

**Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**THESE**

Présentée pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université Louis Pasteur - Strasbourg I**

Sciences de la Vie  
Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Par

**Nelly ETIENNE**

**Etude des fonctions cardiovasculaires du récepteur de la  
sérotonine 5-HT<sub>2B</sub> et de ses interactions avec les hormones  
ovariennes et la synthèse de monoxyde d'azote (NO)**

Soutenue publiquement le 29 septembre 2004

**Membres du jury**

Rapporteur Interne : **Mme Valérie SCHINI-KERTH**, Professeur, Faculté de Pharmacie, Illkirch

Rapporteur Externe : **M. Athanase BENETOS**, Professeur, Faculté de Médecine, Nancy

Rapporteur Externe : **M. Frank LEZOUALC'H**, CR, Faculté de Pharmacie, Paris XI

Directeur de thèse : **M. Luc MAROTEAUX**, Directeur de Recherche, IGBMC, Illkirch

## **Remerciements**

*Je tiens à remercier le docteur Luc Maroteaux d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse tout en sachant que mes activités d'interne en pharmacie ne faciliteraient pas l'avancement de mes travaux. Il a participé à augmenter le trop faible pourcentage d'internes en pharmacie réussissant à mener à terme un doctorat en sciences. Par ailleurs, en me laissant beaucoup d'indépendance au cours de ma thèse, il m'a permis de réaliser mon travail librement et d'acquérir, je pense, beaucoup d'expérience.*

*Je tiens également à remercier le professeur Valérie Schini-Kerth d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteur interne. Son expertise concernant la synthèse de monoxyde d'azote au niveau du système cardiovasculaire a été particulièrement appréciée. Bien qu'une collaboration directe n'ai pu être établie pendant ma thèse avec son équipe, j'espère avoir l'occasion de parfaire mes connaissances en pharmacologie cardiovasculaire au sein de son laboratoire dans un avenir très proche.*

*J'adresse mes vifs remerciements au Professeur Athanase Benetos pour avoir jugé mon travail de thèse en qualité de rapporteur externe. Ses connaissances de la physiologie cardiovasculaire et plus particulièrement de la régulation de la pression artérielle et de la compliance artérielle ont permis d'améliorer l'analyse des résultats obtenus au cours de cette thèse. Je tiens particulièrement à le remercier pour ses commentaires sur la nécessité de publier des résultats négatifs. Ils m'ont particulièrement encouragé à soumettre mes travaux sur les effets de l'ovariectomie chez les femelles knock-out pour le récepteur 5-HT2B.*

*Je tiens enfin à exprimer mes remerciements au Docteur Frank Lezoualc'h pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Son expertise concernant la sérotonine et ses récepteurs était nécessaire pour l'évaluation de ce travail.*

*Mon travail de thèse étant indissociable de ma vie au laboratoire, je tiens à remercier les membres passés et présents du laboratoire de Luc Maroteaux à l'IGBMC.*

*Je tiens plus particulièrement à remercier Bérénice Schaerlinger qui a soutenu sa thèse une semaine avant moi. Par conséquent nous avons partagé les joies et les « galères » de la réalisation d'une thèse pendant 5 années. Elle a été ma « locomotive » pendant les derniers mois de rédaction en me soutenant quotidiennement dans mon travail. Elle aura été une collègue hors paire et elle est devenue une amie hors paire. Merci pour tout...*

*Je suis infiniment reconnaissante envers Canan Nebigil qui aura été pour moi le modèle d'une femme réussissant à concilier recherche scientifique de qualité et vie familiale. Elle a été mon guide lors de mes premiers pas dans un monde dont j'ignorai la plupart des aspects à mon arrivée au laboratoire. J'ai appris énormément à ses côtés tant au niveau technique que dans la façon de mener à bien un projet de recherche. Thanks for everything...*

*Ce travail de thèse n'aurait pas vu le jour sans la participation du personnel du secteur d'exploration cardiovasculaire de l'Institut Clinique de la Souris (ICS). Je tiens à remercier Alain Guimond et Barbara Jung qui ont réalisé des mesures*

*échocardiographiques. Je suis infiniment reconnaissante à Lahcen El Fertak pour l'implantation aortique des sondes de radiotélémetrie et pour m'avoir initié à l'utilisation de ce système ainsi qu'à l'utilisation du système Visitech de mesure de pression à la queue. Je dois enfin remercier le Docteur Laurent Monassier, qui supervise le secteur d'exploration cardiovasculaire de l'ICS, ainsi que pour les premières mesures échocardiographiques réalisées à l'hôpital dans des conditions parfois difficiles.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements au Professeur Jean-Marie Launay pour sa participation à ce travail par la réalisation des expériences de liaisons sur les aortes de souris.*

*L'analyse histologique des tissus animaux n'aurait pas pu être faite sans l'aide des services d'histologie de l'ICS et plus particulièrement, je tiens à remercier Nadia Messaddeq pour les expériences de microscopie électronique.*

*Je tiens à remercier l'ensemble du personnel des services communs de l'IGBMC et plus particulièrement le personnel de l'animalerie qui prend soins quotidiennement des souris et permet de libérer beaucoup de temps aux chercheurs.*

*Je dois également remercier mes amis (à l'IGBMC et dans le monde normal !) et ma famille qui m'ont soutenu tout au long de ces années de thèse. Ils m'ont réconforté dans les moments de doute et je suis heureuse de partager avec eux la satisfaction de « l'avoir fait » !*

*Je tiens finalement à rendre hommage à celui qui partage ma vie depuis quelques années. Il a été présent à chaque instant de ce dur labeur qu'est la réalisation d'une thèse. Il a partagé avec moi (il a supporté...) les moments de stress, les moments de très grand stress...Il m'a fourni une aide inestimable à la fin de la thèse (correction, figures, répétitions, petits fours,...).Maintenant qu'il a passé l'épreuve de la thèse avec succès je peux dire qu'il est prêt à tous accepter (ou presque) de ma part. Merci pour TOUT Momo.*

## AVANT PROPOS

Ces vingt dernières années ont vu se développer la co-existence de deux approches scientifiques différentes pour l'étude de récepteurs couplés aux protéines G et de leurs fonctions cardiovasculaires.

Ainsi, la pharmacologie expérimentale, étudiant les effets des agonistes et des antagonistes *in vivo*, principalement chez le rat, a permis d'élucider les fonctions de nombreux récepteurs couplés aux protéines G dans le contrôle de la pression artérielle par exemple. Et le développement de nouvelles classes médicamenteuses, utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle, provient à n'en pas douter des nombreuses découvertes issues de la pharmacologie expérimentale.

Certains diront que les agents pharmacologiques ne sont jamais spécifiques à 100 %. Ces mêmes personnes sont d'ardents défenseurs de l'utilisation de l'inactivation génétique des récepteurs couplés aux protéines G, afin d'élucider leurs fonctions *in vivo*. Ainsi l'essor fantastique des technologies permettant de produire des souris *knock-out*, semblait être la réponse au manque de sélectivité des ligands pharmacologiques. Malheureusement, le développement des souris *knock-out* trouva un intérêt principalement dans la compréhension du rôle des récepteurs couplés aux protéines G au cours du développement embryonnaire. Ces modèles animaux murins ne correspondent finalement pas au modèle d'étude parfait, d'autant plus que la petite taille des souris complique la plupart des études, notamment dans le domaine de l'exploration cardiovasculaire. Cependant, les avancées techniques dans le domaine de la miniaturisation, ainsi que le développement des animaux génétiquement modifiés de façon conditionnelle (lieu et moment choisis) permet actuellement d'étudier au mieux les fonctions cardiovasculaires *in vivo* des récepteurs couplés aux protéines G. Par ailleurs, ces animaux remplacent peu à peu les rats, pour l'étude des ligands pharmacologiques, lors des phases pré-cliniques.

Ainsi, l'utilisation conjointe de la pharmacologie expérimentale et de la manipulation génétique semble être une bien meilleure stratégie d'étude que leur utilisation séparée. Malgré cela, un article titrait très justement que « *les souris ne se comportent pas comme l'homme, et ne sont même pas comme des petits rats* ». Ainsi, les conclusions de l'expérimentation animale chez la souris restent à prendre avec beaucoup de précautions.

## Abréviations

5-CT : 5-carboxytryptamine  
5-HIAA : *5-hydroxyindole acetic acid*  
5-HT : 5-hydroxytryptamine  
5-HTT : 5-hydroxytryptamine transporteur  
aa : acide aminé  
AA : Acide Arachidonique  
ACTH : Adreno Cortico Trophin Hormone  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : adénosine 5'-diphosphate  
AMP : 3'-5'- adénosine monophosphate  
ANP: *Atrial Natriuretic Peptide*  
ANT-1: *Adenine Nucleotide Translocator*  
ARN: acide ribonucléique  
BH<sub>4</sub> : tetrahydrobioptérine  
BMPR2 : *bone morphogenetic protein receptor type II*  
Bpm : battements par minute  
BW 723C86 : I-[5(2-thienylmethoxy)-1*H*-3-indolyl]propan-2-amine hydrochloride  
CaM : calmoduline  
Cdk : *Cyclin dependent kinase*  
CK-MB : créatine kinase *Muscle – Bone*  
CMD : cardiomyopathie dilatée  
cNOS : *constitutive Nitric Oxide Synthase*  
CNP : peptide natriurétique de type C  
Cox : Cyclo-oxygenase  
CT : 5-carboxytryptamine  
CytP450 : Cytochrome P450  
D : diamètre de l'aorte  
DAG : diacylglycerol  
Dc : débit cardiaque  
DOCA : deoxycorticosterone  
DTD : Diamètre télédiastolique  
DTS : Diamètre télésystolique  
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine  
EDRF : *endothelium-derived relaxing factor*  
EGF : *Epithelial Growth Factor*  
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*  
DOI : (±)-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane  
eNOS : *endothelial Nitric Oxide Synthase*  
ER : *Estrogen receptor*  
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*  
FAD : flavine adénine dinucléotide

Fc : fréquence cardiaque  
FMN : flavine adénine mononucléotide  
GABA : Gamma Amino Butyrique Acid  
GDP : guanosine diphosphate  
GTP : guanosine triphosphate  
GRK : *G-protein coupled Receptor Kinase*  
HAP : hypertension artérielle pulmonaire  
IL-1 $\beta$  : Interleukine 1 $\beta$   
IFN- $\gamma$  : interféron  $\gamma$   
iNOS : *inducible Nitric Oxide Synthase*  
ip : intrapéritonéal  
IP3 : Inositol tri-phosphate  
ITV : intégrale temps vitesse  
KO : *knock-out*  
L-NA : *N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine*  
L-NAME : L-Nitro-Arginine Methyl Ester  
Lox : Lipo-oxygenase  
LPS : lipopolysaccharide  
LSD : Lysergic Acid Diethylamide  
LVEDD : left ventricular end diastolic diameter  
LVESD : left ventricular end systolic diameter  
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*  
mCPP : m-chlorophenylpiperazine  
MDMA : 3,4-methylenedioxymethamphetamine  
MHC : *Myosin Heavy Chain*  
MLCK : *Myosin-Light-Chain Kinase*  
mmHg : millimètre de mercure  
NADPH : *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*  
NF- $\kappa$ B : *Nuclear Factor- $\kappa$ B*  
nNOS : *neuronal Nitric Oxide Synthase*  
NO: *nitric oxide* (monoxyde d'azote)  
NOS: *nitric oxide synthase*  
PAD : pression artérielle diastolique  
PAM : Pression artérielle moyenne  
PAS : pression artérielle systolique  
PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*  
PDZ : *Post-synaptic density-95, Discs large, Zona occludens-1*  
PI3K : *Phosphatidylinositol-3 kinase*  
PIP2 : biphosphate du phosphatidylinositol  
PKA : protéine kinase A  
PKC : protéine kinase C  
PLA2 : Phospholipase A2  
PLC : phospholipase C

Pp : paroi postérieure  
PP : pression pulsée  
PPAR $\alpha$  : *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*   
PW : posterior wall  
Rb : *Retinoblastoma*  
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G  
S : septum  
Sc : sous-cutané  
SDH : succinate déshydrogénase  
SERT : *serotonin transporteur*  
SHR : *Spontaneously hypertensive rat*  
SNC : système nerveux central  
SNP : *sodium nitroprusside*  
TGF- $\beta$  : *Transforming Growth Factor*  
TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*  
VEGF : *vascular endothelial growth factor*  
VES : volume d'éjection systolique  
WT : *wild type*

## Liste des Tableaux

<u>Numéro</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
I	Chronologie des découvertes scientifiques dans le domaine de la sérotonine et de ses récepteurs	18
II	Distribution par espèce et par tissu des récepteurs 5-HT2B	26
III	Affinités (pKi/pKd) des ligands sélectifs aux récepteurs 5-HT2	27
IV	Paramètres échocardiographiques à 6, 8 et 13 semaines chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, ovariectomisées (ovx) ou pas (sham)	106
V	Paramètres échocardiographiques après une injection aiguë de L-NA (80 mg/kg, ip) chez les femelles éveillées, WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	136

## Liste des Figures

<u>Numéro</u>	<u>Titre</u>	<u>Page</u>
1	Voies de synthèse et de métabolisme de la sérotonine	16
2	Représentation graphique de l'actuelle classification des récepteurs de la sérotonine	19
3	Signalisation des RCPGs	29
4	Activation de la voie Gq par le récepteur 5-HT2B	31
5	Activation de la PLA2	32
6	Voie de signalisation mitogène du récepteur 5-HT2B utilisant la transactivation des protéines à activité tyrosine kinase cytoplasmique (Src) et récepteur membranaire (PDGF-R)	34
7	Signal anti-apoptotique du récepteur 5-HT2B permettant de maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale	35
8	Signalisation dépendante du motif PDZ du récepteur 5-HT2B Activation de la synthèse de monoxyde d'azote (NO)	37
9	Représentation schématique du cycle de Désensibilisation- Resensibilisation d'un RCPG	39
10	Interaction entre les récepteurs 5-HT2B et ErbB2 conduisant à une anomalie de formation des trabécules chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B, à une hypoplasie cardiaque et au phénotype de cardiomyopathie dilatée	43
11	Représentation schématique des récepteurs vasculaires de la sérotonine	45
12	Schéma récapitulatif des fonctions du récepteur 5-HT2B dans les cardiomyocytes de souris	52
13	Représentation schématique des différents mécanismes par lesquels l'œstradiol et la testostérone sont associés à l'induction ou à la prévention de l'hypertension artérielle	60

14	Représentation schématique des voies de signalisation potentielles des récepteurs ER $\alpha$ pour l'activation des eNOS	64
15	Résumé des principaux mécanismes de régulation de la pression artérielle	71
16	Revue des mécanismes d'activation des NOS et des effets biologiques du NO	74
17	Régulation de l'activité eNOS dans les caveoles	77
18	Organisation du gène du récepteur de souris 5-HT2B	83
19	Méthode de génération du gène KO pour le récepteur 5-HT2B	83
20	Image en mode 2D des ventricules gauche et droit (petit axe para- sternal)	85
21	Image en mode M du ventricule gauche (petit axe para- sternal)	85
22	Image écho doppler du flux aortique	86
23	Système d'analyse de la pression artérielle BP-2000	88
24	Mise en place d'une souris sur le système BP-2000	88
25	Système d'enregistrement des paramètres cardiovasculaire par radio-téléométrie	89
26	Représentation schématique de l'emplacement idéal pour la sonde de radio-téléométrie dans l'aorte de souris	90
27	Représentation schématique de l'introduction de la sonde de téléométrie dans l'aorte et de sa batterie dans l'espace abdominal	90
28	Exemple d'enregistrement de la pression artérielle pour une souris pendant 10 secondes	91
29	Exemple d'enregistrement de pression artérielle moyenne sur 24 heures pour un groupe de 4 souris	91
30	Conversion biochimique de la L-arginine en L-citrulline	99
31	Evolution du rapport poids de cœur/poids de corps chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B par rapport aux souris WT, en fonction du genre	104
32	Cinétique d'évolution de paramètres échocardiographiques morphologique (masse ventriculaire gauche calculée) et fonctionnel (fraction d'éjection) chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, ovariectomisées (ovx) ou pas (sham)	107
33	Cinétique d'évolution de la pression artérielle systolique et de la fréquence cardiaque après l'ovariectomie chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	110
34	Section de cœur de souris âgées de 2 semaines, inclus en paraffine et coloré par la coloration trichrome de Mallory	111
35	Cinétique d'induction de l'hypertension artérielle par inhibition chronique des NOSs chez les souris WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	115
36	Effet de l'ovariectomie sur l'hypertension artérielle induite par inhibition chronique des NOSs chez les souris WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	117
37	Paramètres échocardiographiques mesurés chez les femelles normotendues (N) ou hypertendues par inhibition des NOSs (L), WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, ovariectomisées (O) ou non (S)	119
38	Analyse histologique de la structure des vaisseaux chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, hypertendues ou normotendues	121

39	Régulation des niveaux d'expression des récepteurs 5-HT1B/1D, 5-HT2A et 5-HT2B dans les aortes de femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, normotendues ou hypertendues par inhibition des NOSs	123
40	Paramètres hémodynamiques enregistrés par radio-télémétrie pendant 24 heures pour les femelles KO et WT pour le récepteur 5-HT2B	128
41	Modifications des paramètres hémodynamiques induites par la phényléphrine (3mg/kg, ip) chez les femelles KO et WT pour le récepteur 5-HT2B	130
42	Modifications des paramètres hémodynamiques induites par le nitroprussiate de sodium (5 mg/kg, sc) chez les femelles KO et WT pour le récepteur 5-HT2B	131
43	Modifications hémodynamiques induites par la L <sup>o</sup> -Nitro-Arginine (80 mg/kg, ip) chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	133
44	Régulation du pulse pressure après injection de L-NA (80 mg/kg, ip) chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	134
45	Représentation schématique du système cardiovasculaire et des facteurs influençant le Pulse Pressure (PP)	135
46	Analyse par Western blot de l'expression de base de la NOS endothéliale (eNOS) et de la NOS inductible (iNOS) dans l'aorte de femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	137
47	Activité basale des NOSs constitutives (cNOS) et inductible (iNOS) dans l'aorte des femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, mesurée par le conversion de l'arginine en citrulline	138
48	Représentation schématique de l'évolution de la taille des cardiomyocytes et de l'influence de l'ovariectomie chez les souris femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B	146
49	Représentation schématique des modifications du profil d'expression des récepteurs de la sérotonine 5-HT1B, 5-HT2B et 5-HT2A chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B hypertendues ou normotendues (induction de l'hypertension par la L-NA)	157
50	Représentation schématique et hypothétique des événements successifs se produisant au cours de l'inhibition chronique de la synthèse de NO chez les souris femelles et conduisant au développement de l'hypertension artérielle systémique selon deux phases	160

# Tables des matières

<b><u>Introduction</u></b>	<b>14</b>
<b><u>1. La sérotonine</u></b>	<b>15</b>
<b><u>2. Les récepteurs de la sérotonine</u></b>	<b>17</b>
<b><u>2.1. Historique et Critères de Classification</u></b>	<b>17</b>
<b><u>2.2. Les récepteurs 5-HT1</u></b>	<b>19</b>
<b><u>2.3. Les récepteurs 5-HT2</u></b>	<b>20</b>
<b><u>2.4. Les récepteurs 5-HT3</u></b>	<b>21</b>
<b><u>2.5. Les récepteurs 5-HT4</u></b>	<b>21</b>
<b><u>2.6. Les récepteurs 5-HT5</u></b>	<b>22</b>
<b><u>2.7. Le récepteur 5-HT6</u></b>	<b>22</b>
<b><u>2.8. Les récepteurs 5-HT7</u></b>	<b>23</b>
<b><u>2.9. Le transporteur de la sérotonine</u></b>	<b>23</b>
<b><u>3. Les récepteurs 5-HT2B</u></b>	<b>24</b>
<b><u>3.1. Découverte</u></b>	<b>24</b>
<b><u>3.2. Généralités : sites d'expression selon l'espèce</u></b>	<b>24</b>
<b><u>3.3. Pharmacologie</u></b>	<b>25</b>
<b><u>3.4. Voies de signalisation du récepteur 5-HT2B</u></b>	<b>28</b>
3.4.1. Signalisation commune à tous les RCPGs	28
3.4.2. Voie de signalisation classique : Gq	30
3.4.3. Activation de la phospholipase A2	31
3.4.4. Voie de signalisation mitogène et transactivation	33
3.4.5. Voie de signalisation anti-apoptotique :	33
Interaction entre les voies PI3K/Akt et ERK1/2/3	
3.4.6. Activation des <i>Nitric Oxide Synthases</i> et rôle du domaine PDZ	36
<b><u>3.5. Trafic des RCPGs</u></b>	<b>38</b>
<b><u>3.6. Fonctions physiologiques du récepteur 5-HT2B</u></b>	<b>40</b>
3.6.1. Mitogène	40
3.6.2. Développement du système nerveux	41
3.6.3. Développement cardiaque	41
3.6.4. Inhibition de l'apoptose dans le coeur	42
3.6.5. Synthèse de NO	44
3.6.6. Rôle du récepteur 5-HT2B dans la physiologie vasculaire	44
<b><u>3.7. Implications du récepteur 5-HT2B en pathologie</u></b>	<b>48</b>
3.7.1. Syndrome carcinoïde	48
3.7.2. Pathologies cardiaques	48
3.7.3. Pathologies vasculaires	53
<b><u>4. Protection cardiovasculaire par les hormones ovariennes</u></b>	<b>57</b>
<b><u>4.1. Modèles animaux présentant des différences selon le genre</u></b>	<b>57</b>
<b><u>4.2. Effets de l'ovariectomie</u></b>	<b>59</b>
<b><u>4.3. Les Oestrogènes : Facteur de Protection Cardiovasculaire</u></b>	<b>61</b>
4.3.1. Les Récepteurs aux Oestrogènes	61
4.3.2. Les Effets Directs des Oestrogènes sur les Vaisseaux	62
4.3.3. Les Oestrogènes et le Cœur	65
4.3.4. Les interactions connues entre la sérotonine et les oestrogènes	65

<b><u>5. La régulation de la pression artérielle</u></b>	<b>67</b>
<b><u>5.1. Le système vasculaire</u></b>	<b>67</b>
<b><u>5.2. La régulation du tonus vasculaire</u></b>	<b>67</b>
5.2.1. Régulation de la concentration en Ca <sup>2+</sup> intracellulaire	67
5.2.2. Rôle de l'endothélium vasculaire	68
5.2.3. Rôle du système rénine angiotensine	69
<b><u>5.3. Hypertension artérielle systémique</u></b>	<b>70</b>
<b><u>6. Nitric Oxide</u></b>	<b>72</b>
<b><u>6.1. Généralités historiques</u></b>	<b>72</b>
<b><u>6.2. Voies de synthèse et mode d'action du NO</u></b>	<b>72</b>
<b><u>6.3. Les Nitric Oxide Synthases (NOSs)</u></b>	<b>73</b>
6.3.1. La NOS neuronale	75
6.3.2. La NOS endothéliale	75
6.3.3. La NOS inductible	78
<b><u>6.4. Les inhibiteurs des NOSs</u></b>	<b>78</b>
<b><u>7. Objectifs généraux de la thèse</u></b>	<b>80</b>
<b><u>Matériels et Méthodes</u></b>	<b>81</b>
<b><u>1. Génération de souris mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT2B</u></b>	<b>82</b>
<b><u>2. Ovariectomie</u></b>	<b>84</b>
<b><u>3. Evaluation de la fonction cardiaque : Echocardiographie</u></b>	<b>84</b>
<b><u>4. Evaluation de la fonction vasculaire</u></b>	<b>87</b>
4.1. Tail cuff method : mesure de la pression artérielle à la queue	87
4.2. Radio-télémetrie	89
<b><u>5. Traitements pharmacologiques</u></b>	<b>92</b>
5.1. Induction de l'hypertension artérielle par L-NA	92
5.2. Agents vasoactifs testé en radio-télémetrie	92
<b><u>6. Histopathologie</u></b>	<b>93</b>
6.1. Sacrifice	93
6.2. Analyse histologique	93
6.2.1. Fixation et inclusion	93
6.2.2. Colorations	94
<b><u>7. Binding</u></b>	<b>96</b>
<b><u>8. Western blot</u></b>	<b>97</b>
<b><u>9. Dosage de l'activité enzymatique des Nitric Oxide Synthases</u></b>	<b>99</b>
<b><u>10. Présentations des résultats - Analyses statistiques</u></b>	<b>101</b>
<b><u>Résultats</u></b>	<b>102</b>
<b><u>Première partie</u></b>	<b>103</b>
Effet de l'ovariectomie sur le phénotype cardiovasculaire des souris femelles <i>knock-out</i> pour le récepteur 5-HT2B	

<a href="#">Introduction</a>	104
<a href="#">But de l'étude</a>	105
<a href="#">Etude cinétique des paramètres échocardiographiques</a>	105
<a href="#">Etude cinétique des paramètres hémodynamiques</a>	108
<a href="#">Analyse du phénotype pré-pubère</a>	109
<a href="#">Conclusion</a>	111
<b><a href="#">Deuxième partie</a></b>	<b>112</b>
<b>Influence de la délétion du récepteur 5-HT2B chez les souris femelles dans l'hypertension induite par inhibition de la synthèse de monoxyde d'azote</b>	
<a href="#">Introduction</a>	113
<a href="#">But de l'étude</a>	113
L'hypertension artérielle induite par la L-NA est biphasique chez les femelles WT	114
L'hypertension artérielle induite par la L-NA est monophasique chez les femelles KO	114
L'ovariectomie protège les femelles vis-à-vis de l'hypertension induite par la L-NA	116
Contrôle de la fonction cardiaque après induction de l'hypertension	118
<a href="#">Analyse histologique en fin de traitement hypertenseur</a>	120
Régulation de l'expression des récepteurs vasculaires de la sérotonine	122
<a href="#">Conclusion</a>	124
<b><a href="#">Troisième partie</a></b>	<b>125</b>
<b>Influence de la délétion du récepteur 5-HT2B sur la compliance aortique et l'activité basale des NOS endothéliales dans l'aorte des souris femelles</b>	
<a href="#">Introduction</a>	126
<a href="#">But de l'étude</a>	126
Paramètres hémodynamiques en conditions basales pendant 24 heures	127
Réponse normale à une injection de phényléphrine chez les femelles KO	129
Réponse normale à une injection de nitroprussiate de sodium chez les femelles KO	129
Augmentation de la pression pulsée par la N $\omega$ -nitro-L-arginine (L-NA) chez les femelles KO	132
Modification de la compliance aortique chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B	135
Expression et activité basales des NOS chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B	137
<a href="#">Conclusion</a>	140
<b><a href="#">Discussion</a></b>	<b>141</b>
<b><a href="#">Première partie</a></b>	<b>142</b>
<b>Influence du récepteur 5-HT2B sur les effets cardiovasculaires induits par l'ovariectomie</b>	
1. Effets de l'ovariectomie sur le développement des fonctions cardiovasculaires adultes	153
2. Effets de l'ovariectomie sur l'hypertension induite par inhibition chronique des NOSs	148
<a href="#">3. Conclusion de la première partie</a>	153
<b><a href="#">Deuxième partie</a></b>	<b>154</b>
<b>Régulation de l'activité des NOSs endothéliales par le récepteur 5-HT2B - Conséquence sur le développement de l'hypertension artérielle induite par inhibition chronique des NOSs et sur la régulation de la compliance artérielle</b>	
1. Rôle du récepteur 5-HT2B dans l'hypertension artérielle induite par inhibition chronique de la synthèse de NO	154
<a href="#">2. Rôle du récepteur 5-HT2B sur la régulation de la compliance artérielle par le NO</a>	162
<b><a href="#">CONCLUSION GENERALE</a></b>	<b>165</b>
<b><a href="#">BIBLIOGRAPHIE</a></b>	<b>166</b>
<b><a href="#">Annexes</a></b>	<b>195</b>

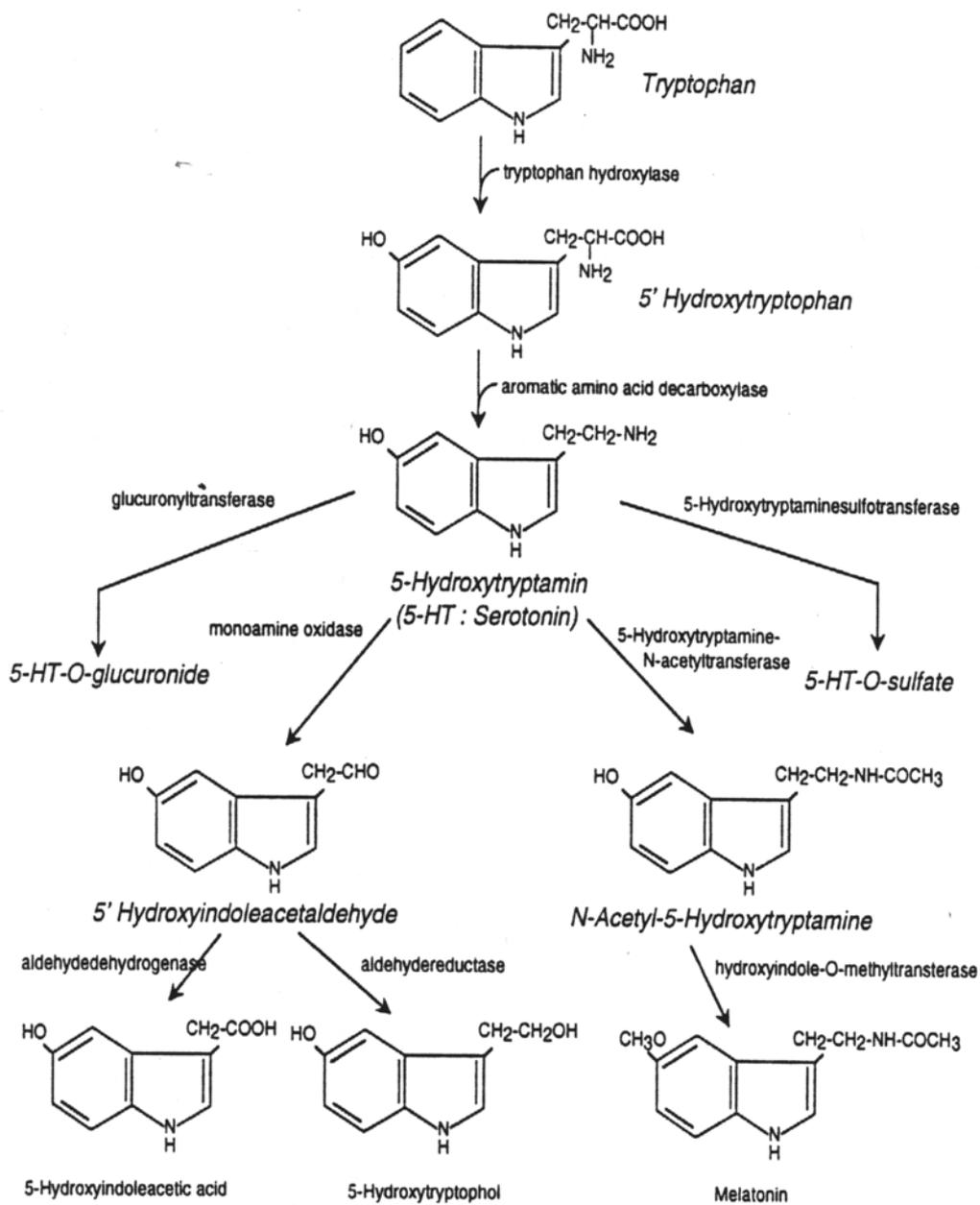
# **Introduction**

# 1. La sérotonine

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) fut initialement décrite il y a une soixantaine d'années pour ses propriétés de constricteur entérique par Erspamer (d'où son synonyme d'entéramine), puis par Page et ses collaborateurs comme étant un vasoconstricteur contenu dans le sang. L'origine du mot sérotonine vient de *sero* pour sérum et *tonin* pour tonus, dénommée ainsi pour la première fois en 1947 (Rapport, 1947) suite à la description d'une substance vasomotrice dans le sérum. Par la suite cette substance fut identifiée chimiquement comme étant la 5-hydroxytryptamine (5-HT) et pu être synthétisée en 1951 par Hamlin et Fischer (Hamlin, 1951). La sérotonine fut mise en évidence d'abord dans le cerveau des mammifères (Twarog and Page, 1953), mais sa distribution, en fait plus hétérogène, fut décrite par la suite (Amin et al., 1954).

La sérotonine est une amine biogène synthétisée de façon endogène à partir du tryptophane par l'action conjointe de la tryptophane hydroxylase et de l'aromatique L-amino acide décarboxylase (**Figure 1**). Elle est produite au niveau du système nerveux central par les cellules du raphé tandis qu'au niveau périphérique sa production émane principalement des cellules entérochromaffines de la paroi intestinale pour être par la suite stockée au niveau des plaquettes sanguines. La sérotonine est ensuite rapidement métabolisée et dégradée par les monoamines-oxydases majoritairement au niveau hépatique et pulmonaire (**Figure 1**).

Ses effets les plus largement connus concernent le système nerveux central (SNC). Ils comprennent entre autres le contrôle de l'appétit, du sommeil, la mémoire et l'apprentissage, la thermorégulation, les comportements et les régulations endocrines. En périphérie, la sérotonine joue un rôle majeur dans l'homéostasie plaquettaire, les fonctions cardiovasculaires, la régulation de la pression artérielle et les mouvements digestifs (Wilkinson et al., 1991). En terme d'évolution, la sérotonine est l'un des plus anciens neurotransmetteurs et parmi eux, probablement celui impliqué dans le plus grand nombre de pathologies, surtout en relation avec le SNC, telles que l'anxiété, la dépression, les troubles obsessionnels-compulsifs, la schizophrénie, la phobie sociale, les troubles paniques, les comportements alimentaires anormaux, l'obésité, la douleur, mais également l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire, la migraine, les nausées, le syndrome de l'intestin irritable et les tumeurs carcinoïdes (Hoyer et al., 2002).



**Figure 1 :** Voies de synthèse et de métabolisme de la sérotonine  
D'après (Rang et al., 2003a)

## 2. Les récepteurs de la sérotonine

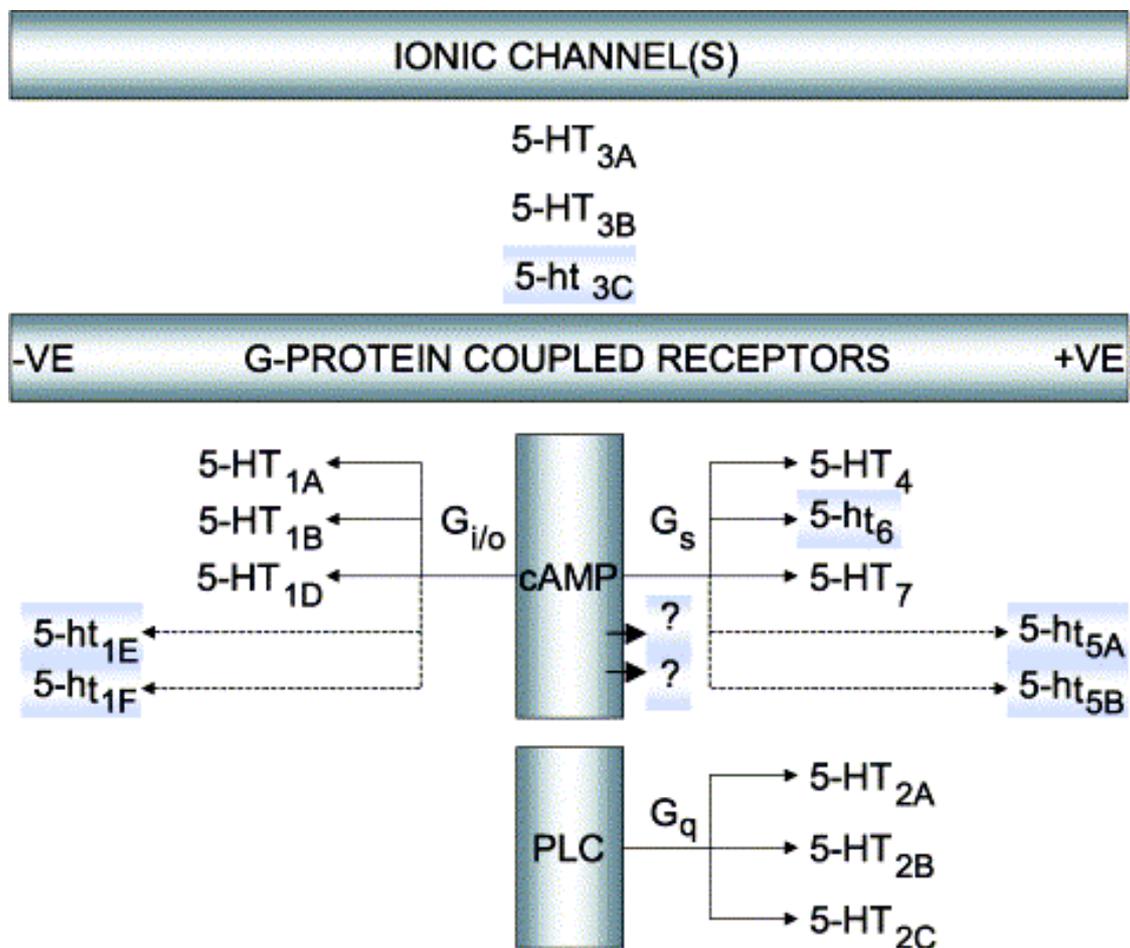
### 2.1. Historique et Critères de Classification (Tableau I)

Un progrès majeur dans la compréhension du rôle de la sérotonine fut l'identification de ses différents récepteurs au cours des dix dernières années. La classification des récepteurs de la sérotonine fut initiée en 1957 par Gaddum et Picarelli (Gaddum and Picarelli, 1957) en distinguant des récepteurs de type M (neurotropes) ou de type D (musculotropes) en raison de la réponse contractile à la sérotonine sur l'intestin du cochon d'Inde qui pouvait être bloquée pour une partie par la morphine (M) et pour la réponse restante par la dibenzylène (D). Il faudra attendre 1979, pour que Peroutka et Snyder démontrent l'existence de deux sites distincts de fixation pour la sérotonine : 5-HT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>2</sub>, ce dernier correspond pharmacologiquement au récepteur D (Peroutka and Snyder, 1979). En 1986, Bradley et coll. proposent une classification en trois groupes : 5-HT<sub>1</sub>-like, 5-HT<sub>2</sub> et 5-HT<sub>3</sub>, ce dernier correspondant aux récepteurs M précédemment décrits (Bradley et al., 1986).

Entre 1987 et 1992, la plupart des récepteurs de la sérotonine ont été clonés, dont au moins 14 types distincts chez les Mammifères (Hoyer et al., 1994; Hoyer et al., 2002) et ils représentent ainsi l'une des plus complexes familles de récepteurs aux neurotransmetteurs. Ils furent classés en 7 classes (5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>) selon leur homologie de séquence et de structure, ainsi que selon leur mécanisme effecteur préférentiel. On compte quatre sous-types (**Figure 2**): les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> couplés aux protéines Gi/o et inhibant l'adénylate-cyclase, les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> couplés aux protéines Gq et activant la phospholipase C, les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> formant des canaux ioniques, et les récepteurs 5-HT<sub>4/6/7</sub> couplés aux protéines Gs et activant l'adénylate-cyclase. Le couplage des récepteurs 5-HT<sub>5</sub> reste encore incertain (activateur ou inhibiteur de l'adénylate cyclase ?) (Hoyer et al., 1994 ; Hoyer et al., 2002). Donc à l'exception des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> qui sont des récepteurs canaux, tous les récepteurs de la sérotonine appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Pendant de nombreuses années, aucun nouveau récepteur n'a été identifié. Cependant, une seconde (5-HT<sub>3B</sub>) voire une troisième (5-HT<sub>3C</sub>) sous-unité du récepteur 5-HT<sub>3</sub> ont été décrites ainsi que plusieurs variants d'épissage alternatif (5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>7</sub>) et des isoformes (5-HT<sub>2C</sub>). Enfin, certains de ces récepteurs ont la capacité de former des homo- ou des hétéro-dimères (5-HT<sub>1B/1D</sub>), comme cela a été montré pour d'autres RCPGs.

**Tableau I** : Chronologie des découvertes scientifiques dans le domaine de la sérotonine et de ses récepteurs

Description	Références et Date
• Existence d'une substance endogène vasoconstrictrice	(Stevens, 1884)
• Augmentation du tonus vasculaire par du sérum obtenu après coagulation du sang	(Brodie, 1900)
• Mise en évidence de la présence d'« entéramine » dans l'estomac	(Vialli, 1933)
• Une substance vasoconstrictrice du sérum est appelée sérotonine	(Rapport, 1947)
• La sérotonine est identifiée comme étant la 5-hydroxytryptamine (5-HT)	(Rapport, 1948)
• Synthèse de la 5-HT	(Hamlin, 1951)
• Mise en évidence de la sérotonine dans le cerveau des Mammifères	(Twarog and Page, 1953)
• La sérotonine agirait comme neurotransmetteur dans le système nerveux central	(Bogdanski et al., 1956)
• Mise en évidence de récepteur à la sérotonine	(Gaddum and Picarelli, 1957)
• Etude des récepteurs à la sérotonine à l'aide de [ <sup>3</sup> H]5-HT	(Marchbanks, 1966)
• La liaison du [ <sup>3</sup> H]LSD peut déplacer la sérotonine	(Farrow and Van Vunakis, 1972)
• Mise en évidence de 2 classes de récepteurs à la sérotonine : 5-HT1 et 5-HT2	(Peroutka and Snyder, 1979)
• Premiers RCPG clonés : la rhodopsine le récepteur β-adrénergique	(Nathans and Hogness, 1983) (Dixon et al., 1986)
• Classification des 3 sous-types majeurs de récepteurs à la sérotonine : 5-HT1-like, 5-HT2 et 5-HT3	(Bradley et al., 1986)
• Premier récepteur à la 5-HT cloné : le récepteur 5-HT1A	(Fargin et al., 1988)
• Clonage du récepteur 5-HT1C (5-HT2C) et du récepteur 5-HT2A	(Julius et al., 1988) (Pritchett et al., 1988)
• Clonage de la plupart des récepteurs de la sérotonine	1987 -1992
• 13 sous-types de récepteurs à la sérotonine identifiés	(Hoyer et al., 1994)
• Clonage du récepteur 5-HT7	(Eglen et al., 1997)
• Dernière classification des récepteurs de la sérotonine comprenant 14 sous-types	(Hoyer et al., 2002)



**Figure 2 :** Représentation graphique de l'actuelle classification des récepteurs de la sérotonine

D'après (Hoyer et al., 2002)

Les récepteurs représentés sur fond bleu n'ont pas démontré de façon définitive des fonctions dans les systèmes natifs.

*Abréviations :* 3'-5' cyclic adenosine monophosphate (cAMP), phospholipase C (PLC), négative (- ve), positive (+ ve).

## 2.2. Les récepteurs 5-HT1

Les récepteurs 5-HT1 (1A, 1B, 1D, 1E et 1F) inhibent la synthèse d'AMP cyclique via leur couplage à une protéine Gi/o. Ils sont également capables de moduler des effecteurs ioniques tels que les canaux calciques ou potassiques. Le récepteur 5-HT1C a été renommé 5-HT2C en raison de son homologie avec la famille 5-HT2 (Hoyer et al., 1994). Tous les récepteurs 5-HT1 ont été clonés chez les rongeurs et chez l'homme, et ils s'expriment tous au niveau du système nerveux central ainsi que dans d'autres tissus (Lanfumeij and Hamon, 2004).

**Les récepteurs 5-HT1A**, largement exprimés dans le système nerveux central, semblent être impliqués dans le contrôle de l'anxiété (Heisler et al., 1998) et la régulation de la libération d'ACTH entre autres (Jorgensen et al., 2001). Ce sont également des autorécepteurs. De plus ils possèdent une fonction régulatrice centrale sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque (Dreteler et al., 1991).

**Les récepteurs 5-HT1B**, exprimés dans le système nerveux central, sont des autorécepteurs contrôlant la libération de la sérotonine et d'autres neurotransmetteurs (acétylcholine, glutamate, dopamine, noradrénaline et GABA) (Pauwels, 1997) et ils jouent un rôle dans le comportement agressif, la consommation d'alcool et les comportements alimentaires (Crabbe et al., 1996; Ramboz et al., 1996; Lucas et al., 1998). Les récepteurs 5-HT1B ont été décrits dans de nombreux tissus vasculaires (artères coronaires humaines et de lapin, artères temporales humaines et artères cérébrales humaines et de porc) où ils induisent une vasoconstriction ou une vasodilatation selon qu'ils sont exprimés respectivement dans le muscle lisse ou l'endothélium vasculaire (Ellwood and Curtis, 1997; Verheggen et al., 1998).

**Les récepteurs 5-HT1D** très faiblement exprimés par rapport aux récepteurs 5-HT1B, possèdent un profil pharmacologique très similaire à ces derniers. Ces deux récepteurs sont des cibles privilégiées des triptans (agonistes 5-HT1B/1D) dans le traitement aigu de la migraine. D'ailleurs ils colocalisent au niveau des ganglions trigéminaux humains avec le peptide *calcitonin gene-related*, la substance P et la *nitric oxide synthase* (NOS) qui sont tous impliqués dans la pathophysiologie de la migraine (Hou et al., 2001).

On connaît peu de choses sur **les récepteurs 5-HT1E et 5-HT1F**, si ce n'est leur localisation commune dans le cerveau. Pourtant il a été observé que le sumatriptan utilisé dans le traitement de la migraine possède aussi une grande affinité pour les récepteurs 5-HT1F, semblable à celle pour les récepteurs 5-HT1D et 5-HT1B (Cravchik and Goldman, 2000). Ce récepteur est donc une potentielle nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la migraine.

## 2.3. Les récepteurs 5-HT2

Le sous-groupe 5-HT2 comprend trois membres : 5-HT2A, 5-HT2B et 5-HT2C. Ils sont tous couplés à des protéines Gq/11 de façon préférentielle et donc activent la phospholipase C qui hydrolyse le biphosphate du phosphatidylinositol (PIP2) en inositol-triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG), entraînant l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2C ont en commun leur localisation préférentielle au niveau du système nerveux central et l'utilisation de leurs antagonistes dans le traitement des psychoses et de la dépression. A l'inverse, le récepteur 5-HT2B n'est que

faiblement exprimé au niveau central et joue un rôle plus important en périphérie et au cours de l'embryogenèse (Leysen, 2004).

**Les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>**, initialement nommés récepteurs D par Gaddum et Picarelli, sont largement distribués dans les tissus centraux et périphériques. Ils sont responsables de la réponse contractile de nombreuses préparations musculaires lisses vasculaires. Au niveau central, ils régulent la sécrétion d'ACTH, de corticostérone, d'ocytocine, de rénine et de prolactine (Van de Kar et al., 2001). De plus, la forte affinité de certains hallucinogènes et médicaments antipsychotiques pour les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> pourrait suggérer un rôle de ces récepteurs dans les psychoses.

**Les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub>** seront décrits en détail dans le prochain chapitre.

**Le récepteur 5-HT<sub>2C</sub>** fut le premier cloné dans cette famille, cependant ses fonctions restent encore peu connues. Il a pour particularité d'être le premier RCPG capable de subir des modifications au niveau de son ARN messager (*RNA editing*) (Sanders-Bush et al., 2003). Son expression est principalement restreinte au SNC et semble être associée aux propriétés anxiolytiques de certains antagonistes du récepteur 5-HT<sub>2C</sub>. Les souris mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT<sub>2C</sub> présentent, par ailleurs, un diabète de type 2, une hyperalgésie et une sensibilité accrue aux crises d'épilepsie (Cravchik and Goldman, 2000) et deviennent obèses en raison d'un comportement alimentaire anormal (Tecott et al., 1995). L'utilisation de la fenfluramine, agissant indirectement sur les récepteurs 5-HT<sub>2C</sub> et 5-HT<sub>1B</sub>, dans le traitement de l'obésité, fut stoppée en raison de graves effets secondaires cardiaques et pulmonaires. Cependant le récepteur 5-HT<sub>2C</sub> reste une cible attrayante pour le développement de nouveaux traitements des comportements alimentaires anormaux (Bickerdike et al., 1999).

## 2.4. Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub>

Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, initialement appelés récepteurs M par Gaddum et Picarelli, appartiennent à la superfamille des récepteurs canaux au même titre que les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine et les récepteurs du GABA par exemple. De même que pour les autres membres de cette superfamille, le canal a une structure pentamérique composé des sous-unités 5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub> et peut-être 5-HT<sub>3C</sub> (van Hooft and Yakel, 2003). Qu'ils soient situés sur des neurones centraux ou périphériques, les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> induisent une dépolarisation rapide consécutive à l'ouverture de canaux potassiques. Ils ont été impliqués dans les vomissements induits par la chimiothérapie ou la radiothérapie d'où l'utilisation d'antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, de la famille des sétrons (ondansétron par exemple), pour lutter contre ces vomissements. De plus, ces antagonistes pourraient être utilisés dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable, de part leur capacité à réduire les sécrétions et la motilité intestinales. Les effets centraux des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> semblent limités bien que l'ondansétron aie montré une certaine efficacité sur la réduction de la consommation d'alcool (Costall and Naylor, 2004).

## 2.5. Les récepteurs 5-HT<sub>4</sub>

Après le clonage du récepteur 5-HT4 (Gerald et al., 1995) (700 Kb, 38 exons), huit isoformes ont été décrites (a, b, c, d, e, f, g, n). Elles ont pour origine un épissage alternatif survenant dans le domaine C terminal de la protéine. Un autre variant est caractérisé par une insertion de 14 acides aminés dans la seconde boucle extracellulaire du récepteur. L'expression des différentes isoformes n'est pas semblable. Ainsi, l'isoforme 5-HT4d, exprimée uniquement chez l'homme, a une expression restreinte à l'intestin, tandis que les autres isoformes sont exprimées dans les oreillettes cardiaque, le muscle lisse vasculaire et le cerveau (Blondel et al., 1998; Mialet et al., 2000; Ullmer et al., 1995). Une caractéristique importante de ces récepteurs est leur faible activité intrinsèque par rapport aux autres récepteurs de la sérotonine. Les récepteurs 5-HT4 jouent un rôle dans la motilité gastro-intestinale, la mémoire et l'apprentissage, dans les arythmies cardiaques, les maladies neurodégénératives et l'incontinence urinaire (Hoyer et al., 2002). Plus récemment, il a été montré que le récepteur 5-HT4g régule le métabolisme du précurseur de la protéine amyloïde (APP695) impliqué dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (Lezoualc'h and Robert, 2003). D'ailleurs, un composé (SL65.0155) a été testé dans le cadre d'essai clinique chez des patients atteints de troubles de la mémoire et de démence (Bockaert et al., 2004; Moser et al., 2002). Enfin, les souris mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT4 présentent une réponse atténuée vis-à-vis de l'hypophagie et de l'hypolocomotion induites par le stress, ainsi qu'une hypersensibilité aux crises de convulsions (Compan et al., 2004).

## 2.6. Les récepteurs 5-HT5

Assez peu de choses sont connues sur cette classe de récepteurs de la sérotonine, d'où l'usage du terme de récepteurs « orphelins ». Deux sous-types ont été identifiés chez les rongeurs (5-HT5A et 5-HT5B) mais seul le récepteur 5-HT5A possède un homologue humain, la séquence codante pour le récepteur 5-HT5B étant interrompue par des codons stop (Grailhe et al., 2001; Matthes et al., 1993). Le couplage fonctionnel initialement décrit était l'inhibition de l'adénylate cyclase par une protéine Gi/o, mais il semble que les récepteurs 5-HT5 exercent aussi, entre autres, un couplage positif sur la synthèse d'AMP cyclique. Leurs sites d'expression sont principalement centraux (astrocytes). La fonction du récepteur 5-HT5B *in vivo* reste inconnu. Cependant les deux sous-types ont une forte affinité pour le LSD, une amphétamine, et les souris mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT5A ont montré une réponse diminuée vis-à-vis de la locomotion induite par le LSD (Nelson, 2004).

## 2.7. Le récepteur 5-HT6

Le récepteur 5-HT6 est l'un des récepteurs de la sérotonine le plus récemment identifié (Monsma et al., 1993) et il est couplé positivement à l'adénylate cyclase via une protéine Gs. Possédant une forte affinité pour de nombreuses molécules utilisées en psychiatrie, le récepteur 5-HT6 est abondamment exprimé dans certaines régions du SNC (système limbique et cortex) où il permet de réguler l'activité des neurones glutamatergiques et cholinergiques. Enfin, le récepteur 5-HT6 semble être impliqué dans la régulation de la cognition et des comportements alimentaires (Hoyer et al., 2002; Woolley et al., 2004).

## 2.8. Les récepteurs 5-HT7

Le récepteur 5-HT7 a été cloné chez l'homme et les rongeurs. Il module positivement le taux d'AMP cyclique via une protéine Gs. L'épissage alternatif permet de distinguer quatre isoformes modifiées dans leur partie C-terminale, mais qui ne présentent aucune différence quant à leur pharmacologie ou leur site d'expression. Le récepteur 5-HT7 est exprimé principalement au niveau du cerveau mais également dans la rate, le tractus gastro-intestinal, les reins, le cœur et dans le muscle lisse vasculaire où il induit une vasodilatation. Il serait impliqué dans la régulation des rythmes circadiens et des comportements affectifs, dans l'anxiété, les anomalies cognitives et la migraine. Il possède par ailleurs un domaine PDZ dans sa partie C-terminale intra-cytoplasmique, mais la fonction de ce domaine d'interaction protéique n'a pas encore été élucidée. *Pour revue* : (Eglen et al., 1997; Hoyer et al., 2002; Thomas and Hagan, 2004; Vanhoenacker et al., 2000).

## 2.9. Le transporteur de la sérotonine

Le transporteur de la sérotonine (SERT = *serotonin transporteur*, 5-HTT) d'abord identifié au niveau neuronal (Blakely et al., 1991; Hoffman et al., 1991) est une protéine membranaire appartenant à la superfamille des transporteurs membranaires Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dépendant tels que le transporteur de la dopamine ou de la noradrénaline. Le SERT permet le transport de la sérotonine de l'espace extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Physiologiquement, le SERT, localisé sur les neurones et les astrocytes, est le principal mécanisme d'inactivation du signal sérotoninergique au niveau neuronal en capturant la sérotonine (Masson et al., 1999). Deux types de molécules peuvent cibler le SERT : les inhibiteurs de recapture, tels que la fluoxétine, qui bloquent le transport de la sérotonine mais ne sont pas transportés eux-mêmes ; et les activateurs de libération, tels que la fenfluramine, le mCPP (m-chlorophenylpiperazine) et le MDMA (« ecstasy ») qui sont transportés à l'intérieur de la cellule où ils activent le processus d'échange de neuromédiateurs et inhibent le stockage vésiculaire de la sérotonine. Le SERT est principalement connu pour l'utilisation des inhibiteurs de recapture de la sérotonine (la fluoxétine, la paroxétine et le citalopram) largement utilisés dans le traitement de la dépression et comme psychostimulants (Inoue et al., 2002). Ils représentent la plus importante classe médicamenteuse ayant émergé au vingtième siècle.

L'utilisation de la fenfluramine pour ses propriétés anorexigènes fut interrompue en raison de ses effets secondaires graves du type hypertension artérielle pulmonaire (HAP) et cardiopathies valvulaires. En effet le transporteur de la sérotonine semble jouer un rôle dans le développement de l'hypertension pulmonaire artérielle (Eddahibi et al., 2002), mais l'affinité récemment découverte de cette molécule pour les récepteurs 5-HT2B et 5-HT2C a partiellement remis en question le lien entre le SERT et l'HAP. Enfin de récents travaux ont montré que le SERT, présent dans les cellules endothéliales et musculaires lisses de l'aorte, est surexprimé dans un modèle d'hypertension DOCA-salt chez le rat (Ni et al., 2004).

## 3. Les récepteurs 5-HT2B

### 3.1. Découverte

Le récepteur 5-HT2B initialement classé comme un récepteur atypique, a été décrit dès 1957 par Vane et coll. (Vanes, 1957) et caractérisé de façon fonctionnelle comme étant le récepteur hautement sensible à la sérotonine capable d'induire la contraction du fundus d'estomac de rat (Cohen and Fludzinski, 1987).

Puis, le récepteur 5-HT2B fut cloné simultanément grâce à l'utilisation de banques d'ADN complémentaires obtenues à partir de fundus d'estomac de rat (Foguet et al., 1992; Kursar et al., 1992), et à partir de cerveau de souris (Loric et al., 1992). Il fut d'abord appelé, 5-HT2-like, NP75, 5-HT2C ou encore 5-HT2F en raison de son homologie avec la classe de récepteur 5-HT2. Mais c'est la nouvelle classification des récepteurs de la sérotonine en 1994 par Hoyer qui nommât définitivement ce nouveau récepteur : 5-HT2B (Hoyer et al., 1994).

Le clonage, dans notre laboratoire (Choi et al., 1994), et dans d'autres laboratoires (Kursar et al., 1994; Schmuck et al., 1994), de l'homologue humain du récepteur 5-HT2B, à partir de banques d'ADN complémentaires de foie humain, d'une lignée cellulaire de neuroblastome (SHSY-5Y) et d'utérus humain, permit d'identifier une protéine de 481 acides aminés pour un poids moléculaire de 55 kilo-Daltons environ, et possédant de façon surprenante une assez faible homologie avec les récepteurs 5-HT2B de rat et de souris (79% et 82% respectivement).

### 3.2. Généralités : sites d'expression selon l'espèce (Tableau II)

Les premiers sites d'expression identifiés furent le cœur, l'intestin, et plus faiblement le cerveau et le rein de souris (Loric et al., 1992), ainsi que les embryons de souris à 10,5 jours de développement et la lignée cellulaire d'origine rénale (BHK). Les sites majeurs d'expression de ce récepteur, chez l'adulte, sont le système cardio-vasculaire et gastro-intestinal y compris les muscles lisses de l'estomac et de l'intestin, mais également les muscles lisses des poumons, l'endothélium vasculaire et le myocarde de l'homme (Bonhaus et al., 1995; Choi et al., 1994; Schmuck et al., 1994), de la souris (Choi and Maroteaux, 1996; Loric et al., 1992) et du rat (Baxter et al., 1995; Foguet et al., 1992; Kursar et al., 1992; Ullmer et al., 1995). Le récepteur 5-HT2B a été identifié dans les valves cardiaques humaines, de porc, de chien (Fitzgerald et al., 2000). Son expression a été mise en évidence dans différents tissus méningés humains et il a été montré que la stimulation de ce récepteur induit une relaxation de l'artère cérébrale de porc par la libération de monoxyde d'azote. Cette expérience conforte l'hypothèse selon laquelle le récepteur 5-HT2B, localisé dans les cellules endothéliales des vaisseaux méningés, serait responsable du déclenchement de la crise de migraine par formation de NO (Schmuck et al., 1996). Des ARN messagers du récepteur 5-HT2B ont été détectés dans la moelle épinière de rat, de chat, de singe et humaine. Des transcrits 5-HT2B ont également été mis en évidence dans les ganglions cervicaux supérieurs du cochon d'Inde où il serait responsable d'une dépolarisation lente (Newberry et al., 1996). L'expression au niveau central du récepteur 5-HT2B reste cependant nettement inférieure à celle des autres membres de la famille des récepteurs 5-HT2. Plus récemment, le récepteur 5-HT2B a été localisé chez le poulet dans différents sous-types cellulaires de l'os (ostéocytes notamment) (Westbroek et al., 2001).

### 3. 3. Pharmacologie (Tableau III)

La pharmacologie du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> se différencie de celle des autres membres de la famille 5-HT<sub>2</sub>. En effet, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> se caractérise par une très forte affinité pour la sérotonine par rapport aux autres membres de la famille 5-HT<sub>2</sub>. Il possède une affinité 300 fois plus forte pour la sérotonine que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Le K<sub>d</sub> (coefficient de dissociation) du DOI [(±)-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane], un agoniste de référence, est de 25nM pour le 5-HT<sub>2B</sub> humain. La spécificité de ligand est également variable entre les différents sous-types : en effet le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> humain lie préférentiellement la 5-HT > la ritanserin > le SB 204741 > la spiperone, tandis que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> humain fixe préférentiellement la ritanserin > la spiperone > la 5-HT > le SB204741 et le récepteur 5-HT<sub>2C</sub>, la ritanserin > la 5-HT > la spiperone = le SB204741. Actuellement plusieurs antagonistes 5-HT<sub>2B</sub> sélectifs sont à l'étude pour la prévention de la migraine (MT-500) et le traitement du syndrome de l'intestin irritable (Mucke, 2001; Poissonnet et al., 2004).

La pharmacologie de ce récepteur présente une différence en fonction de l'espèce : ainsi une forte affinité pour la kétansérine et une faible affinité pour la yohimbine différencient le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> humain de son homologue murin (Bonhaus et al., 1995). De plus, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> de souris possède une affinité pour la sérotonine 100 fois moins forte que ses homologues humain (1 µM versus 10 nM) ou de rat et l'ordre d'affinité 5-HT>5-CT (5-carboxytryptamine) observé chez l'homme et le rat est inversé dans le cas de la souris (Colas et al., 1997; Kursar et al., 1994; Loric et al., 1992; Wainscott et al., 1993; Wainscott et al., 1996). Enfin, les affinités de la spiperone et de la kétansérine pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> de souris sont 50 fois plus importantes que celles observées chez le rat et l'homme.

Si on considère la variabilité de pharmacologie et d'expression du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> selon l'espèce étudiée, l'analyse de ses fonctions sera d'autant plus difficile à réaliser et les extrapolations concernant les modèles animaux par rapport à la pathologie humaine d'autant plus délicates. Le niveau de difficulté s'accroît si on prend en compte les multiples voies de signalisation que ce récepteur est capable d'activer.

**Tableau II : Distribution par espèce et par tissu des récepteurs 5-HT2B**

(Liste non exhaustive reflétant l'état des connaissances en 2004 ; certains organes sont mentionnés sans distinction d'espèce par manque d'information)

	homme	rat	souris	autres
<b>Système nerveux central</b>				
méninges	+			
cerveau adulte	+/-	+	+	+ (chat, singe)
cerveau foetal	+		++	
moelle épinière	+	+		+ (chat, singe)
cortex	+/-	+		
ganglions cervicaux				+ (cochon d'Inde)
rétine				
<b>Système gastro-intestinal</b>				
intestin	+	+	+++	
estomac	+	+++	++	
foie, pancréas, rate	+			
tissu adipeux, glandes salivaires				
système nerveux entérique		+	+	
<b>poumons</b>	+		+	
<b>Cœur</b>				
valves	++	+	+++	+ (porc, chien)
cœur adulte	+			
cardiomyocytes	+/-			
fibroblastes			+	
endocarde			+	
<b>Système vasculaire</b>				
artère pulmonaire	+		+	
endothélium vasculaire	+	+	+	
aorte	+	+	+	
artères mammaires	+		+	
artères cérébrales	+			+ (porc)
muscle lisse vasculaire		+	+	
<b>rein</b>				
thymus, thyroïde, surrénales	++		+	
muscle squelettique			+	
placenta	+			
ovaires			+	
utérus, glandes mammaires				
testicule, prostate				
embryon			+	
os (ostéocytes, ostéoblastes)			+	+ (poulet)
<b>Lignées cellulaires</b>				
SHSY-5Y (neuroblastome)	+			
BHK (origine rénale)			+	
HPMEC-ST1-6R (origine endothéliale pulmonaire)	+			
HMEC-1 (endothélium de micro-vaisseaux cutanés)	+			
<b>Situations pathologiques</b>				
hypertension artérielle pulmonaire:	++		++	
hypertension artérielle systémique :		++		
tumeurs carcinoïdes	++			

**Tableau III : Affinités (pKi/pKd) des ligands sélectifs aux récepteurs 5-HT2**

D'après (Baxter et al., 1995) nd : non déterminé, (H) : humain

Ligands selon leur sélectivité	5-HT2A	5-HT2B	5-HT2C
<b>Récepteur 5-HT2A</b>			
<b>Spiperone</b> (antagoniste)	8,8	5,5	5,9
<b>MDL100907</b> (antagoniste)	9,4	7,04	6,9
<b>Ketanserin</b> (antagoniste)	8,9	5,4	7
	nd	7,26 (H)	nd
<b>Amperozide</b>	7,8	nd	5,9
<b>Risperidone</b>	9,7	nd	7,5
<b>Récepteur 5-HT2B</b>			
<b>lisuride</b>	nd	8,98 (H)	nd
<b>5-methoxytryptamin</b> (agoniste)	7,4	8,8	6,2
<b><math>\alpha</math>-methyl-5-HT</b> (agoniste)	6,1	8,4	7,3
<b>SB204741</b> (antagoniste)	<5,3	7,9	<6,0
	<5,3 (H)	7,13 (H)	<6,0 (H)
<b>BW723C86</b> (agoniste partiel)	<5,4	7,9	<6,9
	7,0 (H)	7,9 (H)	6,3 (H)
<b>LY 266097</b> (antagoniste)	nd	9,62 (H)	nd
<b>LY 272015</b> (antagoniste)	7,6	9,9	7,9
<b>SB 215505</b> (antagoniste)	6,8	8,3	7,7
	nd	8,93 (H)	nd
<b>RS 127445 / MT-500</b> (antagoniste)	6,3	9,5	6,4
<b>EGIS-7625</b> (antagoniste)	6,2	9	7,7
<b>Récepteurs 5-HT2B et 5-HT2C</b>			
<b>SB200646A</b> (antagoniste)	5,2	7,5	6,9
	<5,3 (H)	nd	7,0 (H)
<b>m-chlorophenylpiperazine (mCPP)</b> (agoniste partiel)	6,7	7,9	7
	7,2 (H)	nd	7,3 (H)
<b>MK212</b> (agoniste)	4,8	5,9	6,2
	nd	6,82 (H)	nd
<b>Ligands non-sélectifs</b>			
<b>LY53857</b> (antagoniste)	7,3	8,2	8,1
<b>ICI170809</b> (antagoniste)	9,1	nd	8,3
<b>Ritanserin</b> (antagoniste, agoniste inverse)	8,8	8,3	8,9
<b>Mianserin</b> (antagoniste)	8,1	7,3	8
<b>DOI</b> (agoniste)	7,3	7,4	7,8

## 3. 4. Voies de signalisation du récepteur 5-HT2B

### 3.4.1. Signalisation commune à tous les RCPGs

Le récepteur 5-HT2B appartient à la superfamille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) dont la première description remonte à 1983 avec le clonage de la rhodopsine (Nathans and Hogness, 1983) et plus tard le clonage du récepteur  $\beta$ -adrénergique (Dixon et al., 1986). Par la suite, plus de 2000 RCPGs ont été décrits. Ils possèdent en commun une structure à 7 domaines transmembranaires, un segment N-terminal extracellulaire, trois boucles intracellulaires, trois boucles extracellulaires et enfin un segment C-terminal intracellulaire (**Figure 3**). Chaque domaine transmembranaire possède une structure conservée et il est généralement constitué de 20 à 27 acides aminés. A l'opposé, les autres domaines sont beaucoup plus variables : le domaine N-terminal est composé de 7 à 595 acides aminés, les boucles de 5 à 230 acides aminés et le domaine C-terminal de 12 à 359 acides aminés. Cette importante variabilité de séquence explique en grande partie la diversité de structures et de fonctions des RCPGs (Ji et al., 1998). Le nombre impair de domaines transmembranaires permet l'exposition de l'extrémité N-terminale à l'extérieure de la cellule, site de glycosylation et de fixation du ligand, et l'extrémité C-terminale à l'intérieur de la cellule, accessible pour la phosphorylation ou la palmitoylation conduisant à la désensibilisation et à l'internalisation des récepteurs. (**Figure 3**)

Dans le cas des RCPGs pour les amines biogènes, telle que la sérotonine, il semble que le domaine transmembranaire 3 soit le site de fixation du ligand, tandis que les domaines 5 et 6 joueraient un rôle dans la transduction du signal (Ji et al., 1998).

