

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire

(EA 7296)

THÈSE présentée par :

Roland Fabrice LAWSON

Soutenue, le 30 Septembre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Pharmacologie**

**IMPLICATION DE LA SEROTONINE ET DES RECEPTEURS
5-HT₂ DANS LE REMODELAGE VALVULAIRE CARDIAQUE**

DIRECTEUR DE THÈSE :

Monsieur MONASSIER Laurent Professeur, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur MEROT Jean Chargé de recherche, Institut du Thorax, Université de Nantes

Madame MIALET-PEREZ Jeanne Chargée de recherche, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Université Paul Sabatier, Toulouse

AUTRES MEMBRES :

Monsieur GENY Bernard Professeur, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg

Monsieur MAROTEAUX Luc Directeur de recherche, Institut du Fer à Moulin, Université Pierre et Marie Curie, Paris

« **Mens agitat molem** » (l'Énéide, VI)

Virgile (70 - 19 av. J.-C.)

DEDICACES

Symbole de la jarre trouée



« Si chacun de vous, peut boucher un de ces trous avec son doigt, la jarre retiendra de l'eau ». Roi Guézo (1818-1858 ; Royaume du Dahomey actuel Bénin)

Je dédie cette thèse à toute ma famille.

Et tout particulièrement :

À ma moitié Tania et à mon fils Kenneth.

À mes parents, Paul et Philomène.

À ma tante et son époux, Colette et Luc.

À mes frères et sœurs, Carolle-Erick, Judith et Judicaël

REMERCIEMENTS

Je voudrais adresser mes remerciements,

À tous les membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail et pour leurs contributions à l'amélioration de sa qualité scientifique.

À mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Laurent Monassier, pour m'avoir accueilli dans son équipe et façonné avec une grande et remarquable pédagogie. J'ai beaucoup appris tant scientifiquement que sur le plan humain à vos côtés. Profonde reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Pascal Bousquet, pour m'avoir accepté dans son unité de recherche et contribué significativement à ma formation. Vous êtes une grande icône de la pharmacologie de notre époque et un véritable modèle pour nous, jeunes pharmacologues.

À toute l'équipe du Service de Pathologie du Centre Hospitalier Général Emile Müller de Mulhouse, pour leur contribution à ce travail et tout particulièrement à Monsieur le Docteur Bernard Gasser et à ses collaboratrices, Mesdames Hélène Rouillard et Jordane Stoltz.

À toute l'équipe de la plate-forme cardiovasculaire et d'histologie de l'Institut Clinique de la Souris (ICS-Strasbourg), en particulier à Mesdames Ghina Bou About et Olivia Wendling et à Messieurs Roy Combe et Hugues Jacobs.

À tous les organismes financeurs de ces travaux (Fondation de France, Fondation pour la Recherche Médicale et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

À Monsieur le Docteur Luc Maroteaux, pour ses précieux conseils et son soutien pour la réalisation de ces travaux.

À Messieurs les Professeurs Ralf Brandes (Université de Francfort) et Axel Gödecke (Université de Düsseldorf), qui ont généreusement mis à ma disposition une cohorte de souris transgéniques générée par leurs laboratoires.

À tout le personnel du Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire (EA7296), pour ces années d'échange et de fraternité. J'adresse particulièrement mes remerciements à :

Monsieur le Docteur Hugues Greney, pour ses précieux conseils, pour son implication personnelle dans ma formation aux techniques de biochimie et de biologie cellulaire et pour sa grande sympathie et amitié.

Madame la Docteure Nathalie Niederhöffer, pour sa contribution à ma formation et surtout pour m'avoir accompagné et conseillé sur le plan pédagogique pendant mes premiers pas de moniteur d'enseignement.

Madame Claudia de Tapia, pour son aide précieuse à l'achèvement de ces travaux, pour toute son attention et sa collaboration.

Madame la Docteure Estelle Ayme-Dietrich pour toutes ces années de collaboration efficace et cette passion partagée pour la sérotonine.

Mesdames Denise Jung et Sylvia Mutterer, pour leurs bons conseils, leur disponibilité et toute leur sympathie.

Madame la Docteure Camille Doras, Messieurs les Docteurs Luc Gigou, Walid Mokni, Marc-André Laplante, Florian Zorres, Erwan Bui, Halim Marzak et Brahim Belbellaa pour m'avoir fait bénéficier à diverses échelles de leurs expertises et bons conseils d'ainés.

Mesdames Maud Weiss, Magali Beaughey, Gaëlle Aubertin-Kirch et Houda Bouhadja pour leurs grandes qualités humaines et l'entraide quotidienne au laboratoire.

Mesdames Soumaya Bouchoucha, Lucie Tischmacher, Marine Dorsi, Monsieur Djamil Benameur, pour nos divers échanges lors de votre passage au laboratoire.

À Messieurs les Professeurs Anatole Laleyè et Bonaventure Awédé pour leur soutien tout au long de ma formation.

À tous mes amis de Cotonou, Strasbourg, Besançon et d'ailleurs.

À tous les membres de l'Association des Diplômés de la Diaspora Africaine (ADDA).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT : 5-hydroxytryptamine

5-HIAA : acide 5-hydroxy-indole acétique

8-OH-DPAT : 8-hydroxy-propylaminotétraline

AC : adénylate cyclase

ACTA2 : alpha-actin-2

ACTH : adrénocorticotrophine

Adam17 (ou TACE) : metallopeptidase domain 17

AKT : protéine kinase B

ALK : activin receptor-like kinase

AML : actine de muscle lisse

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

AngII : angiotensine II

AT1 : récepteur type 1 de l'angiotensine II

ATP : adénosine triphosphate

BHE : barrière hémato-encéphalique

BMP (BMPR) : bone morphogenetic protein (BMP receptor)

BrdU : bromodéoxyuridine

Cdc 42 : cell division control protein 42 homolog

CREMEAS : Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale - Strasbourg

Cx 45 : connexine 45

DAG : diacylglycérol

DOCA : acétate de déoxycorticostérone

DS-CAM : Down syndrome cell adhesion molecule

DSCR1 : Down syndrome critical region gene 1

DTD : diamètre télédiastolique

DTS : diamètre télésystolique

EGF : epidermal growth factor

ERK : extracellular regulated kinase

FBN1 : fibrilline 1

FDA : Food and Drug Administration

FGF : fibroblast growth factor
GABA : acide γ -aminobutyrique
GIPC : G alpha interacting protein C-terminus
GIRK : G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels
GRK : G protein receptor kinase
HB-EGF : heparin-binding EGF-like growth factor
HPLC : high-performance liquid chromatography
HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
IL-1 β : interleukine-1 béta
IL-6 : interleukine-6
IMC : indice de masse corporelle
IP3 : inositol triphosphate
I(S)RS : inhibiteur (sélectif) de recapture de la sérotonine
Iso : isoprotérénol
ITV : intégrale temps-vitesse
IUPHAR : International Union of Basic and Clinical Pharmacology
KLF2 : Krüppel-like factor 2
KO : knockout
L-NAME : L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
LSD : diéthylamide de l'acide lysergique
MAO : monoamine oxydase
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MDMA : 3,4-méthylène-dioxy-méthamphétamine (ecstasy)
MLC : myosin light chain
MMPs : métalloprotéinases matricielles
NCAM : neural cell adhesion molecule
NdF : nordexfenfluramine
NF1 : neurofibromin 1
NFATc1 : nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
NO : monoxyde d'azote
NOS (eNOS) : nitric oxide synthase (endothelial NOS)
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1
pCPA : parachlorophénylalanine
PDGFR : platelet-derived growth factor receptor

PECAM : platelet endothelial cell adhesion molecule
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PLC : phospholipase C
PP : paroi postérieure
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
RhoA : Ras homolog gene family member A
SERT : transporteur de la sérotonine
SNC : système nerveux central
TACE (ou Adam17): tumour necrosis factor-alpha converting enzyme
TEM : transition endothélio-mésenchymateuse
TGF- β : tumour growth factor-beta
TNF- α : tumour necrosis factor-alpha
TPH : tryptophane hydroxylase
VEC : valvular endothelial cells
VIC : valvular interstitial cells
VEGF (VEGFR) : vascular endothelial growth factor (VEGF receptor)
Vmax : vitesse maximale en systole

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des tableaux

<i>Numéros</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
1	Récapitulatif des récepteurs sérotoninergiques, leurs ligands de référence et les voies de couplage activées	22
2	Récepteurs sérotoninergiques dans l'appareil cardio-circulatoire	28
3	Aspects physiques, caractéristiques génétiques et provenances des souris	88
4	Groupes expérimentaux constitués par les souris "sauvages"	89
5	Groupes expérimentaux constitués par les souris transgéniques	89
6	Traitements pharmacologiques, doses et méthodes d'administration	90
7	Caractéristiques pharmacologiques de la 5-HT, de la NdF et du BW723C86 sur certaines voies de couplage des récepteurs 5-HT _{2B}	130
8	Dosage de la 5-HT sanguine et du 5-HIAA urinaire	131
9	Évaluation du remodelage cardiaque et analyse histologique des valves	132
10	Séquences des amorces utilisées en RT-PCR	137
11	Caractéristiques des anticorps anti-5-HT _{2B} et CD31 utilisés en immunocytochimie	137
12	Substances bioactives produites par les tumeurs carcinoïdes	153
13	Séquences des amorces utilisées en RT-PCR	159
14	Suivi des souris et paramètres recueillis	162
15	Dosage de la 5-HT intracellulaire	163
16	Dosage de la 5-HT dans le surnageant de culture	163
17	Paramètres physiques à l'autopsie	166
18	Paramètres hémodynamiques à J.90	167
19	Caractéristiques échographiques à J.90	167
20	Modalités de cotation du score d'expansion tumorale	170
21	Aspects macroscopique et histologique de la rate et du foie d'une souris xénogreffée (groupe BON)	171

Liste des figures

<i>Numéros</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
1	Biosynthèse et métabolisme de la 5-HT	5
2	Cibles pharmacologiques de la 5-HT	7
3	Isoformes des récepteurs 5-HT ₄	18
4	Circuit de la 5-HT en périphérie	26
5	Principaux récepteurs sérotoninergiques exprimés dans le cœur	27
6	Implication du système sérotoninergique et des facteurs génétiques prédisposant dans l'HTAP induite par les anorexigènes	37
7	Coupes anatomiques du cœur mettant en évidence les valves cardiaques	47
8	Organisation des valves auriculo-ventriculaires et semi-lunaires	50
9	Principales étapes de la valvulogénèse	51
10	Voies de signalisation moléculaires impliquées dans la morphogénèse valvulaire pendant la TEM chez la souris	56
11	Voies de signalisation moléculaires impliquées dans la morphogénèse valvulaire post-TEM chez la souris	60
12	Aspect de la matrice extra-cellulaire et activité mitotique au sein de la valve de la période fœtale à l'âge adulte	62
13	Transition des cellules interstitielles d'un phénotype néonatal activé à un phénotype quiescent	63
14	Marqueurs des cellules endothéliales	63
15	Interactions entre les différentes populations cellulaires dans la valve	64
16	Hypothèse mécanistique de la dégénérescence valvulaire	66
17	Hypothèse mécanistique simple expliquant les lésions fibro-calciques de la valve aortique	67
18	Principales étiologies de la dégénérescence valvulaire sérotoninergique	75
19	Hypothèse sérotoninergique de la valvulopathie	75
20	Schéma du protocole expérimental	87
21	Schéma d'une micro-pompe osmotique (Alzet [®])	91
22	Système de mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque	93
23	Image en coupe para-sternale petit-axe en mode 2D des ventricules gauche et droit	95

24	Image en coupe para-sternale petit-axe en mode M du ventricule gauche	95
25	Image écho-doppler du flux aortique	96
26	Dispositif de collecte des urines	96
27	Coupe histologique du cœur avec mise en évidence de la valve mitrale	98
28	Modulation de la signalisation induite par un ligand interagissant avec un RCPG par le recrutement de la β -arrestine	128
29	Diversité des voies de signalisation associées à la β -arrestine	129
30	Structure moléculaire de la 5-HT, de la NdF et du BW723C86	130
31	Aspects histologiques des feuillets valvulaires mitraux des souris	132
32	Etude in vitro de la stimulation des récepteurs 5-HT _{2B} sur l'activation de la eNOS et la prolifération des cellules endothéliales	135
33	Principe d'évaluation de l'activité des NO synthases	138
34	Analogie de structure chimique entre la BrdU et la déoxythymidine	139
35	Expression de la eNOS en RT-PCR par les HUVECs	140
36	Recherche de l'expression de l'ARNm codant pour les récepteurs sérotoninergiques 5-HT _{2A} et 5-HT _{2B} dans les HUVECs.	141
37	Expression de l'antigène CD31 et des récepteurs 5-HT _{2B} par les HUVECs	142 143
38	Conditions expérimentales d'étude de l'activation de la eNOS	
39	Validation de la spécificité de mesure	144
40	Effet de la stimulation des récepteurs 5-HT _{2B} endothéliaux sur l'activation de la NO synthase (cellules HUVECs)	144
41	Validation du test BrdU	145
42	Détermination du temps optimal d'incorporation de la BrdU et choix du nombre de cellules	146
43	Détermination du temps optimal de culture	146
44	Évaluation de l'effet de la nordexfenfluramine sur la prolifération des HUVECs	147
45	Localisation des plaques carcinoïdes	154
46	Groupes expérimentaux et protocole de suivi	157
47	Souris Swiss Nudes (Cr1 : NU(Ico)-Foxn1 ^{nu})	160
48	Procédure de xénogreffe des cellules BON	161

49	Expression en Western blot du récepteur de la somatostatine de type 2	164
50	Caractérisation en RT-PCR de l'expression de SSTR2, de SERT, de TPH1, du 5-HT _{2B} et du 5-HT _{2A}	164
51	Dosage de la 5-HT sanguine	168
52	Dosage du 5-HIAA urinaire	169
53	Evaluation de l'expansion tumorale dans la rate, le foie et les poumons	170
54	Evaluation de l'épaisseur moyenne de la valve tricuspide	172
55	Aspect histologique des lésions valvulaires (valve tricuspide)	172
56	Marquage immunohistochimique représentatif pour l'alpha-actine de muscle lisse sur un feuillet valvulaire remodelé	176
57	Hypothèse de progression des lésions valvulaires et stratégies de recherche de nouvelles cibles thérapeutiques	176
58	Hypothèses mécanistiques expliquant le remodelage valvulaire pharmaco-induit par les agonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT _{2B}	178

Liste des annexes

<i>Numéros</i>	<i>Titres</i>	<i>Pages</i>
1	Protocole de la RT-PCR	208
2	Évaluation de l'activité NO synthase (validation des conditions analytiques)	210
3	Composition des milieux de culture des cellules BON, CNDT2.5 et HT29	211
4	Protocole du Western blot	212

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre I : système sérotoninergique, importance dans l'appareil cardiovasculaire et implication dans le remodelage valves.....	1
1. Introduction générale.....	1
2. Le système sérotoninergique et son importance sur le plan cardiovasculaire...	3
2.1. Découverte, localisation, biosynthèse et métabolisme de la sérotonine.....	3
2.2. Cibles pharmacologiques, fonctions physiologiques régulées et implications en thérapeutique.....	6
2.2.1. Les récepteurs 5-HT ₁	7
2.2.2. Les récepteurs 5-HT ₂	11
2.2.3. Les récepteurs 5-HT ₃	14
2.2.4. Les récepteurs 5-HT ₄	16
2.2.5. Les récepteurs 5-HT ₅	19
2.2.6. Les récepteurs 5-HT ₆	20
2.2.7. Les récepteurs 5-HT ₇	20
2.2.8. Le transporteur de la sérotonine.....	23
2.3. Étude du système sérotoninergique dans l'appareil cardiovasculaire.....	24
2.3.1. Origine de la sérotonine dans le système cardiovasculaire.....	24
2.3.2. Répartition et rôles physiologiques des récepteurs sérotoninergiques.....	26
2.3.3. Dysfonctions du système sérotoninergique : causes et pathologies cardiaques.....	29
2.3.3.1. Pathologies vasculaires.....	29
2.3.3.2. Dysfonctions cardiaques.....	37
2.3.3.3. Interaction sérotonine-cœur : de nombreux mécanismes restent à comprendre.....	45
3. Morphogenèse valvulaire : de l'embryogenèse à la valve adulte.....	46
3.1. Description anatomique du cœur.....	46
3.2. Valvulogenèse.....	48
3.2.1. Morphogenèse.....	48
3.2.2. Maturation valvulaire : régulations moléculaires et biophysiques.....	51
3.2.2.1. Régulations moléculaires de la transition endothélio-mésenchymateuse.....	51
3.2.2.2. Régulations moléculaire post-transition endothélio-	

2.1.3.2. Paramètres hémodynamiques.....	92
2.1.3.3. Paramètres échocardiographiques.....	94
2.1.3.4. Recueil des échantillons biologiques.....	96
2.2. Dosage biochimique de la sérotonine sanguine et de l'acide 5-hydroxy-indole acétique urinaire.....	97
2.3. Analyse histologique des valves cardiaques.....	97
2.4. Analyse des données et statistiques.....	99
3. Résultats (manuscrit de publication).....	100
4. Étude comparative des lésions induites par la nordexfenfluramine avec celles provoquées par un autre agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, le BW723C86.....	127

Partie 2 : Étude des mécanismes impliquant la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} et de la eNOS dans un modèle de cellules endothéliales humaines

provenant des veines du cordon ombilical (HUVEC).....	134
1. Introduction.....	134
2. Matériels et méthodes.....	136
2.1. Culture cellulaire.....	136
2.2. Caractérisation des HUVECs.....	136
2.3. Évaluation de l'activité de la NO synthase (NOS).....	138
2.4. Test de prolifération cellulaire (BrdU).....	139
3. Résultats.....	140
3.1. Caractérisation des HUVECs.....	140
3.1.1. Évaluation de l'expression de la eNOS.....	140
3.1.2. Évaluation de l'expression des récepteurs sérotoninergiques 5-HT _{2A} et 5-HT _{2B}	140
3.1.3. Évaluation de l'expression protéique de l'antigène CD31 et des récepteurs 5-HT _{2B}	142
3.2. Étude du couplage fonctionnel de la stimulation des récepteurs 5-HT _{2B} et de la production de NO.....	143
3.3. Étude de l'influence de la stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT _{2B} sur la prolifération des HUVECs.....	145
4. Discussion.....	148
4.1. Système sérotoninergique des HUVECs et rôles physiologiques.....	148

4.2. Implication des récepteurs 5-HT _{2B} dans la prolifération des cellules endothéliales.....	149
4.3. Choix du modèle cellulaire : cellules endothéliales matures ou cellules progénitrices endothéliales d'origine médullaires?.....	150
4.4. Importance de la sérotonine, des récepteurs 5-HT _{2B} et de la eNOS dans la migration et le recrutement des cellules endothéliales progénitrices.....	150
Partie 3 : Valvulopathies carcinoïde : modélisation chez la souris.....	152
1. Introduction.....	152
1.1. La cardiopathie carcinoïde, une complication mortelle des tumeurs neuroendocrines carcinoïdes.....	152
1.2. Les lésions valvulaires.....	154
1.3. Prise en charge des tumeurs carcinoïdes.....	155
1.4. Les modèles murins de tumeurs carcinoïdes.....	155
1.5. Objectifs de l'étude.....	156
2. Matériels et méthodes.....	156
2.1. Protocole d'étude.....	156
2.2. Conditions de culture et caractérisation des cellules.....	158
2.2.1. Conditions de culture des cellules.....	158
2.2.2. Caractérisation des lignées cellulaires.....	158
2.3. Développement du modèle animal.....	160
2.3.1. Les souris.....	160
2.3.2. Technique de xéno greffe.....	161
2.4. Suivi expérimental et paramètres évalués.....	161
3. Résultats.....	163
3.1. Caractérisation de la lignée cellulaire carcinoïde BON.....	163
3.1.1. Dosage de la sérotonine intracellulaire et du surnageant de culture.....	163
3.1.2. Recherche de l'expression de certains marqueurs spécifiques.....	164
3.2. Étude du rôle du système sérotoninergique dans la survenue des lésions valvulaires carcinoïdes.....	165
3.2.1. Paramètres de suivi des souris.....	165
3.2.1.1. Paramètres physiques.....	166
3.2.1.2. Paramètres hémodynamiques.....	166

3.2.1.3. Paramètres échocardiographiques.....	167
3.2.1.4. Dosage de la sérotonine sanguine et de l'acide 5-hydroxy- indole acétique urinaire.....	168
3.2.2. Évaluation des métastases.....	169
3.2.3. Analyse des lésions cardiaques.....	171
4. Discussion.....	173
Chapitre III : Synthèse des résultats et perspectives de ce travail.....	175
1. Synthèse des résultats.....	175
2. Perspectives : Vers la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et l'amélioration de la prise en charge des valvulopathies.....	179
Références bibliographiques.....	181
Annexes.....	208
Publications et communications.....	213

CHAPITRE I :

**Systeme sérotoninergique, importance dans
l'appareil cardiovasculaire et implication dans le
remodelage des valves cardiaques**

Chapitre I : Système sérotoninergique, importance dans l'appareil cardiovasculaire et implication dans le remodelage des valves cardiaques

1. Introduction générale

La dégénérescence des valves cardiaques est une pathologie fréquente, associée particulièrement au vieillissement. Les facteurs de risque sont communs à la plupart des pathologies cardiovasculaires (hypertension artérielle, syndrome métabolique, dyslipidémies, tabagisme, alcoolisme, mauvaise alimentation, infections) mais les mécanismes cellulaires et moléculaires en cause ne sont pas très bien connus. Même si la prévalence des valvulopathies augmente avec l'âge, on observe parfois des cas de dégénérescence précoce. On évoque alors des facteurs génétiques à l'origine d'anomalies structurales des valves comme le prolapsus pour la valve mitrale et la bicuspidie pour la valve aortique. L'étude de ces différentes étiologies pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et d'envisager le développement de nouvelles thérapies efficaces. La seule option thérapeutique reste la chirurgie de remplacement des valves cardiaques par des bioprothèses ou des valves mécaniques puisque, à ce jour, aucun essai thérapeutique prospectif n'a démontré, l'efficacité d'un traitement pharmacologique dans la prise en charge ou l'évolution des lésions.

À la suite d'une investigation rétrospective menée à l'hôpital de Brest (Frachon et al., 2010) une alerte a été lancée en 2009 imputant l'utilisation du Médiator[®] dans la survenue de nombreux cas de valvulopathies *sine materia*. Le Médiator[®] est le nom de marque du benfluorex, une molécule développée par les laboratoires SERVIER pour la prise en charge des dyslipidémies et de la surcharge pondérale du patient diabétique de type 2. Cette molécule, de la classe des amphétamines, a été largement prescrite en dehors des recommandations de son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour la perte de poids. Au moment de son retrait du marché français en 2009, le nombre de patient traité était évalué à plus de 300.000 par an en France depuis 1976, date de sa première commercialisation. Cette description venait compléter un dossier déjà lourd des effets valvulaires toxiques connus de la fenfluramine ou des produits comme le pergolide. On avait d'ailleurs déjà évoqué la similitude de ces lésions avec celles rencontrées dans une valvulopathie observée au décours de tumeurs sécrétant de la sérotonine dans le cadre du cœur carcinoïde.

Les circonstances de survenue des lésions valvulaires et l'étude du profil pharmacologique des différentes substances en cause dans les dégénérescences valvulaires

pharmaco-induites, ont émis l'hypothèse d'un dysfonctionnement du système sérotoninergique avec une éventuelle contribution des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2A} au regard de leur rôle sur le plan cardiovasculaire. L'hypothèse sérotoninergique de la valvulopathie a été suggérée depuis quelques années sans qu'aucune étude pharmacologique robuste ne l'ait démontrée.

Notre équipe étudie depuis plusieurs années le rôle de la sérotonine (5-HT) dans le remodelage du cœur, avec des travaux en rapport avec l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques (Jaffré et al., 2004, 2009a; Monassier et al., 2008, 2010). Ses publications rapportent que l'expression des récepteurs 5-HT_{2B} est indispensable dans le ventricule pour induire la réponse hypertrophique des cardiomyocytes, suite à leur stimulation par des agonistes adrénergiques et par l'angiotensine II, ainsi que pour la production de cytokines pro-inflammatoires (TGF- β , IL-6, IL-1 β , TNF- α). De plus il a été démontré que la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} des fibroblastes cardiaques contrôlait leur prolifération, leur différenciation en myofibroblastes, leur migration, la production de TGF- β et des métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Xu et al., 2002; Yabanoglu et al., 2009).

A la lumière de ces données et au regard de l'importance de ces récepteurs sérotoninergiques (5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}) sur le plan cardiovasculaire, nous nous sommes fixés comme mission principale de mieux comprendre leur rôle dans la survenue des lésions de remodelage des valves cardiaques associées à l'utilisation de certains médicaments agonistes de ces récepteurs et dans la cardiopathie carcinoïde, complication cardiaque mortelle des tumeurs neuroendocrines carcinoïdes survenant chez des patients ayant des taux de sérotonine circulante très élevés. L'hypothèse de cette contribution est renforcée par l'analyse des lésions valvulaires de la cardiopathie carcinoïde et des dégénérescences fibromyxoïdes pharmaco-induites qui a révélé une surexpression de certains récepteurs sérotoninergiques, en particulier le 5-HT_{2B}, dans la matrice valvulaire avec la présence de myofibroblastes, une production importante de matrice extracellulaire et de certaines cytokines pro-inflammatoires notamment le TGF- β .

Dans ce projet, nous évaluerons (1) la contribution effective du système sérotoninergique dans la survenue des lésions dues à la stimulation des récepteurs sérotoninergiques, puis (2) étudierons les voies de signalisation cellulaires et moléculaires impliquant ces récepteurs. Les résultats présentés dans le cadre de cette thèse concernent l'étude de la contribution du système sérotoninergique dans deux modèles murins de valvulopathie et un modèle cellulaire suivi de l'évaluation du blocage (pharmacologique ou constitutionnel) des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} dans la survenue des lésions dues à la stimulation des récepteurs sérotoninergiques. Nous présenterons dans les chapitres à venir, les arguments en faveur d'un lien probable entre le système sérotoninergique et la dégénérescence des valves cardiaques, puis exposerons les

résultats obtenus à partir des différentes expériences menées, que nous discuterons afin de proposer une mise à jour des connaissances actuelles dans ce domaine.

2. Le système sérotoninergique et son importance sur le plan cardiovasculaire

2.1. Découverte, localisation, biosynthèse et métabolisme de la sérotonine

Découverte

Vers 1930 en Italie, Vittorio Erspamer, en étudiant les propriétés contractiles de certaines substances d'origine naturelle à l'Institut d'Anatomie Comparée et de Physiologie de l'Université de Pavie, découvre qu'un extrait de la muqueuse gastrique et intestinale du lapin est capable de contracter les muscles lisses en particulier ceux de l'utérus du rat. Il dénomma alors la substance active de cet extrait « entéramine » (Erspamer et Vialli, 1937, Erspamer et Boretti, 1951). Dans la même période, une équipe américaine composée de Irvine Page, Arda Green et Maurice Rapport qui travaillait sur l'étiologie et le traitement de l'hypertension artérielle, isole et purifie une substance vasoconstrictrice présente dans le sang coagulé qu'elle nomme « sérotonine » (Rapport et al., 1948a, 1948b). Par la suite, la structure chimique de la sérotonine fut déterminée comme étant la 5-hydroxytryptamine (Page et al., 1948; Rapport et al., 1948). La sérotonine et l'entéramine furent identifiées comme une seule et même substance (Erspamer et Asero, 1952; Whitaker-Azmitia, 1999).

Localisation

Bien que décrite pour la première fois en périphérie, la distribution de la sérotonine (5-HT) dans l'organisme est beaucoup plus hétérogène. Les premières études mentionnent notamment sa présence dans le système nerveux central (SNC) (Twarog et Page, 1953; Amin et al., 1954; Whitaker-Azmitia, 1999). En effet, tout comme les catécholamines, la 5-HT est une monoamine endogène jouant un rôle de neuromédiateur dans le SNC et un rôle humoral en périphérie. La majeure partie du stock de l'organisme est produite en périphérie (90%) par les cellules entérochromaffines et accessoirement par le réseau de neurones sérotoninergiques myentériques (Furness et Costa, 1982). La 5-HT produite au niveau du tractus gastro-intestinal est emmagasinée dans les granules denses plaquettaires (sang), qui concentrent la quasi-totalité de la 5-HT de l'organisme. Cependant, la 5-HT ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). La production centrale de 5-HT (10% de la production de l'organisme) est effectuée par les corps cellulaires des neurones du raphé (Fuller et Wong, 1990).

Biosynthèse

La biosynthèse de la 5-HT se fait à partir d'un acide aminé essentiel, le L-tryptophane d'origine alimentaire en deux étapes (Figure 1) :

- Une hydroxylation du L-tryptophane en 5-hydroxytryptophane, sous le contrôle d'une enzyme spécifique (limitante de la synthèse) : la tryptophane hydroxylase (TPH). La TPH existe sous deux isoformes : la TPH-1, qui intervient dans la synthèse périphérique et la TPH-2, qui intervient dans le SNC;

- Une décarboxylation du 5-hydroxytryptophane par une enzyme non spécifique commune à la voie de synthèse des monoamines endogènes, la décarboxylase des acides aminés L-aromatiques.

Métabolisme

La 5-HT produite peut être métabolisée en différentes substances (Figure 1) :

- La voie métabolique principale aboutie à sa dégradation par le système enzymatique des monoamines oxydases (MAO-A et MAO-B) en une molécule inactive, le 5-hydroxyindolacétaldéhyde puis en acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) suite à une désamination oxydative par l'aldéhyde deshydrogénase ou accessoirement en 5-hydroxytryptophol par l'action de l'aldéhyde reductase. Dans le SNC, la 5-HT produite et stockée dans les granules de sécrétion est libérée dans la fente synaptique des terminaisons axonales sérotoninergiques suite à une stimulation nerveuse puis recaptée en pré-synaptique pour sa dégradation par le système enzymatique des MAOs. En périphérie cette dégradation se déroule principalement dans le foie et le poumon (Jonnakuty et Gragnoli, 2008).

- Elle peut être également transformée dans la glande pinéale et l'épiphyse en mélatonine, une substance active intervenant dans la régulation du rythme circadien, suite à une acétylation de sa fonction amine par la N-acétyltransférase et formation de la N-acétyl-sérotinine, suivie d'une méthylation de l'hydroxyde en position 5 par l'hydroxyindole O-méthyltransférase.

- La 5-HT peut également subir une glucurono-conjugaison ou une sulfoconjugaison de son groupement hydroxyle en 5.

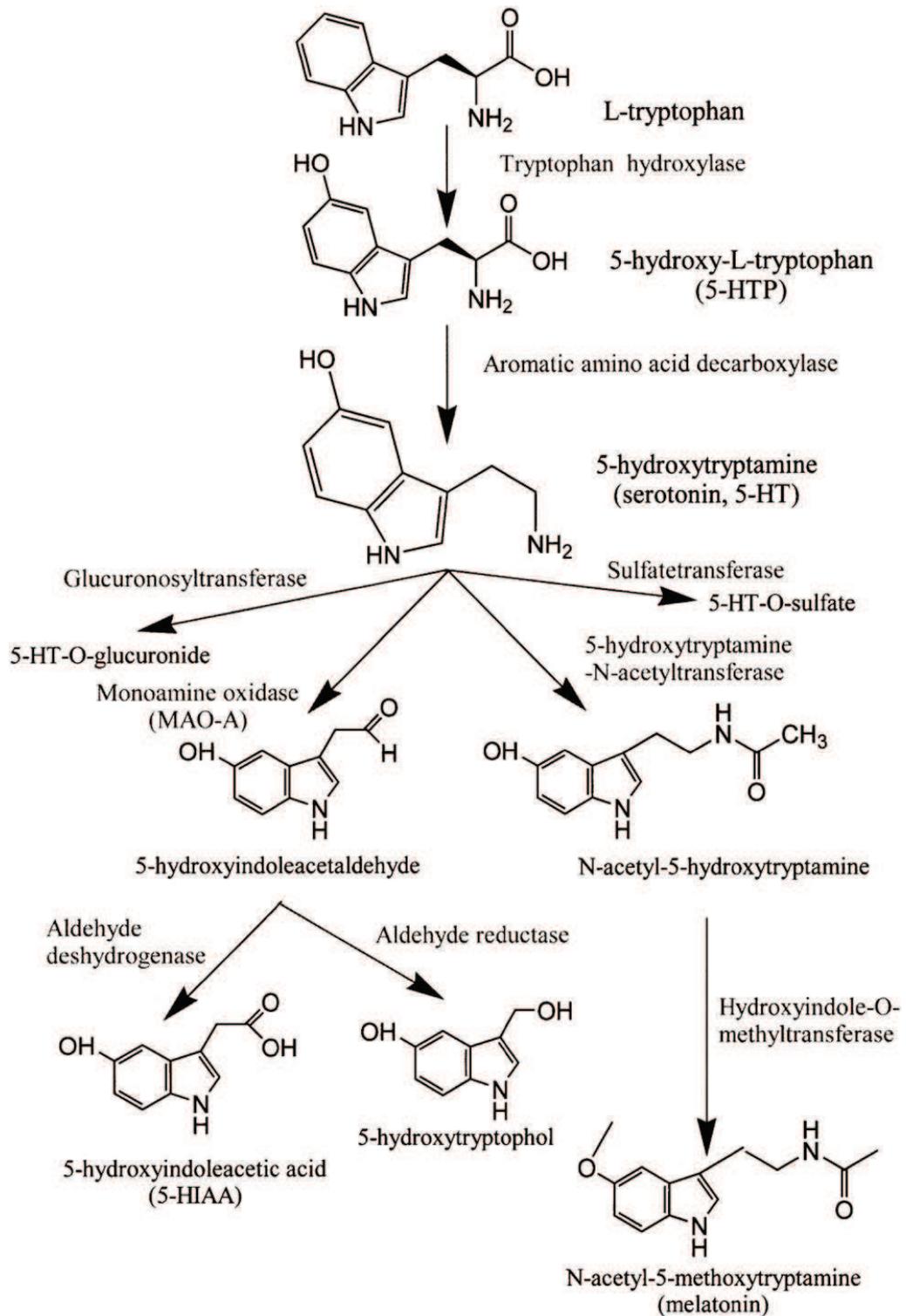


Figure 1. Biosynthèse et métabolisme de la 5-HT

(d'après Monassier et al., 2010)

2.2. Cibles pharmacologiques, fonctions physiologiques régulées et implications en thérapeutique

Dès sa découverte, l'étude des réponses physiologiques de la 5-HT dans les divers modèles expérimentaux (utérus de rat et intestin de cochon d'inde) a fait suggérer l'existence de différentes cibles pharmacologiques. Ainsi, Gaddum et Picarelli proposent et confirment dans leurs expériences de contraction induite par la 5-HT sur une préparation isolée d'intestin de cochon d'inde, que la réponse physiologique dépendait de deux types de récepteurs, les uns sensibles à la morphine et les autres à la dibenzylamine. Ils proposent alors une première classification des récepteurs sérotoninergiques en deux grands groupes : les récepteurs neurotropes de type M (sensibles à la morphine, probablement présents dans le SNC) et des récepteurs musculotropes de type D (sensibles à la dibenzylamine) (Gaddum and Picarelli, 1957).

A la suite d'importants travaux de biologie moléculaire et de pharmacologie fonctionnelle, il est proposé à l'heure actuelle, l'existence de 18 récepteurs différents et d'un transporteur (Hoyer et al., 1994, 2002; Niesler et al., 2007). Ces différents récepteurs sont classés en 7 familles notées 5-HT₁ à 5-HT₇ avec un transporteur (SERT). Cette classification prend en compte la structure des récepteurs et les voies de signalisation principalement associées.

A l'exception des récepteurs 5-HT₃ qui appartiennent à la famille des récepteurs ionotropes, les six autres familles sont des récepteurs métabotropes membranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Figure 2).

Dans notre description, nous présenterons surtout les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs humains (*Homo sapiens*) en se référant au consensus adopté par l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR). Cette description se focalisera surtout sur les effets en dehors de l'appareil cardiovasculaire (dont la description fera l'objet d'un chapitre ultérieur).

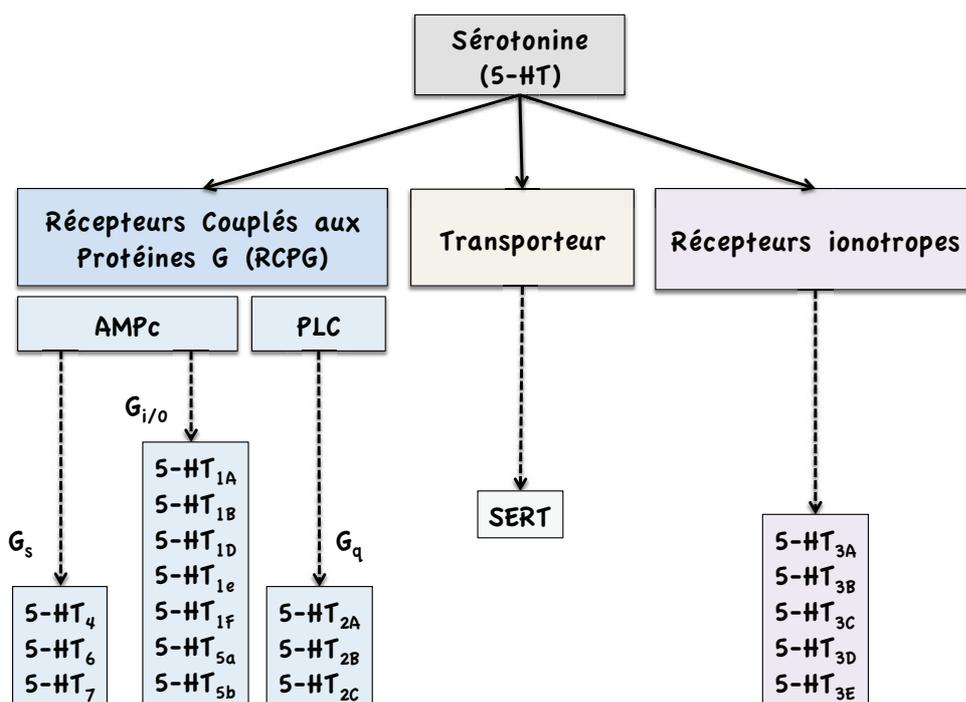


Figure 2. Cibles pharmacologiques de la 5-HT
(Classification selon les principales voies de signalisation)

2.2.1. Les récepteurs 5-HT₁

Les récepteurs 5-HT₁ sont des RCPG de classe A composés de 5 sous-types : 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1e} (la lettre minuscule ‘e’ indique que le rôle physiologique du récepteur n’est pas encore clairement identifié) et 5-HT_{1F}. Ils présentent entre eux 40 à 60% d’homologie de séquence des acides aminés. Ils sont principalement couplés à une protéine G inhibitrice ($G_{i/o}$) de l’adénylate cyclase (AC) dont la stimulation entraîne une réduction de la production intracellulaire d’adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Ils sont répartis dans différentes régions du SNC et cette diversité explique la multiplicité des fonctions physiologiques régulées. Ces récepteurs sont aussi capables d’activer d’autres voies de signalisation. La sous unité $G_{\beta\gamma}$ des récepteurs 5-HT_{1A} peut activer en parallèle un courant potassique rectificateur (GIRK : G-protein activated Inwardly Rectifying K^+ current). Certains sous-types sont des autorécepteurs qui contrôlent l’activation des neurones sérotoninergiques et la libération de 5-HT ou encore des hétérorécepteurs qui modulent la libération d’autres neuromédiateurs (dopamine, noradrénaline et acétylcholine) dans les neurones non sérotoninergiques (Stamford et al., 2000).

Le récepteur 5-HT_{1A}

Le gène du récepteur 5-HT_{1A} humain est porté par le chromosome 5 (5q11.2-q13) et code pour une protéine comportant 422 acides aminés (Fargin et al., 1989; Stam et al., 1992). Ce récepteur est fortement exprimé dans le SNC des mammifères : gyrus denté, gyrus parahippocampique, hippocampe, néocortex et raphé (Pompeiano et al., 1992; Burnet et al., 1995). Il est également présent dans la moelle épinière (Laporte et al., 1996). En périphérie, il est retrouvé dans les néphrons (Raymond et al., 1993), la prostate (Dizeyi et al., 2004), faiblement exprimé dans le cœur (oreillette, ventricule et épicarde) et les artères coronaires (Nilsson et al., 1999b). Sur le plan physiologique, sa stimulation inhibe l'auto-activation des neurones sérotoninergiques et favorise la libération d'acétylcholine, de noradrénaline et de dopamine par les neurones non sérotoninergiques (Stamford et al., 2000). Il est impliqué chez l'homme dans la prolifération maligne ou bénigne des cellules prostatiques (Dizeyi et al., 2004).

Les souris 5-HT_{1A}^{-/-} présentent une activation exagérée des neurones sérotoninergiques du raphé par défaut d'auto-inhibition (Bortolozzi et al., 2004), une diminution de l'expression de SERT (Ase et al., 2001), une exagération de la réponse induite par le stress et l'anxiété (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998), une durée prolongée du sommeil paradoxal (Boutrel et al., 2002) avec une altération des capacités d'apprentissage et de mémoire à long terme (Bert et al., 2005). A l'opposé, une surexpression de ces récepteurs durant la période post-natale, entraîne une élévation du taux de 5-HT dans l'hippocampe et le striatum avec une diminution de l'anxiété et une hypothermie observée uniquement chez les souris mâles (Kusserow et al., 2004). Une surexpression du récepteur pendant la période embryonnaire et périnatale est responsable d'une altération de la mémoire à long-terme (Bert et al., 2005). Des études complémentaires chez les rongeurs mettent en évidence son implication dans la régulation du cycle veille/sommeil (Boutrel et al., 2002), l'induction de crises épileptiques (López-Meraz et al., 2005), le comportement agressif (Popova et al., 2005), l'alimentation, le syndrome sérotoninergique, la libération d'ocytocine et d'adrénocorticotrophine (ACTH) (Osei-Owusu et al., 2005), le développement cérébral (Banar et al., 2004) et la nociception (Harte et al., 2005).

Ce récepteur est activé sélectivement par la 8-hydroxy-propylamino-tétraline (8-OH-DPAT ; pKi 8,4 - 9,4) (De Vry et al., 1998; Kalipatnapu et al., 2004) qui est un agoniste entier et par des agonistes partiels comme la buspirone (pKi 7,7 - 8) (Newman-Tancredi et al., 1992, 1998a, 1998b), le pergolide (pKi 8,7) et la bromocryptine (pKi 7,9) (Millan et al., 2002a). Il est bloqué par le robalzotan (NAD 299, pKi 9,2) (Johansson et al., 1997). Le récepteur 5-HT_{1A} est ciblé en thérapeutique dans la prise en charge de certains désordres neuropsychiatriques comme

l'anxiété, la dépression, le stress et la schizophrénie. Sur le plan clinique, la buspirone (agoniste partiel) a prouvé son efficacité dans la prise en charge de l'anxiété généralisée.

Le récepteur 5-HT_{1B}

Le récepteur 5-HT_{1B} humain est composé de 390 acides aminés et codé par un gène porté sur le chromosome 6 (6q13) (Jin et al., 1992; Mochizuki et al., 1992). Il est exprimé dans différentes régions du système nerveux central et notamment dans le cerveau des mammifères (hypothalamus, noyau suprachiasmatique) (Bonaventure et al., 1997; Sari et al., 1999; Varnäs et al., 2001; Makarenko et al., 2002), dans le ganglion trigéminal (Hou et al., 2001; Ma, 2001), les artères cérébrales corticales (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales) (Nilsson et al., 1999a). En périphérie, ce récepteur est présent dans le tissu prostatique, la rate, le thymus (Stefulj et al., 2000) et dans le cœur (artères coronaires, oreillettes, ventricules et épicaarde) (Nilsson et al., 1999b). Sur le plan physiologique, sa stimulation entraîne une diminution de la libération de 5-HT suivie d'une recapture via son transporteur (SERT) dans les neurones sérotoninergiques mais également une inhibition de la libération du GABA, du glutamate, de la dopamine et de l'acétylcholine (Morikawa et al., 2000). Ils agissent aussi en favorisant une vasoconstriction des artères coronaires et cérébrales (Nilsson et al., 1999a, 1999b).

Les souris 5HT_{1B}^{-/-} présentent un comportement agressif (Saudou et al., 1994), une hyperactivité, une tendance plus prononcée à l'addiction avec une altération du métabolisme des monoamines (5-HT, GABA et glutamate) et une diminution de l'anxiété (Ase et al., 2001; El-Khodori et al., 2004). Le récepteur 5-HT_{1B} participerait également au contrôle de l'état de satiété, à la régulation des fonctions de l'hippocampe, du comportement, des capacités d'apprentissage et de mémorisation. Le phénotype des souris 5HT_{1B}^{-/-} correspondrait beaucoup plus à une compensation avec le système dopaminergique durant le développement, qu'à l'effet même de l'inactivation du récepteur. Ceci s'explique en partie par l'élévation du taux extracellulaire de la dopamine et sa libération dans le noyau accumbens (Shippenberg et al., 2000).

Sur le plan thérapeutique, les agonistes du récepteur 5-HT_{1B} sont utilisés dans le traitement de certains désordres neuropsychiatriques et pour la prise en charge de la migraine. La dihydroergotamine qui est un agoniste entier du récepteur (pKi 8,0 - 9,2) (Leysen et al., 1996) avait été développée comme traitement de fond de la migraine et pour la prise en charge de l'hypotension secondaire aux neuroleptiques mais fait l'objet depuis le 24 septembre 2013, d'une restriction d'indication (au même titre que la dihydroergocristine et la nicergoline) pour cause d'effets indésirables graves à type de valvulopathies et de fibrose rétro-péritonéale (Malaquin et al., 1989). Son efficacité est similaire à celle du sumatriptan dans la prise en charge de la douleur

migraineuse (Young et al., 1997). Le sumatriptan agit comme agoniste partiel (pKi 6,5 - 8,1) des récepteurs 5-HT_{1B} (Grånäs et Larhammar, 1999; Napier et al., 1999). La stimulation pharmacologique des récepteurs 5-HT_{1B} est bloquée par la méthiothépine (pKi 7,1 - 8,5) (Parker et al., 1996a; Watson et al., 1996; Granas et Larhammar, 1999; Newman-Tancredi et al., 2000) qui est un agoniste inverse et par la métergoline (pKi 7,2) (Parker et al., 1996a). La kétansérine (pKi 8,3 Mus musculus) (Maroteaux et al., 1992) et le cyanopindolol (pKi 8,1 Mus musculus) reconnaissent surtout le récepteur murin (Maroteaux et al., 1992).

Le récepteur 5-HT_{1D}

Le récepteur 5-HT_{1D} humain est constitué de 377 acides aminés et codé par le chromosome 1 (1q36.3-p34.3) (Weinshank et al., 1992). Il est présent dans le système nerveux central de façon moins dense que le récepteur 5-HT_{1B}, dans la région du raphé, le ganglion trigéminal (Hou et al., 2001), le globus pallidus, le cortex frontal et le putamen (Miller et Teitler, 1992). Le phénotypage des souris 5-HT_{1B}^{-/-} a permis de comprendre que se sont les récepteurs 5-HT_{1B} qui régulent la libération de 5-HT en agissant comme autorécepteurs dans les terminaisons neuronales et que les récepteurs 5-HT_{1D} seraient présents au niveau des jonctions somato-dendritiques du raphé. Le récepteur 5-HT_{1D} est également exprimé dans les racines nerveuses ventrales et dorsales de la moelle épinière, faiblement dans le cœur (Nilsson et al., 1999b) et dans la prostate (Dizeyi et al., 2004).

Sur le plan physiologique, les récepteurs 5-HT_{1D} agissent en inhibant la libération de 5-HT et de glutamate dans le SNC (Piñeyro et al., 1995) et favorisent la libération de la somatotropine (hormone de croissance) dans l'antéhypophyse (Mota et al., 1995).

Les souris 5-HT_{1D}^{-/-} ne présentent aucun phénotype particulier. La plupart des ligands du récepteur 5-HT_{1D} partagent une affinité relativement forte avec d'autres récepteurs sérotoninergiques et en particulier les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1F} à l'exemple du sumatriptan (pKi 8,0 - 8,7). Les agonistes de ce récepteur sont utilisés dans la prise en charge de la migraine (Napier et al., 1999). Le récepteur peut être bloqué par la kétansérine (pKi 7,4 - 7,5) permettant ainsi d'étudier sa contribution dans certains processus physiologiques (Doménech et al., 1997).

Le récepteur 5-HT_{1e}

Des expériences de liaison spécifique sur une préparation de protéines cérébrales ont suggéré l'existence d'un récepteur appartenant à la famille des récepteurs 5-HT₁ avec une faible affinité pour la carboxamidotryptamine (Leonhardt et al., 1989). Des travaux ultérieurs ont permis de mettre en évidence ce sous-type de récepteurs. Le récepteur 5-HT_{1e} humain est codé

par le chromosome 6 (6q14-q15) et comporte 364 acides aminés (McAllister et al., 1992; Zgombick et al., 1992; Levy et al., 1994). Il est exprimé chez l'homme essentiellement dans le SNC (putamen, cortex frontal, globus pallidus, amygdala et les aires corticales) (Miller et Teitler, 1992) mais absent chez la souris et le rat. L'absence de ligands très sélectifs pour ce récepteur contribue encore à ce jour à la mauvaise connaissance de son rôle physiologique. Cependant, il est stimulé par des agonistes comme le zolmitriptan (pKi 7,7), le naratriptan (pKi 7,7) (Napier et al., 1999) et l' α -méthyl-sérotonine (pKi 6,9 - 7) (Bai et al., 2004) qui sont des agonistes entiers et bloqué par la méthylergonovine (pKi 7,0 - 7,2) et le méthysergide (pKi 6,5 - 6,8) (Dukat et al., 2004).

Le récepteur 5-HT_{1F}

Le récepteur 5-HT_{1F} humain est codé par le chromosome 3 (3p12) et possède 366 acides aminés. Dans le SNC, il est exprimé par les neurones sérotoninergiques et aussi par des neurones non sérotoninergiques et identifié dans le ganglion trigéminal et les neurones du noyau vestibulaire (Adham et al., 1993). En périphérie, il est trouvé dans le thymus, à la surface des lymphocytes circulants, dans la rate (Stefulj et al., 2000), le cœur, l'utérus et les intestins (Adham et al., 1993) . Son rôle physiologique n'est pas encore bien connu. Il présente une forte affinité pour certaines molécules de la classe des triptans : naratriptan (pKi 8,2), élitriptan (pKi 8,0), sumatriptan (pKi 7,2 – 7,9) et le zolmitriptan (pKi 7,4 – 7,5) (Napier et al., 1999). Il est bloqué par le méthysergide (pKi 8,2), la méthylergonovine (pKi 7,5) et la yohimbine (pKi 7) (Adham et al., 1993). Sur le plan thérapeutique, le développement de nouvelles molécules plus sélectives de ce récepteur pourrait permettre de mieux comprendre son implication dans la prise en charge de la migraine mais aussi de lui découvrir de nouvelles fonctions biologiques.

2.2.2. Les récepteurs 5-HT₂

Les récepteurs 5-HT₂ appartiennent au groupe des RCPG de classe A et sont constitués de 3 sous-types : Les récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Ces différents récepteurs présentent entre eux 42 à 51% d'homologie dans la séquence en acides aminés. Ils sont tous couplés à une protéine G de type G α_q ou α_{11} activant la phospholipase C (PLC) et provoquant une augmentation de la concentration intracellulaire d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). Ils peuvent également activer une diversité d'autres voies de signalisation en fonction des ligands, des sous-types de récepteurs et des types cellulaires : la voie PI3K-AKT (phosphoinositide 3-kinase – protéine kinase B) ou la voie ERK (Extracellular Regulated

Kinase). Ils correspondent aux récepteurs de type « D » (sensibles à la dibenzylène) dans la classification de Gaddum et Picarelli.

Le récepteur 5-HT_{2A}

Le récepteur 5-HT_{2A} humain est codé par le chromosome 13 (13q14-q21) et possède 471 acides aminés (Stam et al., 1992). Il est trouvé principalement dans le SNC (Burnet et al., 1995), la moelle épinière (Laporte et al., 1996) et en périphérie dans le cœur (oreillettes et artères coronaires) (Nilsson et al., 1999b), les cellules musculaires lisses vasculaires et les plaquettes sanguines. Il a été également identifié chez le rat dans les artères rénales, le thymus, les lymphocytes et la rate (Stefulj et al., 2000). Il est stimulé par certains agonistes entiers comme l'asénapine (pKi 9,6) (Schotte et al., 1996), le diéthylamide de l'acide lysergique (LSD, pKi 9,4) (Almaula et al., 1996), la méthylergonovine (pKi 9,4) (Knight et al., 2004) et bloqué par la rispéridone (agoniste inverse, pKi 9,3 - 10) (Schotte et al., 1996), la ritansérine (pKi 9,4) (Shapiro et al., 2000) et la kétansérine (pKi 8,1 - 9,7) (Rashid et al., 2003a). Sur le plan physiologique, il joue un rôle important dans la contraction des artères coronaires (Nilsson et al., 1999b), de l'aorte et des artères mésentériques (Watts et al., 1995a). Il participe à l'activation des plaquettes sanguines dans le processus d'hémostase primaire (Li et al., 1997) et à la potentialisation de la douleur inflammatoire en périphérie (Okamoto et al., 2002). La stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} dans l'hypothalamus augmente la libération de la prolactine, de l'ACTH, de la corticostérone, de l'ocytocine et de la rénine (Van de Kar et al., 2001).

Les souris 5-HT_{2A}^{-/-} présentent un défaut de contraction des cellules musculaires lisses coliques en réponse à la stimulation sérotoninergique (Fiorica-Howells et al., 2002).

Sur le plan thérapeutique, du fait de l'effet psychodysléptique de certains agonistes des récepteurs 5-HT_{2A}, de nombreux antagonistes sélectifs sont utilisés comme antipsychotiques. Ils trouvent également leur indication dans la prise en charge de la dépression, de l'anxiété, des troubles cognitifs, de la schizophrénie (clozapine, olanzapine), des troubles des conduites alimentaires et du sommeil.

Le récepteur 5-HT_{2B}

Le récepteur 5-HT_{2B} humain possède 481 acides aminés et est codé par le chromosome 2 (2q36.3-q37.1) (Kursar et al., 1994; Schmuck et al., 1994; Le Coniat et al., 1996). Cette région codante fait partie du complexe codant le protéasome. Il est surtout exprimé chez les mammifères en périphérie dans le tube digestif : estomac, intestin grêle et colon (Choi et Maroteaux, 1996). Il est présent également dans la trachée, le foie, la rate, le thymus, les

lymphocytes, les muscles squelettiques, les reins (artères rénales), l'utérus, les ovaires, les testicules, la prostate, le cœur, le pancréas et le cerveau (Kursar et al., 1994; Watts et al., 1995a; Stefulj et al., 2000). Sur le plan physiologique, sa stimulation permet la contraction des muscles lisses de l'estomac (Cox et Cohen, 1995) et une relaxation des vaisseaux dépendante de l'endothélium (Ellis et al., 1995). Il joue un rôle important au cours du développement cardiaque (différenciation et prolifération) du stade embryonnaire à l'âge adulte.

Les souris 5-HT_{2B}^{-/-}, en dehors d'une tendance accrue à développer des troubles du comportement (impulsivité), présentent surtout un phénotype cardiaque (Nebigil et al., 2000, 2001). L'absence du récepteur chez ces souris entraîne une cardiomyopathie dilatée sans hypertrophie compensatrice. A l'opposé, une surexpression du récepteur dans les cardiomyocytes provoque une prolifération anormale des mitochondries et une hypertrophie ventriculaire (Nebigil et al., 2003).

Sur le plan thérapeutique, de nombreuses substances pharmacologiques recommandées pour la prise en charge de la dépression, de l'anxiété, de la migraine et des troubles du sommeil sont agonistes des récepteurs 5-HT_{2B}. Ce récepteur peut être stimulé par certains dérivés de l'ergot de seigle : méthylergonovine (pKi 9,3), cabergoline (pKi 8,9) et pergolide (pKi 8,2) qui sont des agonistes entiers ; ergotamine (pKi 8,5 - 8,9) et méthysergide (pKi 8,0 - 9,4) (agonistes partiels). La (+)-norfenfluramine (pKi 8) et le BW723C86 (pKi 7,3 - 8,6) sont des agonistes entiers sélectifs du récepteur 5-HT_{2B} souvent utilisés en pharmacologie expérimentale (Rothman et al., 2000; Millan et al., 2002b; Knight et al., 2004). Le récepteur 5-HT_{2B} peut être bloqué par la ritansérine (pKi 8,7 - 9,2), le lisuride (pKi 8,9) et le SB206553 (pKi 7,6 - 8,5) (Bonhaus et al., 1999; Millan et al., 2002b; Knight et al., 2004).

Le récepteur 5-HT_{2C}

Le récepteur 5-HT_{2C} humain est codé par le chromosome X (Xq24) et possède 458 acides aminés (Stam et al., 1994). Il est très largement exprimé dans différentes régions du SNC (Pompeiano et al., 1994), dans la moelle épinière (Fonseca et al., 2001) et très peu en périphérie à la surface des lymphocytes T (Marazziti et al., 2001). Il partage une affinité avec de nombreux ligands interagissant avec d'autres récepteurs sérotoninergiques. Ainsi, de nombreux dérivés de l'ergot de seigle sont agonistes de ce récepteur: ergotamine (pKi 8,7) (Knight et al., 2004) et lisuride (pKi 7,9 - 8,3) (Egan et al., 2000; Millan et al., 2002b) comme agonistes partiels et méthylergonovine (pKi 8,3) (Rothman et al., 2000) comme agoniste entier. Il peut être bloqué par la ritansérine (pKi 8,2 - 9,6), la kétansérine (pKi 6,8 - 7,5) (Knight et al., 2004), le sarpogrelate (pKi 7,4) (Rashid et al., 2003a), l'olanzapine (agoniste inverse ; pKi 8,1 - 8,2), la

mésulergine (agoniste inverse ; pKi 8,7 - 9,3) et l'agomélatine (pKi 6,2) (Millan et al., 2003). Sur le plan physiologique, la stimulation du récepteur 5-HT_{2C} réduit la prise alimentaire (Fone et al., 1998), régule le sommeil (Frank et al., 2002), produit un effet analgésique (Chojnacka-Wójcik et al., 1994), induit un état anxiogène et une hyperlocomotion (Fone et al., 1998).

Les souris 5-HT_{2C}^{-/-} présentent une réponse exagérée au stress (Chou-Green et al., 2003b) et une sensibilité accrue à l'épilepsie (Brennan et al., 1997). Elles présentent des troubles du comportement assimilables à un trouble obsessionnel compulsif (Chou-Green et al., 2003a). Les souris jeunes présentent une hyperactivité et une consommation importante de nourriture. A l'âge adulte, cette hyperactivité s'estompe et le maintien du comportement alimentaire anormal fait apparaître une obésité et une intolérance au glucose (Nonogaki et al., 2003; Giorgetti et Tecott, 2004). Sur le plan thérapeutique, la lorcasérine (pKi 7,8) est un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C} (mais également des récepteurs 5-HT_{2B}) récemment mis sur le marché aux Etats-Unis pour la prise en charge de l'obésité (IMC > 30 ou 27 avec l'existence associée d'une comorbidité) (Gustafson et al., 2013).

2.2.3. Les récepteurs 5-HT₃

Les récepteurs 5-HT₃ correspondent aux récepteurs de type « M » décrits initialement par Gaddum et Picarelli. Ce sont des récepteurs ionotropes pentamériques (à l'instar des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine et des récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique de type-A) facilitant le passage non sélectif de nombreux cations monovalents et aussi des ions divalents comme l'ion calcium (Ca²⁺). Cinq sous-unités de ces récepteurs nommées 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} et 5-HT_{3E} ont été clonées mais l'association fonctionnelle en pentamères s'opère de façon préférentielle entre sous-unités de type 5-HT_{3A} uniquement (homopentamères) ou entre les sous-unités 5-HT_{3A} et 5-HT_{3B} (hétéropentamères). La traduction de l'ARNm codant pour les sous-unités 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} et 5-HT_{3E} en protéine n'est pas clairement établie in vivo. Cependant, leur association in vitro avec les sous-unités 5-HT_{3A} n'affecte pas les caractéristiques pharmacologiques du récepteur. L'existence de nombreux ligands très sélectifs des récepteurs 5-HT₃ a permis une meilleure compréhension de ses effets pharmacologiques. L'activation des récepteurs 5-HT₃ entraîne une dépolarisation des terminaisons nerveuses et module la libération de nombreux neuromédiateurs (glutamate, GABA, acétylcholine, dopamine, sérotonine, noradrénaline, sérotonine et substance P) (Nichols et Mollard, 1996; Chameau et van Hooft, 2006; Fink et Göthert, 2007). De nombreuses possibilités thérapeutiques sont envisageables pour ces récepteurs mais, à l'heure actuelle, leur rôle n'est clairement défini que dans la prise en

charge des nausées et des vomissements liés à la chimiothérapie ou à la radiothérapie et dans les douleurs associées au syndrome du colon irritable (Thompson et Lummis, 2006).