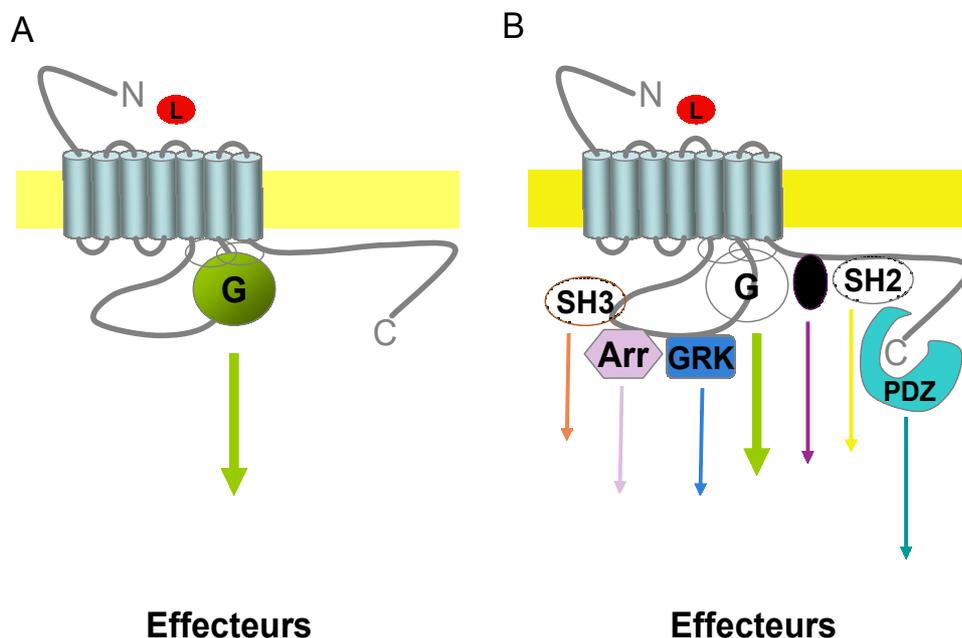
L'activation des RCPGs se divise classiquement en plusieurs étapes :

1. Génération d'un signal induit par la fixation d'un ligand,
2. Transfert de ce signal à travers les domaines transmembranaires,
3. Transduction du signal à des seconds messagers intra-cytoplasmiques et
4. Désensibilisation.

Pendant de nombreuses années, il était communément admis que les RCPGs, comme leur nom l'indique, activaient seulement les protéines G hétérotrimériques. Les changements de conformation du récepteur activé permettent l'interaction avec les protéines G, induisant ainsi l'échange d'une molécule de GDP (guanosine diphosphate) pour une molécule de GTP (guanosine triphosphate). Il s'ensuit une dissociation du complexe hétérotrimérique en 2 sous-unités,  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ , capables de réguler différents effecteurs intracellulaires classiques (en fonction du type de protéine G en jeu) tels que l'adénylate cyclase, les phospholipases ou des canaux ioniques. Mais actuellement, de nouveaux partenaires ainsi que de nouvelles voies de signalisation intracellulaires des RCPGs sont largement décrits (Hall et al., 1999). Parmi eux on distingue les *G protein-coupled receptor kinases* (GRKs) qui phosphorylent les RCPGs, et permettent ainsi une nouvelle interaction avec la  $\beta$ -arrestine, impliquée dans les phénomènes de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs. La  $\beta$ -arrestine peut également intervenir dans l'activation d'autres voies de signalisation en servant de protéine adaptatrice. C'est notamment le cas pour la stimulation des protéines à activité tyrosine kinase de la famille Src dont la conséquence finale est l'activation de la voie des MAPK (*Mitogen Activated Phospho Kinase*). Par ailleurs les RCPGs peuvent interagir avec des protéines d'échafaudages, via des motifs spécifiques (SH2, SH3), semblables à ceux des récepteurs à activité tyrosine kinase. La régulation de petites protéines G, telles que Ras, Rab, Rho, ARF a

été également largement décrite. Enfin certains RCPGs, possédant un long domaine C-terminal, contiennent un domaine d'interaction protéique appelé domaine PDZ (Post-synaptic density-95, Discs large, Zona occludens-1), pouvant s'associer à d'autres domaines PDZ présents dans de nombreuses familles de protéines structurales, d'enzymes ou de récepteurs.

La description de l'ensemble des effecteurs intracellulaires des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> identifiés à ce jour, ajoutés à ceux de la voie classique des protéines G, permettent d'envisager une régulation très complexe des effets de ces récepteurs. (**Figure 3**)



### **Figure 3 : Signalisation des RCPGs**

D'après (Hall et al., 1999)

- A. Modèle classique de signalisation. La fixation du ligand (L) sur le récepteur entraîne l'activation de 3 protéines : le RCPG lui-même, une protéine G hétérotrimérique (G) qui active à son tour un effecteur intracellulaire.
- B. Nouveau modèle de signalisation multiprotéique. Lors de l'activation du RCPG par son ligand, plusieurs protéines peuvent venir s'associer aux parties cytosoliques du RCPG, et ceci indépendamment de la protéine G hétérotrimérique, comme l'arrestine (Arr), des Kinases (GRK), des protéines contenant divers domaines d'interaction (SH2, SH3, PDZ) ou encore des petites protéines g (g).

### 3.4.2. Voie de signalisation classique : Gq

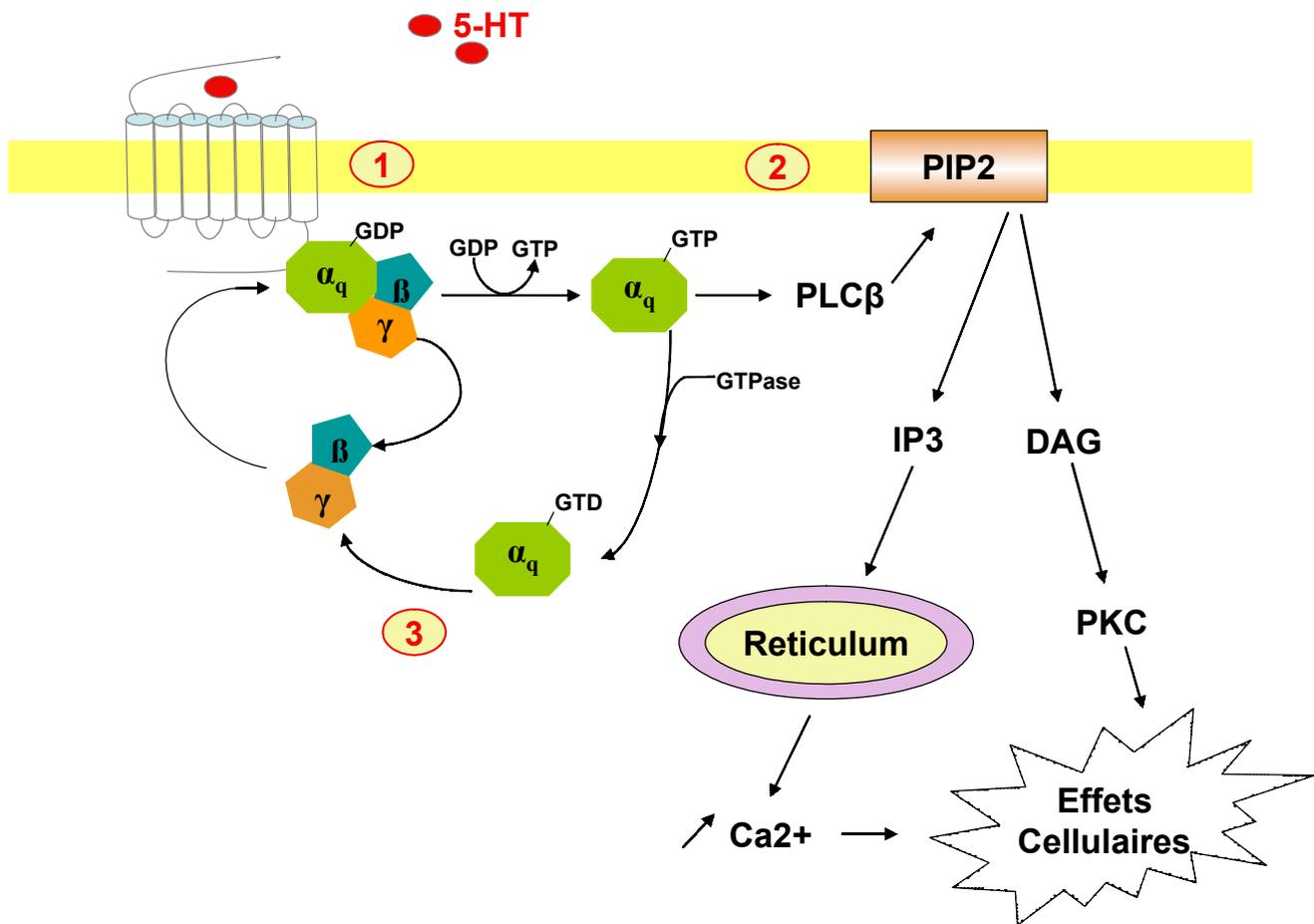
La voie classique de signalisation se décompose en trois étapes (**Figure 4**) :

**1) Initiation du signal** : la signalisation débute lorsque la sérotonine ou un autre ligand se lie au récepteur et favorise son isomérisation vers une conformation active. Dans cet état activé, le récepteur peut interagir avec une protéine Gq hétérotrimérique et la stimuler en catalysant l'échange d'un GDP pour un GTP à un site spécifique de liaison des nucléotides guanylés sur la sous-unité  $G\alpha$ . Cette étape implique la formation d'un complexe ternaire formé par le ligand, le récepteur et la protéine G et au cœur duquel des interactions allostériques initient la transduction du signal.

**2) Propagation du signal** : Une fois activée, la protéine G se dissocie en une sous-unité  $\alpha$  liée au GTP et un dimère  $\beta\gamma$ . Ces deux entités peuvent interagir avec différents effecteurs. Dans le cas du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, la sous-unité  $G\alpha_q$  active la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le biphosphate du phosphatidylinositol (PIP<sub>2</sub>) en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et 1,2-diacylglycerol (DAG). Ce dernier active par la suite une protéine kinase C (PKC). Par ailleurs, l'IP<sub>3</sub> en se liant aux canaux calciques de type ryanodine du réticulum, induit la libération et l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme. Cette libération de calcium est à l'origine de la contraction observée dans le muscle lisse entérique par exemple (Foguet et al., 1992; Loric et al., 1995; Schmuck et al., 1994; Wainscott et al., 1993). Néanmoins le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> n'a pas montré d'induction significative de cette hydrolyse de l'IP<sub>3</sub> dans l'estomac de rat (Cohen and Fludzinski, 1987), ni dans la vasculature de rat (Ellis et al., 1995), ni même dans les cellules isolées de tumeur carcinoïde (Manivet et al., 2000). Par ailleurs il a été montré que le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, présent dans les cellules endothéliales pulmonaires, pouvait induire une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires sensibles à la ryanodine, mais sans faire intervenir la synthèse d'IP<sub>3</sub> (Ullmer et al., 1996). De façon intéressante cette voie est faiblement activée par le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, si on compare ce même couplage avec les autres récepteurs 5-HT<sub>2</sub>. Cela laisse envisager que les autres voies de signalisation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> jouent un rôle d'autant plus important *in vivo* par rapport à la voie de la phospholipase C.

**3) Arrêt du signal** : le signal propagé par la protéine G est transitoire. Il est interrompu lorsque le GTP est hydrolysé en GDP grâce à l'activité enzymatique intrinsèque de la sous-unité  $G\alpha$ , entraînant la réassociation de l'hétérotrimère  $\alpha\beta\gamma$  inactif portant une molécule de GDP et ramenant le système à son état basal.

Comme on pouvait s'y attendre, mis à part cette voie classique de transduction du signal par un RCPG, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> est capable d'activer de nombreuses autres voies. Successivement, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> a montré sa capacité à stimuler la phospholipase A<sub>2</sub> et la voie de l'acide arachidonique ainsi que les enzymes responsables de la production de monoxyde d'azote : les *Nitric Oxide Synthases* (NOSs). Enfin ce récepteur a la capacité d'activer les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes de prolifération et/ou d'apoptose.



**Figure 4 :** Activation de la voie Gq par le récepteur 5-HT2B

### 3.4.3. Activation de la phospholipase A2

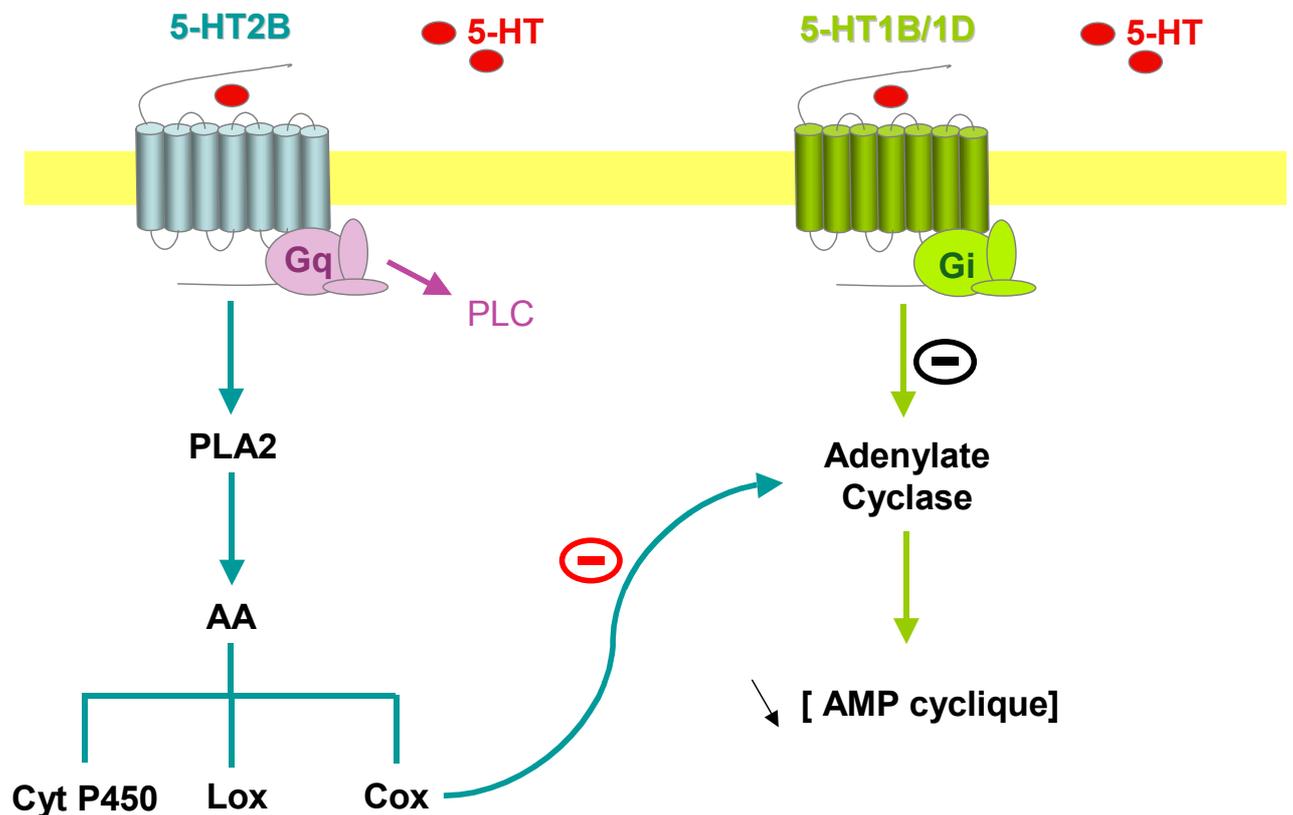
Les cellules 1C11 de carcinomes embryonnaires de souris ont la capacité de se différencier en cellules sérotoninergiques exprimant les récepteurs 5-HT1B/1D et 5-HT2B à deux jours de différenciation, puis, également le récepteur 5-HT2A, au quatrième jour de différenciation.

A deux jours de différenciation, l'activation du récepteur 5-HT2B stimule la phospholipase A2 (PLA2) et ainsi la libération d'acide arachidonique (AA) (Tournois et al., 1998). Ce second messager entraîne la stimulation, via les prostacyclines, de la cyclo-oxygénase (Cox), qui elle-même va bloquer le signal dépendant de la protéine Gi (l'inhibition de la synthèse d'AMP cyclique), induit par l'activation du récepteur 5-HT1B/1D. A quatre jours de différenciation, le récepteur 5-HT2A se couple préférentiellement à la voie de la PLA2 au dépend du récepteur 5-HT2B, bien que l'expression de celui-ci ne soit pas modifiée. Les récepteurs de la sérotonine sont donc capables d'interagir entre eux (**Figure 5**) et ses

expériences démontrent que le couplage des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> dépend de leur environnement et notamment de la présence ou pas d'un autre récepteur présentant le même type de couplage (le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>).

Les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>1B/1D</sub> sont capables de co-localiser au niveau central (hippocampe) mais également en périphérie dans les cellules endothéliales. De plus, les agonistes 5-HT<sub>1B/1D</sub> tel que le sumatriptan sont utilisés dans le traitement de la crise de migraine (Doenicke et al., 1988) et certains antagonistes 5-HT<sub>2</sub> ont une action prophylactique sur la migraine. Donc l'expression conjointe des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> (Schmuck et al., 1996) et 5-HT<sub>1B/1D</sub> dans les vaisseaux méningés laisse supposer une potentielle interaction *in vivo*.

De façon remarquable, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> peut également être couplé à une protéine G $\alpha$ 13 dans les cellules 1C11 pour activer les NOS inductibles (Manivet et al., 2000). Cette sous-unité de protéine G est connue pour activer la PLA<sub>2</sub>, mais l'existence d'un lien entre ces deux observations reste à vérifier.



**Figure 5 :** Activation de la PLA<sub>2</sub>

D'après (Tournois et al., 1998)

Abréviations : PLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>), AA (acide arachidonique), CytP450 (Cytochrome P450), Lox (Lipo-oxygenase), Cox (Cyclo-oxygenase)

### 3.4.4. Voie de signalisation mitogène et transactivation

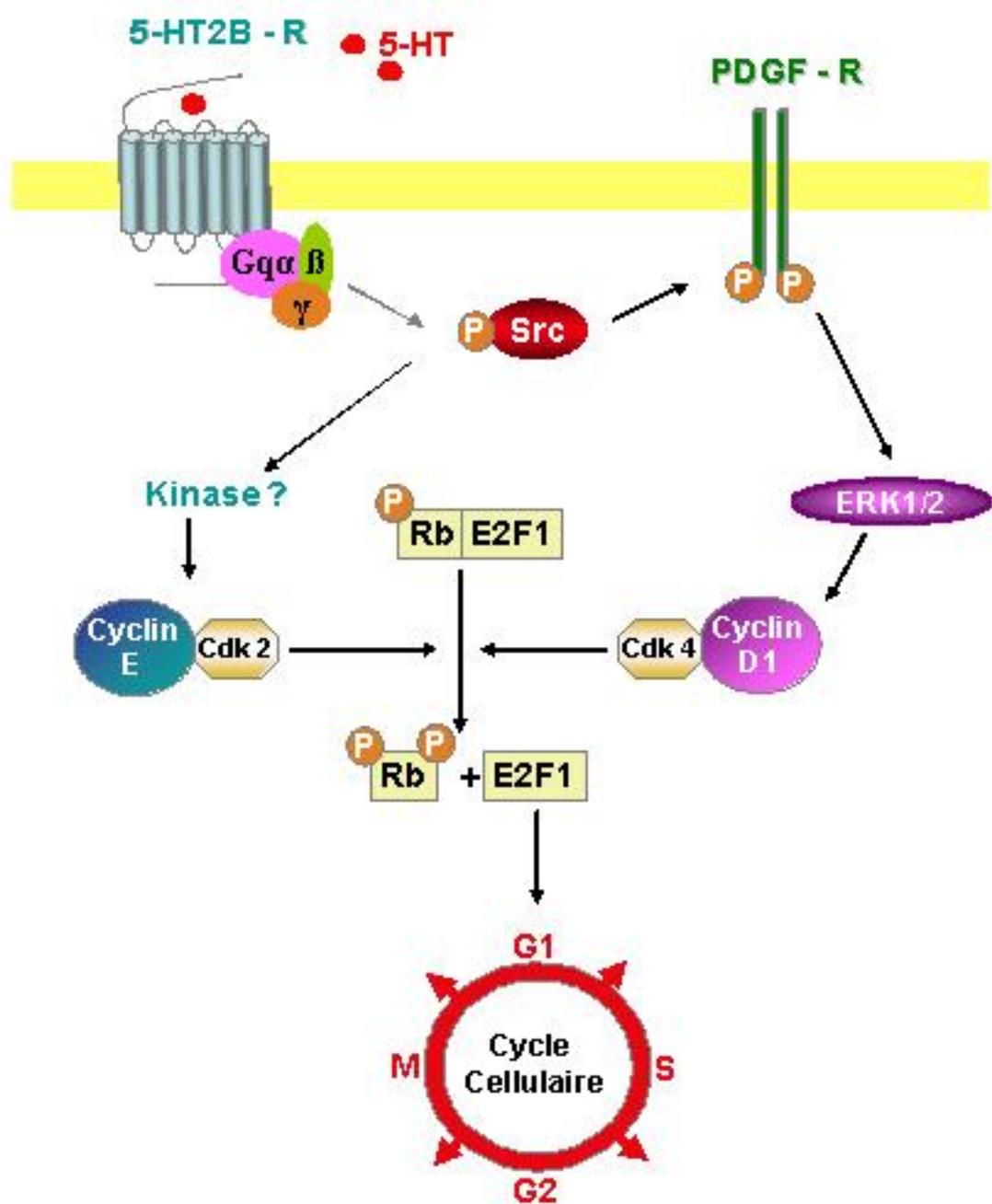
La stimulation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, par des agonistes spécifiques, conduit à une augmentation de l'activité mitogène dans des fibroblastes de souris transfectés par ce récepteur. Cette activité correspond à l'activation rapide du produit du proto-oncogène p21ras, par la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G couplée au récepteur, et à l'activation des *Mitogen Activated Phospho Kinase* (MAPKinase) p42MAPK/p44mapk (ERK1/2) (Launay et al., 1996). Chez les Mammifères, la voie des MAPK peut être activée par des stimuli externes tels que des facteurs de croissance, des hormones ou des neurotransmetteurs et cette activation induit la phosphorylation de facteur de transcription et la division cellulaire. Cette voie peut être induite à la fois par des protéines (cytoplasmiques ou récepteurs membranaires) à activité tyrosine kinase et par des seconds messagers des protéines G.

Plus précisément, il a été montré que la sérotonine en stimulant le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> induit une augmentation de l'expression des cyclines E et D1 et de l'activité des complexes cycline E/cdk2 et cycline D1/cdk4. Ces complexes provoquent une hyperphosphorylation de Rb (*Retinoblastoma protein*) entraînant la progression du cycle cellulaire. L'activation par la sérotonine de l'activité tyrosine kinase du proto-oncogène p60src est une étape indispensable à son activité mitogène. En effet, l'activation de la protéine Src stimule la synthèse de la cycline E d'une part et, d'autre part, induit la trans-activation du récepteur du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) par phosphorylation, et ce, même en absence de ligand pour ce récepteur, conduisant ainsi à l'induction de la synthèse de la cycline D1 (Nebigil et al., 2000b). La stimulation par la sérotonine, des fibroblastes transfectés, s'accompagne d'une perte de l'inhibition de contact et de la formation de foci sur les cellules en culture, mais également de la formation de tumeur après injection de ces cellules à des souris athymiques (Launay et al., 1996). **(Figure 6)**

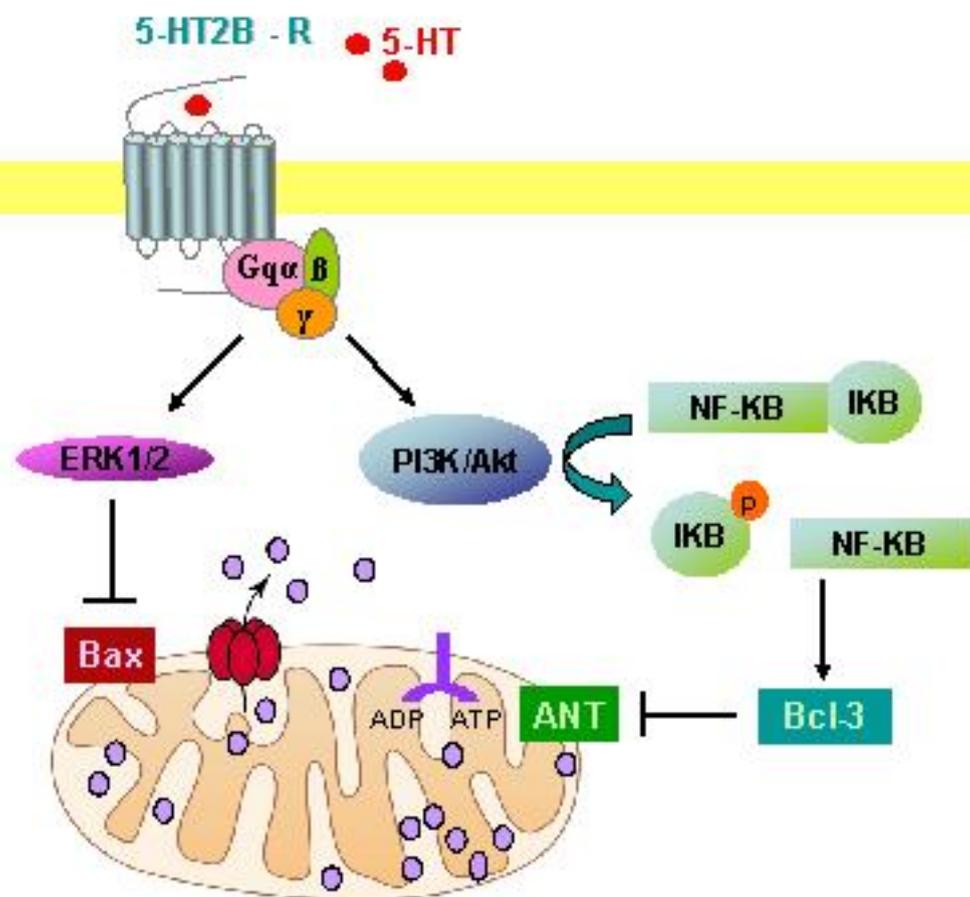
### 3.4.5. Voie de signalisation anti-apoptotique :

#### Interaction entre les voies PI3K/Akt et ERK1/2

L'induction de l'apoptose, par privation de sérum, des cardiomyocytes de souris nouveaux-nés en culture, a permis de mettre en évidence les fonctions anti-apoptotiques du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. En effet la sérotonine inhibe l'apoptose des cardiomyocytes sauvages alors qu'elle ne permet pas de protéger les cardiomyocytes de souris mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> vis-à-vis de la mort cellulaire. La protection induite par la sérotonine dépend de deux voies de signalisation distinctes : ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) et Akt. L'activation de la voie PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt*) entraîne la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  et la translocation dans le noyau du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*). Ce facteur de transcription est notamment responsable de la régulation de l'expression de la protéine ANT-1 (*Adenine Nucleotide Translocator*), un composant de la perméabilité membranaire des mitochondries. L'activation de ERK1/2 par la sérotonine, quant à elle, permet de maintenir une basse expression de Bax, une protéine pro-apoptotique, située dans la membrane des mitochondries. L'addition des effets sur ANT-1 et Bax permet de maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale, évitant ainsi la libération de cytochrome *c* et l'activation associée des caspases-9 et -3, responsables de la mort cellulaire des cardiomyocytes (Nebigil et al., 2003a). **(Figure 7)**



**Figure 6** : Voie de signalisation mitogène du récepteur 5-HT2B utilisant la transactivation des protéines à activité tyrosine kinase cytoplasmique (Src) et récepteur membranaire (PDGF-R)



**Figure 7 :** Signal anti-apoptotique du récepteur 5-HT2B permettant de maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale

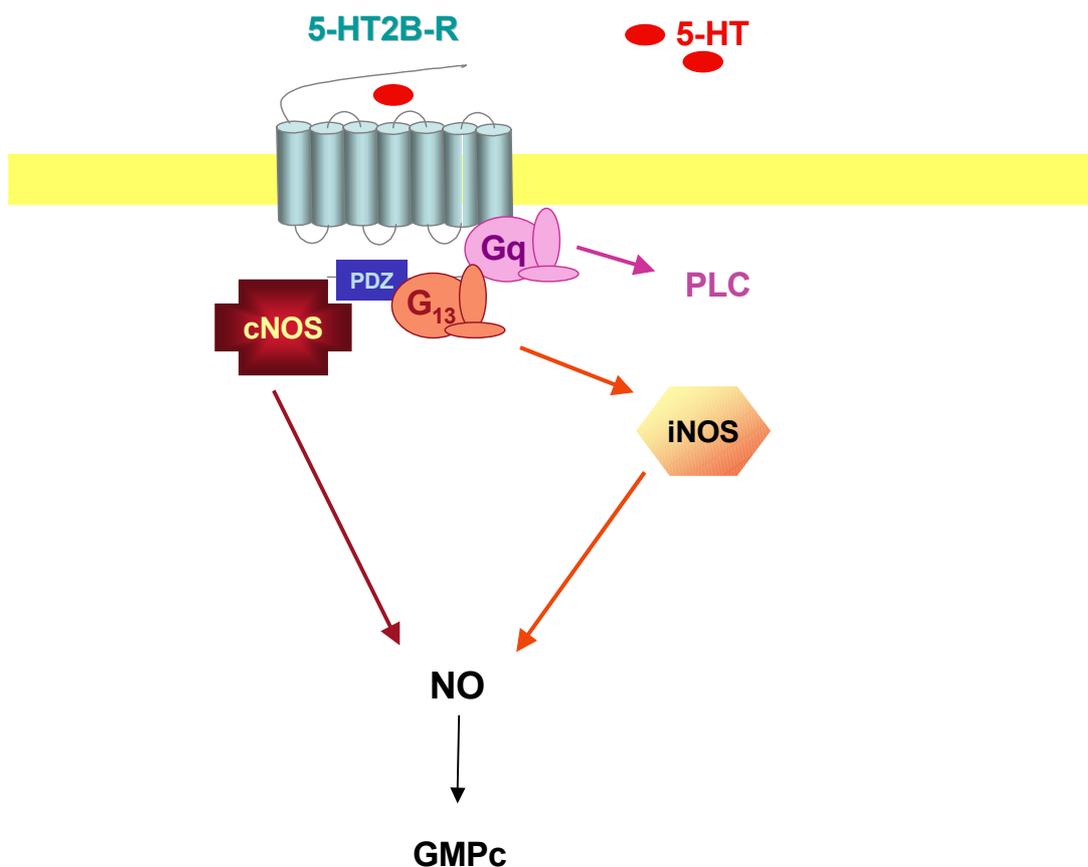
### 3.4.6. Activation des *Nitric Oxide Synthases* et rôle du domaine PDZ

De récents travaux sur les cellules sérotoninergiques 1C11, les cellules isolées de tumeur carcinoïdes et les fibroblastes de souris transfectés pour le récepteur 5-HT2B, ont montré la capacité du récepteur 5-HT2B à activer les *nitric oxyde synthases* [NOSs endothéliales (eNOS) et inductibles (iNOS)] et donc, à augmenter les taux de GMP (guanosine monophosphate) cyclique (Manivet et al., 2000) (**Figure 8**).

Le couplage du récepteur 5-HT2B avec les NOSs inductibles et constitutives endothéliales semble se produire selon un nouveau mode de signalisation, par l'interaction de motifs protéiques spécialisés. Les domaines PDZ (**P**ost-synaptic density-95, **D**iscs large, **Z**ona occludens-1) sont présents dans de nombreuses familles de protéines structurales et d'enzymes telles que les NOSs endothéliales (eNOS) et semblent jouer un rôle important dans les interactions protéine-protéine au niveau de la membrane plasmique. Les interactions entre les protéines contenant des domaines PDZ ou des motifs reconnaissant des domaines PDZ, sont supposées être responsables de la formation de complexes de signalisation macromoléculaires (Kornau et al., 1997). Le couplage du récepteur 5-HT2B avec les NOSs, en réponse au DOI, disparaît dans des fibroblastes transfectés avec un récepteur 5-HT2B tronqué dans la partie C-terminale, contenant le domaine PDZ, ou muté dans la séquence de ce domaine PDZ. La présence de ce domaine PDZ est donc absolument nécessaire à l'activation de la synthèse de NO par les deux enzymes (eNOS et iNOS).

Le couplage du récepteur 5-HT2B à la iNOS est particulièrement rapide et donc incompatible avec l'activation transcriptionnelle habituellement décrite pour cette NOS, notamment dans les phénomènes inflammatoires et infectieux. De façon intéressante, l'activation de la iNOS par le récepteur 5-HT2B semble plus complexe qu'une simple interaction avec le motif PDZ, car elle fait appel au couplage avec une protéine G de type G $\alpha$ 13, alors que le couplage précédemment décrit pour ce récepteur se faisait avec une protéine G $\alpha$ q. L'activation de la iNOS par G $\alpha$ 13 fut décrite précédemment, mais au niveau transcriptionnel (Kitamura et al., 1996). Il a été montré que le récepteur  $\beta$ -adrénergique pouvait également être couplé à deux protéines G différentes : en effet le couplage d'abord à Gs permet l'activation de la PKA (protéine kinase A) entraînant la phosphorylation du récepteur par rétrocontrôle négatif et la forme phosphorylée du récepteur interagit alors avec une protéine Gi (Lefkowitz, 1998). Le couplage Gq et le rétrocontrôle négatif par la PKC permettraient au récepteur 5-HT2B d'activer la iNOS via un couplage à G $\alpha$ 13. C'est une hypothèse qui reste à vérifier. Par ailleurs une interaction entre le couplage Gq et l'activation des NOS ne peut être exclue : en effet des interactions entre l'IP3 et la synthèse de NO ont été décrites précédemment (Clementi et al., 1995; Shimpo et al., 1997).

L'hypothèse a été faite que le domaine PDZ du récepteur 5-HT2B permettrait l'interaction avec d'autres protéines contenant des motifs PDZ, telle que la eNOS, et l'assemblage de complexes protéiques sous la membrane plasmique. Ce genre d'interaction a été précédemment décrit pour le récepteur  $\beta$ -adrénergique (Hall et al., 1999). Il est par ailleurs tentant de penser que les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2C, qui possèdent également un domaine PDZ (Becamel et al., 2004), utilisent ce motif pour la production de GMP cyclique, respectivement dans les cellules du glioma C6 (Kagaya et al., 1995) et dans le plexus choroïde (Kaufman et al., 1995).



**Figure 8 : Signalisation dépendante du motif PDZ du récepteur 5-HT2B**  
**Activation de la synthèse de monoxyde d'azote (NO)**  
 (cNOS : NOS constitutivement active, iNOS : NOS inductible)

Le récepteur 5-HT2B est donc capable d'activer une grande variété de voies de signalisation différentes. L'activation de ces voies dépend probablement du sous-type cellulaire exprimant le récepteur 5-HT2B, et sans doute des autres récepteurs et seconds messagers exprimés dans ces cellules. Ainsi le couplage préférentiel du récepteur 5-HT2A pour certaines voies de signalisation pourrait masquer et empêcher le couplage du récepteur 5-HT2B en raison d'une compétition pour les seconds messagers par exemple. De plus le récepteur 5-HT2B peut modifier les voies de signalisation d'autres récepteurs tel que le récepteur 5-HT1B/1D.

Il existe un autre niveau de régulation de la signalisation des RCPGs et qui s'applique sans aucun doute au récepteur 5-HT2B. En effet les RCPGs peuvent être désensibilisés et internalisés, entraînant ainsi un découplage de certaines voies de signalisation. Bien que les preuves concernant le 5-HT2B nous manquent encore actuellement, il est important de décrire ce phénomène général concernant les RCPGs.

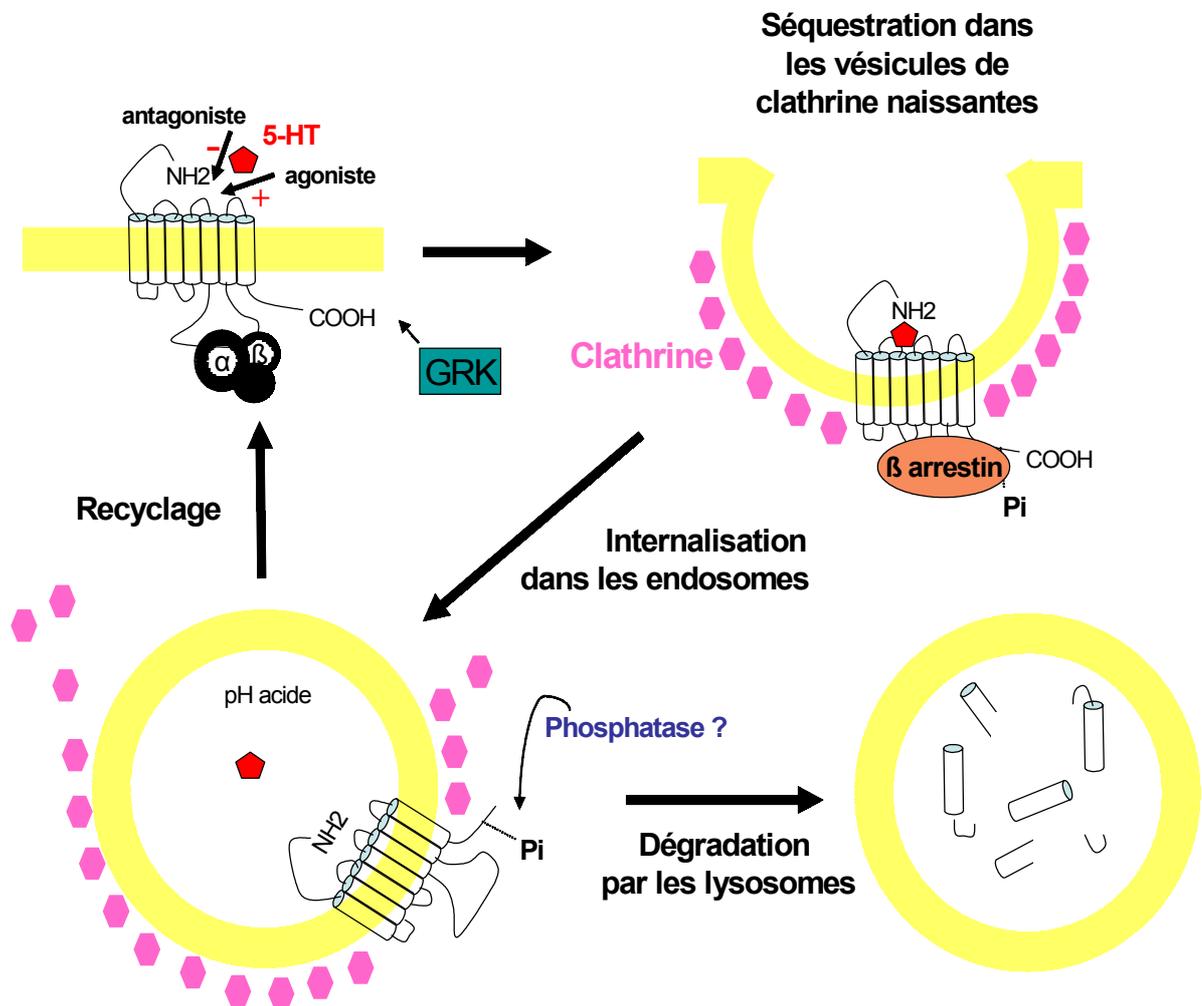
### 3.5. Trafic des RCPGs

Il a été démontré que les récepteurs couplés aux protéines G étaient régulés négativement par l'action de différentes kinases, suite à la stimulation par des agonistes, ou même en absence de stimulation. Cette régulation négative a été montrée par de nombreux auteurs, pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, ainsi que pour d'autres RCPGs, et elle conduit à une désensibilisation du récepteur, même en absence de ligand, suite à la phosphorylation de ce récepteur par une protéine kinase C (PKC) (Roth et al., 1998) ou une protéine kinase AMP cyclique dépendante (PKA) (Pierce and Lefkowitz, 2001). Les RCPGs peuvent donc être désensibilisés par un rétrocontrôle négatif, faisant appel aux kinases qu'ils ont eux-mêmes activées ou qui sont activées par d'autres stimuli (Lefkowitz, 1998).

Par ailleurs, suite à la stimulation par un ligand sélectif, les RCPGs activés sont phosphorylés par des protéines GRK (*G-protein coupled Receptor Kinase*) et s'associent simultanément à une molécule de  $\beta$ -arrestine, inhibant ainsi le couplage aux protéines G. La  $\beta$ -arrestine interagit avec des molécules de clathrine permettant de séquestrer le RCPG à l'intérieur d'une vésicule recouverte de clathrine. L'ensemble de ce processus induit la délocalisation de la surface de la cellule des RCPGs désensibilisés et phosphorylés (Lefkowitz, 1998; Pierce and Lefkowitz, 2001). Après internalisation, le récepteur sera dégradé dans les lysosomes ou recyclé à la membrane. (**Figure 9**)

D'autre part, il semble que les RCPGs puissent utiliser une autre voie d'internalisation faisant appel à la formation d'un autre type de vésicule : les cavéoles (Galbiati et al., 2001; Shaul and Anderson, 1998). Les cavéoles sont des structures endocytosiques, impliquées dans les mouvements transcellulaires, et contenant un très grand nombre de molécules impliquées dans la transduction du signal. Elles permettent également de compartimenter les voies de signalisation. Les cavéoles se composent majoritairement de cavéoline, une protéine dont il existe 4 isoformes : *caveolin-1 $\alpha$* , *1 $\beta$* , *2* et *3*. L'expression de la cavéoline-3 est restreinte aux cellules musculaires tandis que les autres isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire (Liu et al., 2002). Les cavéoles se différencient des vésicules recouvertes de clathrine, car à l'inverse de celles-ci qui se forment à la membrane, les cavéoles se forment dans l'appareil de Golgi pour être ensuite transportées à la membrane. Quatre types de molécules ont été associées aux cavéoles : les molécules de la transduction du signal dépendant des protéines G, les molécules du signal calcique, les composants de la voie de signalisation tyrosine kinase/MAPK et les molécules des voies de signalisation faisant appel aux lipides.

Plusieurs RCPGs ont été localisés dans les cavéoles, tels que les récepteurs pour la bradykinine, l'acétylcholine, l'endothéline, et la plupart des protéines G ont été isolées des cavéoles (Chun et al., 1994). De façon remarquable, les récepteurs mentionnés interagissent tous avec la synthèse de NO par la NOS endothéliale (eNOS) qui est elle-même associée à la cavéoline dans les cavéoles grâce à son domaine PDZ. La quasi-totalité des eNOSs se trouve dans les cavéoles. On peut donc facilement imaginer que l'interaction décrite précédemment, entre le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> et la eNOS, se produise dans les cavéoles, mais cette hypothèse reste à vérifier. Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est également concentré dans les cavéoles des cellules musculaires (Fiorica-Howells et al., 2002).



**Figure 9 : Représentation schématique du cycle de Désensibilisation-Resensibilisation d'un RCPG**

D'après (Lefkowitz, 1998; Pierce and Lefkowitz, 2001; Roth et al., 1998)

La fixation d'un ligand sur un RCPG induit sa phosphorylation par une GRK (*G-protein coupled receptor kinase*), le recrutement de la β-arrestine et l'internalisation du récepteur dans des vésicules recouvertes de clathrine. Le récepteur est alors déphosphorylé dans les endosomes, par des phosphatases, puis recyclé à la membrane ou dégradé dans les lysosomes selon le type de RCPG.

Généralement, suite à l'administration d'un antagoniste ou d'un agoniste inverse, les RCPGs sont régulés positivement ou hypersensibilisés. Ce n'est, semble-t-il, pas le cas pour les récepteurs de la famille 5-HT<sub>2</sub>, notamment pour les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2C</sub> centraux (Enguix et al., 2003). Au niveau périphérique, il apparaît que les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>2A</sub> sont désensibilisés aussi bien en réponse à des agonistes qu'à des antagonistes et que les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> sont désensibilisés plus rapidement que les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (Ben-Harari et al., 1991; Paris et al., 1997) et plus longtemps que les récepteurs 5-HT<sub>2C</sub> (Schaerlinger et al., 2003).

Très peu de choses sont connues sur le phénomène d'internalisation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Cependant, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> humain, tronqué dans sa partie C-terminale (-82 aa), ne présente pas de modification de sa pharmacologie (K<sub>d</sub> du DOI inchangé) mais une augmentation de son nombre de sites de fixation (B<sub>max</sub> multiplié par 2), impliquant un rôle majeur de cette séquence protéique dans le phénomène d'internalisation (Choi et al., 1994), comme cela a été montré pour le récepteur β-adrénergique (Hausdorff et al., 1990).

## 3.6. Fonctions physiologiques du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>

### 3.6.1. Mitogène

La stimulation des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> induit la prolifération des fibroblastes en culture qui forment des foci et induisent des tumeurs chez la souris athymique (Launay et al., 1996; Nebigil et al., 2000b). La sérotonine a également montré un effet mitotique sur les fibroblastes NIH3T3 exprimant une grande densité de récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> ou 5-HT<sub>2C</sub> (Julius et al., 1989). L'effet mitogène serait donc un phénomène commun à tous les récepteurs 5-HT<sub>2</sub>. Il a été montré que le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> transfecté dans les fibroblastes était capable d'induire la prolifération cellulaire notamment grâce à la trans-activation du récepteur du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*).

De façon remarquable, d'anciennes données avaient démontré le pouvoir mitogène de la sérotonine sur des cellules musculaires lisses d'origine bovine (aorte) et une synergie de la prolifération induite par le PDGF (Nemecek et al., 1986). Plus récemment, il a été montré que la sérotonine avait aussi une action synergique avec le thromboxane A<sub>2</sub> sur la prolifération des cellules musculaires lisses d'aorte de chien, cet effet étant bloqué par un antagoniste 5-HT<sub>2</sub> (LY281067) (Pakala et al., 1997). Cependant on ne peut attribuer, de façon certaine, ces effets au récepteur 5-HT<sub>2B</sub> puisqu'il est communément admis que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est le récepteur de la sérotonine préférentiellement exprimé dans le muscle lisse.

Le pouvoir mitogène, dépendant des récepteurs 5-HT<sub>2</sub>, a également été démontré sur des cultures primaires de cellules endothéliales d'aorte bovine et canine. On peut supposer qu'il s'agit d'un effet spécifique du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, puisqu'il est exprimé dans les cellules endothéliales, à l'inverse des autres récepteurs 5-HT<sub>2</sub> (Pakala et al., 1994).

D'autre part, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> est exprimé dans certaines lignées tumorales telles que les cellules DDT-MFII de leiomyosarcome, une tumeur du muscle lisse de hamster, ainsi

que dans les cellules SHSY-5Y de neuroblastome humain et les cellules MCF7 de tumeur mammaire humaine. Le pouvoir mitogène du récepteur 5-HT2B a été impliqué dans certaines situations pathologiques dont les tumeurs carcinoïdes humaines (Launay et al., 1996) et l'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie qui s'accompagne d'un intense remodelage vasculaire par prolifération des cellules musculaires lisses (Launay et al., 2002).

Mais le potentiel mitogène du récepteur 5-HT2B s'exerce d'abord physiologiquement pendant le développement embryonnaire de la souris (Nebigil et al., 2000a; Choi et al., 1997). En effet, la sérotonine, présente en forte concentration durant l'embryogenèse, comme d'autres neurotransmetteurs, joue un rôle prépondérant sur la morphogenèse (Lauder, 1993).

### 3.6.2. Développement du système nerveux

L'utilisation d'inhibiteur de la recapture de la sérotonine sur des embryons de souris en culture a démontré le rôle de la sérotonine dans la morphogenèse craniofaciale (Shuey et al., 1992). Plus précisément, le même type d'expérience avec un antagoniste 5-HT2, la ritansérine, peut induire des défauts de développement de la région céphalique et du tube neural. Au moment du traitement antagoniste (à 8,5 jours de développement) il existe un pic d'expression du récepteur 5-HT2B dans le tube neural, le cœur et les somites. Le récepteur 5-HT2A n'est encore que faiblement exprimé à ce moment (Choi et al., 1998; Choi et al., 1997). Les défauts observés sont un retard de croissance principalement dans la région céphalique, une forme anormale du tube neural présentant souvent un défaut de fermeture, la présence de cellules apoptotiques et une désorganisation des somites. Ces résultats supposent que le récepteur 5-HT2B est impliqué dans la migration, la prolifération et/ou la survie des cellules dérivées de la crête neurale.

Le récepteur 5-HT2B a également été impliqué dans le développement du système nerveux entérique chez le rat. La stimulation par le DOI, un agoniste 5HT2B/2C induit la différenciation des neurones en culture et cet effet est sélectivement bloqué par la ritansérine. Sachant que seuls les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B sont exprimés dans ces cellules, l'effet observé est sans doute dépendant de la stimulation du récepteur 5-HT2B (Fiorica-Howells et al., 2000). Ce phénomène est par ailleurs spécifiquement associé à l'activation des MAPK, dont le couplage avec le récepteur 5-HT2B a déjà été prouvé dans d'autres tissus.

### 3.6.3. Développement cardiaque

Les fonctions cardiaques de la sérotonine sont reconnues depuis longtemps bien que les récepteurs impliqués dans ces fonctions n'aient pas toujours été identifiés (Saxena and Villalon, 1991). Chez la souris, la sérotonine et le récepteur 5-HT2B sont impliqués dans les mouvements morphogénétiques cardiaques (Choi et al., 1997; Yavarone et al., 1993). En effet le traitement par la ritansérine d'embryons de souris entre 8 et 9 jours de développement induit une organisation anormale des sarcomères de la couche sous endocardique ainsi qu'une forte réduction du nombre de cellules trabéculaires dans le myocarde ventriculaire.

L'inactivation génétique par recombinaison homologue du gène du récepteur 5-HT2B a définitivement confirmé le rôle de ce récepteur pendant le développement précoce du coeur.

Ainsi la délétion du récepteur 5-HT2B provoque des anomalies du développement induisant une létalité partielle : une première phase de létalité se situe vers le 10<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, induisant la mort *in utero* de 30 % des embryons ; une seconde période de létalité survient pendant la première semaine de vie et concerne 30 % des souriceaux nouveaux-nés. L'étude histologique de la couche compacte du myocarde des embryons mutants (KO : *knock-out*), à 10 jours d'embryogenèse, montre une différenciation prématurée des cellules trabéculaires qui formeront le myocarde, affectant ainsi l'organisation des sarcomères. La différenciation précoce s'accompagne d'un défaut de prolifération et de migration des cellules trabéculaires, conduisant à l'hypoplasie des ventricules dont les parois se trouvent très amincies. La rupture de ces parois est sans doute la cause de la létalité embryonnaire.

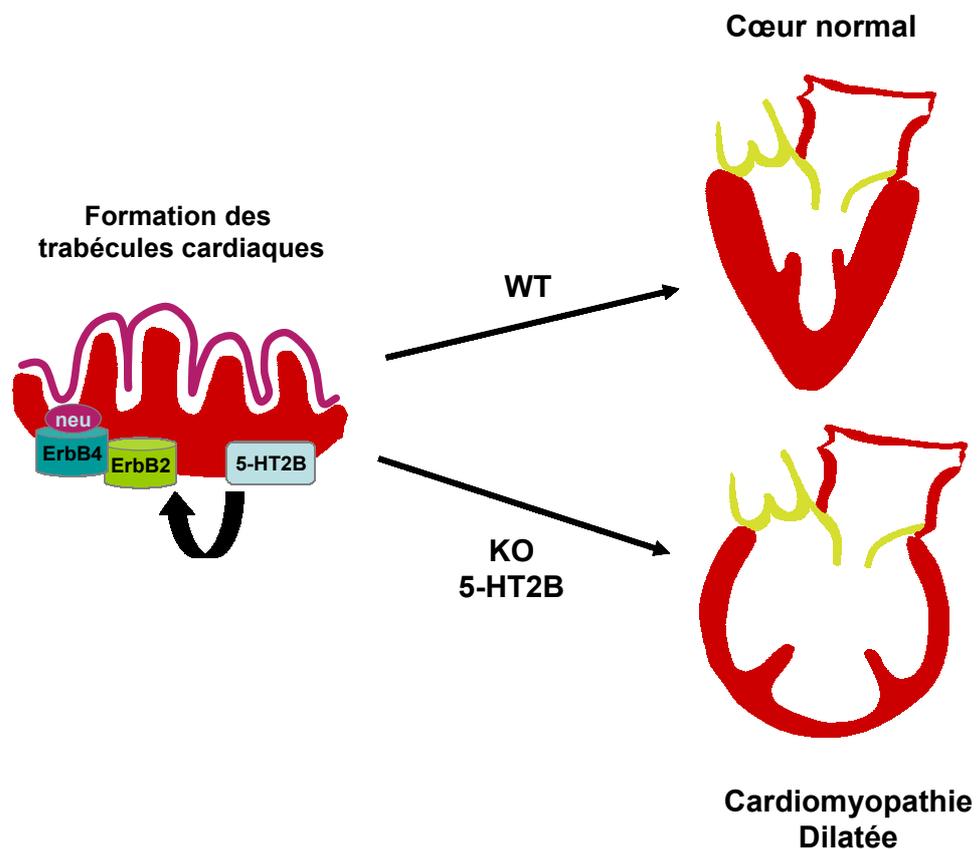
De façon remarquable, les anomalies embryonnaires induites par l'inactivation génétique du récepteur 5-HT2B sont très voisines de celles provoquées par la délétion du gène codant pour la neuréguline ou pour ses récepteurs ErbB-2 (HER-2/*neu*) et ErbB-4. Ce sont des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) possédant une activité tyrosine kinase (Lemke, 1996). Le récepteur 5-HT2B et les protéines de la voie ErbB possèdent des sites d'expression communs puisque la neuréguline est exprimée dans les cellules endothéliales de l'endocarde et que ses récepteurs se situent au niveau des cellules du myocarde. De plus les embryons KO pour le récepteur 5-HT2B présentent une réduction d'expression du récepteur ErbB-2 dans les cœurs à 10,5 jours d'embryogenèse. Par ailleurs, la prolifération des cardiomyocytes de souris en culture, en réponse à la sérotonine ou à la neuréguline, est diminuée dans le cas des souris mutantes par rapport aux souris sauvages. Les anomalies cardiaques observées chez les embryons mutants démontrent que le récepteur 5-HT2B, couplé à une protéine Gq, est nécessaire à la régulation de la voie de signalisation du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB-2, pour la différenciation et la prolifération des cardiomyocytes (**Figure 10**), mais cette régulation se situe à un niveau transcriptionnel et non pas au niveau de la phosphorylation de ErbB2 (Nebigil et al., 2000a).

Il est intéressant de mentionner que le trafic intracellulaire du récepteur ErbB2 est régulé par la protéine ERBIN, grâce à une interaction par un domaine PDZ (Birrane et al., 2003) et que le récepteur ErbB4 est localisé dans les cavéoles (Zhao et al., 1999). L'interaction exacte entre le récepteur 5-HT2B et ErbB2 n'est pas encore élucidée mais on peut faire l'hypothèse que l'absence du récepteur 5-HT2B, qui possède lui aussi un domaine PDZ, pourrait modifier le trafic, et par rétrocontrôle, l'expression de ErbB2, dans les cardiomyocytes au cours de l'embryogenèse. Associée à son pouvoir mitogène, la voie ErbB possède également la capacité à protéger les cardiomyocytes vis-à-vis de l'apoptose et le récepteur 5-HT2B s'est révélé être aussi un facteur de survie des cardiomyocytes *in vivo* et *in vitro* (Nebigil et al., 2003a).

### 3.6.4. Inhibition de l'apoptose dans le coeur

L'apoptose des cardiomyocytes post-mitotiques se caractérise par la diffusion dans le cytoplasme du cytochrome *c* contenu dans les mitochondries (Narula et al., 1999). L'étude par microscopie électronique de l'ultrastructure du myocarde des souris KO pour le récepteur 5-HT2B a révélé d'importantes anomalies de structure des mitochondries qui sont gonflées et présentent des cassures au niveau de la membrane interne (Nebigil et al., 2003a). Bien que les

cœurs de souris KO pour le récepteur 5-HT2B n'aient pas montré de fragmentation nucléaire ou de destruction de myofibrilles, caractéristiques du phénomène d'apoptose, la réduction de l'activité enzymatique de la cytochrome *c* oxydase (COX-2) et de la succinate déshydrogénase (SDH), confirme l'activation du mécanisme d'apoptose, mitochondrial-dépendant, chez les souris mutantes pour le récepteur 5-HT2B. De plus, l'expression de protéines pro-apoptotiques, telles que Bax et ANT-1, est augmentée chez les souris KO par rapport aux souris sauvages, et ces deux protéines voient leur expression diminuer suite à la stimulation par la sérotonine de cardiomyocytes de souris sauvages en culture. L'augmentation de leur expression, chez les souris KO, démontre donc l'initiation de la voie de signalisation apoptotique dans les cœurs des souris invalidées pour le récepteur 5-HT2B. Cette activation participe probablement au phénotype de cardiomyopathie dilatée, observé chez les souris mutantes survivantes.



**Figure 10** : Interaction entre les récepteurs 5-HT2B et ErbB2 conduisant à une anomalie de formation des trabécules chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B, à une hypoplasie cardiaque et au phénotype de cardiomyopathie dilatée

### 3.6.5. Synthèse de NO

Le lien entre la synthèse de NO et la sérotonine était précédemment suspecté. En effet, ces deux molécules sont impliquées dans la contraction musculaire lisse (Cox and Cohen, 1995; Meulemans et al., 1993), dans la relaxation vasculaire (Ellis et al., 1995; Glusa and Richter, 1993) et dans le pathophysiologie de la migraine (Schmuck et al., 1996). Puisque les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> sont présents dans l'estomac, l'intestin, les muscles lisses pulmonaires, le rein, ainsi que dans le myocarde, l'endothélium vasculaire et les tissus méningés (Baxter et al., 1995; Ullmer et al., 1995; Choi and Maroteaux, 1996), ils sont des candidats privilégiés pour une interaction entre la synthèse de NO et la sérotonine.

Le mécanisme d'activation des Nitric Oxide Synthases (NOSs) par le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> reste encore obscur. Une première hypothèse supposait l'hydrolyse du phosphoinositol, suivi d'une activation calcium-calmoduline dépendante des NOSs endothéliales. Mais, comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub>, exprimés dans différents sous-types cellulaires en culture, peuvent induire l'activation des NOSs, qu'elles soient constitutivement actives (NOS endothéliale et neuronale) ou inductibles (iNOS), entraînant ainsi une augmentation des taux de GMP cyclique intracellulaire (Manivet et al., 2000). Nous verrons dans ce chapitre que l'activation par les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> de la synthèse de NO *in vivo* commence à devenir plus claire, notamment dans le système cardiovasculaire. Cependant, une étude réalisée sur des cellules musculaires lisses d'aorte de rat a montré l'effet inhibiteur de la sérotonine sur la synthèse de NO, par la iNOS, en réponse à une stimulation par l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Mais s'agissant d'une régulation transcriptionnelle sensible à la kétansérine, il est probable que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> soit responsable de cette inhibition (Shimpo et al., 1997).

Un autre lien entre la synthèse de NO et les récepteurs de la sérotonine a été établi au niveau du tissu osseux. En effet, en réponse à un stress mécanique, des ostéoblastes de souris en culture, exprimant les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2B</sub>, produisent du NO et cette production est inhibée par l' $\alpha$ -méthyl-sérotonine, un agoniste 5-HT<sub>2B</sub> (Westbroek et al., 2001). La stimulation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> semble donc inhiber la synthèse de NO dans l'os.

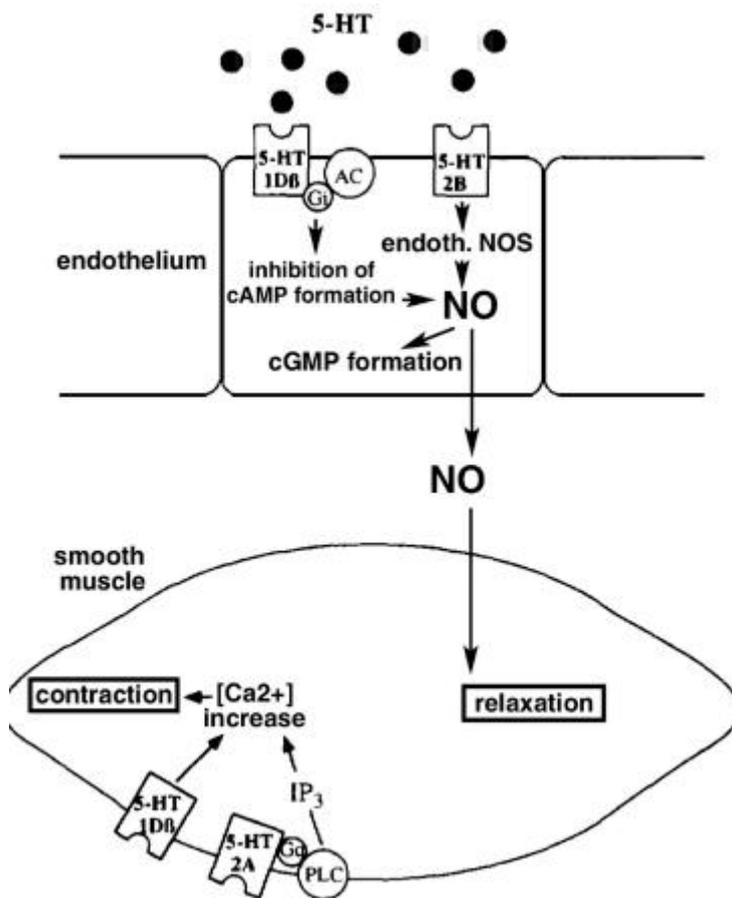
Cette donnée contradictoire par rapport à l'activation des NOSs dans d'autres types cellulaires doit nous rendre attentif à la variabilité de couplage fonctionnel selon l'origine tissulaire des modèles cellulaires utilisés. Donc seules les études *in vivo* peuvent réellement nous informer sur le couplage entre les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et les NOSs.

### 3.6.6. Rôle du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> dans la physiologie vasculaire

Avant même que les récepteurs de la sérotonine aient été clonés, les effets vasculaires de ce neurotransmetteur étaient connus. Les travaux anciens de Cohen et Vanhoutte en 1983 (Cohen et al., 1983) montraient déjà un effet relaxant de la sérotonine sur l'artère coronaire de chien, dépendant de la présence de l'endothélium, et pouvant être bloqué par la methysergide mais pas par la kétansérine. L'étude des modifications de flux coronaire chez l'homme en réponse à l'administration de sérotonine a démontré l'effet vasodilatateur de la sérotonine sur la circulation coronaire de sujets sains et l'effet vasoconstricteur chez les patients souffrant

d'athérosclérose et dont l'endothélium est endommagé (Golino et al., 1991). De plus, la libération brutale de sérotonine suite à une activation plaquettaire a été impliquée dans les effets de thrombose et de remodelage vasculaire associés à la pathologie coronaire (Vikenes et al., 1999).

Parmi les 15 récepteurs de la sérotonine identifiés, seulement 5 sous-types sont exprimés au niveau des vaisseaux sanguins, dans deux principaux types cellulaires. Ainsi au niveau des cellules endothéliales vasculaires sont exprimés les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> et en moindre proportion 5-HT<sub>4</sub>, tandis que les cellules musculaires lisses expriment les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>7</sub> et dans certains cas particuliers 5-HT<sub>2B</sub>. Ce profil d'expression laisse à penser que la sérotonine joue un rôle complexe dans la régulation du tonus vasculaire (Ullmer et al., 1995). En effet, les récepteurs présents sur les cellules endothéliales ont la capacité d'induire une vasodilatation tandis que la stimulation par la sérotonine des cellules musculaires lisses produit une vasoconstriction (**Figure 11**). Par ailleurs le niveau d'expression des récepteurs de la sérotonine dépend de l'espèce et du tissu. Ainsi l'expression du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> est beaucoup plus importante dans les cellules endothéliales pulmonaires que dans les cellules endothéliales coronaires chez l'homme. En fonction du lit vasculaire étudié, les effets obtenus peuvent donc être variables.



**Figure 11 :** Représentation schématique des récepteurs vasculaires de la sérotonine. D'après (Ullmer et al., 1995)

(Le récepteur 5-HT1D $\beta$  est en fait le récepteur 5-HT1B)

### **L'artère pulmonaire**

Les récepteurs 5-HT2B induisent la libération de Ca<sup>2+</sup> à partir des stocks intracellulaires sensibles à la ryanodine dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine, mais indépendamment de la formation d'IP3 (Ullmer et al., 1996). Les dérivés de l'ergot de seigle tels que l'ergotamine, la dihydroergotamine et la dihydroergocristine, de même que la sérotonine et l' $\alpha$ -méthyl-sérotonine induisent une relaxation dépendante de l'endothélium et réversible sur des segments d'artère pulmonaire de porc. Cette relaxation, s'accompagnant d'une augmentation de la concentration en GMP cyclique, est probablement due à la libération de NO, d'autant plus qu'un prétraitement des vaisseaux par un inhibiteur de la synthèse de NO inhibe cette relaxation (Glusa and Roos, 1996). Etant donné le profil d'expression des récepteurs de la sérotonine dans l'artère pulmonaire de porc (Ullmer et al., 1995) et l'affinité des différents agents testés, seul le récepteur 5-HT2B peut être responsable de cette relaxation. Plus tard l'utilisation d'agoniste plus spécifique du récepteur 5-HT2B, tel que le composé BW723C86, a permis d'induire la relaxation d'anneaux pré-contractés d'artère pulmonaire de porc dont l'endothélium était intact. Cette relaxation est bloquée par le retrait de l'endothélium, ou par l'utilisation conjointe d'antagoniste des récepteurs 5-HT2B (SB 204741), des récepteurs 5-HT2B/2C (SB 206553) ou encore de molécules actives dans le traitement de la migraine tel que le pizotifen (Glusa and Pertz, 2000). Le récepteur 5-HT2B est donc bien responsable de la relaxation dépendante de l'endothélium induite par la sérotonine dans l'artère pulmonaire de porc. De façon similaire, la sérotonine induit la dilatation de l'artère pulmonaire de rat, dépendante de la synthèse de NO (Eddahibi et al., 1997).

### **L'aorte et les gros vaisseaux**

Il a été montré que la sérotonine induit la relaxation des anneaux précontractés d'aorte de rat. Cette relaxation dépend de la présence de l'endothélium et de la dose utilisée ainsi que de la présence de kétansérine (0,3  $\mu$ M) un antagoniste des récepteurs 5-HT2A, permettant de bloquer la contraction induite par la sérotonine. L'utilisation d'antagonistes appropriés a permis d'identifier le récepteur 5-HT2B comme étant responsable de cette relaxation dépendante de l'endothélium (Villazon et al., 2002). De plus sur des anneaux d'aorte non précontractés, le pouvoir contractile de la sérotonine est plus important en absence d'endothélium, confirmant ainsi les effets opposés des récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B.