Description des sous-types des récepteurs 5-HT₃

Les sous-unités 5-HT_{3A} et 5-HT_{3B} sont codées par le chromosome 11 sur le domaine 11q23.1 et possèdent respectivement 484 et 441 acides aminés (Belelli et al., 1995; Davies et al., 1999; Dubin et al., 1999). Elles sont largement exprimées dans le système nerveux central et en périphérie. Leur mise en évidence a été réalisée par des techniques d'hybridation in situ, d'immunohistochimie ou immunocytochimie et de liaison spécifique (par des marqueurs radioactifs). Ainsi, ces sous-unités sont exprimées dans l'hippocampe, les noyaux du tractus solitaire, le noyau caudé, le putamen, le noyau accumbens, l'area postrema, le striatum, les noyaux de la medulla oblongata, le noyau spinal du nerf trijumeau et le cortex préfrontal. En périphérie, elles sont retrouvées à la partie basale de l'épiderme, dans les neurones du réseau nerveux autonome associé au tube digestif (plexus myentérique et sous-muqueux) et dans les fibres nerveuses de la vessie (Parker et al., 1996b; Bhattacharya et al., 2004; Michel et al., 2005; Brady et al., 2007).

Les sous-unités 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} et 5-HT_{3E} sont codées par le chromosome 3 (3q27.1). La sous-unité 5-HT_{3C} possède 447 acides aminés et la sous-unité 5-HT_{3D}, 279 acides aminés. Le nombre exact d'acides aminés de la sous-unité 5-HT_{3E} n'est pas encore clairement établi (Karnovsky et al., 2003; Niesler et al., 2003, 2007). Ces différentes sous-unités sont absentes chez les rongeurs mais on retrouve l'ARNm codant pour ces récepteurs chez l'homme par une technique de RT-PCR. L'assemblage de chacune de ces sous-unités avec la sous-unité 5-HT_{3A} dans des systèmes transfectés (cellules HEK 293) et validés par immunoprécipitation n'altère pas fondamentalement les caractéristiques fonctionnelles de ce pentamère en comparaison à l'homopentamère 5-HT_{3A}. L'ARNm codant pour la sous-unité 5-HT_{3C} est présent dans le cerveau, les ganglions de la racine dorsale, le tube digestif (estomac, intestin grêle et colon), les poumons et divers muscles. La sous-unité 5-HT_{3D} est présente dans le cerveau et les ganglions de la racine dorsale mais aussi dans le foie, les reins et le colon. La sous-unité 5-HT_{3E} est présente dans les ganglions de la racine dorsale, le cerveau, la moelle épinière, la rétine, la glande thyroïde, le tube digestif (intestin et colon) et les reins (Holbrook et al., 2009).

L'homopentamère 5-HT_{3A} (le récepteur 5-HT_{3A})

Le récepteur 5-HT_{3A} est constitué par l'assemblage de 5 sous-unités 5-HT_{3A}. Il facilite le passage des cations dans l'ordre de priorité suivant : $Rb^+ = Cs^+ = Li^+ > Na^+ > Ca^{++} > Mg^{++}$ (Mochizuki et al., 1999). Il est stimulé par des agonistes comme la quipazine qui est agoniste partiel (pKi 9,5), et des agonistes entiers comme le méta-phénylbiguanide (pKi 6,6 - 7,2) et la 2-méthylsérotonine (pKi 6,0 - 6,7) (Miyake et al., 1995; Brady et al., 2001). Son activité peut être bloquée par le ramosétron (pKi 10), le granisétron (pKi 8,6 - 8,8), le tropisétron (pKi 8,5 - 8,8) et l'ondansétron (pKi 7,8 - 8,3) (Miyake et al., 1995; Hope et al., 1996; Brady et al., 2001). Le canal ionique peut être bloqué par la picrotoxine (pIC₅₀ 4,96) ou influencé par des régulateurs allostériques comme l'ion calcium et l'ion magnésium qui régulent négativement le récepteur en diminuant l'affinité de certains agonistes (Thompson and Lummis, 2006).

L'hétéropentamère 5-HT_{3A} et 5-HT_{3B} (le récepteur 5-HT_{3AB})

Il est formé par l'association stœchiométrique de deux sous-unités 5-HT_{3A} et de trois sous-unités 5-HT_{3B}. Il permet le passage des cations selon l'ordre de priorité suivant : $Na^+ = K^+ = Cs^+ > Ca^{++}$ (Davies et al., 1999). Il est stimulé par des agonistes entiers comme la quipazine (pKi 9) et le méta-chlorphénylbiguanide (pKi 7). Il est bloqué par l'ondansétron (pKi 7,8) et l'azasétron (pKi 8,4) (Brady et al., 2001). Le canal ionique peut être bloqué par la picrotoxine pIC₅₀ 4,2) (Thompson et al., 2011).

De façon générale, l'affinité des divers ligands n'est pas différente entre les récepteurs 5-HT_{3A} et 5-HT_{3AB}, cependant on enregistre parfois une baisse d'affinité vis-à-vis du pentamère 5-HT_{3AB} pour certains ligands.

2.2.4. Les récepteurs 5-HT₄

Les récepteurs 5-HT₄ sont des RCPG de classe A liés à une protéine Gs capable d'activer l'adénylate cyclase et permettant suite à cette stimulation une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC (Dumuis et al., 1988; Bockaert et al., 1990; Ford et al., 1992). Cette stimulation peut permettre également d'activer des canaux ioniques calcium-dépendant (Torres et al., 1994) et de favoriser la libération centrale de certains neuromédiateurs comme l'acétylcholine dans le cortex, la dopamine dans la substance noire (locus niger) et la 5-HT dans l'hippocampe. Ils présentent moins de 34% d'homologie avec les autres sous-types de récepteurs sérotoninergiques. Ils sont codés chez l'homme par un gène unique situé sur le chromosome 5 (5q31-q33) et composés de 387 acides aminés (Van den Wyngaert et al., 1997). A ce jour, il a

été décrit environ une dizaine d'isoformes différents notés 5-HT_{4a}, 5-HT_{4b}, 5-HT_{4hb} (insertion d'une séquence de 14 acides aminés supplémentaires dans la boucle extracellulaire de l'isoforme 5-HT_{4b}), 5-HT_{4c}, 5-HT_{4d}, 5-HT_{4e}, 5-HT_{4f}, 5-HT_{4g}, 5-HT_{4i}, 5-HT_{4n} (Figure 3) provenant d'un épissage alternatif du domaine C terminal de la protéine ou du domaine extracellulaire situé entre le quatrième et le cinquième domaine transmembranaire (Blondel et al., 1998; Bender et al., 2000a; Brattelid et al., 2004). Ils sont présents dans le tube digestif : œsophage, estomac, plexus myentérique, intestins et colon (Sakurai-Yamashita et al., 1999; Vilaró et al., 2002; Liu et al., 2005). On les trouve également dans la glande surrénale (Vilaró et al., 2002), les amygdales et dans le cœur (oreillettes, nœud sinusal et ventricules) (Bach et al., 2001). Dans le SNC, ils sont exprimés dans différentes régions du cerveau : notamment dans le cortex frontal, l'hippocampe et le ganglion basal (Doménech et al., 1994). Ils interagissent avec de nombreux ligands dont le cisapride (pKi 6,4 - 7,4) (Gerald et al., 1995; Van den Wyngaert et al., 1997; Bender et al., 2000a; Mialet et al., 2000a, 2000b; Bach et al., 2001) et le tegaserod (pKi 7,6 - 8,4) (Bender et al., 2000a; Beattie et al., 2004) qui sont respectivement des agonistes entier et partiel de ces récepteurs. Ils sont bloqués par le tropisétron (pKi 6,3 - 7,1) (Van den Wyngaert et al., 1997; Bach et al., 2001) et le pibosérod (pKi 8,8 - 10,4) (Claeyssen et al., 1997; Fedouloff et al., 2001; Beattie et al., 2004). Sur le plan physiologique, leur activation stimule la prise alimentaire, facilite la progression du bol alimentaire et la vidange gastrique (Hegde et al., 1995; Crowell et al., 2005), entretient le réflexe péristaltique (Foxy-Orenstein et al., 1996), la relaxation de l'œsophage, des intestins et du colon (McLean et Coupar, 1996; Tuladhar et al., 1996). Ils stimulent également la production d'aldostérone dans le cortex surrénalien (Lefebvre et al., 1998). Ils agissent en diminuant la dépression respiratoire induite par les opioïdes (Manzke et al., 2003) et interviennent dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage (Marchetti et al., 2000). Dans le cœur, leur activation par les agonistes sérotoninergiques peut provoquer une arythmie (Kaumann et Sanders, 1994).

Les souris 5-HT₄^{-/-} ont un comportement alimentaire normal et ne présentent pas d'altération de l'activité physique. Cependant, elles ont une réponse atténuée à l'anorexie induite par le stress, une moindre activité exploratrice suite à l'introduction dans une nouvelle ambiance et une sensibilité accrue aux crises convulsives (Compan et al., 2004).

Sur le plan thérapeutique, le cisapride et le tégaserod ont été développés pour la prise en charge du reflux gastro-oesophagien (Arvanitakis et al., 1993), de la constipation (Aboumarzouk et al., 2011) et du syndrome du colon irritable (Layer et al., 2005), mais retirés du marché ou avec une autorisation de prescription très restreinte à cause de leurs effets indésirables

cardiaques à type de trouble du rythme ventriculaire et d'allongement de l'espace QT de l'électrocardiogramme (Kamm, 2002; Tack et al., 2012).

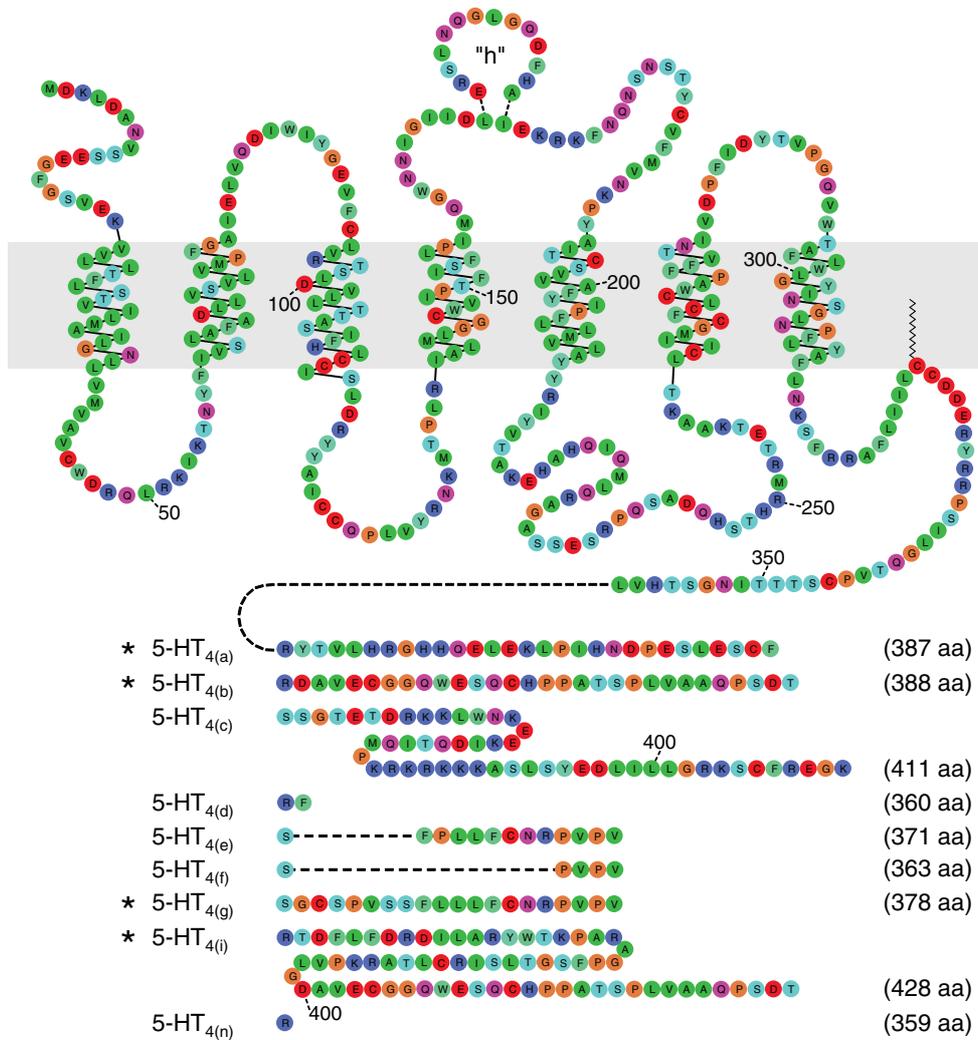


Figure 3. Isoformes des récepteurs 5-HT₄ (d'après Kaumann et Lévy, 2006)

(* désigne les isoformes exprimés dans le cœur et 'h' la séquence de 14 acides aminés supplémentaires insérée dans la boucle extracellulaire 5-HT_{4b} pour former 5-HT_{4hb})

2.2.5. Les récepteurs 5-HT₅

La famille des récepteurs 5-HT₅ est constituée de deux sous-types : les récepteurs 5-HT_{5a} et 5-HT_{5b} codés par deux gènes différents. L'indice a et b en minuscule renseigne sur le fait que le rôle physiologique et l'importance sur le plan thérapeutique de ces récepteurs restent imparfaitement connus. Ils sont classés dans le groupe des RCPG de classe A liés à une protéine Gi/Go inhibant l'adénylate cyclase mais sont également capables d'activer d'autres voies de signalisation impliquant la protéine Gq/G₁₁ dans certains systèmes transfectés ou d'induire des courants potassiques rectificateurs (GIRK) (Grailhe et al., 2001; Noda et al., 2003, 2004).

Le récepteur 5-HT_{5a}

Le récepteur 5-HT_{5a} humain est codé par un gène porté par le chromosome 7 (7q36.1) et possède 357 acides aminés (Rees et al., 1994). Son expression est quasiment restreinte au SNC en particulier dans certaines régions du cerveau : cortex, hippocampe, hypothalamus, substantia nigra et la moelle épinière (Rees et al., 1994). L'ARNm codant pour ce récepteur a été aussi identifié dans les lymphocytes (Marazziti et al., 2001). Le récepteur 5-HT_{5a} est activé par le LSD (radiomarqué à l'iode 125 ; pK_d 9,7) (Grailhe et al., 2001), le donitriptan (pK_i 6,1; agoniste entier) et le sumatriptan (pK_i 5,3; agoniste entier) (Rees et al., 1994; John et al., 1999). Il est bloqué par l'ergotamine (pK_i 8,0 - 8,7), la méthiothépine (pK_i 8,5 - 8,9) et la ritansérine (pK_i 7,6) (Erlander et al., 1993; Grailhe et al., 2001).

Son rôle physiologique est suggéré à partir du phénotype des souris 5-HT_{5a}^{-/-}. L'inactivation totale du récepteur exagère l'activité exploratrice suite à l'introduction dans un nouvel environnement sans modification de l'anxiété associée à ce processus. De plus, les souris présentent une réponse atténuée à la stimulation exploratrice induite par l'administration du LSD (Grailhe et al., 1999). La stimulation des récepteurs 5-HT_{5a} expliquerait en partie les effets psychostimulants du LSD. Les récepteurs 5-HT_{5a} régulent l'activation de la région supra-chiasmatique chez les rongeurs et pourraient jouer un rôle important dans la régulation du rythme circadien (Sprouse et al., 2004).

Le récepteur 5-HT_{5b}

Le récepteur 5-HT_{5b} est un pseudogène localisé chez l'homme sur le chromosome 2 (2q14.1). Sa transcription chez l'homme est tronquée du fait de l'insertion d'un codon stop dans la séquence codante. Il en résulte une protéine non fonctionnelle. Cependant, ce récepteur a été

mis en évidence chez le rat et la souris mais à ce jour, très peu de données existent en rapport avec son importance physiologique.

2.2.6. Le récepteur 5-HT₆

Le récepteur 5-HT₆ humain est codé par le chromosome 1 (1p35-p36) et possède 440 acides aminés (Kohen et al., 1996). Il appartient à la famille des RCPG de classe A et est lié à une protéine Gs permettant l'augmentation des taux intracellulaires de l'AMPc. Il peut être accessoirement couplé à une protéine Gq/G₁₁ capable d'activer la phospholipase C (Zhang et al., 2003). Dans le SNC, il est localisé dans le système limbique et le cortex (Yoshioka et al., 1998) et en périphérie dans les tissus lymphoïdes (thymus, rate) et à la surface des lymphocytes circulant (Stefulj et al., 2000). Il est activé par l'ergotamine (pKi 8,0 - 8,6) et le LSD (8,4) qui sont des agonistes entiers et le lisuride (pKi 8,0 - 8,1) qui est un agoniste partiel (Boess et al., 1997a, 1997b, 1998). Il est bloqué par la méthiothépine (pKi 8,2 - 9,4) (Kohen et al., 1996; Boess et al., 1997a, 1997b).

Sur le plan physiologique, il intervient dans le développement de la mémoire spatiale et les processus d'apprentissage (Rogers et Hagan, 2001; Woolley et al., 2001; Perez-García et Meneses, 2005a). Il module également la transmission cholinergique, dopaminergique et glutamatergique (Lacroix et al., 2004). Sur le plan thérapeutique, certaines molécules utilisées pour la prise en charge des désordres psychiatriques (anxiété, dépression, stress, troubles de la cognition et schizophrénie) interagissent avec le récepteur 5-HT₆, ce qui pourrait expliquer en partie leur efficacité thérapeutique. C'est le cas de l'olanzapine (pKi 8) et de la chlorpromazine (pKi 7,7 - 7,8) qui sont des agonistes inverses de ces récepteurs (Kohen et al., 1996; Purohit et al., 2005).

2.2.7. Le récepteur 5-HT₇

Le récepteur 5-HT₇ humain possède 479 acides aminés et est codé par le chromosome 10 (10q21-q24) (Stam et al., 1997). Il s'agit d'un récepteur couplé principalement aux protéines Gs capable d'activer l'adénylate cyclase et qui de ce fait augmente les taux intracellulaires d'AMPc (Baker et al., 1998). Il peut également activer la voie ERK ou le complexe protéique Gα₁₂/RhoA/Cdc42 (Norum et al., 2003). Il présente moins de 39% d'homologie dans sa séquence en acides aminés avec les autres récepteurs sérotoninergiques. Il est exprimé notamment dans le SNC (hippocampe, néocortex et hypothalamus), dans le cœur, les artères

coronaires et les tissus lymphoïdes (Nilsson et al., 1999b; Stefulj et al., 2000; Terrón et al., 2001).

Sur le plan physiologique, son activation participe à la régulation de la nociception (Rocha-González et al., 2005), du sommeil paradoxal (Thomas et al., 2003), induit une hypotension (Terrón, 1997; Centurión et al., 2004) et une hypothermie (Guscott et al., 2003; Hedlund et al., 2004). Il intervient dans la mise en place des processus d'apprentissage et de mémoire (Perez-García et Meneses, 2005b) et régule l'activité motrice (Takeda et al., 2005).

Les souris 5-HT₇^{-/-} ne présentent pas de réponse à l'hypothermie induite par les agonistes du récepteur 5-HT₇, mais une perturbation des rythmes circadiens. A l'heure actuelle, 4 isoformes (nommées « a, b, c et d ») du récepteur issues d'un épissage alternatif modifiant leur partie C-terminale sans affecter les propriétés pharmacologiques ont été décrites. Il est stimulé par le 8-OH-DPAT (pKi 6,3 - 7,6) et bloqué par la méthiothépine (pKi 8,4 - 9,4). La zotépine (pKi 8,8) et la ziprasidone (pKi 8,4) sont des agonistes inverses de ce récepteur. Du fait de l'affinité de ce récepteur pour certains ligands possédant des propriétés psychotropes comme la clozapine, l'asepine et le pimozide, il pourrait jouer un rôle dans la prise en charge thérapeutique de certains troubles psychiatriques comme la schizophrénie, la dépression, les troubles du sommeil, l'épilepsie et les troubles de la mémoire.

Tableau 1. Récapitulatif des récepteurs sérotoninergiques, leurs ligands de référence et les voies de couplage activées

Récepteurs		Agonistes molécules (pKi)	Antagonistes molécules (pKi)	Voies de couplage
5-HT₁	5-HT _{1A}	8-OH-DPAT (8,4 - 9,4)	robalzatan (9,2)	RCPG (G _{i0})
	5-HT _{1B}	dihydroergotamine (8,0 - 9,2)	méthiothépine (7,1 - 8,5)	
	5-HT _{1D}	sumatriptan (8,0 - 9,2)	kétansérine (7,4 - 7,5)	
	5-HT _{1e}	zolmitriptan (7,7)	méthylergonovine (7,0 - 7,2)	
	5-HT _{1F}	naratriptan (8,2)	méthysergide (8,2)	
5-HT₂	5-HT _{2A}	asénapine (9,6) méthylergonovine (9,4)	ritansérine (9,4) kétansérine (8,1 - 9,7)	RCPG (G _q)
	5-HT _{2B}	norfenfluramine (8,0)	ritansérine (8,7 - 9,2) lisuride (8,9)	
	5-HT _{2C}	méthylergonovine (8,3)	ritansérine (8,2 - 9,6) kétansérine (6,8 - 7,5)	
5-HT₃	5-HT _{3A}	métaphenylbiguanide (6,6 - 7,2)	ramosétron (10) granisétron (8,6 - 8,8) tropisétron (8,5 - 8,8)	Récepteur ionotrope (cations)
	5-HT _{3AB}	quipazine (9)	azasétron (8,4)	
5-HT₄		cisapride (6,4 - 7,4)	pibosérod (8,8 - 10,4)	RCPG (G _s)
5-HT₅		domitriptan (6,1)	ergotamine (8,0 - 8,7) méthiothépine (8,5 - 8,9) ritansérine (7,6)	RCPG (G _s)
5-HT₆		ergotamine (8,0 - 8,6) lisuride (8,0 - 8,1)	méthiothépine (8,2 - 9,4)	RCPG (G _s)
5-HT₇		8-OH-DPAT (6,3 - 7,6)	méthiothépine (8,4 - 9,4)	RCPG (G _s)

pKi (affinité) ; 8-OH-DPAT (8-hydroxy-propyl-amino-tétraline)

2.2.8. Le transporteur de la 5-HT (SERT)

Le transporteur de la sérotonine (SERT) est une protéine membranaire de 64 kDa appartenant à la famille des transporteurs Na^+/Cl^- dépendants. Il est codé par un gène unique porté par le chromosome 17 (17q11.2). Il possède 12 domaines transmembranaires et est spécifique de la 5-HT. Il opère au moyen d'un transport actif secondaire sous la dépendance de la pompe Na^+/K^+ ATPase pour limiter l'interaction de la 5-HT avec ses récepteurs en l'internalisant pour la dégrader ou la recycler dans les vésicules de sécrétion (Masson et al., 1999).

Dans le SNC, il est exprimé par les neurones sérotoninergiques et sert parfois de marqueur de localisation de ces neurones (Fujita et al., 1993; Qian et al., 1995). En périphérie, on le trouve sur la membrane des plaquettes sanguines où il permet l'internalisation de la 5-HT et son stockage dans les granules denses (Maurer-Spurej, 2005a, 2005b) d'où elle sera mobilisée lors des processus d'hémostase. Il est également exprimé dans le cœur, les poumons et les intestins. Dans ces organes, il est porté généralement par les cellules épithéliales, les fibroblastes, les neurones du système nerveux périphériques et les cellules musculaires lisses.

Certains ligands agissent en bloquant SERT. Ils appartiennent à la famille des inhibiteurs de la recapture (sélectifs ou non) de la 5-HT (IRS, ISRS) : fluoxétine, paroxétine et citalopram. Ces ligands ont été développés pour la prise en charge de la dépression ou comme psychostimulants. D'autres ligands interagissent avec SERT en facilitant la libération de la 5-HT stockée dans les neurones ou dans les plaquettes sanguines. Dans ce groupe, on retrouve : le m-chlorophénylpipérazine, le MDMA (ecstasy) et la fenfluramine. Dans le cas particulier de ces dérivés amphétaminiques, la fenfluramine développée initialement pour son effet anorexigène a été retirée du marché pour ses effets indésirables à type d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et de valvulopathie.

Dans les artères pulmonaires, la 5-HT est un médiateur capable d'entraîner la prolifération et la contraction des cellules musculaires lisses. Son action est favorisée par la surexpression de SERT induite par l'hypoxie et/ou l'élévation des résistances artérielles (MacLean, 2007).

L'analyse de la séquence promotrice de SERT a révélé l'existence de deux génotypes. Le génotype 'L' (à vitesse de transcription élevée) ou 'S' (à vitesse de transcription basse). La variante homozygote L/L est retrouvée de façon très fréquente chez les patients porteurs d'une HTAP primitive (70 - 80%), alors que sa fréquence ne dépasse pas 20 - 30% au sein de la population générale. Cette variante génétique favorise une surexpression du SERT et entretient la réponse proliférative des cellules musculaires lisses à la 5-HT. L'implication du SERT dans la

survenue de l'HTAP est confortée par les données expérimentales obtenues chez les souris SERT^{-/-} qui sont protégées contre l'HTAP malgré une potentialisation de la vasoconstriction induite par l'hypoxie (MacLean et al., 2000; Eddahibi et al., 2001).

Le phénotype pléiotrope (plusieurs caractères phénotypiques) de la souris SERT^{-/-} renseigne sur l'importance de cette protéine dans l'organisme. Les souris SERT^{-/-} présentent un développement embryologique anormal du cerveau (Persico et al., 2001; Esaki et al., 2005), une réponse globalement diminuée à la suite d'une stimulation par des agonistes des récepteurs sérotoninergiques, une anxiété exacerbée, une altération des réponses sympatho-adrénergiques et neuroendocrines au stress (même minime), une diminution de l'agressivité (Holmes et al., 2002), une altération de certaines facultés d'apprentissage émotionnelle (Kalueff et al., 2007), un allongement du temps de sommeil paradoxal (Wisor et al., 2003), une diminution de l'excitabilité du cerveau (Bengel et al., 1998), une dérégulation de la température corporelle (Li et al., 1999), une augmentation de la motilité colique, une diminution de la sensibilité de la vessie à l'étirement (Linder et al., 2009), une diminution de la résistance osseuse et musculaire, une diminution de l'activité physique à l'origine d'une obésité et une intolérance au glucose avec une augmentation de l'insuline plasmatique, de la leptine, des triglycérides et du cholestérol (Uçeyler et al., 2010).

2.3. Etude du système sérotoninergique dans l'appareil cardiovasculaire

2.3.1. Origine de la 5-HT dans le système cardiovasculaire

De nombreux récepteurs sérotoninergiques sont exprimés dans le système cardiovasculaire et sont responsables des divers effets physiologiques rapportés dans la littérature. L'appareil cardio-circulatoire est constamment exposé à la 5-HT périphérique véhiculée par les plaquettes sanguines ou synthétisée localement (Ni et al., 2008).

Circuit de la 5-HT véhiculée par les plaquettes

La 5-HT produite en périphérie par les cellules entérochromaffines intestinales, est acheminée par la veine porte dans le foie (où elle est en partie dégradée) puis dans le sang. Durant ce transport, la 5-HT est emmagasinée dans les plaquettes sanguines grâce à son transporteur (SERT). Elle sera remobilisée pour interagir avec ses récepteurs ou internalisée via SERT pour être dégradée par le système des MAOs mitochondriales. La 5-HT peut également être incorporée dans la cellule par un mécanisme indépendant de son transporteur (Ni et al.,

2008). La 5-HT libre cytoplasmique peut s'attacher aux résidus glutamines de certaines protéines du cytosquelette (actines, chaînes lourdes de myosine et filamine-A) ou activer les petites protéines G (Ras) grâce à l'activité catalytique de la transglutaminase tissulaire (TG2). Ce processus, connu sous le terme de 'sérotonylation' permettrait de moduler la transduction de certains signaux intracellulaires (Walther et al., 2003) (Figure 4).

Synthèse locale de la 5-HT

L'implication de la 5-HT dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires a été intensément étudiée avec des fonctions parfois controversées. Une élévation de la 5-HT sanguine peut être corrélée à la présence d'une hypertension artérielle primitive (Kéreveur et al., 2000), d'une insuffisance cardiaque (Chandra et al., 1994) ou constituer un facteur de risque de coronaropathie (Vikenes et al., 1999).

Un effort de caractérisation du système sérotoninergique dans les artères périphériques a permis d'établir la possibilité d'une synthèse locale. En effet, Ni et collaborateurs, dans leurs travaux ont démontré la présence de la TPH1 (RT-PCR et Western blot) dans les artères, l'expression de la MAO-A impliquée dans son métabolisme (immunohistochimie et Western blot), une augmentation de la production du 5-HIAA après une exposition à la 5-HT et la présence de SERT sur la membrane cytoplasmique des cellules musculaires lisses (Ni et al., 2008).

Il a été suggéré que le myocarde pouvait lui-même stocker et synthétiser de la 5-HT. Chez l'homme, la concentration myocardique serait d'environ 0,4 µg/g de tissu sans qu'une localisation précise ne soit évoquée (Sole et al., 1979). De plus, la mise en évidence de la TPH2 dans les neurones des ganglions cardiaques humains pourrait aussi expliquer la synthèse locale de 5-HT (Singh et al., 1999).

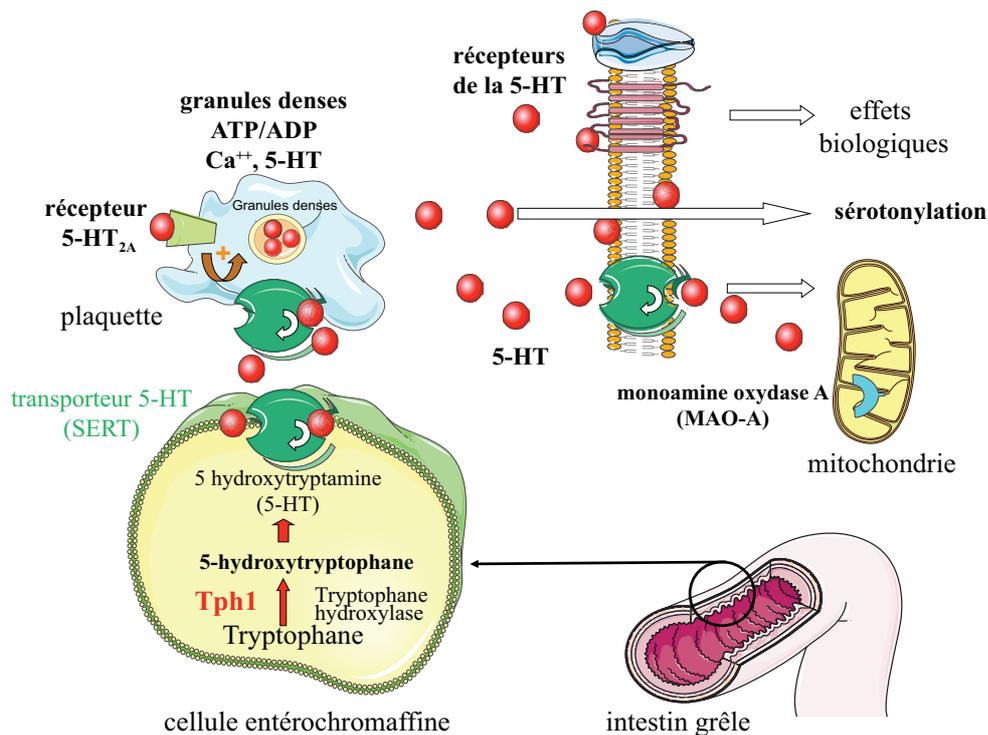


Figure 4. Circuit de la 5-HT en périphérie

2.3.2. Répartition et rôles physiologiques des récepteurs sérotoninergiques

Les différentes études portant sur la caractérisation du système sérotoninergique cardiovasculaire, rapportent de façon variable en fonction du lit circulatoire, la présence des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2A} dans les vaisseaux (responsables de la vasoconstriction), des récepteurs 5-HT₄ dans le myocarde et les récepteurs 5-HT_{2B} sur l'endothélium valvulaire (Kaumann et Levy, 2006). Le tableau 2 résume l'ensemble des récepteurs sérotoninergiques exprimés dans le système cardiovasculaire humain et les principales fonctions biologiques associées décrites dans la littérature.

Nos travaux s'intéressent surtout à l'expression des récepteurs sérotoninergiques dans le cœur. La figure 5 présente un aperçu de la localisation des principaux récepteurs sérotoninergiques exprimés dans le cœur.

En s'intéressant à l'évolution phylogénétique, nous pourrions comprendre à la lumière des travaux originaux de Greenberg, que si chez le mollusque (*Venus mercenaria*), la 5-HT est le neuromédiateur excitateur du cœur, lors de l'évolution, la 5-HT aurait perdu chez les

mammifères, son pouvoir de neuromédiateur excitateur principal du cœur au profit des catécholamines (adrénaline, noradrénaline) (Greenberg, 1960a, 1960b).

Bien qu'il ait été démontré le rôle cardiostimulant de la 5-HT notamment par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT₄, son importance dans le fonctionnement cardiaque normal reste mal connu. De plus, les souris 5-HT₄^{-/-} ne présentent aucun phénotype particulier. Cependant, d'importantes publications révèlent l'importance du système sérotoninergique dans le développement du cœur embryonnaire chez les mammifères. En effet, l'inactivation constitutionnelle de la TPH1 (Côté et al., 2003) ou encore des récepteurs 5-HT_{2B} (Nebigil et al., 2000) chez la souris provoquent une cardiomyopathie dilatée sans hypertrophie compensatrice se soldant à l'âge adulte par une insuffisance cardiaque.

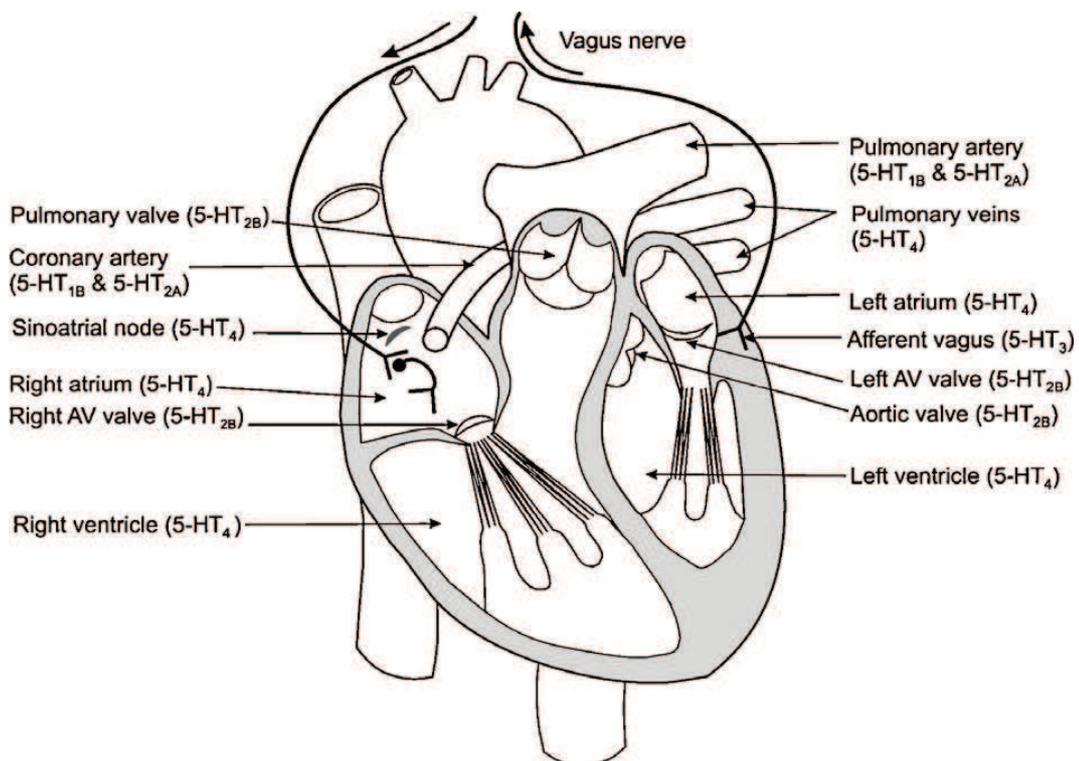


Figure 5. Principaux récepteurs sérotoninergiques exprimés dans le cœur
(d'après Kaumann et Levy, 2006)

Tableau 2. Récepteurs sérotoninergiques dans l'appareil cardio-circulatoire
(d'après Kaumann et Levy, 2006)

Récepteurs (5-HT)	Localisation	Fonctions physiologiques	Références bibliographiques
5-HT _{1A}	cellules endothéliales (artères rénales ?)	vasodilatation?	(Verbeuren et al., 1991)
	cellules musculaires lisses (gros vaisseaux ; aorte)	vasoconstriction	(Kaumann et al., 1993)
5-HT _{1B}	cellules endothéliales (petits vaisseaux ; artérioles cérébrales)	vasodilatation	(Elhusseiny et Hamel, 2001)
	veines (saphène, pulmonaire et ombilicale)	vasoconstriction	(Bax et al., 1992; Cortijo et al., 1997; Rogines-Velo et al., 2002)
5-HT _{1D}	terminaisons nerveuses vasculaires ?	vasodilatation	(Verheggen et al., 1998)
5-HT _{1c}	non déterminé	-	-
5-HT _{1F}	non déterminé	-	-
5-HT _{2A}	idem (5-HT _{1B}) et plaquettes sanguines	idem (5-HT _{1B}) et agrégation plaquettaire	idem (5-HT _{1B}) et (De Clerck et al., 1984)
5-HT _{2B}	cellules endothéliales (artères, valves cardiaques)	morphogenèse valvulaire? pression artérielle pulmonaire? vasodilatation?	(Fitzgerald et al., 2000a) (Launay et al., 2002a) (Glusa et Pertz, 2000)
5-HT _{2C}	non déterminé	-	-
5-HT _{3A} /5-HT _{3B}	afférences épicaudiques du nerf vague	bradycardie réflexe et douleur	(Mohr et al., 1987; Fu et Longhurst, 2002)
5-HT ₄	nœud sinusal et cardiomyocytes (oreillettes et ventricules)	cardiostimulation	(Kaumann et Sanders, 1994; Brattelid et al., 2004)
5-HT _{5a}	non déterminé	-	-
5-HT ₆	non déterminé	-	-
5-HT ₇	Cellules musculaires lisses (artères rénales, ombilicales, cérébrales, rénales)	vasodilatation	(Schoeffter et al., 1996)

2.3.3. Dysfonctions du système sérotoninergique : causes et pathologies cardiaques

Les diverses fonctions physiologiques connues de la 5-HT (Tableau 2) nous permettent d'apprécier son implication dans la physiopathologie de certaines atteintes vasculaires ou cardiaques.

2.3.3.1. Pathologies vasculaires

L'administration de la 5-HT en bolus intraveineux conduit à une réponse adaptative triphasique modifiant la pression artérielle. La première phase, fugace, consiste en une bradycardie associée à une chute de la pression artérielle. Cette réponse baptisée « réflexe de Bezold-Jarisch » provient d'une stimulation des récepteurs 5-HT₃ localisés sur les fibres des afférences parasympathiques avec pour conséquence l'activation d'une boucle réflexe cardiopulmonaire qui conduit à une activation vagale (bradycardie) et une inhibition sympathique (chute de la pression artérielle). Dans la deuxième phase, la 5-HT provoque une augmentation de la pression artérielle principalement en raison de l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} vasculaires. Cette phase est aussi associée à une bradycardie ayant pour origines une stimulation baroréflexe et la réduction présynaptique de la libération périphérique de noradrénaline due à la stimulation des récepteurs 5-HT_{1B/1D}. Finalement, la troisième phase est caractérisée par une chute durable de la pression artérielle impliquant des mécanismes qui associent une réduction de la transmission sympathique ganglionnaire par activation des récepteurs 5-HT_{1B/1D} et un effet vasodilatateur artériel consécutif à l'activation des récepteurs 5-HT₇ des cellules musculaires lisses et des récepteurs 5-HT_{2B} endothéliaux ; cette dernière stimulation conduisant à la libération de NO (Ramage et Villalón, 2008).

Si la sérotonine est perfusée en continu, seule la troisième phase est observée, mais, dans ce cas, on observe une tachycardie passant par l'activation de récepteurs atriaux variants en fonction de l'espèce considérée : 5-HT₄ chez l'Homme, 5-HT_{2A} chez le rat, 5-HT₃ chez le chien ou 5-HT₇ chez le chat. Cette situation pourrait évoluer en cas d'insuffisance cardiaque où le récepteur 5-HT₄ deviendrait principalement responsable de la tachycardie.

Au total, la sérotonine exerce de multiples effets sur l'appareil cardiovasculaire, à la fois en périphérie et au sein du système nerveux central en participant activement à la régulation

baroréflexe. Au sein du système nerveux central, les deux principaux récepteurs qui contribuent à la régulation cardiovasculaire sont les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₃.

Hypertension

Dans les artères, les cellules endothéliales portent les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B} et 5-HT₄ (en moindre proportion). Les cellules musculaires lisses sous-jacentes expriment les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ et parfois 5-HT_{2B}. Les récepteurs des cellules endothéliales ont la capacité d'induire une vasodilatation tandis que la stimulation par la sérotonine des cellules musculaires lisses produit une vasoconstriction. Ce profil d'expression suggère que la 5-HT pourrait jouer un rôle complexe dans la régulation du tonus vasomoteur et que l'effet résultant pourrait varier en fonction de l'équilibre entre les différentes populations cellulaires (Ullmer et al., 1995). De nombreuses études ont évalué la contribution des récepteurs sérotoninergiques dans la régulation de la pression artérielle. Les récepteurs 5-HT_{2A} sont principalement responsables de la contraction des grosses artères au contraire des veines qui se contractent par la stimulation des récepteurs 5-HT_{1B} (Linder et al., 2008).

L'effet vasoconstricteur de la sérotonine est beaucoup plus important dans des modèles expérimentaux ou génétiques d'hypertension que chez des animaux ayant une pression sanguine normale (Mertens et al., 1991). Ces études soulèvent donc la question de l'implication de la sérotonine dans la physiopathologie de l'hypertension. Les muscles lisses artériels provenant de rats rendus hypertendus par une association de désoxycorticostérone et de sel (DOCA/sel) ont une sensibilité accrue à la 5-HT. Ce changement a été attribué récemment à une modification de la population des récepteurs exprimés par les grosses artères de ces animaux. En effet, si les agonistes des récepteurs 5-HT_{1B} ne contractent ni l'aorte, ni l'artère mésentérique de rats normotendus, on voit apparaître une contribution de ces récepteurs dans l'artère mésentérique chez les animaux hypertendus (Banes et Watts, 2001). Ce phénomène a aussi été observé pour les récepteurs 5-HT_{2B}. Plus particulièrement, Watts et collaborateurs ont apporté des éléments pharmacologiques et moléculaires qui montrent que les récepteurs 5-HT_{2A} (sensibles à la kétansérine) sont principalement responsables de la contraction des artères des rats normotendus, alors que les récepteurs 5-HT_{2B} (relativement insensibles à la kétansérine) sont principalement à l'origine de la contraction des artères des rats DOCA/sel (Watts et al., 1995b, 1996; Watts, 1998). Ce changement est crucial car la sérotonine a plus d'affinité pour les récepteurs 5-HT_{2B} que 5-HT_{2A} et donc une concentration plus faible de sérotonine permet l'activation complète des récepteurs 5-HT_{2B}. *In vivo*, le même groupe a montré que l'augmentation de l'activation des récepteurs 5-HT_{2B} est bien responsable de l'hypertension chez les rats DOCA/sel dans la mesure

où l'antagoniste LY-272015 (5-HT_{2B}-sélectif) réduit la pression artérielle de ces animaux (Watts et Fink, 1999).

La fenfluramine est un composé anorexigène dont le métabolite actif, la norfenfluramine, provoque une vasoconstriction et une augmentation de la pression artérielle chez le rat par activation des récepteurs 5-HT_{2A} (Ni et al., 2007). Ce composé a aussi une bonne affinité pour les récepteurs 5-HT_{2B} dont le niveau d'expression est augmenté chez des rats hypertendus DOCA/sel (Banes et Watts, 2002). C'est ainsi que la norfenfluramine augmente la pression artérielle plus fortement en cas d'hypertension. Cet effet passerait par une action dans des artères de petits calibres car, dans l'aorte, que les artères proviennent de rats normo ou hypertendus, la contraction induite par la norfenfluramine implique les récepteurs 5-HT_{2A} mais pas les récepteurs 5-HT_{2B}. Les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} semblent donc jouer des rôles complémentaires dépendants du type vasculaire et/ou de l'état physiologique des vaisseaux.

Au total, la sérotonine contribue peu au contrôle du tonus vasomoteur de base mais son rôle se voit renforcé dans l'hypertension principalement du fait d'une transition d'expression de récepteurs vers des cibles à plus forte affinité (5-HT_{2A} vers 5-HT_{2B}).

Coronaropathie et préconditionnement ischémique

L'angor instable et l'infarctus du myocarde sont des situations pathologiques qui associent des troubles de la vasomotricité des artères coronaires, une activation plaquettaire et une souffrance myocardique. Dans ces situations, les plaquettes activées libèrent leur stock plaquettaire en sérotonine. Ce messager va ainsi pouvoir activer des autorécepteurs plaquettaires du sous-type 5-HT_{2A} mais aussi des récepteurs sérotoninergiques localisés dans la paroi des artères coronaires et les cellules du syntitium cardiaque. Des études *in vitro*, sur des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines, ont montré que l'activation par la sérotonine des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} est responsable d'une production de nitrites, produits du métabolisme du monoxyde d'azote (Ishida et al., 1998). L'ergonovine, ligand à forte affinité pour le récepteur 5-HT_{2B}, 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 NO-synthases. De même, chez le rat, la sérotonine exerce de puissants effets vasodilatateurs coronaires puisqu'elle est capable d'augmenter le flux coronarien de façon dépendante de la dose. Ces effets sont obtenus sur des vaisseaux présentant un endothélium intact. La présence d'une dysfonction endothéliale ou d'une désendothélialisation partielle pourrait, au contraire, révéler des effets coronaroconstricteurs de la sérotonine libérée dans la

lumière vasculaire (Takano et al., 2004). L'interaction entre la plaquette activée et la paroi vasculaire pourrait contribuer aux lésions ischémiques aiguës ou d'ischémie/reperfusion.

C'est sur cette base que le sarpogrelate, un antagoniste bloquant préférentiellement les récepteurs 5-HT_{2A} par rapport aux 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} (Rashid et al., 2003b), a été étudié dans des modèles animaux d'ischémie fixe ou d'ischémie/reperfusion. Cette molécule a été développée et est utilisée en clinique comme antiagrégant plaquettaire. L'idée est donc ici qu'un blocage des récepteurs 5-HT_{2A} pourrait entraver le cercle vicieux de l'autoactivation plaquettaire par la sérotonine conduisant finalement à une réduction de la libération de cette dernière. Par une étude de microdialyse chez le lapin, Shimizu et collaborateurs ont ainsi montré que l'ischémie myocardique entraîne une augmentation de la concentration tissulaire en 5-HT in vivo alors qu'elle n'est pas observée in vitro sur les cœurs isolés et perfusés par une solution dépourvue de plaquettes sanguines (Shimizu et al., 2002). De plus, un prétraitement par le sarpogrelate permettait de prévenir l'apparition de 5-HT dans le myocarde tout en limitant la taille de la nécrose. Cette étude tendrait à démontrer que la sérotonine myocardique provient des plaquettes sanguines, au moins en situation d'activation plaquettaire aiguë. Cependant, ce travail ne permet pas de savoir si la protection myocardique conférée par le sarpogrelate provient d'un effet vasculaire ou myocardique.

La démonstration d'un rôle protecteur myocardique conféré par le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} tissulaires nous provient d'études menées sur des cœurs isolés perfusés. Dans le cœur isolé de cochon d'Inde, le sarpogrelate réduit les lésions ischémiques et permettrait une meilleure activation des K_{ATP} mitochondriaux mimant ainsi un phénomène de préconditionnement ischémique tel qu'il a déjà été décrit avec le nicorandil (Muto et al., 2005). Finalement, in vivo, le sarpogrelate protège le myocarde des phénomènes d'ischémie/reperfusion aussi bien chez l'animal (Temsah et al., 2001) que chez l'Homme (Satomura et al., 2002). Au total, il semble que les récepteurs 5-HT_{2A} plaquettaires, coronaires et myocardiques contribuent aux lésions d'ischémie/reperfusion et que leur blocage autour de la phase aiguë permettrait de limiter l'étendue des lésions. De façon intéressante, cette notion a été étendue au remodelage chronique du post-infarctus (Sanganalmath et al., 2008). Trois semaines après avoir subi une ligature coronaire, des rats ont reçu un traitement de 35 jours par du sarpogrelate. Ce traitement a permis de réduire le remodelage sans affecter la taille de la nécrose qui, de toute façon, était déjà complètement cicatricielle au moment de l'introduction du traitement. De plus, cette molécule présentait des effets antiarythmiques à mettre probablement en relation avec la réduction de la souffrance cellulaire des cardiomyocytes. Ce travail semble montrer une efficacité du blocage

des récepteurs 5-HT_{2A} dans les cardiopathies ischémiques aiguës ou chroniques. La contribution de la sérotonine plaquettaire dans ces mécanismes reste encore à préciser.

Migraine

La migraine est un syndrome qui affecte 15 à 18 % des femmes contre environ 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. La migraine a pour étiologie, une diminution du flux cérébral par vasoconstriction, suivie d'une vasodilatation réactionnelle responsable des céphalées. Il est connu de longue date que les récepteurs de la sérotonine sont impliqués dans la physiopathologie de la migraine en raison de leur forte contribution à la régulation de la vasomotricité cérébrale (Goadsby et al., 2002). D'ailleurs, c'est par l'utilisation d'antimigraineux sérotoninergiques, en particulier les triptans, que l'on a pu décrypter une partie des mécanismes qui sous-tendent cette pathologie. En effet, de nombreuses études ont montré l'efficacité clinique des agonistes des récepteurs 5-HT_{1B}, tels que le sumatriptan, dans le traitement de la crise migraineuse (Ferrari, 1998). Les triptans provoquent une vasoconstriction cérébrale et agissent également sur les ganglions sensitifs du trijumeau. C'est ainsi que des anti-migraineux de référence, comme la dihydroergotamine et les triptans, en plus de leur action vasculaire, s'opposent à l'activation du complexe trigémino-vasculaire et à la libération du CGRP («calcitonin gene-related peptide») qui y sont associées (Buzzi et al., 1991; Hoskin et al., 1996). Ils s'opposent également à la génération éventuelle d'un influx nerveux rétrograde (réflexe d'axone) dans les circuits nociceptifs en réponse à une excitation locale méningée. Au total cette double action, à la fois vasculaire et neuronale, au travers de la stimulation des récepteurs 5-HT_{1B} de la sérotonine, rend très probablement compte de l'efficacité de ces médicaments pour stopper la crise migraineuse (Goadsby et al., 2002).

L'ergotamine, la dihydroergotamine, le méthysergide et son métabolite, la méthylergonovine, sont des antagonistes des récepteurs 5-HT₁ qui possèdent également une forte affinité pour les récepteurs 5-HT₂ (Kursar et al., 1994). Ils sont utilisés pour leurs effets préventifs de la migraine, une action qui provient de leur interaction probable avec les récepteurs 5-HT_{2B} (Kalkman, 1994). Les récepteurs 5-HT_{2B} ont été mis en évidence dans les cellules endothéliales des vaisseaux méningés. Leur activation induit la relaxation des vaisseaux cérébraux par la synthèse de NO (Schmuck et al., 1996).

Hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire primitive (HTAP) est une pathologie où l'augmentation progressive de la pression artérielle pulmonaire provoque une surcharge ventriculaire droite qui conduit à son dysfonctionnement, son hypertrophie puis irrémédiablement à sa défaillance. L'HTAP est le terme clinique classiquement utilisé pour décrire une maladie idiopathique rare (prévalence 1-2 pour 1 000 000 individus) et dont le pronostic est sombre (survie de moins de 3 ans à partir du diagnostic, en absence de traitement). Les premiers symptômes apparaissent quand la pression artérielle pulmonaire systolique moyenne est supérieure à 20 mmHg (au repos). L'HTAP est morphologiquement et histologiquement caractérisée par une hypertrophie des cellules musculaires lisses des petites artères pulmonaires avec une intima épaisse, une hypertrophie de la média, une prolifération adventitielle, et un dépôt anormal de matrice extracellulaire. La progression du remodelage vasculaire entraîne un rétrécissement de la lumière, une augmentation de la pression artérielle pulmonaire, et enfin une hypertension artérielle pulmonaire irréductible (Chan et Loscalzo, 2008). En dehors de cette forme idiopathique, l'hypertension pulmonaire peut être provoquée, à titre d'exemples, par une anémie hémolytique, une infection par le VIH, ou des mutations génétiques dans le gène BMPR2. Un séjour prolongé en haute altitude peut, du fait de l'hypoxie chronique, aussi induire une hypertension pulmonaire chez les personnes prédisposées. En outre, la prise d'anorexigènes, a été associée à l'augmentation de la prévalence de l'HTAP. Dans les années 1980 et 1990, l'utilisation prolongée d'anorexigènes comme la dexfenfluramine et la fenfluramine, maintenant retirées du marché, a augmenté le risque de développer une hypertension pulmonaire d'un facteur 23 (Weir et al., 2008). Très récemment, une augmentation de la pression artérielle pulmonaire et des cas de maladies cardiaques valvulaires ont été observées chez les patients atteints de la maladie de Parkinson traités avec le pergolide (Zanettini et al., 2007a).

De nombreux arguments sont à l'origine de l'intérêt actuel suscité par la 5-HT dans le développement de l'HTAP expérimentale et humaine. Des données expérimentales ont permis d'authentifier l'action déterminante de la sérotonine dans la physiopathologie de l'HTAP induite par l'hypoxie. La sérotonine intervient par son action vasoconstrictrice et mitotique sur les cellules musculaires lisses vasculaires. L'expression de SERT et des récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT₇ de la sérotonine est détectée dans les cellules endothéliales et musculaires lisses de l'artère pulmonaire et de ses branches. L'analyse de la réponse mitotique de cellules musculaires lisses isolées à partir d'artères pulmonaires normales, ou provenant de patients atteints d'HTAP, confirme l'activité mitotique très marquée de la sérotonine sur les cellules

musculaires lisses. Les cellules musculaires lisses des patients atteints d'HTAP prolifèrent davantage en réponse à la 5-HT et au sérum que les cellules de sujets témoins.

Génétiquement, le variant allélique long du promoteur de SERT est associé à une augmentation d'expression du transporteur et à une augmentation de la prolifération des muscles lisses; la forme homozygote de ce variant avait été proposée comme pouvant être associée avec l'HTAP idiopathique des patients mais une étude large des polymorphismes de SERT n'a pas confirmé cette association (Machado et al., 2006). Chez les rats, l'hypoxie chronique et la sérotonine provoquent un important remodelage vasculaire. De même, la surexpression du gène de SERT chez la souris a provoqué le développement spontané de l'HTAP en l'absence d'hypoxie et une exagération de l'hypertension pulmonaire après un stimulus hypoxique. Inversement, le remodelage des vaisseaux et l'hypertension pulmonaire hypoxique sont réduits chez les souris mutantes pour le récepteur 5-HT_{1B} ou pour SERT (Chan et Loscalzo, 2008). Par conséquent, la voie de signalisation de la sérotonine module la fonction des muscles lisses vasculaires pulmonaires, à la fois au stade normal et au stade de la maladie, et contribue probablement à la progression de l'HTAP. Cependant, le mécanisme exact reste à préciser. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (IRSS), qui augmentent les niveaux de sérotonine, mais inhibent le transport de la sérotonine, n'ont aucun effet sur le développement de l'HTAP hypoxique. Au contraire, une association entre l'utilisation maternelle tardive des IRSS et une hypertension pulmonaire néonatale persistante a été observée (Chambers et al., 2006). Par conséquent, il n'est actuellement pas clair si la sérotonine elle-même ou l'association de ses effecteurs principaux conduisent au développement de l'HTAP.

Des concentrations plasmatiques élevées en sérotonine ont été mises en évidence chez la plupart des patients atteints d'HTAP. Une corrélation positive entre ces concentrations et la pression ventriculaire droite a été observée chez plus de 80% des patients présentant une HTAP (Hervé et al., 1995). Les drogues qui peuvent provoquer l'hypertension pulmonaire, telles que l'aminorex, le pergolide, la fenfluramine, et la dexfenfluramine (ou leurs métabolites actifs) sont potentiellement des substances capables de provoquer la libération de sérotonine, bien qu'ils soient aussi des agonistes des récepteurs 5-HT₂ et plus précisément des récepteurs 5-HT_{2B}. Cette stimulation de la libération de sérotonine pourrait contribuer à l'augmentation des concentrations plasmatiques de ce médiateur et favoriser l'activation des effecteurs sérotoninergiques. D'ailleurs, une exposition chronique à l'hypoxie (simulant une haute altitude) entraîne une surexpression des récepteurs 5-HT_{2B} chez les souris (comme chez les patients atteints d'HTAP). L'HTAP induite par l'hypoxie chez les souris est significativement favorisée par administration

de doses thérapeutiques de dexfenfluramine. Au contraire, la survenue d'HTAP induite par l'hypoxie chez les souris est complètement reversée en présence d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2B}, le RS-127445. De manière similaire, les souris invalidées pour le récepteur 5-HT_{2B} ne développent pas d'HTAP suite à une exposition chronique à l'hypoxie et/ou à l'administration de dexfenfluramine (Launay et al., 2002b). Les expériences utilisant des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires ont montré que l'activation des récepteurs 5-HT_{2B} peut aussi initier la progression du cycle cellulaire et la mitogenèse. En analysant la structure du gène du récepteur 5-HT_{2B} chez des patients qui développaient une HTAP après la prise de fenfluramine, une mutation hétérozygote a été trouvée chez un malade (Blanpain et al., 2003). La stimulation de ce récepteur muté conduit à une plus grande efficacité pour la prolifération cellulaire en particulier en réponse à la nordexfenfluramine (le métabolite actif de la dexfenfluramine) et à la 5-HT du fait d'un couplage exclusif à la protéine G α_{13} (Deraet et al., 2005). La sérotonine peut aussi influencer d'autres voies de régulation impliquées dans la progression de l'HTAP ; en particulier, la sérotonine peut inhiber la voie de signalisation du BMP par une modulation des protéines Smad en aval. À ce titre, l'administration chronique de la 5-HT augmente la pression artérielle sanguine et le remodelage vasculaire chez les souris haploinsuffisantes pour le gène du BMPR2 (BMPR2^{-/+}), un effet potentialisé par l'hypoxie (Long et al., 2006).

Ainsi des déterminants spécifiques génétiques, tels que des mutations de BMPR2, pourraient interagir avec des perturbations environnementales comme l'hypoxie ou l'utilisation d'anorexigènes, et des gènes impliqués dans la pérennisation de la maladie tels que le récepteur 5-HT_{2B} ou SERT, pour mener à l'une des nombreuses expressions cellulaires, histologiques et cliniques de l'hypertension artérielle pulmonaire (Figure 6).