### **Les vaisseaux coronaires**

L'étude, in vitro, sur des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines, a montré qu'à la fois les récepteurs 5-HT1B/1D et les récepteurs 5-HT2B sont responsables de la production, induite par la sérotonine, de nitrites (Ishida et al., 1998). Ces nitrites proviennent du métabolisme du NO. L'ergonovine, dont on sait maintenant qu'elle possède une forte affinité pour le récepteur 5-HT2B, induit une vasodilatation suivie d'une vasoconstriction, s'accompagnant d'une augmentation du flux coronaire chez le chien éveillé. La vasodilatation dépend de l'activité des NOSs puisqu'elle disparaît si on traite les chiens avec un inhibiteur de la synthèse de NO, la N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NA) et peut être inhibée par la méthiothépine, un antagoniste non sélectif des récepteurs 5-HT1/2 (Karila-Cohen et al., 1999). Le rôle du récepteur 5-HT2B reste encore à étudier chez les patients souffrant d'athérosclérose et présentant donc une dysfonction endothéliale. La sérotonine est un puissant vasodilatateur au niveau de la vasculature coronaire puisqu'elle est capable

d'augmenter de façon dose dépendante le flux coronarien chez le rat. De façon remarquable, les expériences sur cœurs isolés-perfusés, de souris invalidées pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, ont montré une réduction significative du flux coronarien de base chez les femelles mutantes par rapport aux femelles sauvages (Nebigil et al., 2001b).

La sérotonine peut être libérée par les plaquettes dans le cas d'ischémie du myocarde et elle est impliquée dans l'exacerbation des syndromes coronariens aigus. Des études sur des artérioles coronaires humaines ont montré la capacité de la sérotonine à induire une vasodilatation NOS-dépendante à l'état basal. Au contraire, après une ischémie coronaire, la sérotonine induit une vasoconstriction qui sera inhibée par des antagonistes des cyclo-oxygénases et des antagonistes de la thromboxane A<sub>2</sub> synthase. Les auteurs de cette étude ont montré une augmentation, après une ischémie, de l'expression de la cyclo-oxygénase inductible (COX-2) principalement au niveau des cellules endothéliales et qui serait responsable de la sensibilité accrue à la sérotonine (Metais et al., 2001).

### **Les artères de résistance**

Alors que le récepteur principalement impliqué dans la contraction des gros vaisseaux est le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, le lit vasculaire mésentérique perfusé de rat présente une réponse contractile *in vivo* à la sérotonine et à l' $\alpha$ -methyl-sérotonine qui peut être inhibée par des antagonistes 5-HT<sub>2</sub> (ritansérine) et 5-HT<sub>2B/2C</sub> (SB 206553) (Fernandez et al., 2000). Cette contraction locale du lit mésentérique, probablement due à la stimulation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, ne s'accompagne d'aucun changement de la pression artérielle systémique. Cependant, il est important de mentionner que chez d'autres espèces, telles que le lapin, le récepteur responsable de la contraction de la sérotonine dans le lit mésentérique est le sous-type 5-HT<sub>1B/1D</sub>. Nous ne disposons actuellement d'aucune donnée concernant l'homme ou la souris.

### **La circulation cérébrale**

Il a été montré que le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> stimule la relaxation des artères cérébrales de porc (Schmuck et al., 1996) et de la veine jugulaire de rat (Ellis et al., 1995). Cette relaxation passe par la production de NO.

La plupart des informations à notre disposition concernant le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> et ses fonctions *in vivo* nous viennent des différentes observations réalisées en pathologie humaine et des modèles d'étude de ces pathologies chez l'animal.

## 3.7. Implications du récepteur 5-HT2B en pathologie

### 3.7.1. Syndrome carcinoïde (Kulke and Mayer, 1999)

Les tumeurs carcinoïdes malignes dérivent des cellules entérochromaffines qui synthétisent la sérotonine. Elles se caractérisent par la présence de granules neuro-sécrétoires visibles en microscopie électronique. Ces granules libèrent un certain nombre d'hormones et d'amines biogènes, principalement la sérotonine, mais aussi la dopamine, la kallikrein, l'histamine, les prostaglandines, l'ACTH, la gastrine, la calcitonine, la substance P, la neurotensine et l'hormone de croissance. Ces substances sont responsables du tableau clinique des tumeurs carcinoïdes : une vasodilatation cutanée entraînant une rougeur de la face de type « flushing », de la diarrhée et un dépôt endocardique de type fibrose (Feldman, 1987). Les tumeurs carcinoïdes sont classées selon leur localisation : on distingue les tumeurs carcinoïdes pulmonaires, gastriques, du petit intestin, de l'appendice, du colon ou du rectum. De plus, une pathologie cardiaque valvulaire survient dans 57 à 77% des cas (Howard et al., 1982; Lundin et al., 1990; Lundin et al., 1988). Cette pathologie s'accompagne d'une augmentation significative des taux de sérotonine dans le sérum, le plasma et les plaquettes ainsi que du taux urinaire de 5-hydroxyindole acide acétique, le principal métabolite de la sérotonine (Robiolio et al., 1995). De façon remarquable, les tumeurs carcinoïdes gastriques et de l'appendice sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (Modlin and Sandor, 1997; Rindi et al., 1996). Il a été montré que les tumeurs carcinoïdes humaines spontanées ou induites par *Mastomys natalensis* expriment le récepteur 5-HT2B et que la stimulation par la sérotonine des cellules isolées de ces tumeurs carcinoïdes permet d'induire une activation 5-HT2 dépendante de la voie ras mitogène (Launay et al., 1996).

### 3.7.2. Pathologies cardiaques

#### Cardiopathie valvulaire

Cette pathologie se définit comme un épaississement fibreux de l'endocarde conduisant à des anomalies des valves tricuspide et pulmonaire, de type régurgitation. La pathologie valvulaire induite par l'utilisation de médicaments anorexigènes, de type dexfenfluramine, se caractérise par une prolifération de myofibroblastes. Cette atteinte est identique sur le plan histopathologique à celle qu'on peut observer dans la maladie carcinoïde ou après une utilisation prolongée des dérivés de l'ergot de seigle présentant une forte affinité pour les récepteurs 5-HT2B (ergotamine, methysergide) (Connolly et al., 1997; Kulke and Mayer, 1999). La norfenfluramine, principal métabolite de la dexfenfluramine, présente une très forte affinité pour les récepteurs 5-HT2B et 5-HT2C. Cependant la quantité d'ARN messager pour le récepteur 5-HT2B est 300 fois plus élevée que celle du récepteur 5-HT2C dans les valves cardiaques. La stimulation préférentielle du récepteur 5-HT2B valvulaire par la norfenfluramine, par les dérivées de l'ergot de seigle et la sérotonine provenant des tumeurs carcinoïdes serait à l'origine de la fibroplasie observée chez l'homme (Fitzgerald et al., 2000).

## Cardiomyopathie dilatée

Le premier lien entre le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> et la fonction cardiaque fut établi grâce à la description du phénotype des souris KO pour ce récepteur. En effet les anomalies de développement cardiaque observées chez ces animaux provoquent une létalité partielle au cours de l'embryogenèse. Les animaux survivant présentent à l'âge de 6 semaines une cardiomyopathie dilatée qui se caractérise par une réduction de 24% de la masse ventriculaire cardiaque, une dilatation de la chambre ventriculaire gauche accompagnée d'un amincissement des parois ventriculaires (la paroi postérieure et le septum). Ces anomalies morphologiques, identifiées par une analyse histologique ont été confirmées par échocardiographie chez des souris âgées de 19 semaines. La mesure des diamètres du ventricule gauche en systole et en diastole permet d'évaluer la fraction d'éjection systolique. Ce dernier paramètre est significativement diminué de 20% chez les mâles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, démontrant ainsi un défaut de contractilité probablement relié à la réduction significative d'expression des N-cadhérines, des molécules d'adhésion, et à la présence de disques intercalaires anormaux entre les cardiomyocytes de ces souris KO) (Nebigil et al., 2001a; Nebigil et al., 2001b). La sérotonine, en stimulant le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, est donc impliquée dans la structure et la fonction des cardiomyocytes adultes. Ces effets s'ajoutent à ceux observés sur la prolifération, la migration et la différenciation des cardiomyocytes embryonnaires (Nebigil et al., 2000a) ainsi que la survie des cardiomyocytes post-natals (Nebigil et al., 2003a). Par ailleurs, l'analyse biochimique de marqueurs de souffrance cardiaque couramment utilisés en pathologie humaine tel que la CK-MB (isoforme MB de la créatine kinase) ou la troponine I cardiospécifique, a montré une augmentation du taux de ces marqueurs dans le sérum des souris KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> par rapport aux souris sauvages. Enfin, la fréquence cardiaque et la pression artérielle systémique des souris KO ne sont pas modifiées par rapport aux souris sauvages.

Les souris KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> présentent donc à l'âge adulte des caractéristiques morphologiques, moléculaires et biochimiques similaires à celles de patients souffrant de dilatation cardiaque. En pathologie humaine, on parle de cardiomyopathie dilatée (CMD) primitive qui se définit comme une atteinte en apparence primitive de la fibre cardiaque caractérisée par une dilatation plus ou moins importante d'un ou des deux ventricules, une atteinte de la fonction ventriculaire gauche systolique, une évolution vers l'insuffisance cardiaque progressivement irréductible et un risque de mort à tous les stades de la maladie. Il s'agit d'une affection fréquente, s'observant à tout âge, mais principalement chez l'adulte jeune entre 20 et 40 ans et 3 fois plus souvent chez l'homme que la femme. Les CMD s'accompagnent de deux perturbations essentielles : une atteinte de la fonction contractile ventriculaire avec une fraction d'éjection globale abaissée et une augmentation du volume diastolique ventriculaire.

Chez l'homme, on connaît quelques cas de cardiomyopathies induites par des mutations génétiques mais toutes ou presque concernent des mutations sur des gènes codant pour des protéines du cytosquelette, telles que la dystrophine ou encore la métavinculine, l' $\alpha$ -dystroglycan, l' $\alpha$ -et  $\beta$ -sarcoglycan et la protéine musculaire LIM (Chen and Chien, 1999; Chien, 1999). Plus récemment, la protéine ErbB2, impliquée dans le phénotype embryonnaire des souris KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, s'est montrée essentielle dans la prévention de la cardiomyopathie dilatée chez la souris adulte (Crone et al., 2002). L'interaction entre les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et ErbB2 existe donc peut-être également dans le cœur adulte, mais cette hypothèse reste à vérifier.

De façon remarquable, les souris KO mâles semblent plus atteintes que les souris KO femelles, ce qui laisse supposer que ces dernières sont protégées vis-à-vis des anomalies cardiovasculaires induites par l'absence de récepteur 5-HT2B. Cette différence mâle/femelle se situe à différents niveaux. Au niveau histopathologique, les femelles présentent une dilatation du ventricule gauche moindre que les mâles. Au niveau biochimique, les dosages sanguins de marqueurs de souffrance cardiaque tels que la troponine I cardiospécifique et la créatine kinase MB massique sont nettement plus augmentés à 6 semaines chez les mâles que chez les femelles mutantes. Au niveau fonctionnel, les femelles mutantes présentent des caractéristiques voisines de leurs homologues sauvages. Les paramètres échocardiographiques et l'électrocardiogramme des femelles KO 5-HT2B sont normaux. Les faibles anomalies histopathologiques n'ont donc pas de retentissement majeur sur le plan fonctionnel chez les souris femelles invalidées pour le récepteur 5-HT2B. Il existe donc un mécanisme de compensation ou de protection chez les femelles pour réduire les effets délétères de la mutation dans le récepteur 5-HT2B au niveau du système cardiovasculaire. Les hormones sexuelles femelles, principalement représentées par les œstrogènes, sont classiquement reconnues pour avoir un pouvoir protecteur dans le système cardiovasculaire. Cette hypothèse sera étudiée dans ce manuscrit.

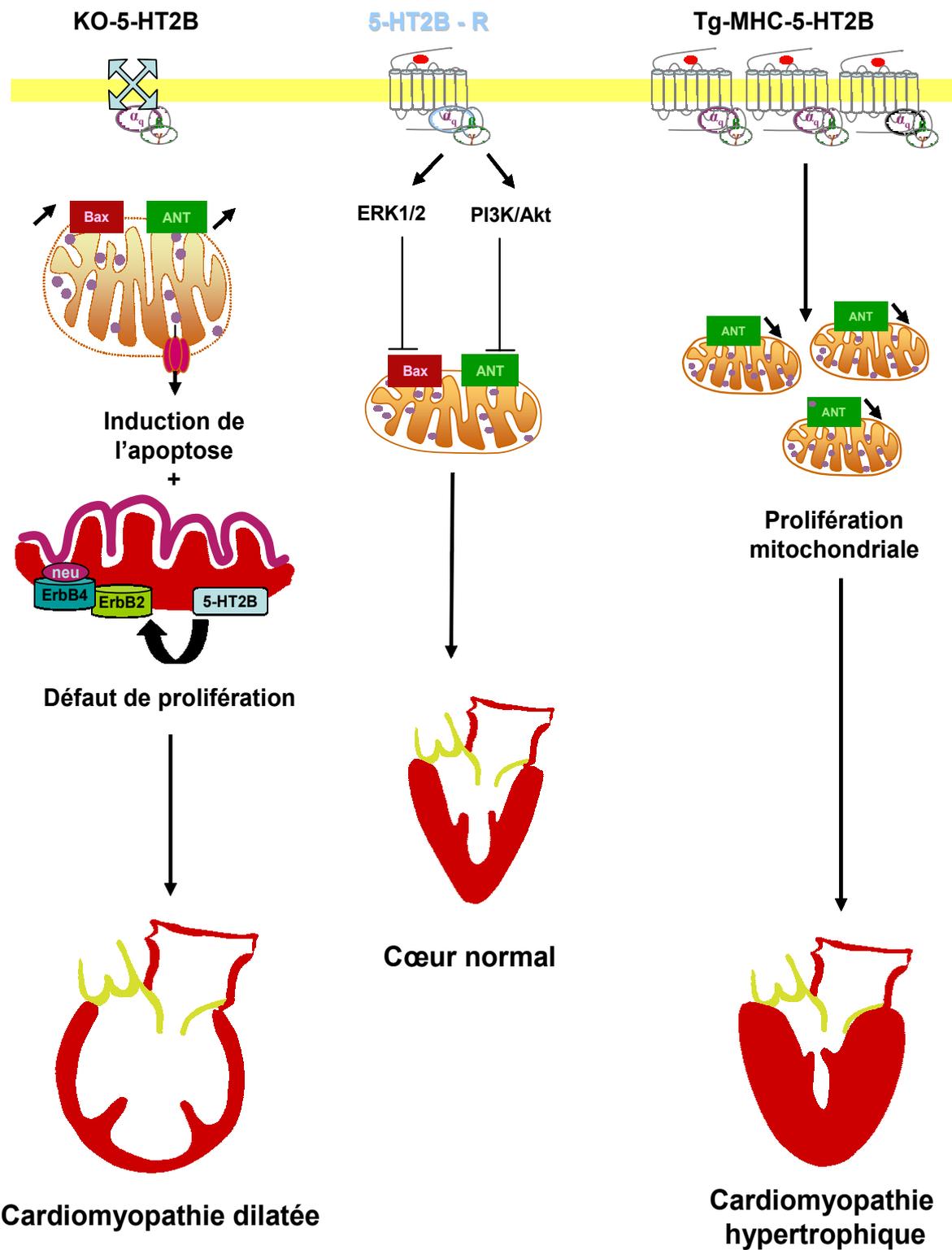
### **Hypertrophie cardiaque**

De façon surprenante, la cardiopathie dilatée induite par la délétion du gène du récepteur 5-HT2B ne subit pas de phénomène compensatoire de type hypertrophie cardiaque comme on pourrait s'y attendre. En effet le stress biomécanique induit par la réduction de la masse ventriculaire provoque généralement la réexpression de gènes embryonnaires impliqués dans l'hypertrophie compensatrice tels que la protéine  $\beta$ -MHC (*Myosin Heavy Chain*) ou l'ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) (Chien et al., 1993). Par contre les souris sur-exprimant de manière spécifique le récepteur 5-HT2B dans les cardiomyocytes, grâce à la fusion de l'ADN complémentaire du récepteur 5-HT2B avec le promoteur du gène de la protéine MHC, présentent des signes caractéristiques d'hypertrophie cardiaque. Les analyses histologiques, échocardiographiques et hémodynamiques ont décrit un épaississement des parois ventriculaires sans modification, ni de la contractilité cardiaque, ni des paramètres hémodynamiques (pression artérielle et fréquence cardiaque) chez les souris transgéniques MHC-5-HT2B par rapport aux souris sauvages. Les caractéristiques morphologiques sont confirmées par la surexpression des marqueurs biochimiques de l'hypertrophie cardiaque  $\beta$ -MHC et ANP. Enfin le cœur des souris transgéniques montre une prolifération anormale des mitochondries ainsi qu'une augmentation de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase et de la cytochrome *c* oxydase associées au métabolisme de ces mitochondries (Nebigil et al., 2003b).

En résumé la délétion du récepteur 5-HT2B induit une destruction des mitochondries associée à une diminution de leur activité enzymatique et à un phénotype de cardiomyopathie dilatée (Nebigil et al., 2003a) tandis que la surexpression de ce même récepteur produit des effets opposés (hypertrophie cardiaque, augmentation de l'activité enzymatique des mitochondries présentes en plus grand nombre). Il apparaît donc que les fonctions cardiaques du récepteur 5-HT2B soient intimement liées à la fonction mitochondriale et que cette interaction soit un élément clé dans la régulation de l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose pendant la vie embryonnaire, et entre l'hypertrophie et l'apoptose des cardiomyocytes adultes post-mitotiques (Nebigil and Maroteaux, 2003). Ces travaux ont démontré le rôle majeur des mitochondries dans la transition entre l'hypertrophie cardiaque, la

cardiomyopathie dilatée, phénomène de décompensation et l'étape ultime d'insuffisance cardiaque, caractérisée par un niveau d'apoptose plus élevé. (**Figure 12**)

Par ailleurs le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> semble intervenir à d'autres niveaux, dans le phénomène d'hypertrophie cardiaque. La perfusion chronique d'isoprénaline induit le développement d'une hypertrophie cardiaque par stimulation excessive des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques. Cependant les souris KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> sont partiellement résistantes au développement de cette hypertrophie cardiaque de même que les souris sauvages co-perfusées avec un antagoniste spécifique du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> (SB 206553 ou SB 215505). Ce type d'hypertrophie cardiaque s'accompagne habituellement d'une augmentation du taux plasmatique de certaines cytokines parmi lesquelles l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ). Les souris KO et les souris sauvages traitées par l'antagoniste 5-HT<sub>2B</sub>, ne montrent pas d'augmentation des taux plasmatiques de ces cytokines à l'inverse des souris contrôles. La stimulation, par l'isoprénaline, des fibroblastes cardiaques de souris, en culture primaire, induit la libération dans le surnageant de culture d'IL-6 (interleukine 6), d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ . A l'inverse les fibroblastes cardiaques sauvages prétraités par un antagoniste 5-HT<sub>2B</sub>, ou de souris mutantes, sont résistants vis-à-vis de la libération des cytokines. Enfin il a été montré que la stimulation des fibroblastes cardiaques de souris sauvages par la sérotonine permet également la libération de ces mêmes cytokines. Ainsi, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> est essentiel au développement de l'hypertrophie cardiaque induite par stimulation  $\beta$ -adrénergique de part son rôle sur la libération des cytokines hypertrophiantes par les fibroblastes cardiaques (Jaffre et al., 2004). Les effets de la stimulation du récepteur  $\beta$ -adrénergique couplé à une protéine G<sub>s</sub> sont donc inhibés par le blocage d'un autre récepteur, 5-HT<sub>2B</sub>, couplé à une protéine G<sub>q</sub>. Ce phénomène, appelé la trans-inhibition, a été décrit précédemment concernant l'inactivation du signal induit par les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II et l'inhibition du signal AT<sub>1</sub> par un antagoniste  $\beta$ -adrénergique (Barki-Harrington et al., 2003).



**Figure 12** : Schéma récapitulatif des fonctions du récepteur 5-HT2B dans les cardiomyocytes de souris

### 3.7.3. Pathologies vasculaires

Alors que les fonctions cardiaques de la sérotonine ne sont connues que depuis peu de temps, ses effets vasculaires et leur implication en pathologie sont reconnus depuis plus longtemps. De plus, certaines applications thérapeutiques ont déjà été évaluées (Villalon et al., 1997). Les implications précises du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> dans les pathologies cardiovasculaires sont actuellement le fait de nombreuses investigations, laissant espérer la mise au point de nouveaux traitements, notamment dans l'hypertension artérielle pulmonaire et la migraine.

#### Hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HAP) est définie comme une élévation progressive de la pression artérielle pulmonaire associée à un remodelage vasculaire irréversible. Une nouvelle classification de l'HAP a récemment été établie (Simonneau et al., 2004). L'HAP idiopathique regroupe les cas où la cause de la maladie n'est pas connue, tandis que les formes secondaires sont classées selon leur étiologie : cardiopathie congénitale, maladie thromboembolique, infection HIV, utilisation de médicaments anorexigènes et maladies du tissu connectif. Certaines formes familiales ont été associées à des mutations dans le gène de la protéine *BMPR2* (*bone morphogenetic protein receptor type II*), ainsi que dans le gène du transporteur de la sérotonine (De Caestecker and Meyrick, 2001; Eddahibi et al., 2002). Plus récemment, une association génétique a été identifiée avec le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> (Blanpain et al., 2003). L'hypertension pulmonaire artérielle est une pathologie de mauvais pronostic avec une mortalité à 3 ans de 50 %. Une anomalie de la production ou du métabolisme de la sérotonine a été impliquée dans cette pathologie puisque les taux de sérotonine plasmatiques sont élevés chez les patients souffrant d'HAP (Herve et al., 1995; Kereveur et al., 2000). L'utilisation d'anorexigènes dérivés des amphétamines, telles que la fenfluramine ou la dexfenfluramine, a provoqué une augmentation de l'incidence de cette pathologie, conduisant ainsi à l'arrêt de son utilisation en thérapeutique. Ce composé connu comme étant un antagoniste du transporteur de la sérotonine, produit un métabolite majeur, la norfenfluramine, récemment identifiée comme étant un agoniste 5-HT<sub>2B</sub> (Fitzgerald et al., 2000). L'utilisation de ce type d'anorexigène ne provoque cependant pas d'hypertension pulmonaire dans tous les cas : il semble donc qu'il existe des facteurs de risques associés (génétiques ou environnementaux tel que l'hypoxie).

Au niveau de la vasculature pulmonaire, une hypoxie chronique entraîne une augmentation de la pression artérielle pulmonaire résultant d'une prolifération des cellules vasculaires. Ces changements structuraux sont semblables à ceux observés dans l'hypertension artérielle pulmonaire primaire. Sur des poumons isolés de rats en conditions normoxiques, où la vasculature est précontractée, de faibles doses de sérotonine induisent une vasodilatation dépendante des NOSs, mais si on augmente les doses de sérotonine, on observe une vasoconstriction inhibée par un antagoniste 5-HT<sub>2A/2C</sub> (kétansérine) ou un antagoniste 5-HT<sub>1/2</sub> (méthiothépine). La vasodilatation, induite par la sérotonine, disparaît si on place le poumon en condition hypoxique (10 % O<sub>2</sub>). L'injection de sérotonine est capable de potentialiser l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire, induite par une hypoxie aiguë chez le rat, sauf si on traite les animaux par des antagonistes 5-HT<sub>1/2</sub>. Cette potentialisation est également réduite si on traite les animaux par des antagonistes des cyclo-oxygénases (Eddahibi et al., 1997). Cette étude montre donc la complexité des effets vasculaires de la sérotonine en fonction des conditions d'oxygénations.

De récents travaux ont montré que les souris invalidées pour le récepteur 5-HT2B sont totalement résistantes au développement d'une hypertension pulmonaire artérielle, qu'elle soit d'origine hypoxique ou liée à l'utilisation de la dexfenfluramine. L'hypertension pulmonaire artérielle induite par l'hypoxie, associée à un traitement par la dexfenfluramine, chez la souris se caractérise par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire, un remodelage vasculaire important par prolifération des cellules musculaires lisses, une augmentation de l'activité élastase et une augmentation des taux de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*). Les souris sauvages, prétraitées par un antagoniste du récepteur 5-HT2B, ainsi que les souris KO pour ce récepteur sont totalement résistantes au développement de cette hypertension artérielle pulmonaire (Launay et al., 2002). De plus, ces travaux ont montré que l'hypertension artérielle pulmonaire, chez l'homme et chez la souris, s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression du récepteur 5-HT2B dans la vasculature pulmonaire et plus précisément dans les cellules musculaires lisses. De façon remarquable, les femelles KO semblent plus sensibles à la dexfenfluramine que les mâles KO (résultats non publiés). Par ailleurs le récepteur 5-HT1B, impliqué dans la vasoconstriction des artères pulmonaires, semble jouer un rôle également prépondérant dans la physiopathologie de l'HAP puisque les souris mutantes invalidées pour ce récepteur sont partiellement résistantes à l'HAP induite par hypoxie (Keegan et al., 2001). De même les souris mutantes invalidées pour le transporteur de la sérotonine sont partiellement résistantes à l'HAP induite par l'hypoxie (Eddahibi et al., 2000). Il apparaît donc que seules les souris mutantes pour le récepteur 5-HT2B soient totalement résistantes à l'HAP et que ce récepteur 5-HT2B soit le facteur limitant dans le développement de l'HAP. Son rôle reste cependant encore controversé, puisque de récents travaux ont montré que le taux des ARN messagers des récepteurs de la sérotonine, dont le récepteur 5-HT2B, n'était pas modifié dans les vaisseaux de patients souffrant d'hypertension pulmonaire primaire ou secondaire, ainsi que dans les cellules musculaires lisses obtenues chez ces mêmes patients. Par contre cette étude a montré la surexpression de l'ARN messenger du transporteur de la sérotonine dans cette pathologie (Marcos et al., 2004).

### Hypertension artérielle systémique

D'anciens travaux ont montré une plus grande sensibilité à la sérotonine chez des animaux hypertendus. En effet les aortes de rats hypertendus selon le modèle 2K2C (deux clips posés sur les artères rénales permettent d'induire une hypertension artérielle) présentent une réponse contractile à la sérotonine plus élevée que celles des rats normotendus (Roson et al., 1990). Les artères mésentériques des rats hypertendus selon le modèle *DOCA-salt* (diète salée associée à une perfusion continue de deoxycorticostérone) sont également plus sensibles à la sérotonine que les artères des rats contrôles (Thompson and Webb, 1987). Un phénomène similaire a été observé dans le cas de la veine portale chez les rats présentant une hypertension portale (Cummings et al., 1986).

Les travaux de S. Watts et coll. ont mis en évidence une nouvelle fonction du récepteur 5-HT2B dans l'hypertension artérielle systémique. En utilisant des modèles d'hypertension induite chez le rat, ces auteurs ont montré une modification de la pharmacologie vasculaire contractile. En effet, la contractilité sérotonine-dépendante est attribuée classiquement à la stimulation du récepteur 5-HT2A exprimé sur le muscle lisse vasculaire en absence d'hypertension (**Figure 11**). Mais de façon surprenante, la pharmacologie contractile de la sérotonine devient 5-HT2B-dépendante chez les rats hypertendus, soit par un traitement *DOCA-salt*, soit par l'inhibition chronique de la synthèse de monoxyde d'azote (NO). Plus précisément, il a été décrit que l'ergonovine, un alcaloïde dérivé de l'ergot de seigle, induisait une importante contraction de l'artère mésentérique

isolée de rats traités *DOCA-salt* mais quasiment pas de l'artère des animaux contrôles. Cette contraction est protéine kinase C et calcium dépendante (Watts and Webb, 1994). Par la suite il a été prouvé que le récepteur 5-HT2B était responsable de cette modification de réponse pharmacologique. De plus ce récepteur semble être surexprimé dans les artères mésentériques des animaux hypertendus par rapport aux animaux contrôles (Watts et al., 1996). L'étude *in vivo* des rats hypertendus, selon le modèle *DOCA-salt*, a confirmé le rôle du récepteur 5-HT2B, puisque l'administration d'un antagoniste spécifique de ce récepteur, le composé LY-272015, a permis d'abaisser la pression artérielle systolique des animaux les plus sévèrement hypertendus. Cependant cette diminution n'est visible qu'après 3 semaines d'induction de l'hypertension et l'antagoniste du récepteur 5-HT2B est sans effet sur la phase précoce de l'hypertension. L'utilisation de cet antagoniste chez les animaux normotendus a confirmé le pouvoir relaxant du récepteur 5-HT2B en induisant une légère, mais significative, augmentation de la pression artérielle. De plus, un agoniste sélectif du récepteur 5-HT2B, le composé BW-723C86, s'est révélé être un agent vasoconstricteur de l'artère mésentérique des rats hypertendus mais pas des rats normotendus (Watts and Fink, 1999). Enfin il faut préciser que cette réponse 5-HT2B dépendante n'est pas restreinte à la vasculature mésentérique puisque l'aorte de rats *DOCA-salt* présente le même type de modifications pharmacologiques.

Il semble que la cause originale de ce changement de pharmacologie soit le traitement par minéralocorticoïdes puisque l'aldostérone, utilisée seule, peut induire la surexpression du récepteur 5-HT2B sur des cultures organotypiques d'aorte de rat. Il existe en effet des éléments de réponse aux minéralocorticoïdes dans le promoteur du gène du récepteur 5-HT2B de rat (Foguet et al., 1992). Cependant les récentes données *in vivo* ont montré que le traitement par minéralocorticoïdes seul n'était pas suffisant pour augmenter l'expression du récepteur 5-HT2B (Banes and Watts, 2003). De plus, la surexpression du récepteur 5-HT2B semble indépendante de l'augmentation de la pression artérielle puisqu'elle apparaît plus précocement. Elle est peut être au contraire la cause de l'augmentation de la pression artérielle dans le modèle *DOCA-salt* (Watts and Harris, 1999). En revanche, il existe dans ce modèle une distinction entre les gros vaisseaux comme l'aorte et l'artère mésentérique par rapport aux artères de résistance mésentériques qui ne sont pas sensibles aux agonistes du récepteur 5-HT2B (Watts, 2002). Donc la fonction du récepteur 5-HT2B dans l'hypertension artérielle est restreinte aux gros vaisseaux.

L'utilisation d'un autre modèle d'hypertension induite par inhibition de la synthèse de NO a montré de façon similaire une plus grande sensibilité à la sérotonine. En effet le traitement chronique par L-NAME (L-Nitro-Arginine Methyl Ester) chez le porc accentue la diminution de flux coronaire en réponse à la sérotonine (Ito et al., 1995). Et plus récemment, le groupe de S. Watts a montré que le récepteur 5-HT2B est responsable de l'hypersensibilité à la sérotonine chez les rats hypertendus par inhibition de la synthèse de NO par un traitement chronique à la L-NA (*N*<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine) (Russell et al., 2002). Cette hypersensibilité s'accompagne d'une modification de pharmacologie semblable à celle observée dans le modèle *DOCA-salt* ainsi que d'une augmentation de l'expression du récepteur 5-HT2B qui devient le récepteur contractile. Enfin ces auteurs ont décrit une diminution de l'hypertension chez les rats traités par un antagoniste 5-HT2B.

## **Pré-éclampsie**

La pré-éclampsie est une pathologie du troisième trimestre de la grossesse caractérisée par une hypertension et des œdèmes pouvant conduire à la mort de la mère et/ou du fœtus. Sa physiopathologie est reliée à une libération locale de sérotonine par les plaquettes sanguines dans le circulation placentaire, accompagnée d'une dysfonction endothéliale (Bolte et al., 2001a).

La kétansérine, un antagoniste 5-HT<sub>2A</sub>, a montré une certaine efficacité dans le traitement de la pré-éclampsie et de l'éclampsie (Bolte et al., 2001b). Cependant le rôle du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> n'a pas été mis en évidence de façon certaine et en tenant compte des données concernant le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> dans l'hypertension (systémique et pulmonaire), on ne peut exclure le rôle de ce dernier dans la physiopathologie de la pré-éclampsie.

## **Migraine**

La migraine est un syndrome qui affecte 15 à 18 % des femmes contre seulement 6% des hommes. Elle se caractérise par des céphalées intenses, pulsatiles, classiquement unilatérales et s'accompagne souvent de nausées, de vomissements et de photo/phonophobie. Brièvement, l'origine de la migraine est une diminution du flux cérébral, suivi d'une vasodilatation responsable de la céphalée. Cette vasodilatation est associée à la libération de nombreux vasodilatateurs tel que le NO (Olesen et al., 1995) et la sérotonine (Johnson et al., 1998) et à la stimulation des nerfs trigéminaux qui renforcerait cette vasodilatation (De Vries et al., 1999).

Les récepteurs de la sérotonine sont depuis longtemps impliqués dans la migraine (Parsons, 1991). De nombreuses études ont montré l'efficacité clinique des agonistes 5-HT<sub>1B/1D</sub>, tels que le sumatriptan, dans le traitement aigu de la migraine (Ferrari, 2003; Humphrey and Feniuk, 1991). Les triptans agissent en produisant une vasoconstriction de la vasculature cérébrale et agissent également sur les ganglions trigéminaux (Hou et al., 2001) et sur le phénomène d'extravasation (Moskowitz, 1992). L'ergotamine, la dihydroergotamine, le methysergide et son métabolite methylegonovine sont des antagonistes 5-HT<sub>1</sub> possédant également une forte affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> (Kursar et al., 1992; Newton et al., 1996; Schmuck et al., 1996) et sont connus pour leurs propriétés de prévention de la migraine en agissant sur les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> ou 5-HT<sub>2C</sub> (Kalkman, 1994). Les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>2C</sub> ont été mis en évidence dans les cellules endothéliales des vaisseaux méningés et le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> induit la relaxation des vaisseaux cérébraux par la synthèse de NO (Schmuck et al., 1996). De plus le blocage du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> permet d'inhiber l'extravasation plasmatique induite par le m-CPP chez le cochon d'Inde (Johnson et al., 2003). Les études *in vitro* sur les cellules 1C11 ont montré la capacité du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> à activer la synthèse de NO (Manivet et al., 2000). Ces études laissent donc à penser que la synthèse de NO par le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> jouerait un rôle dans la physiopathologie de la migraine. Plus récemment, il a été montré que la dihydroergotamine (DHE) et son métabolite la 8-OH-DHE sont des agonistes des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>, permettant la synthèse de GMP cyclique et d'inositol-triphosphate. A l'inverse des triptans qui sont utilisés dans le traitement aigu de la migraine, la DHE a prouvé son efficacité dans le traitement chronique et la prévention des crises de migraine. Par ailleurs son métabolite, la 8-OH-DHE, induit une désensibilisation plus longue du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> que celle du récepteur 5-HT<sub>2C</sub>. On peut donc supposer que l'inactivation à long terme du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> serait impliquée dans la prévention chronique de la migraine (Schaerlinger et al., 2003).

## 4. Protection cardiovasculaire par les hormones ovariennes

*NB : nous nous limiterons dans ce chapitre aux fonctions cardiovasculaires des hormones ovariennes tout en sachant que leurs actions sont beaucoup plus nombreuses et diversifiées.*

L'incidence des maladies cardiovasculaires diffère significativement entre les hommes et les femmes en raison plus particulièrement de la différence de facteurs de risque et de taux hormonal dans ces deux populations (Barrett-Connor, 1997). Alors que les femmes avant la ménopause n'ont qu'une faible incidence de pathologies cardiovasculaires (athérosclérose, maladies coronaires, hypertension) par rapport aux hommes, cette incidence et les taux de mortalité après la ménopause deviennent semblables entre les hommes et les femmes (Adams et al., 1999; Furman, 1968). Alors que les hommes présentent à l'état de base des valeurs de pression artérielle plus élevées que les femmes, à l'inverse, après la ménopause, les femmes présentent une pression artérielle plus élevée que les hommes du même âge. Cependant à cet âge, la pathologie vasculaire est souvent compliquée par l'obésité et le diabète de type II qui sont indépendamment responsables de l'augmentation des valeurs de pression artérielle (August and Oparil, 1999; Stamler et al., 1976).

Mais le rôle des hormones ovariennes comme facteur de protection cardiovasculaire n'est pas parfaitement établi puisque, par exemple, l'hypertrophie cardiaque n'est pas plus sévère chez les hommes que chez les femmes (Dimitrow et al., 1998). De plus, l'utilisation de l'hormonothérapie substitutive a été récemment remise en cause par deux études [l'étude HERS : *Heart and Oestrogen-progestin Replacement Study* (Hulley et al., 1998) et l'étude WHI : *Women's Health Initiative* (Rossouw et al., 2002)] montrant une augmentation du risque thromboembolique et des risques d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux, ainsi que d'autres risques non cardiovasculaires (cancer) chez des femmes ménopausées ayant utilisé des oestrogènes de substitution.

Néanmoins les études *in vitro* et *in vivo* sont nombreuses à démontrer les effets bénéfiques des hormones ovariennes et principalement des oestrogènes.

### 4.1. Modèles animaux présentant des différences selon le genre

De même qu'en pathologie humaine, certains modèles animaux de pathologies cardiovasculaires présentent une sévérité variable en fonction du genre et, le plus souvent, les femelles sont favorablement protégées [pour revue (Leinwand, 2003)].

Les souris mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> présentent une cardiomyopathie dilatée plus sévère chez les mâles que chez les femelles (Nebigil et al., 2001b). Les souris mutantes sur-exprimant le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*) dans le cœur présentent également une cardiomyopathie dilatée avec le même type de différence en fonction du genre (Kadokami et al., 2000).

Cependant la plupart des modèles murins présentant une différence de genre en faveur des femelles sont des modèles de cardiopathie hypertrophique : les souris KO pour la protéine FKBP12.6 intervenant dans le libération du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique (Xin et al., 2002), les souris transgéniques sur-exprimant le phospholamban, une protéine également impliquée dans le signal calcique des cardiomyocytes (Haghighi et al., 2001), les souris hétérozygotes pour la protéine de structure  $\alpha$ -MHC (*myosin heavy chain*) (Berul et al., 1998; Geisterfer-Lowrance et al., 1996) ou ayant une mutation ponctuelle dans le gène de la protéine  $\alpha$ -MHC (Olsson et al., 2001) et les souris KO pour le récepteur de l'ANP (*atrial natriuretic peptide*) dont l'hypertrophie est la conséquence d'une hypertension sévère (Oliver et al., 1997). Dans la plupart de ces modèles murins d'hypertrophie cardiaque, les mâles décompensent en développant une cardiomyopathie dilatée caractérisée par une anomalie de la fonction systolique et, le plus souvent, les femelles sont protégées vis-à-vis de la décompensation et gardent une fonction systolique normale plus longtemps. Enfin, le modèle de souris KO pour les PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ) se caractérise par une accumulation de lipides dans le cœur et le foie limitant la survie des mâles plus que celle des femelles (Djouadi et al., 1998).

Dans certains cas particuliers, la différence de genre peut être due à une mutation dans un gène localisé sur le chromosome X comme c'est le cas pour le gène de la dystrophine (Towbin, 1998). Mais en général, les différences de phénotype cardiovasculaires entre les mâles et les femelles sont supposées provenir de leur statut hormonal différent et l'hypothèse la plus souvent formulée est la protection cardiovasculaire par les hormones ovariennes chez les femelles. Les oestrogènes, étant les principales hormones libérées par les ovaires, sont devenus les candidats privilégiés pour expliquer cette protection.

Cependant une étude récente a montré que la plus grande sévérité pour la cardiopathie hypertrophique des souris mutantes mâles pour la guanylate cyclase A, par rapport aux femelles mutantes, était causée par la testostérone, principale hormone mâle (Li et al., 2004). Le même type d'observation a été fait chez les souris transgéniques sur-exprimant les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans le cœur et souffrant également d'une cardiopathie hypertrophique (Gao et al., 2003).

A l'opposé, les souris transgéniques sur-exprimant le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique présentent une cardiomyopathie dilatée sévère conduisant à la mort précoce des animaux avec une plus grande prévalence de l'insuffisance cardiaque chez les femelles par rapport aux mâles (Lemire et al., 2001).

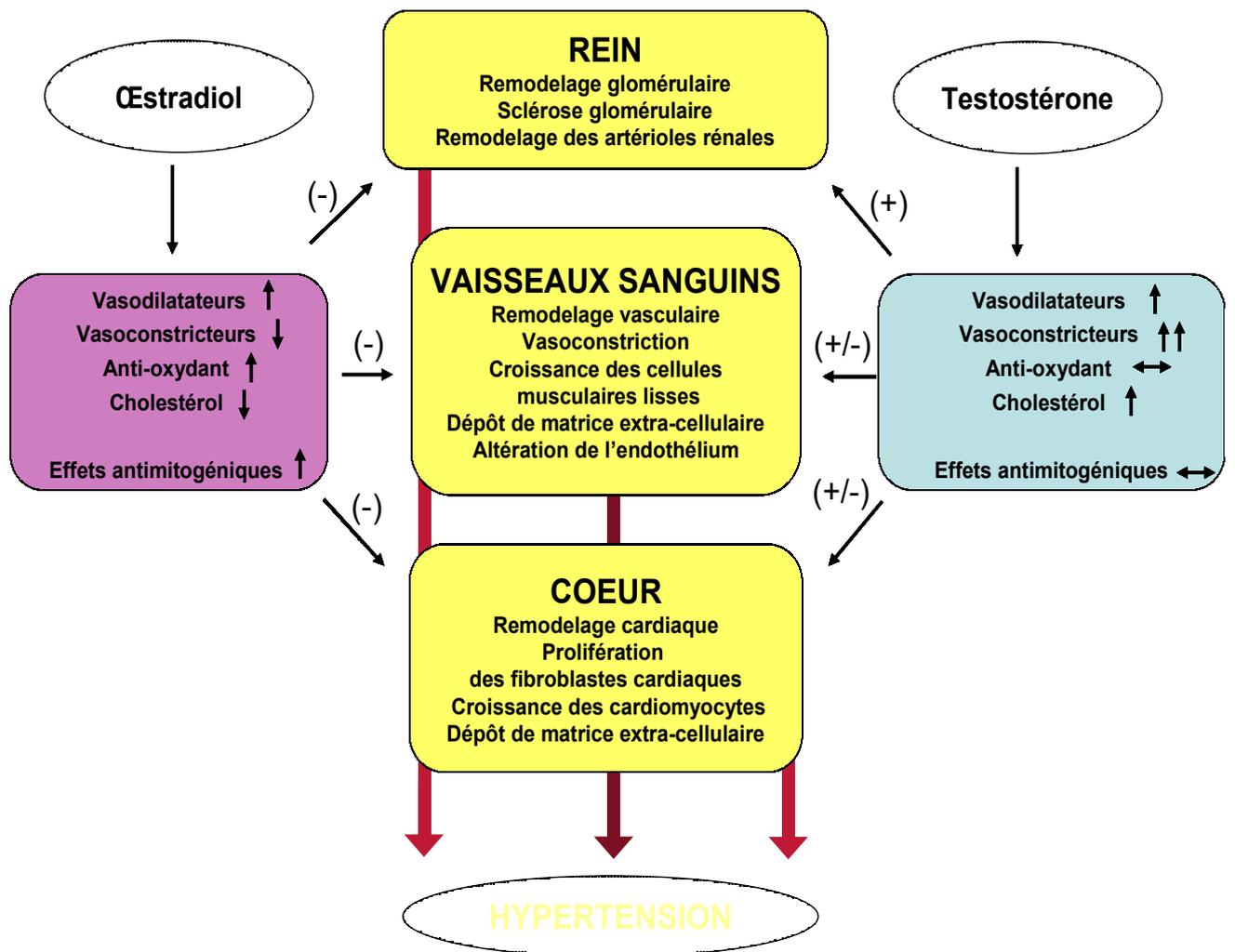
L'utilisation des animaux transgéniques ciblant des protéines impliquées dans la régulation des fonctions cardiovasculaires donnent des phénotypes très variables par rapport au genre des animaux et ne permettent donc pas de conclure à l'action exclusive des hormones ovariennes comme facteur de protection cardiovasculaire. Les études faisant appel à l'ovariectomie (ablation chirurgicale des ovaires) des femelles sont sans doute plus proches de la physiologie concernant les modifications hormonales induites par la ménopause.

## 4.2. Effets de l'ovariectomie

Une étude récente chez la femme a montré qu'une ovariectomie chirurgicale entraîne une augmentation de la pression artérielle et des résistances périphériques (Mercurio et al., 2004).

Mais la plupart des très nombreuses études sur les effets de l'ovariectomie sont réalisées chez le rat. L'ovariectomie des rats femelles induit une légère augmentation de la masse du ventricule gauche sans modification de la pression artérielle. Cependant la pression différentielle (*pulse pressure* : différence entre la pression systolique et la pression diastolique), les résistances périphériques et la fréquence cardiaque augmentent de façon significative chez les femelles ovariectomisées par rapport aux femelles contrôles. De plus le volume d'éjection systolique et le débit cardiaque sont légèrement diminués (Lam et al., 2002). L'ovariectomie aggrave l'hypertension artérielle dans le modèle *DOCA-salt*, en raison d'une réponse vasculaire anormale à l'endothéline par ses récepteurs ET<sub>B</sub> (David et al., 2001). De même chez le rat SHR, spontanément hypertendu, et également sous diète salée, l'ovariectomie induit une élévation plus sévère de la pression artérielle (Fang et al., 2001). Par ailleurs l'hypertrophie ventriculaire droite, provoquée par la monocrotaline, est aggravée par l'ovariectomie. Elle s'accompagne d'une augmentation d'expression de la rénine ainsi que d'autres protéines du système rénine-angiotensine (tel que l'angiotensinogène) (Ahn et al., 2003). Il a également été montré que chez les rats ovariectomisés, il existait une plus grande sensibilité au calcium dans les myofilaments cardiaques et cette différence de réponse serait induite par la régulation de certaines protéines de ces myofilaments, telle que la troponine I (Wattanapernpool and Reiser, 1999).

De nombreux autres exemples de l'effet de ovariectomie et de différence selon le genre sont décrits dans la littérature (Hayward et al., 2000). Mais, de même que pour les souris transgéniques, les études chez les rats donnent des conclusions contradictoires concernant les effets des hormones sexuelles puisque dans certains cas d'hypertension, l'ovariectomie est sans effet sur les valeurs de pression artérielle tandis que la castration des mâles permet d'améliorer ces valeurs. Donc, lorsque l'on parle de régulation des fonctions cardiovasculaires par les hormones sexuelles, il faut prendre en compte les effets, non seulement des oestrogènes, mais aussi de la progestérone et de la testostérone, dont on sait maintenant qu'elles jouent un rôle important dans le système cardiovasculaire. Pour revue : (Dubey et al., 2002). **(Figure 13)**



**Figure 13 :** Représentation schématique des différents mécanismes par lesquels l'œstradiol et la testostérone sont associés à l'induction ou à la prévention de l'hypertension artérielle.

D'après (Dubey et al., 2002)

### 4.3. Les Oestrogènes : Facteur de Protection Cardiovasculaire

*pour revue:* (Mendelsohn, 2000a; Mendelsohn, 2000b; Mendelsohn and Karas, 1999)

L'effet délétère de l'ovariectomie chez des rats spontanément hypertendus peut être corrigé par une hormonothérapie substitutive si les oestrogènes sont administrés avant le développement de l'hypertension mais le traitement hormonal est sans effet sur la progression de la pathologie si il n'est instauré qu'après la ménopause physiologique (Sharkey et al., 1999). Néanmoins, l'effet protecteur des oestrogènes chez les animaux ovariectomisés a été décrit dans un grand nombre de modèles animaux d'hypertension artérielle ou d'hypertrophie cardiaque (Ahn et al., 2003; Lam et al., 2002; Mercuro et al., 2004).

Chez l'homme, de nombreuses études ont montré l'influence bénéfique, dans la maladie coronaire, de l'hormonothérapie substitutive sur le taux de cholestérol, sur la résistance à l'insuline et la tolérance au glucose (Bailey and Ahmed-Sorour, 1980; Godsland et al., 1987). Cependant, les effets bénéfiques sur le métabolisme lipidique ne permettent d'expliquer que 30% des cas d'amélioration des fonctions cardiovasculaires des femmes utilisant des oestrogènes après la ménopause (Bush et al., 1987; Grady et al., 1992). Les données récentes de la littérature suggèrent que l'action des œstrogènes sur la vasculature pourrait bien être la raison majeure de leurs effets bénéfiques chez les femmes, en augmentant la capacité de vasodilatation, en inhibant la réponse sur un vaisseau endommagé et en inhibant le développement de l'athérosclérose (Farhat et al., 1996; Mendelsohn and Karas, 1994).

#### 4.3.1. Les Récepteurs aux Oestrogènes

A ce jour, deux principaux récepteurs des œstrogènes ont été identifiés, ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Tous deux appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes (Kuiper et al., 1996; Walter et al., 1985). Ces deux récepteurs présentent une grande homologie de séquence et sont, comme les autres récepteurs aux stéroïdes, des facteurs de transcription capable de réguler l'expression de gènes cibles (Brown, 1994; Shibata et al., 1997).

Les données de la littérature nous montrent que le système cardiovasculaire est une cible privilégiée pour les œstrogènes au même titre que les organes reproducteurs ou les glandes mammaires. Les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires lient les œstrogènes avec une haute affinité et les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont été identifiés dans ces deux sous-types cellulaires ainsi qu'au niveau des cardiomyocytes chez l'homme et la femme (Grohe et al., 1997; Karas et al., 1994; Iafrati et al., 1997). Cependant il existe des différences de distribution en fonction du genre puisque le récepteur ER $\beta$  est majoritairement exprimé dans les artères des femmes, alors que celles des hommes expriment en quantité équivalente les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Hodges et al., 2000).

La génération de souris invalidées pour les récepteurs aux oestrogènes a permis de mettre en évidence les fonctions des récepteurs ER $\alpha$  sur l'inhibition de l'athérosclérose (Adam et al., 2002), l'expression et l'activation des NOS endothéliales et inductibles (Muller-Delp et al., 2003 ; Liang et al., 2003 ; Darblade et al., 2002). Les récepteurs ER $\beta$  semblent être impliqués dans la régulation de la pression artérielle (Zhu et al., 2002)

### 4.3.2. Les Effets Directs des Œstrogènes sur les Vaisseaux

#### Les effets non génomiques rapides

La mise en évidence, depuis quelques années, d'effets très rapides des œstrogènes, apparaissant en moins d'une heure, indiquent que les récepteurs aux œstrogènes ne sont pas uniquement des facteurs de transcription et peuvent participer à des voies de signalisation plus rapides comme l'activation des MAPK (Wade et al., 2001) et l'activation des *Nitric Oxide Synthases* (NOSs) (Chen et al., 1999). Les œstrogènes provoquent une vasodilatation à court terme (5 à 30 minutes) par des voies endothélium-dépendantes et -indépendantes. A des concentrations supra physiologiques, les œstrogènes inhibent l'entrée de calcium extracellulaire dans les cellules du muscle lisse par un effet sur la membrane ou sur les canaux calciques de type-L (Freay et al., 1997; Jiang et al., 1991). Cependant il s'agit probablement d'artefacts pharmacologiques. A des concentrations physiologiques, les œstrogènes stimulent l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendant grâce à l'activation de la voie de signalisation NO/GMP cyclique et donc induisent une relaxation du muscle lisse et une vasodilatation. Dans les cellules endothéliales en culture, des concentrations physiologiques en œstrogènes provoquent une formation rapide de NO sans modifier le profil d'expression de ces cellules (Caulin-Glaser et al., 1997; Lantin-Hermoso et al., 1997). Actuellement on ne sait pas si cet effet est provoqué par les récepteurs ER $\alpha$  ou ER $\beta$  présents dans le cytoplasme ou bien si les œstrogènes sont capables d'activer un récepteur dans la membrane plasmique qui serait ER $\alpha$  ou ER $\beta$  ou un nouveau sous-type de récepteur aux œstrogènes (Nadal et al., 2001; Pappas et al., 1995).

L'hypothèse du récepteur ER $\alpha$  activant les NOSs semble la plus probable à ce jour, peut-être en utilisant une voie de signalisation intermédiaire telle que l'activation par des tyrosine kinases (Src) ou des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinase*) (Chen et al., 1999; Collins and Webb, 1999; Migliaccio et al., 1996). Certains auteurs ont également proposé l'interaction avec un intermédiaire protéique tel que Hsp90 qui est aussi capable de lier et d'activer les NOSs (Garcia-Cardena et al., 1998). De récents travaux indiquent que l'activation des NOSs endothéliales (eNOS) par les œstrogènes et le récepteur ER $\alpha$  utiliserait la voie phosphatidylinositol-3-kinase-Akt (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Haynes et al., 2000) (**Figure 14**). La mise en évidence d'une interaction directe entre la protéine p85 (de la voie PI3-kinase-Akt) et ER $\alpha$  suggère que les récepteurs aux œstrogènes seraient liés à la membrane plasmique par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, cette interaction étant compatible avec l'absence de motifs structuraux des récepteurs aux œstrogènes permettant leur insertion dans la membrane plasmique (Simoncini et al., 2003).

D'autres auteurs ont montré la localisation d'un complexe ER $\alpha$ -eNOS dans les cavéoles des cellules endothéliales pulmonaires (Chambliss et al., 2000) où le 17 $\beta$ -œstradiol est capable d'induire une activation calcium-dépendante des eNOSs. Il semble que le récepteur aux œstrogènes pourrait être transporté du noyau vers la membrane plasmique et plus précisément vers les cavéoles après stimulation (Razandi et al., 2002). Il apparaît clair maintenant que ces récepteurs peuvent induire l'activation des NOS endothéliales et que cette activation dépend des cavéoles et de la cavéoline qui les composent (**Figure 14**) [pour revue (Zhu and Smart, 2003)].

Les conclusions de ces études *in vitro* sont confortées par les observations faites *in vivo*. En effet, les œstrogènes sont capables d'induire une vasodilatation coronaire rapide chez

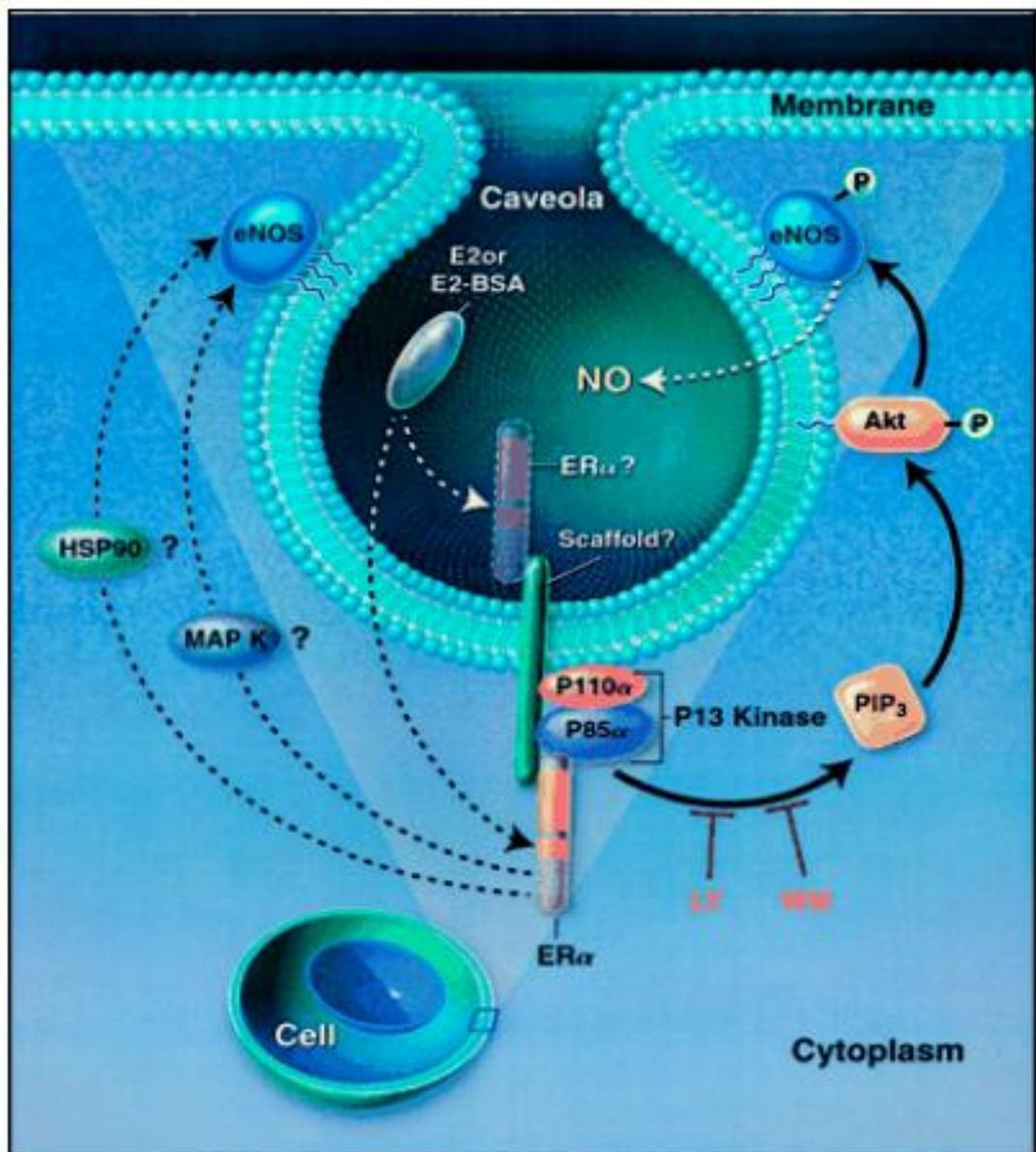
les primates (Williams et al., 1992) et d'autres animaux (Sudhir et al., 1997). Ces hormones provoquent également une dilatation des coronaires et des artères branchiales chez les femmes après la ménopause (Guetta et al., 1997; Reis, 1994). Tous ces effets sont largement reliés à une l'augmentation de la synthèse de NO.

Cependant le doute subsiste quant au rôle des récepteurs aux oestrogènes puisque l'incubation avec de l'œstradiol à court terme d'anneaux d'artère coronaire de porc permet de réduire significativement la contraction du vaisseau en réponse à des agents vasoconstricteurs classiques (endothéline-1, 5-HT) mais ce phénomène n'est pas bloqué par l'utilisation des antagonistes non sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (tamoxifen et ICI 182,780) (Teoh et al., 2000).

### **Les effets à long terme**

La voie classiquement décrite de signalisation des récepteurs aux œstrogènes est l'entrée des œstrogènes hydrophobes dans la cellule par simple diffusion membranaire, leur liaison au récepteur induisant sa translocation dans le noyau pour interagir avec des séquences spécifiques de l'ADN appelées éléments de réponse aux œstrogènes. Ce mécanisme de transduction du signal nécessite plusieurs heures et on parle d'effet génomique (Enmark and Gustafsson, 1999). Les œstrogènes d'origine endogène ou exogène sont capables de réduire l'expression des NOSs inductibles (iNOS) dans l'aorte de rat ovariectomisé (Tamura et al., 2000). Ils induisent également la synthèse d'un autre vasodilatateur, la prostacycline, en augmentant la transcription de la cyclo-oxygénase (Jun et al., 1998). Mais les œstrogènes sont aussi actifs à long terme sur la croissance des cellules endothéliales et permettent une accélération de la régénération de l'endothélium après une atteinte vasculaire en augmentant l'expression locale de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Krasinski et al., 1997). Cette action endothéliale participe à l'inhibition de la prolifération des cellules du muscle lisse en augmentant la bio-disponibilité du NO, mais les œstrogènes sont également capables d'inhiber par un effet direct la prolifération des cellules du muscle lisse (Sullivan et al., 1995). Par ailleurs, ces hormones sont des facteurs de prévention de l'athérosclérose (Nathan and Chaudhuri, 1997). Les oestrogènes pourraient aussi protéger contre l'hypertension dans le modèle de rats SHR (*Spontaneously hypertensive rat*) en inhibant certains agents vasoconstricteurs tels que les prostaglandines (PGH<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>) et les radicaux libres oxygénés (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Dantas et al., 1999). Il existe également de nombreuses évidences que les effets délétères de la ménopause soient liés à une augmentation de l'activité des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 et TNF- $\alpha$  et les oestrogènes agiraient aussi sur d'autres partenaires de l'inflammation en augmentant le TGF- $\beta$  et en régulant la synthèse des prostaglandines entre autres (Pfeilschifter et al., 2002).

Ainsi les effets des œstrogènes sur la vasculature et la régulation de la pression artérielle sont actuellement bien décrits, cependant leurs effets sur le muscle cardiaque restent encore obscurs.



**Figure 14 :** Représentation schématique des voies de signalisation potentielles des récepteurs ER $\alpha$  pour l'activation des eNOSs  
 D'après (Mendelsohn, 2000b)

### 4.3.3. Les Œstrogènes et le Cœur

Bien que les récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  soient exprimés au niveau des cardiomyocytes et des fibroblastes cardiaques (Grohe et al., 1997), leur rôle est encore peu connu. Le récepteur ER $\beta$  semble jouer un rôle *in vivo* puisque les souris invalidées pour ce récepteur présentent un phénotype cardiaque particulier. En effet, les mâles KO- ER $\beta$  ont un cœur de taille réduite par rapport à leurs homologues sauvages et présentent une hypercontractilité ainsi qu'une augmentation de la fraction d'éjection systolique (Mendelsohn, 2000a). Le rôle cardioprotecteur des hormones sexuelles féminines a été prouvé dans une cardiomyopathie hypertrophique par l'effet anti-hypertrophique des œstrogènes (van Eickels et al., 2001; Xin et al., 2002). Cependant le mécanisme cardioprotecteur des œstrogènes sur les cardiomyopathies dilatées reste à ce jour non élucidé.

Les études sur des cardiomyocytes en culture ont montré que les oestrogènes préviennent l'apoptose (Pelzer et al., 2000), augmente la synthèse de NO (Node et al., 1997), régule la synthèse de l'endothéline et de ses récepteurs entre autres (Node et al., 1997). De plus les hormones ovariennes influencent la prolifération des fibroblastes cardiaques et les dépôts de matrice extracellulaire (Dubey et al., 1998). Il a été montré qu'il existe une différence de genre concernant l'activation de Akt dans le cœur. Cette kinase, notamment impliquée dans la survie des cardiomyocytes, est plus fortement exprimée et activée chez les femmes pré-ménopausées par rapport aux hommes et aux femmes ménopausées. De plus l'activation de Akt est augmentée dans des cultures de cardiomyocytes par l'estradiol et chez de jeunes souris pré-pubères ayant consommé des phytoestrogènes (Camper-Kirby et al., 2001). Aucune interaction n'a été décrite entre les fonctions des oestrogènes dans le cœur et celle du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>.

### 4.3.4. Les interactions connues entre la sérotonine et les oestrogènes

On sait que l'action vasodilatatrice, dépendante de l'endothélium, par la sérotonine sur la vasculature coronaire de rat est plus importante chez les femelles que les mâles et qu'elle est régulée par les œstrogènes (Moyses et al., 2001). Dans cette étude l'influence des œstrogènes sur la vasodilatation coronaire induite par la sérotonine semble conduire à l'augmentation du nombre de récepteurs fonctionnels ou de leur couplage puisque seul l'effet maximal est altéré sans modification de l'affinité du récepteur. Mais à l'opposé, une étude de la relaxation endothélium dépendante de l'artère coronaire de porc n'a pas montré de différence de genre (Cox and Cohen, 1997). D'autres expériences chez le lapin ont montré une hyperréactivité de l'aorte et surtout des coronaires concernant la contraction induite par la sérotonine chez des animaux ovariectomisés. Cette hypersensibilité s'accompagne d'une réduction de production de NO et disparaît si on réintroduit le 17 $\beta$ -œstradiol (Ma et al., 1998). Ces résultats montrent que les œstrogènes régulent la synthèse de NO par la sérotonine dans la vasculature.

Des études de contractilité en réponse à la sérotonine sur l'artère carotide de souris montrent une contractilité plus importante chez les mâles par rapport aux femelles sauvages mais l'augmentation de la contractilité induite par la sérotonine chez les souris knock-out pour la NOS endothéliale est plus importante chez les femelles par rapport aux mâles (Lamping and Faraci, 2001). La contractilité induite par d'autres vasoconstricteurs tel qu'un analogue du thromboxane A<sub>2</sub>, ne présentant pas de différence entre les mâles et les femelles,

et ceci quelque soit le génotype des souris, laisse à supposer que la différence de genre est spécifique de la sérotonine. Cette étude confirme par ailleurs le rôle des NOSs endothéliales comme déterminant majeur des effets de la sérotonine sur la vasculature.

Il existe dans la littérature d'autres exemples laissant supposer des interactions entre les hormones ovariennes et les fonctions de la sérotonine. Le récepteur 5-HT1B est impliqué dans les comportements alimentaires, entre autres, et les souris mutantes invalidées pour ce récepteur se caractérisent par une prise de poids plus importante chez les mâles que chez les femelles, due à une consommation en nourriture et en eau plus élevée. Mais il s'agirait en fait d'un effet indirect du récepteur 5-HT2C (Bouwknicht et al., 2001). De plus, les oestrogènes inhibent de façon allostérique le transport de la sérotonine *in vitro*. Il s'agit d'un effet non génomique qui pourrait avoir son importance dans la physiopathologie de la dépression (Chang and Chang, 1999). Au niveau central, les hormones ovariennes régulent l'expression du récepteur 5-HT2A (Cyr et al., 1998), du récepteur 5-HT1A (Osterlund and Hurd, 1998) et du transporteur de la sérotonine (Hayward et al., 2000). Chez le rat, la castration des mâles et des femelles permet de modifier l'expression au niveau central des récepteurs 5-HT2A et du transporteur de la sérotonine. Donc les effets de la testostérone et des oestrogènes sont assez similaires au niveau central (Fink et al., 1999). Enfin, l'hormonothérapie substitutive augmente les taux urinaires du métabolite principal de la sérotonine, le 5-HIAA (5-*hydroxyindole acetic acid*) chez la femme ménopausée, probablement en agissant sur la monoamine oxydase, l'enzyme de dégradation de la sérotonine (**Figure 1**) (Lippert et al., 1996).

Il existe donc probablement plusieurs connections entre les fonctions des hormones sexuelles et les fonctions de la sérotonine tant au niveau central que périphérique et plus particulièrement au niveau cardiovasculaire.