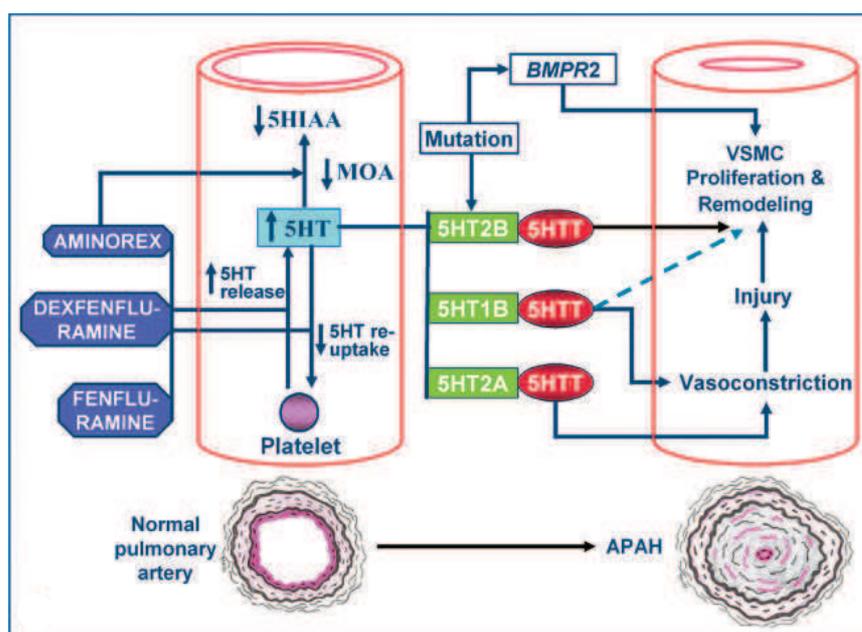


Figure 6. Implication du système sérotoninergique et des facteurs génétiques prédisposant dans l'HTAP induite par les anorexigènes (d'après Elangbam, 2009)

Les anorexigènes (fenfluramine et dexfenfluramine), induisent dans les vaisseaux une élévation des concentrations plasmatiques de 5-HT en favorisant sa libération à partir des plaquettes ou des neurones et en inhibant son métabolisme (transformation en 5-HIAA par la MAO-A. La 5-HT par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2A} vasculaires et de son transporteur 5-HTT (SERT) provoque une vasoconstriction et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) à l'origine du remodelage des petits vaisseaux pulmonaires. Les mutations des récepteurs 5-HT_{2B} (Blanpain et al., 2003) et du BMPR2 (perte de fonction) constituent des facteurs prédisposants pour la survenue d'une HTAP.

2.3.3.2. Dysfonctions cardiaques

Insuffisance et l'hypertrophie cardiaques

L'insuffisance cardiaque se définit comme un syndrome clinique lié à une inadéquation entre la demande tissulaire en oxygène et les capacités qu'a le cœur à augmenter son débit. Les malades se plaignent de difficultés respiratoires initialement pour des efforts importants, mais, qui vont progressivement s'aggraver pour finalement se présenter sous la forme d'une dyspnée de repos. Dans les pays développés, les deux principales étiologies de cette affection sont la

dysfonction ventriculaire gauche chronique du post-infarctus, la cardiomyopathie dilatée primitive et les cardiopathies valvulaires. L'aggravation progressive de la maladie est en partie due à la pathologie originelle, mais, provient aussi d'un processus continu affectant la structure géométrique et histologique du myocarde ainsi que le profil d'expression génique des cellules qui le composent. Ce phénomène continu, indépendant du facteur déclenchant, est appelé « remodelage ». Les traitements médicaux visent à améliorer l'hémodynamique en réduisant les pressions de remplissage et en améliorant la contractilité, mais, un grand bond en avant a été effectué lorsqu'on a compris que le traitement chronique de ces malades devait surtout cibler le remodelage. C'est ainsi que le traitement de base doit associer des médicaments réduisant l'activité des systèmes rénine-angiotensine-aldostérone (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine et de l'aldostérone) et sympathique (β -bloquants). Malheureusement, en dépit de cette révolution thérapeutique, de nombreux malades ne peuvent pas bénéficier des doses optimales de ces traitements en raison d'effets indésirables hémodynamiques et/ou métaboliques. La recherche porte donc actuellement vers la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et de nombreux travaux se sont portés sur l'analyse des interactions entre les cellules de la matrice extracellulaire cardiaque et les cardiomyocytes.

Dans les paragraphes suivants, nous allons tenter de préciser les fonctions de la sérotonine dans l'insuffisance cardiaque, tant sur le plan hémodynamique que sur celui du remodelage.

Il existe deux types d'hypertrophie cardiaque; une hypertrophie dite physiologique que l'on observe chez des athlètes de haut-niveau qui pratiquent un exercice physique chronique. Ce cœur hypertrophique est aussi appelé « cœur athlétique » et correspond à une réponse adaptative 'bénéfique' pour le système cardiovasculaire. Dans les sports dits « d'endurance », l'hypertrophie est de type excentrique et se traduit par une majoration des diamètres ventriculaires. Elle est classiquement observée chez les cyclistes et les coureurs de fond. L'augmentation des diamètres permet de majorer les volumes de remplissage et est habituellement associée à un ralentissement de la fréquence cardiaque qui, par voie de conséquence, contribue à augmenter le temps du remplissage ventriculaire. Dans les sports effectués sur des durées brèves mais à une intensité très élevée, l'hypertrophie est concentrique, impliquant principalement une majoration des épaisseurs pariétales. Ces deux types d'hypertrophie cardiaque physiologique ont pour caractéristique de régresser spontanément à l'arrêt de la pratique sportive. Au contraire, le second type d'hypertrophie cardiaque, dite

hypertrophie pathologique, implique des mécanismes différents de ceux qui induisent une hypertrophie physiologique. Elle entre dans le cadre d'un phénomène global de remodelage du cœur qui se traduit par des atteintes de sa forme (remodelage géométrique), de sa structure (remodelage histologique) mais aussi du profil d'expression génique. Ce remodelage est un phénomène complexe qui se met en place au décours de pathologies comme l'infarctus du myocarde ou l'hypertension artérielle. Dans ce cadre, l'hypertrophie cardiaque est initialement un phénomène de compensation qui, à court terme, permet de maintenir une fonction cardiaque normale, en particulier lors d'augmentations de la contrainte pariétale. Par contre, ce remodelage n'a pas pour caractéristique de régresser spontanément et contribue, au long court, à une irrémédiable évolution vers la dysfonction ventriculaire chronique. Au plan cellulaire, elle se caractérise par une augmentation de la taille et du nombre des sarcomères des cardiomyocytes et par une hyperplasie de la matrice extracellulaire cardiaque, principalement par une prolifération des fibroblastes. La mise en place de cette hypertrophie se fait sous le contrôle d'un nombre important et encore mal connu de facteurs neuroendocriniens et neurohumoraux. Cependant, l'activation des systèmes sympathique et rénine-angiotensine-aldostérone est la pierre angulaire des processus de remodelage, participant à l'ensemble des processus de ce phénomène.

Depuis l'étude de Framingham, on sait que l'hypertrophie cardiaque pathologique constitue un facteur de risque indépendant de morbidité, quelle que soit la cause qui l'a déclenchée. En particulier, on a pu montrer au cours des quinze dernières années que cette hypertrophie cardiaque est fortement corrélée à la mortalité dans l'insuffisance cardiaque et qu'elle est associée à des phénomènes d'apoptose des cardiomyocytes, à une réduction de l'apport relatif en oxygène dans le myocarde ainsi qu'à des troubles du rythme pouvant induire des morts subites. On sait maintenant qu'elle n'est pas nécessaire au maintien d'une fonction cardiaque normale puisque sa réduction, y compris dans des cas de surcharge ventriculaire en pression, est toujours bénéfique. A l'inverse, on sait que la seule réduction des chiffres tensionnels n'est pas toujours suffisante pour faire régresser l'hypertrophie. C'est pour cette raison que des traitements se sont imposés. Les bêta-bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les antagonistes du récepteur AT1 permettent de prévenir ou de faire régresser cette hypertrophie tout en agissant sur la pression artérielle dans l'hypertension. Néanmoins, les effets antihypertrophiques restent peu importants et l'emploi de ces molécules pose des problèmes de tolérance hémodynamique ou néphrologique. Il semble donc exister de la place dans l'arsenal thérapeutique pour des produits plus actifs et/ou mieux tolérés.

5-HT et remodelage cardiaque : Un axe de recherche visant à caractériser le système sérotoninergique cardiaque et à évaluer son impact potentiel dans les processus de remodelage

ventriculaire a été récemment développé. Chez la souris, l'ablation du récepteur 5-HT_{2B} de la sérotonine induit une cardiomyopathie dilatée sans hypertrophie compensatrice (Nebigil et al., 2001). A l'inverse, des souris surexprimant ce récepteur dans les cardiomyocytes présentent une hypertrophie ventriculaire gauche associée à une dysfonction mitochondriale (Nebigil et al., 2003). Il semblerait donc que ce récepteur puisse participer aux processus de l'hypertrophie cardiaque. Cependant, sa localisation à la surface de plusieurs cellules résidentes au sein du myocarde complique l'interprétation de ses rôles potentiels.

Dans un premier temps, ces travaux se sont orientés vers les cellules de la matrice extracellulaire puisque le récepteur 5-HT_{2B} est connu pour être impliqué dans la réponse fibrogénique des fibroblastes cardiaques ventriculaires. Le rôle de la matrice extracellulaire cardiaque et notamment des fibroblastes dans les réponses hypertrophiques a été récemment suspecté puisque ces cellules sont connues pour être capables de libérer des cytokines hypertrophiques suite à une stimulation adrénergique (Bürger et al., 2001); ces cytokines sont des petits peptides pouvant induire une hypertrophie cardiaque et dont les taux plasmatiques ont été montrés élevés chez des malades insuffisants cardiaques. D'ailleurs, en dépit d'une dilatation ventriculaire gauche chez les souris 5-HT_{2B}^{-/-}, aucune modification des concentrations plasmatiques d'IL-1 β , de TNF α et d'IL-6 n'a été détectée. La stimulation chronique des récepteurs β -adrénergiques par l'isoprotérenol (Jaffré et al., 2004) y a été incapable de produire une hypertrophie cardiaque en dépit d'une réponse chronotrope majeure. De plus, le taux plasmatique de ces cytokines est resté inchangé chez les souris invalidées pour le récepteur 5-HT_{2B}, ce qui n'est pas le cas chez les souris contrôles où il est doublé.

Ces résultats sont également observés lors d'une perfusion d'angiotensine II (AngII) où la réponse cardiaque hypertrophique est prévenue chez les souris invalidées pour le récepteur 5-HT_{2B} ou avec un antagoniste sélectif sans affecter l'hypertension artérielle (Monassier et al., 2008). Tous ces effets antihypertrophiques sont associés à une réduction majeure de la concentration myocardique d'anion superoxyde et le blocage des récepteurs 5-HT_{2B} des fibroblastes, les empêche de libérer de l'anion superoxyde au cours de leur incubation avec de l'AngII ou de isoprotérenol (Monassier et al., 2008). Au total, avec un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, il est donc possible de dissocier complètement l'effet antihypertrophique des réponses hémodynamiques puisque ni la réponse chronotrope positive sous isoprotérenol ni la réponse pressive sous AngII n'ont été affectées.

Dans des cultures primaires de fibroblastes cardiaques adultes, le récepteur 5-HT_{2B} est exprimé avec les récepteurs 5-HT_{2A}, AT1 de l'angiotensine et les récepteurs β -adrénergiques. En

présence d'isoprotérenol, des fibroblastes cardiaques adultes provenant de souris KO pour le récepteur 5-HT_{2B} ne libèrent pas ces trois cytokines au contraire des fibroblastes de souris contrôles. Cette inhibition par le récepteur 5-HT_{2B} de la sécrétion de cytokines induite par stimulation adrénergique de ces cellules est également observée pour des fibroblastes cardiaques de souris 'sauvages' stimulés par l'isoprotérenol en présence d'un antagoniste 5-HT_{2B} (SB206553). Toujours dans les fibroblastes cardiaques adultes, un antagoniste β-adrénergique ou un antagoniste AT1 de l'AngII permettent de prévenir la libération de cytokines induite par la sérotonine via le récepteur 5-HT_{2B} (Jaffré et al., 2009b). Ce type d'interaction est appelé transinhibition.

Pour déterminer in vivo si le récepteur 5-HT_{2B} régule la trophicité myocardique par une action dans les fibroblastes cardiaques, dans les cardiomyocytes ou les deux, deux lignées de souris transgéniques ont été générées. La première lignée surexprime le récepteur 5-HT_{2B} dans les cardiomyocytes et la deuxième lignée est complètement invalidée pour le récepteur 5-HT_{2B}. Ainsi le croisement de ces deux lignées permet d'obtenir des animaux présentant une expression des récepteurs 5-HT_{2B} restreinte aux cardiomyocytes. Ces souris perfusées avec un activateur de l'hypertrophie cardiaque (ISO ou AngII) montrent in vivo que le récepteur 5-HT_{2B} exprimé par le fibroblaste cardiaque joue un rôle prépondérant dans la mise en place de l'hypertrophie pathologique du cardiomyocyte (Jaffre et coll., 2009).

Ces travaux ont aussi mis en évidence une production autocrine locale par les fibroblastes cardiaques d'angiotensine en réponse à la stimulation β-adrénergique. Les récepteurs 5-HT_{2B} et AT1 stimulés respectivement par la sérotonine et l'angiotensine utilisent la PI3Kinase, Src et la voie EGF, via la coupure par des métalloprotéases du pro HB-EGF pour stimuler la production de cytokines hypertrophiques par l'intermédiaire de la p38 MAPKinase. Dans ce système physiologique de culture primaire de fibroblastes cardiaques, le blocage d'un de ces deux récepteurs bloque la stimulation de l'autre ; phénomène de transinhibition. Des anticorps spécifiques ont permis de montrer une colocalisation précise de l'expression des récepteurs 5-HT_{2B} et de l'AT1. Ces données ont été confirmées par des expériences de coimmunoprécipitation qui montrent qu'une association entre les récepteurs 5-HT_{2B} et AT1 est probablement responsable de ces effets (Jaffré et al., 2009b).

Ainsi, ces travaux démontrent la convergence des voies adrénergique, angiotensinergique et sérotoninergique vers la production de facteurs hypertrophiques par le fibroblaste cardiaque. Ces travaux révèlent aussi la capacité anti-hypertrophique d'antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2B}. Chez l'Homme, une augmentation du niveau d'expression dans le myocarde est observée dans les insuffisances cardiaques graves et est corrélée aux niveaux plasmatiques de

noradrénaline (Jaffré et al., 2009b). Ainsi, l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2B} en pathologie humaine pourrait prévenir ou faire régresser l'hypertrophie pathologique. Cette hypothèse ne pourra être validée que quand un antagoniste assez sélectif pour ces récepteurs sera administrable à l'Homme.

Système sérotoninergique et régulation de l'hémodynamique cardiaque au cours de l'insuffisance cardiaque : Le système nerveux sympathique régule la contractilité du myocarde en activant des récepteurs couplés à une protéine Gs, les récepteurs β -adrénergiques, et des récepteurs couplés à des protéines Gq, les récepteurs α_1 -adrénergiques. Les premiers assurent un contrôle rapide de la contractilité en provoquant une augmentation de la concentration calcique dans le cytoplasme alors que les deuxièmes vont plutôt sensibiliser l'appareil contractile au calcium. Cette dernière voie est certainement plus économique sur le plan de l'énergétique cellulaire. On peut faire un parallèle entre ces effets et ceux qui impliquent des récepteurs sérotoninergiques. En effet, les deux populations de récepteurs de la sérotonine les plus exprimées dans le myocarde sont les 5-HT₂ (5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}) et les 5-HT₄, respectivement couplés à des protéines Gq et Gs (Levy et al., 2008).

Les récepteurs 5-HT₄ sont exprimés dans le myocarde auriculaire et ventriculaire avec de fortes variations entre les espèces. En effet, les récepteurs 5-HT₄ n'ont été détectés que dans le coeur normal adulte chez l'Homme (Bach et al., 2001) et le cochon (Brattelid et al., 2004) mais pas chez le rat, le lapin ou la souris. Cependant, son niveau d'expression peut largement varier en situation pathologique. C'est ainsi que son expression va augmenter dans le myocarde ventriculaire humain insuffisant et que, dans la même situation, il va apparaître chez le rat (Qvigstad et al., 2005). En condition normale, sa stimulation conduit à peu d'effets car ceux-ci sont probablement largement prévenus par la dégradation de l'AMPc par les phosphodiésterases (Kaumann et Levy, 2006). Par contre, en présence d'un inhibiteur des phosphodiésterases, on va démasquer un effet de la sérotonine passant par les récepteurs 5-HT₄ qui se traduit classiquement par une augmentation de la contractilité, de la relaxation et parfois la survenue d'arythmies (Levy et al., 2008). Ces actions ressemblent curieusement aux effets des catécholamines suite à l'activation des récepteurs β -adrénergiques. L'insuffisance cardiaque semble constituer une situation de réduction chronique de l'activité phosphodiésterasique dans les compartiments cellulaires où se trouvent les récepteurs 5-HT₄, ce qui pourrait spontanément révéler leur fonction. Dans ce cas, chez le rat, des concentrations identiques d'isoprotérenol et de sérotonine

produisent des augmentations similaires de la contractilité. Les effets de la sérotonine sont ici prévenus par le GR113808, un antagoniste 5-HT₄ à forte affinité (Qvigstad et al., 2005).

Dans le myocarde insuffisant, on observe aussi une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT_{2A}. L'augmentation de la contractilité provoquée par la sérotonine est en partie prévenue par la kétansérine, un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (Qvigstad et al., 2005). Ces effets sont observés chez le rat, mais, une autre étude a également montré la même surexpression dans le myocarde humain insuffisant, ouvrant la porte à un rôle de cette protéine dans le support contractile du myocarde défaillant (Brattelid et al., 2004). Les mécanismes moléculaires qui conduisent aux effets inotropes positifs dus à la stimulation des récepteurs 5-HT_{2A} sont encore imparfaitement connus mais il semblerait que leur activation conduise à un effet triphasique sur la contractilité ventriculaire : une augmentation transitoire suivie d'une baisse fugace puis d'une réaugmentation soutenue. Cette dernière apparaît plusieurs minutes après l'application de l'agoniste et proviendrait de l'induction d'une phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC-2) comme cela est provoqué par l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques (Brattelid et al., 2007).

La surexpression (ou réexpression) des récepteurs sérotoninergiques en situation pathologique est particulière car va à l'inverse de ce qui est connu pour les récepteurs adrénergiques. En particulier, les réponses inotropes positives qui lui sont attribuées ne semblent pas se désensibiliser. Elle pourrait entrer dans le cadre de la remise en route d'un programme d'expression embryonnaire impliqué dans le développement. La question est de savoir si cette compensation inotrope survient au moment où les réponses adrénergiques contractiles sont fortement désensibilisées ou si elles surviennent dès les phases précoces du remodelage ventriculaire. Cette question a été abordée dans un travail de Birkeland et collaborateurs, qui ont étudié les réponses inotropes dues à la sérotonine chez des rats dont le cœur a été soumis à une surcharge en pression par une coarctation aortique (Birkeland et al., 2007). Ces animaux ont d'abord une cardiopathie hypertrophique qui va évoluer vers une dilatation et une décompensation. De manière claire, l'expression des récepteurs 5-HT₄ augmente dès le stade de l'hypertrophie et se majore encore quand le cœur défaille. Cette expression est corrélée à la mesure de fortes réponses inotropes suite à l'application de sérotonine. L'expression des récepteurs 5-HT_{2A} augmente, elle aussi, lors de l'hypertrophie, mais, ne semble pas majorée par l'insuffisance. Les réponses contractiles associées à ce récepteur ne semblent pas corrélées à son niveau d'expression, ce qui pourrait impliquer des mécanismes intracellulaires de régulation.

Si on fait un parallèle entre les récepteurs β_1 -adrénergiques et 5-HT₄, on constate qu'ils empruntent les mêmes voies de couplage et régulent les mêmes fonctions. Quand on connaît

l'efficacité spectaculaire des β -bloquants dans l'insuffisance cardiaque, on ne peut qu'être tenté d'explorer les effets d'un antagoniste des récepteurs 5-HT₄ dans cette condition pathologique. Ce travail a été réalisé chez l'animal et très récemment chez l'Homme. Des rats ont été répartis dans deux groupes de traitement, trois jours après un infarctus du myocarde induit par une ligature coronaire (Birkeland et al., 2007). Le premier groupe a été traité par un placebo pendant six semaines alors que l'autre recevait du piboserod, un antagoniste des récepteurs 5-HT₄ à la dose de 0,5 mg/kg/jour. Le piboserod a significativement mais faiblement amélioré la fonction cardiaque et son remodelage sans que les auteurs aient réalisé une étude de survie chez ces animaux. Dans le même temps, cette même molécule a été évaluée dans un essai randomisé incluant 137 patients insuffisants cardiaques symptomatiques recevant un traitement médical optimisé (Kjekshus et al., 2009). A l'inclusion, les patients présentaient une fraction d'éjection ventriculaire gauche inférieure à 35%. 70 malades ont reçu le placebo alors que 67 ont été traités par le piboserod en titration progressive : 20 mg/jour les deux premières semaines puis 40 mg/jour les deux suivantes, avant de passer à 80 mg/jour pour le restant de la durée totale de l'essai, c'est à dire 24 semaines. Le critère principal de jugement était la fraction d'éjection ventriculaire gauche mesurée en imagerie par résonance magnétique nucléaire et la mesure des effets indésirables. Cette étude a montré une amélioration modeste de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et une petite réduction de la dilatation. Une augmentation de la pression artérielle de 4,4 mmHg par rapport aux malades ayant reçu le placebo allait aussi en faveur d'une amélioration hémodynamique. Tous ces résultats montrent un effet positif du piboserod, mais, on peut se demander si les effets bénéfiques associés au blocage des récepteurs 5-HT₄ ne pourraient pas être en partie masqués par le traitement β -bloquant. Dans une analyse de sous-groupes, les malades n'ayant pas ces médicaments ont effectivement montré une réponse supérieure au piboserod. Néanmoins, que se soit chez le rat ou l'Homme, le blocage des récepteurs 5-HT₄ semble peu actif sur le remodelage ventriculaire. Tout se passe comme si ce récepteur n'avait qu'un rôle de régulation hémodynamique et peu d'implication dans les phénomènes de remodelage.

Fibrillation auriculaire et récepteurs 5-HT₄

La fibrillation auriculaire est une pathologie dont la prévalence augmente avec l'âge. Elle expose les malades à un risque thrombotique et emboligène mais contribue aussi à la limitation du remplissage ventriculaire gauche diastolique chez les malades insuffisants cardiaques. Il n'est probablement pas utile de la réduire chez tous les malades, en particulier quand la fonction

ventriculaire est bonne, mais parfois, en raison d'une mauvaise tolérance hémodynamique, cette réduction est nécessaire et il existe une place pour des médicaments prévenant sa récurrence dans l'arsenal thérapeutique cardiologique. Les deux sous-types de récepteurs 5-HT₄ (5-HT_{4a} et 5-HT_{4b}) sont exprimés par les myocytes auriculaires, y compris chez l'Homme, et ont été suspectés de contribuer à la genèse et au maintien de la fibrillation auriculaire. Dans cette structure, le récepteur 5-HT₄ active l'adénylyl cyclase via la stimulation de Gs conduisant à la stimulation des canaux calciques de type L (Castro et al., 2005). Aucune étude n'a, à ce jour, démontré l'efficacité d'un antagoniste 5-HT₄ dans la fibrillation auriculaire.

2.3.3.3. Interaction sérotonine-cœur : de nombreux mécanismes restent à décrypter

La physiopathologie des nombreuses dysfonctions impliquant le système sérotoninergique cardiovasculaire reste à élucider (hypertension artérielle pulmonaire, hypertension artérielle systémique, remodelage cardiaque) et font encore l'objet d'importants projets de recherche. Les pathologies en cause sont graves et engagent très souvent le pronostic vital.

Mon sujet de thèse s'intéresse au cas particulier des valvulopathies. Même si des arguments pharmacologiques établissent une corrélation entre les observations cliniques (survenue de valvulopathies) et une dysfonction du système sérotoninergique, il convient d'approfondir ces connaissances selon des bases mécanistiques afin d'élaborer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Après avoir présenté les mécanismes régissant la morphogenèse valvulaire normale, nous ferons le point sur les principales étiologies des dégénérescences valvulaires et les divers arguments qui mettent en cause le système sérotoninergique.

3. Morphogenèse valvulaire : de l'embryogenèse à la valve adulte

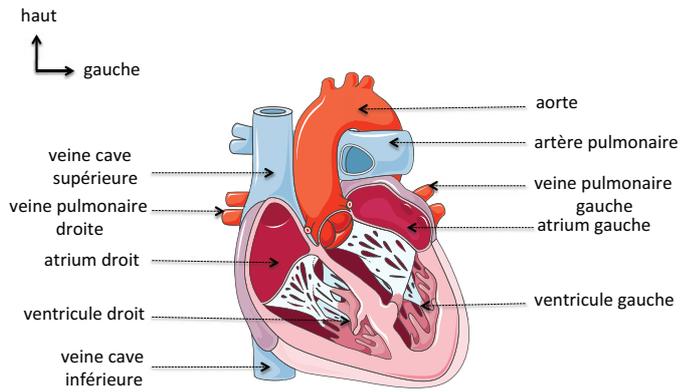
3.1. Description anatomique du cœur adulte

Le cœur humain est composé de 4 cavités (2 oreillettes et 2 ventricules) qui fonctionnent de façon coordonnée pour maintenir une bonne perfusion de tous les organes. Il s'agit d'un muscle creux situé entre le sternum en avant et la colonne vertébrale en arrière.

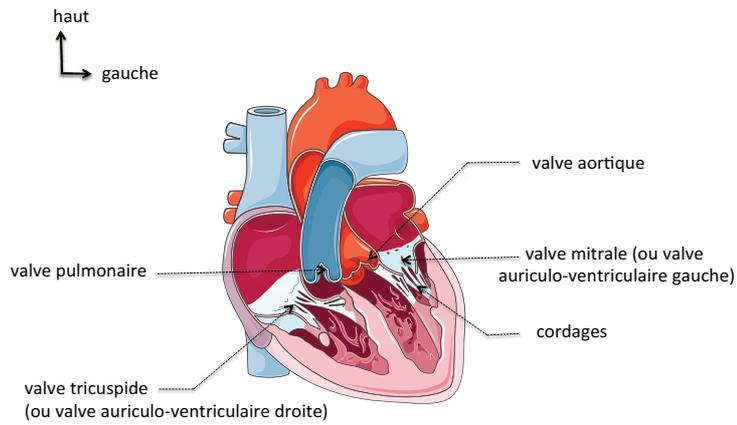
L'écoulement unidirectionnel du sang dans le cœur est dû à la présence de 4 valves dont l'action coordonnée permet le maintien d'une pression optimale de perfusion. Deux valves auriculo-ventriculaires droite (valve tricuspide, formée de 3 cuspidés ou feuillets) et gauche (valve mitrale, formée de deux feuillets) sont situées entre l'oreillette et le ventricule correspondant. Des cordages sont fixés aux bords des valves auriculo-ventriculaires et s'opposent à leur basculement vers l'oreillette au moment de leur fermeture. Les cordages sont fixés entre les feuillets valvulaires et les muscles papillaires (faisant saillie dans le ventricule). Deux autres valves cardiaques assurent la jonction des grosses artères et des ventricules correspondants. La valve aortique est située entre la jonction de l'aorte et du ventricule gauche et la valve pulmonaire entre le ventricule droit avec l'artère pulmonaire. Ces deux valves sont formées de 3 feuillets en forme de demi-cupule et sont aussi appelées valves semi-lunaires.

Il n'existe pas de valve entre les veines et les oreillettes car la pression des oreillettes pendant la systole auriculaire ne monte pas au dessus de la pression des veines qui de plus sont occluses pendant la contraction des oreillettes.

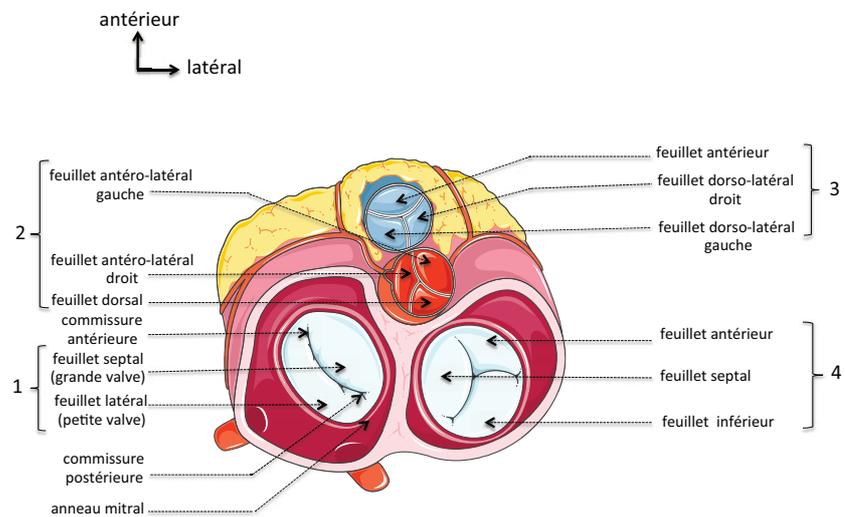
La figure 7 présente deux représentations du cœur : vue horizontale (7.1 et 7.2) et vue de la base (7.3) ; permettant de distinguer l'organisation des différentes cavités et les valves.



7.1



7.2



1- valve mitrale, 2- valve aortique, 3- valve pulmonaire, 4- valve tricuspide

7.3

Figure 7. Coupes anatomiques du cœur mettant en évidence les valves cardiaques

(7.1 et 7.2 = vues horizontales, 7.3 = vue de la base du cœur)

3.2. Valvulogenèse

La rédaction de cette partie est surtout inspirée de la revue bibliographique publiée par Jonathan Butcher et Roger Markwald en 2007 faisant le point sur les aspects mécanistiques de la morphogenèse valvulaire (Butcher and Markwald, 2007).

3.2.1. Morphogenèse

Le développement des valves cardiaques (auriculo-ventriculaires et semi-lunaires) pendant l'embryogenèse est un processus complexe qui s'opère en même temps que les changements morphologiques et hémodynamiques du cœur.

La compréhension des voies de signalisation moléculaires et cellulaires de la morphogenèse valvulaire a été rendue possible grâce à d'importants travaux effectués sur les embryons de poulet, de poisson zèbre et de souris.

Au départ de la formation des valves, le cœur embryonnaire n'est constitué que d'un tube de cellules endocardiques entouré d'un tube de cellules myocardiques séparés par une matrice gélatineuse riche en acide hyaluronique: la "gelée" cardiaque. La gelée cardiaque, produite par les cellules myocardiques, forme un bourrelet qui fait saillie à la surface du myocarde en formation à l'endroit de la jonction auriculo-ventriculaire. Les cellules myocardiques de cette région secrètent des facteurs activateurs des cellules endocardiques en regard. Parmi ces facteurs, nous avons des molécules de la famille du TGF- β (TGF- β 1 à β 3, le BMP-2 et le BMP-4).

Dans les cellules endocardiques activées, il s'opère une répression de certaines glycoprotéines d'adhésion intercellulaire (PECAM1, NCAM1 et DS-CAM) aux dépens d'une surexpression de protéines d'adhésion à la matrice (intégrines). Les cellules activées se distinguent par l'expression d'antigènes spécifiques : ES130 (codant pour un récepteur protéique du ribosome), JB3/fibrilline et TGF- β 3 (Wunsch et al., 1994; Sinning et Hewitt, 1996; Ramsdell et Markwald, 1997). Ces cellules subissent une réorganisation de leur cytosquelette et envahissent la gelée cardiaque. Les cellules passent alors d'un phénotype épithélial (quiescent) à un phénotype mésenchymateux caractérisé par la synthèse d' α -actine de muscle lisse (Nakajima et al., 1997). Elles digèrent la matrice riche en acide hyaluronique et synthétisent une nouvelle matrice plus dense, riche en collagène des types I, II et III et des protéoglycanes notamment le versican (Person et al., 2005). L'évolution de ce processus conduit à l'élongation de l'ébauche valvulaire grâce à la prolifération et la sécrétion des cellules mésenchymateuses présentes dans la matrice (Moorman et Christoffels, 2003). Les processus de maturation diffèrent en fonction de

la nature des valves (auriculo-ventriculaires ou semi-lunaires). A la différence des valves semi-lunaires qui possèdent un bord libre, les valves auriculo-ventriculaires sont arrimées à des cordages soutenus par les muscles papillaires.

Après l'étape commune de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les ébauches des valves auriculo-ventriculaires subissent une délamination provoquant leur décollement du tissu myocardique sous-jacent et le maintien de leur bord distal par les cordages. En effet, les cellules de la portion myocardique sur laquelle le tissu valvulaire se repose se transforment progressivement en fibroblastes et favorisent la condensation de la matrice valvulaire. Sur la base d'un mécanisme imparfaitement connu mais contrôlé par les modifications hémodynamiques (Vermot et al., 2009) et/ou par le développement des ventricules, des fenestrations apparaissent dans le tissu myocardique supportant la valve en pleine élongation. Ces ouvertures convergent et provoquent un décollement total de la valve qui n'est plus maintenue qu'à ses deux extrémités (distale et proximale). Des fenestrations additionnelles se développent au niveau de l'extrémité distale résiduelle et les muscles papillaires en formation. Dans la valve, le tissu myocardique disparaît et laisse place à un fin feuillet riche en fibroblastes. Un immunomarquage de la matrice valvulaire pendant son développement a révélé que la portion endocardique est riche en laminine alors que la portion ventriculaire est riche en collagène III (Hurle et al., 1994). Ultérieurement, la portion endocardique s'épaissit et synthétise de l'élastine et du collagène. Le reste du feuillet maintient un phénotype mésenchymateux avec des faisceaux de collagène et la présence de fibroblastes bordant la portion ventriculaire (Butcher et Markwald, 2007). Ces différentes portions s'organiseront en différentes couches bien distinctes dans la valve mature. Les valves atrio-ventriculaires présentent de la face atriale à la face ventriculaire, 3 couches: l'atrialis, la spongiosa et la fibrosa. L'atrialis comporte une couche de cellules endothéliales bordant la face atriale de la valve, qui repose sur une mince couche de cellules musculaires lisses et une couche de cellules interstitielles entourée d'une matrice extracellulaire riche en élastine. La spongiosa qui est la couche intermédiaire du feuillet valvulaire et la plus épaisse, est constituée de cellules musculaires lisses entourées d'une matrice riche en protéoglycanes et en glycoaminoglycanes. La fibrosa recouvrant la portion ventriculaire, présente de l'extérieur vers l'intérieur, une couche de cellules endothéliales reposant sur une couche de cellules interstitielles entourées d'une matrice riche en collagène de type I (Figure 8).

La formation des valves semi-lunaires est semblable à celle des valves auriculo-ventriculaires. Cependant, elles subissent après la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), à la place de la délamination, un processus d'excavation. Certaines cellules endothéliales et sous-endothéliales de la face vasculaire du feuillet en formation deviennent arrondies, entrent en

apoptose et desquament. Il se forme ainsi une petite dépression. Par contre, les cellules de la face ventriculaire, conservent leur architecture (structure plate et allongée). La matrice du tissu artériel sur laquelle la valve se forme devient de plus en plus fibreuse au fur et à mesure que se creuse la dépression. Le feuillet valvulaire apparaît formé de 3 couches de la face vasculaire à la face ventriculaire: la fibrosa, la spongiosa et la ventricularis (qui est l'équivalent de l'atrialis). Ces différentes couches conservent une organisation histologique identique à celle des valves auriculo-ventriculaires (Figures 9).

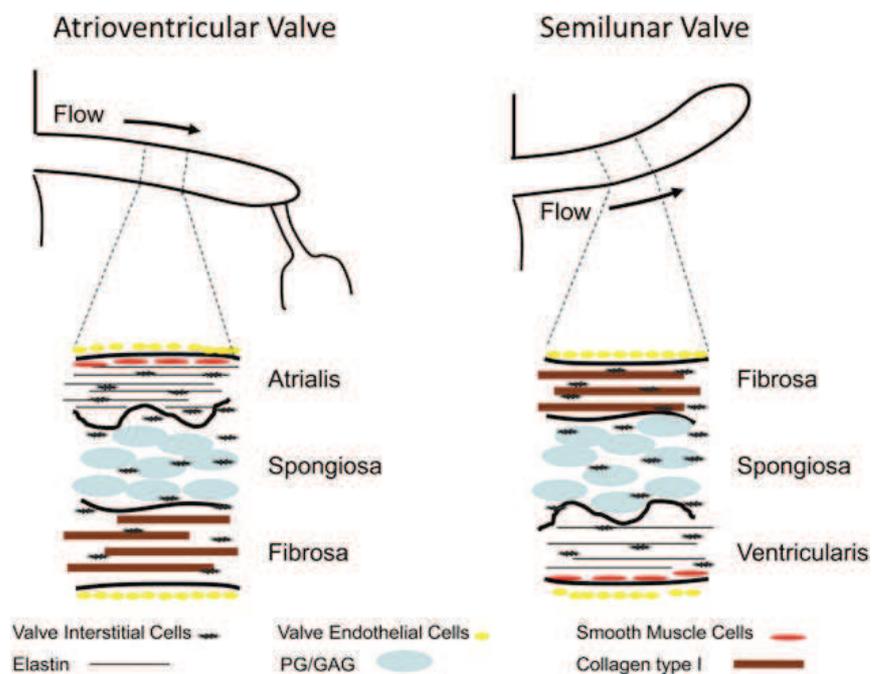


Figure 8. Organisation des valves auriculo-ventriculaires et semi-lunaires
(d'après Orton et al., 2012)

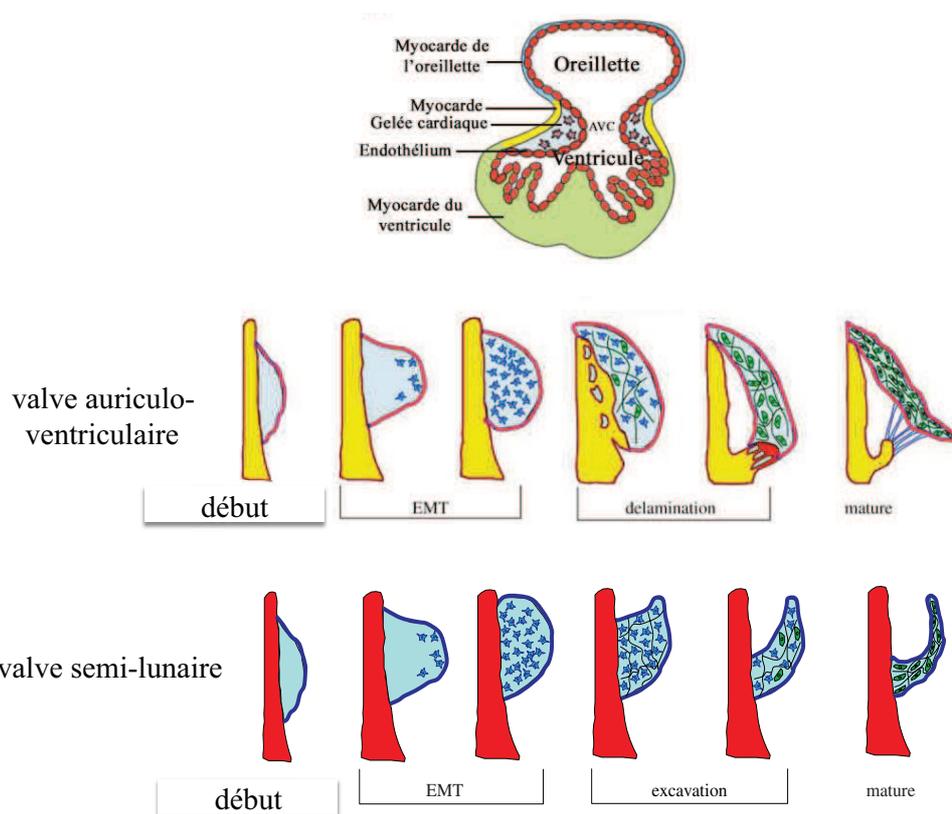


Figure 9. Principales étapes de la valvulogénèse (d'après Butcher et Markwald, 2007).
Cellules mésenchymateuses (bleue) ; cellules interstitielles valvulaires (vert)

3.2.2. Maturation valvulaire : régulations moléculaires et biophysiques

3.2.2.1. Régulations moléculaires de la TEM

De nombreuses études consacrées à la compréhension des mécanismes moléculaires de la valvulogénèse se sont focalisées sur la détermination des voies de signalisation impliquées dans le phénomène de la TEM. Pendant la TEM, les cellules endocardiques présentes autour de la jonction auriculo-ventriculaire deviennent activées, migrent et envahissent la gelée cardiaque produite par les cellules myocardiques en regard. L'interaction entre les cellules myocardiques et endothéliales est indispensable à l'initiation de la TEM. *In vitro*, sur un gel de collagène, la TEM ne se réalise que si les couches cellulaires myocardiques et endocardiques sont en présence (Bernanke et Markwald, 1982). Ces expériences réalisées à partir d'embryons de poulet et de souris transgéniques, ont permis de détecter de nombreux marqueurs biologiques de divers

stades de la TEM. Ainsi, au stade précoce, l'activation des cellules endocardiques correspond à l'expression du ES130 codant pour un récepteur protéique du ribosome, du JB3/fibrilline et du TGF- β 3. Ultérieurement, ces cellules s'hypertrophient et se séparent suite à une diminution de l'expression des protéines d'adhésion (PECAM1, V-CAM1 et VE-cadhérine) et une surexpression d' α -actine de muscle lisse (AML). Au stade de migration, les cellules endocardiques activées, sécrètent des métalloprotéinases qui dégradent la membrane basale permettant l'envahissement de la gelée cardiaque.

La TEM implique de nombreux facteurs de croissance d'origines endothéliale et myocardique. Parmi ces facteurs connus nous avons la signalisation du VEGF, du BMP, du TGF- β , de l'EGF et de NOTCH (Figure 10).

Rôle du VEGF

Le VEGF est un facteur de croissance endothélial d'origine vasculaire connu principalement pour son rôle dans l'angiogenèse. Chez la souris, le VEGF d'origine endocardique ou myocardique est produit pendant le développement des valves. Il existe un seuil optimal de production du VEGF pour favoriser son action pendant la TEM. Ainsi, sa surexpression pendant l'embryogenèse entraîne de nombreuses anomalies du développement cardiaque et des décès chez la souris. À l'inverse, une réduction importante de sa production (-50%) est elle aussi létale (Miquerol et al., 1999, 2000). Le VEGF d'origine myocardique régulerait les étapes précoces du développement valvulaire en s'opposant à la TEM et en favorisant le maintien du phénotype épithélial par l'expression de PECAM-1 et la prolifération des cellules endothéliales (Chang et al., 2004). Le VEGF stimule son récepteur Flk-1 endothélial (VEGFR-2) et favorise l'expression du NFATc1 (facteur nucléaire d'activation des lymphocytes T dépendant de la calcineurine cytoplasmique) impliqué dans la prolifération cellulaire et qui favorise l'expression de PECAM-1. L'activation de Flk-1 entraîne la production d'IP3, une libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique suivie de l'activation de la calcineurine qui à son tour déphosphoryle NFATc1 (Johnson et al., 2003). Ainsi, un déficit en NFATc1 dans les cellules myocardiques ou endothéliales entraîne une hypoplasie des coussins valvulaires. Des expériences réalisées chez le poisson zèbre rapportent que le VEGF endothélial est indispensable au déroulement normal de la TEM par l'induction de l'expression de NOTCH1 et de BMP-4 et au maintien de l'intégrité de l'endothélium (Lee et al., 2006). L'activation de NFATc1 induit l'expression de DSCR1 (Down syndrome critical region gene 1) qui, en retour, régule négativement l'expression de NFATc1 (Lange et al., 2004). L'inactivation génétique de la

connexine 45 (Cx45) endothéliale, qui permet l'activation de la calcineurine par l'apport calcique, inhibe également la TEM (Kumai et al., 2000).

Rôle de la voie Wnt/béta-caténine

De nombreux travaux effectués chez le poisson zèbre ont démontré l'importance de la voie Wnt/ β -caténine dans la valvulogénèse. L'inhibition de la voie Wnt par une surexpression de la protéine Dickkopf 1 (DKK1) abolit complètement la TEM. A l'opposé, une hyperactivation de la voie Wnt induit des anomalies du développement valvulaire par une formation excessive des coussins valvulaires à la surface de l'endocarde (Hurlstone et al., 2003). Il a été montré chez la souris et le poisson zèbre, que la signalisation Wnt/ β -caténine était restreinte à la région des cellules endocardiques au dessus de la zone de formation de la valve suggérant de ce fait son rôle dans le déroulement normal de la valvulogénèse (Gitler et al., 2003a). Cette signalisation peut aussi être inhibée par l'action de PECAM1 exprimé dans l'endothélium qui piège et inactive la β -caténine phosphorylée (Ilan et al., 1999).

Rôle de NOTCH1

Les protéines de la voie NOTCH ont été détectées dans la zone de développement des valves chez la souris et le poisson zèbre. La voie NOTCH participe à la TEM en stimulant la voie de signalisation du TGF- β au moyen de l'activation du facteur de transcription snail qui agit en réprimant les protéines d'identité endothéliale (VE-cadhérine, Tie 1 et 2, TEK et PECAM1) et en exprimant des marqueurs d'identité mésenchymateuse (α -SMA, PDGFR et fibronectine). L'activation constitutionnelle de la NOTCH-1 et de son récepteur Jag1 induit une hypercellularisation de la matrice valvulaire et à l'opposé leur inactivation bloque la TEM (Nosedá et al., 2004).

Rôle du BMP (BMP-2 et BMP-4)

Les molécules de la famille du BMP appartiennent à la superfamille des ligands du TGF- β à l'exception du BMP1 qui est une métalloprotéinase. A ce jour, une vingtaine de BMP ont été décrites (Even et al., 2012). Plusieurs types de BMP sont exprimés dans le cœur au cours du développement embryonnaire et jouent un rôle important dans les stades précoces de la formation des valves. Parmi ces protéines, nous trouvons notamment le BMP-2 dans les valves auriculo-ventriculaires et le BMP-4 dans les valves semi-lunaires (Abdelwahid et al., 2001). Des expériences *in vitro* réalisées sur des explants de valve auriculo-ventriculaire en formation chez les poussins ou les souris ont rapporté que l'expression du BMP-2 était indispensable pour

induire la TEM (Sugi et al., 2004). L'activation des récepteurs BMP-RI et BMP-II (hétérodimères) par le BMP-2 entraîne la phosphorylation de SMAD 1/5 dont l'assemblage avec SMAD 4 induit la transcription des marqueurs de la TEM. Cependant, les souris BMP4^{-/-} décèdent avant le début de la valvulogenèse rendant difficile l'évaluation de la seule contribution du BMP4 (Winnier et al., 1995). Dans tous les cas, le blocage des récepteurs du BMP induit les mêmes anomalies du développement valvulaire. Les souris invalidées pour les autres protéines de la famille du BMP ne possèdent aucun phénotype particulier à l'exception des souris doublement invalidés en BMP6 et BMP7 qui présentent des anomalies de formation des valves semi-lunaires (Kim et al., 2001).

Rôle du TGF- β

Les protéines de la famille du TGF- β jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire. Ces molécules sont exprimées dans le cœur pendant son développement. Dans le cœur embryonnaire de poulet, on trouve du TGF- β 2 et TGF- β 3 mais par contre chez la souris, on trouve du TGF- β 1 et TGF- β 3. Le blocage sélectif du TGF- β 2 et du TGF- β 3 chez le poussin a permis de comprendre leur rôle dans l'initiation de la TEM. L'expression du TGF- β 2 par les cellules de l'endocarde est indispensable pour l'induction de la séparation des cellules alors que le TGF- β 3 jouerait un rôle dans le changement de phénotype des cellules et leur migration (Millan et al., 1991; Boyer et al., 1999). TGF- β 3 induit l'expression de MMP-2 et MT-MMP (membrane bounds MMP), qui digèrent le collagène IV de la matrice endocardique permettant de ce fait l'invasion de la gelée cardiaque (Song et al., 2000). Le TGF- β 2 est produit par les cellules endocardiques et myocardiques alors que la synthèse du TGF- β 3 se fait de manière autocrine dans l'endocarde sous la stimulation du MMP-2 et du TGF- β 2 (Boyer et al., 1999; Nakajima et al., 2000). En présence de TGF- β , ses récepteurs se dimérisent et activent, par l'intermédiaire de SMAD2/3 et/ou de SMAD4, la transcription de facteurs impliqués dans la TEM (snail/slug) (Romano and Runyan, 2000; Greene et al., 2003).

Rôle de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique, encore appelée la gelée cardiaque est majoritairement produite par les cellules myocardiques sous le contrôle de deux enzymes clés : l'UDP-glucose deshydrogénase et la hyaluronate synthétase 2 (Walsh et Stainier, 2001). Dans une culture d'embryons, la digestion de l'acide hyaluronique (par l'action de la hyaluronidase) (Baldwin et al., 1994) ou le blocage de sa synthèse prévient la formation des

coussins valvulaires. Cependant, l'addition d'acide hyaluronique (exogène) rétablit le processus (Camenisch et al., 2000).

L'invalidation de la protéine Ras bloque également la formation des coussins valvulaires et son activation constitutionnelle restaure leur formation chez les embryons n'exprimant pas la hyaluronate synthétase 2. Ainsi, l'acide hyaluronique agit en activant la protéine Ras par la phosphorylation des récepteurs hétérodimériques ErbB2/3 de la famille des récepteurs de l'EGF. Cette voie de signalisation est également confirmée par l'action de la héréguiline qui en activant les récepteurs ErbB2/3 restaure la formation des valves chez les embryons n'exprimant pas la hyaluronate synthétase 2 (Camenisch et al., 2002).

Dans la matrice extracellulaire, le versican semble également contribuer à l'initiation de la TEM. En effet, le versican est une protéine servant de lien entre l'acide hyaluronique et le collagène dans la gelée cardiaque. Chez les souris invalidées en versican, la formation des coussins valvulaires ne s'opère pas (Mjaatvedt et al., 1998).

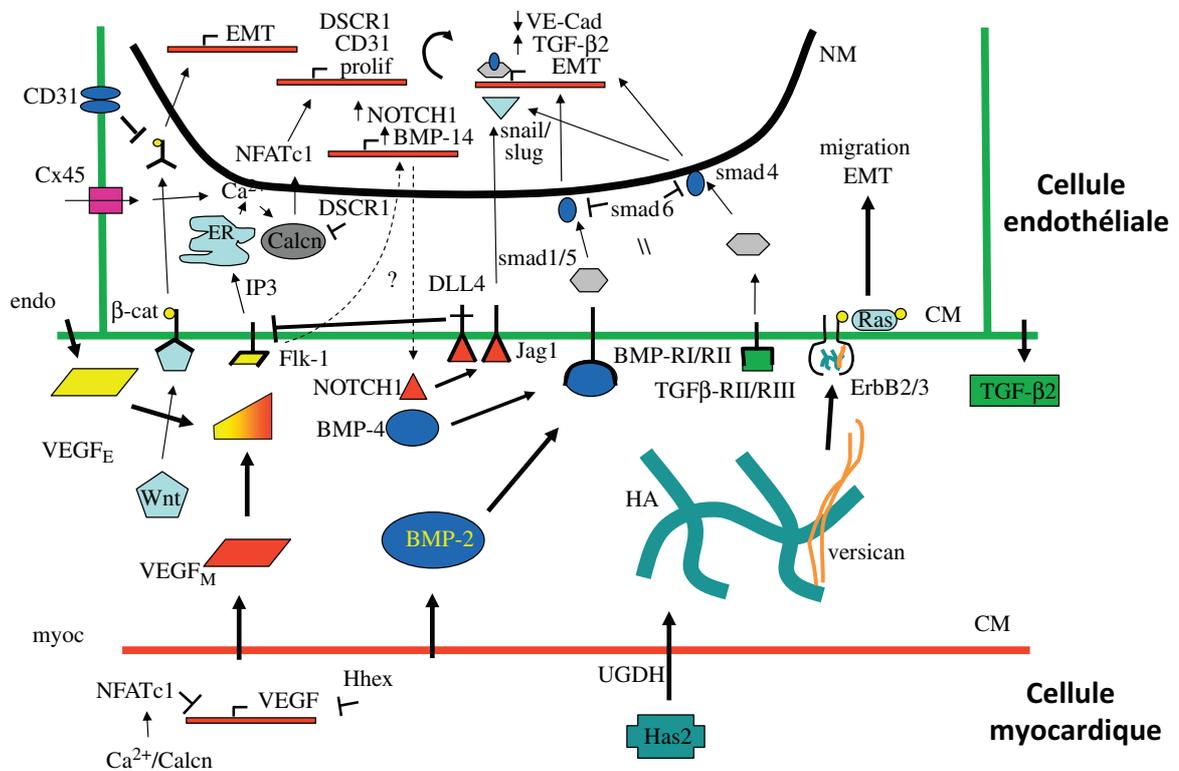


Figure 10. Voies de signalisation moléculaires impliquées dans la morphogénèse valvulaire pendant la TEM chez la souris (d'après Butcher et Markwald, 2007)

CM (membrane cellulaire), NM (membrane nucléaire)

La matrice extracellulaire (versican, acide hyaluronique (HA) et collagène) et la voie Wnt régulent la formation des coussins valvulaires indispensables au bon déroulement de la TEM. De nombreux facteurs d'origines myocardique ou endocardique participent à la régulation de la TEM. Le VEGF myocardique (VEGF_M) et endothélial (VEGF_E) optimisent par l'intermédiaire de NFATc1 la densité cellulaire du feuillet valvulaire et induisent l'expression de NOTCH1 qui favorise la perte de l'identité endothéliale au profit de l'expression des marqueurs d'identité mésenchymateuse. Les molécules de la famille du TGF-β et du BMP participent à la différenciation des cellules valvulaires.

3.2.2.2. Régulations moléculaires post-TEM

Après l'étape de la TEM, le feuillet valvulaire riche en cellules mésenchymateuses subit une réorganisation permettant d'obtenir une architecture fonctionnelle. La valve mature est faite d'un fin feuillet organisé contenant des cellules interstitielles de nature fibroblastique au sein d'une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes, glycoaminoglycanes, élastine et collagènes.

À partir des travaux de biologie moléculaire et des modèles de souris transgéniques, certaines voies de signalisations permettant la maturation valvulaire ont été élucidées. Ainsi, nous décrivons l'importance du FGF, du VEGF, du BMP, du TGF- β et de l'EGF (Figure 11).

Rôle du FGF

L'invasion et la prolifération des cellules mésenchymateuses dans la matrice valvulaire sont contrôlées par certains facteurs de croissance produits dans l'endocarde. Il a été montré que les cellules mésenchymateuses colonisant les valves d'embryons de poussins en formation expriment du FGF-4 de même que ses récepteurs de type 1, 2 et 3 (Sugi et al., 2003). La surexpression ou l'addition de FGF-4 dans la valve au cours des investigations in vitro ou in vivo entraîne une prolifération (test du BrdU) importante des cellules mésenchymateuses. De plus le FGF-2 exprimé dans la valve prévient l'apoptose des cellules mésenchymateuses (Zhao et Rivkees, 2000). En résumé, le FGF participerait à la prolifération des cellules mésenchymateuses tout au long du développement et de la maturation des valves.

Rôle du VEGF

Le VEGF est fortement exprimé au début de la TEM tant par l'endothélium que par les cellules mésenchymateuses du coussin valvulaire. Au cours du développement valvulaire, son expression devient restreinte à l'endocarde. Le VEGF agit en stimulant la prolifération des cellules endocardiques suite à l'activation du facteur NFATc1 (passant par la mobilisation du calcium et l'activation de la calcineurine). L'expression de NFATc1 favorise la prolifération des cellules de l'endocarde et adapte le feuillet valvulaire à l'élongation et la condensation des cellules du coussin valvulaire pour la mise en place d'un fin feuillet mature et structuré (Johnson et al., 2003; Chang et al., 2004). Le VEGF favorise ainsi la prolifération des cellules endocardiques et s'oppose à leur transformation en cellules mésenchymateuses.

Rôle du BMP (BMP-2 et BMP-4)

Les molécules de la famille du BMP sont exprimées par les cellules mésenchymateuses pendant le processus d'élongation de la valve (BMP-2 dans les valves auriculo-ventriculaires et BMP-4 dans les valves semi-lunaires). Le BMP-2 et BMP-4 stimulent l'accumulation des cellules mésenchymateuses en activant la voie SMAD1/5. Cependant, leur expression est corrélée avec l'apoptose des cellules au sein de la matrice valvulaire par un mécanisme non encore élucidé, suggérant leur rôle dans la maturation (Abdelwahid et al., 2001).

Rôle du TGF- β

Les divers mécanismes impliquant le TGF- β dans la maturation valvulaire sont encore difficiles à établir. Des effets opposés ont été décrits sur la prolifération cellulaire. Parmi les souris invalidées pour l'expression du TGF- β 1, TGF- β 2 ou TGF- β 3, seules les souris TGF- β 2^{-/-} présentent un phénotype cardiovasculaire avec surtout un épaississement des valves cardiaques et une matrice anormalement riche en cellules (Sanford et al., 1997). Les effets cellulaires du TGF- β 2 dépendent de sa liaison à l'hétérodimère formé par ses récepteurs de type II et III et leur complexation préférentielle avec ALK1,2 ou ALK5 (Desgrosellier et al., 2005). Ainsi, la liaison du TGF- β 2 à ses récepteurs stimulerait la prolifération et la migration cellulaire par complexation à ALK1 ou ALK2 en activant la voie SMAD1/5 potentialisée Id1 (Goumans et al., 2002). A l'opposé, une complexation à ALK5 favoriserait la prolifération et la migration en activant SMAD2/3 dont l'effet est potentialisé par PAI-1 (Lai et al., 2000). L'activation de l'une ou l'autre de ces voies est contrôlée par l'action de GIPC associé au récepteur du TGF- β de type III qui améliore la sensibilité du TGF- β 2 et active la voie inhibitrice de la prolifération passant par PAI-1 (Blobe et al., 2001). L'activation de l'une ou l'autre de ces voies de signalisation dépendrait également des concentrations du TGF- β dans le milieu. Ainsi, à forte concentration, il activerait la voie SMAD2/3, inhibitrice de la prolifération et à faible dose, stimulerait la prolifération en activant la voie SMAD1/5 (Goumans et al., 2002). L'expression du TGF- β 2 est indispensable dans les stades avancés du développement valvulaire pour réguler la prolifération des cellules mésenchymateuses.

Rôle de l'EGF

L'EGF est l'un des facteurs les plus importants dans le processus de maturation valvulaire. Il est produit sous forme d'un précurseur lié à l'héparine (HB-EGF) qui est clivé par la protéine TACE ou Adam17 pour donner l'EGF (Iwamoto et al., 2003). La liaison de l'EGF à

l'hétérodimère EGFR et ErbB2, 3 ou 4 à son récepteur active la protéine Shp2 (une tyrosine phosphatase) qui active la voie ERK1/2 au moyen de Ras/Raf/PLC- ϵ en inhibant la prolifération (Araki et al., 2004). Le blocage de chacun des acteurs de cette voie de signalisation inhibe l'apoptose initiée par l'EGF (HB-EGF, TACE, EGFR, ErbB2 ou ErbB3) et provoque la formation d'un feuillet prolifératif valvulaire épaissi riche en cellules mésenchymateuses (Erickson et al., 1997; Chen et al., 2000; Jackson et al., 2003). Cependant, une activation constitutionnelle de Ras, Shp2 ou PLC- ϵ provoque également une élévation du nombre de cellules dans la valve. L'activation de Ras est compensée dans ces cas par une stimulation de la signalisation du BMP au moyen de SMAD1/5 pour favoriser l'accumulation des cellules mésenchymateuses. Ainsi, il existe une balance entre ces deux signalisations de sorte à maintenir un bon équilibre entre la prolifération et l'apoptose des cellules mésenchymateuses (Kretzschmar et al., 1997; Tadano et al., 2005). Une autre régulation est aussi exercée pour contrôler l'action de l'EGF en passant par la NF1. La NF1 régule la déphosphorylation de Ras et l'inactive. Une inactivation de NF1 entraîne une augmentation de la forme active de Ras. Cette situation favorise la présence de nombreuses cellules dans le feuillet valvulaire par un mécanisme de compensation impliquant la signalisation du VEGF et de NFATc1 (Lakkis et Epstein, 1998; Gitler et al., 2003b). D'autres voies de signalisation impliquant l'EGF par l'intermédiaire des facteurs de croissance (Neuréguline et IGF-1) participent à la prolifération des cellules mésenchymateuses par PI3-K et Rac1 (Hertig et al., 1999).