## 5. La régulation de la pression artérielle

*Ce chapitre est largement inspiré de (Rang et al., 2003b)*

### 5.1. Le système vasculaire

La paroi des artères, des artérioles, des veinules et des veines contient du muscle lisse dont l'état contractile est contrôlé par différents médiateurs libérés localement, à partir des terminaisons nerveuses sympathiques et des cellules endothéliales, et par des hormones circulantes. Les artérioles et les petites artères musculaires sont les vaisseaux de résistance de la circulation. En terme de fonction cardiaque, les artères et les artérioles régulent la post-charge tandis que les veines et les vaisseaux pulmonaires régulent la pré-charge des ventricules. Les propriétés viscoélastiques des grandes artères de conductance telle que l'aorte déterminent la compliance artérielle, c'est-à-dire la capacité d'augmentation du volume du système artériel en réponse à une augmentation de la pression artérielle. Cette propriété a toute son importance dans un système circulatoire impliquant une pompe à flux intermittent comme le cœur plutôt qu'un flux continu. La majorité de la force induite par le sang éjecté du ventricule est réduite dans un premier temps par la distension du système artériel qui absorbe les pulsations du débit cardiaque, permettant ainsi d'avoir un flux relativement constant vers les tissus périphériques. Plus grande est la compliance vasculaire, meilleure sera la réduction des fluctuations du flux sanguin et plus petites seront les oscillations de pression artérielle à chaque battement cardiaque. Ces oscillations correspondent à la différence entre la pression artérielle systolique et la pression artérielle diastolique. Cette valeur est appelée la pression différentielle ou pression pulsée (PP). Ce paramètre relève d'une importance particulière puisque le travail du cœur peut être réduit simplement en augmentant la compliance artérielle et sans même la moindre modification de débit cardiaque ou de pression artérielle moyenne. Il existe d'ailleurs aujourd'hui de nombreuses évidences que l'augmentation de la pression pulsée est un facteur de risque cardiovasculaire indépendant. L'utilisation de médicaments agissant sur la compliance artérielle, donc sur les artères musculaires, sera préférée dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de l'angor tandis que les médicaments agissant sur les résistances périphériques totales, au niveau des artérioles, trouveront plutôt une application dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'état de choc.

### 5.2. La régulation du tonus vasculaire

Classiquement, le tonus vasculaire et donc la pression artérielle sont contrôlés par différents systèmes dont nous donnerons une introduction succincte.

#### 5.2.1. Régulation de la concentration en $\text{Ca}^{2+}$ intracellulaire

Le  $\text{Ca}^{2+}$  entre dans la cellule par des canaux voltage-dépendants qui s'ouvrent lorsque la cellule subit une dépolarisation de sa membrane ou par des canaux récepteurs-dépendants. De plus l'ouverture des canaux voltage-dépendants est régulée en partie par des seconds messagers produits en réponse à la stimulation de récepteurs par leurs agonistes. La sortie du

$\text{Ca}^{2+}$  s'effectue grâce à une  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPase permettant un échange entre  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Le réticulum sarcoplasmique est le principal stock de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. La libération de ces stocks passe par la fixation d'IP3 au niveau des récepteurs de type ryanodine. L'IP3 provient de l'activation de la phospholipase C en réponse à la stimulation de certains RCPGs.

Dans le muscle lisse, le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline régule la MLCK (Myosin-Light-Chain Kinase) qui phosphoryle les chaînes légères de myosine permettant ainsi l'interaction entre les filaments de myosine et d'actine et donc la contraction. La relaxation est en général le fait d'une diminution de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire conduisant à la déphosphorylation des chaînes légères de myosine par la myosine phosphatase. De nombreux vasodilatateurs agissent sur les niveaux d'AMP cyclique et de GMP cyclique qui activent respectivement la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase G (PKG). La PKA phosphoryle et donc inactive la MLCK tandis que la PKG permet la séquestration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

### 5.2.2. Rôle de l'endothélium vasculaire

L'endothélium n'est pas seulement une barrière passive entre la circulation sanguine et les tissus sous-jacents mais également une source importante de médiateurs chimiques. Ces médiateurs contrôlent la contractilité du muscle lisse vasculaire et influencent les fonctions des plaquettes et des cellules mononucléaires sanguines.

La prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), découverte en 1976 par Bunting, Gryglewski, Moncada et Vane (Bunting et al., 1976), induit la relaxation du muscle lisse vasculaire et inhibe l'aggrégation plaquettaire. L'endothélium des micro-vaisseaux synthétise également de la prostaglandine E2 qui, en plus de son effet vasodilatateur, inhibe la libération de noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques, mais ne possède pas l'effet inhibiteur sur l'aggrégation plaquettaire de la  $\text{PGI}_2$ . Les intermédiaires endoperoxydes des prostaglandines, produits par les cellules endothéliales, agissent sur les récepteurs du thromboxane A2 produisant ainsi des effets opposés à ceux de la prostacycline. La découverte en 1980 du facteur de relaxation endothéliale = *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) par Furchgott et Zawadzki (Furchgott and Zawadzki, 1980) et son identification en 1988 comme étant du monoxyde d'azote (NO) par Moncada (Moncada et al., 1988) et Ignarro (Ignarro et al., 1988) a considérablement amélioré notre compréhension du rôle de l'endothélium. Un autre agent vasodilatateur libéré par l'endothélium, l'EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*), agirait sur les canaux potassiques calcium-dépendants des cellules musculaires lisses pour induire la relaxation (Triggle et al., 2003).

L'endothélium sécrète également des peptides vasoactifs tel que le peptide natriurétique de type C (CNP) possédant des propriétés vasodilatatrices, l'adrenomédulline également vasodilatatrice et l'endothéline possédant à l'opposé des propriétés vasoconstrictrices.

Enfin la membrane des cellules endothéliales contient un certain nombre d'enzymes et de transporteurs agissant sur des hormones circulantes et représentant d'importantes cibles thérapeutiques. L'enzyme de conversion de l'angiotensine est une de ces cibles et permet la libération par l'endothélium d'angiotensine II possédant des propriétés vasoconstrictrices. L'endothéline 1 serait produite en continu par l'endothélium vasculaire des vaisseaux de

résistance permettant de maintenir en continu une contractilité de base en agissant sur les récepteurs ET-A vasoconstricteurs des cellules musculaires lisses.

Chez l'homme, le statut de l'endothélium est un important marqueur de l'athérosclérose puisque la diminution de la quantité de NO libérée définit la dysfonction endothéliale conduisant en général au développement de pathologies cardiovasculaires dont l'athérosclérose et l'hypertension, et à l'augmentation de la morbidité et de la mortalité (Triggle et al., 2003).

### 5.2.3. Rôle du système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine agit en synergie avec le système nerveux sympathique et stimule la sécrétion d'aldostérone qui joue un rôle central dans le contrôle de l'excrétion du sodium et du tonus vasculaire. La rénine est une enzyme protéolytique libérée dans la circulation sanguine à partir des cellules de l'appareil juxta-glomérulaire rénal. La sécrétion de rénine peut être induite de façon physiologique par une chute de la concentration plasmatique de sodium et par une diminution de la pression de perfusion rénale. Par ailleurs, l'activation du système nerveux sympathique rénal, les agonistes  $\beta$  adrénergiques et la prostacycline peuvent induire la sécrétion de rénine tandis que l'angiotensine II exerce un rétrocontrôle négatif sur cette sécrétion. L'ANP (*atrial natriuretic peptide*) inhibe également la libération de rénine. L'effet du NO sur la libération de rénine reste controversé ; le monoxyde d'azote serait tantôt un inhibiteur, tantôt un activateur, de la libération de rénine. La rénine a une demi-vie plasmatique courte et elle libère un décapeptide par protéolyse de l'angiotensinogène circulant (synthétisé par le foie) dans sa partie N-terminale, donnant ainsi naissance à l'angiotensine I.

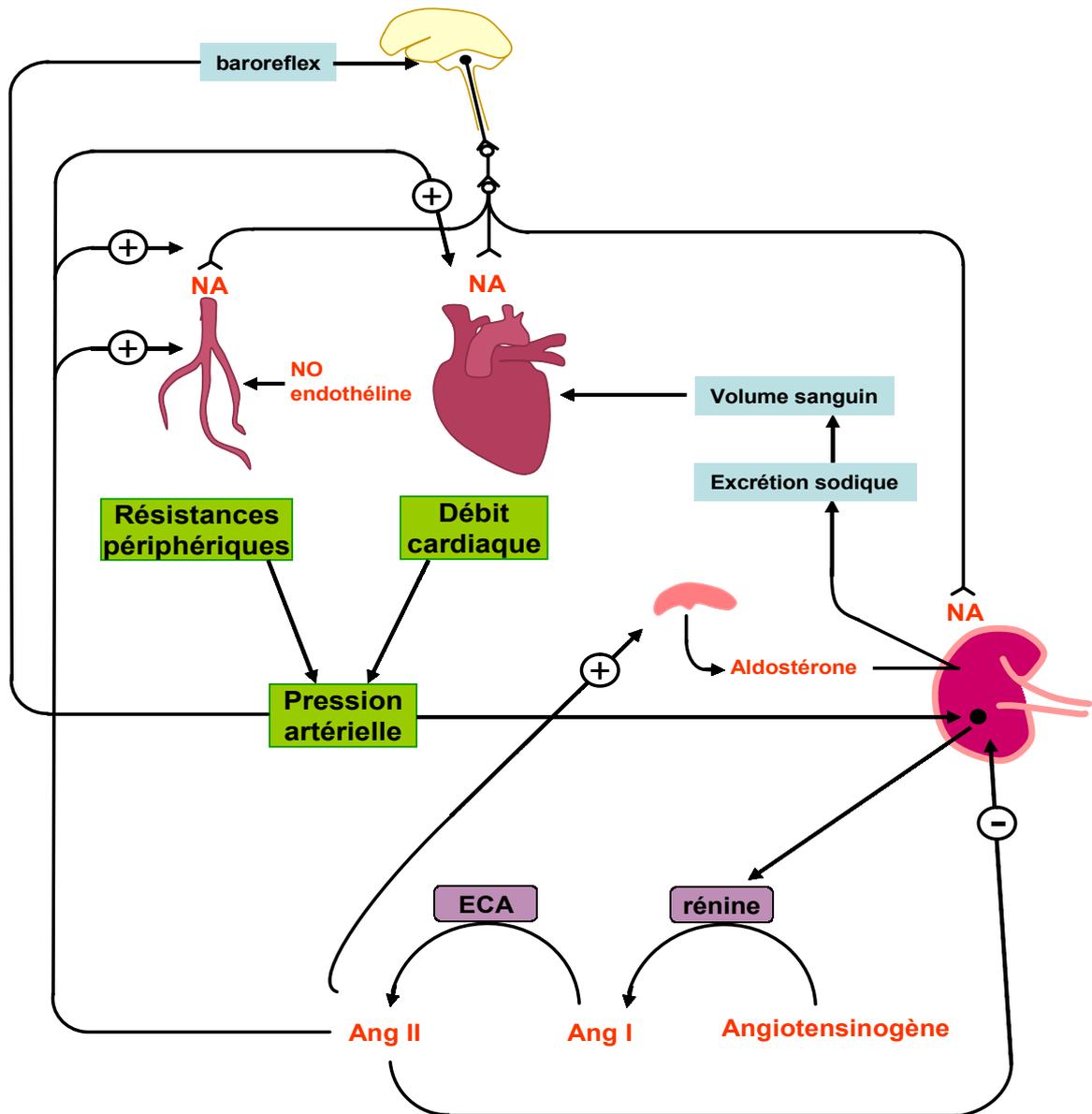
L'angiotensine I ne possède pas d'activité par elle-même, mais se trouve rapidement convertie par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en un octapeptide, l'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur. L'ECA est liée à la membrane plasmique des cellules endothéliales, particulièrement abondante dans les vaisseaux pulmonaires, mais aussi exprimée dans les systèmes vasculaires du cœur, du cerveau, du muscle strié et du rein. En conséquence l'angiotensine II formée *in situ* peut contrôler localement le tonus vasculaire de différents lits vasculaires. De plus l'ECA inactive la bradykinine et d'autres peptides vasodilatateurs. La plupart des effets de l'angiotensine II résultent de sa fixation au récepteur AT-1, un récepteur couplé aux protéines G dont les effets sont : une vasoconstriction particulièrement marquée au niveau rénal, la libération de noradrénaline augmentant la vasoconstriction existante, la réabsorption de sodium, la sécrétion d'aldostérone, la croissance cellulaire dans le cœur et la paroi vasculaire utilisant la même voie de signalisation que les cytokines (phosphorylation de tyrosine, voie Jak/Stat) (Marrero et al., 1995). Le récepteur AT2 de l'angiotensine II semble agir en inhibant la croissance cellulaire et en diminuant la pression artérielle, s'opposant ainsi aux effets des récepteurs AT1.

Ainsi, le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque, ayant donné lieu au développement de grandes classes thérapeutiques avec les inhibiteurs de l'ECA et les antagonistes des récepteurs AT1 principalement.

### 5.3. Hypertension artérielle systémique

L'hypertension artérielle systémique est une pathologie fréquente, qui, si elle n'est pas traitée, peut conduire au développement de complications telles que la thrombose coronaire, l'attaque cérébrale ou l'insuffisance rénale. Jusqu'en 1950, il n'existait pas de traitement efficace de l'hypertension artérielle et l'utilisation des médicaments anti-hypertenseurs a considérablement augmenté l'espérance de vie des patients hypertendus. A l'exception des causes connues d'hypertension pouvant être traitées par la chirurgie, telle que le phéochromocytome, dans la majorité des cas la cause de l'hypertension n'est pas identifiée et on parle alors d'hypertension essentielle. La pathophysiologie de celle-ci se caractérise cependant par un lien étroit avec la fonction rénale et un rétrécissement de la lumière des artérioles systémiques.

L'augmentation des résistances périphériques semble jouer un rôle dans la réponse physiologique au niveau du système cardiovasculaire, du système nerveux et du rein. La **Figure 15** résume les principaux mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation de la pression artérielle : le système nerveux autonome sympathique, le système rénine-angiotensine, les dérivés vasoactifs de l'endothélium (NO, endothéline). De plus le remodelage, vasculaire et cardiaque, associé à l'hypertension, participe à l'aggravation de la pathologie. Le rôle des facteurs de croissance (angiotensine II) et des inhibiteurs de cette croissance (NO) impliqués dans ce phénomène de remodelage sont aussi des cibles pharmacologiques. Actuellement, on tente de traiter l'hypertension avant qu'elle ne devienne symptomatique. Les traitements de première intention sont des mesures non pharmacologiques : exercice physique, diminution des apports salés, de la prise d'alcool et réduction du poids. En absence d'amélioration, on utilise des traitements médicamenteux possédant de faibles effets secondaires : d'abord les diurétiques thiazidiques ou les  $\beta$ -bloquants. Les thérapeutiques utilisées ensuite sont les inhibiteurs calciques et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et plus récemment les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II.



**Figure 15 : Résumé des principaux mécanismes de régulation de la pression artérielle**

Ang I : angiotensine I ; Ang II : angiotensine II ; NA : noradrénaline ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine ; NO : nitric oxide

## 6. Nitric Oxide

### 6.1. Généralités historiques (Vane et al., 1990)

C'est en étudiant de simples artères isolées que Furchgott et Zawadzki (Furchgott and Zawadzki, 1980) ont découvert le rôle essentiel de l'endothélium dans la relaxation induite par l'acétylcholine. Ainsi, la stimulation des récepteurs muscariniques, des cellules endothéliales de toutes les espèces étudiées, est capable d'induire la libération d'un facteur relaxant, appelé d'abord EDRF pour *endothelium-derived relaxing factor*. Déjà au 19<sup>e</sup> siècle, des médecins avaient observé l'amélioration des symptômes de l'angine de poitrine par l'utilisation de nitrates organiques (Krantz, 1975). Alfred Nobel, lui-même inventeur de la nitroglycérine (dynamite) écrivait à un ami en 1895 : « quelle ironie du sort que mon médecin me prescrive de la nitroglycérine ! ». Mais pendant de nombreuses années, le mécanisme d'action de ces médicaments resta obscur. Ce n'est qu'en 1977 que Katsuki et coll. (Katsuki et al., 1977) ont proposé que les nitro-vasodilatateurs étaient métabolisés pour produire du monoxyde d'azote (*nitric oxide* = NO). C'est la stimulation de la guanylate cyclase et la synthèse de GMP cyclique (guanosine monophosphate) qui s'en suivent, qui sont à l'origine de la relaxation induite par le monoxyde d'azote. Plus tard l'EDRF a révélé sa capacité à induire une relaxation dépendante de l'augmentation du taux de GMP cyclique dans le muscle lisse vasculaire. C'est simultanément que deux laboratoires ont proposé que l'EDRF serait en fait du monoxyde d'azote (Ignarro, 1987; Khan, 1987). Et c'est finalement Palmer et coll. (Palmer et al., 1987) qui ont démontré l'identité des deux molécules, démonstration confirmée par Ignarro et coll. (Ignarro et al., 1987). Le monoxyde d'azote est donc le nitro-vasodilatateur endogène.

Utilisant une autre approche, le groupe de Tannenbaum et coll. (Tannenbaum et al., 1978) a montré que la production de nitrates urinaires augmente en cas d'infection. Les macrophages furent identifiés comme source majeure de nitrates (Stuehr and Marletta, 1985) et le monoxyde d'azote, capable de former des nitrates et des nitrites en solution aqueuse, se révéla être un intermédiaire de la cytotoxicité des macrophages (Marletta et al., 1988). Moncada et coll. furent les premiers à montrer que la N<sup>G</sup>-monométhyl-L-arginine, un analogue de la L-arginine, pouvait empêcher la formation de NO dans les cellules endothéliales et que cet effet s'annulait en présence d'une surcharge en L-arginine (Palmer et al., 1988; Rees et al., 1989a). Ces observations suggèrent que la L-arginine est donc le précurseur physiologique de la synthèse basale, ou en réponse à une stimulation, du NO.

### 6.2. Voies de synthèse et mode d'action du NO

*Pour revue* : (Moncada et al., 1997)

Le NO est synthétisé par trois enzymes constituant la famille des *nitric oxide synthases* (NOSs) qui convertissent la L-Arginine en L-citrulline et NO, ce dernier possédant un grand nombre de fonctions physiologiques. Le NO, très réactif, forme des complexes avec des protéines contenant des groupements hème (hémoglobine, myoglobine, cytochrome c, et

surtout guanylate cyclase). La plupart des fonctions physiologiques du NO, produit en faible quantité, proviennent de l'activation de la guanylate cyclase et de l'augmentation des taux de GMP cyclique par conséquent dans les cellules cibles (Murad, 1994). Par contre si le NO est produit en grande quantité, il devient cytotoxique en raison de son action inhibitrice sur les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et les enzymes de la synthèse d'ADN dans les cellules cibles. Le NO peut également interagir avec des radicaux libres oxygénés pour former des peroxy-nitrites toxiques. De plus, de fortes concentrations de NO peuvent induire indirectement l'activité des cyclo-oxygénases et augmenter la concentration en prostaglandines (Salvemini et al., 1993). **(Figure 16)**

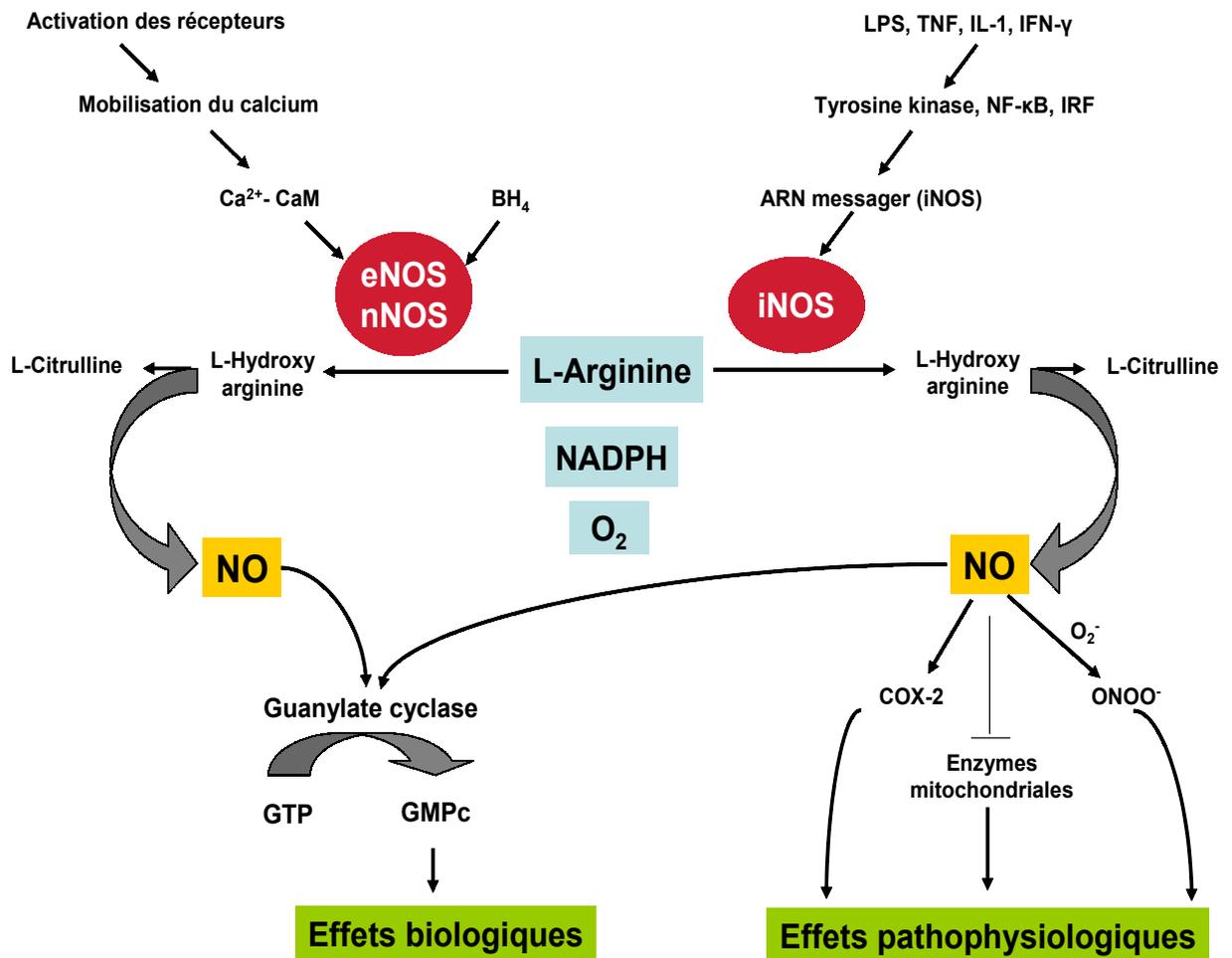
Le NO est un gaz de demi-vie très courte (6 secondes) et diffusant facilement à travers les différentes membranes biologiques. Sa faible solubilité aqueuse conduit à la formation de nitrites et de nitrates dont le dosage permet d'évaluer la quantité de NO en solution. Par ailleurs il semble qu'il existe des formes de stockage endogène du NO tel que les S-nitrosothiols, notamment dans les vaisseaux sanguins (Moncada et al., 1997).

### 6.3. Les Nitric Oxide Synthases (NOSs)

Les NOSs sont des enzymes contenant un groupement hème et dont la séquence est assez proche de celle des cytochrome P450 réductases. Plusieurs isoformes des NOSs ont été décrites : deux isoformes sont constitutivement actives, les isoformes endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS) et une troisième isoforme est dite inductible (iNOS) en réponse à différents stimuli du système immunitaire. Les 3 isoformes sont codées par 3 gènes différents et possèdent entre elles environ 53% d'homologie (Nathan and Xie, 1994).

La nomenclature des NOSs ne correspond pas au sous-type cellulaire les exprimant mais à celui dans lequel elles ont été clonées. Une autre nomenclature fait appel au mode d'activation de ces enzymes. Les NOSs constitutives (eNOS et nNOS) possèdent une activation dépendante du calcium se fixant à la calmoduline, donc rapide et de courte durée (quelques minutes) et produisent de faible quantité de NO (nM). A l'opposé les NOSs inductibles voient leur expression augmenter en réponse à divers stimuli (interféron  $\gamma$ , lipopolysaccharide bactérien, interleukine 1 $\beta$ ,...) et sont activées en absence de calcium, entraînant une plus forte production de NO ( $\mu$ M) sur une plus longue durée (plusieurs jours) (Nathan and Xie, 1994). Cependant les NOSs constitutives peuvent également être régulées au niveau transcriptionnel, par les oestrogènes par exemple, et également au niveau post-transcriptionnel par des modifications du type myristoylation, palmitoylation ou encore phosphorylation. Et à l'opposé, la iNOS peut être activée rapidement de façon non transcriptionnelle comme c'est le cas pour son activation par le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> (Manivet et al., 2000).

La réaction de synthèse du NO est commune entre les trois isoformes. Les NOSs forment des homodimères dont chaque monomère provient lui-même de la fusion de deux enzymes, une cytochrome réductase et un autre cytochrome, nécessitant la présence de trois co-substrats : la L-Arginine, le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et l'oxygène ; et de cinq cofacteurs ou groupements prosthétiques : FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), FMN (Flavine Mononucléotide), calmoduline, tetrahydrobioptérine et hème (Nathan and Xie, 1994). **(Figure 16)**



**Figure 16 :** Revue des mécanismes d'activation des NOSs et des effets biologiques du NO

(CaM : calmoduline ; BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine ; LPS : lipopolysaccharide bactérien ; TNF : *tumor necrosis factor* ; IL-1 : interleukine 1 ; IFN-γ : interféron γ ; COX-2 : cyclo-oxygénase ; ONOO<sup>-</sup> : peroxyinitrite)

Ces trois enzymes ne sont peut-être pas les seules sources de NO puisque récemment la découverte d'une nouvelle famille de NO synthase possédant une activité GTPase a été reportée dans la littérature mais ses fonctions restent inconnues pour le moment (Zemojtel et al., 2004).

### 6.3.1. La NOS neuronale

La première isoforme purifiée et clonée fut découverte dans les neurones, d'où son nom de NOS neuronale (nNOS) également appelée NOS de type I, NOS-1 ou encore bNOS. Elle est exprimée principalement dans le cerveau, la moelle épinière, le système nerveux périphérique mais aussi dans l'épithélium bronchique, trachéal et gastro-intestinal, le muscle squelettique, les polynucléaires neutrophiles, les îlots pancréatiques, l'endomètre, l'adventice et la media des vaisseaux sanguins et dans le réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes (Moncada et al., 1997; Mungrue et al., 2002; Walford and Loscalzo, 2003).

Au niveau périphérique, le NO est libéré par les neurones non-adrénergiques non-cholinergiques et régule certaines fonctions gastro-intestinales, respiratoires et génito-urinaires (Rand, 1992). Les nNOS situées au niveau du système nerveux central sont quant à elles impliquées dans la mémoire, la régulation des fonctions neuroendocrines, la régulation centrale de la pression artérielle, du rythme cardiaque, du rythme respiratoire, des rythmes circadiens, du sommeil, des comportements sexuels, la thermorégulation, la douleur ainsi que dans les comportements agressifs (Garthwaite, 1991; Snyder and Brecht, 1992). En effet les mâles *knock-out* pour la nNOS présentent une augmentation de leur agressivité qui semble être liée à une altération des signaux sérotoninergiques régulés par les récepteurs de la sérotonine 5-HT1A et 5-HT1B. A l'inverse, les femelles présentent un comportement normal (Chiavegatto and Nelson, 2003). Aux anomalies comportementales des souris KO nNOS, s'ajoutent une dilatation de l'estomac, une sténose du pylore, une résistance à l'insuline et une hypertrophie ventriculaire gauche chez les souris âgées. Il a d'ailleurs été montré que la nNOS exprimée dans le coeur pouvait moduler la fréquence et la contractilité cardiaque (Mungrue et al., 2002).

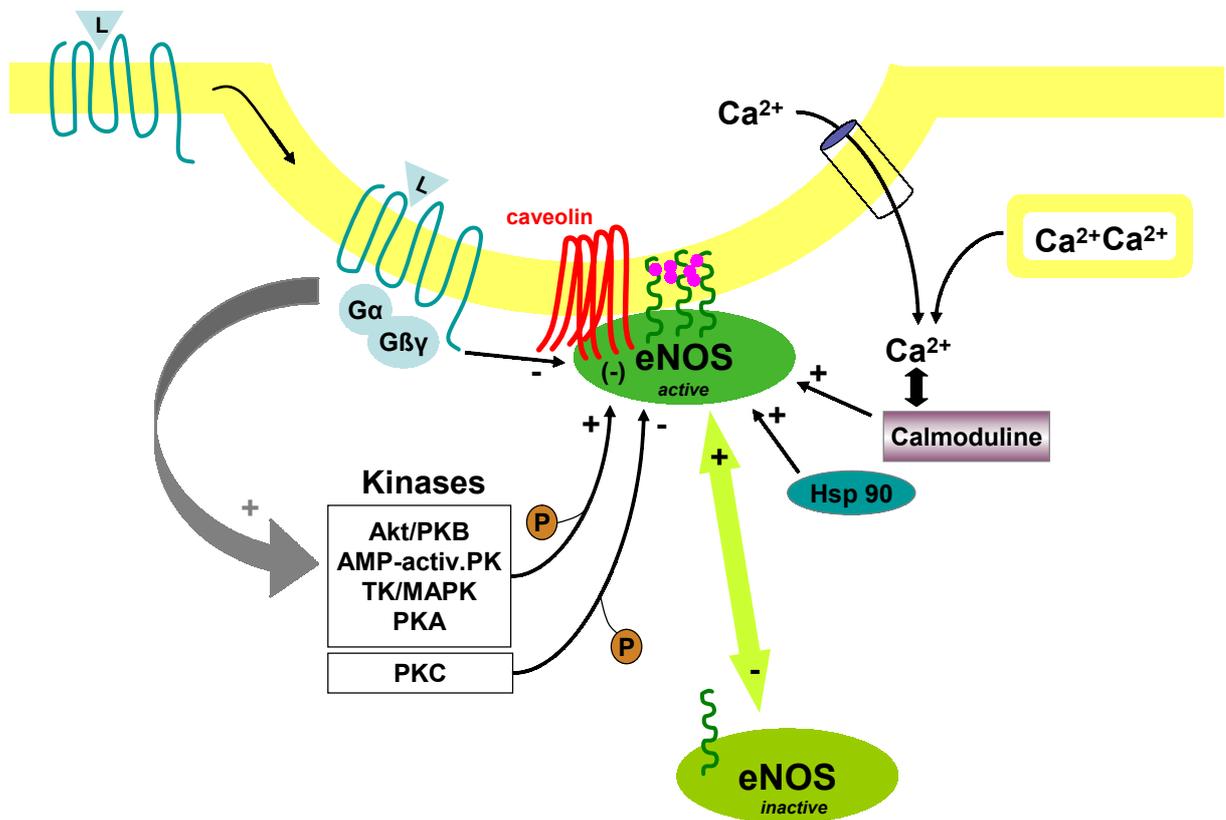
### 6.3.2. La NOS endothéliale

L'isoforme purifiée et clonée à partir des cellules endothéliales, la NOS endothéliale (eNOS) est aussi appelée NOS de type III ou NOS-3. Elle est exprimée principalement dans les cellules endothéliales vasculaires et les plaquettes ainsi que dans certaines populations de neurones et dans l'épithélium respiratoire (Moncada et al., 1997). C'est aussi l'isoforme la plus largement exprimée dans le coeur en condition physiologique, au niveau de l'endothélium endocardique et des cardiomyocytes (Mungrue et al., 2002). Elle peut être activée par les agonistes de divers récepteurs couplés aux protéines G (acétylcholine, bradykinine, histamine, sérotonine), par la substance P, l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), l'ATP, les Ca<sup>2+</sup> ionophores, par les forces de cisaillement et aussi par des modifications du taux d'oxygène. Elle peut également être induite de façon transcriptionnelle dans certain cas comme après stimulation par les oestrogènes ou après un exercice prolongé. Le NO produit par la eNOS joue un rôle dans la régulation de la pression artérielle, de la distribution du flux sanguin, l'inhibition de l'adhésion et de l'activation des plaquettes et des leucocytes, l'inhibition de la

prolifération des cellules musculaires lisses (Moncada and Higgs, 1993). Le NO produit par la eNOS est donc un facteur de prévention de l'athérosclérose, notamment au niveau de la circulation coronaire (Curtis and Pabla, 1997).

Cette donnée est confirmée par le phénotype des souris *knock-out* pour la eNOS qui présente une plus grande sensibilité à l'athérosclérose, une anomalie de l'angiogenèse, une résistance à l'insuline ainsi que des anomalies cardiaques avec diminution de la fréquence cardiaque et développement d'hypertrophie cardiaque chez les souris âgées et d'anomalies valvulaires (Lee et al., 2000; Mungrue et al., 2002). La formation du NO dans l'endothélium vasculaire permet de maintenir un tonus vasodilatateur essentiel à la régulation de la pression et du flux sanguin (Moncada et al., 1989; Vanhoutte, 1989; Vane et al., 1990). C'est pourquoi, les souris *knock-out* pour la eNOS développent une hypertension artérielle systémique (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996) et pulmonaire (Steudel et al., 1997). De même que pour la nNOS, l'activité de la eNOS semble moduler la contractilité cardiaque (Bloch et al., 2001). De plus la synthèse cardiaque de NO serait un facteur de protection contre le remodelage cardiaque (hypertrophie, dilatation) et l'apoptose (Wollert and Drexler, 2002). Enfin, le NO, probablement d'origine endothéliale, joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la migraine (Olesen et al., 1994).

La régulation de l'activité des eNOSs est très intimement liée aux cavéoles et plus précisément à la cavéoline-1 qui constitue ces cavéoles (dans les cardiomyocytes, la eNOS se lie à la cavéoline-3). En effet les souris *knock-out* pour la cavéoline-1 développent des anomalies pulmonaires principalement dues à une hyper-cellularité endothéliale et les aortes de ses souris présentent une vasoconstriction inadéquate en raison d'une désinhibition de la synthèse de NO (Drab et al., 2001). Il a été montré que la eNOS subit plusieurs modifications post-transcriptionnelles de type palmitoylation et myristoylation permettant sa localisation dans les cavéoles, en se liant à la cavéoline (Shaul, 2002). Enfin, l'activité de la eNOS est régulée par différentes kinases dont les effets sont soit une activation, soit une inhibition, en fonction des acides aminés phosphorylés. **(Figure 17).**



**Figure 17 : Régulation de l'activité eNOS dans les cavéoles**  
(D'après Shaul, 2002)

La eNOS active est prioritairement localisée dans les cavéoles dont la membrane est enrichie en cholestérol (rose). L'interaction avec la **cavéoline** inhibe en partie l'activité eNOS. Classiquement la fixation d'un ligand (L) sur un récepteur transloqué dans les cavéoles stimule une ou plusieurs kinases impliquées dans la phosphorylation de la eNOS. Ces phosphorylations peuvent activer (+) ou inhiber (-) l'activité de la eNOS en fonction des acides aminés cibles. Par ailleurs l'activation nécessite la formation du complexe calmoduline/calcium, ce dernier ayant pour origine les stocks intracellulaires à proximité des cavéoles où l'entrée de calcium extracellulaire. L'activité eNOS est augmentée par Hsp90 et diminuée par l'interaction avec le domaine C-terminal de certains **RCPGs**.

### 6.3.3. La NOS inductible

La NOS inductible (iNOS) fut clonée à partir des macrophages. Ses autres noms sont iNOS, NOS de type II, NOS-2, macNOS, hepNOS. Elle est donc exprimée principalement dans les macrophages mais aussi dans les hépatocytes, les chondrocytes, les kératinocytes, l'épithélium respiratoire, le rein, certains tissus fœtaux, les neurones, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Moncada et al., 1997). A l'opposé des NOS constitutives, la iNOS peut produire de plus grande quantité de NO ( $\mu\text{M}$ ) mais cette production passe par une augmentation de la transcription de l'enzyme. Cette augmentation est déclenchée par différents agents pro-inflammatoires tels que les endotoxines bactériennes (LPS), des cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), l'interféron- $\gamma$ . Il existe par ailleurs des évidences que cette régulation transcriptionnelle passe par l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa\text{B}$  et IRF-1 (*interferon regulatory factor*) et de certaines tyrosine kinases (Nathan, 1992). Par ailleurs, l'expression de la iNOS peut-être inhibée par les glucocortocoides, le TGF- $\beta$ , le PDGF et certaines cytokines (IL-4, IL-8, IL-10 et IL-13) (Szabo and Thiernemann, 1995). On sait maintenant que la iNOS peut également être régulée au niveau post-transcriptionnelle par de biais d'interaction avec des protéines inhibant son activité telle que la *kalirin*, la cavéolin-1, la NAP110 (*NOS-associated protein 110kD*) (Zhang, Kone, 2003). Alors que les faibles quantités de NO produites par les NOSs constitutives sont en général bénéfiques, les fortes concentrations de NO formé par la iNOS produisent généralement des effets délétères sur l'organisme au cours des réactions immunes et de défense (Nathan and Hibbs, 1991). Cette production de NO, d'abord observée dans les macrophages, contribue à leur cytotoxicité contre les cellules tumorales, les bactéries, les virus et les autres microorganismes. Par ailleurs le NO impliqué dans les mécanismes de défense peut devenir un agent de la pathophysiologie du choc septique et de l'inflammation. La iNOS est normalement absente des vaisseaux sains. Par contre elle a été identifiée dans les vaisseaux de patients souffrants d'athérosclérose et la formation de peroxy-nitrite semble être à l'origine de la peroxydation des lipides et des dommages vasculaires (Curtis and Pabla, 1997). De plus la iNOS est exprimée dans les cardiomyocytes au cours de certaines pathologies cardiovasculaires d'origine immune ou pas (Bloch et al., 2001; Mungrue et al., 2002). L'augmentation de l'expression de la iNOS dans l'insuffisance cardiaque serait un phénomène de décompensation induisant l'apoptose des cardiomyocytes et augmentant la mortalité (Wollert and Drexler, 2002). Cependant les souris *knock-out* pour la iNOS ne présentent pas d'anomalie majeure au niveau du système cardiovasculaire si ce n'est une augmentation de la pression artérielle transitoire à l'âge de 9 semaines. Par contre, elles sont protégées vis-à-vis de l'induction du choc septique par le LPS.

## 6.4. Les inhibiteurs des NOSs

Des inhibiteurs de la synthèse du NO par les NOSs ont été largement utilisés pour étudier les fonctions des NOSs *in vitro* et *in vivo*. Ces études pharmacologiques ont souvent été confirmées par les méthodes génétiques de perte de fonction des NOSs (souris *knock-out*). La plupart de ces composés sont des analogues du substrat endogène des NOSs, la L-Arginine, mais ils sont rarement sélectifs d'une isoforme par rapport aux autres (par exemple la L-NA [N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine]: nNOS=eNOS>>iNOS). On sait maintenant qu'il existe aussi des inhibiteurs compétitifs endogènes de la synthèse du NO qui fonctionnent selon le même principe, la L-ADMA (N<sup>G</sup>-N<sup>G</sup>-diméthyl-L-arginine) et la L-NMMA (N<sup>o</sup>-monométhyl-L-arginine). Ces composés sont présents dans le sang et les urines chez l'homme et ils

participent à certaines fonctions pathophysiologiques (Moncada et al., 1997; Tran et al., 2003).

Une évidence majeure du rôle physiologique du NO fut la description de l'effet aigu sur la pression artérielle d'injection intraveineuse des inhibiteurs des NOSs chez le rat, le lapin, le cochon d'Inde et même l'homme (Rees et al., 1989b; Vallance et al., 1989). En effet ces composés induisent une augmentation de la pression artérielle systémique pouvant être annulée par la L-arginine en raison de la compétition pour la NOS. Ces expériences indiquent qu'il existe en continu, une libération basale de NO par les cellules endothéliales permettant ainsi de conserver les vaisseaux dans un état dilaté. Donc le blocage de cette production continue de NO peut être impliqué dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle.

Une inhibition chronique de la synthèse de NO conduit au développement d'une hypertension artérielle et de dommages rénaux de type sclérose glomérulaire. Il est maintenant clairement établi que cette hypertension fait non seulement intervenir le niveau basal de NO mais aussi le système rénine angiotensine, les canaux calciques, la rétention sodée et l'endothéline. De plus l'inhibition chronique des NOSs s'accompagne souvent de remodelage vasculaire au niveau cardiaque, rénal et cérébral. Cette hypertension induite constitue donc un bon modèle d'étude de l'hypertension et du rôle du NO dans la pathologie vasculaire (Zatz and Baylis, 1998).

## 7. Objectifs généraux de la thèse

Dans l'introduction nous avons exposé les nombreuses fonctions en physiologie et implications en pathologie du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2B</sub>. Nous avons notamment décrit le phénotype cardiovasculaire des souris mutantes invalidées pour ce récepteur et les différences de genre concernant ce phénotype. En effet les femelles sont moins affectées par la mutation en ce qui concerne la cardiomyopathie dilatée observée chez les mâles mutants (Nebigil et al., 2001b).

### Première Partie

Puisque les femelles semblent être protégées vis-à-vis de la cardiomyopathie dilatée qui caractérise le phénotype des mâles mutants et puisque les hormones ovariennes sont classiquement reconnues pour avoir des propriétés protectrices au niveau du système cardiovasculaire, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle ces hormones ovariennes seraient à l'origine du phénotype moins sévère des femelles mutantes pour le récepteurs 5-HT<sub>2B</sub>.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé l'ablation bilatérale des ovaires au moment de la puberté et analysé l'évolution des paramètres morphométriques et fonctionnels cardiaques en collaboration avec l'équipe technique de l'Institut Clinique de la Souris (échocardiographie, mesure de la pression artérielle systolique).

Les résultats de cette étude indiquent que l'ovariectomie n'altère pas les fonctions cardiovasculaires des femelles invalidées pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Ces résultats feront l'objet d'une publication après quelques expériences complémentaires (étude du rôle des androgènes sur la différence de genre concernant les souris KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>).

### Deuxième et troisième partie

L'absence d'anomalies fonctionnelles cardiaque chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, nous a amené à utiliser les femelles plutôt que les mâles pour l'étude des fonctions vasculaires du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Nous avons décrit dans l'introduction l'activation des NOSs par le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> et le rôle de ce récepteur au cours de l'hypertension artérielle chez le rat (modification de pharmacologie).

C'est pourquoi nous avons étudié la réponse des femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> vis-à-vis de l'hypertension artérielle induite par inhibition chronique des NOSs.

Le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> s'est révélé être un facteur de protection au cours de la phase précoce de l'hypertension mais nécessaire à long terme au développement de l'hypertension artérielle. La protection à court terme semble être associée à la fonction régulatrice du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> sur l'activation basale des NOSs endothéliales et sur la compliance artérielle. Par ailleurs l'hypertension à long terme ne s'accompagne pas de remodelage cardiovasculaire apparent mais d'une modification du profil d'expression des récepteurs de la sérotonine au niveau de l'aorte. Ces changements pharmacologiques dépendent du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe technique de l'Institut Clinique de la Souris (échocardiographie, télémétrie, tail cuff method) et avec Jean-Marie Launay (expériences de liaisons). Ils donneront lieu à une seconde publication actuellement en préparation.

# **Matériels et Méthodes**

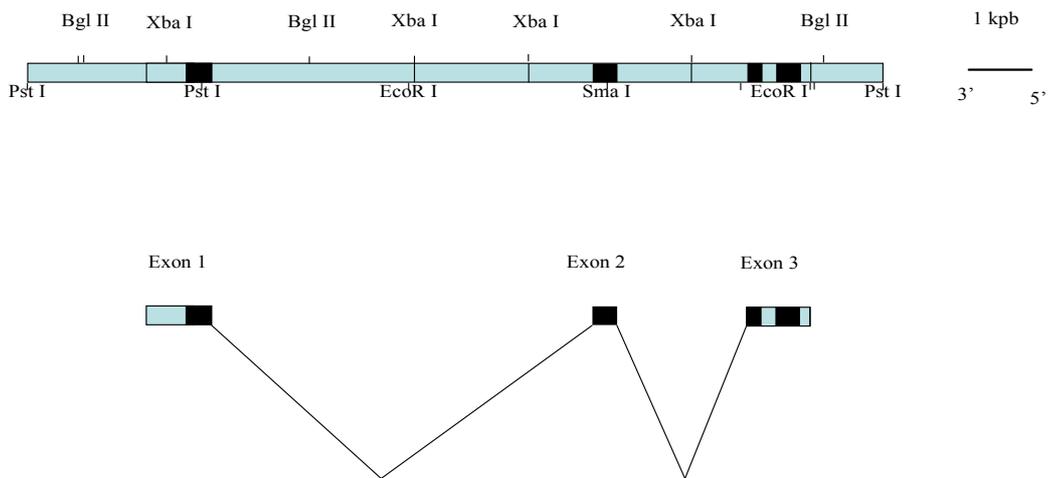
## 1. Génération de souris mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT2B

Le gène du récepteur 5-HT2B de souris (**figure 18**) est composé de 3 exons et deux introns. Les souris mutantes pour le récepteur 5-HT2B ont été générées précédemment au laboratoire par recombinaison homologue (Nebigil et al., 2000a).

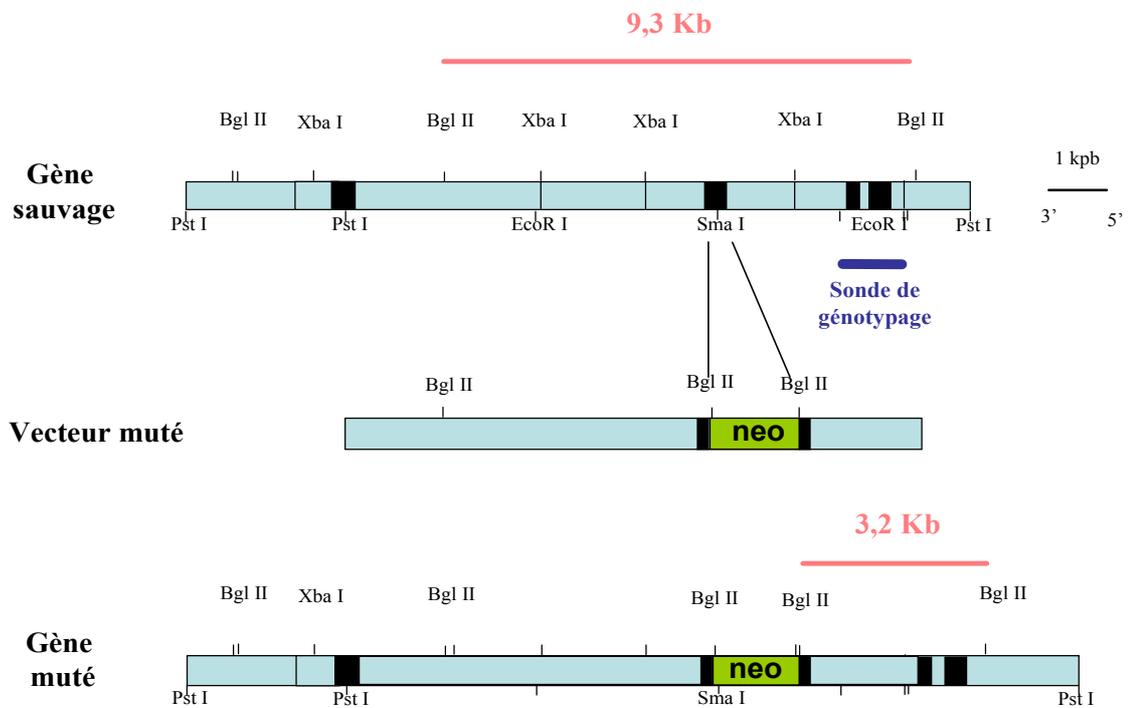
Plus précisément, un vecteur contenant une partie du gène du récepteur 5-HT2B de souris, et pour lequel une insertion dans l'exon 2 a été réalisée, est utilisé pour réaliser une recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES : embryonic stem cell). L'insertion dans l'exon 2 d'une cassette *neo* (gène de sélection bactérienne vis-à-vis de la néomycine) permet de modifier le cadre de lecture du gène du récepteur 5-HT2B après recombinaison, empêchant ainsi la transcription et donc la production de protéine. Cette insertion s'accompagne de l'insertion de nouveaux sites de restriction Bgl II qui seront utilisés pour sélectionner les animaux ayant intégré la mutation (**Figure 19**).

Les cellules ES ayant pour origine la lignée 129PAS et ayant intégré le gène muté sont injectées dans des blastocystes d'embryons de souris de la lignée C57/BL6 permettant d'obtenir des animaux chimères. L'analyse d'ADN génomique, obtenu à partir de queue de souris âgées de 3 à 4 semaines, permet de déterminer le génotype des animaux par la méthode de Southern blot. Les techniques classiques utilisées sont décrites par (Sambrook et al.). Après digestion des tissus des queues de souris, l'ADN génomique, extrait et purifié, subit l'action d'une enzyme de restriction (Bgl II) permettant d'obtenir un ADN fragmenté. Après séparation par électrophorèse dans un gel d'agarose, les fragments correspondants au gène du récepteur 5-HT2B sont identifiés par hybridation avec une sonde spécifique radioactive (**Figure 19**). Si les deux allèles du gène du récepteur sont sauvages, on identifiera un fragment de 9,3 kilobases, si les deux allèles portent la mutation (souris homozygote mutante), le fragment identifié ne sera que de 3,2 kilobases et si l'animal étudié est hétérozygote pour la mutation, un fragment de chacune des tailles précédemment citées pourra être visualisé. Le croisement des animaux chimères porteurs de la mutation (sélectionnés après génotypage) avec des souris de la lignée 129PAS permettra d'obtenir directement des animaux avec un fond génétique pur, 129pas. La lignée mutante (*Knock Out* : KO) pour le récepteur 5-HT2B est viable à l'état homozygote, donc le génotypage des souris n'est plus nécessaire.

Par la suite, les souris sont élevées dans le respect des lois européennes en vigueur. L'ensemble des expériences compareront les souris KO à des souris de génotype sauvage 129PAS fournies par les services de l'animalerie de l'IGBMC.



**Figure 18 : Organisation du gène du récepteur de souris 5-HT2B**



**Figure 19 : Méthode de génération du gène KO pour le récepteur 5-HT2B**

## 2. Ovariectomie

L'inhibition de la synthèse des hormones ovariennes est réalisée par ablation bilatérale des ovaires de souris femelles sauvages (*Wild Type* : WT) ou mutantes invalidées pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> (*Knock-out* : KO). Les femelles sont ovariectomisées entre 3 et 4 semaines après la naissance, lorsque la synthèse des hormones ovariennes se met en place (puberté).

Les souris sont anesthésiées par un mélange de Kétamine (90 mg/kg IP) et d'Acépromazine (1,8 mg/kg IP). Après avoir vérifié l'efficacité de l'anesthésie, les souris sont rasées au niveau du dos. Deux incisions de la peau sont pratiquées au niveau d'une région bien précise correspondant à l'emplacement des ovaires. Après incision de la paroi musculaire, les ovaires sont prélevés à l'aide d'un bistouri électrique, permettant de cautériser la section réalisée entre l'utérus et l'oviducte. Après s'être assuré de l'absence de saignement, la paroi musculaire et la peau sont suturées à l'aide de fils non résorbable ETHICON 5-0. Les souris ainsi ovariectomisées sont maintenues sur une plaque chauffante à 37°C, en attendant leur réveil. Les souris contrôles (que nous appellerons « sham » pour *sham operated*) subissent les mêmes gestes chirurgicaux et anesthésiques, à l'exception bien sûr de la section et du prélèvement des ovaires.

La cicatrisation des souris est contrôlée quotidiennement pendant les deux semaines suivant l'opération. L'efficacité de l'ovariectomie est, quant à elle, contrôlée au moment du sacrifice des souris, par l'absence d'utérus détectable puisqu'il s'est totalement atrophié en absence d'hormones ovariennes.

## 3. Evaluation de la fonction cardiaque : Echocardiographie

### Principe :

L'échocardiographie permet d'évaluer l'anatomie cardiaque ainsi que les fonctions systoliques et diastoliques chez les souris vigiles ou anesthésiées (Gardin et al., 1995). La validité des mesures réalisées par cette méthode dépend largement de la fréquence cardiaque d'où l'intérêt d'utiliser l'anesthésie qui permet d'abaisser la fréquence cardiaque de la souris (aux alentours de 300-350 battements par minutes / bpm) qui est de l'ordre de 650 bpm sans anesthésie.

### Protocole :

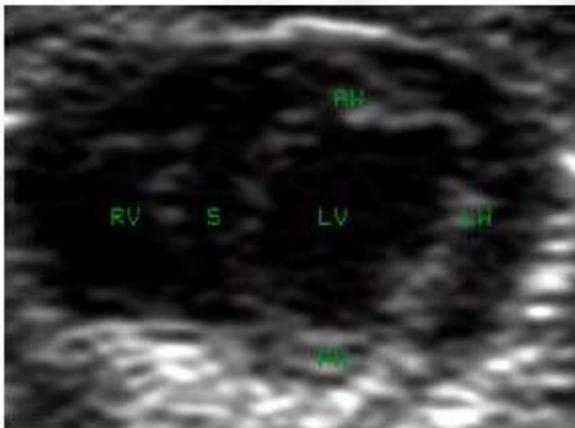
- les souris sont anesthésiées par une dose de 30 mg/kg, IP de pentobarbital, rasées au niveau du thorax sur lequel on applique un gel améliorant la transmission en échocardiographie.
- les mesures sont réalisées à l'aide d'un échographe Sonos 5500 (Philips Healthcare) et d'une sonde à haute fréquence 15MHz
- l'utilisation des images en mode 2D et M (**Figures 20 et 21**) permettent de mesurer la longueur, la surface et le diamètre du ventricule gauche en systole et en diastole.

On détermine ainsi :

- le diamètre télé-systolique (**DTS**) (LVESD : *left ventricular end systolic diameter*)
- le diamètre télé-diastolique (**DTD**) (LVEDD : *left ventricular end diastolic diameter*)
- l'épaisseur du septum (**S**)
- l'épaisseur de la paroi postérieure (**Pp**) (PW : *Posterior Wall*)
- le diamètre de l'aorte (**D**)

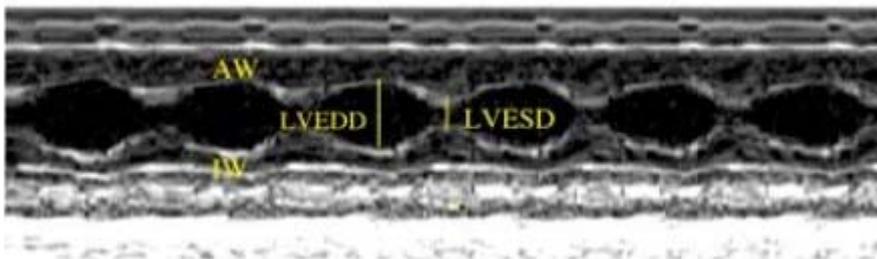
On calcule également :

- la fraction de raccourcissement : **FR (%)** =  $[(DTD - DTS) / DTD] \times 100$
- la fraction d'éjection : **FE (%)** =  $[(DTD)^2 - (DTS)^2] / ((DTD)^2) \times 100$
- la masse ventriculaire gauche : **MVG (mg)** =  $1,06 \times [(DTD + Pp + S)^3 - (DTS)^3]$



**Figure 20 : Image en mode 2D des ventricules gauche et droit (petit axe para- sternal)**

RV: right ventricle; S: septum; LV: left ventricle; LW: lateral wall; AW: anterior wall; PW: posterior wall.



**Figure 21 : Image en mode M du ventricule gauche (petit axe para- sternal)**

AW : *anterior wall* (paroi antérieure) ; LW : *lateral wall* (paroi latérale) ; LVEDD : *left ventricular end diastolic diameter* ; LVESD : *left ventricular end systolic diameter*

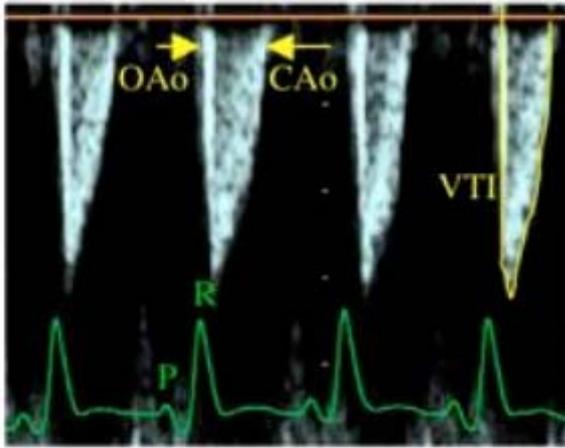
- l'utilisation du mode Doppler permet de mesurer le flux aortique (**Figure 22**)

On détermine ainsi :

- l'intégrale temps vitesse du flux aortique (**ITV**)
- la fréquence cardiaque (**Fc**)

On calcule également :

- le volume d'éjection systolique (stroke volume):  $VES (ml/b) = ITV \times (D/2)^2 \times \pi$
- le débit cardiaque (cardiac output) : **Dc (ml/min)** = VES x Fc



**Figure 22 :** Image échodoppler du flux aortique  
VTI : intégrale temps vitesse

Deux protocoles différents ont été utilisés au cours de cette étude :

- un protocole avec anesthésie pour évaluer la fonction cardiaque des souris dans les conditions de base et après induction de l'hypertension artérielle.
- un second protocole correspond à l'étude de la fonction cardiaque des souris en réponse à une injection aiguë d'un inhibiteur de la synthèse de NO. Ce composé induisant une importante bradycardie, il n'est pas nécessaire d'anesthésier les souris pour abaisser la fréquence cardiaque. Les mesures ont donc été réalisées sur des souris vigiles

## 4. Evaluation de la fonction vasculaire

### 4.1. Tail cuff method : mesure de la pression artérielle à la queue

La mesure de la pression artérielle systolique au niveau de l'artère caudale peut se faire *in vivo* chez une souris vigile grâce au système *tail-cuff* automatisé et informatisé (**Figures 23 et 24**). Cette méthode permet de mesurer les pulsations du flux sanguin au niveau de l'artère caudale et de déterminer la pression artérielle systolique correspondant à la disparition de ce flux à la suite du gonflement d'un manchon en latex autour de la queue de la souris (Krege et al., 1995).

#### Protocole :

Le système Visitech (*Visitech BP-2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, NC*) permet de réaliser 10 mesures préliminaires, qui ne seront pas conservées pour l'analyse, mais nécessaire pour habituer les souris. Ensuite 15 mesures successives sont effectuées automatiquement. La série d'enregistrements est validée si au moins 10 mesures sur les 15 réalisées donnent une valeur cohérente. Le programme d'analyse donne une moyenne et une déviation standard pour la fréquence cardiaque et la pression artérielle systolique pour chaque souris. Avec l'habituation des souris, cette méthode donne des valeurs de pression artérielle très reproductibles pour une même série de mesures (déviation standard inférieure à 5% de la valeur moyenne).

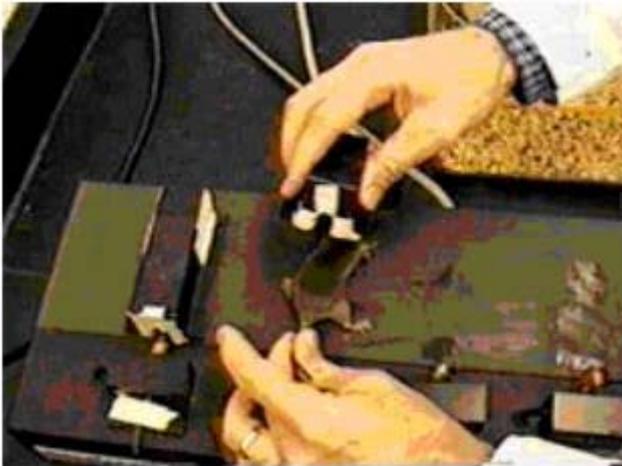
Chaque souris est analysée 2 fois par jour et 4 jours par semaines. Cette répétition permet de diminuer les variations individuelles qui sont très importantes car elles dépendent du stress, de l'heure de la mesure et de tout autres paramètres environnementaux.

Remarque : Ce système étant relativement nouveau au moment de son utilisation, la justesse des mesures à été validée par l'utilisation de souris possédant un implant de télémétrie. Le système Visitech donne des valeurs de pression artérielle systolique inférieures à celles de la télémétrie mais les différences observées entre deux groupes sont parfaitement conservées. Cette différence en valeur absolue peut s'expliquer par le fait que la pression artérielle n'est pas mesurée au niveau de la même artère dans les deux méthodes : aorte pour la télémétrie et artère caudale pour le système Visitech)



**Figure 23 : Système d'analyse de la pression artérielle BP-2000 (Visitech Systems)**

Le système est constitué d'une plateforme chauffante (au milieu) pour la mesure de la pression artérielle, reliée à une pompe (à droite) et à un système d'analyse à l'aide d'un logiciel spécialisé (à gauche). Le système Visitech permet d'analyser 4 souris à la fois pour la pression artérielle systolique et la fréquence cardiaque.

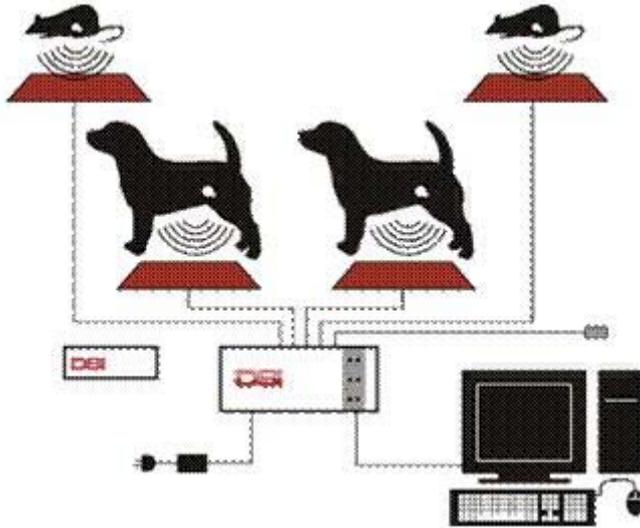


**Figure 24 : Mise en place d'une souris sur le système BP-2000**

Les souris sont maintenues en place sur la plateforme en fixant l'extrémité de leur queue par un ruban adhésif et en les enfermant dans une boîte de contention obscure afin de limiter leurs mouvements. La queue de la souris, passée à travers le manchon en latex, est placée dans la chambre de mesure contenant un système de détection du flux sanguin par infrarouge.

## 4.2. Radio-télémetrie

La radio-télémetrie est une excellente méthode pour mesurer à long terme la pression artérielle et la fréquence cardiaque chez des animaux vigiles et libres de tous mouvements (Butz and Davisson, 2001). L'implant de télémetrie (PA-C20 Device for Blood Pressure and Heart Rate, DATA SCIENCE INTERNATIONAL) se trouvant dans l'aorte de la souris, transmet par onde radio un signal à un transducteur relié à un ordinateur pour l'analyse des enregistrements. (Figure 25)

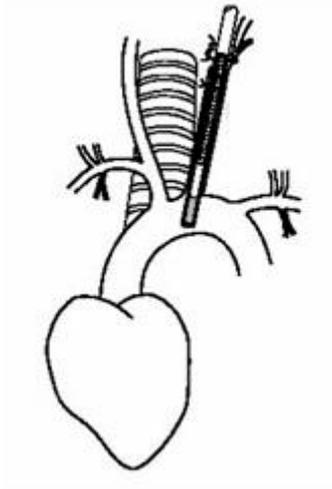


**Figure 25** : Système d'enregistrement des paramètres cardiovasculaires par radio-télémetrie

L'implantation de la sonde de pression se fait sous anesthésie (mélange Kétamine 90mg/kg IP + Acépromazine 1,8 mg/kg IP). Le cathéter est inséré par l'artère carotide gauche jusque dans l'aorte. La position idéale de l'embout du cathéter est représentée sur la **Figure 26**. Le reste de la sonde est placé sous la peau de la souris à droite de l'abdomen de façon à gêner le moins possible les mouvements de la souris après son réveil. (**Figure 27**). Après 15 jours de récupération, les premiers enregistrements sont réalisés pour contrôler le bon fonctionnement du système.

Nous avons équipés 6 femelles sauvages et 6 femelles mutantes pour le récepteur 5-HT2B, âgées de 20 semaines environ, pendant 3 mois, sur lesquelles nous avons testé différents agents pharmacologiques. Chaque femelle était son propre contrôle, à savoir que si le premier jour de l'expérience la souris 1 recevait la phényléphrine, par exemple, et la souris 2 le véhicule, on répétait l'expérience le lendemain en administrant le véhicule à la souris 1 et la phényléphrine à la souris 2. Une période d'au moins 3 jours de repos a été respectée entre chaque expérience.

L'enregistrement des paramètres hémodynamiques est démarré au moins 30 minutes avant l'expérience et arrêté lorsque la pression artérielle est revenue à sa valeur de base.

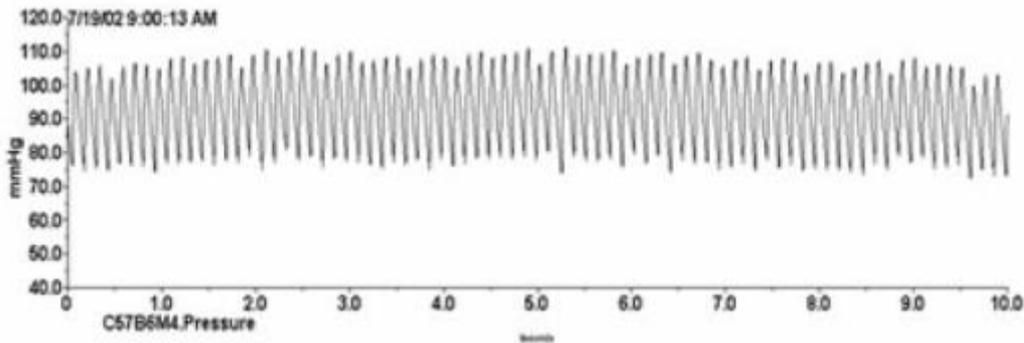


**Figure 26 :** Représentation schématique de l'emplacement idéal pour la sonde de radio-télémetrie dans l'aorte de souris

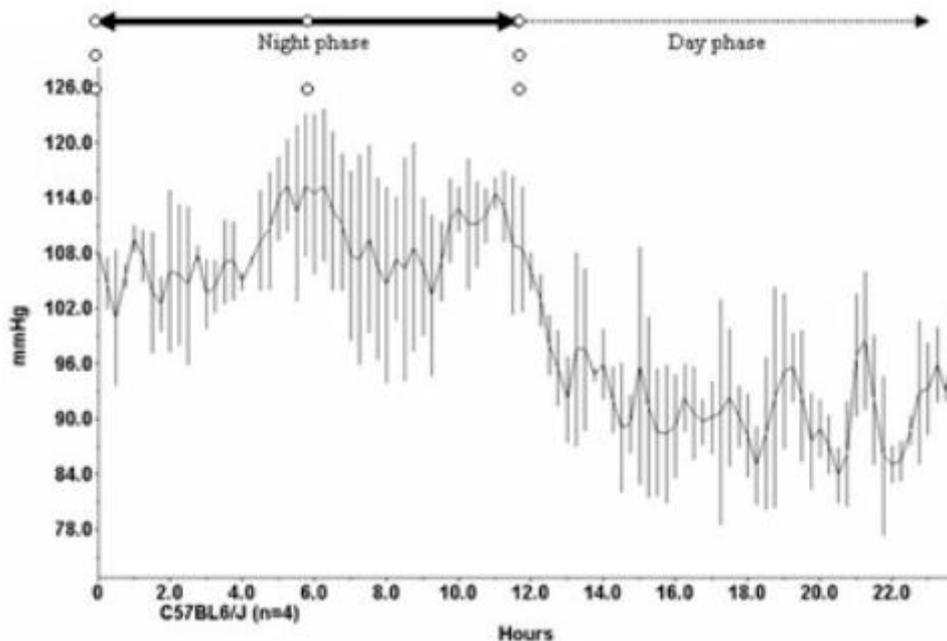


**Figure 27 :** Représentation schématique de l'implantation idéale de la sonde de télémetrie dans l'aorte et de sa batterie dans l'espace abdominal

La **Figure 28** représente le signal que l'on peut enregistrer avec cette méthode. On détermine la fréquence cardiaque, la pression artérielle systolique (PAS) (valeur haute) et diastolique (PAD) (valeur basse) et par calcul, la pression pulsée (PP) (pression différentielle = différence entre le pression systolique et la pression diastolique) et la pression artérielle moyenne (PAM = PAD + 1/3 PP)



**Figure 28** : Exemple d'enregistrement de la pression artérielle pour une souris pendant 10 secondes



**Figure 29** : Exemple d'enregistrement de la pression artérielle moyenne pendant 24 heures pour un groupe de 4 souris

Nous avons programmé le système pour enregistrer les paramètres hémodynamiques pendant 30 secondes toutes les 5 minutes. Lors du traitement des données, nous pouvons calculer la moyenne de chaque paramètre sur la durée souhaitée, en général entre 10 minutes et 1 heure.