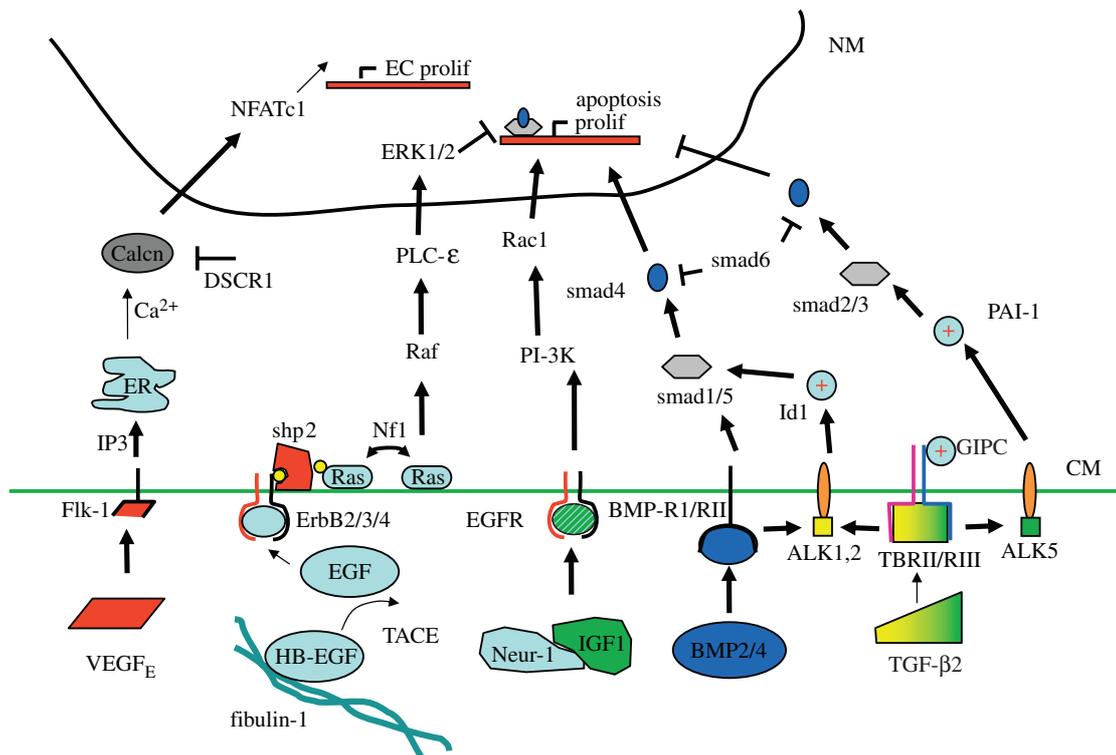


Figure 11. Voies de signalisations moléculaires impliquées dans la morphogénèse valvulaire post-TEM chez la souris (d’après Butcher et Markwald, 2007)

CM (membrane cellulaire), NM (membrane nucléaire)

Après l’étape de TEM, le feuillet valvulaire riche en cellules mésenchymateuses réorganise son architecture fonctionnelle pour former une valve mature. Le VEGF_E (d’origine endocardique) participe à la prolifération des cellules endocardiques et s’oppose à leur transformation en cellules mésenchymateuses. La maturation et le maintien de la densité cellulaire optimale (équilibre apoptose/prolifération) au sein du feuillet valvulaire sont assurés par le BMP, le TGF-β et l’EGF.

3.2.2.3. Régulations liées aux contraintes biophysiques

Au cours du développement embryonnaire, le cœur ajuste sa morphologie aux exigences hémodynamiques et aux contraintes mécaniques. Sur une coupe de cœur embryonnaire observée en microscopie électronique à balayage, les cellules endothéliales situées dans la zone d’entrée des oreillettes s’orientent en direction du flux et perdent cette orientation à la suite d’une ligature de la veine vitelline. A la différence des cellules endothéliales vasculaires, les cellules

endothéliales valvulaires sont alignées perpendiculairement au flux sanguin comme les cellules musculaires lisses vasculaires (Icardo et Colvee, 1995; Butcher et al., 2004).

Il a été montré sur une culture de cellules endothéliales ventriculaires porcines soumises à des contraintes de cisaillement une réponse vasodilatatrice par production de prostaglandines (Hanada et al., 2000). L'étude de eNOS, de KLF2 (Kruppel-like lung factor) et de l'endothéline-1 au cours du développement cardiaque a permis de comprendre que ces facteurs s'exprimaient de façon préférentielle en fonction des contraintes hémodynamiques locales. Les cellules endothéliales peuvent percevoir ainsi des changements hémodynamiques et répondre en modifiant la transcription de certains gènes. La eNOS et KLF2 sont produits dans les zones à forte contrainte hémodynamique et l'endothéline-1 dans les zones à faible contrainte (Groenendijk et al., 2004).

De nombreux facteurs comme VEGF, BMP, TGF- β et NOTCH impliqués dans la TEM sont connus pour être régulés par les contraintes mécaniques et les forces de cisaillement (Butcher et Nerem, 2007).

4. Mécanismes connus de la dégénérescence valvulaire

4.1. Modèle d'adaptation de la valve à son environnement : types cellulaires et évolution des marqueurs spécifiques de différenciation

La valve mature formée subit une réorganisation progressive de sa matrice de la vie fœtale à l'âge adulte. L'étude de l'évolution de la densité cellulaire au sein de la matrice valvulaire et la caractérisation des différents marqueurs biologiques de remodelage ont permis de montrer que la densité cellulaire, la prolifération et l'apoptose sont plus marquées pendant la vie fœtale et néonatale et que les cellules retrouvées dans la matrice valvulaire passaient d'un phénotype immature, activé (assimilable à des myofibroblastes : expression d' α -actine de muscle lisse, de chaîne lourde de myosine embryonnaire et production de métalloprotéinases matricielles) à un phénotype mature, quiescent (fibroblastique). Au départ, la matrice cellulaire est riche en collagène mais s'enrichit en élastine à l'âge adulte et les différentes couches valvulaires deviennent bien distinctes (Figures 12, 13, 14) (Aikawa et al., 2006).

Il a été montré qu'en cas de lésion ou de modification dans l'environnement valvulaire (stimuli mécaniques), les cellules interstitielles quiescentes de nature fibroblastique peuvent s'activer en exprimant un phénotype myofibroblastique et participer au remodelage de la matrice

extracellulaire et à la réparation de la valve. Ces cellules retrouvent leur phénotype de départ et restaurent l'équilibre.

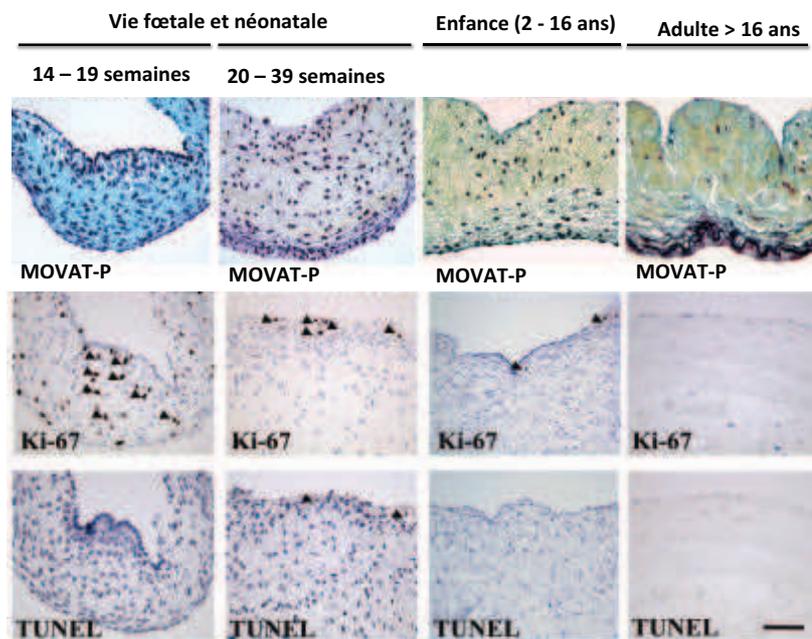


Figure 12. Aspect de la matrice extra-cellulaire et activité mitotique au sein de la valve de la période fœtale à l'âge adulte (d'après Aikawa et al., 2006)

MOVAT-P = coloration movat pentachrome mettant en évidence les noyaux des cellules (noir), la matrice extracellulaire (bleu), les muscles (rouge), la fibrine (rouge intense), le collagène (jaune) ; Ki-67 = marqueur de prolifération cellulaire ; TUNEL= marqueur d'apoptose

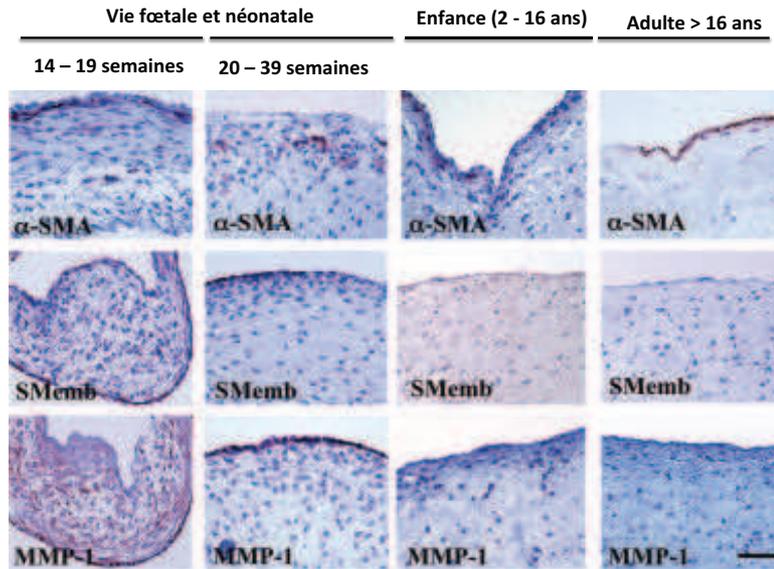


Figure 13. Transition des cellules interstitielles d'un phénotype néonatal activé à un phénotype quiescent (d'après Aikawa et al., 2006)

Marqueurs des myofibroblastes = α -SMA (alpha actine de muscle lisse), SMemb (chaîne de myosine embryonnaire), MMP-1 (métalloprotéinases matricielles type 1)

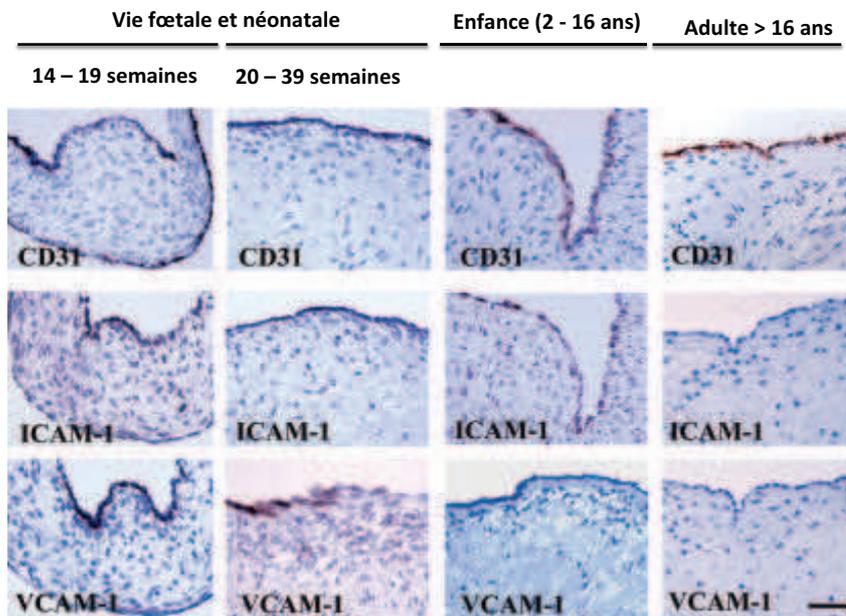


Figure 14. Marqueurs des cellules endothéliales (d'après Aikawa et al., 2006)
 CD31 (Pecam-1 = molécule d'adhésion plaquettaire des cellules endothéliales) ; I-CAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire) ; V-CAM (molécule d'adhésion aux vaisseaux)

Trois grandes populations cellulaires interagissent dans la matrice valvulaire : les cellules endothéliales, les cellules interstitielles (quiescentes ou activées) et les cellules progénitrices mésenchymateuses. Les cellules épithéliales migrant de la crête neurale et les cellules endocardiques génèrent, au cours de la vie fœtale, au sein de la matrice valvulaire par un phénomène de TEM, un pool de cellules interstitielles quiescentes et activées. Les cellules interstitielles peuvent participer au phénomène de réparation par leur capacité à proliférer, migrer et produire de la matrice extracellulaire. Ces cellules peuvent sous certaines conditions se différencier en d'autres types cellulaires. Le rôle des cellules progénitrices n'est pas très bien connu mais il a été proposé qu'une partie de ces cellules pouvait se différencier en ostéoblaste en condition pathologique (Figure 15) (Schoen, 2005; Liu et al., 2007).

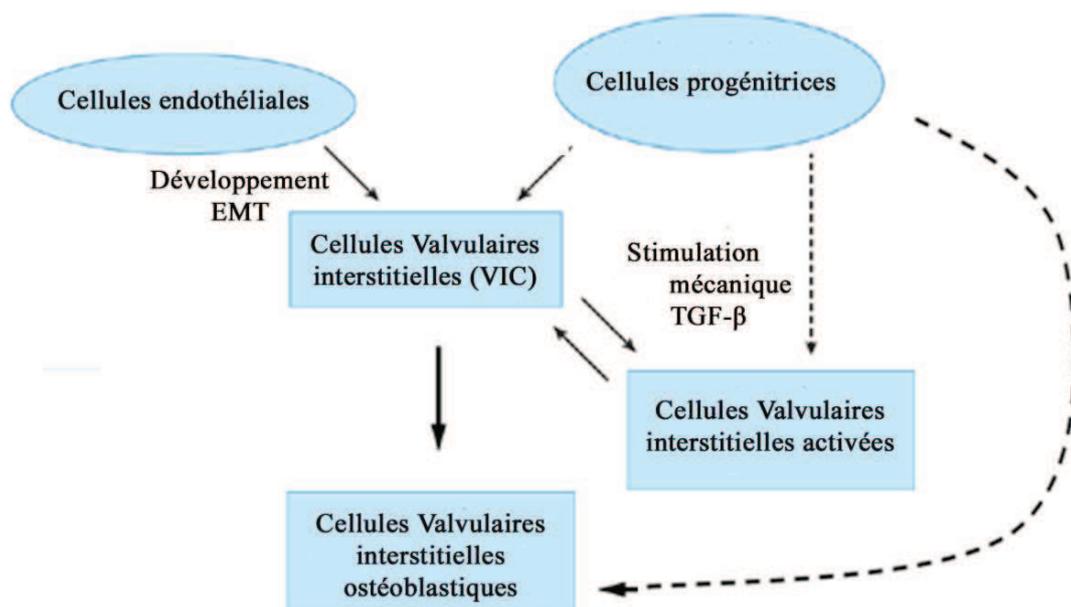


Figure 15. Interactions entre les différentes populations cellulaires dans la valve (d'après Schoen, 2005 et Liu et al., 2007)

La transition endothélio-mésenchymateuse (TEM) et le TGF- β sont les acteurs clés de cette interaction.

4.2. Mécanismes globaux de dégénérescence valvulaire

En fonction du moment de survenue au cours du développement, nous distinguons deux grandes catégories de valvulopathies: les valvulopathies congénitales (développées avant la naissance) et les valvulopathies acquises (survenues après la naissance). Ces valvulopathies peuvent chacune avoir plusieurs étiologies mais présentent des similitudes sur le plan anatomo-pathologique et les manifestations cliniques.

Le dysfonctionnement des valves cardiaques peut se manifester soit par un rétrécissement (ou sténose) des feuillets, constituant une entrave au remplissage ou par une insuffisance, responsable d'une régurgitation (ou fuite). Ces deux dysfonctions coexistent souvent sur une même valve et entraînent une diminution de la motilité valvulaire.

Deux grandes catégories de lésions sont évoquées sur le plan anatomo-pathologique. Les lésions de dégénérescence valvulaire liées à l'âge touchant les valves aortique et mitrale sont très représentatives. Les autres entités cliniques survenant de façon précoce au cours de la vie (quelles que soient leurs étiologies), correspondent à une accélération du processus de remodelage survenant avec l'âge. Ainsi, l'étude des atteintes congénitales ou des dégénérescences précoces offre l'opportunité de mieux comprendre l'implication d'une voie de signalisation donnée dans la survenue et/ou la progression des lésions.

D'une façon générale, en situation pathologique (stress mécanique, anomalies hémodynamiques et lésions), les cellules endothéliales valvulaires (VEC) deviennent activées à la faveur de l'inflammation et/ou de la production de cytokines pro-inflammatoires et activent les cellules interstitielles notamment via la voie de signalisation du TGF- β . Les cellules interstitielles sont impliquées dans la production de matrice extracellulaire responsable de la fibrose. Ces cellules peuvent proliférer puis se différencier en myofibroblaste ou en ostéoblaste (Figure 16) (Schoen, 2005).

Au total, l'ensemble des mécanismes de dégénérescence impacte des voies de signalisation déjà impliquées dans la valvulogénèse.

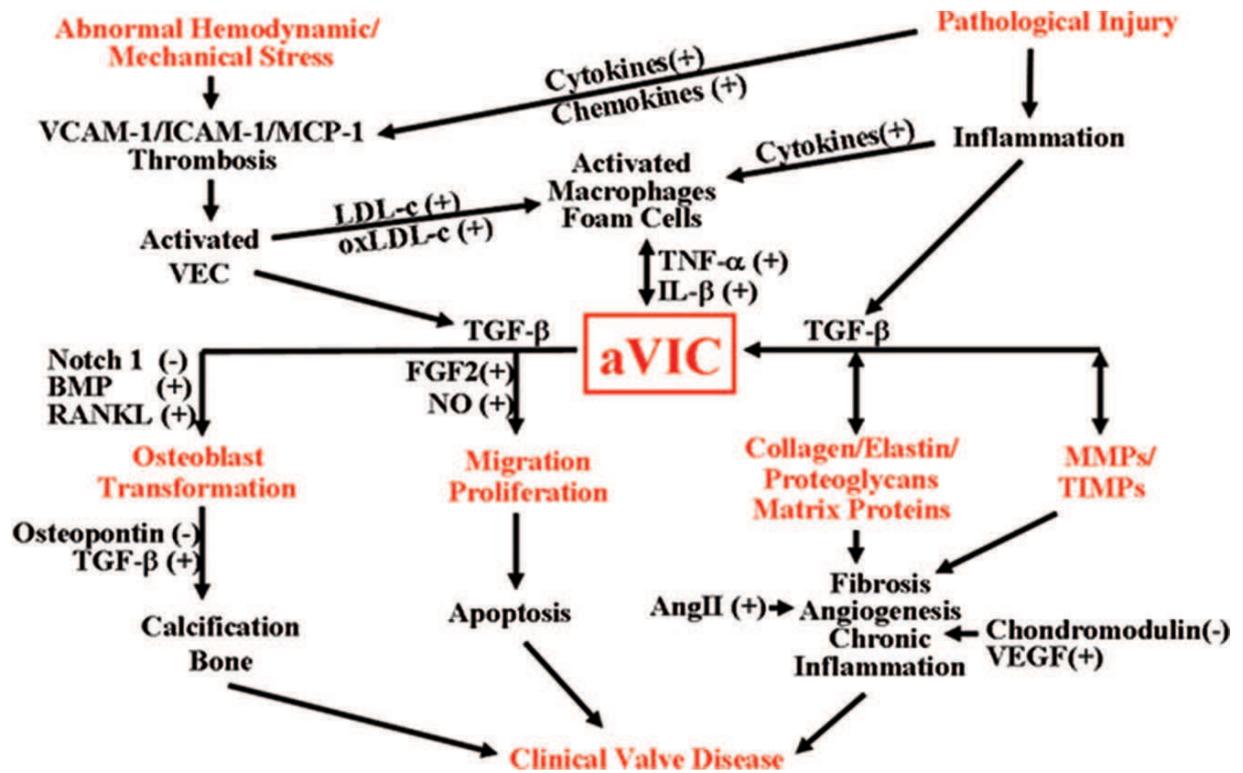


Figure 16. Hypothèse mécanistique de la dégénérescence valvulaire
(d'après Schoen, 2005)

De nombreuses voies de signalisation initiées par certains facteurs comme le stress mécanique, les contraintes hémodynamiques et l'inflammation parviennent aux cellules endothéliales valvulaires (VEC) qui deviennent activées. Ces signaux rompent l'équilibre entre les cellules endothéliales et les cellules interstitielles valvulaires. Les manifestations cliniques de la dégénérescence valvulaire s'expliquent en partie par l'ensemble des réponses biologiques liées à l'activation des cellules interstitielles valvulaires (aVIC) et à leur transdifférenciation (apoptose, fibrose, inflammation et calcification).

4.2.1. Fibro-calcification de la valve aortique

Dans le cas de la dégénérescence fibro-calcique de la valve aortique liée à l'âge survenant chez près de 25% des personnes de plus de 65 ans (Lindroos et al., 1993), les lésions anatomopathologiques associent une calcification initiée à la base du feuillet, une accumulation de lipides, une inflammation et la présence de fibrose. Diverses étiologies notamment le stress oxydant, les lésions endothéliales, l'inflammation ou les contraintes hémodynamiques sont proposées (Towler, 2013). Ces lésions peuvent s'expliquer par une activation suivie d'une différenciation des cellules interstitielles valvulaires (VIC) en myofibroblastes responsables d'une production importante de collagène ou en ostéoblastes responsables de la calcification. L'activation du VEGF_A favorise la formation de nouveaux vaisseaux à la base de la valve, la transformation des péricytes en myofibroblastes et leur différenciation en ostéoblastes. La transformation des monocytes en macrophage ou l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques situées à la base de la valve sont responsables de la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui entretiennent la calcification et le processus inflammatoire (Figure 17) (Weiss et al., 2013).

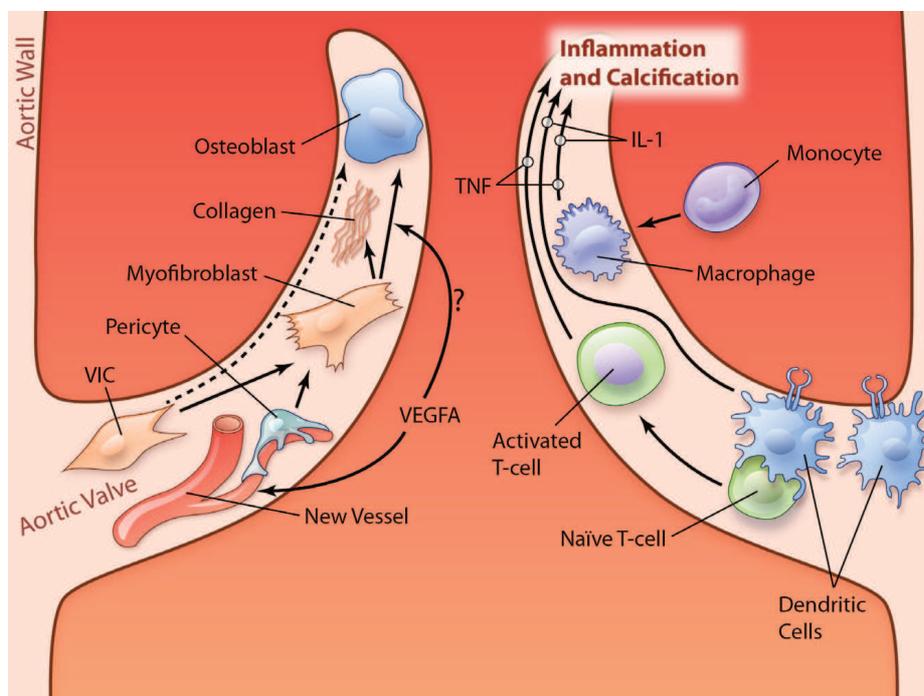


Figure 17. Hypothèse mécanistique simple expliquant les lésions fibro-calciques de la valve aortique (d'après Weiss et al., 2013)

Certaines malformations congénitales permettent de mieux comprendre les mécanismes en cause en cas de lésions. Le caractère héréditaire de la bicuspidie aortique est clairement établi de nos jours. La présence d'une bicuspidie de la valve aortique est un facteur de risque majeur de survenue de la fibro-calcification de la valve aortique (20% des patients développent une fibro-calcification de la valve aortique) (Tzemos et al., 2008; Calloway et al., 2011). Ainsi, chez l'homme ou la souris, un défaut d'expression de nombreux gènes impliqués dans la morphogenèse et la maturation valvulaire est associé au développement d'une bicuspidie de la valve aortique. Il s'agit des gènes NOTCH1, GATA6, FBN1, TGFBR2, ACTA2, HOXA1, KCNJ2 chez l'homme et NOS3, GATA5, HOXA1 et Nkx2.5 chez la souris (Laforest and Nemer, 2011, 2012; Laforest et al., 2011).

4.2.2. Dégénérescence fibromyxoïde de la valve mitrale

Sur le plan anatomo-pathologique, les lésions dégénératives fibromyxoïdes qui touchent la valve mitrale diffèrent des lésions fibro-calciques précédemment décrites. La valve organisée en 3 couches distinctes perd progressivement cette structure et devient épaissie et riche en matrice extracellulaire (protéoglycanes et glycoaminoglycanes). Il est retrouvé très souvent une surexpression de TGF- β , de la fibrose, une prolifération dans la spongiosa (forte cellularité). Les lésions ne sont pas calcifiées et apparaissent peu inflammatoires.

5. Hypothèses de l'implication de la 5-HT dans le remodelage pathologique des valves cardiaques

La 5-HT et les substances qui stimulent les récepteurs 5-HT_{2B} ont été rendues responsables de l'induction de lésions valvulaires. Cette hypothèse provient d'un faisceau d'arguments observationnels issus de la mise en parallèle des lésions de la cardiopathie carcinoïde induites par une tumeur digestive produisant des quantités importantes de 5-HT et des atteintes valvulaires provoquées par des substances agonistes des récepteurs 5-HT_{2B}.

5.1. Arguments pharmacologiques et cliniques

Vers les années 1960, de nombreuses publications mettent l'accent sur un lien probable entre les dérivés sérotoninergiques ou la 5-HT elle-même et la survenue de valvulopathie. Après

avoir rapporté des cas de fibroses rétro-péritonéales associées à l'utilisation du méthysergide (Méthergin[®]) dans la prise en charge de la migraine, dans sa publication parue dans le « New England Journal of Medicine » en 1966, Graham, rapporte une année plus tard, des cas de fibroses myocardique et pulmonaire associées à cette thérapeutique. Il compare les lésions cardiaques à celles observées dans la valvulopathie carcinoïde et met l'accent sur les similitudes de structures entre la 5-HT et le méthysergide (Graham et al., 1966; Graham, 1967a).

Plusieurs autres molécules sont également connues pour induire des atteintes valvulaires cardiaques comme certains dérivés dopaminergiques (dérivés de l'ergot de seigle), certains anorexigènes (fenfluramine, dexfenfluramine), l'ecstasy (Bhattacharyya et al., 2009) et plus récemment le benfluorex (Etienne et al., 2011). Ces substances ont toutes en commun d'interagir avec les récepteurs sérotoninergiques et en particulier les récepteurs 5-HT_{2B}. Il est donc proposé que la 5-HT ou certains agonistes du récepteur 5-HT_{2B} agiraient en stimulant ce dernier et seraient à l'origine d'une signalisation intracellulaire favorisant l'apparition de lésions caractéristiques que nous décrirons plus tard.

5.1.1. La cardiopathie carcinoïde

Les tumeurs carcinoïdes touchent 1 à 2 personnes pour 100.000 habitants par an (Modlin et Sandor, 1997). Elles sont développées à partir des cellules entérochromaffines et localisées principalement dans le tractus gastro-intestinal (rarement dans le poumon et l'ovaire). Depuis la première description effectuée par l'anatomopathologiste allemand A.J. Scholte en 1931, de nombreux cas typiques d'atteinte des valves cardiaques survenant chez des patients ayant des métastases hépatiques de tumeurs carcinoïdes ont été publiés (COSH et al., 1959).

Les tumeurs carcinoïdes produisent en dehors de la 5-HT de nombreuses autres substances vasoactives comme la dopamine et l'histamine ou certains polypeptides comme la bradykinine, la somatostatine et la chromogranine A.

Sur le plan clinique, la plupart des patients présentent des symptômes liés à la libération de ces substances biologiquement actives par la tumeur ou ses métastases sur divers organes comme la peau (syndrome vasomoteur ou flush cutané), les intestins (douleurs abdominales et diarrhées motrices), les bronches (bronchospasme) et le cœur (cardiopathie carcinoïde). Cependant, les circonstances de découverte peuvent être fortuites car dans de nombreux cas, la pathologie peut rester asymptomatique.

Waldenstrom et Ljungberg en 1955 suggèrent que les lésions cardiaques seraient dues aux quantités importantes de 5-HT produites par les métastases hépatiques tumorales. Ils établissent

par la suite que chez les patients présentant un syndrome carcinoïde, les taux sanguins de 5-HT sont très élevés et que sa concentration dans les cavités droites du cœur étaient plus importante que dans les cavités gauches. En effet, la 5-HT est dégradée dans les poumons en un métabolite inactif qui est l'acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA) présent dans le sang et excrété dans les urines (Waldenstrom et Ljungberg, 1955). L'élévation des concentrations urinaires de 5-HIAA permet d'orienter le diagnostic de la maladie.

L'implication de la 5-HT dans le phénomène peut être également suggérée par le fait que les carcinomes digestifs non productifs de 5-HT n'entraînent pas de valvulopathie. De plus, l'administration de concentrations élevées de 5-HT à des rats Sprague-Dawley provoque une valvulopathie de type carcinoïde qui est prévenue par l'administration de transhydrolisuride (antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}) (Gustafsson et al., 2005; Hauso et al., 2007).

Le dogme actuel est que les quantités importantes de 5-HT produites par la tumeur ou les métastases atteignent les cavités droites du cœur et stimulent les récepteurs 5-HT_{2B} valvulaires pour induire les lésions carcinoïdes. Cet argument est renforcé par les cas de valvulopathies décrits suite à l'utilisation de certains anorexigènes comme la fenfluramine et la dexfenfluramine qui sont des agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT_{2B}.

5.1.2. Les valvulopathies médicamenteuses

5.1.2.1. Les dérivés de l'ergot de seigle

Anti-migraineux (méthysergide et ergotamine)

Le méthysergide est une molécule interagissant avec de nombreux récepteurs du système sérotoninergique et développée pour la prise en charge de la migraine et des algies vasculaires de la face. Il s'agit de la première molécule connue depuis 1967 comme pouvant induire une fibrose du myocarde et des feuillets valvulaires (Graham, 1967b). Les lésions valvulaires sont imputables à son métabolite la méthylergonovine qui est un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}. Elle est responsable également de fibrose pleuro-pulmonaire et péritonéale. Selon les recommandations actuelles, son utilisation continue ne doit pas dépasser 6 mois avec une période de 3 à 4 semaines d'interruption entre deux cures (Silberstein, 2000). Les manifestations fibrotiques régressent habituellement à l'arrêt du traitement.

L'ergotamine est un alcaloïde dérivé de l'ergot de seigle dont la structure chimique se rapproche de celle du méthysergide. Certains cas de valvulopathie affectant les cavités gauches

du cœur (valve mitrale) ont été rapportés sous traitement par l'ergotamine. Les lésions induites par ces composés ressemblent à celles de la valvulopathie carcarinoïde.

Agonistes dopaminergiques (pergolide et cabergoline)

Le pergolide et la cabergoline sont deux dérivés de l'ergot de seigle interagissant avec les récepteurs dopaminergiques et utilisés pour le traitement de la maladie de Parkinson, du syndrome des jambes sans repos et de certaines hyperprolactinémies. Ces molécules interagissent également avec d'autres types de récepteurs comme les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}.

L'association entre le pergolide et la survenue de valvulopathie a été publiée en 2002 et depuis de nombreuses études ont confirmé cette tendance (Pritchett et al., 2002). Une revue large de la littérature rapporte que dans treize études sur quinze le traitement de patients atteints de la maladie de Parkinson par le pergolide ou la cabergoline était associé à une augmentation significative du risque de dégénérescence valvulaire cardiaque (Zanettini et al., 2007b; Bhattacharyya et al., 2009). Deux grandes études indépendantes menées au plan européen ont vérifié le lien entre le traitement par le pergolide ou la cabergoline et la survenue de valvulopathie. Dans la première, il a été comparé à un groupe contrôle l'emploi de quatre agonistes dopaminergiques (dérivés ou non de l'ergot de seigle). Cette étude a révélé une augmentation significative des cas de valvulopathies à type de régurgitation (modérée ou sévère) associées aux dérivés de l'ergot de seigle : pergolide (24,4%) et la cabergoline (28,65%) et aucun cas imputables aux deux autres composés non dérivés de l'ergot de seigle : pramipexole et ropinirole (0%) avec une prévalence de 5,6% dans le groupe contrôle (Zanettini et al., 2007b). La deuxième étude démontre une augmentation du risque de valvulopathie de 7,1 fois liée au pergolide et de 4,9 fois liée à la cabergoline en comparaison au pramipexole, au ropinirole, à la bromocriptine (antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, pKi 7,3 et agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{2A}, pKi 7,0) et au lisuride (antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, pKi 8,9). Ces deux études rapportent également que les lésions régressent à l'arrêt du traitement. Le pergolide a été retiré du marché américain en août 2007 et du marché français en mai 2011. Cependant, la cabergoline qui a reçu son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour le traitement des hyperprolactinémies ne présente pas un fort risque aux doses utilisées dans cette indication.

5.1.2.2. Les dérivés amphétaminiques

Anorexigènes et dérivés

La fenfluramine (Pondéral[®]) est un mélange racémique du lévofenfluramine et de la dexfenfluramine qui a été mis sur le marché en France en 1965 et aux Etats-Unis en 1973 (Hutcheson et al., 2011). Après une très large utilisation, elle fût retirée du marché en 1997 pour causes d'effets indésirables graves à type d'hypertension artérielle pulmonaire et de valvulopathie (Connolly et al., 1997; Fitzgerald et al., 2000b). Alerté au cours de ses longues années de prescriptions par ses effets potentiellement graves, il a été proposé de développer l'isomère dextrogyre (dexfenfluramine) sensé être le plus actif et n'induisant pas d'effets indésirables graves. Ainsi, la dexfenfluramine (Isoméride[®] ou Redux[®]) arrive sur le marché en français en 1985 et américain en 1996 mais en sera retirée pour les mêmes raisons respectivement en 1997 en mars 1999. Dans cette classe de molécules, se trouve un autre dérivé de la fenfluramine : le benfluorex mis sur le marché en 1976 et retiré en 2009 en France et dont un des métabolites actifs est la nordexfenfluramine.

Benfluorex

Le benfluorex est un dérivé de la fenfluramine commercialisé sous le nom de Médiator[®] par les laboratoires SERVIER. Il a été introduit sur le marché français en 1975 et en fût retiré en novembre 2009. La principale raison du retrait était l'induction de valvulopathies similaires à celles induites par la fenfluramine. En effet, le benfluorex et la fenfluramine possèdent un métabolite commun qui est la norfenfluramine auquel on attribue les effets délétères sur les valves cardiaques (Tribouilloy et al., 2011).

En France, de 1976 à 2009, environ 5 millions de patients ont été traités par le benfluorex avec une durée moyenne de traitement de 18 mois (Weill et al., 2010). L'imputabilité des décès des patients atteints de valvulopathies à l'utilisation du benfluorex est très difficile à établir. Il existe de nombreux facteurs confondant ou aggravant les fuites valvulaires au sein d'une population cible particulièrement à fort risque cardiovasculaire (diabétiques, hypertendus). L'impact du benfluorex sur la survenue des lésions valvulaires pourrait être une accélération de l'histoire naturelle des valvulopathies décrites chez les patients diabétiques.

Psychotropes : 3,4 méthylène-dioxy-N-méthamphétamine (MDMA) ou Ecstasy

L'ecstasy est un stimulant du système nerveux central. Il a fait l'objet d'un brevet déposé par le laboratoire MERCK comme anorexigène à la suite des travaux réalisés par Anton Köllisch (Benzenhöfer et Passie, 2006). Selon les données publiées par l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT), la prévalence pour une consommation occasionnelle au sein de la population des 18 - 25 ans est de 4,2% et celle des 26 - 34 ans de 6,8%. De nombreuses publications rapportent des cas de valvulopathies chez les personnes consommant l'ecstasy (Droogmans et al., 2007). Les lésions dégénératives valvulaires observées ressemblent sur le plan échocardiographique à celle obtenues lors d'un traitement avec le pergolide. De plus, il a été montré que l'ecstasy pouvait induire in vitro, une prolifération des cellules interstitielles valvulaires (Setola et al., 2003). L'analyse histologique des lésions (touchant généralement la valve mitrale) rapporte la présence au sein des feuillets valvulaires peu inflammatoires, d'une matrice extracellulaire abondante et fortement fibrosée (Montastruc et al., 2012).

5.2. Bases mécanistiques du remodelage valvulaire cardiaque et l'hypothèse sérotoninergique des valvulopathies

Les divers mécanismes à l'origine de la dégénérescence des valves ne sont pas très bien connus mais certains arguments pharmacologiques mettent en jeu des stimuli mécaniques et chimiques (Figure 18). Il a été montré in vitro sur une culture de valve mitrale canine que le stress mécanique favorisait l'expression de nombreux marqueurs de trans-différenciation. La co-culture des cellules endothéliales et interstitielles a révélé que les cellules endothéliales étaient capables de réguler le phénotype des cellules interstitielles en fonction des stimuli mécaniques (Gould et al., 2014).

Le TGF- β , un acteur clé du remodelage

Les valves dégénérées ont une structure histologique évoquant une régression vers un phénotype embryonnaire caractérisé par la présence d'une forte densité de cellules, des myofibroblastes, d'une accumulation importante de matrice extracellulaire et l'expression de nombreux marqueurs de la TEM (TGF- β , vimentine, α -actine de muscle lisse, collagènes et métalloprotéinases matricielles) (Shworak, 2004).

A partir de l'analyse immunohistochimique de tissus valvulaires provenant de patients opérés pour un remplacement valvulaire à la suite d'une cardiopathie carinoïde, Waltenberger et

collaborateurs ont détecté une production importante des diverses isoformes du TGF- β (TGF- β 1, 2 et 3) dans les plaques carcinoïdes (Waltenberger et al., 1993). A la suite de ces travaux, Kim et collaborateurs ont révélé en comparant une série de tissus valvulaires issue de patients présentant une valvulopathie rhumatismale chronique à des valves saines, une production importante de TGF- β 1 au sein des valves pathologiques (Kim et al., 2008). Ces deux études mettent l'accent sur l'importance de la production du TGF- β (en particulier le TGF- β 1) dans la progression de la fibrose. Pour rappel, au cours de la valvulogénèse, la production de TGF- β 1 est indispensable pour l'induction de la transdifférenciation des cellules endothéliales. Le traitement d'un clone de cellules endothéliales mature issu d'une culture primaire de valve pulmonaire par du TGF- β 1 entraîne chez ces cellules la perte de l'identité endothéliale et l'expression de marqueurs caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux (Paranya et al., 2001).

5-HT et remodelage des valves

Il a été montré que la 5-HT est capable d'induire la surexpression de TGF- β 1 (un des acteurs clés du remodelage valvulaire) et la synthèse de collagène dans une culture de cellules interstitielles aortiques de mouton. Cette surexpression passe par la stimulation des récepteurs 5-HT₂ (couplés Gq) et la phosphorylation de ERK (Jian et al., 2002; Xu et al., 2002). L'hypothèse sérotoninergique de la dégénérescence valvulaire est également soutenue par le fait que la 5-HT est capable d'entretenir la prolifération de nombreux types cellulaires et notamment des cellules interstitielles valvulaires. Le mécanisme en jeu passe par une phosphorylation de ERK (Liu et al., 2004) (Figure 19).

De plus, l'injection chronique de 5-HT à des rats provoque une dégénérescence des valves cardiaques (Gustafsson et al., 2005; Droogmans et al., 2009) avec une surexpression des récepteurs 5-HT_{2B} et une diminution de SERT. Les souris SERT^{-/-} développent une valvulopathie probablement liée à l'augmentation de la concentration de 5-HT dans le cœur (Mekontso-Dessap et al., 2006). De plus, dans la dégénérescence fibromyxoïde des valves mitrales chez le chien, il est observé une surexpression des récepteurs 5-HT_{2B} et également une diminution de SERT (Orton et al., 2012). Les contraintes d'étirement, peuvent favoriser l'expression de la TPH1 impliquée dans la production de la 5-HT (Lacerda et al., 2012).

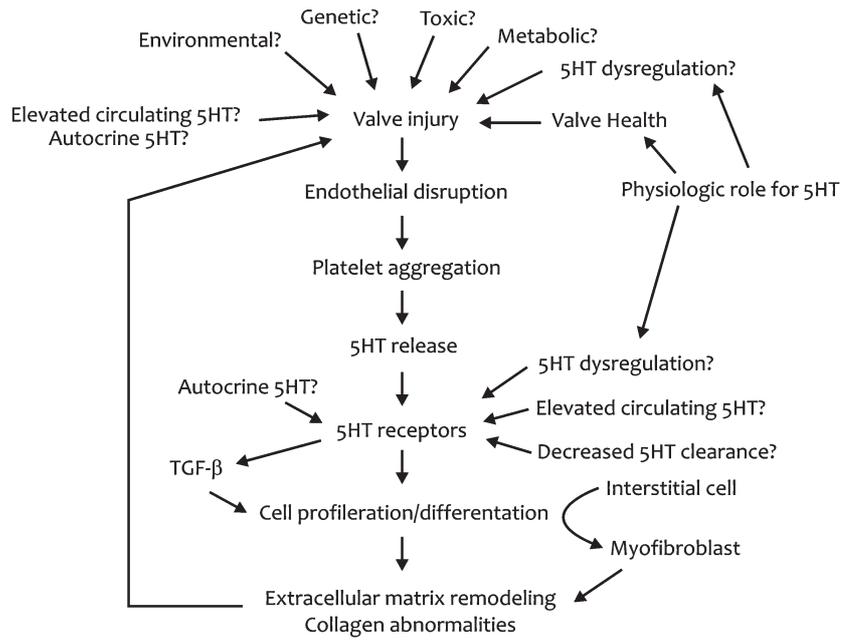


Figure 18. Principales étiologies de la dégénérescence valvulaire sérotoninergique
(d'après Omayya et Levy, 2010)

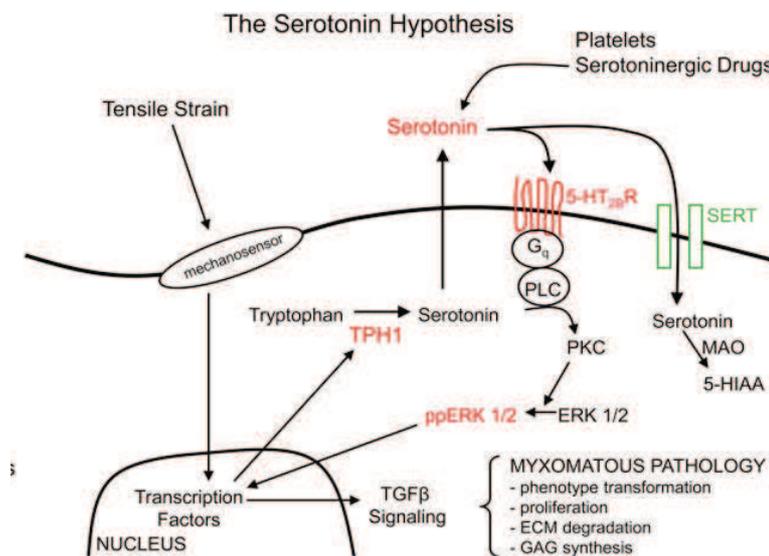


Figure 19. Hypothèse sérotoninergique de la valvulopathie
(d'après Orton et al., 2012)

6. Objectifs

Les valvulopathies associant une dysfonction du système sérotoninergique ré-expriment certains marqueurs impliqués dans la morphogenèse valvulaire et ressemblent histologiquement à une dégénérescence fibromyxoïde liée à l'âge. Bien que la plupart des médicaments en cause soient retirés marché, l'étude des dégénérescences sérotoninergiques pourrait offrir la possibilité de mieux comprendre les mécanismes de la dégénérescence liée à l'âge.

L'**objectif principal** est de confirmer l'hypothèse du rôle de la 5-HT et des récepteurs 5-HT₂ dans la survenue des lésions valvulaires afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ce processus.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons développé (1) un modèle murin de valvulopathie pharmaco-induite par un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B} permettant de faire la preuve de leur implication, (2) un modèle de valvulopathie carcinoïde pouvant permettre d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques pour cette maladie orpheline et (3) un modèle cellulaire pour l'étude des voies de signalisation moléculaires.

« Sérotonine et dégénérescence valvulaire cardiaque : de la valvulopathie carcinoïde aux atteintes médicamenteuses »

Roland Lawson, Estelle Ayme-Dietrich, Laurent Monassier

(Laboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire)

Introduction

La sérotonine et les substances qui stimulent ses récepteurs ont été suspectées d'induire des phénomènes dégénératifs valvulaires cardiaques. Cette hypothèse repose sur un faisceau d'arguments observationnels basé sur la similitude des lésions de la valvulopathie carcinoïde et de celles observées au décours de l'emploi de substances ayant en commun d'activer un sous-type de récepteurs sérotoninergiques, le 5-HT_{2B}. En effet, les lésions se présentent sous la forme de plaques riches en myofibroblastes et en protéoglycanes. Elles sont rétractiles, épaississent les feuillets et conduisent souvent à la coexistence de fuites et de sténoses. De plus, l'intensité de la stimulation est probablement reliée à l'importance des lésions puisqu'on met en évidence une corrélation entre l'importance des lésions dégénératives et les concentrations sanguines de sérotonine d'une part et d'autre part entre la dose et la durée d'emploi des agonistes sérotoninergiques. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires sont encore très imparfaitement élucidés. Cette compréhension constituerait une véritable clé dans le développement de nouvelles stratégies pour la prévention des lésions carcinoïdes et l'identification des substances exposant à un risque valvulaire aussi bien en pharmacologie de sécurité que pour la surveillance des médicaments après leur commercialisation.

LA SÉROTONINE ET SES RÉCEPTEURS

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine endogène produite dans le système nerveux central (10%) et en périphérie (90%) à partir du L-tryptophane sous le contrôle

de la tryptophane hydroxylase (Tph), enzyme limitante de cette synthèse. En périphérie, elle est majoritairement produite par les cellules entérochromaffines intestinales (95%), et accessoirement par les neurones sérotoninergiques myentériques (5%),

puis stockée dans les plaquettes sanguines qui s'en chargent grâce à l'expression du transporteur membranaire (SERT) à leur surface (Fig. 1). Dans le système nerveux central, la production est assurée par les corps cellulaires des neurones du raphé. La 5-HT interagit avec 16 récepteurs différents répartis en sept classes (5-HT₁ à 5-HT₇) et SERT qui favorise son passage de l'espace extracellulaire vers l'intérieur de la cellule où elle est, soit dégradée, soit recyclée dans les vésicules de sécrétion. Le nombre important de récepteurs différents permet à la 5-HT de réguler finement de nombreuses fonctions physiologiques vitales. Dans le système nerveux central, elle intervient notamment dans la thermorégulation, la nociception, le cycle veille/sommeil, la prise alimentaire et, en périphérie, dans la régulation de l'hémostase primaire, la motilité gastro-intestinale, les fonctions hémodynamiques, l'hématopoïèse, la cicatrisation et le maintien de l'homéostasie squelettique. Son élimination se fait par un métabolisme oxydatif dépendant de la monoamine oxy-

dase A (MAO-A) essentiellement dans le foie et les poumons.

LA CARDIOPATHIE CARCINOÏDE

LES TUMEURS CARCINOÏDES

Les tumeurs neuroendocrines carcinoïdes sont développées aux dépens des cellules entérochromaffines. Elles peuvent prendre de nombreuses localisations mais sont le plus classiquement retrouvées dans le tractus gastro-intestinal. Elles présentent un potentiel métastatique vers le foie et les poumons et sont découvertes soit de manière fortuite soit au décours du classique « syndrome carcinoïde » qui associe des diarrhées et des bouffées vasomotrices du visage. Ces tumeurs sont relativement rares, touchant 1 à 2 personnes pour 100 000 individus. Elles produisent de nombreux médiateurs (somatostatine, chromogranine A, histamine, kallikréine, corticotropine) mais surtout des quantités importantes de sérotonine (1) et se compliquent d'une cardiopathie mortelle réduisant la survie des patients à 1,6 ans contre 4,6 ans en absence d'atteinte cardiaque (2).

LES LÉSIONS

L'implication physiopathologique de la 5-HT dans la survenue des lésions cardiaques est fortement suggérée par la corrélation entre les concentrations de 5-HT libre circulante et la gravité de la pathologie (3). Les lésions cardiaques prédominent du côté droit, du fait du drainage sanguin veineux digestif et hépatique qui achemine les substances actives produites par la tumeur vers cette partie du cœur. Les atteintes cardiaques gauches sont très rares du fait de la dégradation de la 5-HT dans

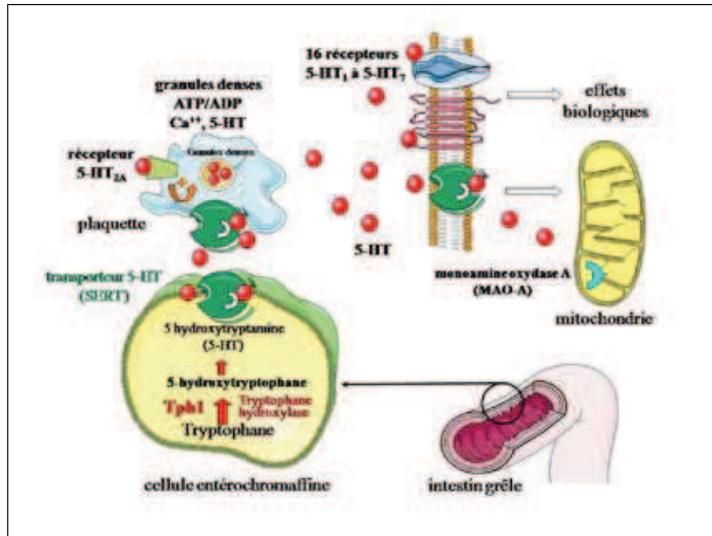


Figure 1 - Synthèse, stockage, effets biologiques et métabolisme périphérique de la sérotonine.

les poumons. On peut néanmoins trouver des atteintes gauches lors de l'existence d'un shunt droite-gauche dont l'ouverture est favorisée par la fréquente coexistence d'une augmentation des pressions pulmonaires (4). Ces lésions se caractérisent par la formation de plaques carcinoïdes localisées surtout sur la face d'aval des feuillets tricuspides et des sigmoïdes de l'artère pulmonaire et plus rarement sur l'endocarde auriculaire, la veine cave supérieure et l'abouchement du sinus coronaire. Ces plaques s'apparentent à des lésions fibromyxoides composées de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de myofibroblastes entourées d'un stroma de collagène et de mucopolysaccharides (5). Du fait de leur grande richesse en cellules contractiles, les plaques carcinoïdes ont la propriété de se rétracter conduisant ainsi à un raccourcissement de la longueur des feuillets valvulaires. On trouve principalement des fuites tricuspides et l'association de fuites et de sténoses pour la

valve de l'artère pulmonaire. Cette atteinte conduit à une progressive insuffisance cardiaque droite en l'absence de remplacement valvulaire.

PRISE EN CHARGE

Au-delà de l'étiologie tumorale primitive, la prise en charge des lésions cardiaques constitue un sérieux défi. Les différentes thérapeutiques antitumorales et l'utilisation des analogues synthétiques de la somatostatine (octréotide) pour contrôler la prolifération et la sécrétion tumorale n'ont pas démontré leur capacité à prévenir ou à faire régresser les lésions cardiaques. A ce jour, la seule option thérapeutique est la chirurgie de remplacement valvulaire. Lorsque le choix se porte sur des valves bioprothétiques, un processus dégénératif, similaire à ce qui était observé dans les valves natives, va se mettre en place, conduisant à une réduction massive de la durée de vie de ces prothèses à seulement 18 mois en moyenne. Les différents mécanismes expliquant ces

effets de la sérotonine de même que les récepteurs potentiellement impliqués restent encore à décrypter.

LES VALVULOPATHIES MÉDICAMENTEUSES : VERS UNE APPROCHE MÉCANISTIQUE

Dans les valves cardiaques humaines, nous avons pu mettre en évidence l'expression de trois récepteurs sérotoninergiques (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄) et de SERT.

LA CIBLE MOLÉCULAIRE

Des travaux déjà anciens ont tenté d'identifier la cible moléculaire de composés ayant tous en commun de pouvoir provoquer des atteintes dégénératives valvulaires. C'est ainsi qu'on a pu mettre en évidence que tous ces produits avaient en commun de se lier avec une forte affinité sur les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B}. Des substances se liant sur ces récepteurs peuvent être identifiées dans plusieurs secteurs de la pharmacopée et une petite synthèse est proposée dans le [tableau 1](#). Une molécule de ce type, le pergolide, a récemment été retirée du marché français (mai 2011) en raison de l'induction de valvulopathies. Ces atteintes correspondent à un épaississement des feuillets valvulaires, surtout à leur extrémité distale par dépôt de matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et en collagènes avec la présence de cellules positives pour l'alpha-actine de muscle lisse. Elles partagent donc de nombreuses similitudes sur le plan anatomopathologique avec celles de la valvulopathie carinoïde. Dans un travail récent de notre équipe, nous avons rapporté que des lésions en tous points similaires pouvaient s'observer dans la valve aortique native mais aussi

sur le matériel biologique d'une bioprothèse mitrale, finalement comme dans le cas des atteintes carinoïdes (6).

LE RÉCEPTEUR 5-HT_{2B}

Le récepteur 5-HT_{2B}, probablement en cause dans la survenue des lésions, appartient à la famille des récepteurs à sept hélices transmembranaires couplés à une protéine Gq. Sur le plan cardiovasculaire, sa surexpression est souvent observée en

tion mitochondriale. Le blocage spécifique des récepteurs 5-HT_{2B} chez la souris prévient l'hypertrophie cardiaque en réduisant fortement le stress oxydant (7). De plus, chez les souris KO-5-HT_{2B}^{-/-}, la production de cytokines puissamment fibrosantes et inflammatoires par les fibroblastes induite par une stimulation β-adrénergique chronique (isoprotérénol) est prévenue en dépit d'une réponse chronotrope majeure (8).

AU-DELÀ DE L'ÉTIOLOGIE TUMORALE PRIMITIVE, LA PRISE EN CHARGE DES LÉSIONS CARDIAQUES CONSTITUE UN SÉRIEUX DÉFI.

condition pathologique. A partir des travaux réalisés in vivo chez la souris, on a pu comprendre que le récepteur 5-HT_{2B} est indispensable à la morphogenèse cardiaque normale. A ce titre, les souris invalidées pour les récepteurs 5-HT_{2B} (KO-5-HT_{2B}^{-/-}) présentent une cardiomyopathie dilatée sans hypertrophie compensatrice et, à l'inverse, la surexpression de ce récepteur dans les cardiomyocytes entraîne une hypertrophie ventriculaire gauche associée à une dysfonc-

QUEL MÉCANISME D'ACTION ?

L'hypothèse actuelle est que les agonistes des récepteurs 5-HT_{2B} agiraient en favorisant la prolifération et/ou la différenciation de cellules (résidentes ou progénitrices) portant ces récepteurs, ainsi que l'activation de voies de signalisation impliquant la production de cytokines (TGF-β, IL-1β, IL-6) et de matrice extracellulaire (protéoglycanes et collagènes) ([Fig. 2](#)). La seule contribution de ce sous-type reste encore discutée puisque la plupart des substances agonistes

Tableau 1 - Liste non exhaustive des substances ou de leurs métabolites qui présentent des effets agonistes des récepteurs 5-HT_{2B} et qui exposent à un risque d'induction d'une valvulopathie médicamenteuse.

Groupes de composés		Substances pharmacologiques
Dérivés d'ergot de seigle	Antimigraineux	ergotamine dihydroergotamine méthylergonovine (méthysergide)
	Antiparkinsoniens	pergolide
	Antiprolactine	lisuride, cabergoline, bromocriptine
Dérivés amphétaminiques		norfenfluramine (fenfluramine, benfluorex) MDA (ecstasy)

5-HT_{2B} sont aussi des inhibiteurs de la recapture de 5-HT et/ou de catécholamines. De plus, de nombreux facteurs associés pourraient participer au déclenchement du processus comme les traitements concomitants d'épargne (inhibiteurs de la recapture de la 5-HT), le terrain génétique, l'environnement (agents toxiques), l'existence d'un stress oxydant ou de troubles métaboliques (diabète) (9).

LES PERSPECTIVES

Une interaction de la 5-HT (augmentée pathologiquement) ou des agonistes des récepteurs 5-HT_{2B} avec les valves cardiaques semble favoriser le développement de lésions dégénératives. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui expliquent la survenue de ces lésions permettrait peut-être l'exploitation de cette cible pharmacologique pour le traitement et/ou la prévention des lésions valvulaires carcinoides et pharmaco-induites. De surcroît, la mise au point de modèles précliniques du risque valvulaire médicamenteux sera de nature à améliorer la sécurité de médicaments possédant une liaison significative aux récepteurs sérotoninergiques. En effet, de

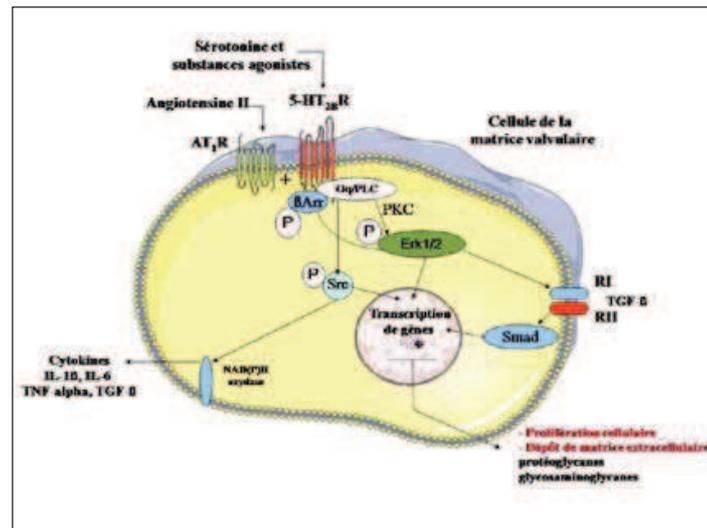


Figure 2 - Hypothèses actuelles concernant les mécanismes cellulaires impliquant la sérotonine dans le remodelage valvulaire cardiaque.

5-HT_{2B}R : récepteur 5-HT_{2B} ; AT1R : récepteur AT1 de l'angiotensine II ; P : phosphorylé ; βArr : β-arrestine ; PLC : phospholipase C ; PKC : protéine kinase C ; RI et RII : récepteur type 1 et 2 du TGF-β, TGF-β : *Tumor growth factor-beta* ; TNF : *Tumor necrosis factor* ; IL : interleukines ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

nombreux psychotropes actuels et en développement (antidépresseurs, antipsychotiques) présentent cette propriété. ■

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les organismes financeurs des travaux de recherche : *Fondation de France, Fondation pour la recherche*

médicale, Agence nationale pour la recherche, Université de Strasbourg. Roland Lawson bénéficie d'une bourse de doctorat du ministère de la Recherche et de l'Espace.

Mots-clés :

Sérotonine, Valvulopathie carcinoides, 5-HT_{2B}

BIBLIOGRAPHIE

- Ghevariya V, Malieckal A, Ghevariya N et al. Carcinoid tumors of the gastrointestinal tract. *South Med J* 2009;102:1032-40.
- Pellikka PA, Tajik AJ, Khandheria BK et al. Carcinoid heart disease. Clinical and echocardiographic spectrum in 74 patients. *Circulation* 1993; 87: 1188-96.
- Lundin L, Norheim I, Landelius J et al. Carcinoid heart disease: relationship of circulating vasoactive substances to ultrasound-detectable cardiac abnormalities. *Circulation* 1988;77:264-9.
- Roberts WC, Varughese CA, Ko JM et al. Carcinoid heart disease without the carcinoid syndrome but with quadrivalvular regurgitation and unsuccessful operative intervention. *Am J Cardiol* 2011; 107:788-92.
- Ferrans VJ, Roberts WC. The carcinoid endocardial plaque; an ultrastructural study. *Hum Pathol* 1976; 7:387-409.
- Ayme-Dietrich E, Lawson R, Gasser B et al. Mitral bioprosthesis hypertrophic scarring and native aortic valve fibrosis during benfluorex therapy. *Fundam Clin Pharmacol* 2012; 26:215-8.
- Monassier L, Laplante MA, Jaffré F et al. Serotonin 5-HT(2B) receptor blockade prevents reactive oxygen species-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertension* 2008; 52:301-7.
- Jaffré F, Callebert J, Sarre A et al. Involvement of the serotonin 5-HT2b receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha cytokine production by ventricular fibroblasts. *Circulation* 2004; 110:969-74.
- Orton EC, Lacerda CM, MacLea HB. Signaling pathways in mitral valve degeneration. *J Vet Cardiol* 2012; 14:7-17.

CHAPITRE II :

**Approches expérimentales
(résultats et discussions)**

CHAPITRE II : Approches expérimentales (résultats - discussions)

Partie 1 : Décryptage des mécanismes impliqués dans la valvulopathie au benfluorex (Mediator®) : approche expérimentale chez la souris

1. Introduction

Le benfluorex (Mediator®) est une molécule de la classe des amphétamines, commercialisée en France (de 1976 à 2009) pour la prise en charge des dyslipidémies et de la surcharge pondérale chez les patients diabétiques de type 2. De nombreuses publications issues de l'étude des cohortes de patients exposés au benfluorex démontrent son implication dans la survenue de valvulopathies mitrales et aortiques. D'un point de vue anatomo-pathologique, les lésions s'apparentent à une fibrose dense, très peu inflammatoire, rarement calcifiée siégeant surtout à la surface de la valve et responsable de son épaissement. On pense que de nombreux décès pourrait être imputables aux complications de ces atteintes valvulaires.

Nous avons exposé dans le chapitre I les divers arguments mettant en cause le système sérotoninergique et notamment les récepteurs 5-HT_{2B} dans la survenue des lésions. Cette partie de nos travaux sera consacrée à une étude réalisée chez la souris dans le but d'analyser la contribution effective du système sérotoninergique et de décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires en jeu.

L'article associée à cette introduction « Mitral bioprosthesis hypertrophic scaring and native aortic valve fibrosis during benfluorex therapy », expose un cas clinique original publié par notre équipe qui fait une nouvelle lumière sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la valvulopathie induite par le benfluorex.

En effet, il s'agit d'une patiente de 40 ans, obèse (IMC 35), hypercholestérolémique, traitée au départ par le benfluorex (1 comprimé de 150 mg/jour). La patiente présentait une dyspnée de repos ayant motivé 4 ans auparavant une consultation en service de cardiologie. L'examen échocardiographique a permis d'objectiver une régurgitation mitrale sans atteinte de la valve aortique. Au regard de l'importance de l'atteinte, la mise la place d'une bioprothèse a été réalisée (St Jude EPIC). Cependant, le traitement au benfluorex a été maintenu. Quatre ans après la mise en place de la bioprothèse, la patiente consulte de nouveau pour les mêmes symptômes et, cette fois-ci, il est mis en évidence une dégénérescence précoce de sa bioprothèse et des lésions sur sa valve aortique native. Les lésions dégénératives de la valve et de la

bioprothèse partagent les mêmes caractéristiques anatomo-pathologiques. Elles sont envahies par des cellules riches en myofibroblastes (positives à l' α -actine de muscle lisse et à la vimentine) (Figure 1 de l'article).

Les lésions de la bioprothèse questionnent sur les types cellulaires qui colonisent la matrice valvulaire et initient son remodelage.

Nous essayerons de répondre à ces questions par le développement et la validation d'un modèle pharmacologique chez la souris qui mime les atteintes lésionnelles induites par le benfluorex. Ce modèle servira à caractériser les lésions et à étudier les différentes interactions entre les cellules valvulaires.

L'endothélium valvulaire joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité valvulaire (implication dans les processus de réparation, l'activation des cellules interstitielles valvulaires). Les valvulopathies médicamenteuses surviennent chez patients à très haut risque cardiovasculaire avec des pathologies chroniques où co-existe une dysfonction endothéliale (hypertension artérielle, diabète).

Nous évaluerons ainsi, l'implication de la 5-HT et de ses récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}, la contribution des cellules endothéliales valvulaires dans la survenue des lésions et notamment de la eNOS.



CASE
REPORT

Mitral bioprosthesis hypertrophic scarring and native aortic valve fibrosis during benfluorex therapy

Estelle Ayme-Dietrich^a, Roland Lawson^a, Bernard Gasser^b, Robert Dallemand^b, Nicolas Bischoff^b, Laurent Monassier^{a*}

^aLaboratoire de Neurobiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg & CHU de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France

^bCentre Hospitalier de Mulhouse, 20 avenue du Docteur René Laennec, 68100 Mulhouse, France

Keywords

adverse drug reaction, benfluorex, bioprosthesis, serotonergic receptors, valvular heart disease

Received 9 August 2011;
revised 22 December 2011;
accepted 9 January 2012

*Correspondence and reprints:
laurent.monassier@unistra.fr

ABSTRACT

The authors describe the case of a simultaneous mitral bioprosthesis hypertrophic scarring and native aortic valve fibrosis during benfluorex therapy in a 40-year-old woman. Four years before, she underwent a mitral valve replacement after the diagnosis of mitral regurgitation during benfluorex treatment (150 mg/day). This drug was reintroduced postoperatively. She presented with exercise and sometimes resting dyspnoea. The bioprosthesis and aortic valves exhibited similar histopathological lesions. Thickening and plaque deposits made by smooth muscle alpha actin- and vimentin-positive cells in a glycosaminoglycan matrix were observed. The study discusses the putative contribution of circulating progenitor cells activated by 5-HT_{2B} receptor agonists in the development of drug-induced heart disease.

Benfluorex Mediator[®] was marketed in patients with hypertriglyceridemia or diabetes with overweight. Owing to its close structural relationship with amphetamines, it was classified and widely used as an appetite suppressant. Moreover, it was considered as a doping molecule added to the list of the World Anti-Doping Agency in 2010 [1]. The association between the use of ergot alkaloids such as methysergide and ergotamine and the development of valvular heart disease is not new. The so-called drug-induced fibrotic valvular disease appears as an adverse drug reaction of many compounds such as pergolide, cabergoline, fenfluramine and the recreational drug ecstasy (3, 4-methylenedioxyamphetamine; MDMA) [2]. All these drugs share in common the pharmacological property to activate a serotonergic receptor subtype, the 5-HT_{2B} [3]. This activation would drive to lesions that are quite similar to those observed in the carcinoid heart, a cardiac valvular disease caused by serotonin-secreting tumours. One of the benfluorex liver metabolites is norfenfluramine [1], a high affinity 5-HT_{2B} receptor

agonist [3]. The current dogma is that agonists of the 5-HT_{2B} receptor would stimulate locally resident valvular interstitial cells leading to proliferation and extracellular cell matrix deposit. But, surprisingly, chronic exposure of mitral valve organ cultures to serotonin and norfenfluramine induce no or only minor plaque deposits and extracellular cell matrix activation [4].

We present the case of a 40-year-old woman in whom a simultaneous mitral bioprosthesis hypertrophic scarring and native aortic valve fibrosis were observed during benfluorex therapy. In 2007, the patient presented with exercise dyspnoea and asthenia. In her medical history, it is noted a supraventricular arrhythmia (atrial tachycardia and supraventricular extrasystoles). She underwent an unsuccessful ablation in 1996. This arrhythmia was assumed as the cause of a left ventricular dilatation and the reduction in the ejection fraction around 50–55%. Asthma and allergy were also noticed. Concerning her cardiovascular risk factors, she was obese (BMI = 35; 1.61 m; 91 kg) with an untreated

hypercholesterolemia (cholesterol: 2.43 g/L, HDL: 0.57 g/L, LDL: 1.67 g/L, triglyceride: 0.93 g/L), and tobacco smoke was stopped in 1993. The glycaemia was normal with a 5.3% HbA1c. At that time, her treatment was carried out by giving atenolol (100 mg/day), inhaled fenoterol plus ipratropium bromide and topiramate (100 mg/day). She started a treatment with benfluorex (150 mg/day) 15 months before (November 2005). She never used any other appetite suppressant such as fenfluramine or phentermine or any ergot derivative. Transthoracic echocardiography identified a slight thickening of three aortic cusps with an opening diameter of 14.5 mm. A small grade II regurgitation was observed with a 466–471 ms pressure half-time and a 15 cm/s end-diastolic aortic regurgitation velocity. The pressure gradient was normal. Concerning the mitral valve, a grade III/IV regurgitation was observed with a diastolic and systolic restrictive motion of the small valve. The regurgitant surface was evaluated at 29 mm² and the regurgitant volume around 45 mL. At a morphological point of view, the leaflets appeared slightly remodelled with the small valve showing a systolic restrictive tenting. The subvalvular apparatus showed increased thickness and tendinous cords appeared moderately shortened (17–17.5 mm). Transoesophageal echocardiography of the mitral valve identified two regurgitant jets because of retraction of the whole posterior leaflet (P1, P2, P3) and the retraction of the A1/A2 segments of the anterior leaflet. Subvalvular apparatus was thickened and retracted (12–15 mm). The three aortic cusps were moderately thickened with a moderate grade II regurgitation. Signs of diseases known to affect valves (rheumatic, infectious endocarditis, carcinoid heart, lupus erythematosus, congenital defect ...) were not identified in her medical history. The patient underwent a mitral valve replacement by St Jude EPIC bioprosthesis. The postoperative follow-up was simple. Early control echocardiography (day 7) showed a reduction in the end-diastolic left ventricular diameter (56–50 mm), a usual postoperative reduction in the ejection fraction (45%) and a normal function of the bioprosthesis. Anatomopathological examination confirmed thickened leaflets and retraction, and remodelling of the subvalvular apparatus. The relevant postoperative medications were rosuvastatine (5 mg/day), amiodarone (400 mg/day), aspirin (160 mg/day) and omeprazole (20 mg/day). Less than 2 months after surgery, benfluorex (300 mg/day followed by 150 mg/day) was reintroduced. She will be treated with benfluorex the same dose from March 2007 to November 2009.

In November 2009, at the time of benfluorex withdrawal from the French market, she stopped this treatment and that was replaced by pravastatine (20 mg/day). On the top of pravastatine, she was treated by diltiazem (200 mg/day), furosemide (40 mg/day), levothyroxine (50 µg/day), inhaled fenoterol plus ipratropium bromide and topiramate (100 mg/day). In February 2010, she presented once more exercise and sometimes resting breathlessness. Echocardiography identified a slight leaflets thickening of the mitral bioprosthesis, a stenosis with a 13 mmHg mean pressure gradient and no regurgitation. The aortic valve was dystrophic and showed a grade III/IV regurgitation with a 300–310 ms pressure half-time. No left ventricular dilatation (left-ventricular end-diastolic diameter: 52 mm) and alteration of contractility (ejection fraction: 52%) were observed. The systolic pulmonary pressure was estimated on the basis of a grade I tricuspid regurgitation at 37 mmHg. She proceeded to have mitral and aortic mechanic valve replacements in March 2011. The explanted bioprosthesis showed no alteration of the three cusps but a parastent hyperplastic tear pannus stenosis (*Figure 1a,b*) made by smooth muscle alpha actin (SMA)- (*Figure 1c*, brown staining) and vimentin-positive cells, in a glycosaminoglycan (GAG)-abundant matrix (*Figure 1d*, blue staining). The three aortic cusps exhibited a similar pannus with massive thickening of the Arantius nodule area (*Figure 1e*) made by SMA-positive cells (*Figure 1f* upper) in an intense GAG deposit (*Figure 1f* lower).

The total cumulative doses of benfluorex for the aortic, mitral and bioprosthetic valves were respectively 201.6 g during 48 months, 63 g during 15 months and 138.6 g during 33 months. *In vivo*, benfluorex is rapidly metabolized in the liver to various compounds hydroxyethylnorfenfluramine, carboxymethylnorfenfluramine, norfenfluramine, benzoic acid and finally the glucuronide of hydroxyethylnorfenfluramine [1,5].

This is the first reported case of rapid (4 years) bioprosthesis alteration observed during benfluorex therapy. The demonstration of the link between valvular heart disease and the use of a drug is always difficult to do. Nevertheless, the combination of a clinical history, a treatment with a compound suspected to induce valvular heart disease [6,7] and a close similarity with histopathological lesions observed in the carcinoid heart reinforce the hypothesis of drug imputability. In this rare carcinoid heart, valve lesions are made of superficial plaque-like thickening of leaflets and subvalvular apparatus [8]. The hypothesis is that 5-HT activates 5-HT_{2B} receptors of the

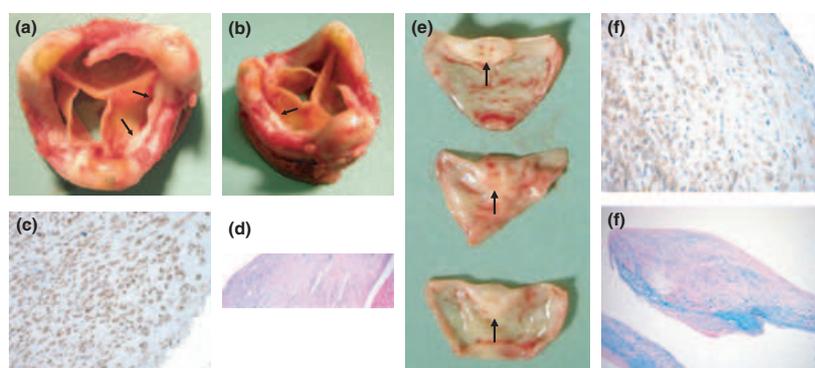


Figure 1 Histopathological examination of the explanted mitral bioprosthesis and the native aortic sigmoid valves. (a, b) No alteration of the three cusps but a parastent hyperplastic tear pannus stenosis was observed on the bioprosthesis (black arrows). (c) Pannus on the prosthesis is made by smooth muscle alpha actin (SMA) (brown staining) and vimentin-positive cells, in a (d) glycosaminoglycan (GAG)-abundant matrix (blue staining). (e) The three aortic cusps exhibit a massive thickening of the Arantius nodule area made by SMA-positive cells (f upper) in an intense GAG deposit (f lower).

valve interstitial cells promoting their proliferation and the deposit of a dense glycosaminoglycan (GAG) and collagen matrix. Importantly, calcified lesions are usually not observed. In drug-induced valvulopathy, lesions are nearly similar but with a greater proportion of GAG and few vessels. Valve tissues express mainly 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT₄ receptors [9]. The poor receptor selectivity of serotonin could explain some differences with drug-induced valve lesions. Echocardiography is the key examination to diagnose a toxic valvulopathy. In young healthy subjects (<50 years old) with no cardiovascular risk factor and without any cause of restrictive valve heart disease (ischaemic mitral regurgitation, rheumatic heart, carcinoid syndrome, cardiac mass, infectious endocarditis or any congenital abnormality), the diagnosis can easily be suggested in front of a thickening of mitral leaflets with thickening and shortening of the subvalvular apparatus leading to retraction and reduced mobility of the leaflets. Importantly, commissural fusion is typical of degenerative valve disease and usually not observed in drug-induced valvulopathy [10]. Concerning the aortic valve, leaflets exhibit a reduced mobility with thickening and incomplete diastolic coaptation. In young subjects or in people without any pre-existing degenerative valve lesion and taking fenfluramine/phentermine, US FDA suggested to evoke the diagnosis of induced valvulopathy in front of a mild-to-moderate aortic and/or mitral regurgitation (quantified by colour Doppler) [11]. In pergolide-induced valve heart disease, this ergot-derived dopamine receptor

agonist that also stimulates 5-HT_{2B} receptors, a scoring from 1/4 to 4/4 was proposed to classify restrictive valvular disease in patients with pre-existing valve lesions: 1, proven restrictive valvular heart disease (pathology, regression after interruption of pergolide treatment, or both); 2, important valvular disease (regurgitant jet $\geq 2/4$) suggestive for restrictive valvular heart disease or restrictive tricuspid even if less than 2/4; 3, mild-to-moderate (regurgitant jet < 2/4) restrictive valvular disease; and 4, no restrictive valvular dysfunction [12].

In the present reported case, numerous factors (clinical history, echocardiography and anatomopathology) argue in favour of the involvement of benfluorex in cardiac valve lesions. In 2007, the patient was treated with this compound for 15 months. The echocardiographic description is typical of a restrictive mitral valvulopathy with increased leaflets thickness and subvalvular apparatus retraction and severe regurgitation. This pattern would be classified as 2 in the previous pergolide scale [12]. The aortic valve was moderately affected but lesions were also typical (retraction of the three cusps without fusion and no calcification) and a moderate regurgitant jet that would be given 3 in the same scale. At the time of first surgery, we have no idea about the possible regression of these aortic lesions because benfluorex was in fact only stopped during the surgical period. Four years later, aortic valve lesions have quickly progressed in a timeline that is similar to fenfluramine-induced valve disease. The aortic valve

shows an important regurgitant jet and histopathology identified 'stuck-on' plaques at the tip of the leaflets with a content showing close similarities with carcinoid and fenfluramine deposits (GAG rich and numerous myofibroblasts) [13]. Importantly, at the opposite of age-dependant degenerative lesions, aortic leaflet alterations were only located on the free margin of the cusps and were quite similar to the bioprosthesis deposit. Moreover, no fusion between cusps was observed. A score of 1, highly suggestive of a drug-induced valvulopathy, would then be given at that time. Interestingly, no tricuspid insufficiency was noticed in 2007 but a grade I regurgitation was used 4 years later to evaluate pulmonary pressures. One can wonder if this evolution could not point out the start of a tricuspid restrictive disease sharing the same mechanism than for the two other valves.

The rapid remodelling of a cardiac bioprosthesis during benfluorex treatment has never been described and asks numerous questions. A cardiac valve bioprosthesis is usually considered as an inert biological material. The glutaraldehyde and photo-oxidation treatments of the biomaterial drive to leaflets typically devoid of intact cells. These treatments are a prerequisite to prevent host-graft early rejection of, in the present case, a porcine mitral valve. Therefore, degeneration and calcifications that limit the long-term bioprosthesis outcome is considered to be the only consequence of a passive calcium deposit from circulating blood. In fact, the implantation of such a biomaterial initiates an inflammatory reaction of the non-specific immune system commonly known as the foreign body reaction [14]. After implantation, the biomaterial matrix is invaded by Sca-1⁺, CD34⁺, c-kit⁺ and CD271⁺ stem/progenitor cells that differentiate into adipo-, osteo- and myofibroblasts. Such a migration could also contribute to the cellular repopulation of native valves from hematopoietic stem cells [15]. Depending on physiological and pathological circumstances, these cells could proliferate and differentiate in the various cell populations usually summarized as the 'valvular interstitial cells'.

The present clinical case underlines the fact that serotonergic agonists could favour migration and/or differentiation of progenitor cells in a biomaterial matrix. Moreover, the close similarity between lesions observed in the mitral bioprosthesis and the native aortic valves could suggest the involvement of similar molecular mechanisms. Finally, this case emphasizes that benfluorex and its metabolites could not only favour native cardiac valve disease but could also promote the remodelling of cardiac valve bioprostheses.

REFERENCES

- Thevis M., Sigmund G., Gougoulidis V. et al. Screening for benfluorex and its major urinary metabolites in routine doping controls. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010) **401** 543–551.
- Bhattacharyya S., Schapira A.H., Mikhailidis D.P., Davar J. Drug-induced fibrotic valvular heart disease. *Lancet* (2009) **374** 577–585.
- Setola V., Hufeisen S.J., Grande-Allen J. et al. 3, 4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* (2003) **63** 1223–1229.
- Barzilla J.E., Acevedo F.E., Grande-Allen J. Organ culture as a tool to identify early mechanisms of serotonergic valve disease. *J. Heart Valve Dis.* (2010) **19** 626–635.
- Orsière T., Chauvet M., Dell'Amico M. et al. In vitro influence of benfluorex and its main metabolites on rat liver microsomal membranes properties. *Chem. Biol. Interact.* (1995) **97** 297–306.
- Boutet K., Frachon I., Jobic Y. et al. Fenfluramine-like cardiovascular side-effects of benfluorex. *Eur. Respir. J.* (2009) **33** 684–688.
- Etienne Y., Jobic Y., Frachon I. et al. Mitral and aortic valvular disease associated with benfluorex use. *J. Heart Valve Dis.* (2011) **20** 348–350.
- Bhattacharyya S., Davar J., Dreyfus G., Caplin M.E. Carcinoid heart disease. *Circulation* (2007) **116** 2860–2865.
- Elangbam C.S., Lightfoot R.M., Yoon L.W. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors in the heart valves of cynomolgus monkeys and Sprague-Dawley rats. *J. Histochem. Cytochem.* (2005) **53** 671–677.
- Droogmans S., Kerckhove D., Cosyns B., Van Camp G. Role of echocardiography in toxic heart valvulopathy. *Eur. J. Echocardiogr.* (2009) **10** 467–476.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cardiac valvulopathy associated with exposure to fenfluramine or dexfenfluramine: U.S. Department of health and human services interim public health recommendations, November 1997. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* (1997) **46** 1061–1066.
- Van Camp G., Flamez A., Cosyns B. et al. Treatment of Parkinson's disease with pergolide and relation to restrictive valvular heart disease. *Lancet* (2004) **363** 1179–1183.
- Connolly H.M., Crary J.L., Mc Goon M.D. et al. Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N. Engl. J. Med.* (1997) **337** 581–588.
- Vranken I., De Visscher G., Lebacqz A., Verbeken E., Flameng W. The recruitment of primitive Lin⁻ Sca-1⁺, CD34⁺, c-kit⁺ and CD271⁺ cells during the early intraperitoneal foreign body reaction. *Biomaterials* (2008) **29** 797–808.
- Visconti R.P., Ebihara Y., LaRue A.C. et al. An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential. Hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells. *Circ. Res.* (2006) **98** 690–696.

2. Études expérimentales chez la souris

2.1. Modèle expérimental

L'ensemble des expériences réalisées dans ce chapitre a fait l'objet d'une validation et d'une autorisation auprès du Comité Régional en Matière d'expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) sous le numéro de saisine AL/81/88/02/13. Ces expériences respectent également les directives en matière d'expérimentation animale du Conseil de l'Union Européenne.

Le modèle expérimental, est un modèle pathologique d'induction de lésions valvulaires chez la souris par l'administration de nordexfenfluramine (NdF) sur une période de 28 jours. Les souris sont suivies sur les plans physique, hémodynamique et échocardiographique. Plusieurs traitements pharmacologiques ciblant le système sérotoninergique ont été également testés pour évaluer notre hypothèse. Au terme du protocole, des échantillons urinaires et sanguins sont recueillis et le cœur prélevé pour une analyse histologique quantitative des valves cardiaques (Figure 20).

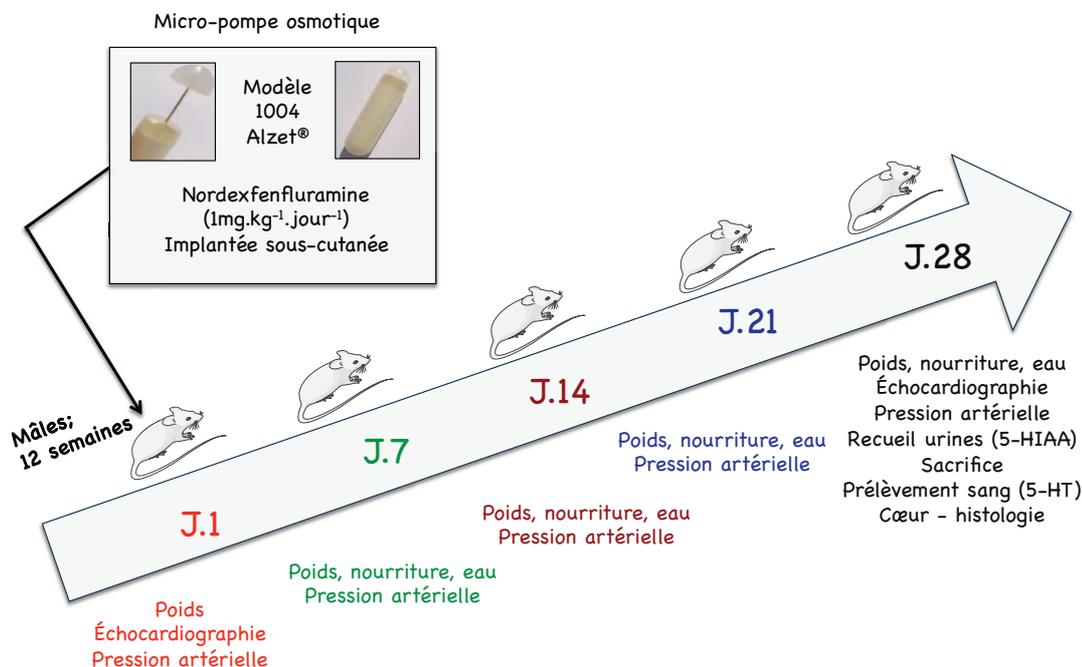


Figure 20. Schéma du protocole expérimental

(J = jour)

2.1.1. Les souris

Les différentes expériences ont été réalisées en utilisant des **souris mâles** âgées de **12 semaines** au moment de l'inclusion dans le protocole. Ces souris ont été hébergées à l'animalerie de la Faculté de Médecine de Strasbourg dans des armoires ventilées pour lesquelles les conditions de température, d'humidité, d'éclairage (cycle jour-nuit) et sonores sont régulées. Le tableau 3 présente les caractéristiques de ces souris.

Tableau 3. Aspects physiques, caractéristiques génétiques et provenances des souris

Aspect physique des souris	Fond génétique	Génotype	Provenance
	129S2/SvPas	sauvages	Charles River® et élevage interne
	129S2/SvPas	Transgéniques 5-HT _{2A} ^{-/-}	Institut du Fer à moulin (Paris) et élevage interne
	129S2/SvPas	Transgéniques 5-HT _{2B} ^{-/-}	Institut du Fer à moulin (Paris) et élevage interne
	129S2/SvPas	Transgéniques 5-HT _{2A/2B} ^{-/-}	Institut du Fer à moulin (Paris) et élevage interne
	C57BL/6	Transgéniques eNOS ^{-/-}	Université et Francfort et élevage interne

2.1.2. Traitements pharmacologiques

Les expériences portent sur quinze groupes expérimentaux de souris recevant différents traitements pharmacologiques. Les tableaux 4, 5 et 6 présentent l'ensemble des groupes pharmacologiques, les traitements reçus, les solvants de dilution, les doses et les voies d'administration.

Tableau 4. Groupes expérimentaux constitués par les souris “sauvages”

Souris sauvages	
Traitements	7 groupes (10 souris/groupe)
Sans traitement	+
NdF	+ + + + +
Ritansérine	+
SB206553	+
L-NAME	+
pCPA	+
BW723C86	+

7 groupes ; (+) traitement reçu ; NdF = Nordexfenfluramine, agoniste des récepteurs 5-HT_{2B} ; Ritansérine = antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} ; SB206553 = antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} ; L-NAME = L-NG-Nitroarginine Methyl Ester, inhibiteur des NO synthases ; pCPA = parachlorophenylalanine, inhibiteur de la TPH ; BW723C86 = agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}

Tableau 5. Groupes expérimentaux constitués par les souris transgéniques

Souris transgéniques	
génotypes	8 groupes (10 souris/groupe)
	Nordexfenfluramine
5-HT _{2A} ^{-/-}	- +
5-HT _{2B} ^{-/-}	- +
5-HT _{2A/2B} ^{-/-}	- +
eNOS ^{-/-}	- +

8 groupes ; (+) génotypes traités avec la norfexfenfluramine ; (-) génotypes non traités avec la nordexfenfluramine (solvant uniquement ; eau ultrapure)

Tableau 6. Traitements pharmacologiques, doses et méthodes d'administration

Substances pharmacologiques	Solvants de dilution ou modes de préparation	Doses administrées (mg.kg ⁻¹ .jour ⁻¹)	Voies ou méthodes d'administration
Nordexfenfluramine	Eau ultrapure	1	Sous-cutanée (micro-pompe osmotique; Alzet® 1004)
Ritansérine	Méthanol	2	Voie orale (incorporation dans les croquettes et évaporation du solvant)
SB206553	Eau ultrapure	1	Sous-cutanée (micro-pompe osmotique; Alzet® 1004)
L-NAME	Eau de boisson	300	Voie orale (eau de boisson)
pCPA	Mélange à la poudre de nourriture	100	Voie orale (poudre de nourriture)
BW723C86	Eau ultrapure	3	Injection quotidienne intrapéritonéale

2.1.2.1. Implantation des micro-pompes osmotiques

2.1.2.1.1. Description et principe de fonctionnement des micro-pompes osmotiques

Les micro-pompes osmotiques sont des dispositifs permettant de mieux contrôler l'administration des substances pharmacologiques. Dans nos expériences nous avons utilisé le modèle 1004 Alzet®. Ces micro-pompes (longueur 1,5 cm, diamètre 0,6 cm, poids 0,4 g) comportent un corps de pompe cylindrique recouvert d'un modérateur de débit (Figure 21). Le corps de pompe est composé de l'intérieur vers l'extérieur, d'un réservoir (volume 100µl) flexible entouré d'une membrane imperméable en élastomères thermoplastiques, d'une couche saline à fort pouvoir osmotique et d'une membrane externe (mélange d'esters de cellulose) semi-perméable qui laisse passer l'eau (volume total mobilisable de 500 µl) du milieu extérieur en provoquant l'augmentation du volume de la couche osmotique. Le modérateur de débit est

composé d'une capsule qui coiffe le corps de pompe et munie d'une tubulure rigide (longueur 1,3 cm, calibre 21G) en acier inoxydable faisant remonter la substance à perfuser.

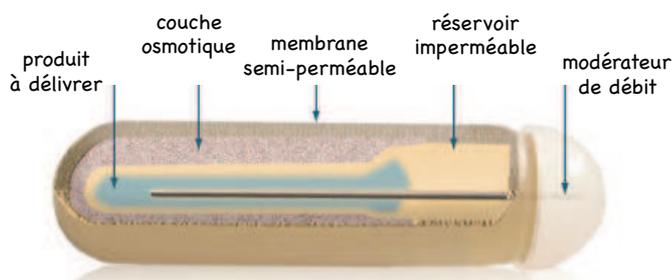


Figure 21. Schéma d'une micro-pompe osmotique (Alzet®)

2.1.2.1.2. Chirurgie d'implantation

Les micro-pompes remplies avec la solution à administrer sont implantées sous anesthésie gazeuse (isoflurane 1%) sur une courte durée (10 minutes environ). La souris placée en position ventrale sur un tapis chauffant (thermostaté à 37°C) est dépilée au niveau du cadran lombaire infra-costal dorso-latéral. La zone dépilée est nettoyée avec de la Bétadine® dermique. Une incision longitudinale d'environ 1 cm est réalisée sur la peau parallèlement à la colonne vertébrale. À l'aide d'une sonde cannelée, on creuse une poche sous la peau pour y faire glisser la micro-pompe. L'orifice du modérateur de débit est orienté en direction caudale. L'incision est refermée par une suture de type Donati à l'aide d'un fil non résorbable. Cette intervention est peu invasive et peu douloureuse et ne nécessite pas d'analgésie systématique. Une analgésie locale est éventuellement mise en place par l'emploi de lidocaïne crème (EMLA 5%).

2.1.2.2. Méthode d'incorporation de la ritansérine aux croquettes

Les caractéristiques physico-chimiques de la ritansérine limitent son administration au moyen d'une micro-pompe osmotique. En effet, elle est très peu soluble dans l'eau mais par contre soluble dans le méthanol (> 10 mg/ml). De ce fait nous avons développé et validé sur une cohorte de souris de même âge (12 semaines) que celles incluses dans nos expériences, une méthode originale d'administration en l'incorporant dans les croquettes (nourriture) (voir suppléments du manuscrit ; partie 3. résultats).

La ritansérine (administrée à 2mg/kg/jour) est dissoute dans du méthanol à une concentration prenant en compte la prise alimentaire des souris et garantissant l'injection au cœur de chaque croquette à l'aide d'une micropipette d'un volume d'environ 60 à 100µl. Les croquettes sont ensuite laissées à température ambiante sous une hôte pendant 24h environ pour faire évaporer le méthanol et ne laisser que la ritansérine enchâssée au cœur des croquettes.

2.1.3. Suivi expérimental

Les souris sont suivies pendant 28 jours et il est évalué régulièrement certains paramètres physiques, hémodynamiques et échocardiographiques. Au terme de l'expérience, des échantillons de sang et d'urine sont obtenus pour effectuer respectivement, le dosage de la 5-HT sanguine et du 5-HIAA urinaire.

2.1.3.1. Paramètres physiques

Poids corporel

Les souris sont pesées après implantation de la micro-pompe osmotique au début de l'expérience (J1) puis hebdomadairement jusqu'à la fin du protocole (J7, J14, J21, J28). Nous considérons comme négligeables le poids total de la micro-pompe osmotique et le volume d'eau déplacé qui est d'environ 1 g (0,4 g poids micro-pompe et volume total déplacé 500 µl) compte tenu de la précision de notre balance (ce biais étant reporté sur toutes les mesures).

Alimentation

La prise alimentaire et la consommation d'eau sont aussi évaluées tout au long du protocole. De façon pratique, les souris sont hébergées par lot de 5 dans chaque cage et leur consommation moyenne de nourriture et d'eau est calculée hebdomadairement (à partir de J1) afin de réajuster les doses des substances administrées par voie orale.

2.1.3.2. Paramètres hémodynamiques

Appareil et principe

La pression artérielle systolique et la fréquence cardiaque sont évaluées hebdomadairement tout au long de l'expérience (J1, J7, J14, J21, J28) par une méthode non invasive chez la souris vigile en utilisant l'appareil Visitech BP-2000 Series II Blood Pressure Analysis SystemTM (Figure 22).

Cet appareil effectue une mesure photopléthysmographique par l'éclairage de la queue de l'animal avec une diode électroluminescente (rouge) émettant un rayonnement dont les variations à travers la queue reflètent les pulsations du flux sanguin au niveau de l'artère caudale (fréquence cardiaque). Il permet également la mesure de la pression artérielle systolique par gonflement d'un manchon en latex posé autour de la queue de l'animal (tail-cuff method).

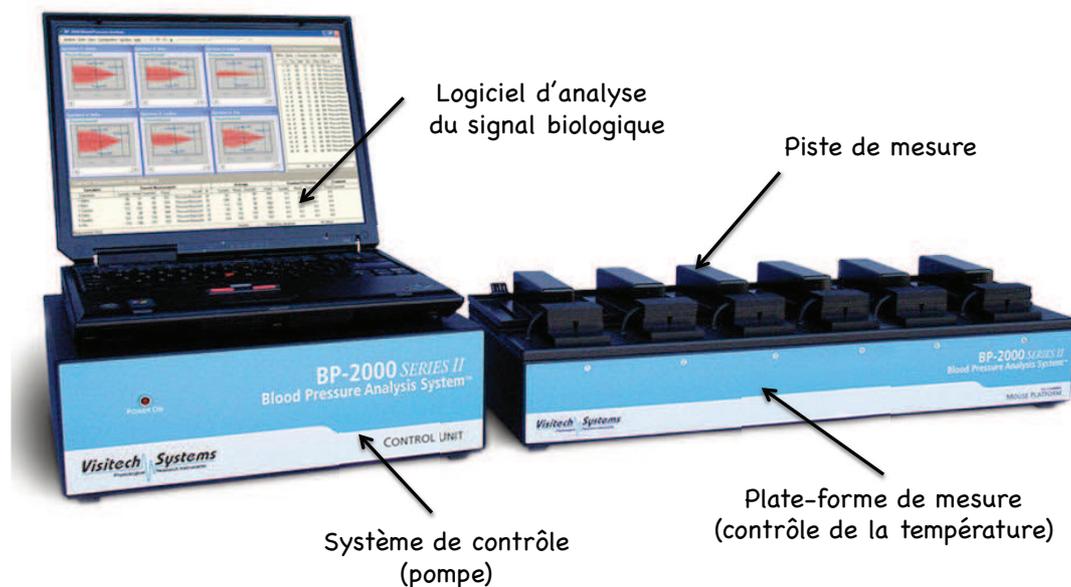


Figure 22. Système de mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque
(BP-2000 SERIES II Blood Pressure Analysis SystemTM, VISITECH, USA)

Protocole

Pour effectuer une mesure, les souris sont maintenues en place sur une piste de mesure de la plate-forme dans une boîte de contention puis l'extrémité de leur queue est fixée à l'aide d'un ruban adhésif. La queue de la souris posée dans la boîte de contention passe par le manchon gonflable et le système de détection du flux par photopléthysmographie.

Une semaine avant le début du protocole, les souris sont habituées à cette manipulation. Une série de mesures non comptabilisées est effectuée pour minimiser les divers biais inhérents au stress généré par le processus de mesure.

Chaque souris est analysée hebdomadairement et la valeur de la pression artérielle et de fréquence cardiaque retenue correspond à une série minimale de 10 mesures préliminaires non comptabilisées, suivies de 20 mesures effectives dont au moins 10 doivent être cohérentes avec une déviation standard inférieure à 10 mmHg.

2.1.3.3. Paramètres échocardiographiques

Principe

Les souris font l'objet d'un examen échocardiographique en début (J1) et fin de protocole (J28). L'analyse échocardiographique permet d'apprécier les paramètres morphométriques et hémodynamiques du cœur (fonction systolique et diastolique). Elle est réalisée chez la souris en condition anesthésiée (isoflurane 1 à 1,5 %) pour abaisser sa fréquence cardiaque autour de 300 à 350 battements par minute (bpm) alors qu'elle peut atteindre 600 à 650 bpm en condition de base.

Protocole

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un échographe Sonos 5500 (Philips Healthcare) et d'une sonde ultrasonore à haute fréquence (15MHz).

- **Préparation de l'animal** : la souris est anesthésiée, dépilée au niveau de la cage thoracique et posée en position dorsale sur un tapis chauffant thermostaté à 37°C.

- **Mesure** : la sonde posée en position parasternale petit-axe ou grand-axe permet de réaliser des images en modes 2D, M et Doppler (Figures 23, 24 et 25).

- **Images** permettent d'évaluer en mode 2D et mode M : le diamètre télé-systolique (DTS), le diamètre télé-diastolique (DTD), l'épaisseur du septum (S), l'épaisseur de la paroi postérieure (PP) et le diamètre de l'aorte (D) ; puis en mode Doppler pour mesurer le flux aortique : l'intégrale temps-vitesse (ITV), la fréquence cardiaque sous échocardiographie (FC) et la vitesse maximale (Vmax).

- Calculs :

- Fraction de raccourcissement, FR (%) = $[(DTD-DTS)/DTD] \times 100$
- Fraction d'éjection, FE (%) = $[(DTD)^2 - (DTS)^2] / (DTD)^2 \times 100$
- Masse du ventricule gauche, MVG (mg) = $1,06 \times [(DTD+PP+S)^3 - (DTS)^3]$
- Volume d'éjection systolique (VES) et débit cardiaque (DC),
VES (ml/battement) = $ITV \times (D/2)^2 \times \pi$; DC (ml/min) = VES \times FC

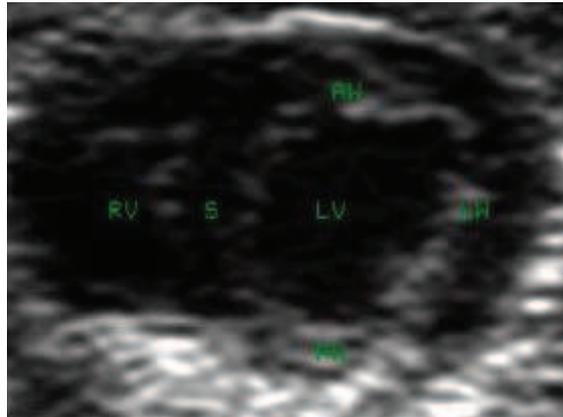


Figure 23. Image en coupe para-sternale petit-axe en mode 2D des ventricules gauche et droit

AW : anterior wall (paroi antérieure), LV : left ventricle (ventricule gauche),
 LW : lateral wall (paroi latérale), PW : posterior wall (paroi postérieure) RV :
 right ventricle (ventricule droit), S : septum

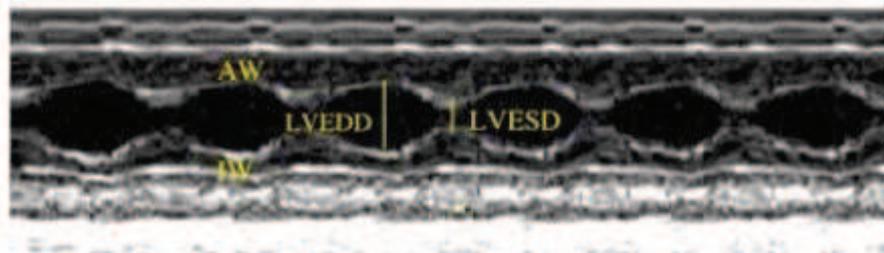


Figure 24. Image en coupe para-sternale petit-axe en mode M du ventricule gauche

AW : anterior wall (paroi antérieure), LW : lateral wall (paroi latérale), LVEDD : left
 ventricle end diastolic diameter (diamètre télédiastolique), LVESD : left ventricle end systolic
 diameter (DTS)

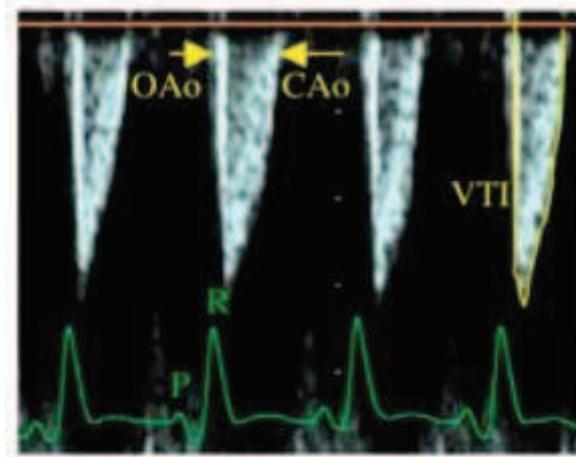


Figure 25. Image écho-doppler du flux aortique
 VTI : Velocity Time Integral (intégrale temps-vitesse)

2.1.3.4. Recueil des échantillons biologiques

2.1.3.4.1. Méthode de recueil des échantillons d'urine

Les échantillons d'urine sont obtenus au terme du protocole avant le sacrifice (J28). Les souris séjournent pendant 4 heures dans une enceinte garnie à sa base d'une plaque 96 puits. Des tests préalables ont été réalisés pour garantir que le séjour dans l'enceinte ne provoque aucune douleur, ni stress, ni changement de comportement. L'échantillon est acidifié avec une goutte d'acide chlorydrique 5N et conservé à -20°C.



Figure 26. Dispositif de collecte des urines

2.1.3.4.2. Mode d'anesthésie et de recueil des échantillons de sang

Au terme du protocole, les souris reçoivent une dose anesthésique de pentobarbital (40-70 mg/kg par voie intra-péritonéale) réajustée en fonction de la profondeur de l'anesthésie induite et de la sensibilité des souris.

Le prélèvement de sang est réalisé par ponction intracardiaque à hauteur de la ligne axillaire inférieure latéralement au rebord sternal gauche. La seringue de ponction est héparinée au préalable (Héparine Choay 25000UI/5ml, Sanofi-Aventis). Le sang recueilli (0,5 à 1ml) est homogénéisé dans un tube à héparine et transféré dans un tube contenant de la vitamine C (antioxydant) et conservé à -20°C.

2.1.3.4.3. Méthode de prélèvement du cœur

Après la ponction intracardiaque de sang, les souris reçoivent une dose complémentaire létale d'anesthésique (environ 200 mg/kg). Une incision est pratiquée sur la cage thoracique puis le sternum est dégagé de ses adhérences costales pour mettre en évidence le cœur et prélever le bloc cœur-poumon. Le cœur est ensuite rincé à l'eau physiologique (NaCl 0,9%), débarrassé du tissu pulmonaire et pesé. Il est ensuite conservé dans du formol 10% pour la réalisation des coupes histologiques.

2.2. Dosages biochimiques de la sérotonine sanguine et de l'acide 5-hydroxy-indole acétique urinaire

Les échantillons de sang et d'urine conservés à -20°C sont acheminés sur glace au Plateau Technique de Biologie (PTB) du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg, pour dosage respectivement de la sérotonine sanguine et de son métabolite urinaire l'acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA) en HPLC.

2.3. Analyse histologique des valves cardiaques

Le cœur conservé dans le formol (10%) est acheminé au Service de Pathologie du Centre Hospitalier Général Emile Muller de Mulhouse. Il est inclus dans un délai de 24 à 48h dans des blocs de paraffine.

Protocole d'inclusion en paraffine

L'inclusion des échantillons en paraffine est réalisée de façon semi-automatique à l'aide d'un automate Tissue-Tek[®] VIP[®] Sakura. L'échantillon séjourne dans différents bains de formol puis est déshydraté dans des bains de concentration croissante d'éthanol. L'éthanol est ensuite remplacé par du toluène et ce dernier ensuite par la paraffine.

L'échantillon ainsi traité est ensuite posé dans un moule dans lequel on coule de la paraffine. Cette étape est réalisée à l'aide de l'appareil TES 99 (Tissue Embedding System) MEDITE et permet d'obtenir des blocs rigides de paraffine qui se prêtent facilement à la coupe à l'aide du microtome.

Coupes sériées et coloration

Les coupes sont réalisées avec un microtome automatique (HM 355s Microm). Le bloc subit dans un premier temps un dégrossissage (par une série de coupes de 400 µm) pour atteindre la zone d'intérêt. De fins rubans de 4 µm de diamètre sont ensuite réalisés autour de cette zone puis étalés sur une lame. Les coupes sont ensuite colorées (éosine-hématoxyline) à l'aide d'un automate (Tissue-Tek[®] Prisma[®] Sakura) puis recouverte d'une lamelle à l'aide d'un automate (Leica CV5030 Coverslipper).

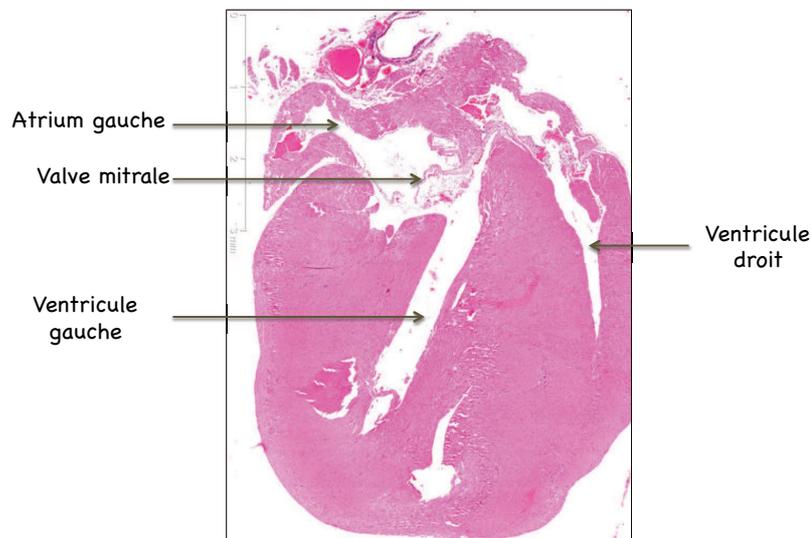


Figure 27. Coupe histologique du cœur avec mise en évidence de la valve mitrale
Coupe sériée (4 µm d'épaisseur) présentant les 4 cavités du cœur (atriums et ventricules)
et la valve mitrale

Immunohistochimie

Les différents marquages immunohistochimiques sont réalisés à l'aide du système BenchMark XT (VENTANA). Les divers anticorps primaires sont utilisés à la dilution de 1/100 et les anticorps secondaires à la dilution 1/200. Nous avons ainsi recherché l'expression de l'antigène CD31 (PECAM-1), une glycoprotéine transmembranaire d'adhésion cellule-cellule, spécifique des cellules endothéliales (anticorps monoclonal de lapin, clone SP38, reconnaissant l'antigène de souris ; référence M3380, Spring BioscienceTM), l'antigène CD34, une glycoprotéine transmembranaire d'adhésion exprimée par les cellules progénitrices d'origine médullaire (anticorps monoclonal de lapin, clone EP373Y, reconnaissant les cellules progénitrices de souris ; référence GTX61737, GenetexTM) et l'antigène Ki-67, un marqueur cellulaire de prolifération, exprimé par les cellules engagées en mitose (anticorps polyclonal de lapin, reconnaissant l'antiègè Ki-67 de souris). L'anticorps secondaire biotinylé est une immunoglobuline de singe reconnaissant les antigènes de lapin (Biotin-SP-AffiniPure Donkey anti-rabbit Ig G ; référence 711-065-152, Jackson Immuno Research).

Analyse micro-morphométrique des valves

L'analyse micro-morphométrique de la valve mitrale est réalisée sur trois sections différentes d'une coupe sagittale sériée présentant les 4 cavités du cœur et colorée en hématoxyline-éosine.

Les analyses sont réalisées à l'aveugle pour minimiser les biais d'interprétation. Cette analyse se fait visuellement à l'aide d'un microscope (Carl Zeiss corp, Germany) muni d'un oculaire à micromètre étalonné au grossissement de mesure ($250 \times 250 \mu\text{m}^2$ au grossissement $40 \times$ divisé en 100 carrés égaux de $25 \times 25 \mu\text{m}^2$).

Les mesures sont effectuées sur la grande valve mitrale. L'ensemble du feuillet valvulaire est divisé en 3 parties égales : le premier tiers représente la région proximale (partant de l'insertion de la valve sur l'anneau mitral), suivie de la région médiane et de la région distale. Dans chaque région, il est évalué l'épaisseur valvulaire (μm) sur la base de 3 mesures distinctes et la densité des cellules endothéliales et interstitielles exprimée en nombre de cellules par unité de surface (soit $10^4 \mu\text{m}^2$ ou $0,01 \text{ mm}^2$).

2.4. Analyses des données et statistiques

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes (à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 4) présentant les valeurs de la moyenne et de sa fluctuation (écart-type). La

comparaison entre deux ou plusieurs groupes est effectuée en utilisant les tests statistiques appropriés : Test de Student (pour la comparaison de deux groupes) ou l'analyse de la variance (ANOVA) suivi d'un post-test de Bonferroni ou de comparaison multiple de Dunnett (comparaison de plusieurs groupes). Une différence est considérée statistiquement significative pour une valeur $p < 0,05$.

3. Résultats

Les différents résultats obtenus dans cette partie de nos investigations sont présentés sous la forme d'un manuscrit qui sera adressé à la revue américaine spécialisée de cardiologie « Circulation Research » pour faire l'objet d'une publication.

Ces résultats ne prennent pas en compte les données obtenues pour le groupe de souris traité avec le BW723C86 (WT-BW) dont l'analyse se fera dans le paragraphe suivant le manuscrit.

Contribution of Endothelial Cells, Serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} Receptors and eNOS in Early Processes of Cardiac Valve Degeneration Due to Nordexfenfluramine in Mice

Lawson: Cardiac Valve Degeneration in Mice

Roland F. Lawson¹, Estelle. Ayme-Dietrich¹, Béatrice. Hechler², Christian. Gachet², Claudia. de Tapia¹, Hélène. Rouillard³, Jordane. Stoltz³, Luc. Maroteaux⁴, Bernard. Gasser³, and Laurent. Monassier¹

From Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology¹ (EA7296), Faculty of Medicine, University of Strasbourg, France, and Etablissement Français du Sang² (EFS), Alsace, France, and Pathology Service, Emile Muller Hospital³, Mulhouse, France, and Institut du Fer à Moulin, (Inserm U869)⁴, Paris, France

Corresponding author: Laurent. Monassier, MD, PhD
Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology
Faculty of Medicine
University of Strasbourg
11, rue Humann
67085 Strasbourg, France
Phone: +33368853392
Fax: +33368853388
Email : laurent.monassier@unistra.fr

Manuscript word count, including figure legends: 6735

Subject Code: [19] Valvular Heart Disease
[118] Cardiovascular Pharmacology

ABSTRACT

Rationale: Chronic use of fenfluramine derivatives has been associated with cardiac valve injury (CVI) characterised by increased thickness and cellularity in a dense extracellular matrix.

Objectives: We investigated the contribution of serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors (5-HT₂-R) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in valve degeneration due to nordexfenfluramine (NdF).

Methods: In wild-type mice, the effects of the selective 5-HT_{2B}-R agonist nordexfenfluramine were compared to vehicle-treated animals (Controls) or NdF combined with one of the following compounds: parachlorophenylalanine (pCPA, tryptophan-hydroxylase type 1 inhibitor), ritanserin (5-HT₂-R antagonist), SB206553 (5-HT_{2B/2C} receptor antagonist), L-NAME (non-selective NOS inhibitor). Similarly, the effects of NdF were evaluated in mice knockout for 5-HT_{2A}-Rs (5-HT_{2A}^{-/-}), 5-HT_{2B}-Rs (5-HT_{2B}^{-/-}), 5-HT_{2A} and 2B-Rs (5-HT_{2A/2B}^{-/-}) and eNOS (eNOS^{-/-}). Mice were monitored for hemodynamic and echocardiographic parameters, blood 5-HT and urine 5-HIAA. NdF-induced valvulopathy was measured histologically.

Results: NdF does not induce hemodynamic effects but increases 5-HT production and degradation. NdF-treated mice develop mitral CVI attested by increased thickness and endothelial cells density. Several endothelial progenitor (CD34⁺) cells are detected in the injured valves. Lesions are prevented by blocking 5-HT_{2B}-Rs (SB206553 or 5-HT_{2B}^{-/-} mice) and both 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors (ritanserin or 5-HT_{2A/2B}^{-/-}). In 5-HT_{2A}^{-/-}, NdF still increases valve thickness. 5-HT is not necessary for NdF-induced valve injury because the response is not affected by peripheral 5-HT synthesis inhibition with pCPA. Finally, eNOS inhibition by L-NAME or in eNOS^{-/-} mice prevents NdF-induced CVI.

Conclusions: We demonstrate that both 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A}-Rs are involved in NdF-induced valvulopathy and the contribution of eNOS and endothelial cells in 5-HT_{2B}-mediated mitral valve degeneration.

Key words: serotonin, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors, valvulopathy, endothelial cells, eNOS.

Abbreviations

5-HIAA : 5-hydroxyindoleacetic acid

5-HT : 5-hydroxytryptamine (serotonin)

CVI : cardiac valve injury

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

NdF : nordexfenfluramine

pCPA : parachlorophenylalanine

L-NAME : L-NG-Nitroarginine Methyl Ester

SERT : serotonin transporter

WT : wild type

INTRODUCTION

Several ergot derivates (pergolide, cabergoline, ergotamine) and anorectic drugs (fenfluramine, dexfenfluramine) have been reported to induce left cardiac (mitral and aortic) valve remodelling.¹⁻⁴ The duration of exposure plays an important role in the development of the cardiac valve injuries (CVI).⁵ The CVI are frequently diagnosed based on the historical background and echocardiographic features. Echocardiographic investigation often reveals restricted valve motion associated with valve regurgitation.⁶ Histopathological analysis of the injured valve shows tissue segmental thickening enriched with myofibroblasts or smooth muscle cells embedded in an abundant extracellular matrix of glycosaminoglycans and collagens.⁷ These lesions share the same characteristics with the spontaneous myxomatous mitral valve disease occurring with age and could be considered as an accelerated form of the aging process. Even though several drugs involved in mitral degeneration have been withdrawn from market, knowledge from their molecular and cellular mechanisms could shed a light on pathogenic processes that initiate and propagate valve degeneration.

The contribution of serotonergic system in the valve defects has early been postulated, however, mechanisms are still unclear.⁸ Serotonin is a biogenic amine mainly produced in periphery by enterochromaffin cells of the gut and stored in platelets. It interacts with 7 different families of receptors (5-HT₁ to 5-HT₇) and a transporter (SERT).⁹ The serotonergic receptors expressed in cardiovascular system are mainly activated in periphery by the 5-HT stored in platelets. All the drugs involved in valves lesions interact with the serotonergic system and specifically target the 5-HT₂-Rs sub-type (5-HT_{2B} and 5-HT_{2A}), which belong to the superfamily of Gq-protein-coupled receptors that activates phospholipase C. Stimulation of 5-HT₂-Rs leads to upregulation of target genes involved in proliferation and stimulation of valvular interstitial cells through activation of protein kinase C, Src-protein, phosphorylation of ERK1/2 and TGF- β receptors activation.¹⁰⁻¹² Phosphorylated ERK is thought to induce TGF- β signalling transcript of effectors genes mediating myxomatous pathology

(myofibroblasts transformation and extracellular matrix production).¹³ Overexpression of TGF- β 1 has also been implicated in several cardiac diseases where fibrosis is a prominent feature.¹⁴

The purpose of this study was: (1) to develop and validate a mouse model of drug-induced valvulopathy mimicking early steps of the injuries, (2) to investigate the putative role of serotonin and its 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} receptors in lesions occurrence, and (3) to study the potential role of endothelial cells and nitric oxide pathway in this process.

METHODS

Animals

Studies were performed in 12 week-old male mice weighting between 25 and 30g. Wild-type 129S2/SvPasCrl (WT) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). 5-HT_{2A}R^{-/-}, 5-HT_{2B}R^{-/-} and 5-HT_{2A/2B}R^{-/-} mice were obtained from Dr. Luc Maroteaux's laboratory and left on a pure 129S2/SvPasCrl background. eNOS^{-/-} on C57BL/6J background were kindly provided by Dr. Ralf Brandes (Frankfurt, Germany).

The animal facilities are legally registered for animal housing and experimentation and the scientists in charge of the experiments are in possession of the certificate authorizing experimentation on living animals, delivered by the governmental veterinary office. All procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the European Communities Council Directive EU/63/2010 and obtained the authorization number delivered by the local ethical committee AL/81/88/02/13.

Experimental procedures

To induce valvulopathy, mice were submitted to a 28 day-long infusion of nordexfenfluramine (NdF, 1mg/kg/day) dissolved in sterile water and delivered by micro-osmotic pumps (Alzet®, model 1004, USA). Pumps were implanted subcutaneously during a 1% isoflurane anaesthesia (Aerrane®, Baxter, France). All drugs coming from Sigma-Aldrich, France.

Six groups of WT mice were designed: (1) vehicle (sterile water), (2) NdF, (3) NdF + the 5-HT_{2A}R antagonist, ritanserin (2mg/kg/day), 4) NdF + the selective 5-HT_{2B}R antagonist, SB206553 (1mg/kg/day), (5) NdF + the non-selective tryptophan hydroxylase inhibitor, parachlorophenylalanine (100mg/kg/day) and (6) NdF + the NO-synthase inhibitor, L-NAME

(300mg/kg/day). SB206553 dissolved in sterile water was infused by the mean of a second osmotic pump. Ritanserin and para-chlorophenylalanine were added to food pellets. Ritanserin pellet's preparation is shown in Supplemental material and Supplemental Figure S1. L-NAME was administered in drinking water.

Eight groups of transgenic mice were studied: (1) 5-HT_{2A}R^{-/-} vehicle, (2) 5-HT_{2A}R^{-/-} NdF, (3) 5-HT_{2B}R^{-/-} vehicle, (4) 5-HT_{2B}R^{-/-} NdF, (5) 5-HT_{2A/2B}R^{-/-} vehicle, (6) 5-HT_{2A/2B}R^{-/-} NdF, (7) eNOS^{-/-} vehicle and (8) eNOS^{-/-} NdF.

All groups were monitored weekly for systolic blood pressure, heart rate at days 1, 7, 14, 21 and 28 by tail-cuff photoplethysmography (Visitech®, BP-2000, USA) method. Transthoracic echocardiography was performed before (day -1) and after 28 days of treatment. Food and water intake were controlled together with body weight to adjust orally delivered drugs. At day 27, urinary 5-HIAA was measured from 0.5-1.0 mL urine collected in a tube protected against light and containing a drop of 5N HCl in mice housed individually in metabolic cages overnight (6 pm to 8 am). At day 28, at the end of the last echocardiography and during isoflurane anesthesia, 0.5 mL blood was collected by intracardiac puncture before euthanasia by a lethal pentobarbital (CEVA Santé Animale, France) intraperitoneal injection (150mg/kg). Hearts harvested from mice, were immediately rinsed in saline solution, weighted and fixed with 10% formaldehyde solution for 2 days before being processed.