La **figure 29** est un exemple des variations de pression artérielle moyenne pour un groupe de 4 souris pour lesquelles on a représenté une moyenne avec sa déviation standard toutes les 15 minutes. On notera les variations caractéristiques chez la souris entre les valeurs nocturnes et diurnes.

A la fin des trois mois d'expérience, les femelles sont sacrifiées par injection létale de pentobarbital (60 mg/kg IP) et disséquées afin de récupérer la sonde de télémétrie réutilisable.

## 5. Traitements pharmacologiques

### 5.1. Induction de l'hypertension artérielle par L-NA

La *N*<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NA) est un inhibiteur de l'activité de synthèse des NOSs dont la sélectivité est plus marquée pour les NOSs constitutives (endothéliale et neuronale) que pour la NOS inductible.

L'hypertension chez les souris femelles, âgées de 16 à 22 semaines, est induite par l'injection intra-péritonéale quotidienne de L-NA à la dose de 80mg/kg. Les souris contrôles reçoivent un volume équivalent de véhicule (NaCl 0,9 %). Les injections sont réalisées en fin de journée, afin de ne pas influencer les mesures de pression artérielle par un effet aigu. Le traitement d'induction de l'hypertension a été maintenu pendant 18 semaines.

### 5.2. Agents vasoactifs testé en radio-télémétrie

**Contrôle NaCl :** des injections intra-péritonéales de NaCl 0,9% ont été réalisées pour tester les effets de l'injection d'un solvant sans propriété vasoactive sur les paramètres cardiovasculaires. Ce contrôle permet d'évaluer l'effet du stress de l'injection sur ces mêmes paramètres.

**Phényléphrine :** 3 mg/kg par injection intra-péritonéale, le véhicule est le NaCl 0,9%

**Nitroprussiate de Sodium :** 5 mg/kg par injection sous-cutanée, le véhicule est le NaCl 0,9%

**L-NA :** la L-NA a été administrée à la même dose que le traitement d'induction de l'hypertension, soit 80 mg/kg par injection intra-péritonéale. Le véhicule est le NaCl 0,9%.

## 6. Histopathologie

### 6.1. Sacrifice

Les souris sont euthanasiées par une injection létale de pentobarbital (60 mg/kg IP)

### 6.2. Analyse histologique

Les protocoles sont disponibles sur le site internet de EUMORPHIA :  
<http://www.eumorphia.org/servlet/ECFLP.Frameset>

#### 6.2.1. Fixation et inclusion

- ***Pour coupes congelées***

Fixation : les organes sont fixés dans le Paraformaldehyde à 4% pendant 1 heure puis protégés par infiltration d'une solution de sucrose à 20% dans le PBS pendant une nuit.

Congélation : les tissus sont transférés dans les moules en plastique pour être inclus dans le milieu de congélation (Cryoblock–Labonord). Les moules sont placés sur de la carboglace jusqu'à congélation puis stockés à -80°C.

Coupe : des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un Cryostat (microtome réfrigéré) et transférées sur des lames Superfrost®.

- ***Pour coupe en paraffine :***

Fixation : les tissus sont placés immédiatement après dissection dans des cassettes d'inclusion pour être ensuite fixées dans une solution de Bouin (mélange de formaline, acide picrique et d'acide acétique) pendant 24 heures à température ambiante.

Inclusion : les cassettes sont transférées dans un automate d'inclusion réalisant les étapes suivantes :

Lavage 1 heure dans l'éthanol à 70%

Incubation dans l'éthanol à 95% pendant 2 heures (2 x 1 heure)

Incubation dans l'éthanol absolu pendant 2 heures (2 x 1 heure)

Inclusion dans l'Histosol® pendant 30 min puis 2 heures (2 x 1 heure)

Inclusion dans la paraffine pendant 1 heure, puis 2 heures sous vide et enfin 5 heures.

Coupe : des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome et transférées sur des lames gélatinées et séchées en position verticale pendant une nuit à 37°C.

- ***Pour microscopie électronique :***

Fixation : les tissus sont taillés en cubes de 2 mm x 2 mm et transférés dans 10 volumes de tampon glutaraldehyde 2,5% / cacodylate 0,1 M et conservés à +4°C.

Inclusion : les tissus fixés sont inclus dans une résine EPON puis analysés par microscopie électronique (coupes semi-fines puis ultra-fines)

## 6.2.2. Colorations

- ***Haematoxyline/Eosine***

La coloration à l'haematoxyline/éosine est une coloration de routine pour les coupes paraffinées. Les noyaux sont colorés en violet, tandis que le cytoplasme, les muscles, les fibres de collagène et les érythrocytes sont colorés en rose.

Protocole :

- \* déparaffiner et réhydrater les coupes :
  - lavage à l'Histosol<sup>®</sup> 2 x 3 minutes
  - réhydratation 2 x 3 minutes à l'éthanol absolu
  - réhydratation 2 x 3 minutes à l'éthanol à 95%
  - lavage à l'eau distillée pendant 3 minutes.
- \* coloration dans l'haematoxylin de Harris pendant 3 minutes
- \* rinçage sous un filet d'eau pendant 3 minutes
- \* brève décoloration dans une solution acido-alcoolique (2 secondes)
- \* rinçage sous un filet d'eau pendant 3 minutes
- \* coloration dans une solution aqueuse d'éosine Y à 0.1% pendant 30 secondes
- \* déshydratation des coupes par immersions successives dans des bains d'alcool : 2 x 2 minutes dans l'alcool à 95% puis 2 x 2 minutes dans l'alcool absolu.
- \* montage des coupes.

- ***Coloration trichrome de Mallory***

La coloration trichrome de Mallory permet de mettre en évidence les fibres de collagène, et plus particulièrement la fibrose, par une coloration bleue intense. Les noyaux sont colorés en violet et les structures cytoplasmiques en orangé.

Protocole :

- \* déparaffiner et réhydrater les coupes :
  - lavage à l'Histosol<sup>®</sup> 2 x 3 minutes
  - réhydratation 2 x 3 minutes à l'éthanol absolu
  - réhydratation 2 x 3 minutes à l'éthanol à 95%
  - lavage à l'eau distillée pendant 3 minutes
- \* Coloration pendant 4 minutes dans une solution d'haematoxyline ferrique
- \* rinçage sous un filet d'eau pendant 3 minutes
- \* coloration pendant 3 minutes dans une solution de fuchsine acide à 0,5%
- \* coloration 2 x 20 minutes avec une solution de bleu d'aniline et orange G
- \* déshydrater les coupes par immersions successives dans des bains d'alcool : 2 x 2 minutes dans l'alcool à 95% puis 2 x 2 minutes dans l'alcool absolu.
- \* montage des coupes.

- ***Coloration des fibres élastiques : Orcein***

La coloration à l'Orcein permet de colorer les fibres élastiques en rouge.

Protocole :

- \* déparaffiner et réhydrater les coupes :
  - lavage à l'Histosol® 2 x 3 minutes
  - réhydratation 2 x 3 minutes avec de l'éthanol absolu
  - réhydratation 2 x 3 minutes avec de l'éthanol à 95%
  - lavage à l'eau distillée pendant 3 minutes
- \* Coloration pendant 30 minutes dans une solution acide/alcoolique d'Orcein à 1%
- \* Rinçage avec l'eau distillée 2 x 3 minutes
- \* Immersion dans l'éthanol à 95% pendant 1 minute pour éliminer l'excès de colorant puis 15 minutes dans l'éthanol absolu (les sections deviennent marrons pâles)
- \* décoloration pendant 10 min dans la solution acide/alcoolique
- \* rinçage sous un filet d'eau pendant 5 min
- \* déshydrater les coupes par immersions successives dans des bains d'alcool : 2 x 2 minutes dans l'alcool à 95% puis 2 x 2 minutes dans l'alcool absolu.
- \* montage des coupes.

- ***Coloration des fibres de collagène : rouge de Sirius***

La coloration au rouge de Sirius permet de colorer les fibres de collagène des organes de souris adultes. Le rouge de Sirius est un colorant anionique réagissant avec le collagène par l'intermédiaire de ces groupements acides sulfoniques se fixant sur les groupements basiques du collagène. Il en résulte une fixation du colorant parallèle aux fibres de collagène. Cette fixation particulière est à l'origine de la biréfringence du colorant permettant de visualiser le collagène en lumière polarisée.

Protocole :

- \* déparaffiner et réhydrater les coupes :
  - lavage à l'Histosol® 2 x 3 minutes
  - réhydratation 2 x 3 minutes avec de l'éthanol absolu
  - réhydratation 2 x 3 minutes avec de l'éthanol à 95%
  - lavage à l'eau distillée pendant 3 minutes.
- \* coloration dans la solution de rouge picro-Sirius pendant 1 heure
- \* lavage à l'eau acide 2 x 30 secondes puis à l'eau distillée
- \* immersion dans l'éthanol absolu 3 x 1 minute
- \* montage des coupes.

## 7. Binding

### Préparation des protéines membranaires à partir d'anneaux d'aorte de souris

D'après le protocole décrit par (Kellermann et al., 1996).

Les tissus congelés sont homogénéisés dans un tampon imidazole 10 mM pH : 7,30 contenant 4 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA et 0,1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride. Après centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes, le surnageant est déposé sur un coussin de sucrose à 20% et centrifugé pendant 90 minutes à 100 000 g. Le culot contenant les protéines membranaires est mis en solution dans un tampon imidazole 10 mM pH : 7,30 contenant 75 mM de KCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1 mM d'EGTA.

Le dosage des protéines est réalisée par le kit : *bicinchoninic acid (BCA) protein assay* (PIERCE).

### Binding

50 µl de tampon Tris 50 mM pH : 7,40 contenant 1nM de ligand radioactif et 100 nM de ligand froid (non radioactif) sont ajoutés à 50 µl de préparation membranaires (environ 20 µg). Après 30 minutes d'incubation, la réaction est stoppée par l'addition de 5 ml de tampon Tris 10 mM pH : 7,40 froid. Les échantillons sont filtrés et la radioactivité retenue sur les filtres est mesurée par un compteur à scintillation β ou un compteur γ pour I<sup>125</sup> (Packard).

### Les ligands

Pour déterminer la quantité de récepteur 5-HT1B/1D : [<sup>125</sup>I]-GTI

Pour déterminer la quantité de récepteur 5-HT2A : [<sup>3</sup>H]-MDL100907

Pour déterminer la quantité de récepteur 5-HT2B : [<sup>3</sup>H]-LY266070

### Calculs

La quantité de radioactivité retenue sur le filtre permet de faire une évaluation approximative du nombre de sites de fixation pour chaque récepteur (en fmol/mg) et pour chaque aorte.

Cette approximation a été confirmée en réalisant une expérience de compétition à l'aide d'un pool des préparations membranaires de chaque groupe (les faibles quantités de protéines ne permettent pas de faire cette expérience de compétition pour chaque échantillon d'aorte).

## 8. Western blot

- 1 à 2 aortes de souris sont homogénéisées dans 300µl de tampon RIPA, à l'aide d'un broyeur de type ULTRATURAX<sup>®</sup>, puis par 50 coups de piston dans un Potter<sup>®</sup> et enfin par sonication (3 x 5 secondes).

Tampon RIPA : 10 mM Tris-HCl, pH : 7,4  
10 µg/ml cocktail d'anti-protéases  
10 mM NaF (fluoride de sodium)  
1 mM orthovanadate  
1 mM Pefabloc  
1% NP-40

- après centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes à +4°C de l'homogénat tissulaire, le surnageant est prélevé pour analyse.
- Le dosage des protéines est réalisé par la méthode colorimétrique de Bradford à l'aide du kit de dosage *Protein Assay* de BIO-RAD.
- 50 µg de protéine sont mélangés à un volume équivalent de tampon de Laemmli (x 2) puis séparé par électrophorèse à l'aide d'un gel de polyacrylamide à 6%

Tampon de Laemmli (x 2)  
125 mM Tris-HCl pH : 6,8  
4 % SDS  
2 % β-mercapto-ethanol  
20 % glycérol  
0,1 % bleu de bromophénol

Gel de polyacrylamide 6 % (pour 5 ml)  
2,6 ml d'H<sub>2</sub>O  
1 ml de mélange d'acrylamide à 30%  
1,3 ml de Tris-HCl pH : 8,8  
0,05 ml de SDS 10%  
0,05 ml d'ammonium persulfate à 10%  
0,004 ml de TEMED

Tampon de migration (x5)  
15,1 g de Tris-Base  
94 g de glycine  
50 ml de SDS 10%  
H<sub>2</sub>O qsp 1000 ml

Gel de « stacking » (pour 2 ml)  
1,4 ml d'H<sub>2</sub>O  
0,33 ml de mélange d'acrylamide à 30%  
0,25 ml de Tris-HCl pH : 6,8  
0,02 ml de SDS 10%  
0,02 ml d'ammonium persulfate à 10%  
0,002 ml de TEMED

- Après migration, les protéines contenues dans le gel de polyacrylamide sont transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (PROTRAN) pendant 1h30 à 100 mA.

Tampon de transfert (pour 1,5 litre)  
4,35 g de glycine  
8,7 g de Tris-Base  
2,62 ml de SDS 20%  
300 ml de méthanol  
H<sub>2</sub>O qsp 1,5 l

- L'incubation pendant quelques secondes dans une solution de Rouge Ponceau permet de vérifier l'efficacité du transfert et de contrôler la quantité de protéine.
- La membrane est transférée dans une solution de blocage pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation.

Solution de blocage

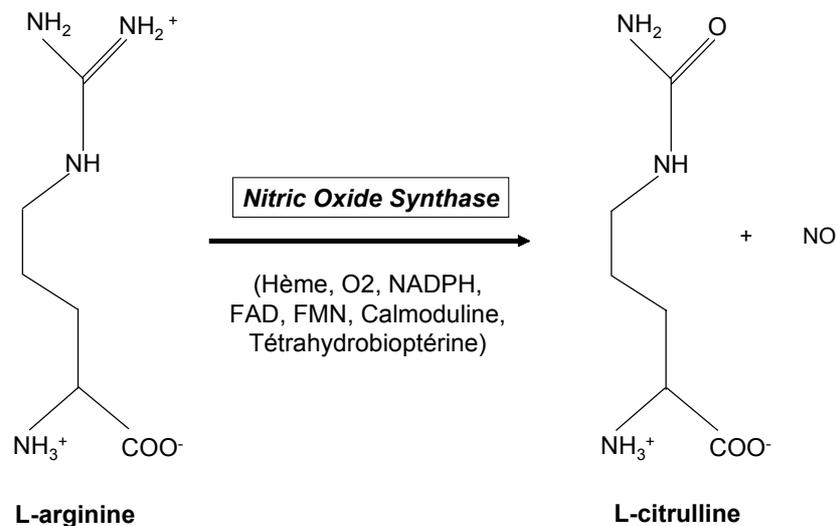
5 % de poudre de lait écrémé  
 10 mM de Tris pH : 7,5  
 100 mM NaCl  
 0,1 % Tween 20

- La membrane est ensuite incubée avec la solution d'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage, pendant une nuit à 4°C et sous agitation.
  - Anti-eNOS (BD Transduction Laboratories), polyclonal de lapin : dilution 1 : 500
  - Anti-iNOS (Santa Cruz biotechnology), monoclonal de souris : dilution 1 : 200
  - Anti-vimentine (Santa Cruz biotechnology), polyclonal de chèvre : dilution 1 :100
- La membrane est ensuite lavée dans le tampon de lavage (idem tampon de blocage mais sans le lait) 3 x 10 minutes à température ambiante sous agitation, puis incubée pendant 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire
  - Anti-IgG de lapin, couplé à la peroxydase : dilution 1 :5000
  - Anti-IgG de souris, couplé à la peroxydase : dilution 1 :2000
  - Anti-IgG de chèvre, couplé à la peroxydase : dilution 1 :1000
- Après lavage 3 x 10 minutes, la présence d'anticorps sur la membrane est révélée grâce au kit *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (PIERCE) permettant de visualiser l'activité peroxydase par chimiluminescence.
- L'exposition de la membrane à un film photo permet d'obtenir une image de la protéine spécifiquement révélée par la réaction de chimiluminescence.
- La densité des bandes est mesurée par un scanner *GS-700 Imaging Densitometer* (BIORAD) couplé à un programme d'analyse d'image.

## 9. Dosage de l'activité enzymatique des Nitric Oxide Synthases

### Principe

L'activité des *nitric oxide synthases* peut être évaluée en mesurant de façon indirecte la quantité de monoxyde d'azote produite par un homogénat de protéines à partir d'un substrat radiomarqué. La réaction de synthèse du NO est la suivante :



**Figure 30** : Conversion biochimique de la L-arginine en L-citrulline

Le dosage est basé sur la conversion enzymatique de [<sup>3</sup>H]-arginine en [<sup>3</sup>H]-citrulline. Cette conversion nécessite la présence de cofacteurs dans le milieu réactionnel tel que le NADPH, le FAD, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), l'oxygène et optionnellement le FMN et la calmoduline, cette dernière se trouvant déjà en quantité suffisante dans l'homogénat tissulaire. Le substrat de la réaction, la [<sup>3</sup>H]-arginine, est chargé positivement tandis que la [<sup>3</sup>H]-citrulline est neutre à pH=5,5. Cette différence de charge permet de séparer le substrat du produit de la réaction à l'aide d'une résine échangeuse d'ion. La [<sup>3</sup>H]-citrulline éluée est ensuite dosée par un compteur à scintillation. L'activité enzymatique NOS est exprimée en pmol de [<sup>3</sup>H]-citrulline formée par mg de protéines totale dans l'homogénat tissulaire et par minute. Cette méthode permet de distinguer les activités des NOS constitutives, calcium-dépendantes, de l'activité de la NOS inducible, ne nécessitant pas la présence de calcium. Le dosage de l'activité NOS totale en présence de calcium et de l'activité iNOS en absence de calcium sur un même échantillon permet de calculer par soustraction l'activité NOS constitutive (endothéliale + neuronale). Le dosage de l'activité enzymatique en présence d'un inhibiteur des NOSs (L-NA) permet d'évaluer l'activité non-spécifique, qui sera soustraite de l'activité totale, pour déterminer l'activité spécifique. Enfin, un traceur est ajouté à la réaction, la [<sup>14</sup>C]-citrulline, permettant de corriger le rendement d'extraction de la [<sup>3</sup>H]-citrulline par la résine échangeuse d'ion.

### ***Procédure : dosage de l'activité basale dans les aortes de souris***

- 2 à 3 aortes de souris sont homogénéisées dans 300µl de tampon A, à l'aide d'un broyeur de type ULTRATURAX<sup>®</sup>, puis par 50 coups de piston dans un Potter<sup>®</sup> et enfin par sonication (3 x 5 secondes).

Tampon A : 50 mM Tris-HCl, pH : 7,4  
10 µg/ml cocktail d'anti-protéases  
1 mM DTT  
0,1 mM EDTA  
0,1 mM EGTA  
1mM Pefabloc  
1% NP-40

- après centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min à +4°C de l'homogénat tissulaire, le surnageant est prélevé pour analyse.
- 60 µl de surnageant est ajouté à 200 µl de tampon réactionnel (1, 2, 3 et 4)

Tampon commun :  
50 mM Tris-HCl, pH : 7,4  
1 mM DTT  
10 µM L-arginine (non radioactive)  
1 µCi L-[2,3,4,5-<sup>3</sup>H]-arginine (Amersham), traceur de la réaction  
0,02 µCi [<sup>14</sup>C]-citrulline (Perkin-Elmer), traceur de l'extraction par la résine  
1 mM NADPH  
300 nM calmoduline  
100 µM BH<sub>4</sub>  
10 µM FAD

Tampon 1: Tampon commun + 1 mM L-NA + 2 mM CaCl<sub>2</sub>

Tampon 2: Tampon commun + 2 mM CaCl<sub>2</sub>

Tampon 3: Tampon commun + 1 mM L-NA + 0,5 mM EDTA + 0,5 mM EGTA

Tampon 4: Tampon commun + 0,5 mM EDTA + 0,5 mM EGTA

- Incubation 30 minutes à 37°C
- La réaction est stoppée par l'addition de 1ml de tampon d'équilibration (20 mM Hepes pH:5,5 + 2 mM EDTA + 2 mM EGTA) contenant 500 mg de résine DOWEX<sup>®</sup> 50WX8-200. L'échange ionique se fait pendant 5 minutes en agitant les tubes de réactions à 4°C.
- Après centrifugation à 12000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant est transféré dans des tubes contenant 10 ml de liquide de scintillation (READY SAFE<sup>™</sup>) et les quantités de radioactivité [<sup>3</sup>H] et [<sup>14</sup>C] sont comptées sur un compteur à scintillation LS 6000 (BECKMAN).
- Le dosage des protéines est réalisé par la méthode colorimétrique de Bradford à l'aide du kit de dosage *Protein Assay* de BIO-RAD

### ***Calcul des activités NOS***

Chaque échantillon de protéines est dosé en duplicata pour chacun des tampons 1, 2, 3 et 4. Les valeurs obtenues avec les tampons 1 et 2 permettent de calculer l'activité NOS totale spécifique (2-1). Les valeurs obtenues avec les tampons 3 et 4 permettent de calculer l'activité NOS inductible spécifique (4-3). L'activité NOS constitutive (eNOS et nNOS) est déduite des valeurs précédentes. Les valeurs d'activité sont normalisées par la valeur du dosage de protéine.

### ***Les contrôles***

Des échantillons contrôles, sans protéines, sont utilisés pour tester l'efficacité d'échange de la résine. Cette dernière ne doit pas retenir plus de 5% de la [<sup>3</sup>H]-arginine et moins de 60% de la [<sup>14</sup>C]-citrulline (95% en théorie mais la résine possède un volume mort important, d'où l'intérêt de la [<sup>14</sup>C]-citrulline afin de calculer le rendement d'extraction).

## **10. Présentations des résultats - Analyses statistiques**

Tous les résultats sont représentés par la moyenne du groupe  $\pm$  l'écart standard à la moyenne (sem) et les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel STAVIEW.

Pour comparer différents groupes nous avons utilisé le test de comparaison des variances (ANOVA). Plus spécifiquement, pour l'analyse des phases d'hypertension et des phases nocturnes et diurnes pour la radio-télémétrie, nous avons comparé des valeurs compactées correspondant aux différentes phases.

Pour évaluer l'existence d'une corrélation significative entre deux paramètres, nous avons utilisé le test Z de corrélation et le test de sphéricité de Bartlett.

La significativité des différents tests est définie pour une valeur de  $p < 0,05$ .

# Résultats

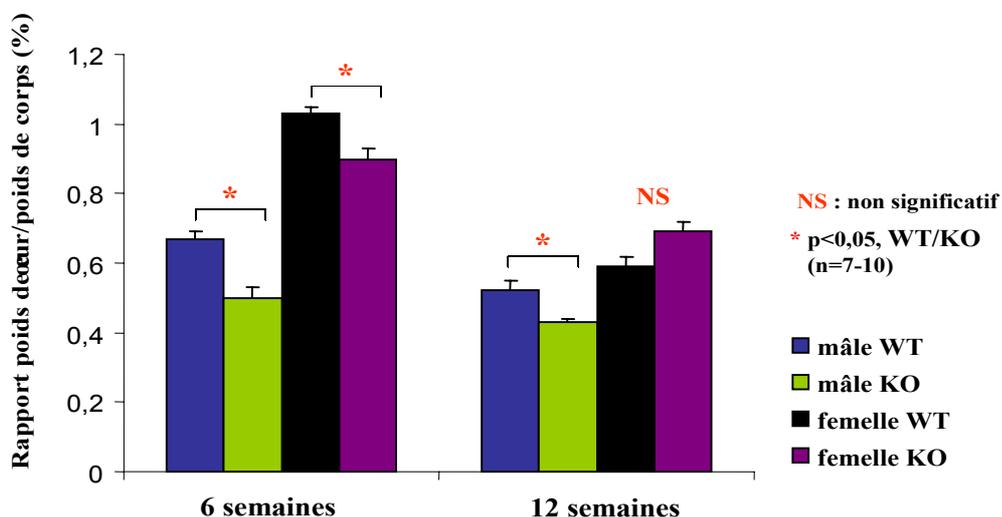
## **Première partie**

### **Effet de l'ovariectomie sur le phénotype cardiovasculaire des souris femelles *knock-out* pour le récepteur 5-HT2B**

« For every complex human problem there is a neat and simple answer that is wrong... » - H.L. Mencken

## Introduction

Comme nous l'avons décrit précédemment les souris *knock-out* (KO) pour le récepteur 5-HT2B présentent à l'âge adulte une cardiomyopathie dilatée de sévérité variable en fonction du genre. En effet les femelles KO, bien que possédant des anomalies histopathologiques cardiaques, ne présentent pas d'anomalie fonctionnelle cardiaque détectable. A l'inverse, le phénotype des mâles KO se caractérise par une augmentation des diamètres ventriculaires systolique et diastolique (DTS et DTD) accompagnée d'une diminution de la fraction de raccourcissement (FR) mesurée par échocardiographie (Nebigil et al., 2001b). De plus, des données non publiées (C. Nebigil) (**Figure 31**) concernant le rapport de poids de cœur/poids du corps montrent que ce paramètre est significativement diminué ( $p < 0,05$ ,  $n=7-10$ , ANOVA) chez les mâles et les femelles KO par rapport à leur contrôles respectifs mâles et femelles sauvages (Wild type : WT), à l'âge de 6 semaines. Mais à l'âge de 12 semaines, seuls les mâles KO conservent une différence significative par rapport aux mâles WT tandis que les femelles KO sont indistinguables des femelles WT concernant le rapport poids de cœur/poids de corps. Les femelles semblent donc capables de compenser une anomalie cardiaque entre l'âge de 6 et 12 semaines, alors que les mâles KO pour le récepteur 5-HT2B n'en sont pas capables.



**Figure 31 :** Evolution du rapport poids de cœur/poids de corps chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B par rapport aux souris WT, en fonction du genre (\*  $p < 0,05$ ,  $n=7-10$ , test ANOVA)

## But de l'étude

L'ovariectomie des souris femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, à l'âge de 4 semaines, supprime la source principale d'hormones sexuelles et donc d'oestrogènes, dont nous avons décrit précédemment le rôle protecteur vis-à-vis des pathologies cardiovasculaires. En comparant le phénotype cardiovasculaire des femelles sauvages (WT) et *knock-out* (KO), ovariectomisées (ovx) par rapport aux souris contrôles non ovariectomisées (sham), nous avons examiné l'effet du retrait des hormones ovariennes sur les fonctions cardiovasculaires de ces souris. Cette expérience nous a permis de déterminer si ces hormones ovariennes sont des facteurs de protection dans la cardiomyopathie dilatée induite par la délétion du récepteur 5-HT2B.

## Etude cinétique des paramètres échocardiographiques (Tableau IV)

La mesure des paramètres échocardiographiques a été réalisée à 6 semaines, 8 semaines et 13 semaines, soit 2, 4 et 9 semaines après l'ovariectomie.

Les femelles âgées de **6 semaines** présentent des différences morphologiques provoquées par l'ovariectomie. En effet, les diamètres ventriculaires gauches télé systolique et télé diastolique sont significativement augmentés ( $p < 0,05$ ,  $n=6-7$ , ANOVA) chez les femelles WT ovariectomisées et KO ovariectomisées par rapport à leurs contrôles sham respectifs. Cependant ces diamètres ne sont pas significativement différents entre les femelles WT et les femelles KO. Ces résultats démontrent que la suppression des hormones ovariennes induit un remodelage cardiaque de type dilatation, mais indépendamment de la présence ou l'absence du récepteur 5-HT2B. Par ailleurs, les autres paramètres morphologiques tels que les épaisseurs de parois (paroi postérieure et septum) ou le diamètre de l'aorte restent inchangés quelque soient le génotype ou le statut hormonal des femelles. L'augmentation des diamètres ventriculaires gauches a pour conséquence une augmentation significative ( $p < 0,05$ ,  $n=6-7$ , ANOVA) de la masse ventriculaire gauche (MVG) calculée (**Figure 32**) chez les femelles ovariectomisées par rapport aux femelles sham quelque soit le génotype des souris.

Les paramètres fonctionnels tels que la fraction de raccourcissement, la fraction d'éjection ou le débit cardiaque ne sont modifiés ni par la délétion du récepteur 5-HT2B, ni par l'ovariectomie (**Figure 32 et Tableau IV**).

En résumé, l'effet de deux semaines d'ovariectomie induit une augmentation de la taille du cœur de type dilatation sans hypertrophie (épaisseurs de paroi inchangées) n'ayant aucune conséquence sur la fonction cardiaque.

Les mesures réalisées deux semaines plus tard, à l'âge de **8 semaines**, se caractérisent par une disparition des différences morphologiques causées par l'ovariectomie chez les femelles WT mais pas chez les femelles KO. En effet, les diamètres ventriculaires gauches (télé systolique et télé diastolique) et la masse ventriculaire gauche (MVG) calculée se sont normalisés chez les femelles WT tandis que la MVG reste significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ,  $n=6-10$ , ANOVA) chez les femelles KO ovariectomisées par rapport aux femelles KO sham. De plus, il n'existe aucune différence entre la MVG des femelles WT sham et des

femelles KO sham. Enfin, tous les autres paramètres restent inchangés quelque soit le génotype ou le statut hormonal des femelles.

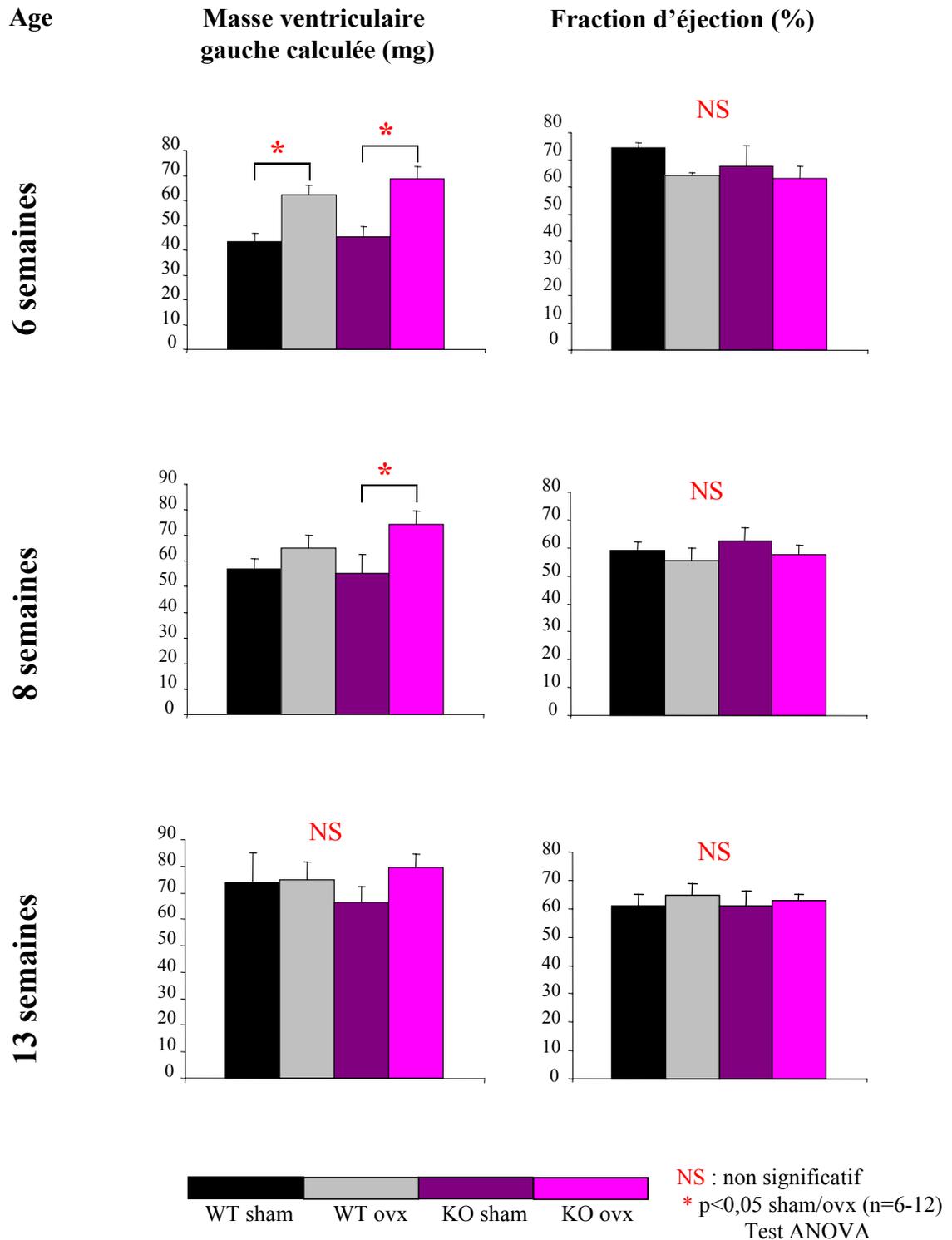
**Tableau IV : Paramètres échocardiographiques à 6, 8 et 13 semaines chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, ovariectomisées (ovx) ou pas (sham)**

6 semaines (n=6-7)	WT sham	WT ovx	KO sham	KO ovx
Diamètre Télé Systolique (mm)	1,35 ± 0,06	1,82 ± 0,04 *	1,48 ± 0,17	1,87 ± 0,15 *
Diamètre Télé Diastolique (mm)	2,67 ± 0,11	3,05 ± 0,07 *	2,68 ± 0,09	3,11 ± 0,10 *
Fraction de Raccourcissement (%)	49 ± 2	40 ± 1	45 ± 6	40 ± 4
Fraction d'Ejection (%)	74 ± 2	64 ± 1	68 ± 7	63 ± 4
Fréquence cardiaque (bpm)	298 ± 19	287 ± 26	285 ± 26	270 ± 16
Paroi Postérieure (mm)	0,55 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,53 ± 0,04	0,64 ± 0,05
Septum (mm)	0,69 ± 0,02	0,77 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,81 ± 0,02
diamètre aorte (cm)	0,98 ± 0,04	1,01 ± 0,04	0,96 ± 0,01	0,95 ± 0,05
Intégrale Temps Vitesse (cm)	7,73 ± 0,45	7,63 ± 0,72	8,88 ± 0,61	9,30 ± 0,45 #
débit cardiaque (ml/min)	1776 ± 240	1726 ± 193	1835 ± 252	1763 ± 180
Volume d'Ejection Systolique (ml)	6,0 ± 0,7	6,2 ± 0,8	6,4 ± 0,5	6,7 ± 0,8
Masse Ventriculaire Gauche (MVG) (mg)	43,4 ± 3,6	62,4 ± 3,7 *	45,3 ± 4,1	68,8 ± 4,6 *
Poids (g)	15,9 ± 0,5	18,0 ± 0,5 *	13,2 ± 0,5 #	15,4 ± 0,2 *#
MVG/poids (mg/g)	2,7 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	4,5 ± 0,3

8 semaines (n=6-10)	WT sham	WT ovx	KO sham	KO ovx
Diamètre Télé Systolique (mm)	1,91 ± 0,10	2,12 ± 0,14	1,78 ± 0,19	1,94 ± 0,08
Diamètre Télé Diastolique (mm)	3,00 ± 0,13	3,18 ± 0,10	2,91 ± 0,13	3,01 ± 0,10
Fraction de Raccourcissement (%)	36 ± 2	34 ± 3	39 ± 4	35 ± 3
Fraction d'Ejection (%)	59 ± 3	55 ± 4	62 ± 5	58 ± 4
Fréquence cardiaque (bpm)	301 ± 17	324 ± 17	288 ± 20	328 ± 14
Paroi Postérieure (mm)	0,59 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,63 ± 0,06	0,74 ± 0,06
Septum (mm)	0,73 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,68 ± 0,05	0,84 ± 0,03 *#
diamètre aorte (cm)	1,02 ± 0,03	1,11 ± 0,04	1,02 ± 0,05	1,06 ± 0,05
Intégrale Temps Vitesse (cm)	7,75 ± 0,41	7,23 ± 0,55	7,41 ± 0,47	7,02 ± 0,27
débit cardiaque (ml/min)	1809 ± 78	1740 ± 410	1659 ± 149	2077 ± 164
Volume d'Ejection Systolique (ml)	6,3 ± 0,5	6,9 ± 0,3	6,0 ± 0,3	6,2 ± 0,6
Masse Ventriculaire Gauche (MVG) (mg)	56,9 ± 4,1	65,2 ± 5,0	55,2 ± 0,5	74,0 ± 0,5 *
Poids (g)	16,9 ± 0,2	18,8 ± 0,7	15,5 ± 0,2	17,0 ± 0,3
LVM/poids (mg/g)	3,1 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,0 ± 0,4	4,4 ± 0,4 *

13 semaines (n=6-12)	WT sham	WT ovx	KO sham	KO ovx
Diamètre Télé Systolique (mm)	1,79 ± 0,15	1,78 ± 0,16	1,74 ± 0,15	2,03 ± 0,08
Diamètre Télé Diastolique (mm)	2,88 ± 0,15	3,02 ± 0,12	2,82 ± 0,11	3,36 ± 0,09 #
Fraction de Raccourcissement (%)	38 ± 3	42 ± 4	39 ± 4	40 ± 2
Fraction d'Ejection (%)	61 ± 4	65 ± 4	61 ± 5	63 ± 2
Fréquence cardiaque (bpm)	269 ± 12	310 ± 18	294 ± 13	310 ± 12
Paroi Postérieure (mm)	0,72 ± 0,05	0,67 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,63 ± 0,02
Septum (mm)	0,90 ± 0,06	0,91 ± 0,06	0,87 ± 0,06	0,83 ± 0,02
diamètre aorte (cm)	1,09 ± 0,03	1,14 ± 0,02	1,11 ± 0,03	1,21 ± 0,04 *
Intégrale Temps Vitesse (cm)	5,61 ± 0,54	6,22 ± 0,48	6,58 ± 0,56	6,99 ± 0,26
débit cardiaque (ml/min)	1634 ± 145	2223 ± 274	1898 ± 294	2564 ± 138
Volume d'Ejection Systolique (ml)	5,8 ± 0,3	7,3 ± 0,3	6,6 ± 1,2	7,8 ± 0,8
Masse Ventriculaire Gauche (MVG) (mg)	73,8 ± 11,2	75,0 ± 6,7	66,6 ± 5,7	79,3 ± 5,1
Poids (g)	20,9 ± 0,6	22,9 ± 1,1	19,9 ± 1,2	21,7 ± 0,8
MVG/poids (mg/g)	2,8 ± 0,4	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,4	3,6 ± 0,3

- \*  $p < 0,05$  entre sham et ovx : effet de l'ovariectomie (test ANOVA)
- #  $p < 0,05$  entre WT et KO : effet de la délétion du récepteur 5-HT2B (test ANOVA)



**Figure 32** : Cinétique d'évolution de paramètres échocardiographiques morphologique (masse ventriculaire gauche calculée) et

## **fonctionnel (fraction d'éjection) chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, ovariectomisées (ovx) ou pas (sham)**

A l'âge de **13 semaines**, la MVG ne présente plus aucune différence entre les quatre groupes de femelles étudiées. L'effet de l'ovariectomie a donc disparu aussi bien chez les femelles WT que les chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B. Deux différences persistent cependant : d'une part le diamètre télé diastolique est plus élevé chez les femelles KO ovariectomisées par rapport aux femelles WT ovariectomisées et d'autre part le diamètre de l'aorte est significativement augmenté chez les femelles KO ovariectomisées par rapport à leurs contrôles sham. Ces dernières données indiquent que la compensation vis-à-vis des effets de l'ovariectomie n'est pas encore totale à l'âge de 13 semaines chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B.

Il est intéressant de mentionner que la masse ventriculaire gauche des femelles ovariectomisées (KO ou WT) âgées de 6 semaines n'augmente quasiment pas jusqu'à ce qu'elles atteignent l'âge adulte. A l'inverse, la masse ventriculaire gauche des femelles sham augmente progressivement jusqu'à atteindre sa taille adulte à 13 semaines.

L'étude cinétique des paramètres échocardiographiques après ovariectomie a permis de mettre en évidence un remodelage cardiaque de type dilatation sans hypertrophie s'accompagnant d'une augmentation de la masse ventriculaire gauche chez les souris femelles. Cependant ce remodelage cardiaque n'est associé à aucune modification fonctionnelle cardiaque et disparaît lorsque les souris atteignent l'âge de 13 semaines. Par ailleurs ce remodelage est similaire quelque soit le génotype des femelles, mais semble être compensé plus rapidement chez les femelles WT que chez les femelles KO puisque des différences subsistent à 8 semaines chez les femelles KO mais pas chez les femelles WT.

En conclusion, la suppression des hormones ovariennes chez les femelles mutantes pour le récepteur 5-HT2B ne permet pas d'induire un phénotype cardiaque spécifiquement causé par cette mutation et similaire à celui des mâles mutants pour le récepteur 5-HT2B. En effet, nous n'avons jamais observé de réduction de la fraction de raccourcissement chez les femelles malgré l'augmentation des diamètres ventriculaires gauches.

## **Etude cinétique des paramètres hémodynamiques**

Afin de mieux comprendre les effets de l'ovariectomie sur les fonctions cardiovasculaires des femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, nous avons mesuré de façon non-invasive chez les souris vigiles, la pression artérielle systolique (PAS) au niveau de l'artère caudale ainsi que la fréquence cardiaque. De même que pour les paramètres échocardiographiques, nous avons réalisé une cinétique en commençant à l'âge de 8 semaines au lieu de 6 semaines, la taille des souris étant trop petite et donc mal adaptée au système de mesure avant l'âge de 8 semaines.

Quatre semaines après l'ovariectomie, la PAS est significativement réduite ( $p < 0,05$  ;  $n=7-12$ , ANOVA) chez les femelles ovariectomisées par rapport aux femelles sham quelque soit leur génotype (WT ou KO) (**Figure 33**). Cependant cette différence, entre les femelles ovariectomisées et les femelles sham, disparaît chez les femelles WT à l'âge de 10 semaines tandis qu'elle persiste chez les femelles KO. De façon remarquable, à l'âge de 10 semaines la PAS des femelles KO sham devient significativement plus élevée ( $p < 0,05$  ;  $n=7-12$ , ANOVA)

que celle des femelles WT sham. Enfin à l'âge de 12 semaines, toutes les différences imputées à l'ovariectomie ont disparu, aussi bien chez les femelles WT que les femelles KO. L'augmentation de PAS des femelles KO sham par rapport aux femelles WT sham persiste à l'âge de 12 semaines mais disparaît chez les femelles âgées de 14 à 16 semaines. Quelque soit la période examinée, nous n'avons jamais observé de différence significative concernant la fréquence cardiaque entre les différents groupes étudiés (**Figure 33**).

En conclusion, l'ovariectomie induit des modifications hémodynamiques, de type hypotension, qui disparaissent avec l'âge, mais plus lentement dans le cas des femelles KO pour le récepteur 5-HT2B. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle du récepteur 5-HT2B dans la régulation de la pression artérielle puisque les femelles KO présentent une augmentation significative de la pression artérielle à 12 semaines. Cependant cette différence reste transitoire puisque les valeurs de pression artérielle sont normalisées chez les femelles KO âgées de 14 à 16 semaines.

### Analyse du phénotype pré-pubère

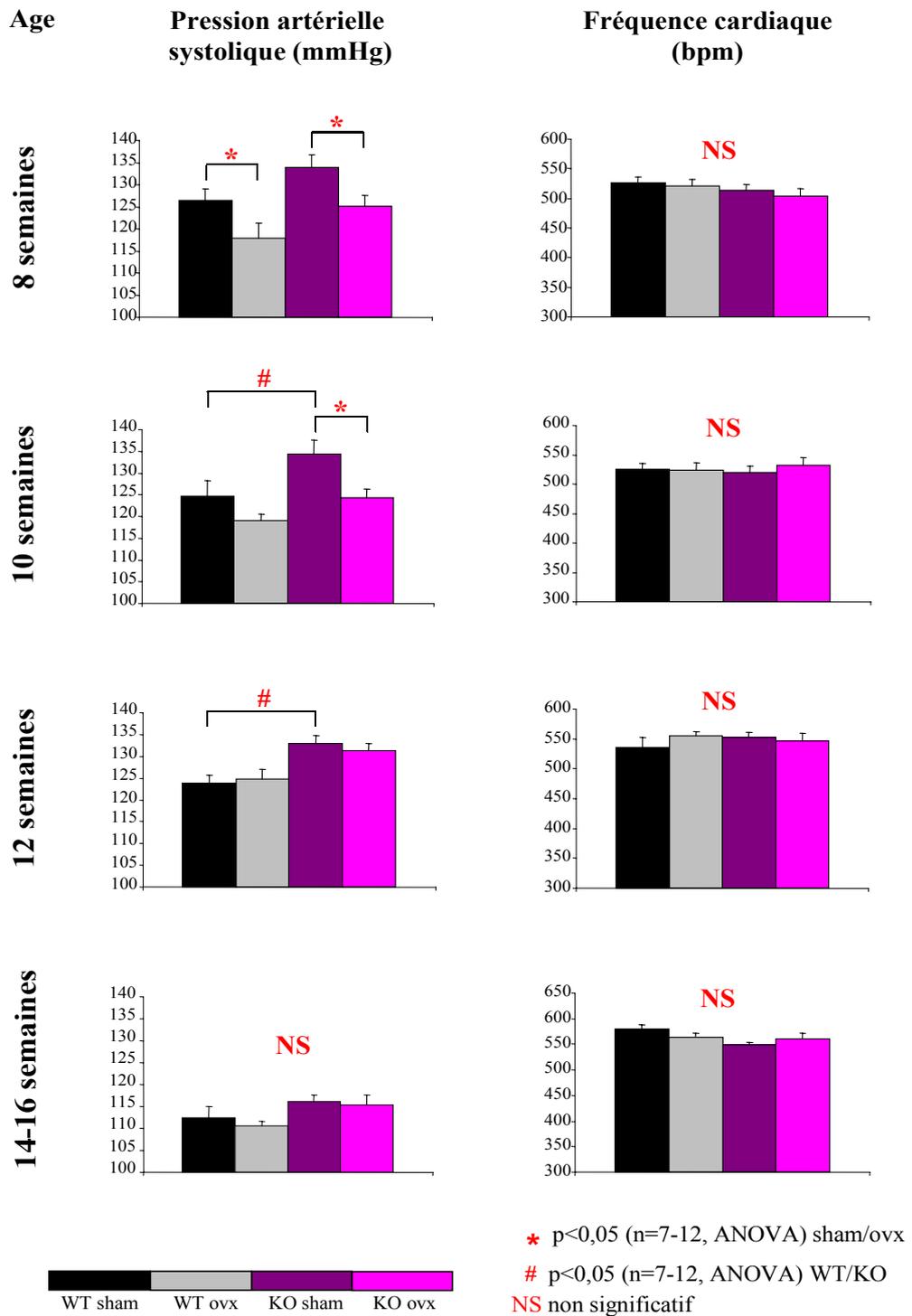
La sécrétion des hormones ovariennes commence entre la troisième et la quatrième semaine de vie chez la souris. La différence de genre concernant le phénotype cardiaque des souris KO pour le récepteur est évidente à l'âge de 12 semaines. En absence d'effet de l'ovariectomie sur le phénotype cardiaque, spécifique du génotype, à 12 semaines chez les femelles KO, nous avons posé l'hypothèse que la différence entre les mâles et les femelles KO pourrait apparaître avant la puberté et serait donc indépendante de la sécrétion d'hormones ovariennes. Sachant qu'il existe une période de létalité importante pendant la première semaine de vie chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B, nous avons évalué le *sex ratio* des animaux survivants afin de savoir si une éventuelle différence de genre à la naissance pourrait avoir un retentissement sur la mortalité.

La comptabilité des naissances sur une période de 2 ans a permis de calculer un sex ratio de **0,501 (femelle) / 0,499 (mâle)**, soit 400 femelles et 398 mâles KO pour le récepteur 5-HT2B. Il n'y a donc pas plus de femelles survivantes que de mâles survivants.

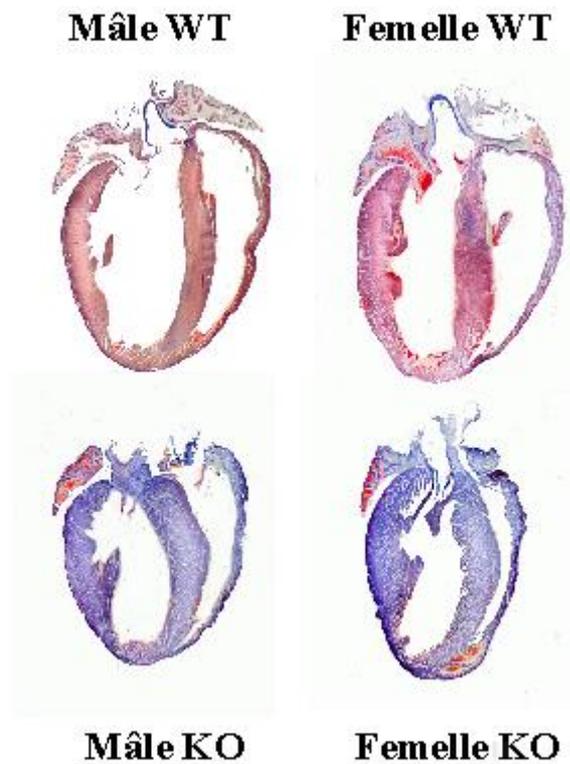
En conclusion, si il existe une différence de sévérité des anomalies cardiaques à la naissance entre les mâles et les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, elle n'affecte pas la létalité des souris.

Afin de savoir si des différences anatomiques existent, avant la puberté, entre les mâles et les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, soit avant la mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles, nous avons examiné des coupes histologiques de cœurs inclus en paraffine, de souris âgées de 2 semaines et colorées par la coloration trichrome de Mallory (**Figure 34**). Il n'existe pas de différence anatomique majeure entre les mâles et les femelles WT d'une part, ni entre les mâles et les femelles KO d'autre part. Cependant la désorganisation des fibres musculaires cardiaques est évidente chez les mâles et les femelles KO par rapport à leurs contrôles WT dont les fibres sont beaucoup plus compactes. De plus, la réduction de la taille du cœur chez les souris KO par rapport aux souris WT est similaire pour les mâles et les femelles. Par ailleurs, il n'existe pas de signe de dilatation ventriculaire gauche chez les mâles KO à cet âge. La différence apparente de coloration entre les cœurs WT et KO est un artéfact provoqué par la fixation des organes.

En résumé, la différence de genre n'apparaît pas avant l'âge de 2 semaines chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B.



**Figure 33 :** Cinétique d'évolution de la pression artérielle systolique et de la fréquence cardiaque après l'ovariectomie chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B



**Figure 34** : Sections de cœur de souris âgées de 2 semaines, inclus en paraffine et colorées par la coloration trichrome de Mallory

### Conclusion

La différence de genre concernant le phénotype des souris KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> apparaît entre l'âge de 2 semaines et celui de 12 semaines. L'ovariectomie, réalisée à l'âge de 4 semaines, n'induit pas d'aggravation du phénotype cardiaque des femelles KO donc les hormones ovariennes ne sont pas impliquées dans le phénotype moins sévère des femelles par rapport aux mâle KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>.

Par ailleurs les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> présentent une augmentation significative de la pression artérielle systolique qui, bien que temporaire, laisse supposer que ce récepteur est impliqué dans la régulation de la pression artérielle.

## **Deuxième partie**

**Influence de la délétion du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> chez les souris femelles dans l'hypertension induite par inhibition de la synthèse de monoxyde d'azote**

## Introduction

Les femelles mutantes (KO) pour le récepteur 5-HT2B n'ont pas d'anomalie cardiaque fonctionnelle, ni anatomique à l'âge adulte par rapport aux femelles sauvages (WT). L'étude de la régulation de la pression artérielle chez les femelles KO, plutôt que chez les mâles KO présente donc un avantage pour l'interprétation des résultats puisque la fonction cardiaque normale ne doit pas, à priori, influencer la régulation de la pression artérielle.

De plus l'élévation transitoire de la pression artérielle chez les femelles KO âgées de 12 semaines nous a amené à suggérer un rôle du récepteur 5-HT2B dans la régulation de la pression artérielle de base. Les données présentées dans l'introduction, concernant l'activation des NOS endothéliales par le récepteur 5-HT2B, nous ont conduit à faire l'hypothèse que cette régulation passerait par le contrôle de la libération de NO.

## But de l'étude

La pression artérielle systolique basale n'étant pas différente entre les femelles adultes WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, nous avons entrepris d'étudier la régulation de la pression artérielle dans un modèle pathologique. C'est pourquoi nous avons induit le développement d'une hypertension artérielle systémique chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B par injection intra-péritonéale quotidienne d'un inhibiteur non sélectif des NOSs, la N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NA, 80 mg/kg), pendant 18 semaines. Cette méthode nous permet à la fois d'étudier la régulation de la pression artérielle par le récepteur 5-HT2B en situation de stress et de mettre en évidence une interaction entre le récepteur 5-HT2B et la synthèse de NO, *in vivo*.

Par ailleurs, afin d'évaluer une interaction potentielle de la régulation de la pression artérielle par le récepteur 5-HT2B avec les hormones ovariennes, nous avons comparé les effets du L-NA chez les femelles sham et ovariectomisées pour chaque génotype. Enfin, chaque groupe traité à la L-NA a été comparé à un groupe contrôle dont les femelles ont reçu quotidiennement un volume équivalent de véhicule (NaCl, 0,9%) par injection intra-péritonéale. Pour la suite de l'étude nous distinguerons donc les femelles WT et KO par les lettres W et K, les femelles Sham et Ovariectomisées par les lettres S et O, et les femelles ayant reçu la L-NA par la lettre L, tandis que les femelles recevant le NaCl seront identifiées par la lettre N. Les résultats seront présentés en pourcentage d'augmentation de la pression artérielle systolique par rapport au groupe contrôle correspondant, recevant le NaCl.

## L'hypertension artérielle induite par la L-NA est biphasique chez les femelles WT

L'induction de l'hypertension réalisée pendant 18 semaines a permis d'identifier deux phases chez les femelles WT sham traitées à la L-NA (WSL) (**Figure 35A**).

En effet après une phase rapide d'augmentation de la pression artérielle pendant les 5 premières semaines de traitement, nous observons une phase de stabilisation des valeurs de pression artérielle systolique (PAS) pendant 4 semaines (semaines 5 à 9). C'est la phase I, correspondant à 12 % d'augmentation de la PAS chez les femelles WSL par rapport aux femelles WT sham contrôles (WSN).

A partir de la 9<sup>ème</sup> semaine de traitement, la PAS se met à nouveau à augmenter jusqu'à la semaine 13 où nous observons une deuxième phase de stabilisation jusqu'à la fin du traitement d'induction. C'est la phase II, correspondant à 24 % d'augmentation de la PAS chez les femelles WSL par rapport aux femelles WSN. Il existe une différence significative ( $p < 0,001$ ,  $n=7$ , ANOVA) entre les valeurs compactées de PAS de la phase I et de la phase II chez les femelles WSL.

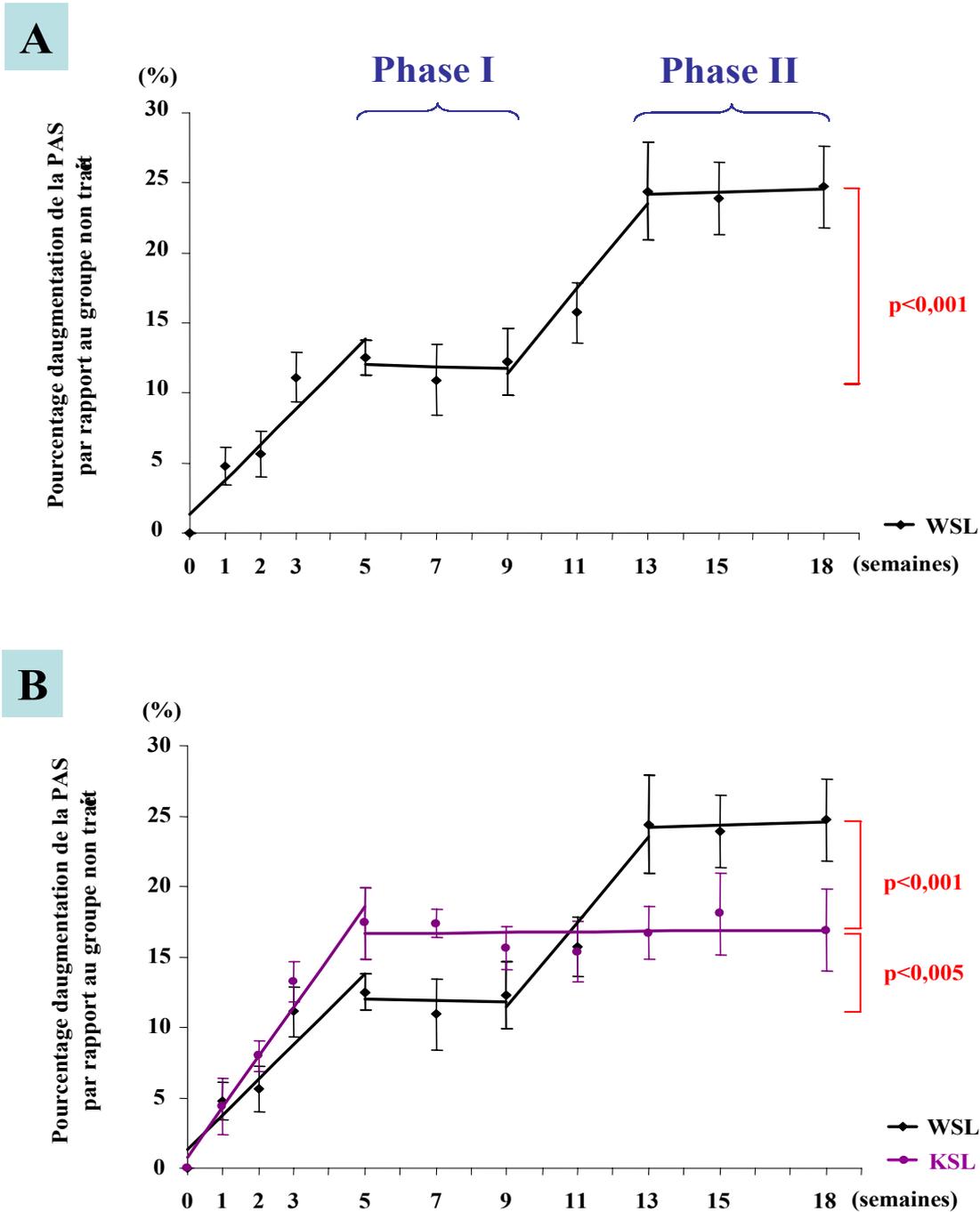
L'augmentation de la pression artérielle induite par l'inhibition de la synthèse de NO chez les femelles WT sham semble donc être bloquée, de façon transitoire, pendant la phase I, avant de reprendre pour atteindre des valeurs d'hypertension plus sévère dans la phase II.

## L'hypertension artérielle induite par la L-NA est monophasique chez les femelles KO

A l'inverse des femelles WT sham hypertendues (WSL), le traitement inhibiteur des NOSs induit une augmentation de la PAS chez les femelles KO sham (KSL) qui se caractérise par une seule phase d'hypertension à partir de la semaine 5 et jusqu'à la fin du traitement.

En effet, il n'y a pas de différence significative (test ANOVA) entre les valeurs compactées de pression artérielle systolique des semaines 5 à 9 (phase I des femelles WT) et celles des semaines 13 à 18 (phase II des femelles WT). L'hypertension des femelles KSL correspond à 17 % d'augmentation de la PAS par rapport aux femelles sham contrôles KSN (**Figure 35B**). De façon remarquable l'hypertension des femelles KSL est significativement plus élevée que la phase I des femelles WT qui est de 12 % ( $p < 0,005$ ,  $n=7-8$ , ANOVA) et significativement plus basse que la phase II des femelles WT qui est de 24 % ( $p < 0,001$ ,  $n=7-8$ , ANOVA).

En résumé, le récepteur 5-HT2B est absolument indispensable au développement, selon un mode biphasique, de l'hypertension artérielle induite par inhibition des NOSs. De plus le récepteur 5-HT2B semble avoir un rôle protecteur vis-à-vis de l'augmentation de la PAS induite par inhibition des NOS puisque les femelles KO sham présentent une augmentation plus précoce et plus sévère de la pression artérielle systolique par rapport aux femelles WT sham au début de l'induction de l'hypertension. A l'inverse, l'absence du récepteur 5-HT2B confère une protection vis-à-vis de l'hypertension à long terme, induite par la L-NA.



**Figure 35 : Cinétique d'induction de l'hypertension artérielle par inhibition chronique des NOSs chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B**

(WSL : Femelles WT sham traitées à la L-NA ; KSL : Femelles KO sham traitées à la L-NA ; n=6-8, test ANOVA,  $p < 0,05$ )

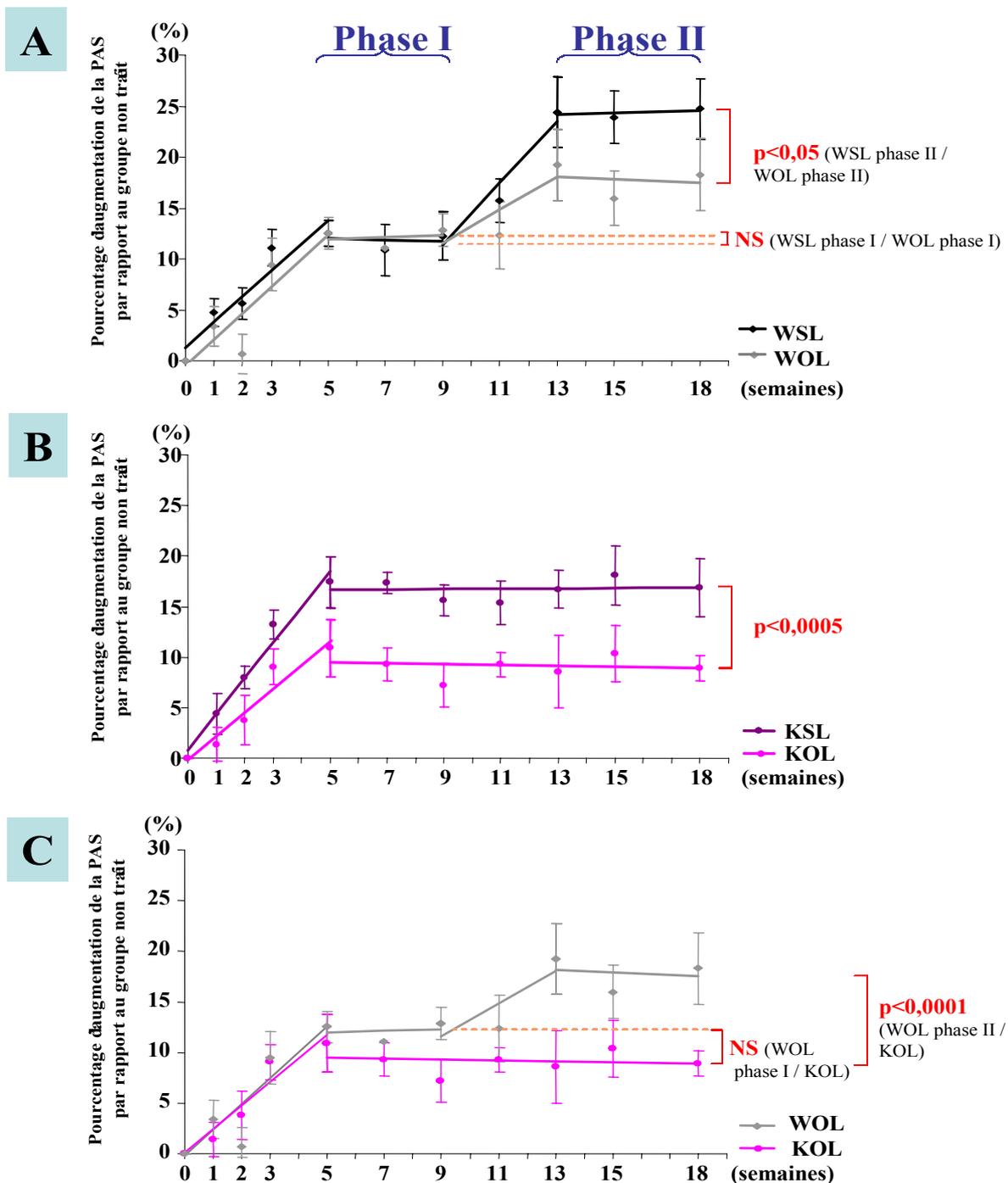
## L'ovariectomie protège les femelles vis-à-vis de l'hypertension induite par le L-NA

Chez les femelles WT, l'ovariectomie ne modifie pas le profil général de l'induction de l'hypertension artérielle avec ses deux phases. Cependant nous remarquons que la deuxième phase de l'hypertension chez les femelles WT ovariectomisées (WOL) est significativement plus faible (moins 30%,  $p < 0,05$ ,  $n = 6-7$ , ANOVA sur valeurs compactées) que la phase II de l'hypertension chez les femelles WT sham (WSL), tandis que les phases I sont strictement superposables pour les deux groupes (**Figure 36A**). Ce résultat suggère que l'ovariectomie protège les femelles WT vis-à-vis de l'hypertension induite par la L-NA dans la phase II uniquement.

Dans le cas des femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, l'ovariectomie ne modifie pas non plus le profil général de l'hypertension avec une seule phase. Elle possède également un pouvoir protecteur vis-à-vis de l'hypertension puisque l'augmentation de pression artérielle des femelles KO ovariectomisées (KOL, environ 9% d'augmentation par rapport au contrôle KON) est quasiment diminuée de moitié par rapport aux femelles KO sham (KSL, 17 % d'augmentation par rapport au contrôle KSN) sur toute la période de stabilisation de la pression artérielle systolique ( $p < 0,0005$ ,  $n = 6-8$ , ANOVA sur valeurs compactées) (**Figure 36B**).

Enfin, si on compare les femelles WT ovariectomisées (WOL) et les femelles KO ovariectomisées (KOL), on remarque que la pression artérielle systolique des femelles KOL n'est pas significativement différente de celle des femelles WOL dans la phase I mais elle devient significativement différente de la pression artérielle systolique des femelles WOL dans la phase II de l'hypertension induite par la L-NA ( $p < 0,0001$ ,  $n = 6-8$ , ANOVA sur valeurs compactées) (**Figure 36C**).