Echocardiography

Animals were analysed for cardiac anatomy and function on a Sonos 5500 (Hewlett Packard, USA) with a 15MHz linear transducer (15L6). All the examinations were performed in mice anesthetized with 1-1.5% isoflurane. The heart was first imaged in the two-dimensional (2D) mode in the parasternal long-axis view to obtain the aortic root dimensions. The aortic flow velocity and the heart rate (HR) were measured with pulsed-wave Doppler on the same section. The cardiac output (CO) was calculated from the following equation: $CO = 0.785 \times D^2 \times VTI \times HR$ where D is the diameter of the aortic root and VTI is the velocity-time integral of the Doppler aortic spectrum. Left ventricular cross sectional internal diameters in end-diastole (EDLVD) and end-systole (ESLVD) were obtained by an M-mode analysis of a 2D-short axis view at the papillary muscle level. The shortening fraction was calculated as $SF = (EDLVD - ESLVD / EDLVD) \times 100$. From this view, the diastolic septum (S) and posterior wall (PW) thicknesses were measured. The left ventricular mass (LVM) was calculated with the following formula: $LVM = 1.055 \times [(S + PW + EDLVD)^3 - (EDLVD)^3]$. All the measurements

were performed on, at least three beats, according to the guidelines of the American Society of Echocardiography.

Biochemical measurement

Whole blood 5-HT and urinary 5-HIAA concentrations were obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Plateau technique de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg).

Valve histology and quantification of lesions

All samples were paraffin embedded, sectioned at 4 μ m (using HM 355s Automatic microtome) and stained with hematoxylin and eosin. Sections were performed in a way to obtain four chamber views of the heart with long axis section of the tricuspid, mitral and aortic leaflets. A single operator (R.F.L), blinded to the experimental groups, performed valve morphometric analysis with a microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a 40x calibrated objective giving, at this magnification, a large square of 250 μ m x 250 μ m divided in 100 equal parts of 25 μ m x 25 μ m each. NdF induced non-reproducible lesions of the aortic valve and no alteration of the tricuspid in our conditions. Therefore, we decided to focus on the mitral valve. For quantification, the whole mitral valve leaflet section was divided in three equal segments: proximal (near the insertion), medial and distal (including the tip). The thickness of each segment is the mean value obtained in 3 distinct sites. The surface cells density was determined on the whole segment and the result expressed in number of cells per 0,01 mm².

Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded samples against Ki-67, CD34 and CD31 (Pecam-1).

Data analysis and statistics

Results are expressed as mean \pm SEM or SD. Statistical comparisons between two or more groups were performed when appropriate using Student's unpaired t-tests or analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Bonferroni's or Dunnett's multiple comparison tests (GraphPad Prism V4, USA) post-hoc analysis. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

In mice, chronic nordexfenfluramine administration induces mitral valve remodelling and activates serotonin turnover

At the end of the protocol, compared to their littermate controls receiving sterile water, mice infused with NdF were similar regarding body weight, systolic arterial blood pressure, heart rate and echocardiographic parameters (Table 1, Supplemental Figures 2-4 and Supplemental Tables). In particular, no cardiac hypertrophy and/or dysfunction were observed. Whole blood 5-HT and 5-HIAA urinary dosage revealed an increase in 5-HT turnover with a two-fold augmentation of 5-HIAA (WT-C 36 ± 7 $\mu\text{mol/L}$ vs WT-NdF 64 ± 5 $\mu\text{mol/L}$; $p<0.05$) while blood 5-HT concentration remained unchanged (WT-C 1930 ± 163 $\mu\text{g/L}$ vs WT-NdF 1801 ± 81 $\mu\text{g/L}$; $p>0.05$) (Table 2).

In mice receiving NdF, histological analysis focused on mitral heart valves showed typical aspects of remodelled leaflets. WT-C mice presented a homogenous and thin valve architecture bordered by regular endothelial CD31+ and only few CD34+ cells (Figure 1). Conversely, we observed segmental thickened and retracted leaflets in WT-NdF animals (Figure 2.A) with increased endothelial cell number bordering the valve (Figure 2.B). Moreover, clusters of rounded shape cells positive for CD34 antigen were observed (Figure 1). However, similarly to the WT-C group, in WT-NdF mitral valves only few nuclei were Ki-67 positive indicating a low rate of proliferation (Figure 1). Finally, concerning interstitial cells density, no change was observed between WT-NdF and WT-C (Figure 2.C).

We also analysed aortic valves, but the injuries induced by NdF administration were inconstant (data not shown).

Pharmacological approach

Two sets of experiments using pharmacological antagonists and knockout mice were used to investigate the role of serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors and the contribution of NO synthases(s). Echocardiographic, hemodynamic and physical parameters of these experimental groups are presented in supplemental data.

Involvement of serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors in NdF induced valvulopathy

To test the contribution of 5-HT_{2B}-R, we evaluated NdF effects in wild-type mice co-treated with the selective 5-HT_{2B}-R antagonist, SB206553 (WT-SB; 1mg/kg/day) or in 5-HT_{2B}^{-/-} mice. In wild-type mice, NdF induced urine 5-HIAA increase was not blocked by

SB206553 co-treatment. Blood 5-HT concentration was not statistically different from WT-NdF group (Table 2). 5-HT_{2B}^{-/-}-C mice had higher baseline urine 5-HIAA, which was then not affected by NdF treatment (Table 3). SB206553 treatment prevents valve injuries induced by NdF (Figure 2). Furthermore, no lesion was detectable in 5-HT_{2B}^{-/-} mice under NdF treatment (Figure 3).

To test the contribution of 5-HT_{2A}-R, we evaluated NdF effects on wild-type mice co-treated with the selective murine 5-HT_{2A}-R antagonist, ritanserin (WT-R; 2mg/kg/day) or on 5-HT_{2A}^{-/-} mice. In opposite to SB206553, NdF induced urine 5-HIAA increase was blocked by ritanserin co-treatment. Peripheral blood 5-HT concentration was not statistically different (Table 2). With 5-HT_{2A}^{-/-} mice no difference was observed regarding blood 5-HT and urine 5-HIAA under NdF (Table 3). Histological lesions were also fully prevented by ritanserin (Figure 2). However we detect and increase thickness with 5-HT_{2A}^{-/-} mice under NdF treatment.

To test both 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} blockade contribution to lesion, we use 5-HT_{2A/2B}^{-/-} mice, which show a two-fold increase of urine 5-HIAA under NdF and significantly lower blood 5-HT compared to their control group (Table 3). Histological and morphometric analysis of 5-HT_{2A/2B}^{-/-} mice mitral valve did not reveal any lesion (Figure 3).

These results confirm the putative role 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors in valve remodelling with a major contribution of 5-HT_{2B} receptors according to the persistent valve increased thickness observed with 5-HT_{2A}^{-/-} mice.

Involvement of peripheral serotonin in NdF induced valve remodelling

To investigate if fluctuation of serotonin metabolism could contribute to NdF induced valve remodelling, we strongly depleted peripheral 5-HT in mice treated with NdF by the co-administrating 100 mg/kg/day of parachlorophenylalanine (pCPA), a tryptophan hydroxylase inhibitor (the rate-limiting enzyme for 5-HT biosynthesis). PCPA markedly three-fold decreased blood 5-HT and urinary 5-HIAA (Table 2). Nevertheless, this massive depletion failed to prevent valve leaflets remodelling (Figure 2). These data indicate that peripheral 5-HT is not necessary for NdF to induced mitral valve injury.

Involvement of endothelial cells and nitric oxide pathway

We previously confirmed in our experimental model that mitral valve remodelling in mice involved endothelial cells, both 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors, and that 5-HT_{2B} receptors

seem hierarchically important in this process. We decided according to the importance of nitric oxide in several processes involving endothelial cells (angiogenesis) to investigate the link between 5-HT_{2B} receptors activation and eNOS pathway.

Complementary experiments were performed to study the effects of NdF in co-treatment with L-NAME (WT-L) and on eNOS^{-/-} mice. There was no significant difference in WT-L group concerning blood 5-HT (WT-NdF 1801 ± 81 µg/L vs WT-L 2160 ± 152 µg/L, p>0.05) and urine 5-HIAA (WT-NdF 64 ± 5 µmol/L vs WT-L 55 ± 12 µmol/L, p>0.05). L-NAME treatment fully prevented lesions (thickness: WT-NdF 69 ± 9 µm vs WT-L 43 ± 4 µm, p<0,05; endothelial cells density: WT-NdF 24 ± 3 cells/0.01mm² vs WT-L 14 ± 1 cells/0.01mm², p<0.05). In addition, WT-L has lower interstitial cells density (WT-NdF 53 ± 8 cells/0.01mm² vs WT-L 28 ± 2 cells/0.01mm², p<0.05). For eNOS^{-/-} mice despite a basal two-fold elevated blood 5-HT in comparison to our WT-C group, did not show any modification of blood 5-HT under NdF treatment or urine 5-HIAA. There were also no important histological difference in the two groups attributable to NdF treatment despite the slightly decrease of endothelial cells in eNOS^{-/-}-NdF (Figure 4).

DISCUSSION

In our study, cardiac mitral valve remodelling occurs after chronic infusion of NdF to mice and is characterized by segmental increased valve thickness and endothelial cells density with a normal repartition of interstitial cells (Figure 2.C and Supplemental Figure S5). Superficial CD31+ cells boarding the valve appear rounded shaped and are migrating into the sub-endothelial layer. Lesions were low proliferative (Ki-67) but are constituted by several CD34+ cells. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors antagonists (ritanserin and SB206553) or complementary experiments run with 5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{2B}^{-/-} or the double knockout 5-HT_{2A/2B}^{-/-} mice, successfully prevent valves lesions. NdF-induced 5-HT release does not contribute significantly to the lesions, since 5-HT depletion with pCPA failed to block mitral valve remodelling. In addition, we find that eNOS activation is a critical downstream pathway for lesions initiation. In this part, we will discuss our results based on the pharmacological profile of NdF and decrypt the mechanisms that could both explain the abundance of CD34+ cells and the contribution of the serotonergic system and eNOS to the valves damage.

NdF, a vasoactive amphetamine with a complex pharmacological profile

Published radioligand binding experiments show that NdF, the hepatic deethylated dexfenfluramine metabolite has a high affinity at the 5-HT_{2B} receptor ($K_i = 11.2 \pm 4.3$ nM), 5-HT_{2C} receptor ($K_i = 324 \pm 7.1$ nM) and a lesser affinity at the 5-HT_{2A} receptor ($K_i = 1516 \pm 88$ nM).² The 5-HT_{2C} receptors, which are mainly expressed in the central nervous system, are involved in its anorectic effect. Peripheral effects involve 5-HT_{2A} and/or 5-HT_{2B} receptors. NdF is a vasoactive compound, which can induce through 5-HT_{2A} receptors stimulation a concentration-dependent contraction of several isolated arteries (aorta, renal and mesenteric arteries) or exhibit in vivo increase of blood pressure in a dose-dependent manner.¹⁵ NdF high potency and efficacy on 5-HT_{2B} receptors is thought to be associated to the life-threatening side effects including pulmonary hypertension and heart valve disease. Acute administration of NdF or its precursors (fenfluramine) is able to induce peripheral and central 5-HT release by direct activation of SERT.¹⁶ In periphery NdF pharmacological effects is the combination of its interaction with 5-HT₂ receptors and SERT. In our experimental groups, NdF slightly increases heart rate and systolic blood pressure of mice but does not induce cardiac hypertrophy or functional damage that could be detected based on echocardiographic evaluation (Supplemental Figures S3-4 and Supplemental tables).

If the lack of selective 5-HT₂ receptors ligands has limited the possibility to investigate the contribution of serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors to CVI, a great step has been over-crossed with transgenic mice. Previous experiments published in the literature, mainly addressed acute in vivo effects of NdF on rats and find that administration of this drug induces hypophagia depending on 5-HT_{2C} receptors stimulation.^{17,18} Studies investigating NdF pharmacological actions on mice describe suppression of feeding during acute administration.¹⁹ In a study performing chronic infusion of NdF (3mg/kg/day during 14 days) in mice, body weight loss is only observed in obese mice, however no effect or slightly increase was registered on normal-weight mice.²⁰ A similar observation has been done in our experiments on normal-weight mice infused with 1mg/kg/day of NdF during 28 days, which did not exhibit significant change in body weight ratio (day 28/ day1) (Supplemental Figure S2) or food intake (data not shown).

Chronic administration of NdF to rats for 7 or 14 days at 3 or 10 mg/kg/day has been linked to plasma 5-HT decrease.²¹ Our investigation in mice (1mg/kg/day during 28 days) shows that blood 5-HT was not statistically different, but we report a quasi 2-fold increase of its urinary metabolite 5-HIAA. It has been demonstrated that the agonist activity of NdF on 5-HT_{2B} receptors contributes to the activation of SERT. Stimulation of 5-HT_{2B} receptors

phosphorylates SERT via NO/PKG pathway in absence of extracellular 5-HT and in presence of 5-HT promotes additional PKC pathway phosphorylation.²² We suggest that NdF activates SERT by releasing 5-HT from platelets and in other hand promotes its rapid internalization and degradation inside the cells. The transient peripheral 5-HT increase can therefore be masked by the rapid 5-HT internalization by the activated SERT, which leads to 5-HT degradation into the inactive metabolite 5-HIAA. This effect is not consistent with MAO activation.²³

Valve remodelling induced by 5-HT₂ receptors stimulation: from strong correlation to proof of concept

Several arguments support the strong association between 5-HT_{2B} receptors agonists (ergot derivatives, fenfluramine derivatives) and drug-induced valvular heart disease.²⁴ 5-HT_{2B} receptors are enriched in heart valves from various species.^{1,25,26} It has been demonstrated that the activation of human valvular interstitial cells 5-HT_{2B} receptors, is mitogenic resulting in ERK1/2 phosphorylation and [³H]deoxythymidine incorporation.²⁷ The 5-HT_{2B} receptors activation has also been implicated in 5-HT induced valvulopathy in experimental animals.²⁸ Some chemically similar drugs to ergot derivatives lacking 5-HT_{2B} receptors agonism (lisuride and bromocriptine) are not associated with an increase risk of valvulopathy.²⁹⁻³¹

Previous studies in the literature show indirect arguments to explain 5-HT₂ receptors contribution. Our study provides the first mouse model of drug-induced valve lesions in mice that involves the serotonergic 5-HT₂ receptors as proof of concept. The 5-HT_{2B} receptors agonist NdF chronic infusion shows evidence of valve lesions. These lesions involved mainly 5-HT_{2B} receptors stimulation and partially 5-HT_{2A} receptors as demonstrated by antagonist treatments (ritanserin and SB206553) and transgenic mice experiments.

Valve lesions are probably a complex combination of several signalling pathways and could exhibit different stage of progression. Therapeutic target that could alter the natural course of the disease should focus on early steps progression. Possible regression of cardiac valvulopathy related to ergot-derived agonists depends on the time of exposure.⁵ Mitral valve histological analysis of mice treated with NdF in our protocol reveals early steps of valve damage with low proliferative leaflet.

Contribution of the serotonergic system to the valve damage: does it involve endothelial progenitor cells invasion?

Our results demonstrate that valve lesions involve the increase density in the endothelial and sub-endothelial layer of CD34+ cells. CD34 antigen is a specific marker of endothelial progenitor cells. Hematopoietic stem cells (CD34+, CD133+ and CD45+) resident in the bone marrow niche give rise to a population of cell that differentiate into endothelial progenitor (CD34+, CD133+ and VEGFR2+) subtypes.³² The involvement of progenitor cells in tissue remodelling has been indicated in number of diseases progression (atherosclerosis, asthma). Add to this, it has been demonstrated that hematopoietic stem cells contribute to adult valve fibroblast population in bone marrow engrafted experiments.³³

Serotonin can promote the differentiation of progenitor cells.³⁴ We hypothesize that 5-HT and or 5-HT_{2B} receptors stimulation induce maturation of progenitor cells, their mobilization from bone marrow and recruitment in the valve. Our mouse model combine 5-HT influence and 5-HT_{2B} receptors activation since NdF can induce 5-HT release and is agonist of 5-HT_{2B} receptors. Our results demonstrate that 5-HT_{2B} receptors are the main features of this process, since its blockade prevents lesions while concomitant inhibition of 5-HT synthesis with pCPA fail to prevent or alter NdF induce valve remodelling at this step.

We also demonstrate that eNOS blockade prevents lesions. It has been demonstrated that eNOS expressed by bone marrow stromal cells influences recruitment of stem and progenitor cells.³⁵

A parallel can now be established between early steps of valve remodelling and angiogenesis mechanisms. A clear link has been previously established between 5-HT, 5-HT_{2B} receptors and eNOS during angiogenesis. Depletion of serotonin and selective inhibition of 5-HT_{2B} receptors suppressed tumours angiogenesis by inhibiting eNOS and ERK1/2 phosphorylation.³⁶

In conclusion, this work suggests that 5-HT and 5-HT_{2B} receptors are involved in early processes of valve remodelling. The cellular mechanism may consist with bone marrow maturation and mobilisation depending on eNOS of endothelial progenitor cells. These cells are recruited in the valve where they will undergo differentiation to myofibroblast or other cell types to propagate valve lesions to an irreversible step.

A possible therapeutic target could be found by better understanding early process mechanisms. Further experiments will better characterize CD34+ cells recruited in valve, identity specific biomarkers and then investigate capability of 5-HT_{2B} receptors agonists to mobilize bone marrow hematopoietic stem cell or endothelial progenitor cells.

Acknowledgements: We thank Pr. Ralf Brandes (Université of Francfort) and Pr. Axel Gödecke (Université of Düsseldorf) for eNOS mice.

Funding sources: These studies were supported by: French Ministry of higher education and research grant, Fondation de France, French Medical Research Foundation (FRM) and French National Research (ANR).

Disclosures: The authors have no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Fitzgerald, L. W. *et al.* Possible role of valvular serotonin 5-HT_{2B} receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* **57**, 75–81 (2000).
2. Rothman, R. B. *et al.* Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* **102**, 2836–2841 (2000).
3. Van Camp, G. *et al.* Treatment of Parkinson's disease with pergolide and relation to restrictive valvular heart disease. *Lancet* **363**, 1179–1183 (2004).
4. Ayme-Dietrich, E. *et al.* Mitral bioprosthesis hypertrophic scarring and native aortic valve fibrosis during benfluorex therapy. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **26**, 1 (2012).
5. Zanettini, R. *et al.* Regression of cardiac valvulopathy related to ergot-derived dopamine agonists. *Cardiovasc Ther* **29**, 404–410 (2011).
6. Smith, S. A., Waggoner, A. D., de las Fuentes, L. & Davila-Roman, V. G. Role of serotonergic pathways in drug-induced valvular heart disease and diagnostic features by echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* **22**, 883–889 (2009).
7. Andrejak, M. & Tribouilloy, C. Drug-induced valvular heart disease: an update. *Arch Cardiovasc Dis* **106**, 333–339 (2013).
8. Orton, E. C., Lacerda, C. M. R. & MacLea, H. B. Signaling pathways in mitral valve degeneration. *J Vet Cardiol* **14**, 7–17 (2012).
9. Monassier, L., Laplante, M. A., Ayadi, T., Doly, S. & Maroteaux, L. Contribution of gene-modified mice and rats to our understanding of the cardiovascular pharmacology of serotonin. *Pharmacol. Ther.* **128**, 559–567 (2010).
10. Roth, B. L. Drugs and valvular heart disease. *N. Engl. J. Med.* **356**, 6–9 (2007).
11. Xu, J. *et al.* Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* **161**, 2209–2218 (2002).
12. Jian, B. *et al.* Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* **161**, 2111–2121 (2002).
13. Walker, G. A., Masters, K. S., Shah, D. N., Anseth, K. S. & Leinwand, L. A. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ. Res.* **95**, 253–260 (2004).
14. Khan, R. & Sheppard, R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* **118**, 10–24 (2006).
15. Ni, W. *et al.* (+)-Norfenfluramine-induced arterial contraction is not dependent on endogenous 5-hydroxytryptamine or 5-hydroxytryptamine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 953–960 (2005).
16. Rothman, R. B. *et al.* Evidence for noncompetitive modulation of substrate-induced serotonin release. *Synapse* **64**, 862–869 (2010).
17. Vickers, S. P., Clifton, P. G., Dourish, C. T. & Tecott, L. H. Reduced satiating effect of d-fenfluramine in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **143**, 309–314 (1999).
18. Vickers, S. P., Dourish, C. T. & Kennett, G. A. Evidence that hypophagia induced by d-fenfluramine and d-norfenfluramine in the rat is mediated by 5-HT_{2C} receptors. *Neuropharmacology* **41**, 200–209 (2001).
19. Rowland, N. E., Robertson, K. L., Cadiz, E. M., Kenney, J. & Kwiatkowski, V. Action of a serotonergic anorectic in meal-fed mice working for food. *Behav Pharmacol* **23**, 560–566 (2012).
20. Rowland, N. E. Long-term administration of dexfenfluramine to genetically obese (ob/ob) and lean mice: body weight and brain serotonin changes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49**, 287–294 (1994).
21. Zolkowska, D., Baumann, M. H. & Rothman, R. B. Chronic fenfluramine administration increases

- plasma serotonin (5-hydroxytryptamine) to nontoxic levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**, 791–797 (2008).
22. Launay, J.-M., Schneider, B., Loric, S., Da Prada, M. & Kellermann, O. Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT_{2B} receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J.* **20**, 1843–1854 (2006).
 23. Kilpatrick, I. C., Traut, M. & Heal, D. J. Monoamine oxidase inhibition is unlikely to be relevant to the risks associated with phentermine and fenfluramine: a comparison with their abilities to evoke monoamine release. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **25**, 1454–1458 (2001).
 24. Elangbam, C. S. Drug-induced valvulopathy: an update. *Toxicol Pathol* **38**, 837–848 (2010).
 25. Setola, V. *et al.* 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ‘Ecstasy’) induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1223–1229 (2003).
 26. Elangbam, C. S. *et al.* 5-Hydroxytryptamine (5HT) receptors in the heart valves of cynomolgus monkeys and Sprague-Dawley rats. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 671–677 (2005).
 27. Setola, V. *et al.* 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ‘Ecstasy’) induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1223–1229 (2003).
 28. Elangbam, C. S. *et al.* 5-hydroxytryptamine (5HT)-induced valvulopathy: compositional valvular alterations are associated with 5HT_{2B} receptor and 5HT transporter transcript changes in Sprague-Dawley rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* **60**, 253–262 (2008).
 29. Droogmans, S. *et al.* Possible association between 3,4-methylenedioxymethamphetamine abuse and valvular heart disease. *Am. J. Cardiol.* **100**, 1442–1445 (2007).
 30. Schade, R., Andersohn, F., Suissa, S., Haverkamp, W. & Garbe, E. Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N. Engl. J. Med.* **356**, 29–38 (2007).
 31. Zanettini, R. *et al.* Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson’s disease. *N. Engl. J. Med.* **356**, 39–46 (2007).
 32. Balaji, S., King, A., Crombleholme, T. M. & Keswani, S. G. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**, 283–295 (2013).
 33. Visconti, R. P. *et al.* An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells. *Circ. Res.* **98**, 690–696 (2006).
 34. Hirota, N., McCuaig, S., O’Sullivan, M. J. & Martin, J. G. Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res* **12**, 599–609 (2014).
 35. Aicher, A. *et al.* Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **9**, 1370–1376 (2003).
 36. Asada, M. *et al.* Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia* **11**, 408–417 (2009).

Table 1: Effects of nordexfenfluramine on hemodynamic and morphometric parameters in wild-type mice.

PARAMETERS	DAY 1			DAY 28		
	WT-C (n=10)	WT-NdF (n=10)	p value	WT-C (n=10)	WT-NdF (n=10)	p value
BW, mg	30 ± 2	28 ± 2	ns	30 ± 3	29 ± 3	ns
HW/BW, mg/g	-	-	-	5.38 ± 0.23	5.42 ± 0.29	ns
SAP, mmHg	96 ± 8	101 ± 6	ns	123 ± 5	126 ± 6	ns
HR, bpm	480 ± 63	441 ± 30	ns	575 ± 53	570 ± 40	ns
PWT, mm	0.76 ± 0.06	0.77 ± 0.05	ns	0.73 ± 0.05	0.65 ± 0.12	ns
SWT, mm	0.79 ± 0.05	0.78 ± 0.06	ns	0.78 ± 0.06	0.67 ± 0.10	ns
LV mass, mg	103 ± 25	97 ± 14	ns	103 ± 25	103 ± 30	ns
LV mass index mg/g	3.43 ± 0.67	3.56 ± 0.73	ns	3.33 ± 0.93	3.76 ± 0.42	ns
EDLVD, mm	3.77 ± 0.61	3.68 ± 0.43	ns	4.10 ± 0.30	4.28 ± 0.25	ns
ESLVD, mm	2.22 ± 0.50	2.55 ± 0.35	ns	2.23 ± 0.35	2.50 ± 0.36	ns
SF, %	38 ± 8	40 ± 7	ns	38 ± 5	42 ± 5	ns
CO, ml/min	50 ± 17	46 ± 17	ns	55 ± 11	53 ± 8	ns

Values are means ± SD, - represents undefined parameters, **p** = statistical significance (unpaired t-test), **ns** = not significance, **n** = number per group, **NdF** = nordexfenfluramine, **WT-C** = wild-type control group, **WT-NdF** = wild-type nordexfenfluramine treated group, **BW** = body weight, **HW** = heart weight, **SAP** = systolic arterial pressure, **PWT** = posterior wall thickness, **SWT** = septum wall thickness, **HR** = heart rate, **LV** = left ventricle, **EDLVD** = end diastolic left ventricle diameter, **ESLVD** = end systolic left ventricle diameter, **SF** = shortening fraction, **CO** = cardiac output

Table 2: Blood 5-HT and urine 5-HIAA dosage on wild-type mice.

	WT-C (n=9)	WT-NdF (n=10)	WT-P (n=9)	WT-R (n=10)	WT-SB (n=10)	WT-L (n=5)
Blood 5-HT (µg/L)	1930±162	1801±81	596±48 ^{#*}	1877±76	2213±89	2160±152
Urine 5-HIAA (µmol/L)	36±7	64±5 [#]	16±3 [*]	44±5	75±10 [#]	55±12

Values are means ± SEM, (p<0.05) statistical significance (ANOVA, post hoc Dunnett's multiple comparison test; [#] vs WT-C or ^{*} vs WT-NdF).

Table 3: Blood 5-HT and urine 5-HIAA dosage on transgenic mice.

	5-HT _{2A} ^{-/-}		5-HT _{2B} ^{-/-}		5-HT _{2A/2B} ^{-/-}		eNOS ^{-/-}	
	C	NdF	C	NdF	C	NdF	C	NdF
Blood 5-HT (µg/L)	1750±69	1774±102	1656±109	1834±79	2144±53	1795±75 [*]	3517±150	3657±231
Urine 5-HIAA (µmol/L)	52±4	51±7	74±7	57±6	43±4	85±5 [*]	30±3	32±3

Values are means ± SEM, ^{*}(p<0.05) statistical significance (unpaired t-test); C = control.

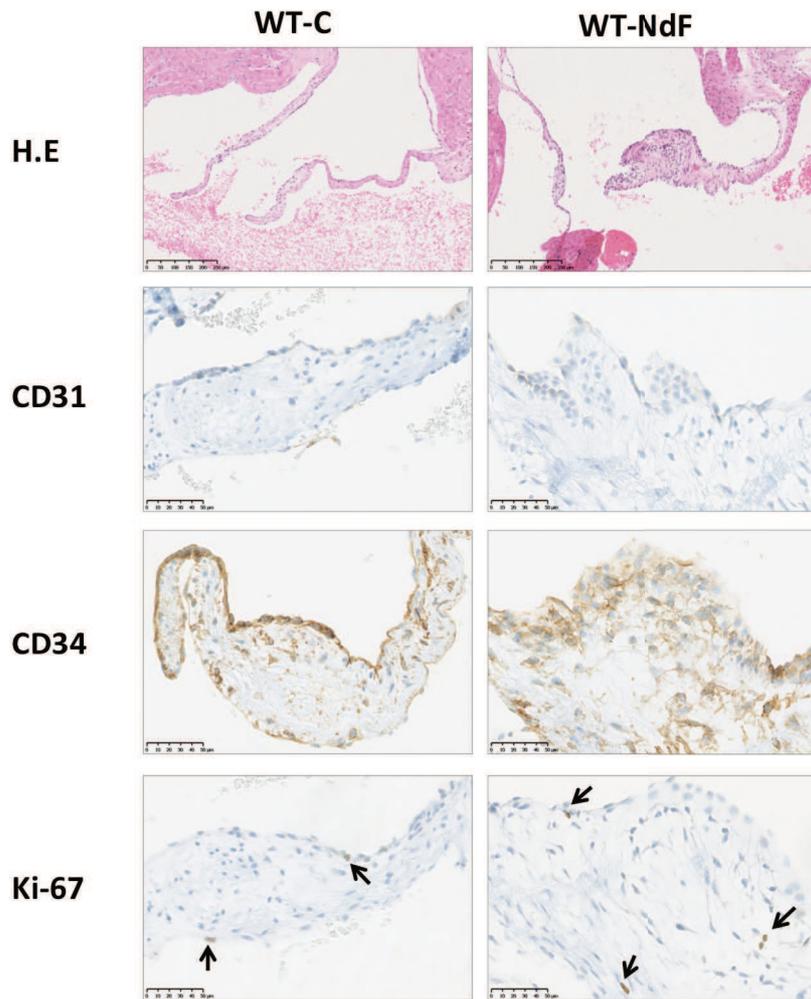


Figure 1: Mitral valve histological aspect in wild-type mice.

H.E = hematoxylin eosin (scale bar = 250 μ m); immunohistochemical staining (scale bar = 50 μ m) for CD31 (endothelial cells), CD34 (endothelial progenitor cells) and Ki-67 (mitosis engaged cells); arrows indicate positive nuclei for Ki-67.

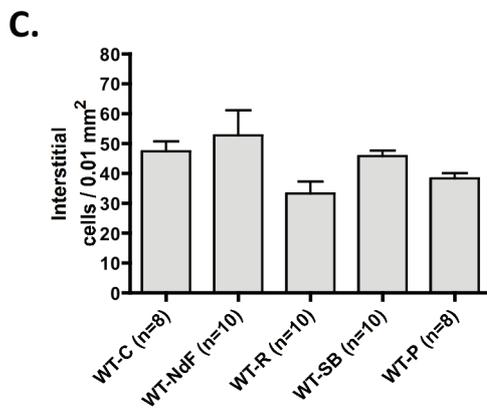
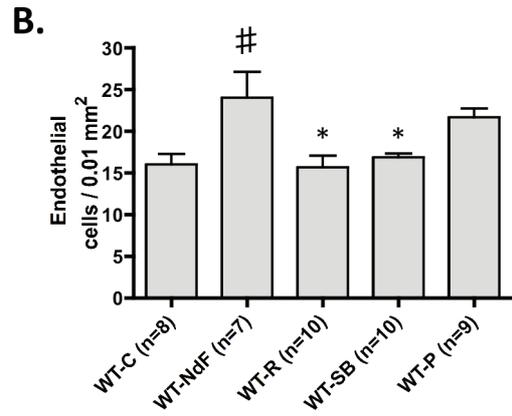
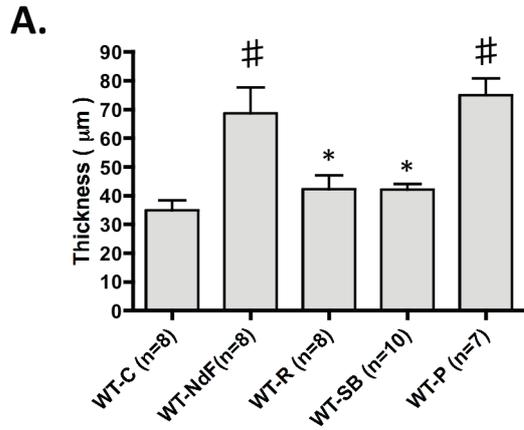


Figure 2: Effect of serotonergic system blockade wild-type mitral valve.

Values are means \pm SEM, A. thickness measurement, B. endothelial cells and C. interstitial cells counting on WT-C (wild-type control), WT-NdF (wild-type nordexfenfluramine), WT-P (WT-NdF + pCPA), WT-R (WT-NdF + ritanserin), WT-SB (WT-NdF + SB 206553); ($p < 0.05$) statistical significance (ANOVA, Bonferroni post hoc test; [#] vs WT-C or ^{*} vs WT-NdF), n = number per group.

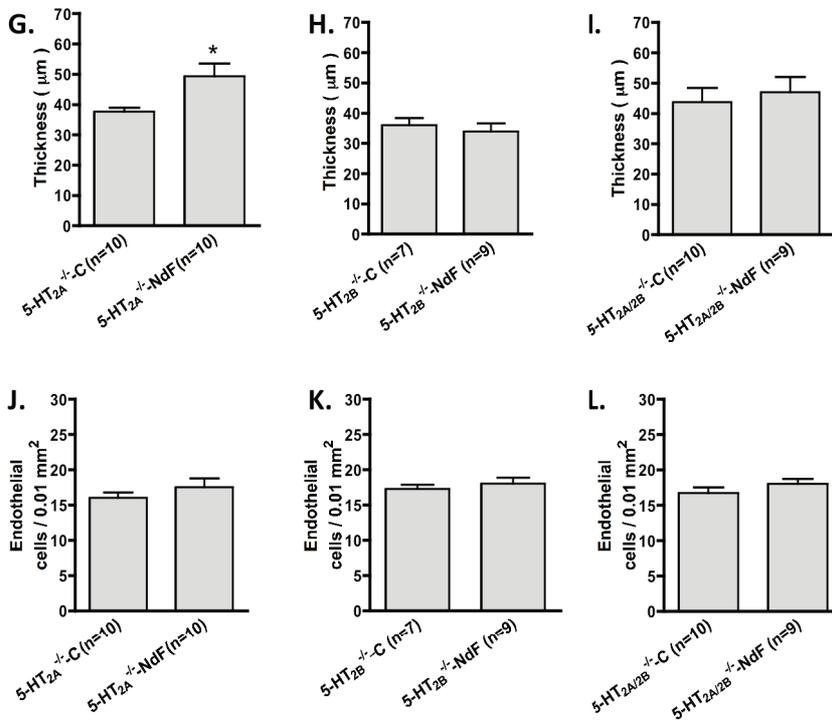
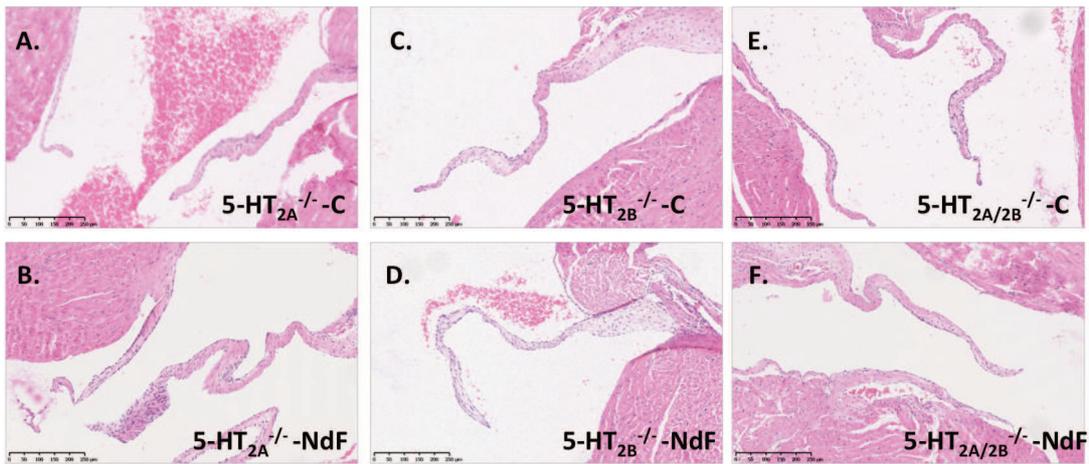


Figure 3: Histological and morphometric analysis of serotonergic knocked-out 5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{2B}^{-/-} and 5-HT_{2A/2B}^{-/-} mice (scale bar = 250 μm).

Values are means ± SEM, A to F correspond to typical histologic aspects of the different 5-HT₂ knocked-out mice (control and NdF); G, H and I represent measured thickness; J, K and L represent counted endothelial cells. *(p < 0.05) statistical significance (unpaired t-test).

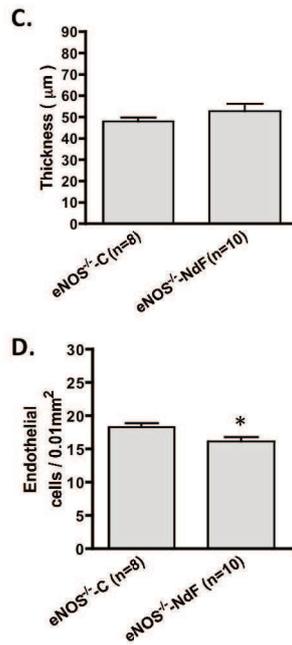
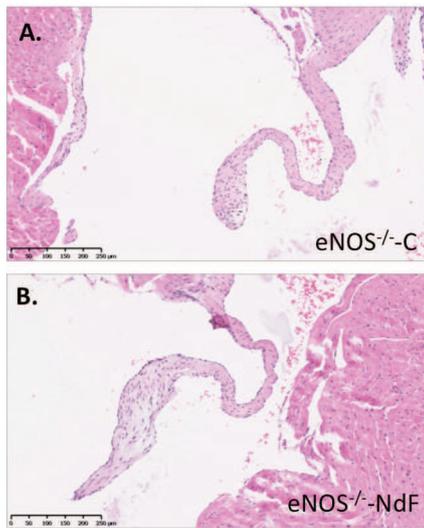


Figure 4: Histological and morphometric analysis of eNOS^{-/-} mice.

Values are means ± SEM, A and B correspond to typical histologic aspects of the eNOS^{-/-} knocked-out mice (control and NdF; scale bar = 250 μm); C and D represent respectively measured thickness and counted endothelial cells.

Supplemental material

Validation of ritanserin dose and administration route

Ritanserin, a potent murine 5-HT_{2A} receptors antagonist, is not soluble in water, but in the organic solvents methanol (10 mg/mL) and DMSO (10.1 mg/mL). To overcome its solubility limits in water, we decided to administer this drug to mice in food pellets. The strategy was to deliver the appropriate dose of the drug depending on food intake. Ritanserin was dissolved in a pre-determined volume of methanol that should allow 60 - 100µl injection inside each pellet in order to deliver the appropriate concentration based on mice food consumption. Pellets wet with ritanserin (previously dissolved in methanol) were put under a laminar flow hood overnight until total evaporation of the methanol.

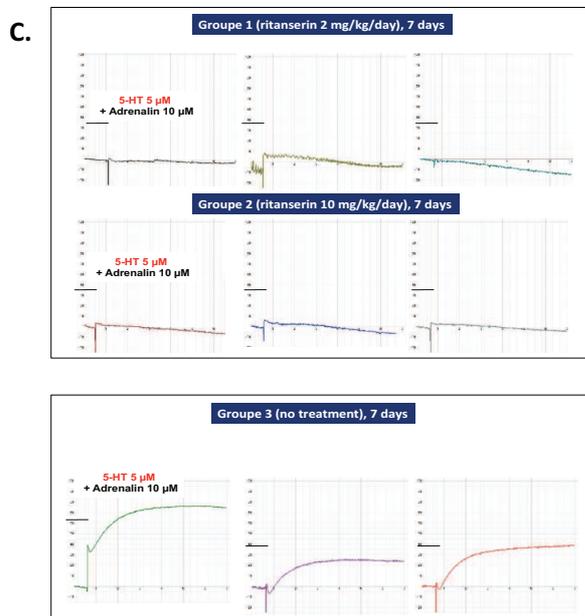
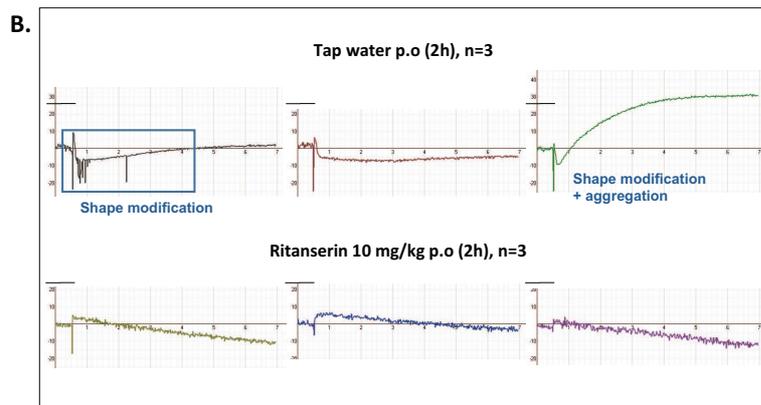
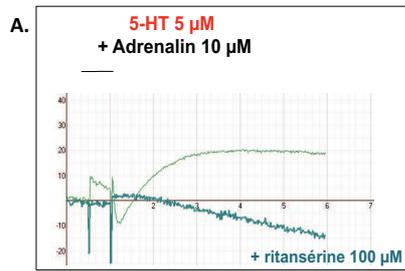
5-HT_{2A} receptors blockade by ritanserin (administered by this method) were validated by platelets aggregation test. 5-HT_{2A} receptors mediated serotonin induced auto-activation loop during platelets aggregation. The principle of this test was to measure the ability of this antagonist to inhibit platelet activation and platelet-platelet binding thus providing a pharmacological proof of 5-HT_{2A} receptors blockade by ritanserin in treated mice.

This evaluation was performed on plasma-rich platelet (350,000 platelets/µl) anticoagulated with citrate (3.15%) on blood samples collected from mice abdominal aorta under pentobarbital anaesthesia before sacrifice. The platelets aggregation was induced by a mix of serotonin (5µmol/L) and adrenalin (10µmol/L) (supplemental Figure 1.A).

Prior to dose validation, a first set of experiment was run. Mice (n=3/ group) were assigned in two experimental groups (experiment 1, supplemental Figure 1.B). Once received tap water and the second ritanserin by oral gavage at 10 mg/kg. Blood sample was collected after 2 hours and platelet aggregation measured blinded to the investigator (Béatrice Hechler). Ritanserin after 2 hours prevents at this concentration platelet aggregation (see result below).

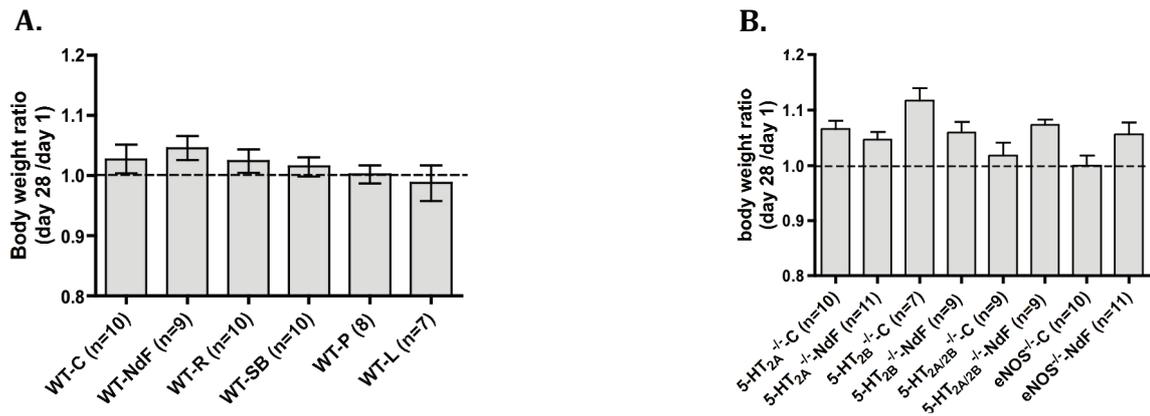
Then we prepare ritanserin-enriched pellets as described above and perform the second set experiment. Mice were randomly assigned in 3 experimental groups (experiment 2, supplemental Figure 1.C). Mice were followed prior for 7 days for body weight, food and water intake. After this period, mice were followed for additional 7 days. Two groups were feed with ritanserin pellets at respectively 2 mg/kg/day and 10 mg/kg/day and the third group as control did not receive ritanserin. At the end, blood samples were collected for platelets aggregation test. Ritanserin at 2 or 10 mg/kg/day fully prevents platelet aggregation (see results below).

Supplemental figures

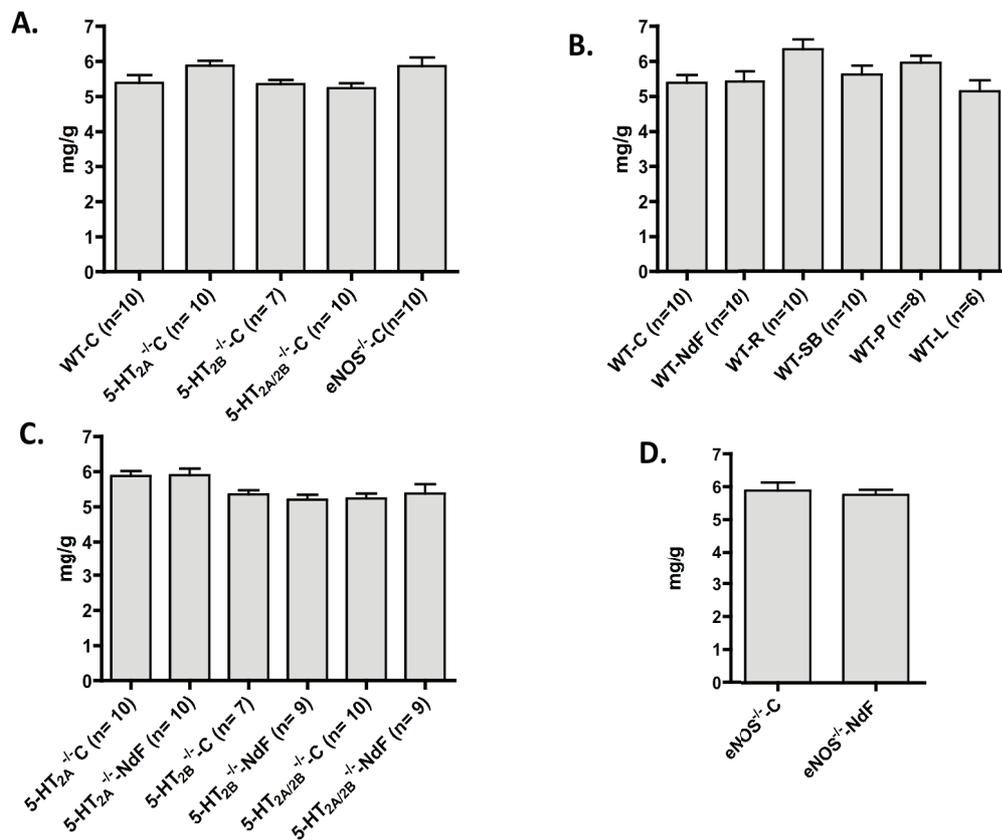


Supplemental Figure S1: Inhibition of platelet aggregation by ritanserin

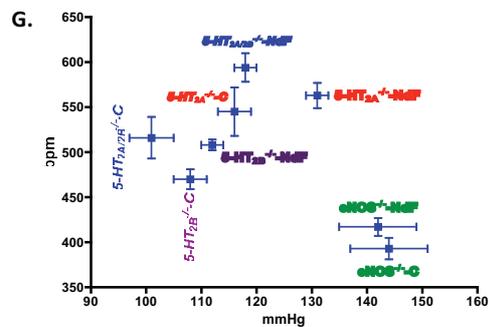
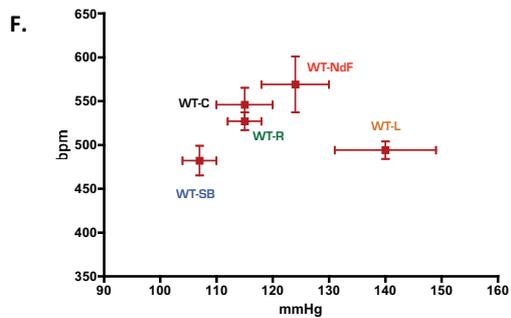
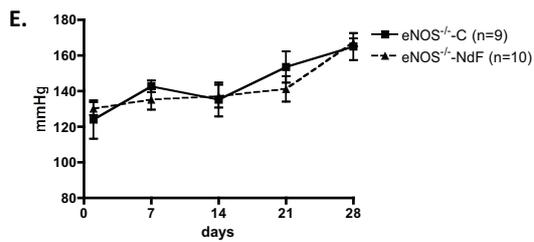
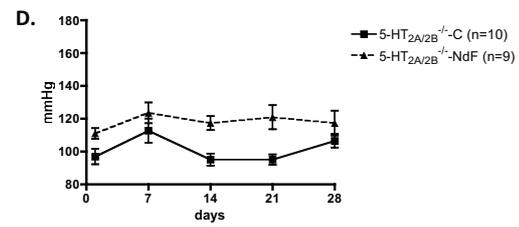
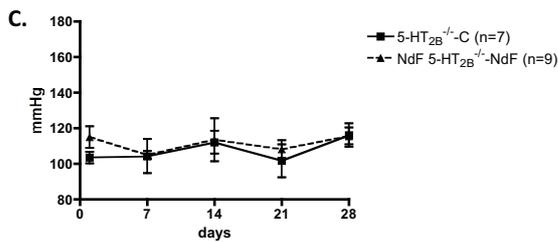
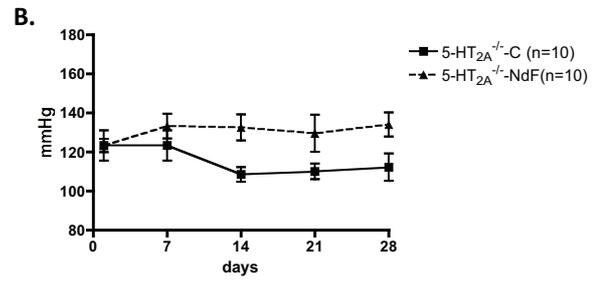
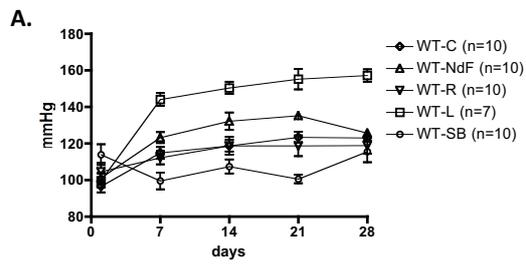
This experiment is performed on platelet-rich plasma, citrate 3.15% (350,000 platelets/ l) and aggregation was induced by the mix of 5-HT (5 M) and adrenalin (10 M); A. Inhibition of platelet aggregation by ritanserin 100 mol/L addition in vitro to plasma (proof of concept), B. Experiment 1: ex vivo inhibition of platelet aggregation by ritanserin 2 hours after oral administration (gavage), C. Experiment 2: ex vivo inhibition of platelet aggregation by ritanserin after 7 days administration.



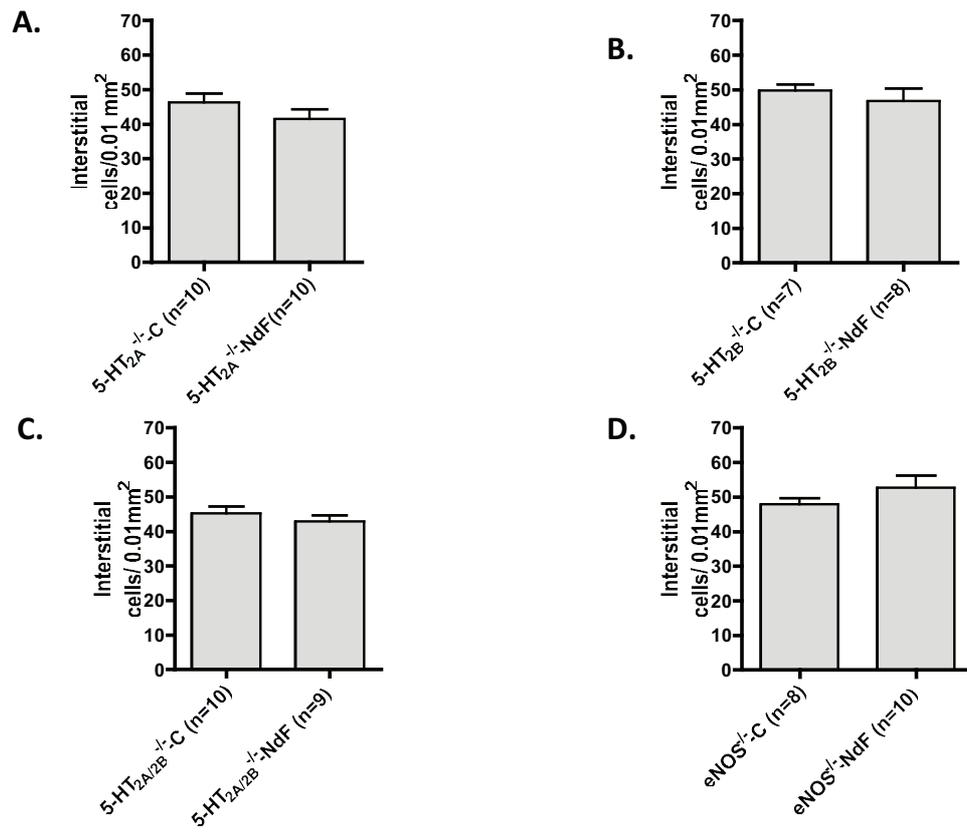
Supplemental Figure S2: Physical parameters. Body weight ratio (day28/day1) from wild type (A) and transgenic mice (B). Body weight loss is attested by a significant mean ratio under 1. No statistically significant decrease was registered in our experimental groups. ANOVA $p > 0.05$



Supplemental Figure S3: Heart and body weight ratio from controls groups wild type and transgenic mice (A), from WT experiments groups (B) and transgenic groups (C and D). This ratio appreciates myocardial hypertrophy. No significant difference is observed among all experimental groups. ANOVA $p > 0.05$



Supplemental Figure S4: Hemodynamic parameters. Indicative weekly systolic blood pressure (SBP) variation from WT (A) and transgenics (B, C, D and E) mice involved in the experiments. F and G correspond to schematic representation of SBP (x-axis) in function of heart rate (HR) (y-axis) respectively in WT and transgenic groups. NdF administration increases both HR and SBP



Supplemental Figure S5: Interstitial cells density from 5-HT_{2A}^{-/-} (A), 5-HT_{2B}^{-/-} (B), 5-HT_{2A/2B}^{-/-} (C) and eNOS^{-/-} (D) mice. No statistical difference is registered from control and NdF treated groups. Unpaired t-test ($p > 0.05$)

Supplemental Tables: Echocardiographic parameters

Groups	CO (mL/mn)	
	Day 1	Day 28
WT-C	49.78 ± 5.97	54.65 ± 3.94
WT-NdF	54.26 ± 7.33	53.36 ± 2.60
WT-R	49.27 ± 2.99	56.71 ± 3.15
WT-SB	49.39 ± 2.72	51.39 ± 3.15
WT-L	50.60 ± 6.97	50.86 ± 3.22
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	49.82 ± 2.52	47.51 ± 2.20
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	60.35 ± 3.03	66.05 ± 4.46
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	49.15 ± 2.10	50.12 ± 3.37
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	49.96 ± 4.23	50.69 ± 5.00
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	48.38 ± 3.08	62.19 ± 3.26**
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	50.98 ± 3.39	53.61 ± 4.56
eNOS ^{-/-} -C	40.82 ± 3.93	43.56 ± 2.45
eNOS ^{-/-} -NdF	53.00 ± 3.93	48.75 ± 3.56

Groups	Echocardiographic HR (bpm)	
	Day 1	Day 28
WT-C	322 ± 29	383 ± 12
WT-NdF	357 ± 29	405 ± 08
WT-R	379 ± 07	379 ± 11
WT-SB	348 ± 18	362 ± 09
WT-L	328 ± 32	420 ± 09*
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	342 ± 18	367 ± 12
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	400 ± 10	418 ± 11
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	357 ± 11	339 ± 16
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	356 ± 20	328 ± 14
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	336 ± 08	364 ± 11
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	368 ± 10	380 ± 12
eNOS ^{-/-} -C	334 ± 21	314 ± 19
eNOS ^{-/-} -NdF	362 ± 11	330 ± 07*

Groups	EDLVD (mm)	
	Day 1	Day 28
WT-C	3.77 ± 0.20	4.10 ± 0.10
WT-NdF	3.68 ± 0.13	4.28 ± 0.07**
WT-R	4.33 ± 0.10	3.93 ± 0.07**
WT-SB	3.87 ± 0.07	3.99 ± 0.09
WT-L	3.51 ± 0.02	4.21 ± 0.02 *
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	4.00 ± 0.10	3.97 ± 0.14
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	3.91 ± 0.08	4.26 ± 0.10 *
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	3.95 ± 0.10	4.02 ± 0.07
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	3.86 ± 0.08	3.92 ± 0.14
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	3.99 ± 0.08	3.94 ± 0.08
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	4.15 ± 0.11	4.22 ± 0.10
eNOS ^{-/-} -C	3.76 ± 0.13	3.80 ± 0.11
eNOS ^{-/-} -NdF	3.78 ± 0.06	3.69 ± 0.08

Groups	ESLVD (mm)	
	Day 1	Day 28
WT-C	2.22 ± 0.50	2.55 ± 0.35
WT-NdF	2.30 ± 0.35	2.50 ± 0.36
WT-R	2.67 ± 0.32	2.49 ± 0.29
WT-SB	2.40 ± 0.25	2.58 ± 0.21
WT-L	2.08 ± 0.88	2.27 ± 0.27
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	2.33 ± 0.21	2.61 ± 0.31 *
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	2.28 ± 0.18	2.71 ± 0.34 **
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	2.59 ± 0.22	2.37 ± 0.19
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	2.30 ± 0.26	2.33 ± 0.37
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	2.34 ± 0.23	2.32 ± 0.29
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	2.52 ± 0.21	2.65 ± 0.38
eNOS ^{-/-} -C	2.16 ± 0.28	2.10 ± 0.21
eNOS ^{-/-} -NdF	2.21 ± 0.13	2.21 ± 0.18

Groups	E/A	
	Day 1	Day 28
WT-C	1.58 ± 0.09	1.59 ± 0.08
WT-NdF	1.65 ± 0.08	2.05 ± 0.14 *
WT-R	1.77 ± 0.09	1.65 ± 0.14
WT-SB	1.85 ± 0.13	1.88 ± 0.10
WT-L	1.73 ± 0.13	1.39 ± 0.19
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	1.92 ± 0.04	1.68 ± 0.08 *
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	1.78 ± 0.14	1.94 ± 0.16
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	1.69 ± 0.07	2.12 ± 0.13 *
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	1.84 ± 0.12	2.12 ± 0.12
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	1.89 ± 0.14	1.74 ± 0.11
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	1.95 ± 0.11	1.85 ± 0.15
eNOS ^{-/-} -C	1.52 ± 0.06	1.60 ± 0.08
eNOS ^{-/-} -NdF	1.68 ± 0.15	1.63 ± 0.09

Groups	EF (%)	
	Day 1	Day 28
WT-C	74.5 ± 2.8	74.0 ± 1.9
WT-NdF	78.1 ± 3.0	78.4 ± 1.8
WT-R	74.3 ± 1.9	72.4 ± 2.1
WT-SB	73.2 ± 2.1	71.0 ± 1.8
WT-L	76.3 ± 3.1	72.1 ± 8.9
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	78.9 ± 1.1	72.7 ± 1.8 **
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	78.7 ± 1.2	72.4 ± 1.6 **
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	69.9 ± 1.5	77.3 ± 1.9
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	77.5 ± 1.7	77.1 ± 2.2 *
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	78.0 ± 1.3	77.7 ± 1.9
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	76.6 ± 1.5	74.1 ± 2.3
eNOS ^{-/-} -C	79.7 ± 1.5	81.9 ± 1.0
eNOS ^{-/-} -NdF	77.9 ± 1.7	76.7 ± 1.4

Groups	SF (%)	
	Day 1	Day 28
WT-C	37.9 ± 2.5	38.1 ± 1.6
WT-NdF	39.8 ± 2.2	41.9 ± 1.7
WT-R	38.8 ± 1.6	36.7 ± 1.7
WT-SB	37.2 ± 1.7	35.4 ± 1.3
WT-L	40.3 ± 2.7	44.0 ± 2.3
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	41.9 ± 1.0	36.8 ± 1.4 **
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	41.8 ± 1.3	36.6 ± 1.3 **
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	34.7 ± 1.0	40.9 ± 1.7 **
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	41.0 ± 1.8	40.9 ± 2.0
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	41.1 ± 1.3	41.1 ± 1.8
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	40.0 ± 1.3	38.0 ± 2.0
eNOS ^{-/-} -C	42.7 ± 1.5	44.8 ± 1.0
eNOS ^{-/-} -NdF	41.2 ± 1.4	40.1 ± 1.1

Groups	LV mass (mg)	
	Day 1	Day 28
WT-C	103.0 ± 8.4	102.7 ± 9.5
WT-NdF	97.4 ± 4.3	103.1 ± 8.7
WT-R	104.7 ± 4.6	84.6 ± 3.8 **
WT-SB	71.8 ± 3.0	74.2 ± 3.0
WT-L	105.1 ± 6.9	77.4 ± 5.2 **
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	88.8 ± 3.9	75.2 ± 3.9 *
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	85.5 ± 4.5	100.9 ± 7.1
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	79.8 ± 7.6	78.4 ± 4.1
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	84.5 ± 3.4	76.4 ± 6.6
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	79.9 ± 2.9	73.3 ± 3.6
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	90.4 ± 4.6	90.9 ± 4.4
eNOS ^{-/-} -C	66.4 ± 10.5	59.1 ± 8.2
eNOS ^{-/-} -NdF	67.3 ± 11.2	53.7 ± 3.7

Groups	PWT (mm)	
	Day 1	Day 28
WT-C	0.761 ± 0.019	0.729 ± 0.017
WT-NdF	0.766 ± 0.024	0.647 ± 0.040 *
WT-R	0.640 ± 0.013	0.599 ± 0.020
WT-SB	0.529 ± 0.011	0.505 ± 0.008
WT-L	0.797 ± 0.017	0.527 ± 0.029 ***
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	0.639 ± 0.013	0.568 ± 0.007 ***
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	0.640 ± 0.016	0.634 ± 0.021
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	0.581 ± 0.033	0.539 ± 0.017
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	0.636 ± 0.017	0.558 ± 0.017 **
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	0.579 ± 0.012	0.515 ± 0.013
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	0.592 ± 0.013	0.601 ± 0.010
eNOS ^{-/-} -C	0.519 ± 0.015	0.482 ± 0.150
eNOS ^{-/-} -NdF	0.539 ± 0.029	0.448 ± 0.012 *

Groups	SWT (mm)	
	Day 1	Day 28
WT-C	0.789 ± 0.017	0.723 ± 0.034
WT-NdF	0.775 ± 0.019	0.665 ± 0.031 **
WT-R	0.680 ± 0.014	0.673 ± 0.020
WT-SB	0.613 ± 0.012	0.619 ± 0.009
WT-L	0.808 ± 0.024	0.555 ± 0.020 ***
5-HT _{2A} ^{-/-} -C	0.649 ± 0.015	0.575 ± 0.009 ***
5-HT _{2A} ^{-/-} -NdF	0.647 ± 0.015	0.659 ± 0.022
5-HT _{2B} ^{-/-} -C	0.614 ± 0.038	0.623 ± 0.015
5-HT _{2B} ^{-/-} -NdF	0.664 ± 0.009	0.608 ± 0.017 *
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -C	0.612 ± 0.011	0.616 ± 0.009
5-HT _{2A/2B} ^{-/-} -NdF	0.648 ± 0.013	0.617 ± 0.009
eNOS ^{-/-} -C	0.577 ± 0.014	0.523 ± 0.015 *
eNOS ^{-/-} -NdF	0.623 ± 0.022	0.562 ± 0.009 *

4. Étude comparative des lésions induites par la nordexfenfluramine avec celles provoquées par un autre agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, le BW723C86

Rationnel : Nous avons précédemment démontré que l'administration chronique de la NdF, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}, était capable d'induire des lésions valvulaires chez la souris. Cependant, une étude ayant porté sur le criblage à grande échelle de plus de 2200 molécules (médicaments approuvés par la FDA et autres molécules expérimentales) (Huang et al., 2009) a montré qu'une même molécule agoniste des récepteurs 5-HT_{2B} pouvait se comporter comme agoniste partiel ou entier sur différentes voies de couplage. Ainsi, par rapport à la 5-HT (pKi 7,9 - 8,4), la NdF (pKi 8) et le BW723C86 (pKi 7,3 - 8,6), deux agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT_{2B} présentent des profils similaires en ce qui concerne le niveau d'activation du flux calcique, du facteur de transcription NFAT, de la phosphorylation de ERK et de l'accumulation d'inositol phosphate. Au contraire, si comme la 5-HT, le BW723C86 se comporte comme un agoniste entier pour le recrutement de la β -arrestine (100%), la NdF ne recrute que partiellement cette protéine (52%) (Tableau 7).

Le recrutement de la β -arrestine joue un rôle important dans l'initiation des voies de signalisation médiées par différents ligands interagissant avec un même RCPG et la modulation de l'effet physiologique (désensibilisation et internalisation du récepteur). Ces voies impliquent pour les ligands capables de recruter la β -arrestine, une signalisation intracellulaire canonique médiée par la protéine G associée au récepteur, mais aussi une stimulation collatérale β -arrestine-dépendante, fonction du type de GRK (G protein Receptor Kinase) (GRK1 à GRK7) activé et de la conformation du récepteur (Reiter et al., 2012) (Figures 28 et 29).

Sur le plan pharmacochimique, la NdF possède le motif amphétaminique alors que le BW723C86 possède comme la 5-HT un motif indolique (Figure 30). Suivant l'hypothèse que chaque molécule agoniste des récepteurs 5-HT_{2B} peut activer, en fonction de son pharmacophore, une conformation active donnée et de ce fait différentes voies de signalisation, nous nous proposons d'étudier l'importance du motif amphétaminique porté par la NdF dans l'induction des lésions en comparant dans nos conditions expérimentales son effet avec le BW723C86, une autre molécule sélective, agoniste des récepteurs 5-HT_{2B} mais ne possédant pas le motif amphétaminique.

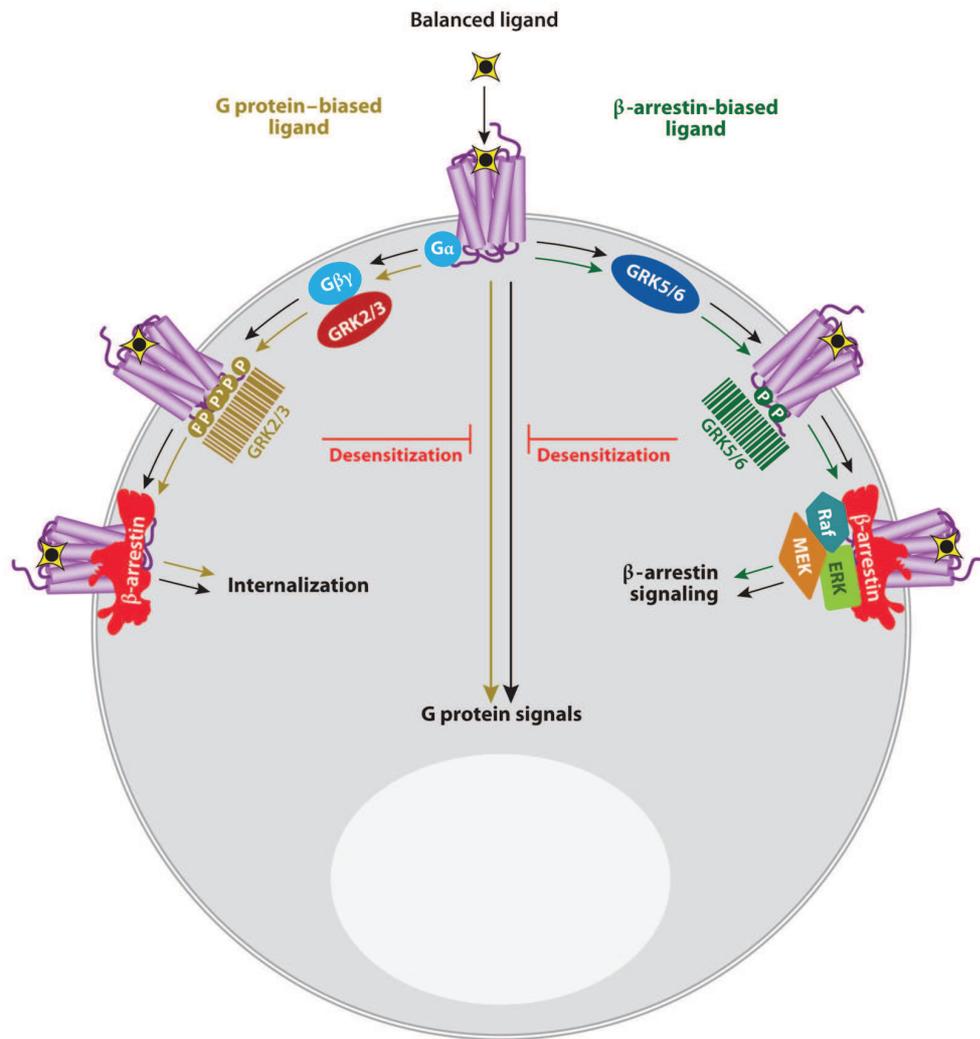


Figure 28. Modulation de la signalisation induite par un ligand interagissant avec un RCPG par le recrutement de la β -arrestine (d'après Reiter et al, 2012)

L'interaction d'un ligand avec un RCPG induit une conformation spécifique du récepteur. La phosphorylation des RCPGs à l'extrémité C-terminale par les GRKs (code- barres) active sélectivement en fonction de la conformation induite par l'interaction avec le ligand, une signalisation intracellulaire spécifique médiée par la β -arrestine. La phosphorylation induite par GRK2/3 dépendante de la protéine G β conduit à une désensibilisation et à l'internalisation du récepteur, tandis que GRK5/6 indépendante de la protéine G active des partenaires multiples comme les MAP kinases.

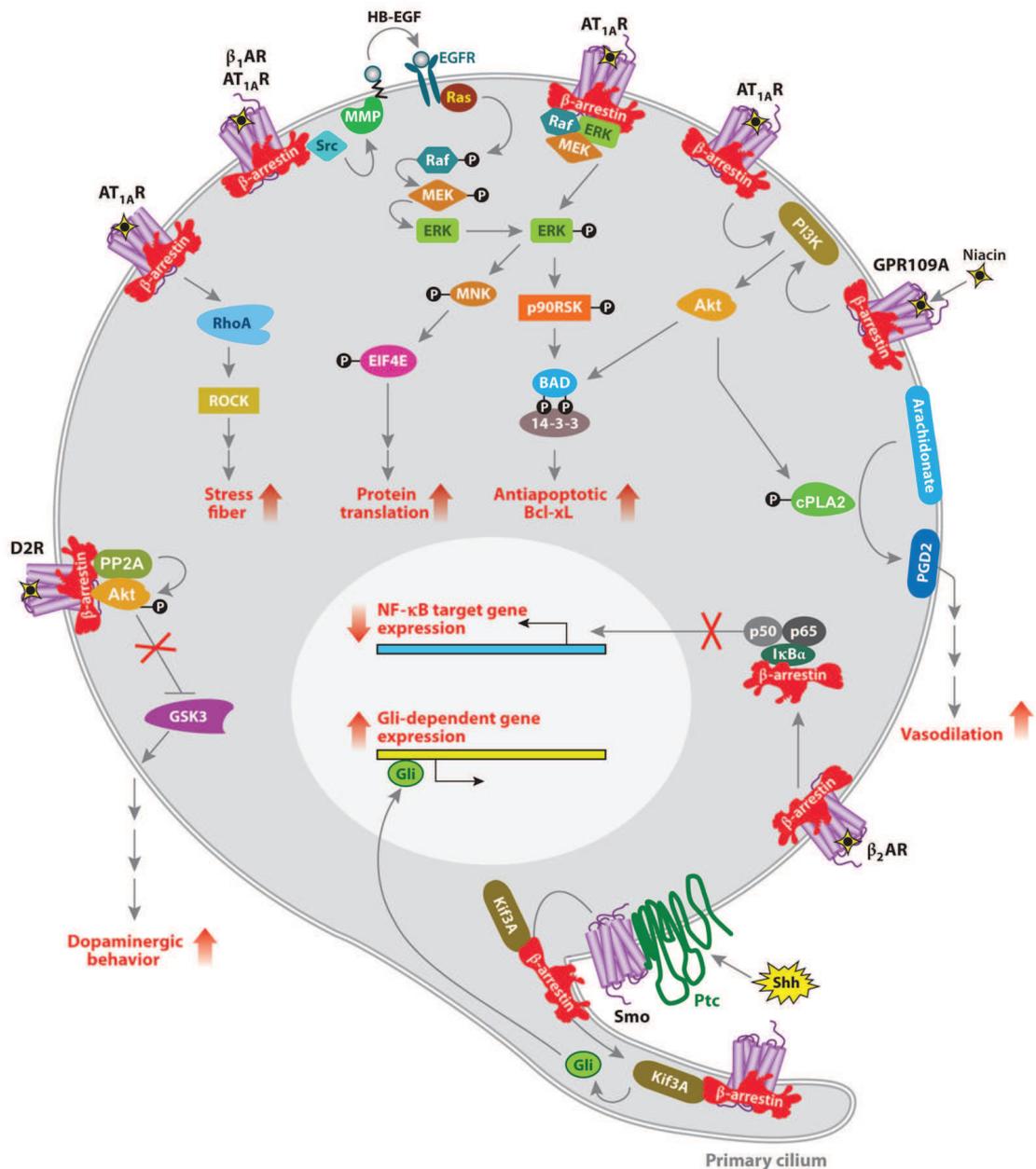


Figure 29. Diversité des voies de signalisation associées à la β -arrestine (d'après Reiter et al, 2012).

De nombreux ligands interagissant avec les RCPGs sont capables de recruter la β -arrestine. Les voies de signalisations intracellulaires sont multiples et peuvent aboutir à la régulation du niveau d'expression de certains gènes, à la synthèse des fibres du stress, à la vasodilatation et au contrôle de la viabilité cellulaire.

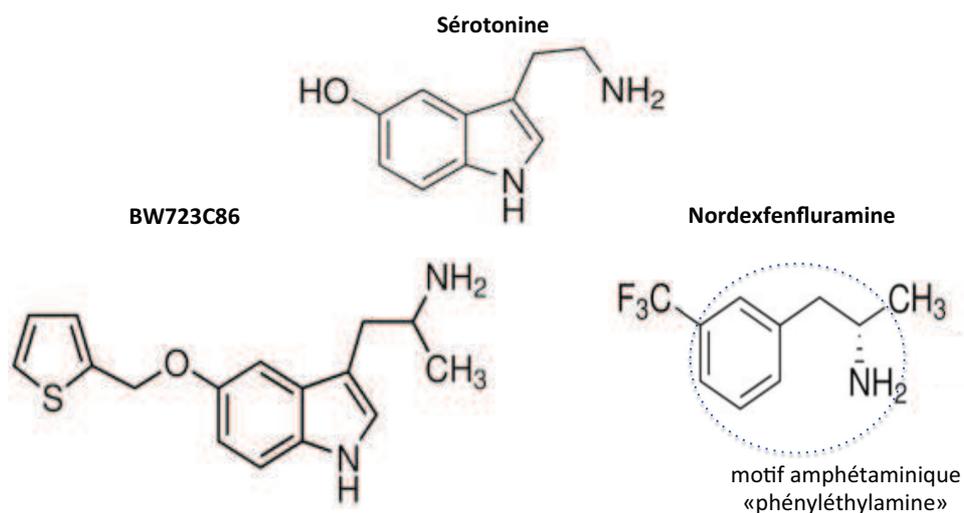


Figure 30. Structure moléculaire de la sérotonine, de la nordexfenfluramine et du BW723C86

Tableau 7. Caractéristiques pharmacologiques (efficacité et puissance) de la 5-HT, de la NdF et du BW723C86 sur certaines des voies de couplage des récepteurs 5-HT_{2B} (d'après Reiter et al., 2012)

Paramètres	5-HT		BW723C86		NdF	
	E _{max} %	pCE ₅₀	E _{max} %	pCE ₅₀	E _{max} %	pCE ₅₀
Influx calcique	100 ± 0,7	8,75 ± 0,03	92,9 ± 0,9	8,85 ± 0,03	107,4 ± 0,6	8,61 ± 0,02
Activité NFAT	100 ± 2	9,14 ± 0,05	96 ± 2	8,23 ± 0,05	101 ± 2	7,81 ± 0,04
pERK	100	9,43 ± 0,02	65,3 ± 0,8	9,04 ± 0,04	75 ± 1	8,85 ± 0,04
Recrutement β-arrestine	100 ± 2	7,78 ± 0,06	100 ± 2	6,18 ± 0,05	52 ± 1	6,89 ± 0,05
Accumulation inositol-phosphate	100 ± 1	7,97 ± 0,03	89,5 ± 0,6	7,58 ± 0,02	84 ± 2	6,73 ± 0,06

Méthodes : Le protocole expérimental est le même que celui décrit au point 2 de ce chapitre (2. Études expérimentales chez la souris). Les souris reçoivent une injection intrapéritonéale quotidienne du BW723C86 (3 mg/kg/jour pendant 28 jours dilué dans de l'eau ultrapure).

Résultats : Le tableau 8 compare les résultats du dosage de la 5-HT sanguine et du 5-HIAA urinaire entre les groupes de souris contrôles (WT-C), traités avec la NdF (WT-NdF) et traités avec le BW723C86 (WT-BW). Tout comme les souris WT-NdF, les WT-BW présentent une augmentation significative du 5-HIAA urinaire sans modification significative de la 5-HT sanguine.

Tableau 8. Dosage de la 5-HT sanguine et du 5-HIAA urinaire

PARAMETRES	WT-C	WT-NdF	WT-BW
5-HT sanguine (µg/L)	1930 ± 163 (n=9)	1801 ± 81 (n=10)	2159 ± 151 (n=8)
5-HIAA urinaire (µmol/L)	36 ± 7 (n=10)	64 ± 5* (n=9)	64 ± 9* (n=8)

*p<0,05 ANOVA, post-hoc Bonferroni test WT-C vs WT-NdF ou WT-BW ; n = nombre de souris

Après le sacrifice des souris, l'évaluation du rapport masse du cœur/poids corporel donne des valeurs très proches ; ce qui signe l'absence d'une hypertrophie cardiaque chez ces souris (Tableau 9). L'analyse histologique des feuillets valvaires mitraux des différentes souris ne montre aucune lésion de remodelage dans le groupe WT-BW. Les feuillets valvulaires, à l'opposé des souris du groupe WT-NdF sont quasi-similaires au groupe WT-C (Tableau 9). La figure 31 présente les aspects histologiques représentatifs des feuillets valvulaires des 3 groupes expérimentaux.

Tableau 9. Évaluation du remodelage cardiaque et analyse histologique des valves

PARAMETRES		WT-C	WT-NdF	WT-BW
Rapport poids du cœur/poids corporel (mg/g)		5,38 ± 0,23 (n=10)	5,41 ± 0,29 (n=10)	5,27 ± 0,09 (n=9)
Analyse histologique	Épaisseur (µm)	35 ± 3 (n=8)	69 ± 9* (n=10)	41 ± 3# (n=9)
	Cellularité endothéliale (cellules/0,01 mm ²)	16 ± 1 (n=8)	24 ± 3* (n=7)	17 ± 1# (n=9)
	Cellularité interstitielle (cellules/0,01 mm ²)	47 ± 3 (n=8)	53 ± 8 (n=10)	39 ± 2 (n=8)

*p<0,05 ANOVA, post-hoc Bonferroni test WT-C vs WT-NdF ou WT-BW

#p<0,05 ANOVA, post-hoc Bonferroni test WT-NdF vs WT-BW ; n = nombre de souris

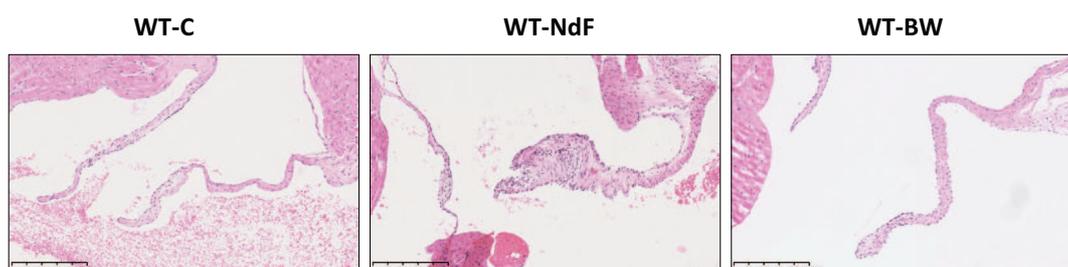


Figure 31. Aspects histologiques des feuillets valvulaires mitraux des souris

Barre d'échelle 250 µm

Discussion : Nous pouvons déduire de ces résultats que (1) pour un agoniste sélectif du récepteurs 5-HT_{2B}, la présence du motif “amphétaminique” n’est pas nécessaire pour augmenter le cycle métabolique de la 5-HT et que (2) le motif moléculaire de la NdF (son pharmacophore) doit activer le récepteur 5-HT_{2B} d’une manière propre à induire des voies de couplage non stimulées par le BW723C86 et qui provoqueraient une valvulopathie. Une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes en jeu serait la détermination des types cellulaires qui répondent à cette stimulation et les voies de signalisations potentiellement impliquées.

À notre connaissance, aucune étude publiée à ce jour dans la littérature n’a évalué l’effet de l’administration chronique du BW723C86 sur une période allant jusqu’à 28 jours chez la souris. La plupart des études procédant à une administration de courte durée utilisent des doses allant de 3 à 30 mg/kg/jour. À ces doses aucune toxicité, ni souffrance n’ont été mentionnées chez la souris. Nos souris traitées à la dose de 3 mg/kg/jour, tolèrent également ce traitement et ne présentent aucun effet toxique. Une preuve indirecte du niveau d’activation des récepteurs 5-HT_{2B} est donnée par la régulation de SERT entraînant une activation similaire du cycle métabolique de la 5-HT par le BW723C86 et la NdF. En effet, il a été montré que ces molécules sont capables de phosphoryler SERT par un mécanisme dépendant de la PKC et/ou de la voie PKG/NO (Launay et al., 2006). Cependant, le BW723C86 et la NdF sont capables d’interagir directement avec SERT. Le BW723C86 occasionnerait une augmentation de la 5-HT périphérique par une inhibition de la capture par les plaquettes alors que la NdF activerait à l’opposé une décharge plaquettaire (Rothman et al., 2010). Cela dit, nous avons pu montrer dans notre groupe traité par la pCPA (inhibiteur de la TPH1) que la libération et/ou l’inhibition de la capture de la 5-HT n’intervenaient pas dans la valvulopathie due à la NdF. Il s’agit donc bien des modalités de l’interaction du ligand avec le récepteur 5-HT_{2B} qui conditionne le développement ou pas de lésions valvulaires. Nous souhaitons tester le rôle du recrutement de la β -arrestine (sous l’hypothèse d’un effet protecteur) par l’évaluation de la réponse des souris invalidées pour les deux sous-types ubiquitaires de la β -arrestine (β -arrestine-1 et 2) à la suite d’un traitement par le BW723C86 et la NdF. Cette évaluation pourra être complétée par l’étude des effets du traitement d’un groupe de souris sauvages par un inhibiteur des GRK (responsable du blocage en amont du recrutement de la β -arrestine) comme le 4-amino-5-(bromométhyl)-2-méthylpyrimidine.

Partie 2: Étude des mécanismes impliquant la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} et la eNOS dans un modèle de cellules endothéliales humaines provenant des veines du cordon ombilical (HUVEC)

1. Introduction

Nous avons démontré dans la première partie de nos travaux que 1) la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} était à l'origine des lésions valvulaires induites par la nordexfenfluramine et que 2) l'inhibition de la eNOS était suffisante pour empêcher la survenue des lésions.

Ces lésions sont caractérisées par une augmentation de la densité des cellules endothéliales couvrant la matrice valvulaire. Les cellules endothéliales expriment les récepteurs 5-HT_{2B} et la eNOS. Nous avons donc considéré qu'il était important de mieux comprendre l'effet de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} sur les cellules endothéliales et leur lien avec la eNOS.

Nous avons émis comme hypothèse, que les lésions valvulaires pourraient dans leurs stades initiaux s'expliquer par une stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} des cellules endothéliales qui à son tour activerait la eNOS et favoriserait soit leur prolifération, soit leur trans-différenciation en myofibroblastes à l'origine du remodelage ultérieur de la valve.

La eNOS est l'une des 3 isoformes (NOS neuronale, inductible et endothéliale) de la famille des synthétases du monoxyde d'azote (NOS). Son expression est codée chez l'homme par un gène situé sur le domaine chromosomique 7q35-36. Elle a un poids moléculaire de 135 kDa et possède 1294 acides aminés. Elle est exprimée spécifiquement dans le placenta, les plaquettes sanguines, le foie et les reins. Elle est retrouvée de façon prépondérante dans les cellules endothéliales et accessoirement chez l'homme dans les cellules neuronales, les astrocytes, les lymphocytes T, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les fibroblastes dermiques (Marsden et al., 1993).

Nous avons choisi de tester notre hypothèse en utilisant une lignée de cellules endothéliales humaines provenant des veines du cordon ombilical (HUVEC). Ces investigations permettront dans un premier temps de valider l'hypothèse de l'implication des cellules endothéliales et le lien probable avec l'activation de la eNOS et par la suite faciliter la compréhension du phénomène sur le plan moléculaire. A terme, ces travaux pourraient contribuer à établir un modèle stable prédictif du risque d'induction de lésions valvulaires dans les stades précoces du développement des médicaments, d'étudier les voies de couplage

intracellulaire et aussi d'initier une stratégie pharmacologique pour la prévention du remodelage valvulaire.

Les HUVECs constituent une lignée de cellules endothéliales stable largement utilisée dans la littérature pour étudier de nombreux processus physiologiques impliquant les cellules endothéliales comme par exemple la néovascularisation post-ischémique.

Nous allons dans un premier temps caractériser et valider le phénotype de notre lignée cellulaire (HUVEC) par la recherche de l'expression de l'antigène CD31 (Pecam-1), des récepteurs 5-HT_{2B}, 5-HT_{2A} et de la eNOS. Dans un second temps, nous étudierons l'effet de la stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B} sur l'activation de la eNOS. Enfin, nous étudierons l'effet de cette stimulation sur la prolifération des HUVECs (Figure 32).

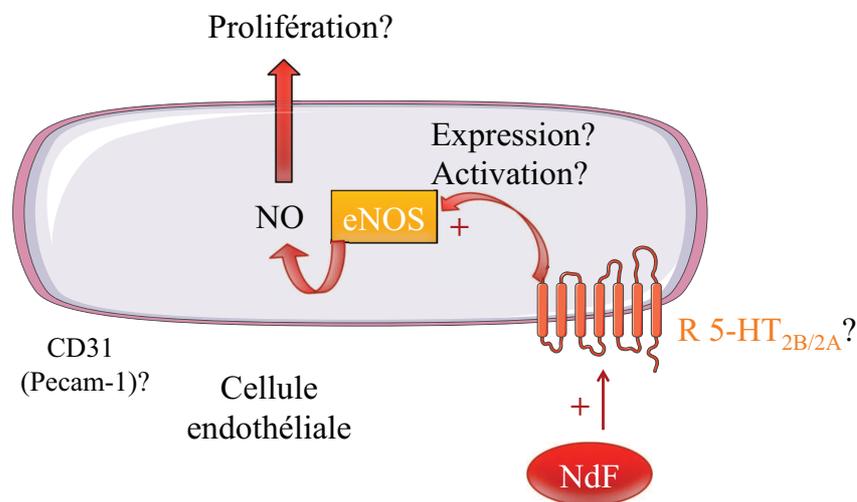


Figure 32. Etude in vitro de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} sur l'activation de la eNOS et la prolifération des cellules endothéliales.

Les points d'interrogation (?) représentent les différentes investigations, la cellule endothéliale à caractériser est la lignée HUVEC.

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire de 25cm² (lors de la mise en culture) ou 75cm² (pour les passages ultérieurs). Elles sont maintenues dans un incubateur à 37°C contenant 90% d'air et 5% de dioxyde de carbone. La manipulation est réalisée de façon aseptique sous une hotte à flux laminaire. La numération des cellules est faite à l'aide du compteur automatique de cellules (Scepter™ 2.0 Automated Cell Counter, Merck-Millipore).

Nous avons utilisé pour nos travaux, une lignée commerciale (référence catalogue SCCE001/ Merck-Millipore) obtenue en premier passage. Le milieu de culture (SCME001 Endogro™-LS Media) est pauvre en sérum bovin pour atténuer l'impact des facteurs de croissance et autres cytokines inflammatoires sur les expériences de prolifération cellulaire et la production des marqueurs biologiques recherchés. Les cellules sont adhérentes à la base du flacon de culture qui est spécialement traité pour faciliter l'adhésion cellulaire (Corning® CellBIND® modified polystyrène surface).

Le repiquage des cellules est réalisé en traitant le tapis cellulaire à confluence (au bout de 3 à 4 jours) par une solution de 0,05% trypsine/0,02% EDTA. Les cellules sont récupérées dans 10 ml de milieu de culture puis centrifugées à 900 tours/minute. Le culot cellulaire obtenu sert à l'ensemencement de nouvelles boîtes selon un ratio de culture 1:4.

2.2. Caractérisation des HUVECs

Nous avons recherché en RT-PCR (voir Annexe 1 pour protocole), l'expression de l'ARNm codant pour la eNOS, les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} par les HUVECs. En immunocytochimie nous avons cherché l'expression de l'antigène CD31 et des récepteurs 5-HT_{2B}. Le tableau 10 présente la séquence des amorces utilisées en RT-PCR et le tableau 11 les caractéristiques des anticorps utilisés en immunocytochimie.

Tableau 10. Séquences des amorces utilisées en RT-PCR

Gènes		Séquences	Taille	Tm (°C)	GC%	PM (bp)
18S	sens	Qiagen QuantiTect QT00199367				149
	antisens					
5-HT _{2A}	sens	TCCTGTTTGTGGTGATGTGG	20	60	50	143
	antisens	TGGGTTGACTGCTGAAGAGA	20	60	50	
5-HT _{2B}	sens	TGCTGGTTGGATTGTTTGTG	20	58	45	127
	antisens	ATGGATGCGGTTGAAAAGAG	20	58	45	
eNOS	sens	Qiagen QuantiTect QT00089033				111
	antisens					

Tm : température de fusion, PM : poids moléculaire, bp : paire de bases

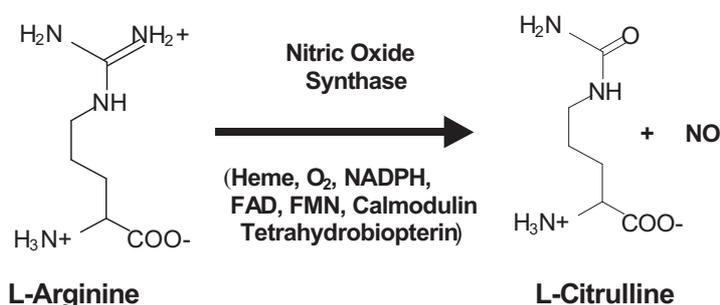
Tableau 11. Caractéristiques des anticorps anti-5-HT_{2B} et CD31 utilisés en immunocytochimie

anticorps		Hôtes	Espèces réactives	Types d'anticorps	dilutions	références
5-HT _{2B}	primaire	souris	homme, rat	monoclonal	1/200	556334 /BD Pharmingen
	secondaire	chèvre	souris	polyclonal conjugué Cy3 (rouge)	1/1000	AP124C/ Millipore
CD31	primaire	lapin	homme, rat, souris	polyclonal	1/200	SC1506/Santa Cruz Technology
	secondaire	chèvre	lapin	polyclonal conjugué Alexa Fluor® 488 (vert)	1/500	AP132JA4/ Millipore

2.3. Evaluation de l'activité de la NO synthase (NOS)

L'activité de la NOS a été évaluée en utilisant le kit de dosage (FCANOS-1, Sigma-Aldrich-France). Ce kit permet d'évaluer indirectement la production du monoxyde d'azote (NO) en mesurant l'activité de la NOS des cellules endothéliales soumises à différentes conditions expérimentales. Au cours du dosage, le substrat L-Arginine est apporté dans un premier temps à l'enzyme (NOS) pour induire la formation de L-Citrulline et de NO. Dans un second temps, une réaction indicatrice utilise le NO produit pour la formation de la triazolofluoresceine (DAF-2T), un composé fluorescent. La DAF-2T est formée à la suite de la dégradation du diacétate de 4,5-diaminofluoresceine (DAF-2 DA) en 2-diaminofluoresceine (DAF2) sous l'action des estérases intracellulaires (Figure 33). Le DAF2 se transforme en DAF-2T sous l'action du NO produit, de l'oxygène et à pH neutre. L'intensité de la production de la DAF-2T est quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre à la longueur d'onde d'excitation de 485 nm et à la longueur d'onde d'émission de 535 nm.

Étape 1 : Évaluation du niveau d'activation de la NOS



Étape 2 : Évaluation de la production du NO

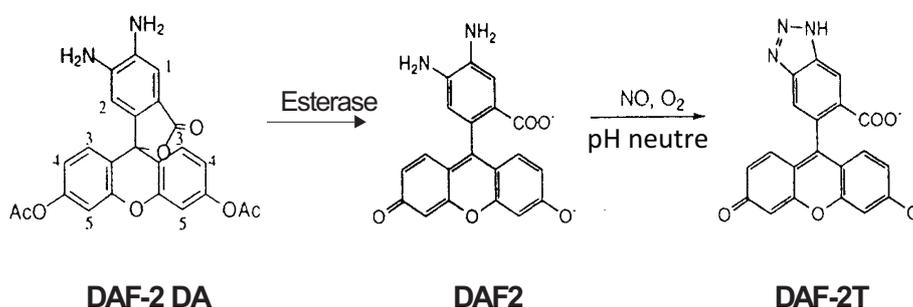


Figure 33. Principe d'évaluation de l'activité des NO synthases

DAF-2 DA (diacétate de 4,5-diaminofluoresceine) ; DAF2 (2-diaminofluoresceine) ;
DAF-2T (triazolofluoresceine)

2.4. Test de prolifération cellulaire (BrdU)

La prolifération cellulaire est évaluée par l'incorporation de la 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) un analogue de la déoxythymidine (dT) s'intégrant au noyau au cours de la phase cellulaire de synthèse de l'ADN (phase S) (Figure 34).

Nos expériences ont été réalisées dans ce protocole avec le kit BrdU Cell proliferation assay Millipore (catalogue N°2752). Dans ce kit, un anticorps primaire monoclonal de souris anti-BrdU est utilisé pour reconnaître le BrdU incorporé dans les cellules pendant la phase S. Cet anticorps est reconnu par un autre anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline G de souris couplé à la peroxydase. L'apport d'un substrat chromogène de la peroxydase (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine ou TMB) génère par oxydation de ce dernier un dérivé coloré (bleu) transformé ensuite en jaune par l'action d'une solution d'acide sulfurique (2,5 N) qui arrête la réaction. Le produit réactionnel jaune est analysé au spectrophotomètre à 450 nm et permet de quantifier l'importance de la prolifération.

Figure 34. Analogie de structure chimique entre la BrdU et la déoxythymidine (dT)

3. Résultats

3.1. Caractérisation des HUVECs

3.1.1. Evaluation de l'expression de la eNOS

Nous avons montré en RT-PCR, que les HUVECs expriment l'ARNm codant pour la eNOS (Figure 35).

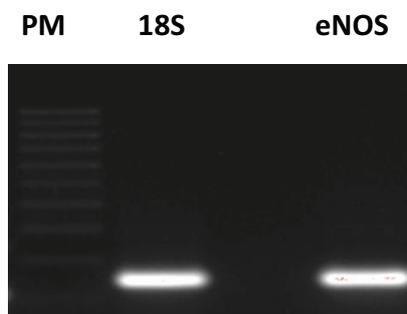
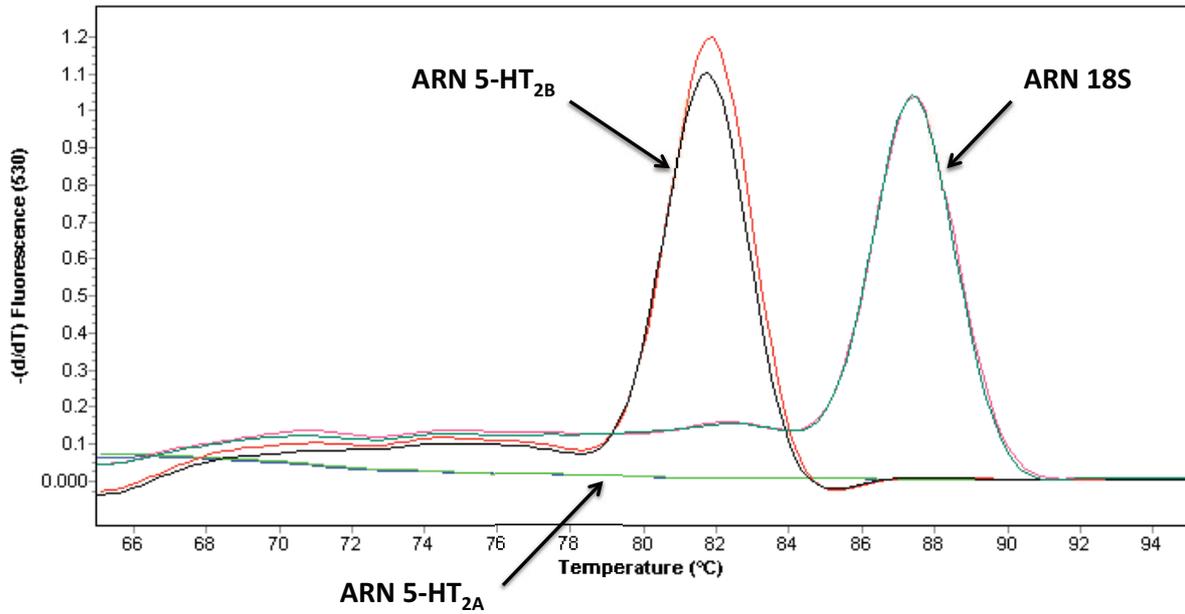


Figure 35. Expression de la eNOS en RT-PCR par les HUVECs
Visualisation sur gel d'agarose 2% ; 18S = ARN ribosomal d'expression relativement stable utilisé comme gène de référence (ou ménage)

3.1.2. Evaluation de l'expression des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}

Notre lignée cellulaire exprime l'ARNm codant pour les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B} mais à l'opposé n'exprime pas ceux codant pour les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A}. Cette spécificité permet d'évaluer sur le plan pharmacologique, la seule contribution des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B} endothéliaux dans la réponse induite par la nordexfenfluramine (Figure 36).

Courbe de fusion



Gel d'agarose 2%

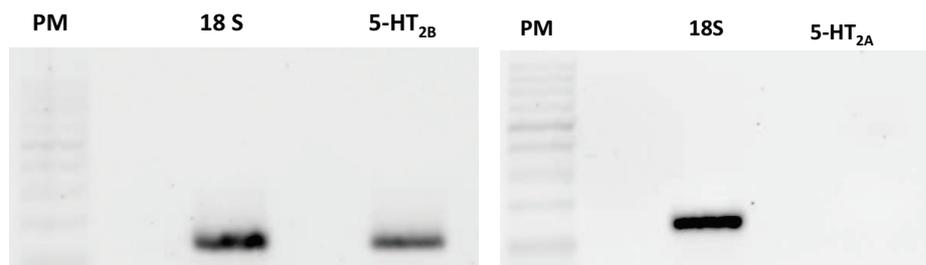


Figure 36. Recherche de l'expression de l'ARNm codant pour les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} dans les HUVECs.

18S = ARN ribosomal d'expression relativement stable utilisé comme gène de référence (ou ménage)

3.1.3. Evaluation de l'expression protéique de l'antigène CD31 et des récepteurs 5-HT_{2B}

Nous avons détecté en immunocytochimie l'expression de l'antigène CD31 et des récepteurs 5-HT_{2B} à la surface des HUVECs (Figure 37).

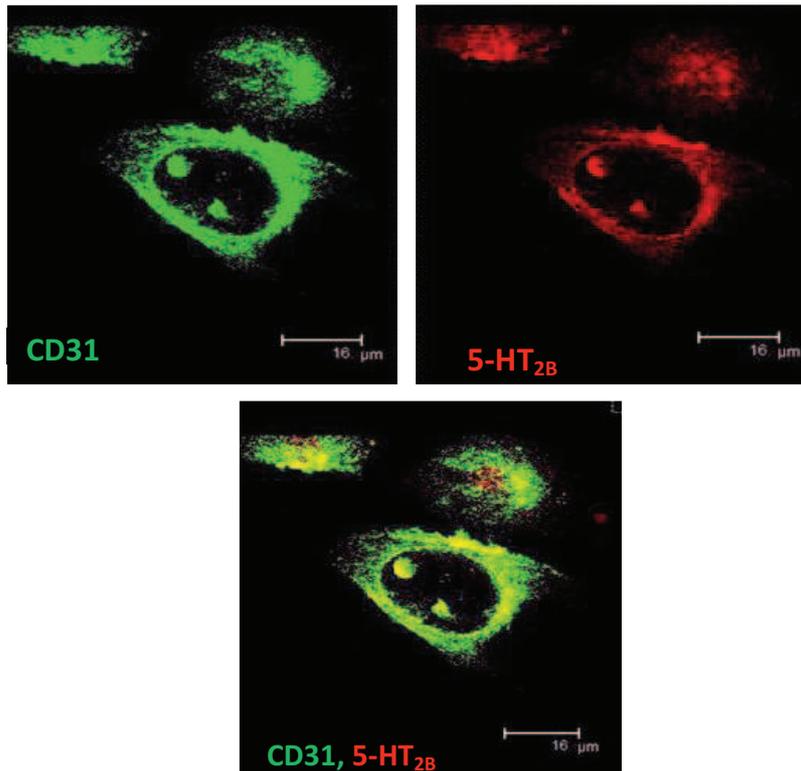


Figure 37. Expression de l'antigène CD31 et des récepteurs 5-HT_{2B} par les HUVECs

Barre d'échelle 16 μ m

En résumé, nous avons montré que notre lignée HUVEC possède effectivement un phénotype de cellule endothéliale. Elles expriment l'ARNm codant pour la eNOS et les récepteurs 5-HT_{2B}. De plus, elles expriment en immunocytochimie, l'antigène CD31 (marqueur spécifique des cellules endothéliales) et les récepteurs 5-HT_{2B}.

3.2. Etude du couplage fonctionnel de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} et la production de NO

Nous avons recherché l'effet de la stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B} sur l'activation de la eNOS. Les résultats des différentes expériences de validation des conditions analytiques (choix de la quantité de cellules, optimisation des longueurs d'onde analytiques) sont présentés en annexe (Annexe 2). L'activité NOS est évaluée au bout de 2 heures dans nos conditions expérimentales.

Nous avons testé trois concentrations différentes de NdF (10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} mol/L) pour évaluer l'effet de la NdF sur l'activation de la eNOS. Pour cette expérience, un culot de 10.000 cellules estensemencé dans des plaques 96 puits à fond noir. Après deux heures, les cellules sont traitées avec la NdF aux différentes concentrations pendant deux heures supplémentaires. Au bout de 4 heures au total, on procède à la détection de l'activité de la NO synthase dans les HUVECs (Figure 38).

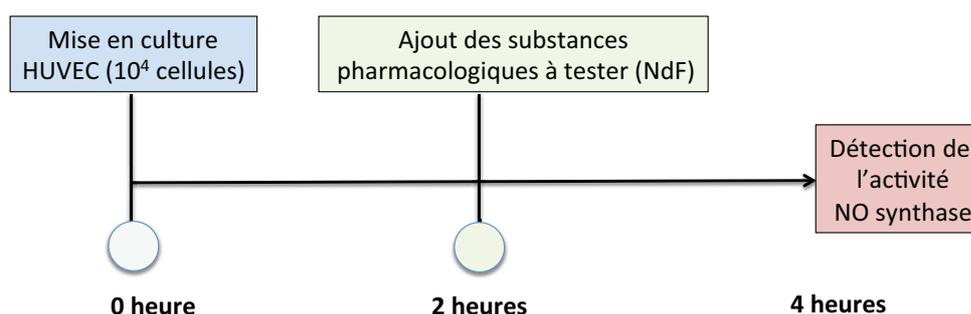


Figure 38. Conditions expérimentales d'étude de l'activation de la eNOS

Avant d'évaluer l'effet de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B}, nous avons montré dans un premier temps, que le signal analytique obtenu est le reflet de l'activité de la NO synthase. Pour ce faire, les cellules sont traitées pendant la phase de détection de l'activité NOS par le L-NAME (inhibiteur non sélectif) et par le diphenyleiodonium (DPI ; inhibiteur spécifique de la NOS inductible) (Figure 39).

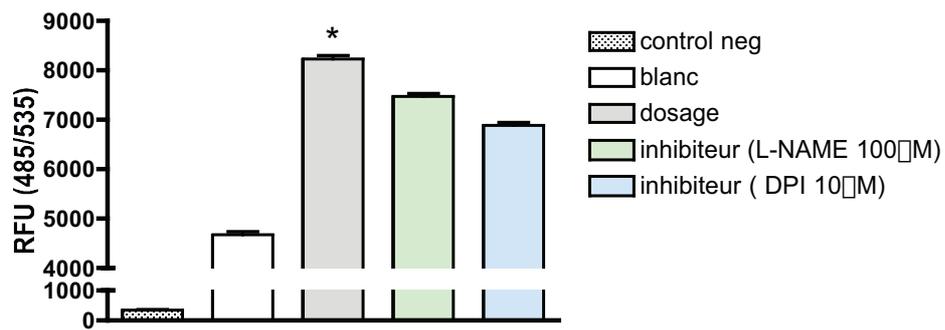


Figure 39. Validation de la spécificité de mesure

Diphenyleneiodonium (DPI) : inhibiteur spécifique de la NOS inducible ;

L-NAME : inhibiteur non sélectif de la NOS (endothéliale, neuronale et inducible) ;

* $p < 0.05$ ANOVA, post-test Bonferonni dosage vs blanc et dosage vs inhibiteurs (L-NAME et DPI). Nombre de cellules (10.000).

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons enregistré aucune variation de l'activité de la NOS des HUVECs (Figure 40) lors du traitement par différentes concentrations de NdF (100 nM, 1µM et 10µM).

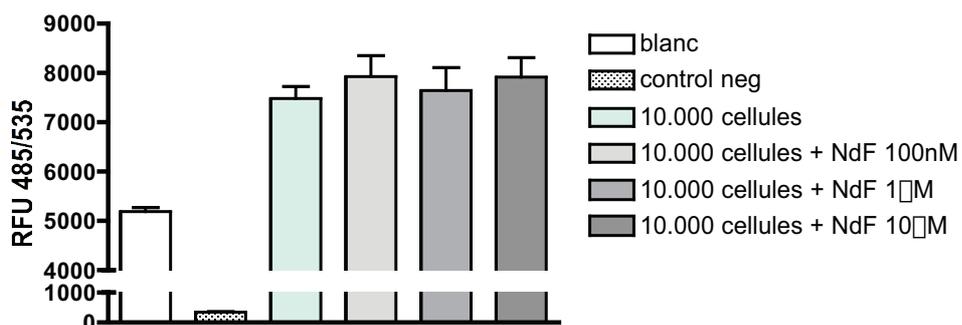


Figure 40. Effet de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} endothéliaux sur l'activation de la NO synthase (cellules HUVECs)

3.3. Etude de l'influence de la stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B} sur la prolifération des HUVECs

Pour la validation du test BrdU, les cellules sont mises en culture pour 24 heures et sont traitées à T (temps) = 0 heure par la BrdU. Cette dernière s'incorpore pendant 24 heures. On note une différence statistiquement significative aux différentes quantités de cellules utilisées en comparaison au contrôle négatif (cellules - BrdU), au blanc expérimental (sans cellule + BrdU) et en situation apoptotique (cellules + DMSO 20% + BrdU). Nous avons donc une bonne sensibilité du test déjà avec 5.000 cellules pour un temps d'incorporation de 24 heures (Figure 41).

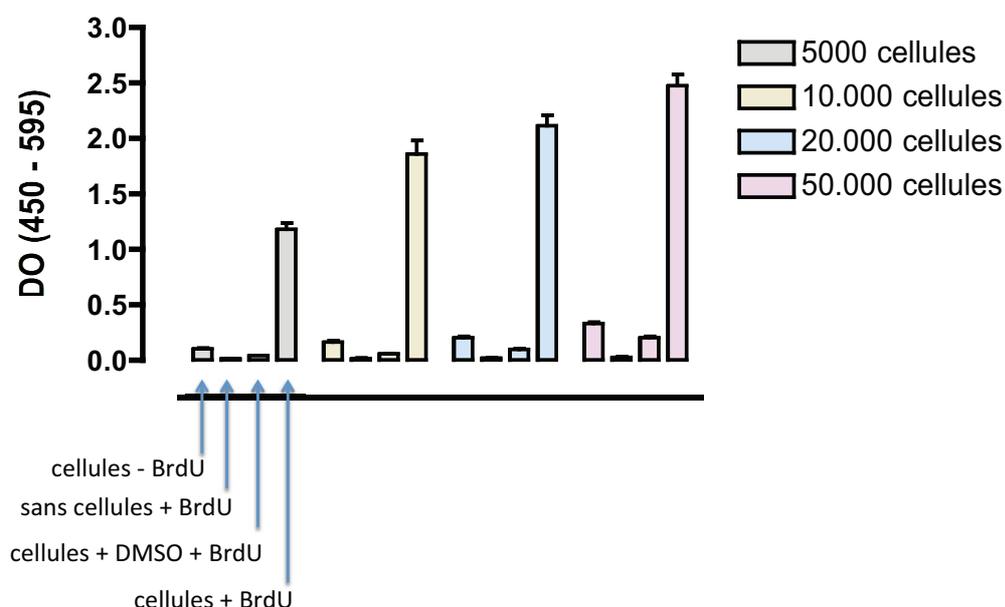


Figure 41. Validation du test BrdU

Nous avons cherché à optimiser le temps d'incorporation du BrdU au cours des 24 heures de culture en testant des quantités de cellules inférieures ou égales à 5.000 (1.000 ; 3000 et 5000 cellules) afin de voir la variation du signal analytique. Ainsi, nous avons testé 4, 8, 16 et 24 heures d'incorporation de BrdU (Figure 42).

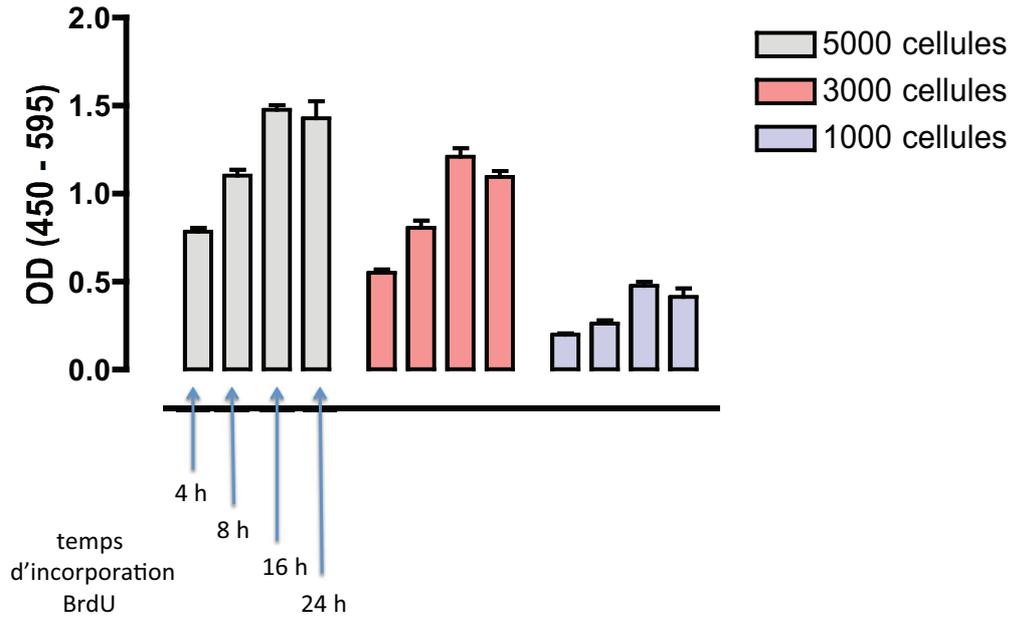


Figure 42. Détermination du temps optimal d'incorporation de la BrdU et choix du nombre de cellules

Une incorporation de 4 heures pour 1.000 cellules est suffisante pour avoir un signal analytique de base pouvant refléter l'activité mitotique. Nous avons ainsi choisi, de faire nos expériences en ensemençant 1.000 cellules et en adoptant 4 heures d'incorporation de BrdU

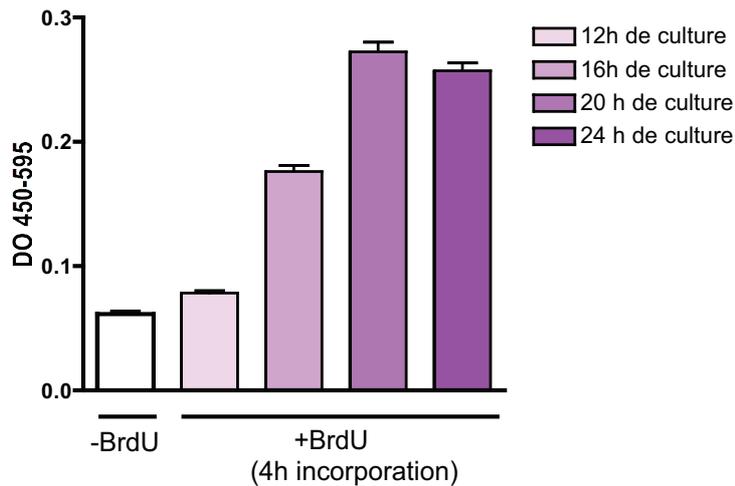


Figure 43. Détermination du temps optimal de culture (1000 cellules)

La sensibilité du test diminue après de 20h de culture.

Pour le test pharmacologique, 1000 cellules sontensemencées dans les plaques 96 puits. Quatre schémas expérimentaux ont été utilisés (Figure 44). La BrdU et la nordexfenfluramine (10^{-6} et 10^{-7} mol/L) sont ajoutés 4 heures avant la fin de la culture. Les cellules ont été cultivées pendant 12, 16, 20 et 24 heures

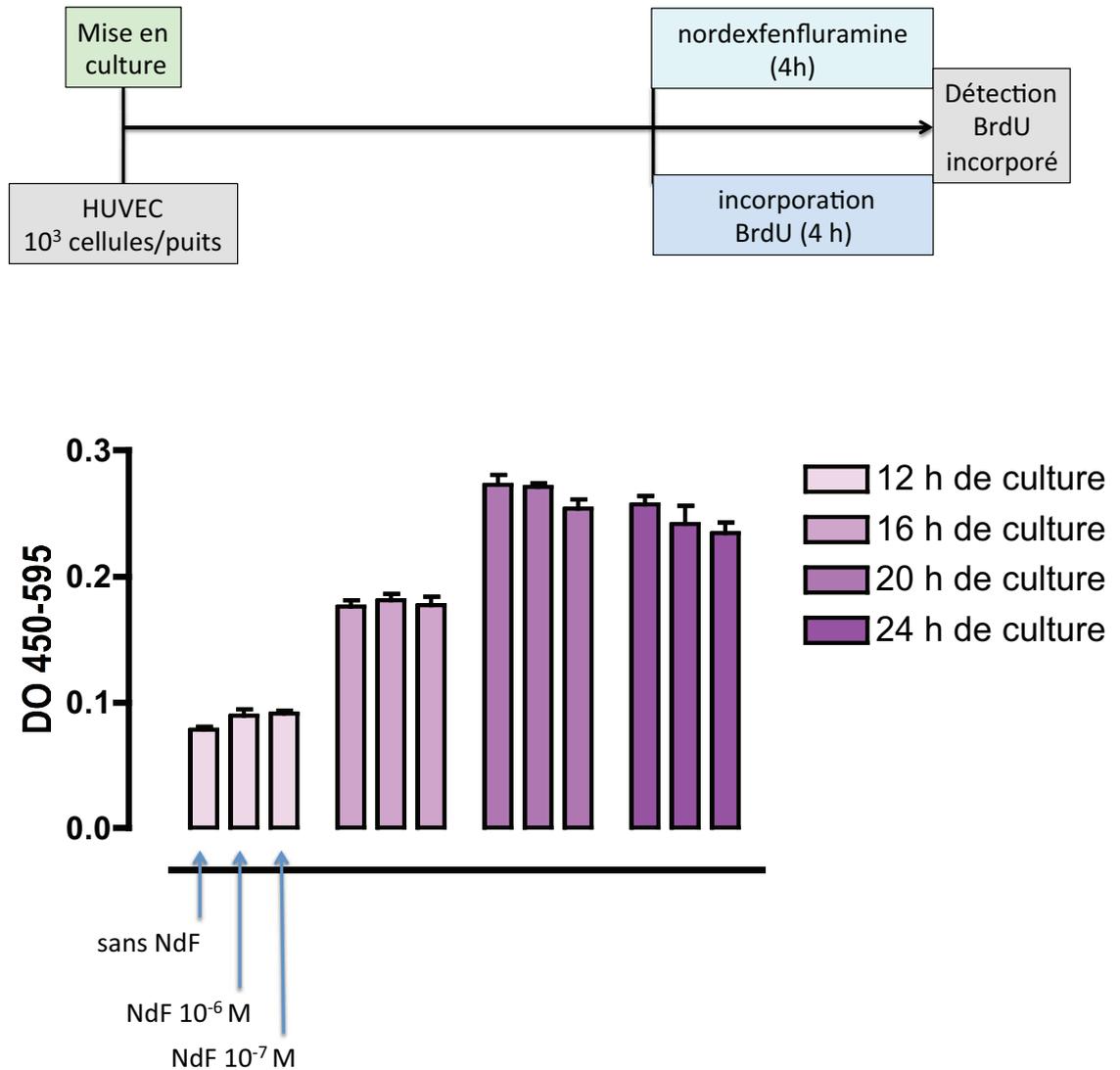


Figure 44. Évaluation de l'effet de la nordexfenfluramine sur la prolifération des HUVECs

Les cellules traitées par deux concentrations différentes de NdF (10^{-7} et 10^{-6} mol/L) dans nos conditions expérimentales montrent une activité mitotique identique dans les différentes conditions expérimentales (Figure 44).

Nous pouvons ainsi dire que la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} des HUVECs en passage précoce dans nos conditions expérimentales, n'induit pas une augmentation de leur prolifération.

4. Discussion

Les expériences menées dans cette partie de nos travaux montrent que la stimulation par la N_DF des récepteurs 5-HT_{2B} de la lignée cellulaire endothéliale mature HUVEC n'entraîne pas une modification de l'activation de la NOS et de la prolifération. Pour analyser ces résultats, il convient de mieux comprendre le fonctionnement du système sérotoninergique exprimé par les HUVECs, de discuter du rôle des récepteurs 5-HT_{2B} dans la prolifération cellulaire et du choix du modèle cellulaire.