En conclusion, l'ovariectomie induit une diminution des valeurs de pression artérielle systolique dans la phase II du modèle d'hypertension par inhibition des NO synthases chez les femelles WT mais indépendamment du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> puisque les femelles KO ovariectomisées présentent également cette diminution de pression artérielle.



**Figure 36 : Effet de l’ovariectomie sur l’hypertension artérielle induite par inhibition chronique des NOSs chez les souris WT et KO pour le récepteur 5-HT2B**

(WSL : Femelles WT sham traitées à la L-NA ;WOL : Femelles WT ovariectomisées traitées à la L-NA ; KSL : Femelles KO sham traitées à la L-NA ; KOL : Femelles KO ovariectomisées traitées à la L-NA n=6-8, test ANOVA)

## Contrôle de la fonction cardiaque après induction de l'hypertension (Figure 37)

L'induction de l'hypertension par inhibition de la synthèse de NO ne produit que peu de modifications au niveau de la morphologie et de la fonction cardiaque. D'une part, les paramètres morphologiques cardiaques tels que les épaisseurs de paroi (septum et paroi postérieure) reste inchangés après induction de l'hypertension par rapport aux contrôles non hypertendus. Par ailleurs ces paramètres ne sont pas non plus influencés par le génotype des femelles, ni par leur statut hormonal (ovx ou sham).

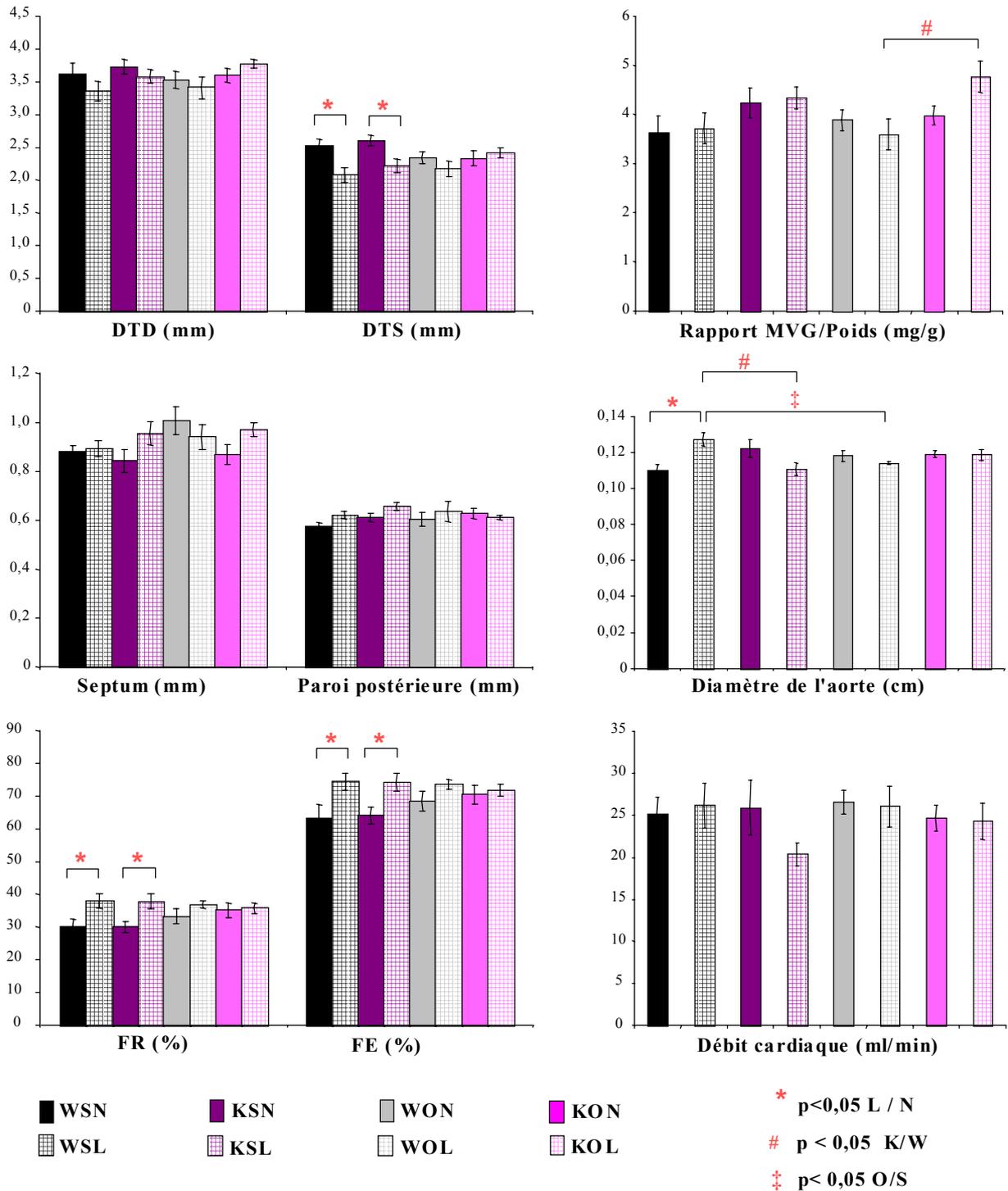
Concernant les diamètres ventriculaires gauches, seul le diamètre télé systolique (DTS) est modifié tandis que le diamètre télé diastolique (DTD) est inchangé parmi les huit groupes étudiés. Le DTS diminue significativement ( $p < 0,05$ ,  $n=6-8$ , ANOVA) avec le traitement hypertenseur chez les femelles sham WT et KO (WSL et KSL) par rapport à leurs contrôles normotendus (WSN et KSN). A l'opposé le DTS ne diminue pas avec le traitement par la L-NA chez les femelles ovariectomisées. En effet le DTS des femelles ovariectomisées est déjà diminué en absence de traitement par rapport à celui des femelles sham, mais de façon non significative.

L'hypertension induite par la L-NA diminue donc sélectivement le diamètre télé systolique mais indépendamment du génotype et uniquement en présence d'hormones ovariennes. Cette modification de la fonction systolique s'accompagne d'une augmentation significative de la fraction d'éjection (FE) et de la fraction de raccourcissement (FR) chez les femelles sham hypertendues (WT et KO) par rapport aux femelles normotendues (WT et KO), indépendamment du génotype. De même que pour le DTS, l'ovariectomie n'induit aucune différence significative pour ces deux paramètres entre les femelles hypertendues ou normotendues.

Les autres paramètres échocardiographiques sont inchangés parmi les huit groupes étudiés, à l'exception d'une augmentation significative ( $p < 0,05$ ,  $n=6-8$ , ANOVA) de la masse ventriculaire gauche rapportée au poids du cœur, entre les femelles WT ovariectomisées hypertendues (WOL) et les femelles KO ovariectomisées hypertendues (KOL). Enfin, des différences apparaissent au niveau du diamètre de l'aorte puisqu'il augmente de façon significative ( $p < 0,05$ ,  $n=6-8$ , ANOVA) chez les femelles WT sham hypertendues (WSL) par rapport à leur contrôles normotendus (WSN). Cette augmentation est spécifique du génotype puisqu'elle ne survient pas dans le cas des femelles KO sham (KSL versus KSN) et elle est également spécifique du statut hormonal puisqu'elle ne survient pas non plus dans le cas des femelles sauvages ovariectomisées (WOL versus WON).

En résumé, l'hypertension induite par inhibition des NO synthases entraîne des modifications des paramètres échocardiographiques chez les femelles sham mais pas chez les femelles ovariectomisées, indépendamment du génotype et donc du récepteur 5-HT2B.

L'ovariectomie ne donne donc pas de phénotype particulier chez les femelles KO par rapport aux femelles WT tant au niveau de la régulation de la pression artérielle qu'au niveau de la fonction cardiaque. Par conséquent pour la suite de notre étude, nous nous attacherons à élucider les effets observés chez les animaux non ovariectomisés afin de mieux comprendre le rôle du récepteur 5-HT2B dans le modèle d'hypertension induit par inhibition des NOSs.



**Figure 37 :** Paramètres échocardiographiques mesurés chez les femelles normotendues (N) ou hypertendues par inhibition des NOSs (L), WT et KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, ovariectomisées (O) ou non (S)

(DTD : diamètre télé diastolique ; DTS : diamètre télé systolique ; MVG : masse ventriculaire gauche ; FR : fraction de raccourcissement ; FE : fraction d'éjection ;  $p < 0,05$ ,  $n = 6-8$ , ANOVA)

## Analyse histologique en fin de traitement hypertenseur

Puisque les femelles sauvages développent deux phases hypertensives, nous avons émis l'hypothèse que la deuxième phase pourrait être la conséquence de modifications vasculaires de type remodelage caractérisées habituellement par le développement d'une fibrose péri-vasculaire, au niveau de l'adventice et par la prolifération des cellules musculaires lisses de la media des vaisseaux. Afin d'évaluer ces potentielles modifications, nous avons observé la morphologie des vaisseaux coronaires et des glomérules rénaux qui sont habituellement les premiers sites atteints par le remodelage induit par l'hypertension artérielle.

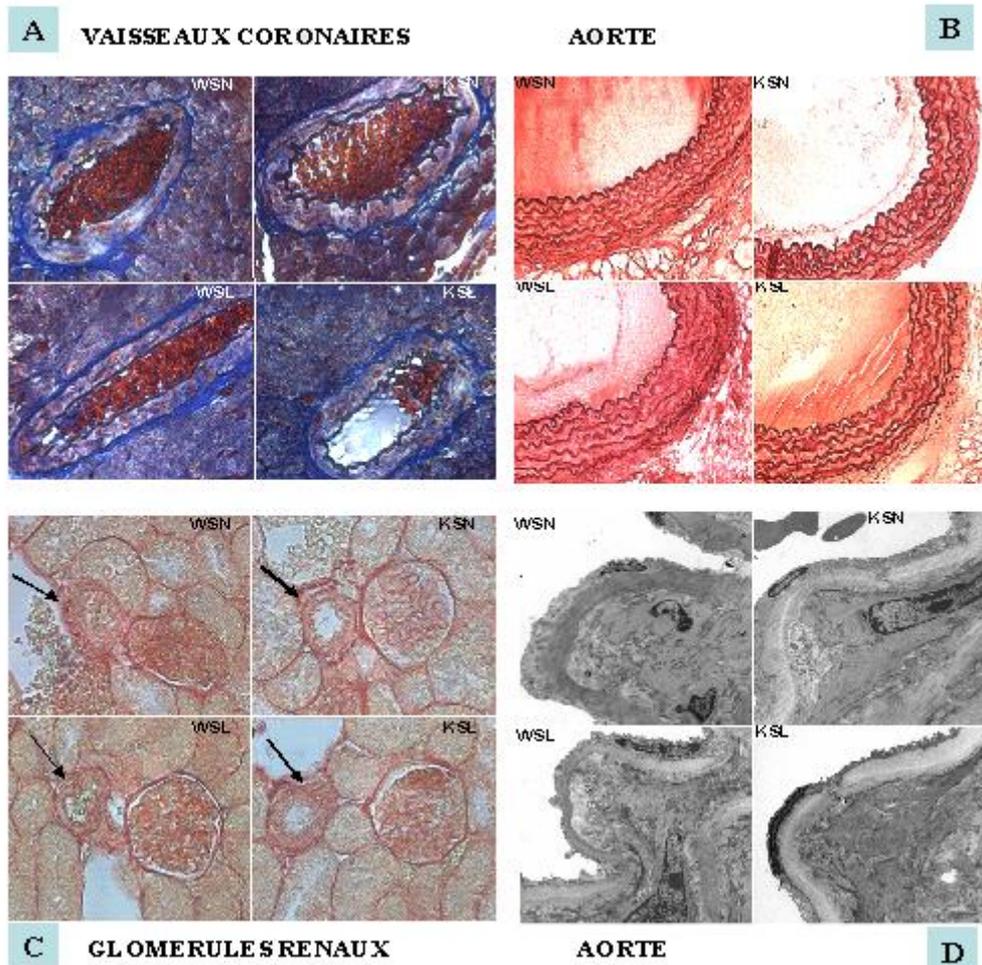
La coloration trichrome de Mallory (**Figure 38A**) des vaisseaux coronaires permet de visualiser en bleu intense l'adventice des vaisseaux, qui ne présente aucune différence entre les animaux hypertendus (WSL et KSL) et normotendus (WSN et KSN). Par ailleurs, l'épaisseur de la média n'est pas modifiée par l'hypertension suggérant l'absence de prolifération des cellules musculaires lisses.

La coloration au rouge Sirius (**Figure 38C**) des glomérules rénaux permet d'identifier les zones de fibroses en rouge très intense en lumière visible, et en jaune, en lumière polarisée. Les glomérules rénaux ainsi que les micro-vaisseaux à proximité ne présentent aucune fibrose quelques soient les groupes étudiés. Les images en lumière polarisée ne sont pas présentées puisque l'absence de fibrose se traduit par l'absence de réfraction de la lumière et donc une image totalement noire. Par ailleurs aucun remodelage n'a été observé chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, que se soit avec ou sans traitement hypertenseur.

La structure des artérioles et des glomérules rénaux n'est donc pas altérée par l'hypertension induite par inhibition des NOSs malgré les valeurs de pression élevées. Un remodelage vasculaire ou une atteinte rénale ne sont donc pas associés au développement de l'hypertension chez les femelles sauvages ou *knock-out*. Le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> n'influence donc pas, à priori, l'anatomie des vaisseaux coronaires ou de l'appareil rénal chez les souris femelles.

L'analyse de la structure de l'aorte grâce à la coloration des fibres élastiques par l'orcéine (**Figure 38B**) ou par microscopie électronique (**Figure 38D**) n'a révélé aucune différence de structure due à la mutation du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> ou à l'hypertension induite par la L-NA.

En conclusion, aucune modification de la structure générale des vaisseaux ou de leur ultrastructure ne survient chez les femelles hypertendues (WT et KO) démontrant ainsi que le modèle d'hypertension induit par une inhibition chronique des NOSs n'est pas associé à un phénomène de remodelage vasculaire majeur chez la souris. Par ailleurs la délétion du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> ne modifie pas à priori la structure des vaisseaux sanguins.



**Figure 38 :** Analyse histologique de la structure des vaisseaux chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, hypertendues ou normotendues

(WSN: WT sham NaCl ; WSL: WT sham L-NA; KSN: KO sham NaCl; KSL: KO sham L-NA; → : artériole rénale)

## Régulation de l'expression des récepteurs vasculaires de la sérotonine

La pression artérielle dépend non seulement de la structure des vaisseaux mais aussi de leur tonicité. Au niveau vasculaire, plusieurs sous-types de récepteurs de la sérotonine sont exprimés : principalement les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>1B/1D</sub> et plus faiblement les récepteurs 5-HT<sub>7</sub> et 5-HT<sub>4</sub>. Les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>1B/1D</sub> sont exprimés à la fois dans les cellules musculaires lisses et dans l'endothélium tandis que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a une expression restreinte au muscle lisse. A l'aide d'expériences de liaisons nous avons évalué l'expression de chacun de ces sous-types dans l'aorte des souris WT et KO, hypertendues ou non (**Figure 39A**).

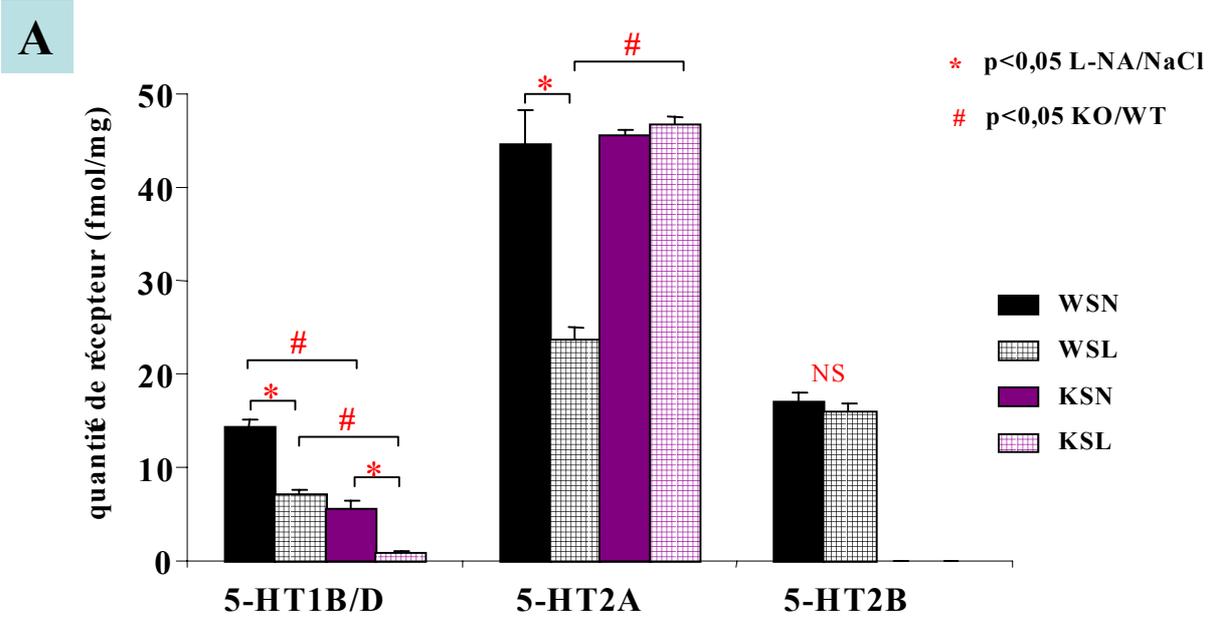
On remarque d'abord que l'expression du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> n'est pas modifiée par l'hypertension induite par inhibition chronique des NOSs par la L-NA.

A l'inverse, le niveau d'expression du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> diminue de moitié dans l'aorte des femelles KO par rapport aux femelles WT avant l'induction de l'hypertension. De plus, l'hypertension induite par la L-NA conduit également à la réduction du niveau d'expression des récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> dans l'aorte aussi bien chez les femelles WT que chez les femelles KO. La diminution d'expression du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> est donc sous le contrôle du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> et de la synthèse du NO puisque le blocage de ces deux facteurs entraîne une régulation négative synergique de l'expression du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub>.

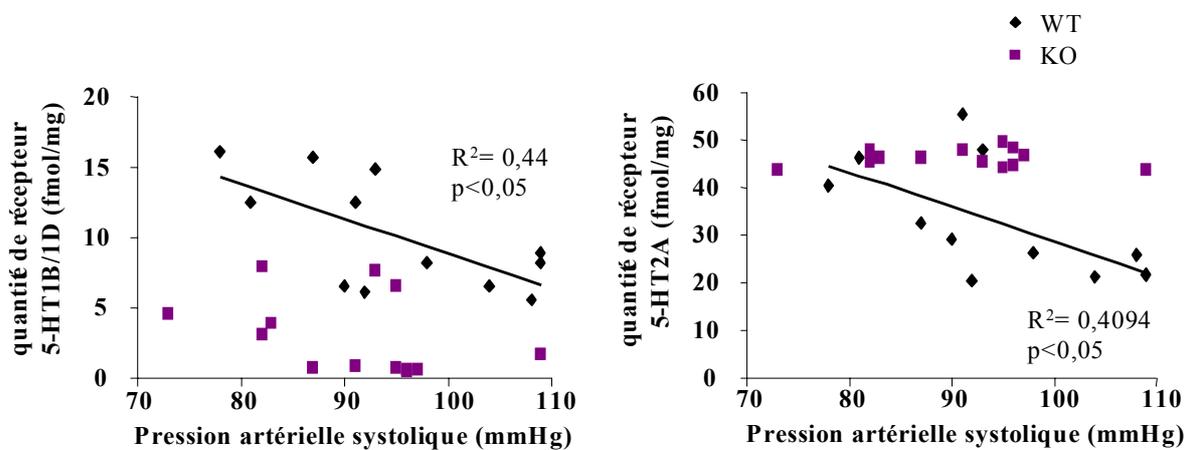
De même, le niveau d'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> diminue de moitié, suite à l'induction de l'hypertension par la L-NA chez les femelles WT, alors que son expression reste inchangée chez les femelles KO hypertendues par rapport aux femelles KO normotendues. De plus le niveau d'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> n'est pas différent avant le traitement hypertenseur entre les femelles WT et KO. Ces résultats suggèrent que la régulation négative du taux d'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> induite par l'inhibition de la synthèse du NO est dépendante de la présence du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>.

En comparant les niveaux d'expression des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>1B/1D</sub> avec les valeurs de pression artérielle correspondantes pour chaque femelle (WT ou KO), nous avons observé l'existence d'une corrélation négative entre les taux d'expression de ces récepteurs et la pression artérielle dans le cas des femelles WT mais pas dans le cas des femelles KO (**Figure 39B**).

En résumé, le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> conserve un niveau d'expression stable quelque soit la pression artérielle chez les femelles sauvages. De plus il participe à la régulation du niveau de base de l'expression du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> ainsi qu'à la régulation, en fonction de la pression artérielle, des niveaux d'expression des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>1B/1D</sub>.



**B** Corrélation entre l'expression des récepteurs 5-HT1B/1D ou 5-HT2A dans l'aorte et la Pression Artérielle Systolique



**Figure 39** : Régulation des niveaux d'expression des récepteurs 5-HT1B/1D, 5-HT2A et 5-HT2B dans les aortes de femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, normotendues ou hypertendues par inhibition des NOSs

(WSN : WT sham NaCl ; WSL : WT sham L-NA ; KSN : KO sham NaCl ; KSL : KO sham L-NA ;  $p < 0,05$ ,  $n = 5-8$ , ANOVA ; NS : non significatif)

## Conclusion

Nous avons démontré que dans l'hypertension induite par inhibition de la synthèse de NO, le développement de deux phases successives est sujet à plusieurs types de régulation faisant intervenir le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>.

Premièrement, l'absence de récepteur 5-HT<sub>2B</sub> conduit à une hypersensibilité des femelles KO par rapport à la première phase d'hypertension chez les femelles sauvages.

Deuxièmement, l'absence de récepteur 5-HT<sub>2B</sub> empêche le développement d'une seconde phase d'hypertension dont l'apparition semble être associée à la diminution du niveau d'expression des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et mais pas à un remodelage vasculaire.

Troisièmement, l'ovariectomie protège les femelles WT, dans la phase II, et les femelles KO vis-à-vis de l'hypertension induite par inhibition des NOSs.

## **Troisième partie**

### **Influence de la délétion du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> sur la compliance aortique et l'activité basale des NOS endothéliales dans l'aorte des souris femelles**

## Introduction

Comme nous l'avons observé dans le chapitre précédent, les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> sont plus sensibles au traitement inhibiteur des *Nitric Oxide Synthases* par la L-NA à court terme, puisque leur pression artérielle systolique est significativement plus élevée entre les semaines 3 et 9 de l'induction de l'hypertension par rapport aux femelles WT. Nous avons émis l'hypothèse que cette hypersensibilité à un traitement chronique par la L-NA serait la conséquence d'une hypersensibilité aiguë vis-à-vis de l'inhibition de la synthèse de NO chez les femelles KO.

## But de l'étude

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré différents paramètres hémodynamiques chez des femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, équipées d'une sonde de pression. Cette sonde est implantée dans l'aorte et permet l'enregistrement en continu, par radio-télémetrie, des paramètres hémodynamiques chez les souris éveillées et libres de tous mouvements.

Nous avons dans un premier temps évalué les paramètres hémodynamiques dans les conditions de base, puis nous avons testé différents agents vasoactifs dont la L-NA.

Dans un deuxième temps, nous avons contrôlé l'expression et l'activité basale des *Nitric Oxide Synthases*.

## Paramètres hémodynamiques en conditions basales pendant 24 heures

L'enregistrement pendant 5 jours des paramètres hémodynamiques, sans aucune intervention de notre part, sur les femelles KO et WT, nous a permis de contrôler le caractère biphasique des variations de la pression artérielle moyenne (PAM) (**Figure 40A**). En effet, la PAM augmente pendant la phase nocturne qui correspond à la phase d'activité des souris. Pendant la journée, la PAM n'est pas significativement différente entre les femelles WT et KO, mais à l'inverse, si on compacte les valeurs de pression artérielle moyenne pendant la phase nocturne, on observe une augmentation significative ( $p < 0,0001$ ,  $n=6-7$ , ANOVA) de ce paramètre chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B par rapport aux femelles WT.

La fréquence cardiaque, quant à elle, ne présente aucune différence significative, entre les femelles WT et KO, quelque soit le période de la journée (**Figure 40B**).

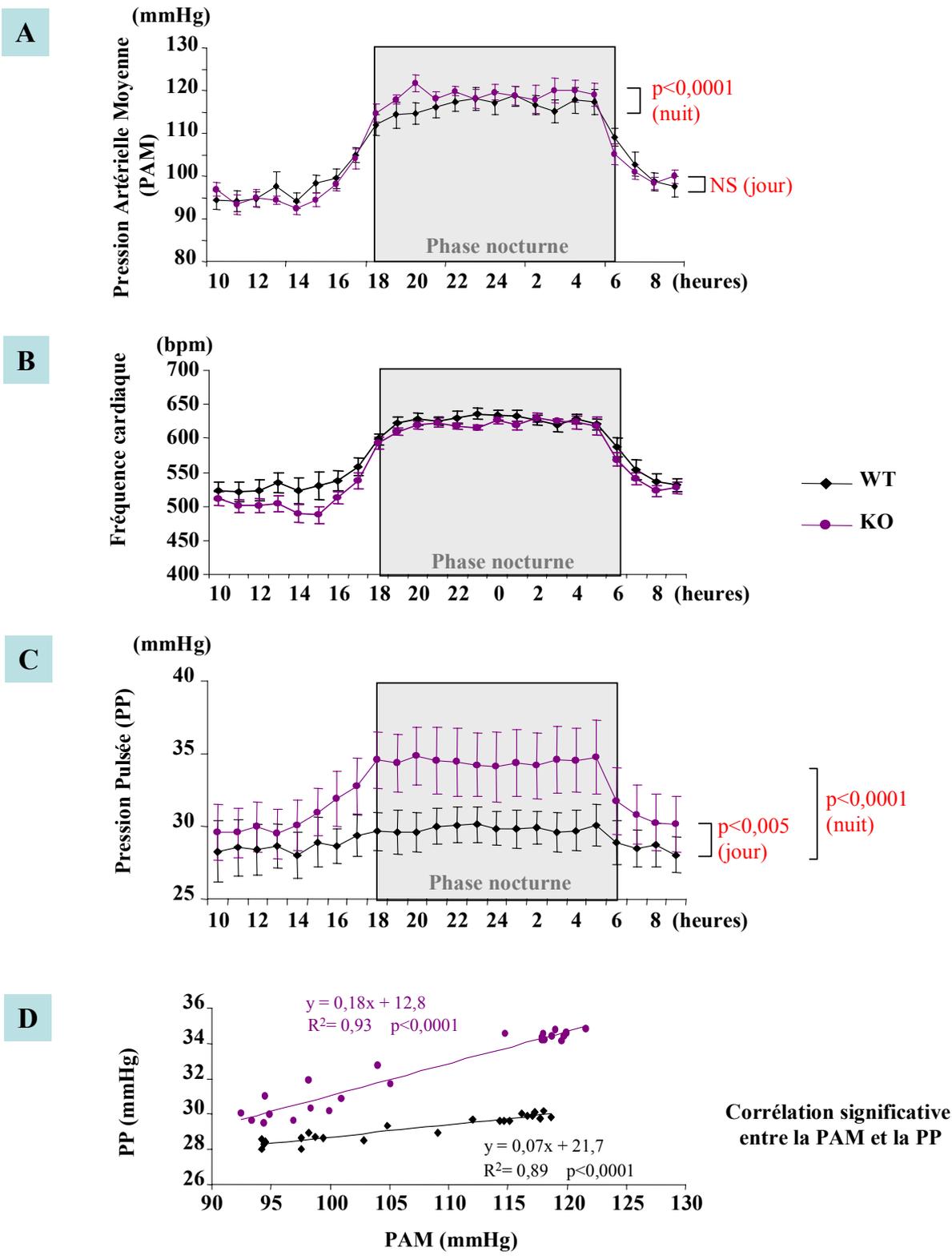
L'analyse des variations, sur 24 heures, de la pression pulsée (PP) (**Figure 40C**) a permis de mettre en évidence une augmentation significative de ce paramètre (en utilisant des valeurs compactées pour le jour et la nuit, ANOVA) chez les femelles KO par rapport aux femelles WT aussi bien le jour que la nuit. Cependant l'augmentation de pression pulsée est plus marquée pendant la phase nocturne.

La pression artérielle moyenne est calculée selon la formule suivante :

**Pression artérielle moyenne = pression artérielle diastolique + 1/3 pression pulsée**

Il existe donc une relation directe entre la pression artérielle moyenne et la pression pulsée. Nous avons représenté cette relation sur la **figure 40D** afin de vérifier l'existence d'une corrélation entre ces deux paramètres. Une bonne corrélation a été observée entre la pression artérielle moyenne et la pression pulsée chez les femelles WT et KO ( $p < 0,0001$  ; test Z de corrélation), cependant il est important de mentionner que la pente de la droite de régression est 2,5 fois plus élevée dans le cas des femelles KO ( $y = 12,8 + 0,18x$  ;  $R^2 = 0,93$ ) par rapport aux femelles WT ( $y = 21,7 + 0,07x$  ;  $R^2 = 0,89$ ).

En résumé, les paramètres hémodynamiques de base des femelles KO pour le récepteur 5-HT2B se différencient de ceux des femelles WT par une augmentation de la pression artérielle moyenne pendant la phase d'activité nocturne ainsi qu'une augmentation générale (jour et nuit) des valeurs de pression pulsée, entraînant une modification de la corrélation entre ces deux paramètres.



**Figure 40 :** Paramètres hémodynamiques enregistrés par radio-télémetrie pendant 24 heures pour les femelles et WT pour le récepteur 5-HT2B (n=6-7) (PAM : pression artérielle moyenne ; PP : pression pulsée)

## Réponse normale à une injection de phényléphrine chez les femelles KO

La phényléphrine est un agoniste de référence pour les récepteurs  $\alpha$ 1-adrénérgiques situés, entre autres, sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux et induisant une vasoconstriction.

Afin de tester la réactivité vasculaire des femelles KO par rapport aux femelles WT et plus particulièrement la contractilité dépendante des cellules musculaires lisses, nous avons enregistré les modifications hémodynamiques induites par l'injection d'une dose unique de phényléphrine (3 mg/kg, en intra-péritonéal) et comparé ces modifications à celles induites par l'injection d'un volume équivalent de solvant (NaCl 0,9%). L'injection en *bolus* d'une dose de phényléphrine chez les femelles WT et KO provoque une importante augmentation de la pression artérielle moyenne dont la valeur maximale est atteinte 20 minutes après l'injection. La réponse contractile des femelles KO n'est pas différente de celle des femelles WT (**Figure 41A**). De même, la diminution de fréquence cardiaque et l'augmentation de pression pulsée induites par l'injection de phényléphrine ne sont pas différentes entre les femelles WT et KO (**Figure 41B et 41C**).

Par conséquent, la relation entre la pression pulsée et la pression artérielle moyenne n'est pas différente entre les femelles WT et KO. Dans chaque cas, l'injection du véhicule (NaCl) ou de phényléphrine, s'accompagne toujours d'une très bonne corrélation entre ces deux paramètres ( $p < 0,0001$ , Test Z de corrélation) (**Figure 41D**).

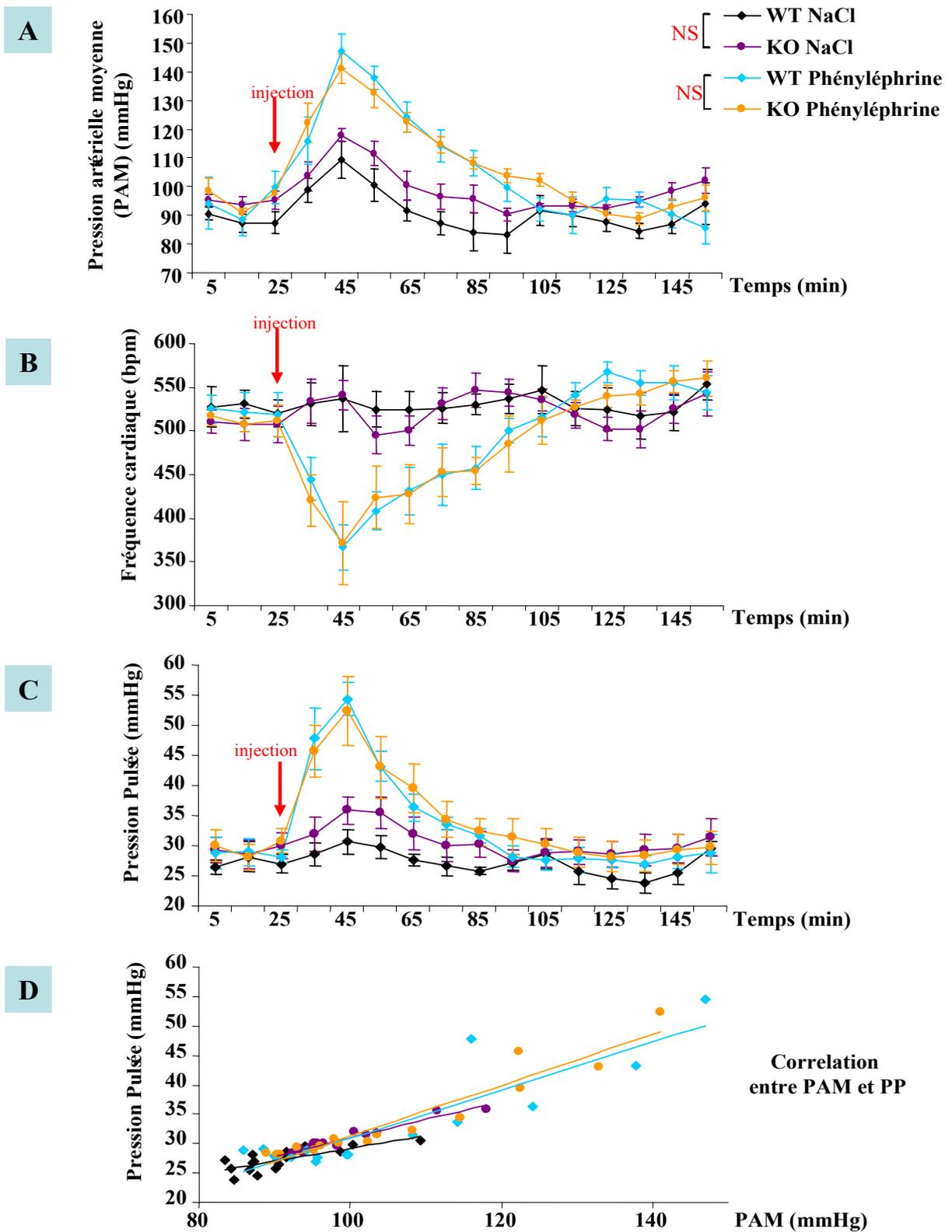
En résumé, les modifications hémodynamiques induites par une injection en *bolus* de phényléphrine ne sont pas influencées par la délétion du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> chez les souris femelles.

## Réponse normale à une injection de nitroprussiate de sodium chez les femelles KO

Le nitroprussiate de sodium induit classiquement une vasodilatation par libération exogène de monoxyde d'azote (NO) et de façon indépendante de la synthèse endogène de NO par les NOSs.

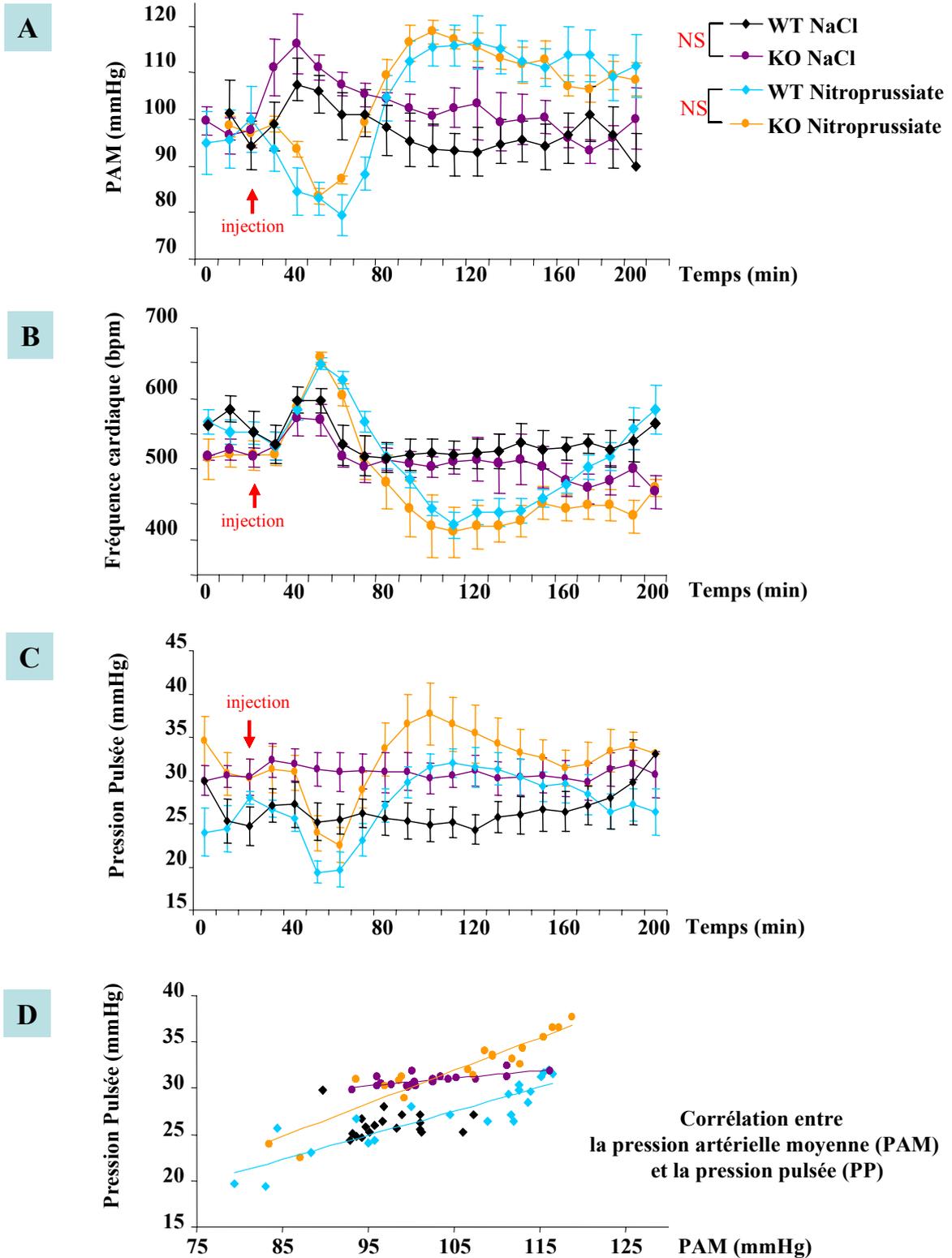
Afin de tester la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires *in vivo* chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, nous avons réalisé le même type d'expérience qu'avec la phényléphrine, mais en pratiquant une injection sous-cutanée de nitroprussiate de sodium (SNP) à la dose de 5 mg/kg. La diminution de pression artérielle moyenne, l'augmentation de fréquence cardiaque et la diminution de pression pulsée induites par le nitroprussiate de sodium sont semblables chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> (**Figure 42A, 42B et 42C**). Par conséquent, la relation de corrélation entre la pression pulsée et la pression artérielle moyenne n'est pas affectée par l'injection de nitroprussiate quelque soit le génotype des femelles traitées (**Figure 42D**).

En résumé, la vasodilatation induite par le nitroprussiate de sodium, un donneur de NO, n'est pas modifiée par la délétion du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>.



**Figure 41** : Modifications des paramètres hémodynamiques induites par la phényléphrine (3mg/kg, ip) chez les femelles KO et WT pour le récepteur 5-HT2B (NS : non significatif, n=5-6, ANOVA)





**Figure 42** : Modifications des paramètres hémodynamiques induites par le nitroprussiate de sodium (5 mg/kg, sc) chez les femelles KO et WT pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> (NS : non significatif, n=5-6, ANOVA)

## Augmentation de la pression pulsée par la N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NA) chez les femelles KO

Après avoir vérifié que la vasoconstriction induite un agoniste adrénergique (phényléphrine) n'est pas différente chez les femelles KO par rapport aux femelles WT, nous avons provoqué une vasoconstriction en inhibant la synthèse de NO, par la N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine, précédemment utilisée pour induire une hypertension chronique. L'expérience a été réalisée pendant 5 jours consécutifs afin de limiter les variations individuelles.

L'augmentation de pression artérielle moyenne suivant une injection intra-péritonéale de L-NA, n'est pas significativement plus importante chez les femelles KO par rapport aux femelles WT ( $p > 0,01$ , non significatif,  $n=4-5$ ) (**Figure 43A**). En effet, si on mesure la variation de pression avant et après l'injection de L-NA, on remarque une augmentation de 18 mmHg chez les femelles WT traitées à la L-NA par rapport aux femelles WT traitées par le véhicule (NaCl). Cette augmentation est de 17 mmHg dans le cas des femelles KO.

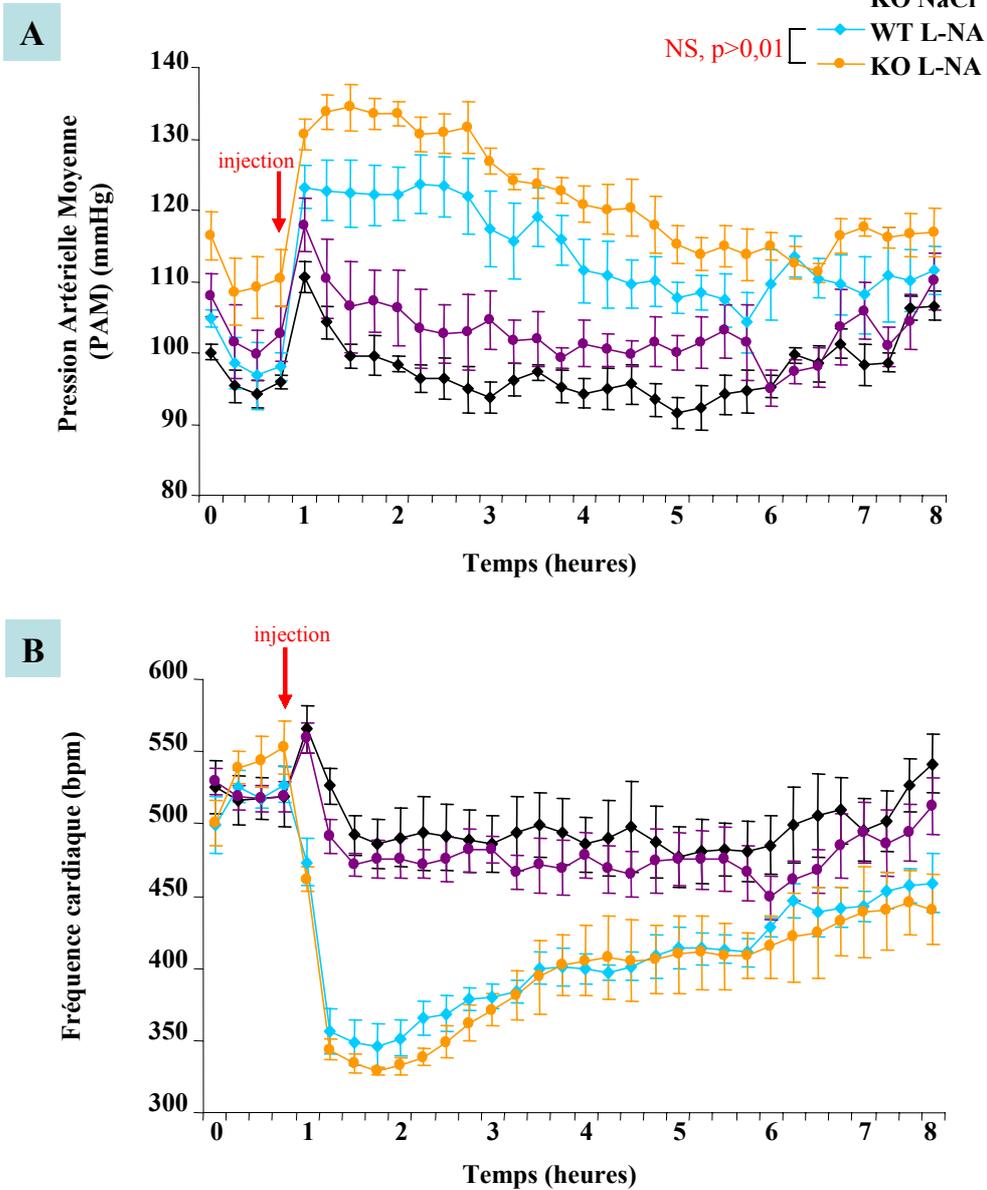
Par ailleurs, la chute des valeurs de fréquence cardiaque consécutive à la vasoconstriction n'est pas non plus différente chez les femelles KO par rapport aux femelles WT (**Figure 43B**).

Mais de façon remarquable, la pression pulsée est fortement augmentée (17 mmHg, soit 47% d'augmentation) chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, tandis qu'elle est plus faiblement augmentée (7 mmHg, soit 23% d'augmentation) chez les femelles WT après l'injection de L-NA (**Figure 44A**). En comparant les groupes traités par la L-NA et par le véhicule, on observe une différence significative ( $p < 0,01$ ,  $n=4$ , ANOVA) pour les femelles KO entre 30 minutes et 2,5 heures après l'injection de L-NA, tandis que les femelles WT n'atteignent jamais ce niveau de significativité, en comparant la même période.

Ainsi, la réponse à une injection aiguë de L-NA, chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, se caractérise par une augmentation de la pression pulsée significativement plus élevée que chez les femelles WT, mais sans modification significative de la pression artérielle moyenne ou de la fréquence cardiaque.

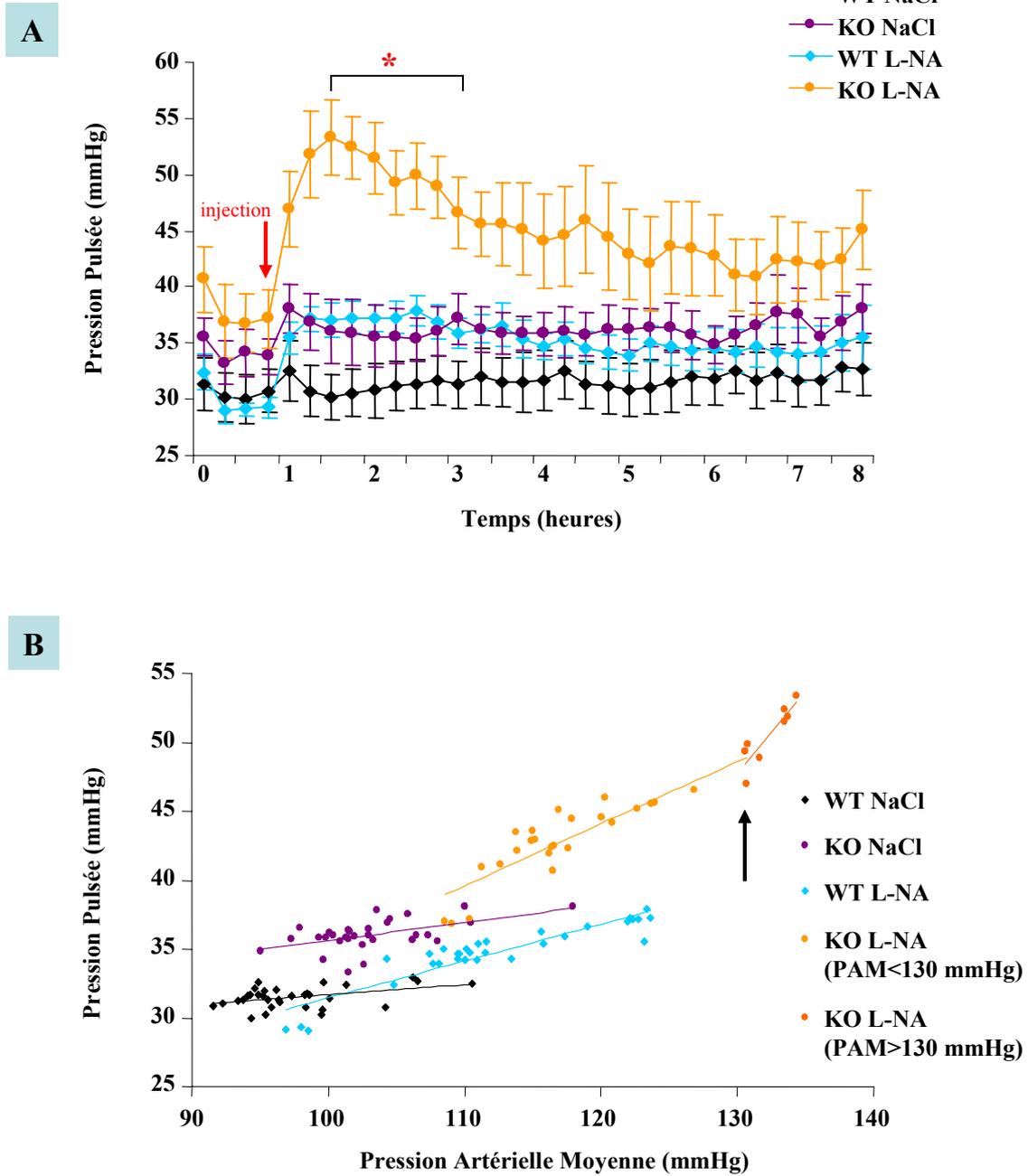
Si on représente la corrélation entre la pression pulsée et la pression artérielle moyenne, on remarque une « cassure » dans la pente de la droite de régression pour les femelles KO traitées à la L-NA (**Figure 44B**). En effet pour des valeurs de pression artérielle moyenne supérieures à 130 mmHg, la pente de la droite est multipliée par 3 (équation pour KO L-NA < 130 mmHg :  $y = 0,45x - 10,1$  ; équation pour KO L-NA > 130 mmHg :  $y = 1,20x - 108,7$ ).

En résumé, les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> sont plus sensibles que les femelles WT vis-à-vis de l'augmentation de la pression pulsée induite par une injection en *bolus* d'un inhibiteur de la synthèse de NO et cette sensibilité est amplifiée lorsque la pression artérielle moyenne est supérieure à 130 mmHg.



**Figure 43 : Modifications hémodynamiques induites par la L-NA (80 mg/kg, ip) chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>**  
(NS : non significatif à 1%)

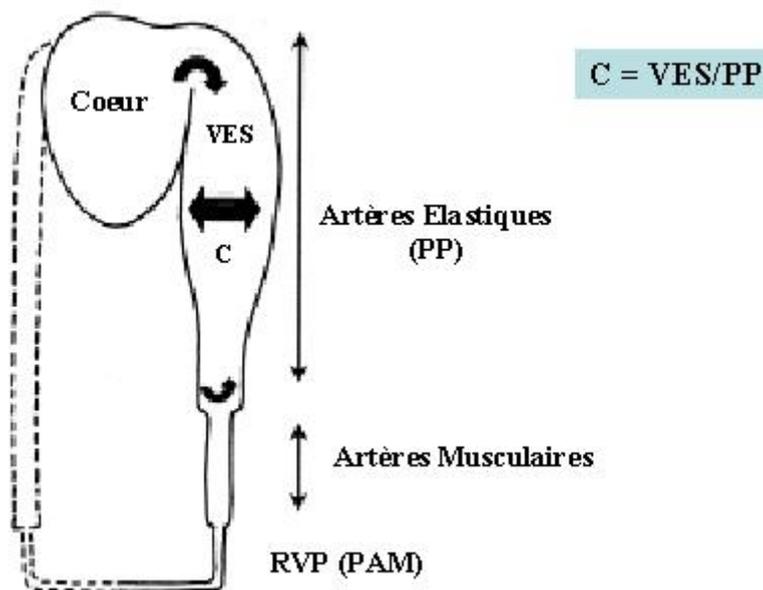
\*  $p < 0,01$ , KO L-NA / KO NaCl



**Figure 44** : Régulation de la pression pulsée après injection de L-NA (80 mg/kg, ip) chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>

## Modification de la compliance aortique chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B

Il a été décrit que la pression pulsée est le résultat d'une interaction entre le volume d'éjection systolique (VES) et les caractéristiques artérielles (notamment l'aorte) qui déterminent la compliance vasculaire (C) (Dart and Kingwell, 2001) (**Figure 45**). Nous avons montré que la pression pulsée est spécifiquement augmentée chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B après l'injection en *bolus* de *N*<sup>0</sup>-nitro-L-arginine, alors que la pression artérielle moyenne (PAM) n'est pas significativement modifiée. Puisque la compliance peut être évaluée par le rapport : volume d'éjection systolique / pression pulsée, nous avons mesuré par échocardiographie ce volume d'éjection systolique, juste après une injection en *bolus* de L-NA (80 mg/kg, ip), chez les femelles KO et WT pour le récepteur 5-HT2B.



**Figure 45 :** Représentation schématique du système cardiovasculaire et des facteurs influençant la Pression Pulsée (PP)

D'après (Dart and Kingwell, 2001)

(VES : Volume d'Ejection Systolique ; PP : Pression Pulsée ; C : compliance ; RVP : Résistances Vasculaires Périphériques ; PAM : Pression Artérielle Moyenne)

Les paramètres échocardiographiques ont été mesurés chez des femelles éveillées puisque l'injection en *bolus* de L-NA induit une chute des valeurs de fréquence cardiaque de 530 bpm à environ 330 bpm (battements par minutes). Il n'est donc pas nécessaire d'anesthésier les souris pour baisser leur fréquence cardiaque et cette anesthésie pourrait être fatale pour la survie des souris.

Il n'existe aucune différence significative (ANOVA,  $p > 0,05$ ,  $n = 7$ ) concernant les paramètres échocardiographiques, et notamment le volume d'éjection systolique, entre les femelles KO et WT pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> après injection de L-NA (**Tableau V**).

**Tableau V : Paramètres échocardiographiques après une injection aiguë de L-NA (80 mg/kg, ip) chez les femelles éveillées, WT et KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>**

	WT	KO	p
Fréquence cardiaque (bpm)	337 ± 24	321 ± 22	NS
Fraction de raccourcissement (%)	41 ± 2	40 ± 2	NS
Fraction d'éjection (%)	77 ± 3	76 ± 3	NS
Diamètre de l'aorte (cm)	0,122 ± 0,002	0,126 ± 0,002	NS
Intégrale temps vitesse (cm)	8,91 ± 0,64	9,24 ± 0,50	NS
Volume d'éjection systolique (ml)	<b>0,103 ± 0,008</b>	<b>0,115 ± 0,003</b>	<b>NS</b>
Débit cardiaque (ml/min)	38,7 ± 3,8	37,3 ± 1,7	NS

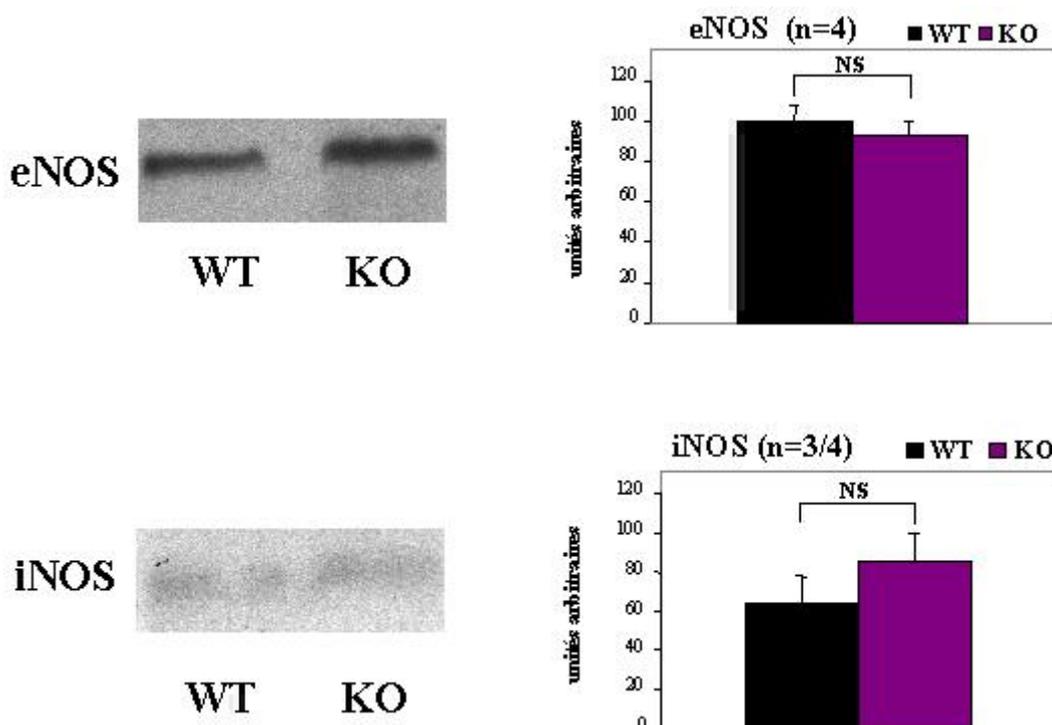
En résumé, l'injection de L-NA ne modifie pas le volume d'éjection systolique mais augmente la pression pulsée chez les femelles KO. Donc d'après la formule :  $\text{Compliance} = \frac{\text{VES}}{\text{PP}}$ , la compliance artérielle des femelles KO est réduite par rapport à celle des femelles WT, en réponse à un traitement aigu par un inhibiteur de la synthèse de NO.

## Expression et activité basales des NOS chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B

Afin de comprendre pourquoi la pression pulsée et la compliance aortique sont modifiées chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B par rapport aux femelles WT en réponse à une inhibition aiguë de la synthèse de NO par les NOSs, nous avons mesuré l'expression de la NOS endothéliale et de la NOS inductible, dans l'aorte, par Western Blot.

Après avoir normalisé les niveaux d'expression des NOSs par rapport à ceux d'une protéine de structure, la vimentine, non spécifique d'un sous-type cellulaire, nous n'avons observé aucune différence significative ( $p < 0,05$ ,  $n = 3-4$ , ANOVA) de niveau d'expression de la NOS endothéliale ou de la NOS inductible entre les aortes des femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B (**Figure 46**). De façon remarquable, le niveau d'expression de la iNOS est très faible comparé à celui de la eNOS.

Ainsi, la délétion du récepteur 5-HT2B ne modifie pas les niveaux d'expression des NOSs endothéliales et inductibles dans l'aorte des souris femelles.



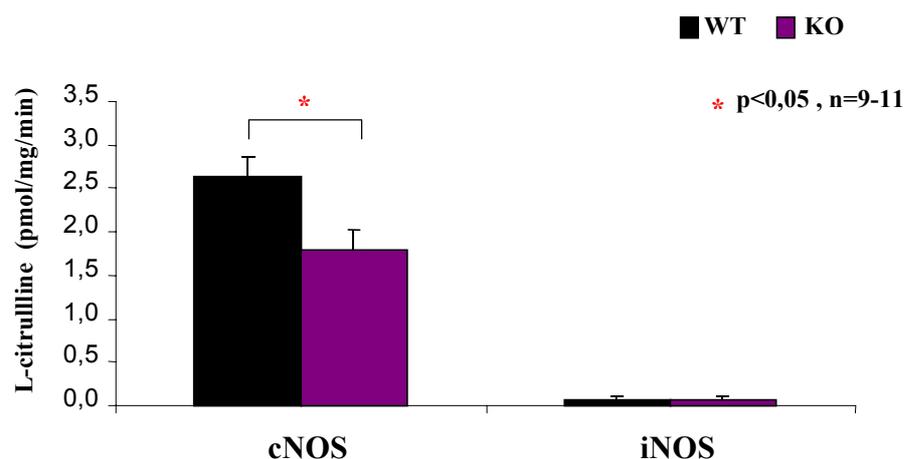
**Figure 46 :** Analyse par Western blot de l'expression basale de la NOS endothéliale (eNOS) et de la NOS inductible (iNOS) dans l'aorte de femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B

(Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport à l'expression de la vimentine)

Nous avons ensuite mesuré l'activité de base des NOSs constitutives (endothéliales et neuronales, calcium-dépendantes) et de la NOS inductible (calcium-indépendante) par le dosage de la citrulline radioactive formée à partir d'arginine radioactive, le substrat des NOSs.

L'activité basale des NOSs inductibles se situe en dessous du seuil de détection de la méthode de dosage utilisée, aussi bien pour les aortes de femelles WT que celles de femelles KO (**Figure 47**). On peut donc conclure que les NOSs inductibles ne sont pas activées dans les conditions basales, ni chez les femelles WT, ni chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B.

En revanche, l'activité basale des NOSs calcium-dépendante est significativement réduite ( $p < 0,05$ ,  $n = 9-11$ ) chez les femelles KO, de l'ordre de 30 % par rapport à l'activité basale chez les femelles WT (**Figure 47**). On peut donc conclure que la délétion du récepteur 5-HT2B chez les souris femelles, induit une réduction de l'activité basale des NOSs constitutives dans l'aorte sans affecter celle des NOSs inductibles.



**Figure 47** : **Activité basale des NOSs constitutives (cNOS) et inductible (iNOS) dans l'aorte des femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, mesurée par la conversion de l'arginine en citrulline**

## Conclusion

Nous avons montré dans cette troisième partie que la pression pulsée est spécifiquement modifiée chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> par rapport aux femelles WT dans la cas d'un traitement aigu par un inhibiteur de la synthèse du NO, alors qu'il n'est pas affecté par un autre agent vasoconstricteur tel que la phényléphrine.

En absence de défaut au niveau du volume d'éjection systolique, l'effet de l'inhibiteur de la synthèse de NO, associé à la délétion du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, produit donc un défaut de compliance aortique chez des souris femelles.

Ce phénotype est associé à une réduction de 30% de l'activité basale dans l'aorte des NOS calcium-dépendantes mais sans modification de l'expression de la NOS endothéliale.

# Discussion

## **Première partie**

### **Influence du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> sur les effets cardiovasculaires induits par l'ovariectomie**

L'ovariectomie réalisée sur des souris femelle âgées de 4 semaines, c'est-à-dire au moment de la puberté, bloque l'augmentation de la synthèse des hormones ovariennes. Au cours de nos différentes études, nous avons mis en évidence les conséquences de l'ovariectomie sur les fonctions cardiovasculaires des femelles sauvages (WT) ou mutantes invalidées pour le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2B</sub>.

Nous avons pu discerner d'une part, les effets de l'ovariectomie sur le développement des fonctions cardiovasculaires entre la puberté et l'âge adulte, dans les conditions physiologiques et d'autre part les effets de l'ovariectomie dans un modèle d'hypertension induite par inhibition chronique de la synthèse de monoxyde d'azote, un vasodilatateur endogène.

## 1. Effets de l'ovariectomie sur le développement des fonctions cardiovasculaires adultes

### Effet de l'ovariectomie sur le cœur

Le calcul à partir des mesures échocardiographiques de la masse ventriculaire gauche (MVG), 2 semaines après l'ablation chirurgicale des ovaires a permis de mettre en évidence une augmentation de ce paramètre chez les femelles ovariectomisées, quelque soit leur génotype, par rapport aux femelles sham. Cette mesure, répétée deux semaines plus tard sur les mêmes groupes, a démontré la disparition de cette différence chez les femelles WT, alors que cette différence persiste chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> jusqu'à 9 semaines après l'ovariectomie (soit 5 semaines plus tard que pour les femelles WT). De façon intéressante, la MVG des souris ovariectomisées n'évolue quasiment plus au cours du temps à cette période, mais à l'inverse, la MVG des femelles non ovariectomisées (sham) continue d'augmenter progressivement pour atteindre le même niveau que celui des femelles ovariectomisées. Il semble donc que le cœur des femelles ovariectomisées atteigne sa taille adulte de façon précoce, à 6 semaines, tandis que le cœur des femelles non ovariectomisées (sham) n'atteint cette taille adulte qu'à l'âge de 13 semaines.

Il a été décrit que les cardiomyocytes des souris se divisent activement pendant les 4 premiers jours de vie post-natale sans modifier leur taille et que par la suite l'élévation de la masse cardiaque n'est induite que par l'augmentation de la taille des cardiomyocytes post-mitotiques jusqu'à l'arrêt de cette croissance à l'âge de 3 mois (12 semaines) (Leu et al., 2001; Wiesmann et al., 2000). Cette phase de croissance est appelée hypertrophie développementale. Elle est particulièrement rapide avant la puberté (jusqu'à 2 semaines) et puis se trouve ralentie par le début de la synthèse des hormones sexuelles (puberté).

L'hypertrophie développementale est, entre autres, régulée par la voie Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI3K) et par la phosphorylation de Akt (Shioi et al., 2000; Shioi et al., 2002; Shiojima et al., 2002). Par ailleurs, chez l'homme, les modifications de la taille du cœur après la puberté ne sont pas égales quelque soit le genre. En effet la masse ventriculaire gauche augmente de façon similaire chez les filles et les garçons avant l'âge de 12 ans, mais la puberté marque le début d'une augmentation plus importante chez les hommes par rapport aux femmes de la masse du ventricule gauche (de Simone et al., 1995). Chez les souris double *knock-out* pour les récepteurs adrénergiques  $\alpha_{1A/C}$  et  $\alpha_{1B}$ , la taille des cardiomyocytes est

réduite chez les mâles âgés de 12 semaines et n'est pas différente de la taille des cardiomyocytes des femelles du même génotype (O'Connell et al., 2003). Cette double mutation a supprimé la différence mâle/femelles qui existe chez les souris sauvages concernant la taille des cardiomyocytes. De façon remarquable, l'ovariectomie de ces femelles double KO n'a pas induit de réduction de la taille des cardiomyocytes et les hormones ovariennes ne semblent donc être des facteurs de protection concernant le retard de croissance des cardiomyocytes.

La régulation de la taille du cœur par les hormones sexuelles n'est pas encore totalement éclaircie à ce jour. De nombreuses études ont démontré des différences de genre concernant des modèles animaux de pathologie cardiovasculaire (Kadokami et al., 2000; Oliver et al., 1997; Xin et al., 2002), pour revue (Leinwand, 2003). Dans la plupart des cas, il s'agit de cardiomyopathie hypertrophique pour laquelle l'ovariectomie s'est révélée être un facteur aggravant tandis que le traitement par les oestrogènes est un facteur protecteur. Par exemple, les oestrogènes permettent de limiter l'hypertrophie cardiaque induite par coarctation aortique chez des souris ovariectomisées (van Eickels et al., 2001). Les récepteurs aux oestrogènes sont exprimés dans les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques (Grohe et al., 1997; Nuedling et al., 1999) et pourraient donc inhiber l'hypertrophie cardiaque pathologique. Mais le rôle des oestrogènes dans l'hypertrophie physiologique n'a pas été décrit.

Dans notre étude, nous avons démontré que le retrait des hormones ovariennes induit une accélération de la croissance cardiaque. Ces hormones sont donc également des facteurs anti-hypertrophiques dans les conditions physiologiques. La mutation du récepteur 5-HT2B induit un ralentissement transitoire de la croissance du cœur des femelles KO, qu'elles soient ovariectomisées ou non. Cet effet est par conséquent indépendant des hormones ovariennes qui ne sont donc pas des facteurs cardioprotecteurs vis-à-vis du phénotype induit par la délétion du récepteur 5-HT2B chez la souris.

Une étude récente a montré que les souris mâles mutantes pour la guanylate cyclase A présentent une cardiopathie hypertrophique plus sévère par rapport aux femelles. La testostérone, principale hormone mâle, est à l'origine de cette différence (Li et al., 2004). Le même type d'observation a été faite chez les souris transgéniques sur-exprimant les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans le cœur et souffrant également d'une cardiopathie hypertrophique (Gao et al., 2003). Les récepteurs aux androgènes sont exprimés dans les cardiomyocytes de rongeurs et leur stimulation par la testostérone induit une hypertrophie et la synthèse d'ANP (Marsh et al., 1998). Bien que l'activation par les androgènes de la voie hypertrophique Akt n'aie pas été démontrée dans le cœur, elle a été décrite récemment dans les ostéoblastes (Kang et al., 2004). De plus les oestrogènes et la testostérone ont des effets opposés sur le remodelage et la fonction cardiaque chez la souris après un infarctus du myocarde (Cavasin et al., 2003). On peut donc supposer que la différence naturelle concernant la taille des cardiomyocytes pourrait avoir pour origine la stimulation de l'hypertrophie par les androgènes chez les mâles, tandis que les oestrogènes seraient plutôt des inhibiteurs de cette hypertrophie développementale après la puberté.

L'ovariectomie n'induit pas de différence majeure entre les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B. De plus elle n'aggrave pas le phénotype des femelles KO de façon similaire à celui des mâles KO. Les hormones ovariennes ne semblent donc pas à l'origine de la différence mâle / femelle concernant le rapport du poids du cœur / le poids du corps chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B.

On sait par ailleurs que la taille des cardiomyocytes est réduite à la naissance chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B (Nebigil et al., 2001b). On peut donc proposer que la réduction de taille est peu à peu compensée chez les femelles KO jusqu'à atteindre un niveau comparable à celui des femelles WT et à l'inverse la compensation par hypertrophie développementale serait incomplète chez les mâles KO. Une des principales voies de signalisation induite au cours de l'hypertrophie développementale est la voie PI3K/Akt, et il a été démontré que le récepteur 5-HT2B active cette même voie dans les cardiomyocytes afin de limiter leur apoptose (Nebigil et al., 2003a). On peut donc proposer qu'un retard de croissance serait associé au poids de cœur réduit des souris KO pour le récepteur 5-HT2B par défaut d'activation de la voie de signalisation hypertrophique Akt. Il n'y a pas de différence évidente entre les mâles et les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B à l'âge de 2 semaines, soit après la première phase d'hypertrophie développementale, malgré la désorganisation des myofibrilles dans les deux cas (**figure 34**). On peut supposer que cette différence apparaît plus tardivement, et qu'elle est la conséquence d'une anomalie de cette hypertrophie développementale. En effet la différence mâle/femelle apparaît la plus importante à l'âge de 12 semaines, soit la fin de cette phase d'hypertrophie. De plus il a été observé (mais non publié) que les anomalies fonctionnelles et anatomiques observées chez les mâles KO pour le récepteur 5-HT2B, disparaissent au cours du vieillissement.

Cependant, différents arguments nous laissent supposer que le retard de croissance des cardiomyocytes n'est sans doute pas la cause principale de la différence de genre concernant le phénotype de cardiomyopathie dilatée. D'une part ce retard de croissance chez les femelles KO ne s'accompagne d'aucune modification de la fraction d'éjection qui est un des paramètres diagnostics majeurs de la cardiomyopathie dilatée. D'autre part, un défaut d'hypertrophie développementale n'est pas associé à la cardiomyopathie dilatée observée dans d'autres modèles animaux. En effet, l'étude de la taille des cardiomyocytes entre la naissance et l'âge adulte chez des souris *knock-out* pour la protéine MLP (*muscle LIM protein*) a mis en évidence l'absence de modifications des dimensions des cardiomyocytes mais une hétérogénéité dans leur taille ainsi qu'une forme irrégulière par rapport aux cardiomyocytes des souris sauvages. Ces souris développent à l'âge adulte une cardiomyopathie dilatée dont la cause a été reliée à la désorganisation des myofibrilles et à l'apparition d'espaces entre les cardiomyocytes (Leu et al., 2001). Un phénotype similaire a été décrit dans le cas des souriceaux nouveaux-nés *knock-out* pour le récepteur 5-HT2B, présentant des anomalies au niveau des jonctions intercellulaires et une diminution de l'expression des cadhérines nécessaires à l'établissement de ces jonctions.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la cardiomyopathie dilatée observée chez les mâles KO pour le récepteur 5-HT2B est causée par une anomalie de la croissance physiologique des cardiomyocytes pendant la vie postnatale, associée à la désorganisation des myofibrilles cardiaques. La différence de genre n'étant pas annulée par l'ovariectomie, on peut supposer qu'elle est induite par la testostérone. En effet, le retrait des hormones ovariennes n'induit pas d'aggravation du phénotype des femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, mais au contraire accélère l'hypertrophie développementale qui est normalement ralentie par la puberté et également par la mutation du récepteur 5-HT2B.

Sur la base de nos observations et des données de la littérature, nous proposons un modèle de l'évolution de la masse cardiaque chez les souris au cours de leur croissance (**Figure 48**).

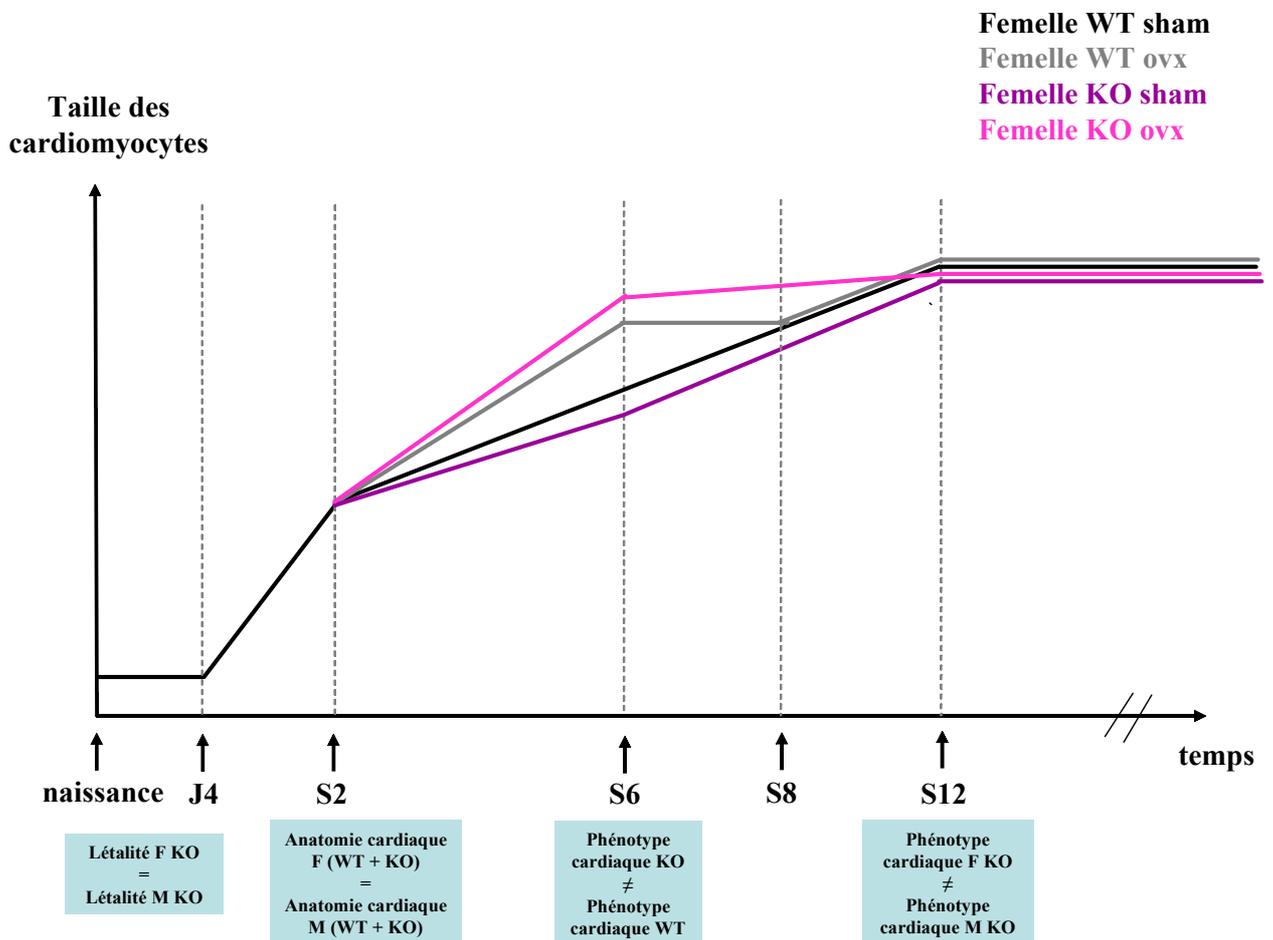
**Entre la naissance et le 4<sup>ème</sup> jour de vie postnatale**, il n'y a pas d'augmentation de la taille des cardiomyocytes mais un taux important de prolifération des cardiomyocytes. C'est à cette période que les souris KO pour le récepteur 5-HT2B présentent leur deuxième phase de létalité. La première phase de létalité embryonnaire est causée par une anomalie de la prolifération des futurs cardiomyocytes et cette anomalie a été reliée à une diminution de l'expression du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB2. On peut supposer que la seconde phase de létalité, pendant la première semaine de vie, est également provoquée par une insuffisance de prolifération. En effet, il a été publié que les cœurs de souris KO nouvelles présentent un défaut de prolifération (Nebigil et al., 2000a) et que les cardiomyocytes isolés à partir de ces cœurs présentent également un défaut de prolifération en réponse à la sérotonine ou à la neuréguline, le ligand naturel du récepteur ErbB2. Nous avons évalué le *sex ratio* des animaux survivants et nous n'avons observé aucune différence dans le nombre de femelles survivantes par rapport au nombre de mâles survivants. La différence entre les mâles et les femelles concernant le phénotype cardiaque des souris KO pour le récepteur 5-HT2B n'apparaît donc pas pendant cette période d'intense prolifération cellulaire périnatale.

**Entre le 4<sup>ème</sup> jour et la 2<sup>ème</sup> semaine**, la taille des cardiomyocytes, devenus majoritairement post-mitotiques, augmente de façon importante par hypertrophie physiologique chez les souris sauvages. L'analyse histologique des cœur de souris WT et KO pour le récepteur 5-HT2B n'a pas mis en évidence de différence en fonction du genre concernant la morphologie du cœur et notamment nous n'avons pas observé la dilatation du ventricule gauche chez la mâles KO caractéristique de leur phénotype à l'âge adulte (12 à 19 semaines) (Nebigil et al., 2001b). En conclusion la différence de genre apparaît plus tard au cours du développement postnatal.

**Entre la 2<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine**, la vitesse de croissance des cardiomyocytes diminue chez les souris sauvages. A l'âge de 6 semaines, le phénotype des souris KO pour le récepteur 5-HT2B se caractérise par une diminution du rapport poids de cœur/poids de corps aussi bien chez les mâles que chez les femelles. A ce stade, les hormones sexuelles sont présentes depuis 3 semaines environ. Nos travaux ont mis en évidence un effet hypertrophique de l'ovariectomie puisqu'à l'âge de 6 semaines le cœur des femelles WT ou KO a déjà quasiment atteint sa taille adulte. Etant donné l'effet anti-hypertrophique des oestrogènes, on peut émettre l'hypothèse que l'absence des hormones ovariennes stimule d'autant plus les voies hypertrophiques qui sont activées pendant la phase post-pubère chez les femelles. A cet âge il n'existe aucune différence de réponse entre les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B.

**Entre la 6<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine**, la masse cardiaque des femelles WT a augmenté et n'est plus différente de celle des femelles WT ovariectomisées. Mais à l'inverse, les femelles KO ovariectomisées possèdent encore un cœur plus gros que celui de leurs homologues sham. C'est à cette période que se situe l'unique différence entre les femelles KO et WT concernant l'effet de l'ovariectomie.

**Entre la 8<sup>ème</sup> et la 13<sup>ème</sup> semaine**, les effets de l'ovariectomie ne sont plus visibles ni chez les femelles WT ni chez les femelles KO qui ont totalement compensé la différence de masse ventriculaire gauche. L'ovariectomie ne modifie la masse cardiaque que de façon temporaire chez les femelles WT (4 semaines) et les femelles KO présentent un délai de compensation puisque cette période temporaire atteint au moins 9 semaines en absence de récepteur 5-HT2B. Il nous manque des données sur des périodes intermédiaires entre 8 et 13 semaines pour définir exactement le moment où les femelles KO sham sont capables de compenser totalement la différence avec les femelles KO ovariectomisées.



**Figure 48 :** Représentation schématique de l'évolution de la taille des cardiomyocytes et de l'influence de l'ovariectomie chez les souris femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B

(Sur fond bleu sont mentionnés les informations concernant les différences de genre vis-à-vis du phénotype cardiaque induit par la délétion du récepteur 5-HT2B ; J : jour ; S : semaine ; M : mâle ; F : femelle)

A l'âge de 12 semaines, les femelles KO ne présentent pas d'anomalie histopathologique majeure ni d'altération de la fonction cardiaque alors que les mâles KO présentent une cardiomyopathie dilatée. La différence en fonction du genre apparaît donc chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B entre la 6<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine. Mais l'ovariectomie n'ayant jamais induit de phénotype aussi délétère que celui des mâles, à savoir une réduction de la fraction d'éjection, nous pouvons affirmer que les hormones ovariennes ne sont pas responsables du phénotype mineur des femelles KO pour le récepteur 5-HT2B par rapport aux mâles KO. Etant donné les effets des androgènes sur la croissance des cardiomyocytes, il serait intéressant de procéder à la castration des mâles KO pour le récepteur 5-HT2B afin de contrôler si le retrait de la testostérone induit une amélioration du phénotype cardiaque des mâles.

De façon similaire, les mâles double KO pour les récepteurs adrénergiques  $\alpha_{1A/C}$  et  $\alpha_{1B}$  présentent une réduction de la masse cardiaque alors que les femelles double KO ne sont pas différentes des femelles WT (O'Connell et al., 2003). De façon remarquable les récepteurs adrénergiques  $\alpha_{1A/C}$  et  $\alpha_{1B}$  sont des récepteurs couplés à la protéine Gq de même que le récepteur 5-HT2B. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cette voie de signalisation est associée à la différence de genre au cours de l'hypertrophie développementale mais qu'elle n'est pas sous le contrôle des hormones ovariennes.

### **Effet de l'ovariectomie sur la pression artérielle**

De façon remarquable, nous n'avons observé aucune modification de la fraction d'éjection chez les femelles KO et WT, quelque soit la période observée au cours de notre étude. Les modifications morphologiques ne remettent donc pas en cause la contractilité cardiaque et la perfusion des organes. Cependant, l'augmentation de la taille du cœur chez les femelles ovariectomisées s'accompagne d'une diminution de la pression artérielle. Mais de façon tout à fait similaire, les différences de pression artérielle induites par l'ovariectomie disparaissent lorsque les souris atteignent l'âge adulte, avec cependant, un délai de compensation dans le cas des femelles KO pour le récepteur 5-HT2B. Les modifications de PAS provoquées par l'ovariectomie disparaissent donc au cours du temps, plus rapidement chez les femelles WT que chez les femelles KO, de même que pour les différences échocardiographiques. Cependant les différences cardiaques sont compensées plus précocement que les différences de pression artérielle, suggérant ainsi que les deux phénomènes ne sont pas complètement dépendants l'un de l'autre.

De même que la masse cardiaque, la pression artérielle évolue au cours de la vie post-natale. Il n'existe que peu de données concernant les modifications de pression artérielle chez la souris au cours de cette période. Cependant il a été décrit que la pression artérielle chez le rat augmente progressivement à partir de la naissance pour atteindre sa valeur adulte à 9 semaines (Hew and Keller, 2003). De façon intéressante, cette période correspond au moment où les différences de pression artérielle entre les femelles WT sham et ovariectomisées disparaissent. L'abaissement de la pression artérielle suite à l'ovariectomie est particulièrement surprenant si on considère que l'ovariectomie entraîne la diminution de la concentration en oestrogènes possédant un pouvoir vasodilatateur par activation des *Nitric Oxide Synthases* (Chambliss et al., 2000; Chen et al., 1999).

On peut émettre l'hypothèse que la diminution de la pression artérielle systolique est une compensation de l'hypertrophie développementale accélérée chez les femelles ovariectomisées. Cependant l'absence de données dans la littérature concernant les effets de l'ovariectomie sur la régulation de la pression artérielle au cours de la croissance des souris, ne nous permet pas de conclure sur cette potentielle compensation. Le retard de compensation dans le cas des femelles KO confirme par ailleurs l'induction d'anomalies cardiovasculaires mineures mais surmontables lorsque le récepteur 5-HT2B est absent.

Un point important de cette étude est la mise en évidence d'une augmentation significative de la pression artérielle systolique chez les femelles KO, indépendamment du statut hormonal, par rapport aux femelles WT à l'âge de 12 semaines. Rappelons qu'à cet âge toutes les différences induites par l'ovariectomie ont disparu, le cœur des souris a atteint sa taille adulte et les femelles KO ne présentent pas de différences majeures par rapport aux femelles WT concernant la fonction et la structure cardiaque. La petite hypertension observée chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B est donc, à priori, indépendante de la fonction cardiaque et des hormones ovariennes. Ainsi la délétion du récepteur 5-HT2B chez la souris induit une élévation de la pression artérielle, suggérant que ce récepteur est impliqué dans le maintien d'une pression artérielle de base normale chez les jeunes femelles adultes. Cependant la petite hypertension disparaît au cours du temps laissant supposer la mise en place de nouveaux mécanismes compensatoires chez les femelles adultes.

En conclusion, l'ovariectomie, et donc le retrait des hormones ovariennes, n'aggrave pas le phénotype cardiovasculaire des femelles KO pour le récepteur 5-HT2B mais induit des modifications hémodynamiques et un remodelage cardiaque chez toutes les femelles, quelque soit leur génotype. Ces modifications sont transitoires et l'absence de récepteur 5-HT2B n'induit qu'un retard de compensation de ces modifications. Ainsi, bien que le récepteur 5-HT2B semble participer à la régulation de la pression artérielle systolique de base chez les jeunes femelles, il n'est pas indispensable à cette régulation chez l'adulte.

## 2. Effets de l'ovariectomie sur l'hypertension induite par inhibition chronique des NOSs

De nombreuses études ont décrit une plus faible sensibilité des femelles vis-à-vis du développement de l'hypertension artérielle par rapport aux mâles (Ouchi et al., 1987). D'autres études ont montré l'aggravation de cette hypertension en cas d'ovariectomie (David et al., 2001; Mercier et al., 2002), ainsi que le rôle protecteur des oestrogènes permettant d'abaisser la pression artérielle (Chappell et al., 2003; Sharkey et al., 1999).

Cependant une étude récente a démontré des effets surprenants de l'ovariectomie chez les souris doubles *knock-out* pour la *Nitric Oxide Synthase* endothéliale (eNOS) et l'apolipoprotéine E (ApoE). En effet, l'ovariectomie permet d'abaisser la pression artérielle, sans la normaliser, chez les femelles doubles KO par rapport aux femelles KO ApoE et sauvage pour l'expression de la eNOS. De façon encore plus surprenante, une réduction équivalente de la pression artérielle a été observée après la castration des mâles. Enfin, à la fois chez les mâles et les femelles double KO eNOS/ApoE, le traitement par les oestrogènes permet de normaliser la pression artérielle (Hodgin et al., 2002). Les informations majeures de cette étude sont, d'une part l'effet protecteur de la gonadectomie dans l'hypertension induite par

inhibition génétique des eNOS sans influence du genre, et d'autre part, le pouvoir protecteur des oestrogènes dans l'hypertension artérielle en absence des eNOSs (KO). La délétion du gène de l'ApoE ne modifie pas la pression artérielle, bien qu'elle induise une réduction de la compliance artérielle (Hartley et al., 2000). Donc seule la délétion de la eNOS est responsable de l'hypertension observée chez les doubles KO, de même que chez les simples KO eNOS (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996).

Ce travail peut être mis en parallèle avec notre étude puisque nous avons mis en évidence le pouvoir protecteur de l'ovariectomie sur l'hypertension artérielle induite par inhibition pharmacologique des NOSs. En effet, l'hypertension induite par la L-NA chez les femelles WT ovariectomisées est significativement plus faible pendant la phase II de l'hypertension par rapport aux femelles WT sham. Ce phénomène est spécifique de la phase II puisque lors de la phase I, la pression artérielle est similaire entre les femelles ovariectomisées ou non. Ainsi, la régulation de la pression artérielle au cours de l'inhibition chronique de la synthèse du NO, pendant la phase II, est modulée en cas d'ovariectomie de façon similaire à l'inhibition génétique des eNOSs. Nous avons utilisé la  $L^0$ -Nitro-Arginine qui ne permet pas d'inhiber de façon sélective une isoforme NOS par rapport aux autres, cependant cet agent possède un pouvoir inhibiteur plus puissant sur les NOS constitutives (neuronales et endothéliales) par rapport à la NOS inductible. Si on compare notre étude à celle des souris KO eNOS, on peut supposer que la deuxième phase de l'hypertension chez les femelles WT correspond à un blocage total de la synthèse de NO par les NOSs endothéliales. A l'opposé, la première phase de l'hypertension n'étant pas sensible à l'effet de l'ovariectomie, on peut émettre l'hypothèse que le blocage des eNOSs n'est pas total dans la phase I, malgré le traitement chronique par la L-NA.

Nous avons donc confirmé la protection par le retrait des hormones ovariennes vis-à-vis de l'hypertension induite par inhibition chronique des NOSs endothéliales.

Nous avons décrit, dans l'introduction, les effets vasculaires des NOSs, ainsi que l'activation génomique (activation de l'expression) et non génomique (stimulation de l'activité) des NOSs endothéliales par les œstrogènes. De façon remarquable, l'ovariectomie induit une anomalie de la synthèse basale de NO chez les rats SHR (Riveiro et al., 2001) et une diminution de l'expression de la NOS endothéliale (Widder et al., 2003). De plus la réponse contractile vis-à-vis d'un inhibiteur de la NOS endothéliale, la L-NA, est moins importante dans le cas des femelles SHR ovariectomisées par rapport aux femelles SHR sham.

Donc dans le modèle de rat SHR, l'ovariectomie aggrave l'hypertension artérielle en diminuant l'expression et l'activité des NOSs et un traitement par les oestrogènes permet de protéger les femelles ovariectomisées vis-à-vis de l'augmentation de la pression artérielle en restaurant l'activation des NOSs. Les oestrogènes maintiennent donc la synthèse de NO dans les artères (Huang et al., 1997). Ainsi dans le modèle d'hypertension chez les rats SHR, l'ovariectomie aggrave l'hypertension en inhibant la synthèse de NO par les NOSs endothéliales.

Cependant en absence de NOS endothéliales fonctionnelles (femelle KO eNOS), l'ovariectomie ne peut pas modifier l'expression ou l'activité des NOSs. Dans cette situation particulière, l'ovariectomie protège vis-à-vis de l'hypertension en agissant sur un mécanisme encore inconnu. Cependant, les données concernant la gonadectomie chez les souris double KO eNOS/ApoE, suggèrent que la protection n'est pas dépendante du genre des souris, ni des

oestrogènes. De façon intéressante, les estroènes sont capables de stimuler à la fois les récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes, indépendamment du genre et induisent certains effets non génomiques de ces récepteurs tels que l'inhibition de la perte osseuse induite par la gonadectomie (Kousteni et al., 2003; Moggs et al., 2003). C'est pourquoi ces estroènes sont renommés les ANGELS (*activators of nongenotropic estrogen-like signaling*). Cependant aucun effet vasculaire des ANGELS n'a été décrit jusqu'à ce jour. Etant donné nos résultats et ceux de Hodgin et coll. (Hodgin et al., 2002), il serait intéressant de tester les effets des ANGELS sur l'hypertension induite par inhibition chronique des NOSs afin de déterminer si ils peuvent réduire la pression artérielle. On peut supposer que l'ovariectomie provoque un déséquilibre hormonal permettant de révéler les effets d'hormones habituellement peu actives car trop peu synthétisées. Les ANGELS ou certains de leurs analogues peuvent être de bons candidats pour expliquer les effets protecteurs de l'ovariectomie en absence de NOSs endothéliales fonctionnelles.

Par ailleurs, la protection de l'ovariectomie vis-à-vis de l'hypertension induite par la L-NA, suggère qu'un mécanisme vasodilatateur ou inhibiteur de la vasoconstriction est activé en absence d'hormones ovariennes. De façon intéressante, une étude chez le rat a montré l'induction de la vasodilatation par l'EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*) chez les femelles ovariectomisées et traitées pendant 3 semaines par un inhibiteur des NOSs (L-NAME) (Xu et al., 2003). L'ovariectomie permet donc probablement de révéler l'activation de l'EDHF par un composé inconnu à ce jour. De plus, le pouvoir hypotenseur des oestrogènes en absence de NOS chez les femelles KO eNOS ovariectomisées peut s'expliquer par l'activation d'autres voies NO indépendantes, telles que l'EDHF comme précédemment, ou encore les dérivés de l'acide arachidonique, la diminution des radicaux oxygénés, la modulation des voies de l'angiotensine II ou de l'endothéline entre autres (Tostes et al., 2003). Le ou les composés, dont l'activité est révélée par l'ovariectomie, agissent donc probablement sur les mêmes voies que les oestrogènes.

Dans une étude plus récente (Sainz et al., 2004), l'ovariectomie n'a pas permis de protéger les femelles rats rendues hypertensives par un traitement au L-NAME (L-Nitro-Arginine-Methyl-Ester), un autre inhibiteur de la synthèse de NO. Ce résultat contradictoire ne dépend probablement pas de la durée de l'induction de l'hypertension puisque ces auteurs ont traité les rats au L-NAME pendant 5 semaines. Par contre, l'ovariectomie dans cette étude ne semble pas avoir été réalisée au moment de la puberté, mais juste avant l'induction de l'hypertension. On peut donc supposer que la durée de l'ovariectomie joue un rôle sur son potentiel hypotenseur ou bien que les rats se comportent différemment des souris vis-à-vis des effets de l'ovariectomie dans ce modèle d'hypertension.

En conclusion, les modifications hormonales induites par l'ovariectomie prolongée, permettent de réduire la pression artérielle dans un modèle d'hypertension par inhibition chronique de la synthèse de NO par les NOS endothéliales.

L'hypertension induite par inhibition chronique des NOSs chez les femelles *knock-out* pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> ne présente qu'une seule phase à l'inverse des femelles WT. De façon remarquable, l'effet protecteur de l'ovariectomie apparaît dès la 5<sup>ème</sup> semaine d'induction de l'hypertension chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Si on considère que l'ovariectomie ne produit un effet protecteur que lorsque les NOSs endothéliales ne sont plus fonctionnelles, on peut supposer que le blocage des NOSs survient de façon plus précoce en absence de récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Donc la phase unique d'hypertension des femelles KO s'apparente plus à la phase II d'hypertension des femelles WT qu'à la phase

I. Mais nous ne pouvons pas exclure qu'il ne s'agisse ni d'une phase I, ni d'une phase II, et que l'effet de l'ovariectomie n'apparaisse qu'au-delà d'une certaine valeur de pression artérielle puisque la pression artérielle systolique des femelles KO est plus élevée à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine que celle des femelles WT.

Le contrôle par échocardiographie de la fonction et de la structure cardiaque, en fin de traitement hypertenseur, n'a mis en évidence aucune différence significative induite par ce traitement ou par l'ovariectomie, chez les femelles ovariectomisées (WT et KO), à l'exception du diamètre de l'aorte. En effet, ce diamètre augmente suite au traitement par la L-NA chez les femelles WT non ovariectomisées (sham), mais n'augmente pas chez les femelles ovariectomisées. Les femelles WT sham sont celles qui développent la plus haute valeur de pression artérielle, on peut donc faire l'hypothèse que l'hypertension artérielle sévère induit des changements quant à la capacité de dilatation de l'aorte au moment de l'éjection systolique. A l'inverse des valeurs moins élevées de pression artérielle ne modifierait pas le diamètre de l'aorte.

Par ailleurs, nous avons remarqué que les paramètres contractiles tels que la fraction d'éjection et la fraction de raccourcissement augmentent chez les femelles ovariectomisées (WT et KO) mais de façon non significative par rapport aux femelles non ovariectomisées (sham). De plus ces paramètres augmentent chez les femelles sham (WT et KO) après le traitement hypertenseur jusqu'à atteindre le même niveau que chez les femelles ovariectomisées alors que celles-ci ne sont sujettes à aucune modification de leurs paramètres contractiles après le traitement hypertenseur. Le traitement inhibiteur de la synthèse de NO améliore donc en quelque sorte la contractilité chez les femelles non ovariectomisées, quelque soit leur génotype, de façon à atteindre un niveau comparable à celui de leurs homologues ovariectomisées. On peut imaginer que cette amélioration de la contractilité est une réponse compensatrice à l'augmentation de pression artérielle chez les femelles sham. Chez les femelles ovariectomisées normotendues (WON et KON) la contractilité est élevée, probablement pour répondre à l'augmentation du travail du cœur, en raison de l'augmentation de la masse corporelle induite par l'ovariectomie. L'absence d'augmentation supplémentaire dans le cas de l'induction de l'hypertension chez les femelles ovariectomisées (WOL et KOL) suggère que la capacité maximale de compensation est déjà atteinte.

En conclusion, l'effet de l'ovariectomie est le même chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, à savoir une réduction de la pression artérielle, sans modification majeure de la fonction cardiaque, dans un modèle d'hypertension induite par inhibition chronique de la synthèse de NO. L'effet hypotenseur de l'ovariectomie ne semble donc pas sous le contrôle du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Par contre si on considère que l'effet de l'ovariectomie dépend de la présence des NOSs endothéliales fonctionnelles, la précocité des effets de l'ovariectomie chez les femelles KO suggère une régulation anormale des NOSs endothéliales en absence du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>.

### 3. Conclusion de la première partie

Au cours de notre étude nous avons démontré les **effets hypertrophiants et hypotenseurs transitoires de l'ovariectomie au cours du développement cardiaque entre la puberté et l'âge adulte**, chez les femelles sauvage et *knock-out* pour le récepteur 5-HT2B.

Le délai de compensation vis-à-vis des effets transitoires de l'ovariectomie chez les femelles KO confirme les **anomalies cardiovasculaires mineures chez les femelles en absence de récepteur 5-HT2B**.

Une dilatation cardiaque associée à une dysfonction systolique ne se produisant pas suite à l'ovariectomie chez les femelles KO, nous avons démontré **l'absence d'effet cardioprotecteur des hormones ovariennes par rapport au phénotype cardiaque moins sévère observé après la délétion du récepteur 5-HT2B chez les femelles KO par rapport aux mâles KO**.

Nous avons également déterminé l'absence de **différence mâle/femelle** avant la puberté chez les souris mutantes pour le récepteur 5-HT2, suggérant que cette différence **survient au cours de la phase d'hypertrophie cardiaque développementale** (entre la 2<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine).

**L'ovariectomie protège les femelles KO et WT vis-à-vis de l'hypertension induite par l'inhibition chronique des NOSs endothéliales indépendamment de la présence ou non du récepteur 5-HT2B.**

**Les effets cardiovasculaires de l'ovariectomie et des hormones ovariennes semblent indépendants des effets cardiovasculaires du récepteur de la sérotonine 5-HT2B chez les souris femelles.**

## **Deuxième partie**

### **Régulation de l'activité des NOSs endothéliales par le récepteur 5-HT2B**

**Conséquences sur le développement de l'hypertension  
artérielle induite par inhibition chronique des NOSs et  
sur la régulation de la compliance artérielle**

## 1. Rôle du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> dans l'hypertension artérielle induite par inhibition chronique de la synthèse de NO

L'hypertension artérielle, induite par inhibition chronique des NOSs, en pratiquant des injections quotidiennes de L-NA, chez des femelles WT (129pas) a permis de décrire pour la première fois le caractère biphasique de ce modèle chez la souris. La plupart des études mentionnées dans la littérature ont été réalisées chez le rat, ce dernier étant plus fortement sensible à l'augmentation de la pression artérielle. En effet, l'hypertension induite par inhibition des NOSs survient en général après seulement 1 à 2 semaines de traitement inhibiteur chez le rat (Ito et al., 1995; Russell et al., 2002; Takahashi et al., 1995). Dans le cas de la souris (fond génétique 129pas), il nous a fallu traiter les souris pendant 18 semaines pour obtenir le développement d'une hypertension artérielle systémique. De plus les valeurs de pression artérielle en cas d'hypertension ne sont pas comparables entre ces deux espèces. En effet la pression artérielle peut atteindre des valeurs proches de 200 mmHg soit 60% d'augmentation chez le rat alors que notre étude chez la souris a permis d'atteindre un maximum de 25% d'augmentation de la pression artérielle par rapport aux contrôles normotendus. Cependant cette augmentation est tout à fait compatible avec celle observée dans le cas des souris KO pour la NOS endothéliale développant une hypertension artérielle (20 à 30 % d'augmentation de la pression artérielle par rapport au contrôle sauvage) (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996). Quelques études ont été réalisées chez la souris, mais aucune n'a décrit le développement de l'hypertension en deux phases. Il faut préciser que ces travaux ont été effectués chez des souris de fond génétique différent (Swiss Webster) et à l'aide d'un inhibiteur des NOS différent de celui que nous avons utilisé (L-Nitro Arginine Methyl Ester, L-NAME versus L-NA) (Mattson, 1998; Peotta et al., 2001). Ces deux composés ont une activité inhibitrice préférentielle pour les NOS constitutives (endothéliale et neuronale) par rapport à la NOS inductible (Moncada et al., 1997), mais il existe cependant un rapport d'affinité eNOS/iNOS différent pour la L-NA et le L-NAME, avec une sélectivité plus forte pour la L-NA vis-à-vis de la eNOS humaine (Boer et al., 2000). Malheureusement nous ne disposons pas d'information concernant cette sélectivité vis-à-vis des différentes isoformes des NOSs chez la souris.

Parmi les nombreuses études réalisées chez le rat, principalement à l'aide de L-NAME, la plupart a démontré le développement d'une légère hypertrophie cardiaque associée à un remodelage des vaisseaux coronaires (Sanada et al., 2001) ainsi que le développement d'une fibrose rénale (Tharoux et al., 1999). Il existe également une étude chez la souris traitée pendant 14 semaines par le L-NAME et présentant une altération de la fonction et de la structure rénale (Boffa et al., 1999). Cependant, le traitement chronique par la L-NA, pendant une durée plus longue (18 semaines), chez les femelles sauvages 129pas n'est associé à aucune modification structurale cardiaque, rénale ou vasculaire (aorte, vaisseaux coronaires, artérioles rénales, glomérules rénaux) (**Figure 38**).

En conclusion, nous avons décrit pour la première fois un modèle biphasique d'hypertension artérielle induite par inhibition chronique des NOSs par la L-NA chez la souris, mais ne présentant aucune anomalie de type remodelage vasculaire, cardiaque ou rénal malgré l'augmentation de 25 % de la pression artérielle.

De façon remarquable, les femelles invalidées pour le récepteur 5-HT2B développent une hypertension moins sévère que leurs homologues sauvages, ne comprenant qu'une seule phase au lieu de deux. La protection des femelles en absence de récepteur 5-HT2B fonctionnel vient confirmer les résultats obtenus chez le rat. En effet, le traitement par un inhibiteur sélectif du récepteur 5-HT2B (LY272015) permet de réduire de façon significative la pression artérielle dans un modèle d'hypertension induite la L-NA (Russell et al., 2002). Dans cette étude, les auteurs ont décrit une modification du profil pharmacologique des récepteurs de la sérotonine au niveau de l'aorte. En effet, le récepteur 5-HT2B n'induit pas la contraction vasculaire à l'état de base. Mais celui-ci pourrait acquérir cette propriété après le traitement par la L-NA car ce récepteur se trouve alors surexprimé dans le muscle lisse. Ainsi, chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, cette modification pharmacologique et de niveau d'expression ne pouvant pas avoir lieu, maintiendrait la pression artérielle à un niveau plus bas.

Cependant, l'analyse de l'expression des récepteurs de la sérotonine dans l'aorte des souris femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, réalisée en fin de traitement hypertenseur, a donné un résultat apparemment contradictoire par rapport aux travaux de Russel et coll. (Russell et al., 2002) chez le rat. En effet nous n'avons observé aucune modification du niveau d'expression des récepteurs 5-HT2B entre les aortes des femelles WT hypertendue par rapport aux femelles WT normotendues. Par contre, l'expression des récepteurs 5-HT2A et 5-HT1B/1D diminue de moitié après le traitement hypertenseur chez les femelles WT.

Lors de l'étude chez le rat, l'expression de ces deux autres sous-types de récepteurs n'a pas été évaluée, mais, d'après les auteurs, la contractilité de l'aorte dépendante du récepteur 5-HT2A est diminuée. Les changements pharmacologiques observés chez le rat seraient donc principalement provoqués par une augmentation de l'expression du récepteur 5-HT2B (et peut-être une diminution de l'expression du récepteur 5-HT2A qui reste à prouver). Dans notre étude, la réduction importante de l'expression des récepteurs 5-HT1B/1D et 5-HT2A, sans modification de l'expression du récepteur 5-HT2B pourrait expliquer la modification de la pharmacologie contractile de la sérotonine dans l'aorte, observée par Russell et coll.. En effet, les trois sous-types de récepteurs sont exprimés dans le muscle lisse vasculaire et ont la capacité d'induire une contraction (Russell et al., 2002; Ullmer et al., 1995).

Le récepteur 5-HT1B/1D, couplé à la protéine Gi, est un médiateur de la vasoconstriction au niveau des artères cérébrales et coronaires mais son rôle dans l'aorte reste incertain dans les conditions physiologiques (Watts and Cohen, 1999). Par contre ce récepteur a été impliqué dans la réponse contractile chez le rat hypertendu, suite à l'augmentation de son expression (modèle DOCA-salt) (Banes and Watts, 2001; Banes and Watts, 2003). Le récepteur 5-HT1B/1D est également exprimé dans l'endothélium et serait responsable d'une relaxation vasculaire par l'intermédiaire de la synthèse de NO (Bhattacharya et al., 2004; Ishida et al., 1998). Les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B sont couplés à la protéine Gq. Le récepteur 5-HT2A n'est à priori pas exprimé dans les cellules endothéliales à l'inverse du récepteur 5-HT2B qui induirait la libération de NO dans ces cellules (Ellis et al., 1995; Glusa and Pertz, 2000; Ishida et al., 1998). Cependant les deux récepteurs 5-HT2 sont exprimés dans les cellules musculaires lisses, bien que le récepteur 5-HT2A soit apparemment le seul responsable de la contraction sérotonine dépendante de l'aorte de souris dans les conditions physiologiques (McKune and Watts, 2001).

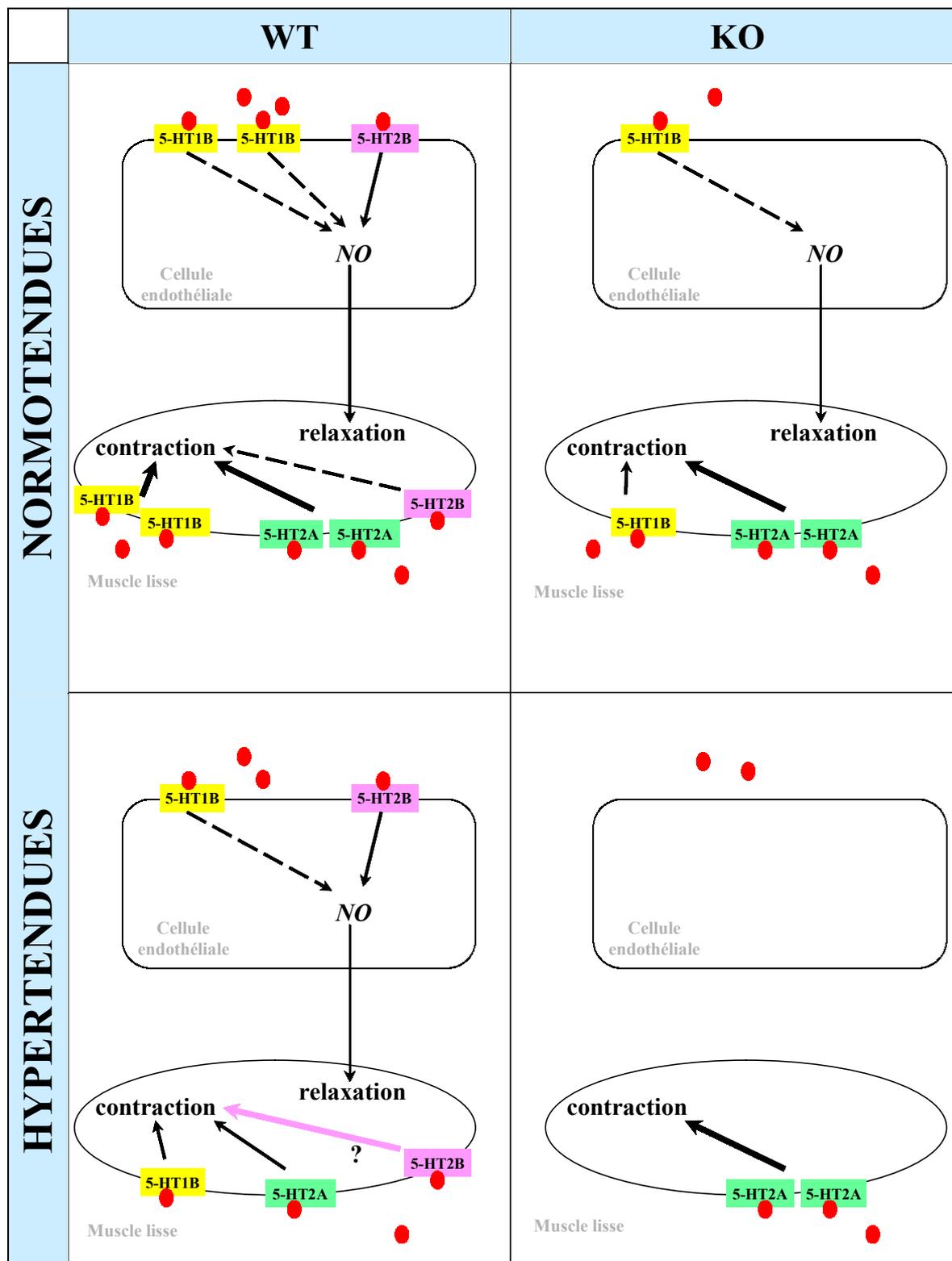
Le schéma de la **Figure 49** représente la répartition des récepteurs de la sérotonine dans l'endothélium et les cellules musculaires lisses d'après nos résultats d'expérience de liaisons. Chez les femelles WT normotendues, la sérotonine agit au niveau de l'endothélium sur les récepteurs 5-HT2B et peut-être 5-HT1B/1D pour induire la libération de NO et donc la relaxation. A l'inverse la liaison de la sérotonine sur ses récepteurs au niveau du muscle lisse (5-HT2A, 5-HT1B/1D et 5-HT2B) induit une vasoconstriction. De façon surprenante, chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, l'absence de ce récepteur ainsi que la diminution de moitié de l'expression du récepteur 5-HT1B/1D ne modifie pas la pression artérielle systolique de base. On peut donc en déduire que les récepteurs 5-HT2B et au moins une partie des récepteurs 5-HT1B/1D exprimés dans l'aorte ne sont pas nécessaires à la régulation de la pression artérielle.

On peut également supposer que la diminution de l'expression des récepteurs 5-HT1B/1D vient justement compenser l'absence du récepteur 5-HT2B afin de maintenir la pression artérielle à sa valeur normale. Mais de façon générale, l'aorte est un gros vaisseau de conductance et ne joue donc pas un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle moyenne à l'inverse des artères de résistances (Dart and Kingwell, 2001). L'expression du récepteur 5-HT2A est similaire entre les aortes des femelles KO et WT normotendues. Son expression importante confirme son rôle majeur dans la contractilité sérotonine dépendante de l'aorte de souris femelles 129pas, comme cela a été décrit précédemment (McKune and Watts, 2001).

Chez les femelles WT hypertendues par inhibition de la synthèse de NO, les expressions des récepteurs 5-HT1B/1D et 5-HT2A diminuent de moitié, impliquant une diminution de la contraction (et de la relaxation) induite par ces récepteurs. Puisque l'expression du récepteur 5-HT2B reste inchangée, la proportion de ce sous-type augmente par rapport aux autres sous-types. Les récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B sont couplés à la protéine Gq et il a été montré que lorsqu'ils sont exprimés conjointement dans un même sous-type cellulaire, il existe un couplage préférentiel du récepteur 5-HT2A pour la protéine Gq au détriment du récepteur 5-HT2B (Tournois et al., 1998). On peut donc proposer que le changement de proportion des récepteurs 5-HT2A et 5-HT2B, au niveau des cellules musculaires lisses, favorise un nouveau couplage de la protéine Gq avec le récepteur 5-HT2B. Connaissant la plus forte affinité de la sérotonine pour le récepteur 5-HT2B par rapport au récepteur 5-HT2A (Wainscott et al., 1993), on peut supposer une augmentation du seuil de sensibilité de la contraction induite par la sérotonine et une augmentation du niveau de cette contraction participant au maintien de l'hypertension.

En résumé, bien que nous n'ayons pas observé de modification de l'expression du récepteur 5-HT2B comme cela a été montré chez le rat dans un modèle équivalent d'hypertension, il est possible que la pharmacologie de l'aorte soit modifiée chez la souris de même que chez le rat. Cette hypothèse reste cependant à vérifier. Par ailleurs, il faut rappeler que la pharmacologie du récepteur 5-HT2B est différente chez le rat et la souris (Choi et al., 1996).

En conclusion l'hypertension artérielle induite par inhibition chronique de la synthèse de NO se développe selon deux phases successives chez les femelles WT et se caractérise par la modification du profil d'expression des récepteurs contractiles de la sérotonine dans la seconde phase.



**Figure 49 :** Représentation schématique des modifications du profil d'expression des récepteurs de la sérotonine 5-HT1B, 5-HT2B et 5-HT2A chez les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B hypertendues ou normotendues (induction de l'hypertension par la L-NA)

Chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, l'hypertension s'accompagne de la disparition quasiment totale des récepteurs 5-HT1B/1D dans l'aorte alors que le niveau d'expression du récepteur 5-HT2A reste inchangé par rapport aux femelles WT hypertendues.

Nous avons précédemment décrit la réduction de moitié de l'expression du récepteur 5-HT1B/1D suite à l'inhibition chronique de la synthèse de NO. De plus, nous avons montré que l'activité basale des NOS constitutives (principalement eNOS) est réduite de 30% dans les aortes des femelles KO normotendues. Ainsi lorsque l'activité de base de synthèse de NO est réduite, l'expression du récepteur 5-HT1B/1D diminue. Le cumul des effets de la délétion du récepteur 5-HT2B et du traitement par la L-NA provoque de façon synergique chez les femelles KO hypertendues la diminution du niveau d'expression des récepteurs 5-HT1B/1D. De plus, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre le niveau d'expression du récepteur 5-HT1B/1D et la pression artérielle systolique chez les femelles WT. A l'inverse, cette corrélation n'existe pas dans le cas des femelles KO. Il semble donc que le niveau d'expression du récepteur 5-HT1B/1D soit sous le contrôle du niveau de synthèse basale de NO, mais également de la pression artérielle lorsque le récepteur 5-HT2B est normalement exprimé.

Chez les femelles KO hypertendues, ni le récepteur 5-HT2B, ni le récepteur 5-HT1B/1D ne peuvent induire de contraction vasculaire. Seul le récepteur 5-HT2A, dont l'expression n'est pas modifiée par le traitement, peut jouer ce rôle. Ainsi l'absence de régulation négative du taux de récepteur 5-HT2A chez les femelles KO est peut-être un phénomène compensatoire permettant de maintenir un niveau contractile suffisant. Par ailleurs nous avons montré l'existence d'une corrélation négative entre l'expression du récepteur 5-HT2A et la pression artérielle chez les femelles WT et non pas chez les femelles KO. En résumé, le niveau d'expression du récepteur 5-HT2A dépend de la pression artérielle uniquement lorsque le récepteur 5-HT2B est co-exprimé et subit une régulation négative au cours de l'hypertension au profit probablement du récepteur 5-HT2B.

La modification du niveau d'expression d'un récepteur de la sérotonine (5-HT1B/1D) lorsque l'un d'eux est absent est une observation originale. En effet, chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B, l'expression des récepteurs 5-HT2A et 5-HT2C n'est pas modifiée dans le cœur et l'estomac (Nebigil et al., 2000a). Par ailleurs chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2A, l'expression du récepteur 5-HT2B reste inchangée dans l'intestin (Fiorica-Howells et al., 2002). Ces données étayent l'hypothèse selon laquelle la diminution du niveau d'expression du récepteur 5-HT1B/1D n'est pas directement lié à l'absence du récepteur 5-HT2B, mais à la diminution d'activité basale des NOS endothéliales induite par la délétion de ce récepteur.

La modification de l'expression des récepteurs de la sérotonine en situation pathologique a cependant été décrite. Ainsi, la surexpression du récepteur 5-HT2B a été associée au développement de l'hypertension artérielle systémique dans deux modèles différents chez le rat (modèle DOCA-salt et inhibition chronique des NOS (Banes and Watts, 2002; Russell et al., 2002). De même l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'hypoxie chronique s'accompagne d'un important remodelage vasculaire et de la surexpression des récepteurs 5-HT2B et 5-HT1B. Il semble par ailleurs évident que cette surexpression soit associée au remodelage vasculaire. Cependant dans notre étude, nous n'avons pas observé de modification structurale vasculaire. Il est fort possible que nous ayons stoppé l'induction de l'hypertension avant qu'un tel remodelage ne se produise et donc avant que l'expression du récepteur 5-HT2B ne soit modifiée. Il serait donc intéressant de

reproduire le traitement d'induction de l'hypertension chez les souris KO pour le récepteur 5-HT2B et de contrôler l'expression des récepteurs de la sérotonine à différents moments clé de l'évolution de l'hypertension afin de définir clairement les changements induit par l'inhibition de la synthèse de NO et l'absence du récepteur 5-HT2B. De plus il serait nécessaire de contrôler l'expression des récepteurs 5-HT4 et 5-HT7 qui sont également présents dans les vaisseaux sanguins (Ullmer et al., 1995).

Nous avons observé que le niveau d'expression du récepteur 5-HT1B/1D est régulé de façon similaire chez les femelles KO et les femelles WT, alors que seules les femelles WT présentent un niveau différent d'expression du récepteur 5-HT2A. Si on compare ces données au nombre de phases de l'hypertension, l'absence de régulation du récepteur 5-HT2A est peut-être associée à l'absence d'une des deux phases chez les femelles KO hypertendues. Par ailleurs la réduction de la pression artérielle chez les femelles WT ovariectomisées au cours de la seconde phase et chez les femelles KO suggère que l'unique plateau d'hypertension observé chez les femelles KO correspond à la seconde phase de l'hypertension des femelles WT. Ainsi, la phase manquante serait la phase I, probablement associé à la diminution d'expression du récepteurs 5-HT2A. On peut également supposer que cette phase I de stabilisation de la pression artérielle est une phase compensatoire indépendante des hormones ovariennes mais dont l'existence est absolument dépendante de la présence du récepteur 5-HT2B.

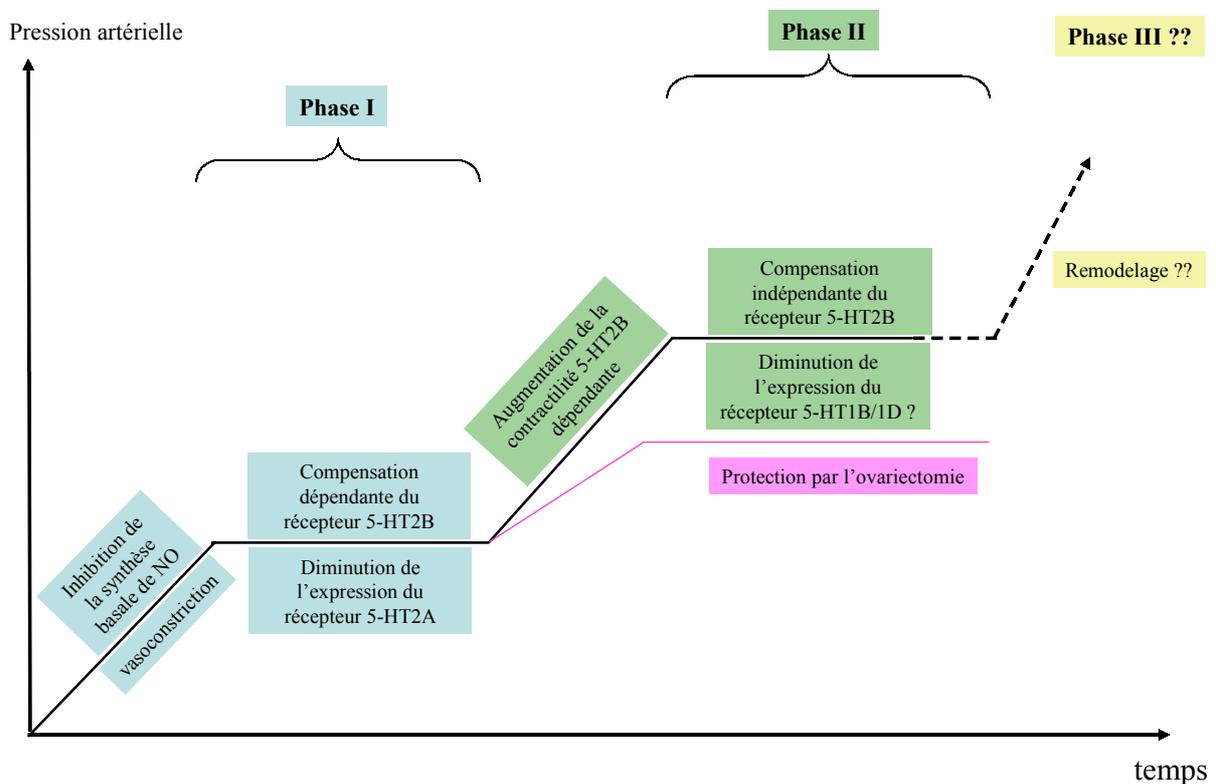
Nous savons que le récepteur 5-HT2B active les NOSs endothéliales (Manivet et al., 2000) et la libération de NO endothélium dépendante (Glusa and Pertz, 2000). De plus, nous avons montré que la délétion du récepteur 5-HT2B entraîne une diminution de l'activité basale de la eNOS sans modifier son expression. Par conséquent, nous pouvons proposer que la première voie de compensation, qui est induite lors de l'inhibition chronique de la synthèse de NO, correspond à l'activation de cette même voie. Cette hypothèse suppose donc que le récepteur 5-HT2B est indispensable à la compensation par activation des NOSs endothéliales lors de leur inhibition et que l'absence des hormones ovariennes n'a aucune conséquence sur cette phase de compensation. Cependant cette hypothèse reste à vérifier.

L'analyse des paramètres échocardiographiques à la fin du traitement hypertenseur a permis de mettre en évidence une augmentation des fractions d'éjection et de raccourcissement consécutives à la réduction du diamètre télé systolique chez les femelles hypertendues. Ces modifications surviennent indépendamment de la présence ou non du récepteur 5-HT2B. Nous n'avons détecté aucun signe d'hypertrophie cardiaque, mais son développement lors d'une hypertension artérielle induite par inhibition de la synthèse de NO n'est pas toujours observé (Sanada et al., 2001; Zhang et al., 2003). Par ailleurs, nous avons peut-être arrêté l'induction de l'hypertension avant que ce type de remodelage cardiaque ne se produise. En résumé, la mutation du récepteur 5-HT2B ne semble pas modifier les fonctions cardiaques dans un modèle d'hypertension artérielle par inhibition de la synthèse de NO.

En conclusion, nous avons démontré le rôle protecteur de l'ablation génétique des récepteurs 5-HT2B dans un modèle d'hypertension par inhibition de la synthèse du NO. Cette protection peut s'expliquer par le blocage de la régulation négative du récepteur 5-HT2A. La protection, uniquement, partielle semble être liée à l'action synergique, de la mutation et de l'inhibiteur de la synthèse de NO, sur la réduction de l'expression du récepteur 5-HT1B/1D.

L'effet paradoxal (protection et aggravation) de la délétion du récepteur 5-HT2B laisse envisager la complexité des fonctions de ce récepteur sur la régulation de la pression artérielle.

Le schéma de la **Figure 50** résume les événements se succédant, selon nous, au cours du développement de l'hypertension artérielle induite par la L-NA chez les femelles WT.



**Figure 50 :** Représentation schématique et hypothétique des événements successifs se produisant au cours de l'inhibition chronique de la synthèse de NO chez les souris femelles et conduisant au développement de l'hypertension artérielle systémique selon deux phases

## 2. Rôle du récepteur 5-HT2B sur la régulation de la compliance artérielle par le NO

La pression artérielle systolique de base n'est pas différente entre les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B, suggérant que ce dernier n'est pas nécessaire à la régulation de la pression artérielle. Cependant ses données ont été obtenues en mesurant la pression artérielle systolique par la méthode dite de « tail cuff » chez des souris éveillées mais soumise au stress de la manipulation par l'expérimentateur. L'utilisation de la radiotélémétrie nous a permis de mesurer un plus grand nombre de paramètres (pression artérielle moyenne, systolique, diastolique, pression pulsée, fréquence cardiaque) chez des souris éveillées, libres de tous mouvements et donc sans intervention de l'expérimentateur.

Grâce à l'enregistrement répété pendant 24 heures consécutives des paramètres hémodynamiques, nous avons mis en évidence une augmentation de la pression pulsée chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B par rapport aux femelles WT. La pression pulsée étant corrélée à la pression artérielle moyenne par calcul, on pourrait s'attendre au même type de modification pour ce paramètre. Cependant, à pression artérielle moyenne égale, la pression pulsée augmente de façon plus importante chez les femelles KO par rapport aux femelles WT. Nous avons précédemment décrit la relation existante entre la pression pulsée et les gros vaisseaux, et entre la pression artérielle moyenne et les résistances périphériques (Dart and Kingwell, 2001). Les variations de pression pulsée permettent d'évaluer la compliance artérielle des gros vaisseaux à conditions que le volume d'éjection systolique cardiaque reste stable. Nous n'avons jamais observé de différence de volume d'éjection systolique entre les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B dans les conditions de base. Sachant que la sonde de mesure de pression a été implantée dans l'aorte des souris, les modifications de pression pulsée nous renseignent sur la compliance de l'aorte. Les résultats obtenus nous permettent donc de conclure à une diminution de la compliance aortique chez les femelles KO en absence de modification significative des résistances périphériques.

L'étude des variations de pression artérielle et de fréquence cardiaque suite à l'injection en *bolus* de phényléphrine et de nitroprussiate de sodium est couramment utilisée en expérimentation animale pour évaluer le baroreflex (Peotta et al., 2001). Nous n'avons observé aucune différence significative concernant les modifications hémodynamiques induites par ces deux composés vasoactifs entre les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B. Ces données nous permettent donc de conclure sur le fonctionnement normal du baroreflex chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B malgré le défaut de compliance aortique. De façon remarquable, il a été décrit que le baroreflex pouvait être modifié chez la souris lors de l'inhibition chronique de la synthèse de NO (Peotta et al., 2001). Chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, nous avons montré une réduction de 30% de l'activité basale de la synthèse de NO dans l'aorte sans modification de l'expression des NOSs endothéliales. Ainsi malgré la faible inhibition chronique des NOSs préexistante dans l'aorte des femelles KO, le baroreflex reste normal. Les niveaux d'inhibition, non comparables entre les deux modèles, peuvent probablement expliquer la différence de résultat.

L'injection d'un *bolus* de L-NA, en bloquant la synthèse basale de NO, induit une vasoconstriction et par conséquent une augmentation de la pression artérielle moyenne. Nous avons montré que le traitement aigu par la L-NA induit une augmentation significativement plus importante de la pression pulsée chez les femelles KO que chez les femelles WT. Cependant les variations de pression artérielle moyenne et de fréquence cardiaque sont

semblables quelque soit le génotype. Ainsi, nous avons confirmé la régulation anormale de la pression pulsée chez les femelles KO et leur hypersensibilité vis-à-vis de la vasoconstriction induite par un inhibiteur des NOSs. Etant donné la sélectivité du traitement par la L-NA pour les NOS constitutives, l'absence d'induction de la iNOS (expression faible, activité nulle) et la réduction de l'activité basale NOS calcium-dépendante dans les aortes des femelles KO, on peut émettre l'hypothèse que l'hypersensibilité des femelles KO pour la L-NA provient d'un effet synergique sur l'inhibition de l'activité NOS basale.

De façon surprenante, la régulation anormale de la pression pulsée en fonction de la pression artérielle moyenne (PAM) devient plus sévère pour des valeurs de PAM supérieures à 130 mmHg. L'injection de phényléphrine, qui induit une augmentation de la PAM au-delà de 130 mmHg, n'a jamais montré de changement concernant la corrélation entre la PAM et la pression pulsée. En conclusion, la régulation anormale de la pression pulsée chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B semble être un phénomène spécifiquement associé à une inhibition de la synthèse de NO.

Afin de savoir si l'augmentation de la pression pulsée suite à l'injection de L-NA est associée à une diminution de la compliance aortique, nous avons mesuré par échocardiographie le volume d'éjection systolique (VES) après une injection en *bolus* de L-NA. En absence de différence entre les femelles WT et KO concernant le VES, nous pouvons conclure à l'altération de la compliance aortique chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B.

La compliance aortique est un marqueur de l'élasticité vasculaire et donc de la capacité d'un vaisseau à absorber les variations de flux sanguins très importantes dans l'aorte entre la systole et la diastole cardiaque. Une bonne compliance artérielle participe au maintien de la perfusion normale des organes (Belz, 1995). De façon intéressante, les souris KO pour le récepteur 5-HT2B sont plus petites que les souris WT. Bien qu'aucune donnée ne permette de confirmer cette hypothèse, la réduction de compliance aortique pourrait être à l'origine d'une hypoperfusion des organes et d'un retard de croissance.

Il a par ailleurs été décrit que la pression pulsée est un indice de prédiction pour les pathologies associées à une dysfonction endothéliale telles que l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle (Glasser et al., 1998). La compliance artérielle est aussi communément estimée par la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (*Pulse Wave Velocity : PWV*) (Hartley et al., 1997). Il a été montré que le PWV, et donc la compliance artérielle, peuvent être modifiés selon trois niveaux (Fitch et al., 2001). Dans un premier temps, la compliance est régulée par le tonus vasculaire dont le niveau basal de NO est un composant majeur. Dans un deuxième temps, la compliance artérielle est régulée par l'augmentation de pression artérielle moyenne. Enfin le remodelage vasculaire, en modifiant le rapport collagène/élastine, réduit également la compliance.

Chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B, l'analyse de la structure de l'aorte par la coloration trichrome de Mallory (non montré) et par l'orcéine, ainsi que par microscopie électronique, a permis de confirmer l'absence de remodelage majeur au niveau de l'aorte. D'autre part les changements de pression artérielle induit par la phényléphrine et le nitroprussiate de sodium ne s'accompagnent pas de différences de réponse entre les femelles WT et KO pour le récepteur 5-HT2B. Par conséquent, seul une modification du tonus de base semble être à l'origine du pulse pressure anormalement élevé (de base ou après L-NA) chez les femelles KO.

En conclusion, le récepteur 5-HT2B est un régulateur de la compliance aortique chez les souris femelles en modifiant l'activité basale de la NOS endothéliale.

Nous savons que le récepteur 5-HT2B de souris est capable d'activer la NOS endothéliale dans les fibroblastes transfectés, les tumeurs carcinoïdes et les cellules 1C11. Cette activation est dépendante du domaine PDZ contenu dans la partie C-terminale du récepteur (Manivet et al., 2000). L'absence du récepteur 5-HT2B dans les cellules endothéliales de l'aorte semble conduire à l'inhibition de l'activité de la NOS endothéliale, sans modifier son expression, confirmant ainsi le rôle activateur de l'interaction entre le récepteur et l'enzyme. Nous n'avons pas évalué l'expression de la NOS neuronale dans les aortes des femelles, mais cette isoforme est généralement très peu exprimée dans l'aorte (Walford and Loscalzo, 2003). Par ailleurs, une éventuelle surexpression de la NOS neuronale ne remet pas en cause la réduction de l'activité basale calcium-dépendante. De façon surprenante, malgré la réduction de 30% de l'activité basale de la NOS endothéliale, et en absence d'induction de la iNOS, la pression artérielle de base est normale chez les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B. Il n'existe qu'une courte période, lorsque les souris atteignent l'âge adulte, où nous avons observé une augmentation significative de la pression artérielle. Mais la rapide disparition de cette légère hypertension, laisse supposer que des mécanismes de compensation ont été activés afin de normaliser la pression artérielle (peut être par régulation de l'expression des récepteurs 5-HT1B/1D).

Le défaut de compliance artérielle est cependant probablement une des raisons pour laquelle les femelles KO pour le récepteur 5-HT2B sont plus sensibles à l'hypertension induite par la L-NA au cours des 9 premières semaines de traitement. Sachant que ce même défaut est un marqueur prédictif de l'athérosclérose, il serait particulièrement intéressant de tester la sensibilité des souris KO pour le récepteur 5-HT2B vis-à-vis de l'athérosclérose induite par un régime enrichi en graisse par exemple. On pourrait s'attendre normalement à ce que les souris KO soient plus sensibles à l'athérosclérose que les souris sauvages.

**En conclusion, le récepteur 5-HT2B régule la compliance aortique en contrôlant l'activité basale des NOS endothéliales. Par ailleurs il ne semble pas participer à la régulation du baroreflex.**

## CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail de thèse, nous avons tenté de comprendre, dans un premier temps, la raison pour laquelle les femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> présentent des défauts cardiovasculaires de moindre importance par rapport aux mâles KO souffrant d'une cardiomyopathie dilatée. L'explication la plus probable semblait être un effet cardioprotecteur des hormones ovariennes, précédemment décrit dans la littérature. Cependant, nos travaux sur les effets de l'ovariectomie ne nous ont pas permis de confirmer cette hypothèse. A l'inverse, nous avons mis en évidence une hypertrophie cardiaque et une hypotension provoquée par l'ovariectomie, de façon transitoire, au cours de développement cardiovasculaire physiologique des femelles. Les modifications cardiovasculaires induites par l'ovariectomie, chez les jeunes femelles, sont quasiment insensibles à la délétion du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, excluant ainsi une interaction entre ces deux facteurs au cours de l'hypertrophie développementale.

Dans un deuxième temps, l'étude d'un modèle d'hypertension par inhibition chronique de la synthèse des NOS, nous a permis de mettre en évidence pour la première fois le caractère multiphasique de ce modèle. En effet, l'hypertension se développe selon au moins deux phases. Nous avons également montré que l'une de ces phases nécessite la présence du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> pour se développer, alors que l'autre est amplifiée par l'absence de ce récepteur. De plus, l'ovariectomie s'est révélée être un facteur de protection vis-à-vis de la deuxième phase de l'hypertension. Enfin, nous avons démontré les importantes modifications d'expression des principaux récepteurs de la sérotonine au niveau de l'aorte des souris KO et WT, dont certains sont sous le contrôle du récepteur 5-HT<sub>2B</sub>. Ainsi, l'hypertension artérielle induite par inhibition chronique des NOSs s'accompagne de changements complexes au sein de la population des récepteurs de la sérotonine. Finalement, l'hypersensibilité des femelles KO pour le récepteur 5-HT<sub>2B</sub>, au cours de la phase précoce de l'hypertension, est probablement liée aux anomalies de compliance aortique, associées à la diminution de l'activité basale des NOSs endothéliales.

L'ensemble de nos travaux a donc permis d'améliorer notre compréhension des fonctions vasculaires du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2B</sub> et de ses interactions avec la synthèse de monoxyde d'azote *in vivo*. Ce type d'interaction pouvant avoir son importance en pathologie humaine (hypertension systémique, hypertension pulmonaire, athérosclérose) nos résultats permettent, nous l'espérons, d'élucider certaines questions concernant l'étiologie ou le traitement de ces pathologies.

# BIBLIOGRAPHIE

## A

**Adams, K. F., Jr., Sueta, C. A., Gheorghiade, M., O'Connor, C. M., Schwartz, T. A., Koch, G. G., Uretsky, B., Swedberg, K., McKenna, W., Soler-Soler, J. et al.** (1999). Gender differences in survival in advanced heart failure. Insights from the FIRST study. *Circulation* **99**, 1816-21.

**Adam, M. R., Golden, D. L., Register, T. C., Anthony, M. S., Hodgins, J. B., Maeda, N. and Williams, J. K.** (2002). The atheroprotective effect of dietary soy isoflavones in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice requires the presence of estrogen receptor- $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1859-64.

**Ahn, B. H., Park, H. K., Cho, H. G., Lee, H. A., Lee, Y. M., Yang, E. K. and Lee, W. J.** (2003). Estrogen and enalapril attenuate the development of right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in ovariectomized rats. *J Korean Med Sci* **18**, 641-8.

**Amin, A. H., Crawford, T. B. and Gaddum, J. H.** (1954). The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol* **126**, 596-618.

**August, P. and Oparil, S.** (1999). Hypertension in women. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1862-6.

## B

**Bailey, C. J. and Ahmed-Sorour, H.** (1980). Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion. *Diabetologia* **19**, 475-81.

**Banes, A. K. and Watts, S. W.** (2001). Enhanced contraction to 5-hydroxytryptamine is not due to "unmasking" of 5-hydroxytryptamine(1b) receptors in the mesenteric artery of the deoxycorticosterone acetate-salt rat. *Hypertension* **38**, 891-5.

**Banes, A. K. and Watts, S. W.** (2002). Upregulation of arterial serotonin 1B and 2B receptors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* **39**, 394-8.

**Banes, A. K. and Watts, S. W.** (2003). Arterial expression of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors during development of DOCA-salt hypertension. *BMC Pharmacol* **3**, 12.

**Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M. and Rockman, H. A.** (2003). Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation* **108**, 1611-8.

**Barrett-Connor, E.** (1997). Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* **95**, 252-64.

**Baxter, G., Kennett, G., Blaney, F. and Blackburn, T.** (1995). 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci* **16**, 105-10.

**Becamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galeotti, N., Dumuis, A., Bockaert, J. and Marin, P.** (2004). The serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J Biol Chem* **279**, 20257-66.

- Belz, G. G.** (1995). Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther* **9**, 73-83.
- Ben-Harari, R. R., Dalton, B. A., Osman, R. and Maayani, S.** (1991). Kinetic characterization of 5-hydroxytryptamine receptor desensitization in isolated guinea-pig trachea and rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **257**, 416-24.
- Berul, C. I., Christe, M. E., Aronovitz, M. J., Maguire, C. T., Seidman, C. E., Seidman, J. G. and Mendelsohn, M. E.** (1998). Familial hypertrophic cardiomyopathy mice display gender differences in electrophysiological abnormalities. *J Interv Card Electrophysiol* **2**, 7-14.
- Bhattacharya, A., Schenck, K. W., Xu, Y. C., Nisenbaum, L., Galbreath, E. and Cohen, M. L.** (2004). 5-Hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptor-mediated contraction of rabbit saphenous vein and basilar artery: role of vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 825-32.
- Bickerdike, M. J., Vickers, S. P. and Dourish, C. T.** (1999). 5-HT<sub>2C</sub> receptor modulation and the treatment of obesity. *Diabetes Obes Metab* **1**, 207-14.
- Birrane, G., Chung, J. and Ladias, J. A.** (2003). Novel mode of ligand recognition by the Erbin PDZ domain. *J Biol Chem* **278**, 1399-402.
- Blakely, R. D., Berson, H. E., Fremeau, R. T., Jr., Caron, M. G., Peek, M. M., Prince, H. K. and Bradley, C. C.** (1991). Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* **354**, 66-70.
- Blanpain, C., Le Poul, E., Parma, J., Knoop, C., Detheux, M., Parmentier, M., Vassart, G. and Abramowicz, M. J.** (2003). Serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor loss of function mutation in a patient with fenfluramine-associated primary pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* **60**, 518-28.
- Bloch, W., Addicks, K., Hescheler, J. and Fleischmann, B. K.** (2001). Nitric oxide synthase expression and function in embryonic and adult cardiomyocytes. *Microsc Res Tech* **55**, 259-69.
- Blondel, O., Gastineau, M., Dahmoune, Y., Langlois, M. and Fischmeister, R.** (1998). Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem* **70**, 2252-61.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V. and Dumuis, A.** (2004). 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 39-51.
- Boer, R., Ulrich, W. R., Klein, T., Mirau, B., Haas, S. and Baur, I.** (2000). The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol* **58**, 1026-34.
- Boffa, J. J., Tharaux, P. L., Placier, S., Ardaillou, R., Dussaule, J. C. and Chatziantoniou, C.** (1999). Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal vasculature of transgenic mice during inhibition of nitric oxide synthesis: evidence for an endothelin-mediated mechanism. *Circulation* **100**, 1901-8.
- Bogdanski, D. F., Pletscher, A., Brodie, B. B. and Udenfriend, S.** (1956). Identification and assay of serotonin in brain. *J Pharmacol Exp Ther* **117**, 82-8.

**Bolte, A. C., van Geijn, H. P. and Dekker, G. A.** (2001a). Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **95**, 12-21.

**Bolte, A. C., van Geijn, H. P. and Dekker, G. A.** (2001b). Pharmacological treatment of severe hypertension in pregnancy and the role of serotonin(2)-receptor blockers. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **95**, 22-36.

**Bonhaus, D. W., Bach, C., DeSouza, A., Salazar, F. H., Matsuoka, B. D., Zuppan, P., Chan, H. W. and Eglen, R. M.** (1995). The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptor gene products: comparison with 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Br J Pharmacol* **115**, 622-8.

**Bouwknicht, J. A., van der Gugten, J., Hijzen, T. H., Maes, R. A., Hen, R. and Olivier, B.** (2001). Male and female 5-HT(1B) receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes. *Physiol Behav* **74**, 507-16.

**Bradley, P. B., Engel, G., Feniuk, W., Fozard, J. R., Humphrey, P. P., Middlemiss, D. N., Mylecharane, E. J., Richardson, B. P. and Saxena, P. R.** (1986). Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* **25**, 563-76.

**Brodie, T. G.** (1900). The immediate action of an intravenous injection of blood serum. *J. Physiol.* **26**, 48-71.

**Brown, M.** (1994). Estrogen receptor molecular biology. *Hematol Oncol Clin North Am* **8**, 101-12.

**Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S. and Vane, J. R.** (1976). Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* **12**, 897-913.

**Bush, T. L., Barrett-Connor, E., Cowan, L. D., Criqui, M. H., Wallace, R. B., Suchindran, C. M., Tyroler, H. A. and Rifkind, B. M.** (1987). Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation* **75**, 1102-9.

**Butz, G. M. and Davisson, R. L.** (2001). Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice : a physiological genomics toll. *Physiol Genomics* **5**, 89-97

## C

**Camper-Kirby, D., Welch, S., Walker, A., Shiraishi, I., Setchell, K. D., Schaefer, E., Kajstura, J., Anversa, P. and Sussman, M. A.** (2001). Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res* **88**, 1020-7.

**Caulin-Glaser, T., Garcia-Cardena, G., Sarrel, P., Sessa, W. C. and Bender, J. R.** (1997). 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* **81**, 885-92.

**Cavasin, M. A., Sankey, S. S., Yu, A. L., Menon, S. and Yang, X. P.** (2003). Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H1560-9.

- Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Mineo, C., Liu, P., German, Z., Sherman, T. S., Mendelsohn, M. E., Anderson, R. G. and Shaul, P. W.** (2000). Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* **87**, E44-52.
- Chang, A. S. and Chang, S. M.** (1999). Nongenomic steroidal modulation of high-affinity serotonin transport. *Biochim Biophys Acta* **1417**, 157-66.
- Chappell, M. C., Gallagher, P. E., Averill, D. B., Ferrario, C. M. and Brosnihan, K. B.** (2003). Estrogen or the AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2.Lewis rat. *Hypertension* **42**, 781-6.
- Chen, J. and Chien, K. R.** (1999). Complexity in simplicity: monogenic disorders and complex cardiomyopathies. *J Clin Invest* **103**, 1483-5.
- Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E. and Shaul, P. W.** (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* **103**, 401-6.
- Chiavegatto, S. and Nelson, R. J.** (2003). Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. *Horm Behav* **44**, 233-41.
- Chien, K. R.** (1999). Stress pathways and heart failure. *Cell* **98**, 555-8.
- Chien, K. R., Zhu, H., Knowlton, K. U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T. X. and Evans, S. M.** (1993). Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* **55**, 77-95.
- Choi, D. S., Birraux, G., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (1994). The human serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor: pharmacological link between 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors. *FEBS Lett* **352**, 393-9.
- Choi, D. S., Kellermann, O., Richard, S., Colas, J. F., Bolanos-Jimenez, F., Tournois, C., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (1998). Mouse 5-HT<sub>2B</sub> receptor-mediated serotonin trophic functions. *Ann N Y Acad Sci* **861**, 67-73.
- Choi, D. S., Loric, S., Colas, J. F., Callebert, J., Rosay, P., Kellermann, O., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (1996). The mouse 5-HT<sub>2B</sub> receptor: homologous subtype or species variant? *Behav Brain Res* **73**, 253-7.
- Choi, D. S. and Maroteaux, L.** (1996). Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Lett* **391**, 45-51.
- Choi, D. S., Ward, S. J., Messaddeq, N., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (1997). 5-HT<sub>2B</sub> receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* **124**, 1745-55.
- Chun, M., Liyanage, U. K., Lisanti, M. P. and Lodish, H. F.** (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11728-32.
- Clementi, E., Sciorati, C., Riccio, M., Miloso, M., Meldolesi, J. and Nistico, G.** (1995). Nitric oxide action on growth factor-elicited signals. Phosphoinositide hydrolysis and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

responses are negatively modulated via a cGMP-dependent protein kinase I pathway. *J Biol Chem* **270**, 22277-82.

**Cohen, M. L. and Fludzinski, L. A.** (1987). Contractile serotonergic receptor in rat stomach fundus. *J Pharmacol Exp Ther* **243**, 264-9.

**Cohen, R. A., Shepherd, J. T. and Vanhoutte, P. M.** (1983). 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* **245**, H1077-80.

**Colas, J. F., Choi, D. S., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (1997). Evolutionary conservation of the 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Ann N Y Acad Sci* **812**, 149-53.

**Collins, P. and Webb, C.** (1999). Estrogen hits the surface. *Nat Med* **5**, 1130-1.

**Compan, V., Zhou, M., Grailhe, R., Gazzara, R. A., Martin, R., Gingrich, J., Dumuis, A., Brunner, D., Bockaert, J. and Hen, R.** (2004). Attenuated response to stress and novelty and hypersensitivity to seizures in 5-HT<sub>4</sub> receptor knock-out mice. *J Neurosci* **24**, 412-9.

**Connolly, H. M., Crary, J. L., McGoon, M. D., Hensrud, D. D., Edwards, B. S., Edwards, W. D. and Schaff, H. V.** (1997). Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N Engl J Med* **337**, 581-8.

**Costall, B. and Naylor, R. J.** (2004). 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 27-37.

**Cox, D. A. and Cohen, M. L.** (1995). 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptor signaling in rat stomach fundus: role of voltage-dependent calcium channels, intracellular calcium release and protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* **272**, 143-50.

**Cox, D. A. and Cohen, M. L.** (1997). Influence of gender on vasomotor effects of oxidized low-density lipoprotein in porcine coronary arteries. *Am J Physiol* **272**, H2577-83.

**Crabbe, J. C., Phillips, T. J., Feller, D. J., Hen, R., Wenger, C. D., Lessov, C. N. and Schafer, G. L.** (1996). Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors. *Nat Genet* **14**, 98-101.

**Cravchik, A. and Goldman, D.** (2000). Neurochemical individuality: genetic diversity among human dopamine and serotonin receptors and transporters. *Arch Gen Psychiatry* **57**, 1105-14.

**Crone, S. A., Zhao, Y. Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K. L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G. et al.** (2002). ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* **8**, 459-65.

**Cummings, S. A., Groszmann, R. J. and Kaumann, A. J.** (1986). Hypersensitivity of mesenteric veins to 5-hydroxytryptamine- and ketanserin-induced reduction of portal pressure in portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **89**, 501-13.

**Curtis, M. J. and Pabla, R.** (1997). Nitric oxide supplementation or synthesis block--which is the better approach to treatment of heart disease? *Trends Pharmacol Sci* **18**, 239-44.

**Cyr, M., Bosse, R. and Di Paolo, T.** (1998). Gonadal hormones modulate 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors: emphasis on the rat frontal cortex. *Neuroscience* **83**, 829-36.

## D

- Dantas, A. P., Scivoletto, R., Fortes, Z. B., Nigro, D. and Carvalho, M. H.** (1999). Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **34**, 914-9.
- Darblade, B., Pendaries, C., Krust, A., Dupond, S., Fouque, M. J., Rami, J., Chambon, P., Bayard, F. and Arnal, J. F.** (2002). Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* **90**, 413-9.
- Dart, A. M. and Kingwell, B. A.** (2001). Pulse pressure--a review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* **37**, 975-84.
- David, F. L., Carvalho, M. H., Cobra, A. L., Nigro, D., Fortes, Z. B., Reboucas, N. A. and Tostes, R. C.** (2001). Ovarian hormones modulate endothelin-1 vascular reactivity and mRNA expression in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* **38**, 692-6.
- De Caestecker, M. and Meyrick, B.** (2001). Bone morphogenetic proteins, genetics and the pathophysiology of primary pulmonary hypertension. *Respir Res* **2**, 193-7.
- de Simone, G., Devereux, R. B., Daniels, S. R. and Meyer, R. A.** (1995). Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension* **26**, 979-83.
- De Vries, P., Villalon, C. M. and Saxena, P. R.** (1999). Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *Eur J Pharmacol* **375**, 61-74.
- Dimitrow, P. P., Czarnecka, D., Jaszcz, K. K. and Dubiel, J. S.** (1998). Comparison of left ventricular hypertrophy expression in patients with hypertrophic cardiomyopathy on the basis of sex. *J Cardiovasc Risk* **5**, 85-7.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A. M.** (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-5.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E. et al.** (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**, 75-9.
- Djouadi, F., Weinheimer, C. J., Saffitz, J. E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F. J. and Kelly, D. P.** (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest* **102**, 1083-91.
- Doenicke, A., Brand, J. and Perrin, V. L.** (1988). Possible benefit of GR43175, a novel 5-HT<sub>1</sub>-like receptor agonist, for the acute treatment of severe migraine. *Lancet* **1**, 1309-11.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C. et al.** (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**, 2449-52.
- Dreteler, G. H., Wouters, W., Toorop, G. P., Jansen, J. A. and Saxena, P. R.** (1991). Systemic and regional hemodynamic effects of the 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor agonists

flesinoxan and 8-hydroxy-2(di-N-propylamino)tetralin in the conscious rat. *J Cardiovasc Pharmacol* **17**, 488-93.

**Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Jackson, E. K. and Keller, P. J.** (1998). 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension* **31**, 522-8.

**Dubey, R. K., Oparil, S., Imthurn, B. and Jackson, E. K.** (2002). Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res* **53**, 688-708.

## E

**Eddahibi, S., Hanoun, N., Lanfumey, L., Lesch, K. P., Raffestin, B., Hamon, M. and Adnot, S.** (2000). Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J Clin Invest* **105**, 1555-62.

**Eddahibi, S., Morrell, N., d'Ortho, M. P., Naeije, R. and Adnot, S.** (2002). Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **20**, 1559-72.

**Eddahibi, S., Raffestin, B., Pham, I., Launay, J. M., Aegerter, P., Sitbon, M. and Adnot, S.** (1997). Treatment with 5-HT potentiates development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* **272**, H1173-81.

**Eglen, R. M., Jasper, J. R., Chang, D. J. and Martin, G. R.** (1997). The 5-HT<sub>7</sub> receptor: orphan found. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 104-7.

**Ellis, E. S., Byrne, C., Murphy, O. E., Tilford, N. S. and Baxter, G. S.** (1995). Mediation by 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptors of endothelium-dependent relaxation in rat jugular vein. *Br J Pharmacol* **114**, 400-4.

**Ellwood, A. J. and Curtis, M. J.** (1997). Involvement of 5-HT<sub>1B/1D</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in 5-HT-induced contraction of endothelium-denuded rabbit epicardial coronary arteries. *Br J Pharmacol* **122**, 875-84.

**Enguix, M. J., Sanchez, L., Villazon, M., Brea, J., Tristan, H., Caruncho, H. J., Cadavid, M. I. and Loza, M. I.** (2003). Differential regulation of rat peripheral 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptor systems: influence of drug treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **368**, 79-90.

**Enmark, E. and Gustafsson, J. A.** (1999). Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* **246**, 133-8.

## F

**Fang, Z., Carlson, S. H., Chen, Y. F., Oparil, S. and Wyss, J. M.** (2001). Estrogen depletion induces NaCl-sensitive hypertension in female spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R1934-9.

**Fargin, A., Raymond, J. R., Lohse, M. J., Kobilka, B. K., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1988). The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Nature* **335**, 358-60.

**Farhat, M. Y., Abi-Younes, S. and Ramwell, P. W.** (1996). Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol* **51**, 571-6.

- Farrow, J. T. and Van Vunakis, H.** (1972). Binding of d-lysergic acid diethylamide to subcellular fractions from rat brain. *Nature* **237**, 164-6.
- Feldman, J. M.** (1987). Carcinoid tumors and syndrome. *Semin Oncol* **14**, 237-46.
- Fernandez, M. M., Moran, A., Martin, M. L. and San Roman, L.** (2000). Mesenteric vasoconstrictor response to 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused rat mesentery: involvement of 5-HT(2B) and/or 5-HT(2C) receptor activation. *Eur J Pharmacol* **401**, 221-7.
- Ferrari, M. D.** (2003). Current perspectives on effective migraine treatments: Are small clinical differences important for patients? *Drugs Today (Barc)* **39 Suppl D**, 37-41.
- Fink, G., Sumner, B., Rosie, R., Wilson, H. and McQueen, J.** (1999). Androgen actions on central serotonin neurotransmission: relevance for mood, mental state and memory. *Behav Brain Res* **105**, 53-68.
- Fiorica-Howells, E., Hen, R., Gingrich, J., Li, Z. and Gershon, M. D.** (2002). 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G877-93.
- Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L. and Gershon, M. D.** (2000). Serotonin and the 5-HT(2B) receptor in the development of enteric neurons. *J Neurosci* **20**, 294-305.
- Fitch, R. M., Vergona, R., Sullivan, M. E. and Wang, Y. X.** (2001). Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc Res* **51**, 351-8.
- Fitzgerald, L. W., Burn, T. C., Brown, B. S., Patterson, J. P., Corjay, M. H., Valentine, P. A., Sun, J. H., Link, J. R., Abbaszade, I., Hollis, J. M. et al.** (2000). Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol Pharmacol* **57**, 75-81.
- Foguet, M., Hoyer, D., Pardo, L. A., Parekh, A., Kluxen, F. W., Kalkman, H. O., Stuhmer, W. and Lubbert, H.** (1992). Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *Embo J* **11**, 3481-7.
- Freay, A. D., Curtis, S. W., Korach, K. S. and Rubanyi, G. M.** (1997). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca<sup>2+</sup> uptake. *Circ Res* **81**, 242-8.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C.** (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V.** (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-6.
- Furman, R. H.** (1968). Are gonadal hormones (estrogens and androgens) of significance in the development of ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* **149**, 822-33.

## G

- Gaddum, J. H. and Picarelli, Z. P.** (1957). Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol* **12**, 323-8.
- Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M. P.** (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**, 403-11.
- Gao, X. M., Agrotis, A., Autelitano, D. J., Percy, E., Woodcock, E. A., Jennings, G. L., Dart, A. M. and Du, X. J.** (2003). Sex hormones and cardiomyopathic phenotype induced by cardiac beta 2-adrenergic receptor overexpression. *Endocrinology* **144**, 4097-105.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C.** (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **392**, 821-4.
- Gardin, J. M., Siri, F. M., Kitsis, R. N., Edwards, J. G. and Leinwand, L. A.** (1995). Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res* **76**, 907-14
- Garthwaite, J.** (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* **14**, 60-7.
- Geisterfer-Lowrance, A. A., Christe, M., Conner, D. A., Ingwall, J. S., Schoen, F. J., Seidman, C. E. and Seidman, J. G.** (1996). A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* **272**, 731-4.
- 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.** (1995). The 5-HT<sub>4</sub> receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *Embo J* **14**, 2806-15.
- Glasser, S. P., Arnett, D. K., McVeigh, G. E., Finkelstein, S. M., Bank, A. K., Morgan, D. J. and Cohn, J. N.** (1998). The importance of arterial compliance in cardiovascular drug therapy. *J Clin Pharmacol* **38**, 202-12.
- Glusa, E. and Pertz, H. H.** (2000). Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Br J Pharmacol* **130**, 692-8.
- Glusa, E. and Richter, M.** (1993). Endothelium-dependent relaxation of porcine pulmonary arteries via 5-HT<sub>1C</sub>-like receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **347**, 471-7.
- Glusa, E. and Roos, A.** (1996). Endothelial 5-HT receptors mediate relaxation of porcine pulmonary arteries in response to ergotamine and dihydroergotamine. *Br J Pharmacol* **119**, 330-4.
- Godsland, I. F., Wynn, V., Crook, D. and Miller, N. E.** (1987). Sex, plasma lipoproteins, and atherosclerosis: prevailing assumptions and outstanding questions. *Am Heart J* **114**, 1467-503.
- Golino, P., Piscione, F., Willerson, J. T., Cappelli-Bigazzi, M., Focaccio, A., Villari, B., Indolfi, C., Russolillo, E., Condorelli, M. and Chiariello, M.** (1991). Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med* **324**, 641-8.

**Grady, D., Rubin, S. M., Petitti, D. B., Fox, C. S., Black, D., Ettinger, B., Ernster, V. L. and Cummings, S. R.** (1992). Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* **117**, 1016-37.

**Grailhe, R., Grabtree, G. W. and Hen, R.** (2001). Human 5-HT(5) receptors: the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. *Eur J Pharmacol* **418**, 157-67.

**Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, K., Stimpel, M., Karas, R. H., Vetter, H. and Neyses, L.** (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* **416**, 107-12.

**Guetta, V., Quyyumi, A. A., Prasad, A., Panza, J. A., Waclawiw, M. and Cannon, R. O., 3rd.** (1997). The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* **96**, 2795-801.

## H

**Haghighi, K., Schmidt, A. G., Hoit, B. D., Brittsan, A. G., Yatani, A., Lester, J. W., Zhai, J., Kimura, Y., Dorn, G. W., 2nd, MacLennan, D. H. et al.** (2001). Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem* **276**, 24145-52.

**Hall, R. A., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J.** (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* **145**, 927-32.

**Hamlin, K. E. a. F., F.E.** (1951). The synthesis of 5-HT. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 5007-5008.

**Hartley, C. J., Reddy, A. K., Madala, S., Martin-McNulty, B., Vergona, R., Sullivan, M. E., Halks-Miller, M., Taffet, G. E., Michael, L. H., Entman, M. L. et al.** (2000). Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2326-34.

**Hartley, C. J., Taffet, G. E., Michael, L. H., Pham, T. T. and Entman, M. L.** (1997). Noninvasive determination of pulse-wave velocity in mice. *Am J Physiol* **273**, H494-500.

**Hausdorff, W. P., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* **4**, 2881-9.

**Haynes, M. P., Sinha, D., Russell, K. S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C. and Bender, J. R.** (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* **87**, 677-82.

**Hayward, C. S., Kelly, R. P. and Collins, P.** (2000). The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res* **46**, 28-49.

**Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H. and Tecott, L. H.** (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15049-54.

**Herve, P., Launay, J. M., Scrobohaci, M. L., Brenot, F., Simonneau, G., Petitpretz, P., Poubeau, P., Cerrina, J., Duroux, P. and Drouet, L.** (1995). Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* **99**, 249-54.

**Hew, K. W. and Keller, K. A.** (2003). Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison. *Birth Defects Res Part B Dev Reprod Toxicol* **68**, 309-20.

**Hodges, Y. K., Tung, L., Yan, X. D., Graham, J. D., Horwitz, K. B. and Horwitz, L. D.** (2000). Estrogen receptors alpha and beta: prevalence of estrogen receptor beta mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation* **101**, 1792-8.

**Hodgin, J. B., Knowles, J. W., Kim, H. S., Smithies, O. and Maeda, N.** (2002). Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. *J Clin Invest* **109**, 541-8.

**Hoffman, B. J., Mezey, E. and Brownstein, M. J.** (1991). Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* **254**, 579-80.

**Hou, M., Kanje, M., Longmore, J., Tajti, J., Uddman, R. and Edvinsson, L.** (2001). 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptors in the human trigeminal ganglion: co-localization with calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide synthase. *Brain Res* **909**, 112-20.

**Howard, R. J., Drobac, M., Rider, W. D., Keane, T. J., Finlayson, J., Silver, M. D., Wigle, E. D. and Rakowski, H.** (1982). Carcinoid heart disease: diagnosis by two-dimensional echocardiography. *Circulation* **66**, 1059-65.

**Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R. and Humphrey, P. P.** (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* **46**, 157-203.

**Hoyer, D., Hannon, J. P. and Martin, G. R.** (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**, 533-54.

**Huang, A., Sun, D., Kaley, G. and Koller, A.** (1997). Estrogen maintains nitric oxide synthesis in arterioles of female hypertensive rats. *Hypertension* **29**, 1351-6.

**Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. and Fishman, M. C.** (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239-42.

**Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B. and Vittinghoff, E.** (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* **280**, 605-13.

**Humphrey, P. P. and Feniuk, W.** (1991). Mode of action of the anti-migraine drug sumatriptan. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 444-6.

## I

**Iafrati, M. D., Karas, R. H., Aronovitz, M., Kim, S., Sullivan, T. R., Jr., Lubahn, D. B., O'Donnell, T. F., Jr., Korach, K. S. and Mendelsohn, M. E.** (1997). Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med* **3**, 545-8.

**Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. and Wood, K. S.** (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* **61**, 866-79.

**Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S. and Chaudhuri, G.** (1988). Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 181-9.

**Ignarro, L. J. B., R.E. ; Buga, G.M. ; Wood, K.S.** (1987). Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) released from artery and vein appears to be nitric oxide (NO) or a closely related radical species. In *Fed. Proc.*, vol. 46 (ed., pp. 644. abstract.

**Inoue, T., Kusumi, I. and Yoshioka, M.** (2002). Serotonin transporters. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **1**, 519-29.

**Ishida, T., Kawashima, S., Hirata, K. and Yokoyama, M.** (1998). Nitric oxide is produced via 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation in human coronary artery endothelial cells. *Kobe J Med Sci* **44**, 51-63.

**Ito, A., Egashira, K., Kadokami, T., Fukumoto, Y., Takayanagi, T., Nakaike, R., Kuga, T., Sueishi, K., Shimokawa, H. and Takeshita, A.** (1995). Chronic inhibition of endothelium-derived nitric oxide synthesis causes coronary microvascular structural changes and hyperreactivity to serotonin in pigs. *Circulation* **92**, 2636-44.

## J

**Jaffre, F., Callebert, J., Sarre, A., Etienne, N., Nebigil, C. G., Launay, J. M., Maroteaux, L. and Monassier, L.** (2004). Involvement of the Serotonin 5-HT<sub>2B</sub> Receptor in Cardiac Hypertrophy Linked to Sympathetic Stimulation. Control of Interleukin-6, Interleukin-1{beta}, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Cytokine Production by Ventricular Fibroblasts. *Circulation*.

**Ji, T. H., Grossmann, M. and Ji, I.** (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **273**, 17299-302.

**Jiang, C. W., Sarrel, P. M., Lindsay, D. C., Poole-Wilson, P. A. and Collins, P.** (1991). Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol* **104**, 1033-7.

**Johnson, K. W., Nelson, D. L., Dieckman, D. K., Wainscott, D. B., Lucaites, V. L., Audia, J. E., Owton, W. M. and Phebus, L. A.** (2003). Neurogenic dural protein extravasation induced by meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) involves nitric oxide and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation. *Cephalalgia* **23**, 117-23.

**Johnson, K. W., Phebus, L. A. and Cohen, M. L.** (1998). Serotonin in migraine: theories, animal models and emerging therapies. *Prog Drug Res* **51**, 219-44.

**Jorgensen, H., Kjaer, A., Warberg, J. and Knigge, U.** (2001). Differential effect of serotonin 5-HT(1A) receptor antagonists on the secretion of corticotropin and prolactin. *Neuroendocrinology* **73**, 322-33.

**Julius, D., Livelli, T. J., Jessell, T. M. and Axel, R.** (1989). Ectopic expression of the serotonin 1c receptor and the triggering of malignant transformation. *Science* **244**, 1057-62.

**Julius, D., MacDermott, A. B., Axel, R. and Jessell, T. M.** (1988). Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* **241**, 558-64.

**Jun, S. S., Chen, Z., Pace, M. C. and Shaul, P. W.** (1998). Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest* **102**, 176-83.

## K

**Kadokami, T., McTiernan, C. F., Kubota, T., Frye, C. S. and Feldman, A. M.** (2000). Sex-related survival differences in murine cardiomyopathy are associated with differences in TNF-receptor expression. *J Clin Invest* **106**, 589-97.

**Kagaya, A., Motohashi, N., Kugaya, A., Yamaji, T., Hayashi, T., Okamoto, Y., Shinno, H., Takebayashi, M., Uchitomi, Y. and Yamawaki, S.** (1995). Cyclic GMP generation mediated by 5-HT<sub>2</sub> receptors via nitric oxide-dependent pathway and its effect on the desensitization of 5-HT<sub>2</sub> receptors in C6 glioma cells. *J Neural Transm Gen Sect* **100**, 27-38.

**Kalkman, H. O.** (1994). Is migraine prophylactic activity caused by 5-HT<sub>2B</sub> or 5-HT<sub>2C</sub> receptor blockade? *Life Sci* **54**, 641-4.

**Kang, H. Y., Cho, C. L., Huang, K. L., Wang, J. C., Hu, Y. C., Lin, H. K., Chang, C. and Huang, K. E.** (2004). Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res* **19**, 1181-90.

**Karas, R. H., Patterson, B. L. and Mendelsohn, M. E.** (1994). Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* **89**, 1943-50.

**Karila-Cohen, D., Delpy, E., Dubois-Rande, J. L., Puybasset, L., Hittinger, L., Giudicelli, J. F. and Berdeaux, A.** (1999). Influence of the endothelium, nitric oxide and serotonergic receptors on coronary vasomotor responses evoked by ergonovine in conscious dogs. *Br J Pharmacol* **127**, 1039-47.

**Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad, F.** (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* **3**, 23-35.

**Kaufman, M. J., Hartig, P. R. and Hoffman, B. J.** (1995). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor stimulates cyclic GMP formation in choroid plexus. *J Neurochem* **64**, 199-205.

**Keegan, A., Morecroft, I., Smillie, D., Hicks, M. N. and MacLean, M. R.** (2001). Contribution of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT<sub>1B</sub>-receptor knockout mice and the 5-HT<sub>1B/1D</sub>-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* **89**, 1231-9.

**Kellermann, O., Loric, S., Maroteaux, L. and Launay, J. M.** (1996). Sequential onset of three 5-HT receptors during the 5-hydroxytryptaminergic differentiation of the murine 1C11 cell line. *Br J Pharmacol* **118**, 1161-70.

**Kereveur, A., Callebert, J., Humbert, M., Herve, P., Simonneau, G., Launay, J. M. and Drouet, L.** (2000). High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension. Effect of long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2233-9.

**Khan, M. T. F., R. F.** (1987). Similarities of behavior of nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor in perfusion cascade bioassay system. In *Fed Proc*, vol. 46 (ed., pp. 385. abstract.

**Kitamura, K., Singer, W. D., Star, R. A., Muallem, S. and Miller, R. T.** (1996). Induction of inducible nitric-oxide synthase by the heterotrimeric G protein Galpha13. *J Biol Chem* **271**, 7412-5.

**Kornau, H. C., Seeburg, P. H. and Kennedy, M. B.** (1997). Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 368-73.

**Kousteni, S., Han, L., Chen, J. R., Almeida, M., Plotkin, L. I., Bellido, T. and Manolagas, S. C.** (2003). Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* **111**, 1651-64.

**Krantz, J. J.** (1975). Historical background. In *Organic nitrates*, (ed. e. Needleman P), pp. 1-12. Berlin: Springer-Verlag.

**Krasinski, K., Spyridopoulos, I., Asahara, T., van der Zee, R., Isner, J. M. and Losordo, D. W.** (1997). Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* **95**, 1768-72.

**Kredge, J. H., Hodgins, J. B., Hagaman, J. R. and Smithies, O.** (1995). A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* **25**, 1111-5

**Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A.** (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5925-30.

**Kulke, M. H. and Mayer, R. J.** (1999). Carcinoid tumors. *N Engl J Med* **340**, 858-68.

**Kursar, J. D., Nelson, D. L., Wainscott, D. B. and Baez, M.** (1994). Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptor. *Mol Pharmacol* **46**, 227-34.

**Kursar, J. D., Nelson, D. L., Wainscott, D. B., Cohen, M. L. and Baez, M.** (1992). Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine<sub>2F</sub>) from rat stomach fundus. *Mol Pharmacol* **42**, 549-57.

## L

**Lam, K. K., Hu, C. T., Ou, T. Y., Yen, M. H. and Chen, H. I.** (2002). Effects of oestrogen replacement on steady and pulsatile haemodynamics in ovariectomized rats. *Br J Pharmacol* **136**, 811-8.

**Lamping, K. G. and Faraci, F. M.** (2001). Role of sex differences and effects of endothelial NO synthase deficiency in responses of carotid arteries to serotonin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 523-8.

**Lanfume, L. and Hamon, M.** (2004). 5-HT<sub>1</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 1-10.

**Lantin-Hermoso, R. L., Rosenfeld, C. R., Yuhanna, I. S., German, Z., Chen, Z. and Shaul, P. W.** (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* **273**, L119-26.

- Lauder, J. M.** (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* **16**, 233-40.
- Launay, J. M., Birraux, G., Bondoux, D., Callebert, J., Choi, D. S., Loric, S. and Maroteaux, L.** (1996). Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor. *J Biol Chem* **271**, 3141-7.
- Launay, J. M., Herve, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebert, J., Nebigil, C. G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G. et al.** (2002). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* **8**, 1129-35.
- Lee, T. C., Zhao, Y. D., Courtman, D. W. and Stewart, D. J.** (2000). Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **101**, 2345-8.
- Lefkowitz, R. J.** (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* **273**, 18677-80.
- Leinwand, L. A.** (2003). Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* **112**, 302-7.
- Lemire, I., Ducharme, A., Tardif, J. C., Poulin, F., Jones, L. R., Allen, B. G., Hebert, T. E. and Rindt, H.** (2001). Cardiac-directed overexpression of wild-type alpha<sub>1B</sub>-adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H931-8.
- Lemke, G.** (1996). Neuregulins in development. *Mol Cell Neurosci* **7**, 247-62.
- Leu, M., Ehler, E. and Perriard, J. C.** (2001). Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat Embryol (Berl)* **204**, 217-24.
- Leysen, J. E.** (2004). 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 11-26.
- Lezoualc'h, F. and Robert, S. J.** (2003). The serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor and the amyloid precursor protein processing. *Exp Gerontol* **38**, 159-66.
- Li, Y., Kishimoto, I., Saito, Y., Harada, M., Kuwahara, K., Izumi, T., Hamanaka, I., Takahashi, N., Kawakami, R., Tanimoto, K. et al.** (2004). Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology* **145**, 951-8.
- Liang, M., Ekblad, E., Lydrup, M. L. and Nilsson, B. O.** (2003). Combined lack of estrogen receptors alpha and beta affects vascular iNOS protein expression. *Cell Tissues Res* **313**, 63-70.
- Lippert, T. H., Filshie, M., Muck, A. O., Seeger, H. and Zwirner, M.** (1996). Serotonin metabolite excretion after postmenopausal estradiol therapy. *Maturitas* **24**, 37-41.
- Liu, P., Rudick, M. and Anderson, R. G.** (2002). Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* **277**, 41295-8.
- Loric, S., Launay, J. M., Colas, J. F. and Maroteaux, L.** (1992). New mouse 5-HT<sub>2</sub>-like receptor. Expression in brain, heart and intestine. *FEBS Lett* **312**, 203-7.
- Loric, S., Maroteaux, L., Kellermann, O. and Launay, J. M.** (1995). Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation. *Mol Pharmacol* **47**, 458-66.

**Lucas, J. J., Yamamoto, A., Scearce-Levie, K., Saudou, F. and Hen, R.** (1998). Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-Fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice. *J Neurosci* **18**, 5537-44.

**Lundin, L., Landelius, J., Andren, B. and Oberg, K.** (1990). Transoesophageal echocardiography improves the diagnostic value of cardiac ultrasound in patients with carcinoid heart disease. *Br Heart J* **64**, 190-4.

**Lundin, L., Norheim, I., Landelius, J., Oberg, K. and Theodorsson-Norheim, E.** (1988). Carcinoid heart disease: relationship of circulating vasoactive substances to ultrasound-detectable cardiac abnormalities. *Circulation* **77**, 264-9.

## M

**Ma, L., Yu, Z., Xiao, S., Thadani, U., Robinson, C. P. and Patterson, E.** (1998). Supersensitivity to serotonin- and histamine-induced arterial contraction following ovariectomy. *Eur J Pharmacol* **359**, 191-200.

**Manivet, P., Mouillet-Richard, S., Callebert, J., Nebigil, C. G., Maroteaux, L., Hosoda, S., Kellermann, O. and Launay, J. M.** (2000). PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J Biol Chem* **275**, 9324-31.

**Marchbanks, R. M.** (1966). Serotonin binding to nerve ending particles and other preparations from rat brain. *J Neurochem* **13**, 1481-93.

**Marcos, E., Fadel, E., Sanchez, O., Humbert, M., Dartevelle, P., Simonneau, G., Hamon, M., Adnot, S. and Eddahibi, S.** (2004). Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res* **94**, 1263-70.

**Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D. and Wishnok, J. S.** (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* **27**, 8706-11.

**Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Heerdt, L., Berk, B. C., Delafontaine, P. and Bernstein, K. E.** (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* **375**, 247-50.

**Marsh, J. D., Lehmann, M. H., Ritchie, R. H., Gwathmey, J. K., Green, G. E. and Schiebinger, R. J.** (1998). Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* **98**, 256-61.

**Masson, J., Sagne, C., Hamon, M. and El Mestikawy, S.** (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **51**, 439-64.

**Matthes, H., Boschert, U., Amlaiky, N., Grailhe, R., Plassat, J. L., Muscatelli, F., Mattei, M. G. and Hen, R.** (1993). Mouse 5-hydroxytryptamine<sub>5A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>5B</sub> receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol Pharmacol* **43**, 313-9.

**Mattson, D. L.** (1998). Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice. *Am J Physiol* **274**, R564-70.

- McKune, C. M. and Watts, S. W.** (2001). Characterization of the serotonin receptor mediating contraction in the mouse thoracic aorta and signal pathway coupling. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 88-95.
- Mendelsohn, M. E.** (2000a). Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**, 337-43.
- Mendelsohn, M. E.** (2000b). Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res* **87**, 956-60.
- Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H.** (1994). Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol* **9**, 619-26.
- Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H.** (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* **340**, 1801-11.
- Mercier, I., Pham-Dang, M., Clement, R., Gosselin, H., Colombo, F., Rouleau, J. L. and Calderone, A.** (2002). Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET(A) receptor antagonist therapy: absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol* **136**, 685-92.
- Mercuro, G., Zoncu, S., Saiu, F., Mascia, M., Melis, G. B. and Rosano, G. M.** (2004). Menopause induced by oophorectomy reveals a role of ovarian estrogen on the maintenance of pressure homeostasis. *Maturitas* **47**, 131-8.
- Metais, C., Bianchi, C., Li, J., Simons, M. and Sellke, F. W.** (2001). Serotonin-induced human coronary microvascular contraction during acute myocardial ischemia is blocked by COX-2 inhibition. *Basic Res Cardiol* **96**, 59-67.
- Meulemans, A. L., Helsen, L. F. and Schuurkes, J. A.** (1993). The role of nitric oxide (NO) in 5-HT-induced relaxations of the guinea-pig stomach. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **348**, 424-30.
- Mialet, J., Berque-Bestel, I., Eftekhari, P., Gastineau, M., Giner, M., Dahmoune, Y., Donzeau-Gouge, P., Hoebeke, J., Langlois, M., Sicsic, S. et al.** (2000). Isolation of the serotonergic 5-HT<sub>4</sub>(e) receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Br J Pharmacol* **129**, 771-81.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. and Auricchio, F.** (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* **15**, 1292-300.
- Modlin, I. M. and Sandor, A.** (1997). An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer* **79**, 813-29.
- Moggs, J. G., Deavall, D. G. and Orphanides, G.** (2003). Sex steroids, ANGELS and osteoporosis. *Bioessays* **25**, 195-9.
- Moncada, S. and Higgs, A.** (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**, 2002-12.
- Moncada, S., Higgs, A. and Furchgott, R.** (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* **49**, 137-42.

**Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A.** (1988). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* **12**, 365-72.

**Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A.** (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* **38**, 1709-15.

**Monsma, F. J., Jr., Shen, Y., Ward, R. P., Hamblin, M. W. and Sibley, D. R.** (1993). Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol Pharmacol* **43**, 320-7.

**Moser, P. C., Bergis, O. E., Jegham, S., Lothead, A., Duconseille, E., Terranova, J. P., Caille, D., Berque-Bestel, I., Lezoualc'h, F., Fischmeister, R. et al.** (2002). SL65.0155, a novel 5-hydroxytryptamine(4) receptor partial agonist with potent cognition-enhancing properties. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 731-41.

**Moskowitz, M. A.** (1992). Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 307-11.

**Moyses, M. R., Barker, L. A. and Cabral, A. M.** (2001). Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart. *Braz J Med Biol Res* **34**, 949-58.

**Mucke, H. A.** (2001). Mt-500 (Pozen). *Curr Opin Investig Drugs* **2**, 419-21.

**Muller-Delp, J. M., Lubahn, D. B., Nichol, K. E., Philips, B. J., Price, E. M., Curran, E. M. and Laughlin, M. H.** (2003). Regulation of nitric oxide-dependent vasodilation in coronary arteries of estrogen receptor-alpha-deficient-mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H2150-7.

**Mungrue, I. N., Husain, M. and Stewart, D. J.** (2002). The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev* **7**, 407-22.

**Murad, F.** (1994). The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res* **49**, 239-48.

## N

**Nadal, A., Ropero, A. B., Fuentes, E. and Soria, B.** (2001). The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci* **22**, 597-9.

**Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F. D., Dal Bello, B., Semigran, M. J., Bielsa-Masdeu, A., Dec, G. W. et al.** (1999). Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8144-9.

**Nathan, C.** (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* **6**, 3051-64.

**Nathan, C. and Xie, Q. W.** (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-8.

**Nathan, C. F. and Hibbs, J. B., Jr.** (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**, 65-70.

- Nathan, L. and Chaudhuri, G.** (1997). Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 477-515.
- Nathans, J. and Hogness, D. S.** (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* **34**, 807-14.
- Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (2000a). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9508-13.
- Nebigil, C. G., Etienne, N., Messaddeq, N. and Maroteaux, L.** (2003a). Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT<sub>2B</sub> receptor signaling. *Faseb J* **17**, 1373-5.
- Nebigil, C. G., Etienne, N., Schaerlinger, B., Hickel, P., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (2001a). Developmentally regulated serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Int J Dev Neurosci* **19**, 365-72.
- Nebigil, C. G., Hickel, P., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Douchet, M. P., Monassier, L., Gyorgy, K., Matz, R., Andriantsitohaina, R., Manivet, P. et al.** (2001b). Ablation of serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* **103**, 2973-9.
- Nebigil, C. G., Jaffre, F., Messaddeq, N., Hickel, P., Monassier, L., Launay, J. M. and Maroteaux, L.** (2003b). Overexpression of the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy. *Circulation* **107**, 3223-9.
- Nebigil, C. G., Launay, J. M., Hickel, P., Tournois, C. and Maroteaux, L.** (2000b). 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways.
- Nebigil, C. G. and Maroteaux, L.** (2003). Functional consequence of serotonin/5-HT<sub>2B</sub> receptor signaling in heart: role of mitochondria in transition between hypertrophy and heart failure? *Circulation* **108**, 902-8.
- Nelson, D. L.** (2004). 5-HT<sub>5</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 53-8.
- Nemecek, G. M., Coughlin, S. R., Handley, D. A. and Moskowitz, M. A.** (1986). Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 674-8.
- Newberry, N. R., Watkins, C. J., Volenec, A. and Flanigan, T. P.** (1996). 5-HT<sub>2B</sub> receptor mRNA in guinea pig superior cervical ganglion. *Neuroreport* **7**, 2909-11.
- Newton, R. A., Phipps, S. L., Flanigan, T. P., Newberry, N. R., Carey, J. E., Kumar, C., McDonald, B., Chen, C. and Elliott, J. M.** (1996). Characterisation of human 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors expressed in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: comparative stimulation by hallucinogenic drugs. *J Neurochem* **67**, 2521-31.
- Ni, W., Thompson, J. M., Northcott, C. A., Lookingland, K. and Watts, S. W.** (2004). The serotonin transporter is present and functional in peripheral arterial smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* **43**, 770-81.

**Node, K., Kitakaze, M., Kosaka, H., Minamino, T., Sato, H., Kuzuya, T. and Hori, M.** (1997). Roles of NO and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in ischemic heart failure. *Faseb J* **11**, 793-9.

**Nuedling, S., Kahlert, S., Loebbert, K., Meyer, R., Vetter, H. and Grohe, C.** (1999). Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* **454**, 271-6.

## O

**O'Connell, T. D., Ishizaka, S., Nakamura, A., Swigart, P. M., Rodrigo, M. C., Simpson, G. L., Cotecchia, S., Rokosh, D. G., Grossman, W., Foster, E. et al.** (2003). The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest* **111**, 1783-91.

**Olesen, J., Thomsen, L. L. and Iversen, H.** (1994). Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 149-53.

**Olesen, J., Thomsen, L. L., Lassen, L. H. and Olesen, I. J.** (1995). The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* **15**, 94-100.

**Oliver, P. M., Fox, J. E., Kim, R., Rockman, H. A., Kim, H. S., Reddick, R. L., Pandey, K. N., Milgram, S. L., Smithies, O. and Maeda, N.** (1997). Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14730-5.

**Olsson, M. C., Palmer, B. M., Leinwand, L. A. and Moore, R. L.** (2001). Gender and aging in a transgenic mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1136-44.

**Osterlund, M. K. and Hurd, Y. L.** (1998). Acute 17 beta-estradiol treatment down-regulates serotonin 5HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression in the limbic system of female rats. *Brain Res Mol Brain Res* **55**, 169-72.

**Ouchi, Y., Share, L., Crofton, J. T., Iitake, K. and Brooks, D. P.** (1987). Sex difference in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension* **9**, 172-7.

## P

**Pakala, R., Willerson, J. T. and Benedict, C. R.** (1994). Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation* **90**, 1919-26.

**Pakala, R., Willerson, J. T. and Benedict, C. R.** (1997). Effect of serotonin, thromboxane A<sub>2</sub>, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* **96**, 2280-6.

**Palmer, R. M., Ashton, D. S. and Moncada, S.** (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664-6.

**Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S.** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-6.

**Pappas, T. C., Gametchu, B. and Watson, C. S.** (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J* **9**, 404-10.

**Paris, G., Sugar, I. P., Gonsiorek, W., Loza, M. I., Tristan, H., Honrubia, M. and Maayani, S.** (1997). Rapid desensitization and concurrent resensitization of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor in stomach fundus. In *ASPET*, (ed. San Diego, CA).

**Parsons, A. A.** (1991). 5-HT receptors in human and animal cerebrovasculature. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 310-5.

**Pauwels, P. J.** (1997). 5-HT 1B/D receptor antagonists. *Gen Pharmacol* **29**, 293-303.

**Pelzer, T., Schumann, M., Neumann, M., deJager, T., Stimpel, M., Serfling, E. and Neyses, L.** (2000). 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 192-200.

**Peotta, V. A., Vasquez, E. C. and Meyrelles, S. S.** (2001). Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. *Hypertension* **38**, 555-9.

**Peroutka, S. J. and Snyder, S. H.** (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]lysergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. *Mol Pharmacol* **16**, 687-99.

**Pfeilschifter, J., Koditz, R., Pfohl, M. and Schatz, H.** (2002). Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* **23**, 90-119.

**Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J.** (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 727-33.

**Poissonnet, G., Parmentier, J. G., Boutin, J. A. and Goldstein, S.** (2004). The emergence of selective 5-HT<sub>2B</sub> antagonists structures, activities and potential therapeutic applications. *Mini Rev Med Chem* **4**, 325-30.

**Pritchett, D. B., Bach, A. W., Wozny, M., Taleb, O., Dal Toso, R., Shih, J. C. and Seeburg, P. H.** (1988). Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT<sub>2</sub> receptor. *Embo J* **7**, 4135-40.

## R

**Ramboz, S., Saudou, F., Amara, D. A., Belzung, C., Segu, L., Misslin, R., Buhot, M. C. and Hen, R.** (1996). 5-HT<sub>1B</sub> receptor knock out--behavioral consequences. *Behav Brain Res* **73**, 305-12.

**Rand, M. J.** (1992). Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **19**, 147-69.

**Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. and Moore, P. K.** (2003a). Other peripheral mediators : 5-hydroxytryptamine and purines. In *Pharmacology, Fifth Edition 2003*, (ed. C. Livingstone), pp. 185. Edinburgh.

**Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. and Moore, P. K.** (2003b). The vascular system. In *Pharmacology, Fifth Edition 2003*, (ed. C. Livingstone), pp. 285-305. Edinburgh.

**Rapport, M. M., Green, A.A., and Page, I.H.** (1947). Purification of substance which is responsible for vasoconstrictor activity of serum. *Fed. Proc.* **6**, 184.

- Rapport, M. M., Green, A.A., and Page, I.H.** (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin) : isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **176**, 1243-1251.
- Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J. and Levin, E. R.** (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* **16**, 100-115.
- Rees, D. D., Palmer, R. M., Hodson, H. F. and Moncada, S.** (1989a). A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* **96**, 418-24.
- Rees, D. D., Palmer, R. M. and Moncada, S.** (1989b). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3375-8.
- Reis, S. E.** (1994). Oestrogens attenuate abnormal coronary vasoreactivity in postmenopausal women. *Ann Med* **26**, 387-8.
- Rindi, G., Bordi, C., Rappell, S., La Rosa, S., Stolte, M. and Solcia, E.** (1996). Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology, and behavior. *World J Surg* **20**, 168-72.
- Riveiro, A., Mosquera, A., Calvo, C., Alonso, M., Macia, M. and Cores, M.** (2001). Long-term effect of bilateral ovariectomy on endothelial function in aortic rings of spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide. *Gynecol Endocrinol* **15**, 158-64.
- Robiolio, P. A., Rigolin, V. H., Wilson, J. S., Harrison, J. K., Sanders, L. L., Bashore, T. M. and Feldman, J. M.** (1995). Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* **92**, 790-5.
- Roson, M. I., Maquieira, M. K. and de la Riva, I. J.** (1990). Contrasting effects of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine on contractility of abdominal aorta of two kidney-two clip hypertensive rats. Effects of inhibitors of arachidonic acid metabolic enzymes. *Clin Exp Hypertens A* **12**, 285-306.
- Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C. et al.** (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* **288**, 321-33.
- Roth, B. L., Willins, D. L., Kristiansen, K. and Kroeze, W. K.** (1998). 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub>-family receptors (5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub>): where structure meets function. *Pharmacol Ther* **79**, 231-57.
- Russell, A., Banes, A., Berlin, H., Fink, G. D. and Watts, S. W.** (2002). 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-L-arginine hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 179-87.

## S

- Sainz, J., Osuna, A., Wangenstein, R., de Dios Luna, J., Rodriguez-Gomez, I., Duarte, J., Moreno, J. M. and Vargas, F.** (2004). Role of sex, gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced hypertension. *Exp Physiol* **89**, 155-62.

- Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P.** (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7240-4.
- Sanada, S., Kitakaze, M., Node, K., Takashima, S., Ogai, A., Asanuma, H., Sakata, Y., Asakura, M., Ogita, H., Liao, Y. et al.** (2001). Differential subcellular actions of ACE inhibitors and AT(1) receptor antagonists on cardiac remodeling induced by chronic inhibition of NO synthesis in rats. *Hypertension* **38**, 404-11.
- Sanders-Bush, E., Fentress, H. and Hazelwood, L.** (2003). Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors: molecular and genomic diversity. *Mol Interv* **3**, 319-30.
- Saxena, P. R. and Villalon, C. M.** (1991). 5-Hydroxytryptamine: a chameleon in the heart. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 223-7.
- Schaerlinger, B., Hickel, P., Etienne, N., Guesnier, L. and Maroteaux, L.** (2003). Agonist actions of dihydroergotamine at 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors and their possible relevance to antimigraine efficacy. *Br J Pharmacol* **140**, 277-84.
- Schmuck, K., Ullmer, C., Engels, P. and Lubbert, H.** (1994). Cloning and functional characterization of the human 5-HT<sub>2B</sub> serotonin receptor. *FEBS Lett* **342**, 85-90.
- Schmuck, K., Ullmer, C., Kalkman, H. O., Probst, A. and Lubbert, H.** (1996). Activation of meningeal 5-HT<sub>2B</sub> receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur J Neurosci* **8**, 959-67.
- Sharkey, L. C., Holycross, B. J., Park, S., Shiry, L. J., Hoepf, T. M., McCune, S. A. and Radin, M. J.** (1999). Effect of ovariectomy and estrogen replacement on cardiovascular disease in heart failure-prone SHHF/Mcc- fa cp rats. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1527-37.
- Shaul, P. W.** (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* **64**, 749-74.
- Shaul, P. W. and Anderson, R. G.** (1998). Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* **275**, L843-51.
- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C. and Smithies, O.** (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13176-81.
- Shibata, H., Spencer, T. E., Onate, S. A., Jenster, G., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W.** (1997). Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res* **52**, 141-64; discussion 164-5.
- Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Kurosaki, K., Okada, K., Saito, T. and Shimada, K.** (1997). Serotonin inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells stimulated with interleukin-1. *Eur J Pharmacol* **338**, 97-104.
- Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., Cantley, L. C. and Izumo, S.** (2000). The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *Embo J* **19**, 2537-48.

**Shioi, T., McMullen, J. R., Kang, P. M., Douglas, P. S., Obata, T., Franke, T. F., Cantley, L. C. and Izumo, S.** (2002). Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **22**, 2799-809.

**Shiojima, I., Yefremashvili, M., Luo, Z., Kureishi, Y., Takahashi, A., Tao, J., Rosenzweig, A., Kahn, C. R., Abel, E. D. and Walsh, K.** (2002). Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem* **277**, 37670-7.

**Shuey, D. L., Sadler, T. W. and Lauder, J. M.** (1992). Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology* **46**, 367-78.

**Simoncini, T., Rabkin, E. and Liao, J. K.** (2003). Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 198-203.

**Simonneau, G., Galie, N., Rubin, L. J., Langleben, D., Seeger, W., Domenighetti, G., Gibbs, S., Lebrech, D., Speich, R., Beghetti, M. et al.** (2004). Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* **43**, 5S-12S.

**Snyder, S. H. and Brecht, D. S.** (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* **266**, 68-71, 74-7.

**Stamler, J., Stamler, R., Riedlinger, W. F., Algra, G. and Roberts, R. H.** (1976). Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *Jama* **235**, 2299-306.

**Studel, W., Ichinose, F., Huang, P. L., Hurford, W. E., Jones, R. C., Bevan, J. A., Fishman, M. C. and Zapol, W. M.** (1997). Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ Res* **81**, 34-41.

**Stevens, L. T., and Lee, F.S.** (1884). Action of intermittent pressure and of defibrinated blood upon blood vessels of frog and terrapin. *Johns Hopkins Biol. Studies* **3**, 99.

**Stuehr, D. J. and Marletta, M. A.** (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7738-42.

**Sudhir, K., Ko, E., Zellner, C., Wong, H. E., Hutchison, S. J., Chou, T. M. and Chatterjee, K.** (1997). Physiological concentrations of estradiol attenuate endothelin 1-induced coronary vasoconstriction in vivo. *Circulation* **96**, 3626-32.

**Sullivan, T. R., Jr., Karas, R. H., Aronovitz, M., Faller, G. T., Ziar, J. P., Smith, J. J., O'Donnell, T. F., Jr. and Mendelsohn, M. E.** (1995). Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *J Clin Invest* **96**, 2482-8.

**Szabo, C. and Thiemermann, C.** (1995). Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* **34**, 113-53.

## T

- Takahashi, H., Hara, K., Komiyama, Y., Masuda, M., Murakami, T., Nishimura, M., Nambu, A. and Yoshimura, M.** (1995). Mechanism of hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide in rats. *Hypertens Res* **18**, 319-24.
- Tamura, K., Yamaguchi, K. and Kogo, H.** (2000). 17Beta-estradiol inhibits ovariectomy-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat aorta in vivo. *Life Sci* **66**, PL 259-64.
- Tannenbaum, S. R., Fett, D., Young, V. R., Land, P. D. and Bruce, W. R.** (1978). Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science* **200**, 1487-9.
- Tecott, L. H., Sun, L. M., Akana, S. F., Strack, A. M., Lowenstein, D. H., Dallman, M. F. and Julius, D.** (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. *Nature* **374**, 542-6.
- Teoh, H., Quan, A., Leung, S. W. and Man, R. Y.** (2000). Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* **129**, 1301-8.
- Tharaux, P. L., Chatziantoniou, C., Casellas, D., Fouassier, L., Ardaillou, R. and Dussaule, J. C.** (1999). Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephroangiosclerosis during nitric oxide synthase inhibition in rats. *Circulation* **99**, 2185-91.
- Thomas, D. R. and Hagan, J. J.** (2004). 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 81-90.
- Thompson, L. P. and Webb, R. C.** (1987). Vascular responsiveness to serotonin metabolites in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* **9**, 277-81.
- Tostes, R. C., Nigro, D., Fortes, Z. B. and Carvalho, M. H.** (2003). Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* **36**, 1143-58.
- Tournois, C., Mutel, V., Manivet, P., Launay, J. M. and Kellermann, O.** (1998). Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* **273**, 17498-503.
- Towbin, J. A.** (1998). The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 131-9.
- Tran, C. T., Leiper, J. M. and Vallance, P.** (2003). The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* **4**, 33-40.
- Triggle, C. R., Hollenberg, M., Anderson, T. J., Ding, H., Jiang, Y., Ceroni, L., Wiehler, W. B., Ng, E. S., Ellis, A., Andrews, K. et al.** (2003). The endothelium in health and disease—a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res* **39**, 249-67.
- Twarog, B. M. and Page, I. H.** (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* **175**, 157-61.

## U

**Ullmer, C., Boddeke, H. G., Schmuck, K. and Lubbert, H.** (1996). 5-HT<sub>2B</sub> receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* **117**, 1081-8.

**Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H. O. and Lubbert, H.** (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett* **370**, 215-21.

## V

**Vallance, P., Collier, J. and Moncada, S.** (1989). Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* **2**, 997-1000.

**Van de Kar, L. D., Javed, A., Zhang, Y., Serres, F., Raap, D. K. and Gray, T. S.** (2001). 5-HT<sub>2A</sub> receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J Neurosci* **21**, 3572-9.

**van Eickels, M., Grohe, C., Cleutjens, J. P., Janssen, B. J., Wellens, H. J. and Doevendans, P. A.** (2001). 17 $\beta$ -estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **104**, 1419-23.

**van Hooft, J. A. and Yakel, J. L.** (2003). 5-HT<sub>3</sub> receptors in the CNS: 3B or not 3B? *Trends Pharmacol Sci* **24**, 157-60.

**Vane, J. R., Anggard, E. E. and Botting, R. M.** (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* **323**, 27-36.

**Vanes, J. R.** (1957). *Br J Pharmacol* **12**, 344:349.

**Vanhoenacker, P., Haegeman, G. and Leysen, J. E.** (2000). 5-HT<sub>7</sub> receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 70-7.

**Vanhoutte, P. M.** (1989). Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension* **13**, 658-67.

**Verheggen, R., Hundeshagen, A. G., Brown, A. M., Schindler, M. and Kaumann, A. J.** (1998). 5-HT<sub>1B</sub> receptor-mediated contractions in human temporal artery: evidence from selective antagonists and 5-HT receptor mRNA expression. *Br J Pharmacol* **124**, 1345-54.

**Vialli, M. a. E., V.** (1933). Cellule enterocromaffini e cellule basigranulose acidofole nei vertebrati. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **19**, 743.

**Vikenes, K., Farstad, M. and Nordrehaug, J. E.** (1999). Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. *Circulation* **100**, 483-9.

**Villalon, C. M., de Vries, P. and Saxena, P. R.** (1997). Serotonin receptors as cardiovascular targets. *Drug Discovery Today* **2**, 294:300.

**Villazon, M., Padin, J. F., Cadavid, M. I., Enguix, M. J., Tristan, H., Orallo, F. and Loza, M. I.** (2002). Functional characterization of serotonin receptors in rat isolated aorta. *Biol Pharm Bull* **25**, 584-90.

## W

- Wade, C. B., Robinson, S., Shapiro, R. A. and Dorsa, D. M.** (2001). Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* **142**, 2336-42.
- Wainscott, D. B., Cohen, M. L., Schenck, K. W., Audia, J. E., Nissen, J. S., Baez, M., Kursar, J. D., Lucaites, V. L. and Nelson, D. L.** (1993). Pharmacological characteristics of the newly cloned rat 5-hydroxytryptamine<sub>2F</sub> receptor. *Mol Pharmacol* **43**, 419-26.
- Wainscott, D. B., Lucaites, V. L., Kursar, J. D., Baez, M. and Nelson, D. L.** (1996). Pharmacologic characterization of the human 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptor: evidence for species differences. *J Pharmacol Exp Ther* **276**, 720-7.
- Walford, G. and Loscalzo, J.** (2003). Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* **1**, 2112-8.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. et al.** (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7889-93.
- Wattanapernpool, J. and Reiser, P. J.** (1999). Differential effects of ovariectomy on calcium activation of cardiac and soleus myofilaments. *Am J Physiol* **277**, H467-73.
- Watts, S. W.** (2002). Serotonin-induced contraction in mesenteric resistance arteries: signaling and changes in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* **39**, 825-9.
- Watts, S. W., Baez, M. and Webb, R. C.** (1996). The 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptor and 5-HT receptor signal transduction in mesenteric arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **277**, 1103-13.
- Watts, S. W. and Cohen, M. L.** (1999). Vascular 5-HT receptors: pharmacology and pathophysiology of 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors.
- Watts, S. W. and Fink, G. D.** (1999). 5-HT<sub>2B</sub>-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *Am J Physiol* **276**, H944-52.
- Watts, S. W. and Harris, B.** (1999). Is functional upregulation of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor in deoxycorticosterone acetate salt-treated rats blood pressure dependent? *Gen Pharmacol* **33**, 439-47.
- Watts, S. W. and Webb, R. C.** (1994). Mechanism of ergonovine-induced contraction in the mesenteric artery from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* **269**, 617-25.
- Westbroek, I., van der Plas, A., de Rooij, K. E., Klein-Nulend, J. and Nijweide, P. J.** (2001). Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem* **276**, 28961-8.
- Widder, J., Pelzer, T., von Poser-Klein, C., Hu, K., Jazbutyte, V., Fritzemeier, K. H., Hegele-Hartung, C., Neyses, L. and Bauersachs, J.** (2003). Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor-alpha stimulation in ovariectomized SHR. *Hypertension* **42**, 991-6.

**Wiesmann, F., Ruff, J., Hiller, K. H., Rommel, E., Haase, A. and Neubauer, S.** (2000). Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H652-7.

**Wilkinson, L. O., Auerbach, S. B. and Jacobs, B. L.** (1991). Extracellular serotonin levels change with behavioral state but not with pyrogen-induced hyperthermia. *J Neurosci* **11**, 2732-41.

**Williams, J. K., Adams, M. R., Herrington, D. M. and Clarkson, T. B.** (1992). Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* **20**, 452-7.

**Wollert, K. C. and Drexler, H.** (2002). Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev* **7**, 317-25.

**Woolley, M. L., Marsden, C. A. and Fone, K. C.** (2004). 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 59-79.

## X

**Xin, H. B., Senbonmatsu, T., Cheng, D. S., Wang, Y. X., Copello, J. A., Ji, G. J., Collier, M. L., Deng, K. Y., Jeyakumar, L. H., Magnuson, M. A. et al.** (2002). Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* **416**, 334-8.

**Xu, H. L., Santizo, R. A., Baughman, V. L. and Pelligrino, D. A.** (2003). Nascent EDHF-mediated cerebral vasodilation in ovariectomized rats is not induced by eNOS dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H2045-53.

## Y

**Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Tamir, H., Sadler, T. W. and Lauder, J. M.** (1993). Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* **47**, 573-84.

## Z

**Zatz, R. and Baylis, C.** (1998). Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* **32**, 958-64.

**Zemojtel, T., Penzkofer, T., Dandekar, T. and Schultz, J.** (2004). A novel conserved family of nitric oxide synthase? *Trends Biochem Sci* **29**, 224-6.

**Zhang, Y., Carreras, D. and de Bold, A. J.** (2003). Discoordinate re-expression of cardiac fetal genes in N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hypertension. *Cardiovasc Res* **57**, 158-67.

**Zhao, Y. Y., Feron, O., Dessy, C., Han, X., Marchionni, M. A. and Kelly, R. A.** (1999). Neuregulin signaling in the heart. Dynamic targeting of erbB4 to caveolar microdomains in cardiac myocytes. *Circ Res* **84**, 1380-7.

**Zhu, W. and Smart, E. J.** (2003). Caveolae, estrogen and nitric oxide. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 114-7.

**Zhu, Y., Bian, Z., Lu, P., Karas, R. H., Bao, L., Cox, D., Hodgin, J., Shaul, P. W., Thoren, P., Smithies, O., Gustafsson, J. A. and Mendelsohn, M. E. (2002). Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* **295**, 505-8.**

# Annexes