4.1. Système sérotoninergique des HUVECs et rôles physiologiques

Une brève revue de la littérature, rapporte la présence des récepteurs 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} et 5-HT₄ dans les HUVECs (Schoeffter et al., 1995; Asada et al., 2009a; Nishikawa et al., 2010). Une étude publiée sur le rôle de la 5-HT et des récepteurs 5-HT_{2B} dans l'angiogenèse tumorale, utilisant la lignée cellulaire HUVEC a montré l'absence de l'ARNm codant pour les récepteurs 5-HT_{2A} mais par contre, la présence de l'ARNm (RT-PCR), puis l'expression protéique (Western blot) des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Ces résultats sont confirmés par nos expériences qui attestent de la présence des ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2B} et de l'absence de ceux codant pour les récepteurs 5-HT_{2A}. En ce qui concerne les récepteurs 5-HT_{2C}, il n'existe pas de données dans la littérature sur leur localisation précise en périphérie dans le système cardiovasculaire de même que leur rôle physiologique. L'ARNm et le récepteur 5-HT_{1D} ont été identifiés dans les HUVECs (Schoeffter et al., 1995). La stimulation des récepteurs 5-HT_{1D} des HUVECs par le sumatriptan (pKi 8,0 – 8,7) ou par la 5-HT elle-même entraîne une libération de facteur von Willebrand contenu dans les corps de Weidel Palade (Schlüter and Bohnensack, 1999). Le facteur von Willebrand est connu à son tour pour inhiber l'activité de la eNOS (Singh et al., 2014). Le traitement des HUVECs par le mosapride, un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT₄ (pKi 6,2 - 6,9) (Bender et al., 2000b) provoque l'inhibition de l'angiogenèse et l'arrêt de la croissance cellulaire en maintenant les cellules en interphase (Nishikawa et al., 2010).

Au total, à partir des données de la littérature et de nos résultats expérimentaux, nous pouvons dire que la seule stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} n'active pas la NOS et ne fait pas proliférer les cellules endothéliales et que la 5-HT ou les agonistes des récepteurs 5-HT_{1D} et 5-HT₄ exprimés par les HUVECs, pourraient au contraire, jouer un rôle antiprolifératif et inhibiteur de la eNOS.

4.2. Implication des récepteurs 5-HT_{2B} dans la prolifération des cellules endothéliales

Nos investigations dans le modèle in vivo montrent que les lésions valvulaires étaient très peu prolifératives (détection de rares noyaux positifs au marquage Ki-67) et qu'elles s'installaient probablement à la suite d'un recrutement de cellules progénitrices endothéliales d'origine médullaire (CD34+) augmentant la densité des cellules endothéliales et sous-endothéliales. L'effet de la stimulation sérotoninergique (5-HT ou agonistes) sur la prolifération des cellules endothéliales à différents stades de leur maturation reste très controversé. En effet, bien que d'importants travaux mettent en évidence le rôle de la 5-HT dans la prolifération de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes (Seuwen et al., 1988; Welsh et al., 2004), les cellules musculaires lisses (Nemecek et al., 1986) et les cellules interstitielles valvulaires (Hafizi et al., 2000), son rôle dans la régulation de la prolifération des cellules endothéliales en situation pathologique reste à élucider. Il a été suggéré qu'en cas de lésion endothéliale, à la faveur d'une angioplastie par exemple, les plaquettes sanguines adhéraient à la lumière du vaisseau et leur interaction avec la matrice sous-endothéliale induirait leur activation et la libération de quantités importantes de 5-HT et de beaucoup d'autres médiateurs. Cette 5-HT libérée serait à l'origine de la prolifération des cellules endothéliales et de la réparation de l'endothélium (Pakala et al., 1994). De plus, cette étude montre que l'effet prolifératif était bloqué par un traitement avec un antagoniste des récepteurs 5-HT₂, la kétansérine. Six ans plus tard, une autre étude confirme l'effet prolifératif des cellules endothéliales au contact des plaquettes mais démontre que la contribution de la 5-HT à cet effet est mineure. En effet, dans leurs expériences, une co-incubation des HUVECs avec les plaquettes sanguines activées ou non activées par la thrombine et de façon dose-dépendante donnait le même niveau de prolifération. Cette prolifération est faiblement inhibée par la kétansérine (30%) mais totalement par un anticorps dirigé contre la P-sélectine, une molécule d'adhésion cellulaire exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales. Ils en concluent que la seule interaction entre ces deux types cellulaires suffisait pour induire la prolifération des cellules endothéliales (Marcondes et al., 2000) et que la contribution du système sérotoninergique et des récepteurs 5-HT₂ est mineure.

4.3. Choix du modèle cellulaire : cellules endothéliales matures ou cellules progénitrices endothéliales d'origine médullaire?

Nous avons montré que la stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B} n'entraîne pas une prolifération des cellules endothéliales matures. Ces résultats pourraient expliquer le faible taux de cellules en mitose dans les valves des souris traitées avec la NdF. Il semblerait donc que les lésions observées chez nos souris rassemblent deux populations de cellules endothéliales : les cellules matures (CD31+) qui ne répondent pas à la stimulation sérotoninergique et des cellules progénitrices (CD34+) recrutées initiatrices du remodelage et impliquées dans la progression des lésions.

L'hypothèse du recrutement des cellules progénitrices semble la plus plausible pour expliquer l'augmentation de la densité des cellules retrouvées au niveau de la couche endothéliale et sub-endothéliale car les cellules endothéliales résidentes matures ne répondent pas à la stimulation sérotoninergique par une prolifération importante. De plus, il a été récemment montré que la production de NO par les cellules endothéliales valvulaires exercerait plutôt, un effet protecteur en s'opposant à l'activation des cellules interstitielles valvulaires (Gould et al., 2014).

4.4. Importance de la 5-HT, des récepteurs 5-HT_{2B} et de la eNOS dans la migration et le recrutement des cellules endothéliales progénitrices

Les cellules endothéliales progénitrices sont constituées d'une population hétérogène avec des caractéristiques très différentes. Il a été montré la présence d'une population de cellules dites précoces, présente dès les premiers jours de culture avec un maximum à 2-3 semaines et disparaissant au bout de 4 semaines. Elles ont une forme en fuseau et produisent des quantités importantes de cytokines impliquées dans l'angiogenèse : le VEGF, le G-CSF et l'IL-8. Les cellules progénitrices tardives ont une forme en pavé, apparaissent au bout de 2-3 semaines en culture avec un maximum entre 4-8 semaines avant de disparaître au bout de 12 semaines. Ces dernières ont un fort pouvoir prolifératif et produisent des quantités importantes de NO (Hur et al., 2004; Qiao et al., 2010).

Bien qu'il ait été montré le pouvoir protecteur du NO sur l'activation des cellules interstitielles valvulaires (Gould et al., 2014), le NO pourrait faciliter également le recrutement des cellules endothéliales progénitrices. En effet, l'expression de la eNOS dans le

microenvironnement médullaire a été montré indispensable pour la mobilisation en périphérie des cellules progénitrices induite par le VEGF (Aicher et al., 2003). De plus l'effet bénéfique des statines (rosuvastatine) dans l'angiogenèse est un mécanisme dépendant de la NO synthase endothéliale (Zhou et al., 2013).

Des travaux récents montrent que la sérotonine intervient dans la maturation des cellules mésenchymateuses d'origine médullaire (Hirota et al., 2014). Il a été démontré que le récepteur 5-HT_{2B} est couplé à la eNOS et que l'effet pro-angiogénique de la sérotonine était prévenu par le blocage des récepteurs 5-HT_{2B} et l'inhibition de la eNOS (Asada et al., 2009b). Au cours de l'angiogenèse, la production des facteurs impliqués dans la réparation tissulaire est réalisée par les cellules progénitrices recrutées dans la zone ischémique (Kim et al., 2013).

Partie 3: Valvulopathie carcinoïde : modélisation chez la souris

1. Introduction

1.1 La cardiopathie carcinoïde, une complication mortelle des tumeurs neuroendocrines carcinoïdes

Les tumeurs neuroendocrines carcinoïdes du tube digestif sont des atteintes tumorales relativement rares qui touchent en France 1 à 2 personnes pour 100.000 habitants au sein de la population générale (avec une tendance à l'augmentation de la prévalence). Elles sont développées aux dépens des cellules entérochromaffines intestinales. Le terme carcinoïde (Karzinoide tumoren) a été utilisé pour la première fois en 1907 par Siegfried Oberndorfer, un médecin allemand qui décrivait l'histoire naturelle d'une tumeur intestinale moins agressive que l'adénocarcinome. Ces tumeurs sont classées selon les recommandations de l'OMS en fonction de leur localisation (par rapport au tractus gastro-intestinal), du degré de différenciation des cellules tumorales, de l'index mitotique (score de prolifération cellulaire Ki-67), de la taille de la tumeur et de la présence ou non d'un réseau vasculaire important (Klöppel et al., 2004). Les tumeurs carcinoïdes se rencontrent, la plupart du temps, dans les parties moyennes du tractus gastro-intestinal (intestin grêle, appendice, caecum, colon proximal) mais parfois dans les parties supérieures (œsophage, estomac, duodénum, vésicule biliaire et pancréas) ou inférieures (colon distal et rectum) du tube digestif. Des localisations atypiques comme le poumon et les ovaires ont été décrites.

Les circonstances de découverte de la pathologie sont parfois fortuites car cette atteinte tumorale peut évoluer très lentement au départ et rester asymptomatique. Les premiers symptômes apparaissent lorsque la tumeur atteint une masse critique et est responsable de la production de concentrations importantes de substances bioactives déversées dans la circulation sanguine. Cette atteinte tumorale se complique très souvent par une fibrose accompagnée d'une occlusion intestinale, d'une ischémie intestinale ou d'une valvulopathie. Elle peut être rétro-péritonéale, intestinale, pleurale, pulmonaire ou cutanée et peut être localisée ou survenir à distance de la masse tumorale primitive. Le tableau clinique caractéristique du syndrome carcinoïde associe des bouffées vasomotrices cutanées (flush), une bronchoconstriction, des diarrhées motrices et une cardiopathie mortelle (valvulopathie carcinoïde) (Modlin et al., 2005).

L'ensemble des symptômes peut s'expliquer par les effets délétères des nombreuses substances sécrétées par les cellules tumorales. Le foie inactive l'ensemble des substances

bioactives produites par la tumeur et provenant du tractus gastro-intestinal. En cas de localisation extra-intestinale ou de métastases hépatiques, les nombreuses substances produites atteignent directement la circulation sanguine et sont responsables des symptômes observés (syndrome carcinoïde). Le tableau 12 présente une liste non exhaustive des substances produites par les cellules tumorales (Ghevariya et al., 2009).

La cardiopathie carcinoïde qui survient chez environ 65% des patients constitue un événement pronostique majeur. Les décès sont imputables dans environ 40% des cas à l'atteinte cardiaque et non à l'évolution de la tumeur (Roberts, 1997). Il s'agit d'une complication cardiaque se manifestant comme une valvulopathie atteignant les cavités droites du cœur (valve tricuspide et pulmonaire). Les cavités gauches du cœur sont protégées du fait de la circulation pulmonaire qui participe à la dégradation de certaines substances bioactives dont la 5-HT. Cependant, à la faveur d'une communication "droite-gauche", une atteinte des valves des cavités gauches du cœur peut être observée (valve mitrale et aortique) (McAlindon et al., 2011). A terme, les lésions valvulaires sont à l'origine d'une régurgitation et/ou d'une sténose entraînant une insuffisance cardiaque (Druce et al., 2009).

Tableau 12. Substances bioactives produites par les tumeurs carcinoïdes

(d'après Ghevariya et al., 2009)

(Les tumeurs carcinoïdes produisent des quantités importantes de sérotonine)

Amines	Polypeptides	Prostaglandines
Sérotonine	Kallikreïne	Prostaglandines
5-Hydroxytryptophane	Polypeptide pancréatique	(E2 et autres)
Norepinephrine	Bradykinine	
Dopamine	Motiline	
Histamine	Peptide vasoactif intestinal	
	Somatostatine	
	Substance P	
	Neuropeptide K	
	Neurokinine A et B	
	Corticotropine	
	Gastrine	
	Hormone de croissance	
	Peptide YY	
	Glucagon	
	Neurotensine	
	Chromogranine A	
	Béta-endorphine	

1.2. Les lésions valvulaires

L'implication physiopathologique de la 5-HT dans la survenue de la cardiopathie carcinoïde est fortement suggérée par la corrélation entre les concentrations de 5-HT libre circulante et la gravité de la pathologie. L'ensemble des hypothèses en faveur du rôle causal de la 5-HT ont été exposés dans le chapitre I-5. Ces lésions se caractérisent par la formation de plaques carcinoïdes localisées sur l'endocarde auriculaire, la veine cave supérieure, l'abouchement du sinus coronaire mais surtout sur la face d'aval des feuillets tricuspides et des sigmoïdes de l'artère pulmonaire (Figure 45). Ces plaques s'apparentent à des lésions fibromyxoïdes composées de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de myofibroblastes entourées d'un stroma de collagène et de mucopolysaccharides (Ferrans et Roberts, 1976). Du fait de leur grande richesse en cellules contractiles, les plaques carcinoïdes ont la propriété de se rétracter conduisant ainsi à un raccourcissement de la longueur des feuillets de la valve tricuspide à l'origine d'une insuffisance valvulaire du fait des adhérences entre la face ventriculaire du feuillet et l'endocarde. Par contre, la valve pulmonaire, possédant une zone d'insertion plus petite, présente plus souvent un rétrécissement la rendant inopérante par sténose (Bhattacharyya et al., 2007). Il s'installe alors un tableau d'insuffisance cardiaque. L'échocardiographie permet de mettre en évidence une régurgitation massive au niveau des valves pulmonaire et tricuspide.

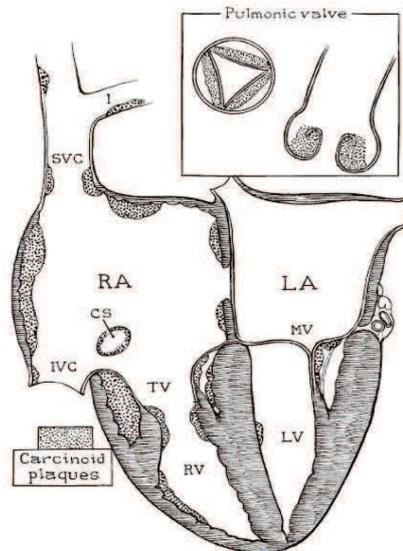


Figure 45. Localisation des plaques carcinoïdes (d'après Roberts, 1997)

CS : Ostium du sinus coronaire ; IVC : Veine cave inférieure ; LA : Atrium gauche ; LV :
Ventricule gauche ; MV : Valve mitrale ; RA : Atrium droit ; RV : Ventricule droit ; SVC :
Veine cave supérieure ; TV : Valve tricuspide

1.3 Prise en charge des tumeurs carcinoïdes

La prise en charge des tumeurs carcinoïdes et de leurs complications cardiaques constitue à l'heure actuelle un sérieux défi. Bien qu'un effet bénéfique sur le blocage de la production tumorale (des peptides vasoactifs), la régression de certains signes cliniques et la prolifération tumorale soient obtenus par l'utilisation des analogues synthétiques de la somatostatine (octréotide et lanréotide), aucune étude n'a montré leur efficacité sur la mortalité et/ou les atteintes cardiaques (Eriksson and Oberg, 1999). De plus, les différentes thérapeutiques antitumorales (interféron alpha, 5-fluorouracile, doxorubicine et topotécan) n'ont démontré aucune amélioration significative sur le développement de la tumeur (Oberg et al., 1987; Ritzel et al., 1995; Ansell et al., 2004). En absence de toute métastase (surtout hépatique) et en cas de diagnostic précoce, la résection tumorale peut être curative.

Au niveau cardiaque, la seule option thérapeutique reste le remplacement des valves dégénérées par des bioprothèses. Les bioprothèses offrent l'avantage de ne pas nécessiter un traitement anticoagulant en comparaison aux valves mécaniques et cela est d'autant plus intéressant chez des patients présentant un tableau de dysfonction hépatique suite à l'expansion métastatique tumorale. Cependant, loin de combler les attentes, on assiste régulièrement à une dégénérescence précoce des bioprothèses dans un délai de 12 à 24 mois suite à des dépôts de plaques carcinoïdes à leur surface (Najib et al., 2011).

L'élévation des taux sériques de la fraction N-terminale du peptide natriurétique (NT-BNP), de la chromogranine A, de la 5-HT plasmatique ou du 5-HIAA urinaire est fortement corrélée à l'existence d'une atteinte valvulaire cardiaque. Cependant, il convient de trouver de nouveaux marqueurs de diagnostic précoce des atteintes valvulaires (Patel et al., 2014).

Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la dégénérescence valvulaire permettrait de proposer un traitement pharmacologique efficace pour la prise en charge des lésions. Cependant, il convient de déterminer et d'étudier l'interaction entre les différentes substances vasoactives à l'aide de modèles pharmacologiques (in vivo ou in vitro) mimant au plus près cette pathologie.

1.4 Les modèles murins de tumeurs carcinoïdes

Les recherches sur la cardiopathie carcinoïde sont rendues possibles par la publication et la validation de certaines lignées cellulaires carcinoïdes comme la lignée BON, qui est obtenue à partir d'une tumeur carcinoïde pancréatique humaine (Parekh et al., 1994) et de la lignée

CNDT2.5 qui est issue d'une métastase hépatique d'une tumeur carcinoïde primitive iléale humaine (Van Buren et al., 2007).

Un modèle in vivo de tumeur carcinoïde a été développé et validé par xéno greffe sous-capsulaire splénique des cellules BON (Musunuru et al., 2005 ; Jackson et al., 2009) à des souris immunodéprimées (souris Nudes).

1.5 Objectifs de l'étude

Dans cette partie, nous étudierons à l'aide du modèle in vivo de cardiopathie carcinoïde développé par xéno greffe de la lignée cellulaire BON, l'hypothèse du rôle de la 5-HT et/ou de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} dans la survenue des lésions. En effet, au stade où nous avons amorcé ce travail, aucune étude n'avait démontré la contribution de la seule 5-HT dans la cardiopathie carcinoïde.

2. Matériels et méthodes

2.1 Protocole d'étude

Les expériences réalisées dans ce chapitre ont fait l'objet d'une validation réglementaire auprès du Comité Régional en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) sous le numéro de saisine AL/81/88/02/13. Ces expériences respectent également les directives en matière d'expérimentation animale du Conseil de l'Union Européenne.

Le modèle expérimental, est un modèle pathologique qui consiste à induire des lésions valvulaires chez des souris immunodéprimées en faisant une xéno greffe par voie sous capsulaire splénique d'une lignée cellulaire carcinoïde humaine (cellules BON). Les souris sont réparties aléatoirement en 4 groupes expérimentaux suivis pour une période de 90 jours. Les traitements pharmacologiques sont introduits trente jours après la xéno greffe (J.30) afin de ne pas interférer avec le développement tumoral. Les quatre groupes de souris sont répartis de la façon suivante : (1) un groupe de souris contrôles ne recevant pas les cellules, (2) un groupe de souris xéno greffées par les cellules BON, (3) un groupe de souris xéno greffées et traitées par la ritansérine (2mg/kg/jour ; antagoniste des récepteurs 5-HT₂) et (4) un dernier groupe de souris xéno greffées et traitées par la pCPA (100mg/kg/jour ; inhibiteur de la TPH, et s'opposant à la synthèse périphérique et centrale de 5-HT) (Figure 46).

Pour un meilleur suivi des animaux, une importance particulière est accordée à la détermination des paramètres physiques, à la croissance tumorale et au bien-être des animaux.

Les modalités d'administration des différents traitements pharmacologiques, de mesure des paramètres biochimiques (5-HT sanguine et 5-HIAA urinaire) et l'analyse histologique des valves cardiaques sont les mêmes que celles présentées pour le modèle de valvulopathie médicamenteuse. Ainsi, au terme du protocole, des échantillons d'urine et de sang sont recueillis pour les dosages respectifs du 5-HIAA et de la 5-HT. Le cœur est prélevé pour une analyse histologique quantitative de la valve tricuspide.

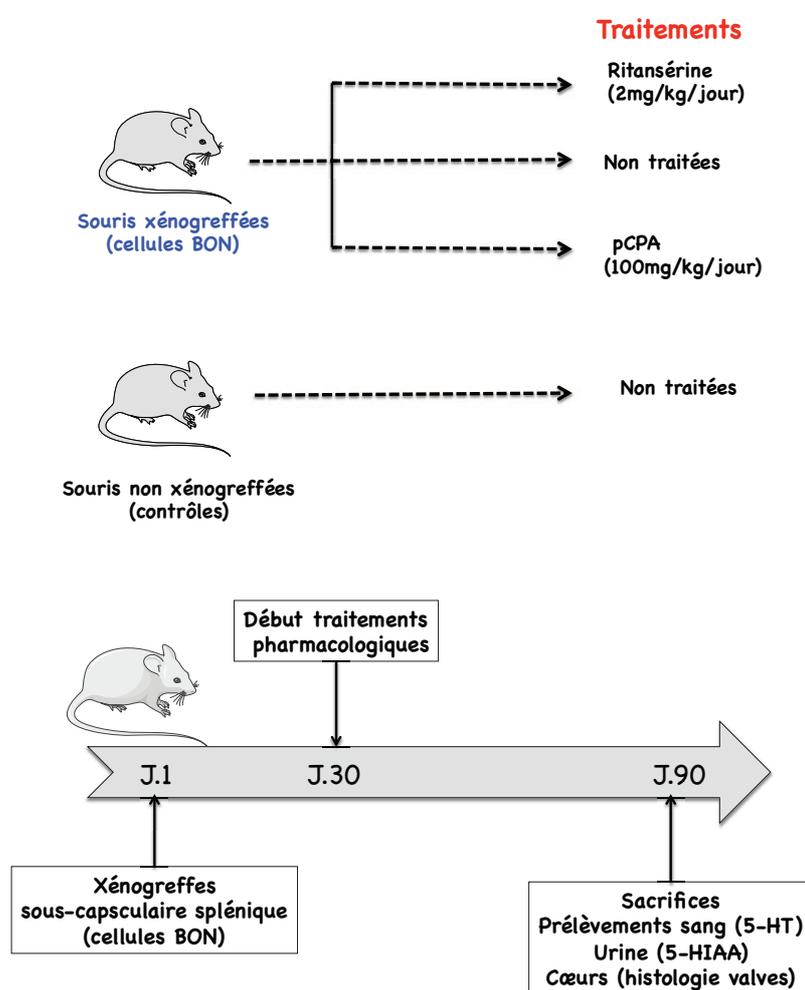


Figure 46. Groupes expérimentaux et protocole de suivi

2.2 Conditions de culture et caractérisation des cellules

2.2.1 Conditions de culture des cellules

Nous avons caractérisé et validé les conditions de culture des cellules BON utilisées dans nos expériences. Il s'agit d'une lignée cellulaire carcinoïde stable (obtenue auprès du Dr Colette Roche, Inserm U865, Lyon). Cette lignée cellulaire a été caractérisée en comparaison à une autre lignée cellulaire carcinoïde, la lignée CNDT2.5 (obtenue auprès du Professeur Lee ELLIS, Houston, Etats Unis). Nous avons utilisé comme contrôle négatif, la lignée cellulaire HT29, qui est une lignée tumorale digestive non carcinoïde provenant d'un adénocarcinome colique (voir Annexe 3 pour la composition des milieux de culture pour chaque type cellulaire).

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire de 25 cm² lors de la mise en culture puis en flacon de 75 cm² pour les passages ultérieurs. Elles sont maintenues dans un incubateur à 37°C contenant 90% d'air et 5% de dioxyde de carbone. Les cellules sont repiquées à confluence (tous les 4 à 5 jours) avec un ratio de culture 1:3.

La manipulation des cellules est réalisée de façon aseptique sous une hôte à flux laminaire. Leur numération est réalisée à l'aide d'un compteur automatique de cellules (ScepterTM 2.0 Automated Cell Counter, Merck-Millipore).

2.2.2 Caractérisation des lignées cellulaires

Nous avons obtenu nos cellules à des passages élevés de culture (> 30). De ce fait, ces cellules ont été caractérisées pour vérifier si elles possèdent les marqueurs spécifiques des lignées cellulaires carcinoïdes. Nous avons recherché en Western blot (voir Annexe 4 pour protocole) l'expression du récepteur de la somatostatine de type 2 (SSTR2) généralement ciblé en thérapeutique (octréotide) et en RT-PCR, l'expression des ARNm codant pour les récepteurs SSTR2, TPH1, SERT et les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}. Les différentes amorces des gènes utilisées sont présentées dans le tableau 13. Nous avons également évalué la concentration de 5-HT intracellulaire et du surnageant de culture.

Tableau 13. Séquences des amorces utilisées en RT-PCR

Gènes		Séquences	Taille	Tm (°C)	GC%	PM (bp)
18S	sens	Qiagen QuantiTect QT00199367				149
	antisens					
5-HT _{2A}	sens	TCCTGTTTGTGGTGATGTGG	20	60	50	143
	antisens	TGGGTTGACTGCTGAAGAGA	20	60	50	
5-HT _{2B}	sens	TGCTGGTTGGATTGTTTGTG	20	58	45	127
	antisens	ATGGATGCGGTTGAAAAGAG	20	58	45	
SSTR2	sens	ATGCTGGGTCTGCCTTTCTT	20	60	50	112
	antisens	TGCTGGTGAAGTATTGATG	20	58	45	
TPH1	sens	Qiagen QuantiTect QT00045346				101
	antisens					
SERT	sens	ATTCCTCCTCCCCTACACCA	20	62	55	145
	antisens	GGCATAACCAATCCCTTTGA	20	58	45	

Dosage de la sérotonine dans le surnageant de culture

Dans un flacon de culture à confluence, nous récupérons les cellules et le milieu dans un tube stérile de 50 ml (BD Falcon[®]) puis centrifugeons pendant 5 mn à 1000 tr/mn. Le surnageant de culture (5 ml) est prélevé dans un tube contenant de l'acide ascorbique (antioxydant) pour le dosage de la sérotonine puis congelé à -80°C en attendant l'acheminement de l'échantillon pour dosage en HPLC au Plateau technique de Biologie du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg (PTB-NHC). La numération des cellules est effectuée à l'aide d'un compteur automatique (Scepter[™] 2.0 Automated Cell Counter, Merck-Millipore) afin de normaliser les résultats du dosage.

Dosage de la sérotonine intracellulaire

L'évaluation de la 5-HT intracellulaire se fait en récupérant le culot cellulaire (boîte de culture à confluence) obtenu après une première centrifugation (1000 tr/mn pendant 5 mn) puis repris dans 2 ml d'une solution PBS (Phosphate Buffered Saline) pour la numération des cellules (Scepter[™] 2.0 Automated Cell Counter, Merck-Millipore). Il est procédé à nouveau à une centrifugation pour éliminer la solution de PBS. On ajoute au culot cellulaire du tampon de lyse (1000 µl) et on homogénéise. On récupère tout le contenu dans un tube pour dosage de la

sérotonine contenant de l'acide ascorbique qu'on maintient pendant 30 mn à 4°C. Après cette étape, le tube est centrifugé (4 mn à 1000 tr/mn) et le surnageant est repris dans un autre tube pour doser la 5-HT, qui sera congelé à -80°C en attendant l'acheminement au Plateau Technique de Biologie du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg.

2.3 Développement du modèle animal

2.3.1 Les souris

Les différentes expériences ont été réalisées en utilisant des **souris mâles** Swiss Nude (Cr1 : NU(Ico)-Foxn1^{nu}) obtenues chez Charles River (France) âgées de **7 semaines** au moment de l'inclusion dans le protocole (Figure 47). Ces souris présentent une mutation spontanée du gène *FOXN1* situé sur le chromosome 11, intervenant dans les processus de maturation de l'épithélium thymique et provoquant ainsi une altération de la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T. Il s'agit de souris albinos, glabres et athymiques qui, du fait de leur immunodépression, constituent un modèle de choix pour les xénogreffes. Elles ont été hébergées à l'animalerie de la Faculté de médecine de Strasbourg dans des armoires ventilées pour lesquelles les conditions de température, d'humidité, d'éclairage (cycle jour-nuit) et sonores sont régulées. Elles sont réparties dans des cages où la litière, la nourriture et l'eau de boisson sont autoclavées. Les différentes souris sont réparties aléatoirement dans les divers groupes expérimentaux.



Figure 47. Souris Swiss Nudes (Cr1 : NU(Ico)-Foxn1^{nu})

2.3.2 Technique de xénogreffe

Une préparation cellulaire contenant 10^7 cellules est reprise dans 200 μl de milieu de culture. L'intervention se déroule sous une hotte à flux laminaire. La souris est pesée puis anesthésiée à l'isoflurane. La profondeur de l'anesthésie est évaluée en pinçant la patte de l'animal. Le siège d'inoculation est préalablement désinfecté à l'aide d'une solution de povidone iodée (Bétadine[®] dermique). La préparation de cellules est inoculée par voie sous-capsulaire splénique.

L'inoculation des cellules se fait au moyen d'une micro-seringue en verre à extrémité conique en téflon et douille filetée à 2 voies de type Hamilton Gastlight[®] serie 1000 munie d'une aiguille de calibre 22 Gauge. Pour l'inoculation intrasplénique, une incision latérale est réalisée sur le flanc gauche légèrement en dessous du rebord costal. Au terme de cette étape, une fois la rate réintégrée dans l'abdomen, on suture les plans sous-cutané et cutané (Figure 48).

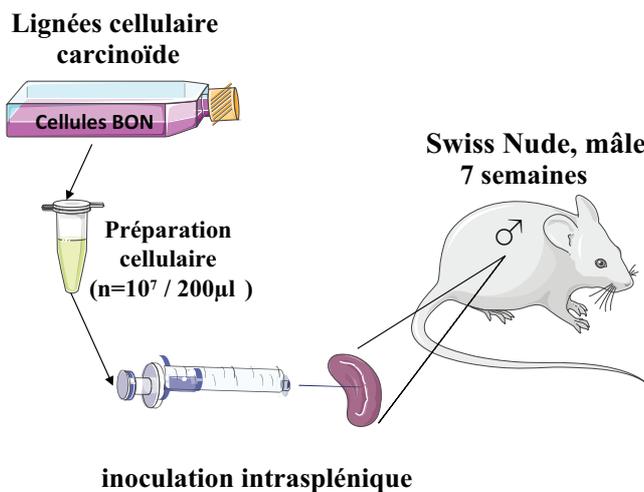


Figure 48. Procédure de xénogreffe des cellules BON

2.4 Suivi expérimental et paramètres évalués

Dans ce modèle de xénogreffe de cellules carcinoïdes, il est difficile d'apprécier objectivement la perte de poids des souris car une augmentation de la masse tumorale peut masquer cette dernière. De ce fait, le suivi est essentiellement clinique et basé sur la difficulté ou l'arrêt de l'alimentation (eau et nourriture), une prostration ou des signes patents de cachexie. Les animaux sont surveillés quotidiennement pendant la première semaine d'expérimentation.

Les critères de surveillance sont l'aspect général (piloérection, hyperventilation et prostration), l'activité motrice et le comportement avec les congénères, l'évolution du poids, de la prise alimentaire et de boisson. Toute modification de l'un ou plusieurs de ces paramètres (en référence aux observations et valeurs mesurées avant le début des divers traitements) est considérée comme un signal d'alerte. En pratique, nous considérons des fluctuations de +/- 10% comme non significatives. Une baisse significative (> 15%) et répétée sur deux mesures successives sera considérée comme un signal d'alerte, nécessitant une surveillance quotidienne de l'animal et éventuellement son isolement (si existence de comportements agressifs). L'expérience est interrompue si la perte de poids et/ou de prise alimentaire et de boisson se poursuit au-delà des 48 heures suivantes. Une autopsie est systématiquement pratiquée à la fin des expérimentations in vivo pour récupérer le cœur des souris pour des expérimentations complémentaires in vitro (analyse histologique). Cette autopsie permet de vérifier l'absence d'atteintes macroscopiques des organes vitaux, notamment le foie et les reins. Une dose létale de pentobarbital est administrée par voie intra-péritonéale (150 mg/kg) en fin d'expérience.

Tableau 14. Suivi des souris et paramètres recueillis

Jours		J.0	J.15	J.30	J.45	J.60	J.75	J.90
		Paramètres						
Poids, consommation eau/nourriture		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Échographie (rate, foie, cœur)		✓		✓		✓		✓
Biochimie	5-HIAA (urines)							✓
	5-HT (sang)							✓
Histologie	Cœur (valve tricuspide)							✓

3. Résultats

3.1 Caractérisation de la lignée cellulaire carcinoïde BON

3.1.1 Dosage de la 5-HT intracellulaire et du surnageant de culture

Les deux lignées cellulaires carcinoïdes BON et CNDT 2.5 produisent (intracellulaire BON 988 ± 73 ; CNDT2.5 1067 ± 137 $\mu\text{g/L}/10^5$ cellules) (Tableau 15) et sécrètent (surnageant BON $21,7 \pm 2,9$; CNDT2.5 $31,4 \pm 3,8$ $\mu\text{g/L}/10^5$ cellules) (Tableau 16) dans le milieu de culture des concentrations à peu près similaires de 5-HT, en opposition à la lignée d'adénocarcinome colique HT29 pour laquelle nous détectons des concentrations à la limite de la méthode de dosage (intracellulaire 40 ± 4 $\mu\text{g/L}/10^5$ cellules ; surnageant $0,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/L}/10^5$ cellules).

Tableau 15. Dosage de la 5-HT intracellulaire

Lignées cellulaires	BON (n=5)	CNDT2.5 (n=6)	HT29 (n=6)
5-HT ($\mu\text{g/L}/10^5$ cellules)	988 ± 73	1067 ± 137	40 ± 4

ANOVA, $p < 0,05$ post-hoc Bonferroni test : BON vs HT29 ($p < 0,05$) ; CNDT2.5 vs HT29 ($p < 0,05$)

Tableau 16. Dosage de la 5-HT dans le surnageant de culture

Lignées cellulaires	BON (n=8)	CNDT2.5 (n=7)	HT29 (n=4)	sans cellule (milieu de culture) (n=4)
5-HT ($\mu\text{g/L}/10^5$ cellules)	$21,7 \pm 2,9$	$31,4 \pm 3,8$	$0,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,5$

ANOVA, $p < 0,05$ post-hoc Bonferroni test : BON vs HT29 et sans cellules ($p < 0,05$) ; CNDT2.5 vs HT29 et sans cellules ($p < 0,05$)

3.1.2 Recherche de l'expression de certains marqueurs spécifiques

3.1.2.1 Western blot (SSTR2)

Les deux lignées cellulaires carcinoïdes possèdent le récepteur SSTR2 ciblé en thérapeutique à l'opposé de la lignée HT29 qui n'en possède pas (Figure 49).



Figure 49. Expression en Western blot du récepteur de la somatostatine de type 2 (SSTR2)

3.1.2.2 RT-PCR

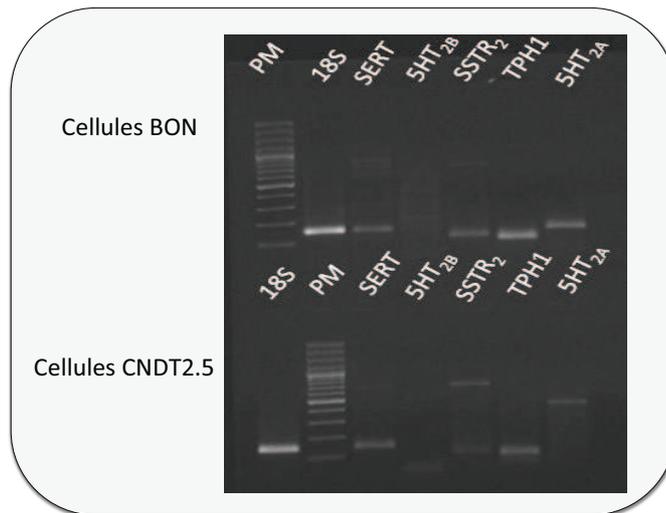


Figure 50. Caractérisation en RT-PCR de l'expression de SSTR2, de SERT, de TPH1, du 5-HT_{2B} et du 5-HT_{2A}

Nous avons également mis en évidence en RT-PCR l'expression de l'ARNm codant pour le SSTR2.

La caractérisation du système sérotoninergique révèle pour les cellules BON, la présence de l'ARNm codant pour la TPH1, le transporteur de la 5-HT (SERT) et des récepteurs 5-HT_{2A}. La lignée CNDT2.5 possède également des caractéristiques similaires, cependant elles n'expriment pas les récepteurs 5-HT_{2A}. Nous n'avons pas détecté dans nos deux lignées cellulaires carcinoïdes l'expression des récepteurs 5-HT_{2B} (Figure 50).

3.2 Etude du rôle du système sérotoninergique dans la survenue des lésions valvulaires carcinoïdes

Conformément au protocole expérimental choisi, nous avons 4 groupes de souris Nudes: 1) sans BON (servant de contrôle), 2) BON (souris xéno greffées sans traitement servant de modèle pharmacologique de la pathologie), 3) BON + ritansérine (2mg/kg/jour) (souris xéno greffées traitées avec un antagoniste des récepteurs 5-HT₂), 4) BON + pCPA (100 mg/kg/jour) (souris xéno greffées traitées avec un inhibiteur de la TPH).

Le critère principal de jugement dans ce protocole est la quantification des lésions cardiaques. En se basant sur les résultats précédemment publiés dans la littérature par Musunuru et collaborateurs en 2009 qui mettaient en évidence une différence significative pour l'analyse histologique des valves, dans une cohorte de 11 souris xéno greffées avec les cellules BON et 6 souris contrôles non xéno greffées, suivies pendant 9 semaines, nous avons choisi d'analyser environ 10 valves de souris arrivant au terme du protocole (dans chaque groupe) afin de garantir une meilleure puissance statistique.

3.2.1 Paramètres de suivi des souris

Les tableaux 17, 18 et 19 présentent les résultats de l'évaluation des paramètres physiques, hémodynamiques et échographiques des souris parvenues au terme de l'expérimentation.

Le nombre de souris par groupe est : 1) sans BON (n=9), 2) BON (n=9), 3) BON + ritansérine (n=6), 4) BON + pCPA (n=6).

3.2.1.1 Paramètres physiques

Au début des investigations, l'ensemble des souris avait un poids corporel compris entre 28 et 31 grammes. Du fait du caractère invasif de l'inoculation des cellules et de la riche vascularisation splénique, nous avons environ 30% de mortalité imputables à l'existence d'une hémorragie splénique et survenant pendant l'intervention ou dans un délai de 24 heures. Compte tenu de la croissance tumorale, qui constitue un biais d'appréciation de l'évolution du poids corporel, nous présentons ici, les caractéristiques des souris parvenues au terme de notre expérimentation (J.90).

Tableau 17. Paramètres physiques à l'autopsie

Paramètres physiques	sans BON	BON	BON + ritansérine	BON + pCPA
Poids corporel (g) J90	30 ± 2	28 ± 4	33 ± 7	33 ± 2
Poids sans tumeur splénique (g) autopsie	30 ± 2	25 ± 4	30 ± 2	26 ± 4

Le tableau nous indique que les souris xénogreffées sans traitement (BON) ou traitées n'ont pas significativement diminué leur poids corporel après soustraction de la masse tumorale.

3.2.1.2 Paramètres hémodynamiques

Au terme du protocole (J.90), nous n'avons pas enregistré une variation significative des paramètres hémodynamiques entre les divers groupes expérimentaux.

Tableau 18. Paramètres hémodynamiques à J.90

Paramètres hémodynamiques	sans BON	BON	BON + ritansérine	BON + pCPA
PAS (mmHg)	101 ± 16	116 ± 15	103 ± 26	115 ± 27
Fréquence cardiaque (bpm)	523 ± 76	601 ± 86	545 ± 132	710 ± 132

3.2.1.3 Paramètres échographiques

Nous avons échographié le cœur, le foie et la rate des souris. Aucune anomalie n'est détectée au niveau de ces organes à l'exception du lobe gauche hépatique qui est épaissi chez les 3 groupes de souris xénogreffées.

Tableau 19. Caractéristiques échographiques à J.90

Organes	Paramètres échographiques	sans BON	BON	BON + ritansérine	BON + pCPA
Cœur	masse VG (mg)	154 ± 27	175 ± 24	121 ± 35	149 ± 73
	DTD VG (mm)	3,6 ± 0,5	4,0 ± 0,2	3,4 ± 0,6	3,6 ± 1,0
	FE VG (%)	64 ± 13	68 ± 8	65 ± 16	64 ± 14
	rapport diamètre VD/VG	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	index d'exentricité du VD	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,7 ± 0,4	2,3 ± 0,3
Foie	longueur hépatique (cm)	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,2
	lobe droit hépatique (cm)	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,3
	lobe gauche hépatique (cm)	0,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1*	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,2
Rate	longueur rate (cm)	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,9	1,3 ± 0,2

*p<0,05 (ANOVA, Dunett's multiple comparison post test BON vs sans BON)

3.2.1.4 Dosage de la 5-HT sanguine et du 5-HIAA urinaire

Nous enregistrons une augmentation significative de la 5-HT sanguine chez les souris BON par rapport au groupe contrôle (sans BON 1824 ± 90 vs BON 4288 ± 627 $\mu\text{g/L}$ $p < 0,05$ ANOVA, post-hoc Bonferroni test). Chez les souris traitées par la ritansérine, la concentration reste élevée mais sans différence significative avec le groupe contrôle (BON + ritansérine 3330 ± 534 $\mu\text{g/L}$ vs BON 4288 ± 627 $\mu\text{g/L}$, $p > 0,05$ ANOVA, post-hoc Bonferroni test). Le traitement par la pCPA permet de faire effondrer de façon significative la concentration de 5-HT (BON + pCPA 762 ± 36 $\mu\text{g/L}$ vs BON 4288 ± 627 $\mu\text{g/L}$, $p < 0,05$ ANOVA, post-hoc Bonferroni test) (Figure 51).

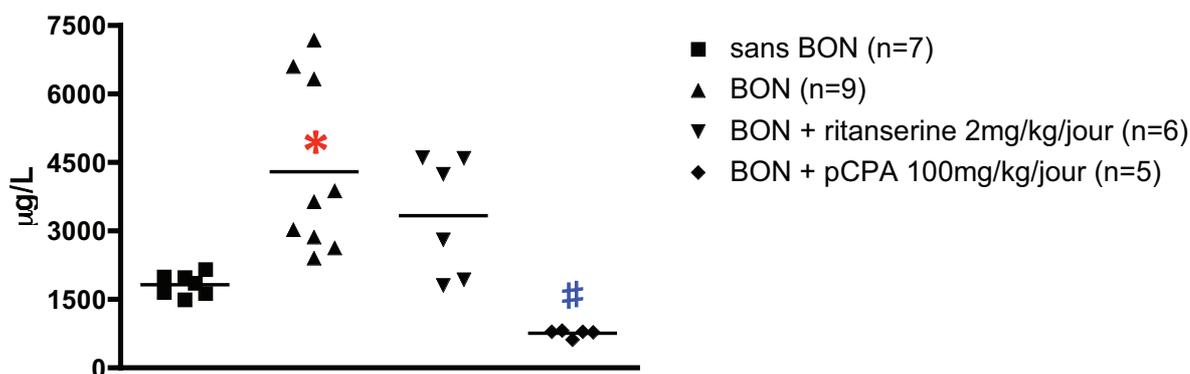


Figure 51. Dosage de la 5-HT sanguine

* vs sans BON, # vs BON; $p < 0,05$ ANOVA, Bonferonni post hoc test

L'évaluation de la concentration du 5-HIAA urinaire, montre une tendance à l'augmentation avec une fluctuation très importante dans le groupe BON sans différence statistiquement significative (sans BON 42 ± 2 $\mu\text{mol/L}$, BON 80 ± 40 $\mu\text{mol/L}$, BON = ritansérine 45 ± 16 $\mu\text{mol/L}$, BON + pCPA 28 ± 17 $\mu\text{mol/L}$, $p > 0,05$ ANOVA, post-hoc Bonferroni test) (Figure 52).

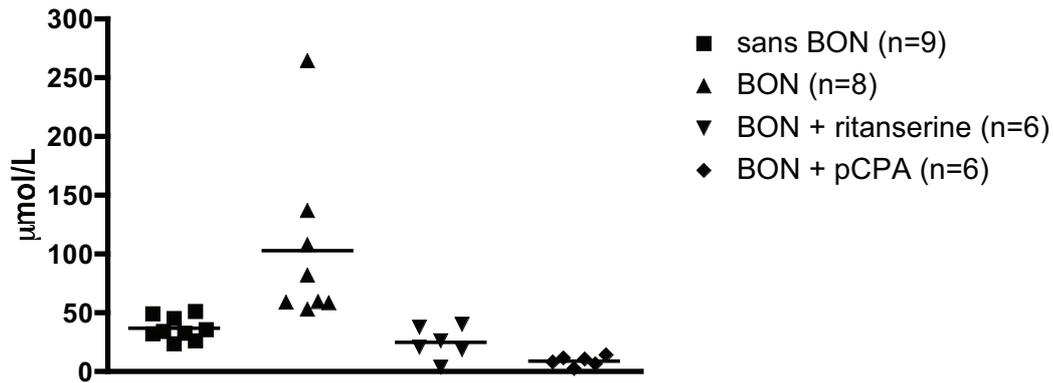


Figure 52. Dosage du 5-HIAA urinaire

3.2.2 Evaluation des métastases

L'élévation des concentrations périphériques de 5-HT et du 5-HIAA urinaire chez les souris xéno greffées suggère la présence de métastases hépatiques et/ou pulmonaires. L'évaluation du développement de la tumeur après inoculation sous capsulaire splénique, la présence d'une métastase hépatique et/ou pulmonaire ont donné lieu à l'élaboration d'un score d'expansion tumorale.

Ce score est apprécié pour chaque souris sur une échelle de 10 points. Le score individuel correspond à la somme des points issus de l'analyse des coupes histologiques de la rate, du foie et des poumons. L'importance du développement de la tumeur dans la rate est notée sur 3 points (0 à 3), l'ampleur des métastases hépatiques est notée sur 6 points (0 à 6) et la présence d'une métastase pulmonaire est notée sur 1 point (0 à 1). Le tableau 20 présente les modalités de cotation du score.

Tableau 20. Modalités de cotation du score d'expansion tumorale

Score individuel = somme des scores (rate ; foie ; poumons)

Organes	Cotations	Interprétations	
Rate	0	-	absence de tumeur
	1	+	masse tumorale faible
	2	++	masse tumorale modérée
	3	+++	masse tumorale importante
Foie	0	-	absence de métastase
	2	+	métastases peu nombreuses
	4	++	métastases nombreuses
	6	+++	métastases très nombreuses
Poumons	0	-	absence de métastase
	1	+	présence de métastase

Dans ce modèle, avons observé un seul cas de métastase pulmonaire dans le groupe BON + ritansérine. L'ensemble des souris du groupe sans BON a un score de 0 et ceux du groupe BON un score de 9. Dans le groupe BON + pCPA, nous avons un score moyen de 4. Il semble donc que la déplétion périphérique en sérotonine s'oppose au développement de la tumeur et à la survenue des métastases hépatiques. Dans le groupe BON + ritansérine, l'effet du traitement est très hétérogène. Le score moyen est de 7. Le traitement avec la ritansérine affecte en partie le développement de la tumeur (Figure 53).

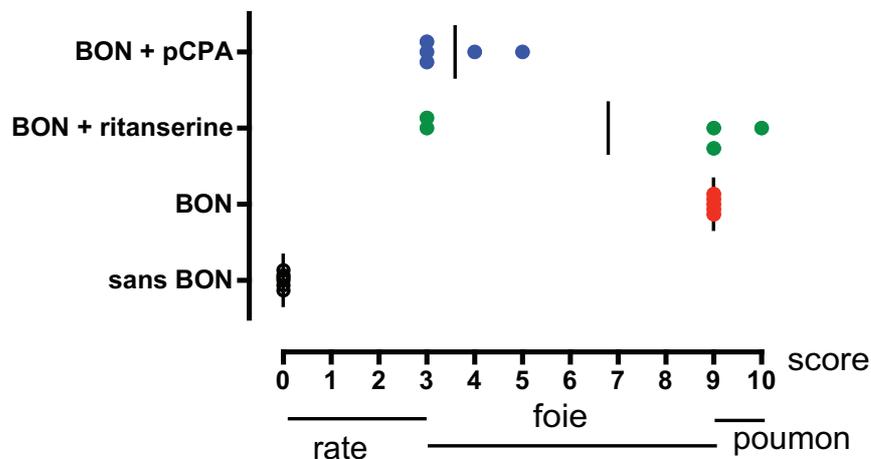
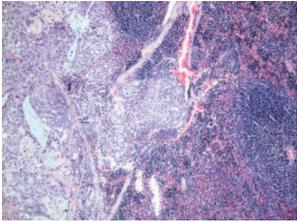
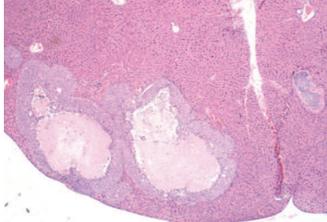


Figure 53. Evaluation de l'expansion tumorale dans la rate, le foie et les poumons

Tableau 21. Aspects macroscopique et histologique de la rate et du foie d'une souris xénogreffée (groupe BON)

Groupe	ASPECTS	RATE	FOIE
BON	Macroscopique		
	Histologique		

Le tableau 21 présente les caractéristiques macroscopiques et histologiques de la rate et du foie des souris xénogreffées et non traitées. Il est noté un développement important de la tumeur dans la rate qui devient bosselée. Sur le plan histologique, de nombreuses cellules sont infiltrées dans le parenchyme splénique. Dans le foie, de nombreux nids cellulaires neuroendocrines sont développés dans tout le parenchyme.

3.2.3 Analyse des lésions cardiaques

Une étape préliminaire de mise au point des techniques de coupe pour la standardisation des échantillons à analyser (observation du feuillet tricuspide dans toute sa longueur) afin de permettre une interprétation rigoureuse a permis de valider dans chaque groupe : 1) sans BON (n=4), 2) BON (n=4), 3) BON + ritansérine (n=5), 4) BON + pCPA (n=4) échantillons de valve ayant fait l'objet de l'analyse histologique.

L'analyse histologique des lésions rapporte une augmentation (non significative liée probablement au faible effectif) de l'épaisseur valvulaire moyenne dans le groupe BON ($54 \pm 10 \mu\text{m}$) par rapport au groupe sans BON ($24 \pm 6 \mu\text{m}$). La déplétion périphérique en sérotonine par la

pCPA freine cet épaissement (BON + pCPA $33 \pm 4 \mu\text{m}$). Il en est de même pour le blocage périphérique des récepteurs 5-HT₂ par la ritansérine (BON + ritansérine $34 \pm 7 \mu\text{m}$) (Figure 54).

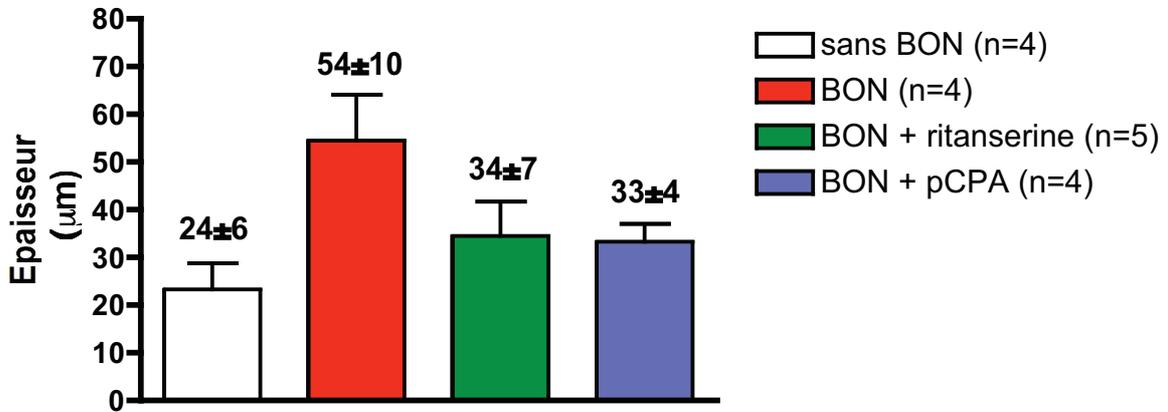


Figure 54. Evaluation de l'épaisseur moyenne de la valve tricuspide

Sur le plan histologique, les lésions observées sur la valve tricuspide siègent fréquemment sur le bord distal. Ces lésions correspondent à un épaissement de la valve. Ici, l'évaluation de la cellularité interstitielle est rendue difficile par le fait de la faible épaisseur des valves controles. Cependant, une analyse microscopique révèle de nombreuses cellules enchâssées dans la matrice valvulaire (Figure 55).

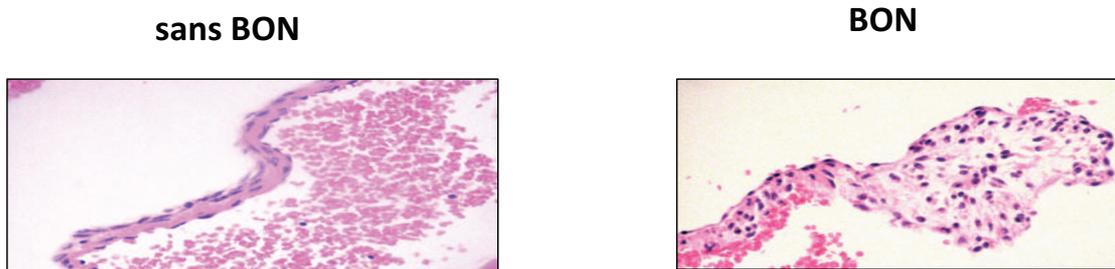


Figure 55. Aspect histologique des lésions valvulaires (valve tricuspide)

Grossissement 40x

4. Discussion

Nous avons décrit au chapitre I de ce travail, les divers arguments qui établissent un lien potentiel entre les lésions valvulaires carcinoïdes et le système sérotoninergique. A l'heure actuelle, la cardiopathie carcinoïde demeure une maladie orpheline. Bien que les analogues de la somatostatine (octréotide et lanréotide) aient prouvé leur efficacité dans le contrôle des sécrétions tumorales et sur la croissance tumorale avec pour conséquence l'augmentation de la survie des patients, il demeure urgent de développer une stratégie thérapeutique de prise en charge de la fibrose et des lésions cardiaques qui représentent actuellement les principales causes de décès. Il s'impose donc une meilleure connaissance de la physiopathologie des atteintes carcinoïdes et le développement de modèles pharmacologiques stables récapitulant les différentes séquelles observées en clinique humaine.

En 2005, Musunuru et collaborateurs, menant leur travaux à l'Université de Wisconsin, franchissent un grand pas en publiant le premier modèle de souris par xéno greffe sous-capsulaire splénique des cellules BON à des souris immunodéprimées (Musunuru et al., 2005b). Cependant, ils ne réalisent le suivi des souris que sur 9 semaines afin de trouver un compromis entre la survenue d'une mortalité liée à l'atteinte hépatique et l'importance des lésions cardiaques. En 2009, Jackson et collaborateurs, à l'Université du Texas réalisent un suivi de 12 semaines à l'aide de ce même modèle en testant avec succès l'hypothèse de la prévention des métastases hépatiques (et donc indirectement l'atteinte cardiaque) par un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le bévacizumab (Jackson et al., 2009).

Nous avons donc choisi d'utiliser ce même modèle pour tester le rôle de la modulation du système sérotoninergique (déplétion périphérique ou blocage des récepteurs 5-HT₂) dans la cardiopathie carcinoïde. Ce modèle est parfaitement reproductible. L'inoculation des cellules BON aux souris induit des métastases hépatiques qui sont disséminées dans le parenchyme avec une augmentation importante de la concentration de 5-HT sanguine. A cette étape, à partir de nos résultats provisoires (dont l'effectif sera complété pour une meilleure puissance statistique), l'analyse histologique des lésions valvulaires révèle une augmentation importante de l'épaisseur valvulaire qui est prévenue soit par la déplétion sérotoninergique (pCPA) ou le blocage des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₂ (ritansérine).

Une des limites importantes de ce modèle concerne l'ampleur des atteintes valvulaires chez chaque souris qui introduit une fluctuation importante dans l'analyse des résultats. Dans le modèle de Musunuru et collaborateurs, les chercheurs établissent que 65% des souris

xéno greffées présentaient une atteinte cardiaque typique. Par contre, Jackson et collaborateurs observent 80% de métastases et environ 40% de lésions cardiaques dans l'ensemble du groupe expérimental. Il convient donc d'opter pour une analyse des lésions valvulaires prenant en compte l'ampleur de l'atteinte hépatique. Dans notre modèle, nous avons observé 100% de lésions hépatiques. Cependant, dans les deux autres groupes (BON + pCPA et BON + ritansérine), la modulation du système sérotoninergique interfère avec la croissance tumorale et il devient presque impossible de conclure si l'effet sur le remodelage valvulaire observé est dû au frein de la croissance tumorale et/ou au blocage au niveau des récepteurs de l'organisme.

La sérotonine est également connue pour stimuler la néoangiogenèse tumorale et donc la croissance tumorale par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT_{2B} (Asada et al., 2009b). Ainsi, le faible score d'expansion tumorale et la prévention des lésions valvulaires par la pCPA seraient beaucoup plus imputables à une action sur la tumorigenèse.

CHAPITRE III :
Synthèse des résultats et perspectives
de ce travail

Chapitre III : Synthèse des résultats et perspectives de ce travail

1. Synthèse des résultats

L'hypothèse du lien entre la 5-HT et les récepteurs 5-HT_{2B} dans le développement de certaines lésions valvulaires a été proposé en se référant à la physiopathologie de la cardiopathie carcinoïde et des dégénérescences pharmaco-induites. Cependant, au moment de l'initiation de nos travaux, aucune preuve pharmacologique formelle n'avait été établie.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons développé, validé et standardisé un premier modèle de valvulopathie induite chez la souris par l'administration chronique d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{2B}. Les souris développent effectivement un remodelage de la valve mitrale caractérisé par une augmentation de l'épaisseur et de la densité des cellules endothéliales qui sont prévenues par le blocage des récepteurs 5-HT_{2B} et mais aussi en partie et ce de façon inattendue, par les récepteurs 5-HT_{2A} attestant ainsi de leur rôle dans la survenue des lésions. La caractérisation des lésions dans notre modèle, montre une matrice valvulaire très peu proliférative mais riche en cellules exprimant l'antigène CD34. Ces cellules sont probablement des cellules endothéliales progénitrices pouvant être recrutées au sein de la valve à partir de la moelle osseuse puisque au contraire, la eNOS exprimée dans la valve non lésée, exerce plutôt un rôle protecteur. L'inhibition de la eNOS, connue pour faciliter la migration et le recrutement des cellules progénitrices circulantes au cours de la néoangiogenèse, prévient ce processus et renforce les arguments en faveur d'un recrutement des cellules au sein de la valve. Les lésions obtenues correspondent à des stades précoces du remodelage puisqu'un immunomarquage des valves lésées pour l'expression de l' α -AML s'est révélé négatif signant l'absence de myofibroblastes (Figure 56).

Ce modèle est original car il permet de dissocier les mécanismes en jeu dans les stades précoces de ceux des stades tardifs. Nous proposons comme hypothèse qu'une stimulation prolongée des récepteurs 5-HT₂ pourrait favoriser la maturation et la mobilisation massive d'un pool de cellules endothéliales progénitrices (CD34+) à partir du microenvironnement médullaire et/ou leur recrutement au sein des feuillets valvulaires. Ces cellules se transdifférencieraient par la suite en myofibroblastes (ou d'autres types cellulaires) par un processus de transition endothélio-mésenchymateuse (reminiscent de la morphogenèse valvulaire) pour initier les étapes avancées du remodelage caractérisées par l'ensemble des mécanismes impliquant notamment la signalisation du TGF- β et l'activation des cellules valvulaires portant les récepteurs 5-HT₂ au sein de la valve (Figure 57).

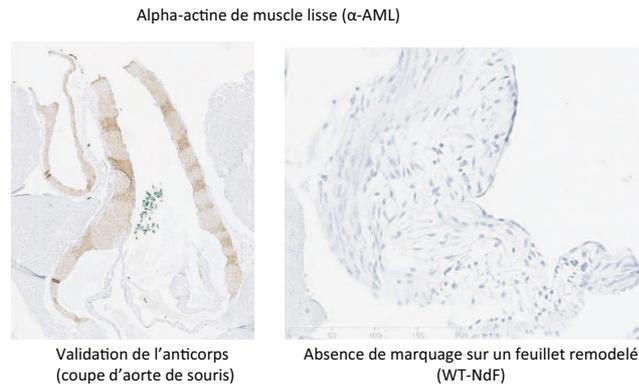


Figure 56. Marquage immunohistochimique représentatif pour l'alpha-actine de muscle lisse sur un feuillet valvulaire remodelé (WT-NdF)

Anticorps primaire polyclonal anti-alpha actine de muscle lisse de lapin contre la souris (référence GTX100034 Genetex); anticorps secondaire biotinylé IgG de singe reconnaissant les antigènes de lapin (Biotin-SP-AffiniPure Donkey anti-rabbit Ig G ; référence 711-065-152, Jackson Immuno Research)

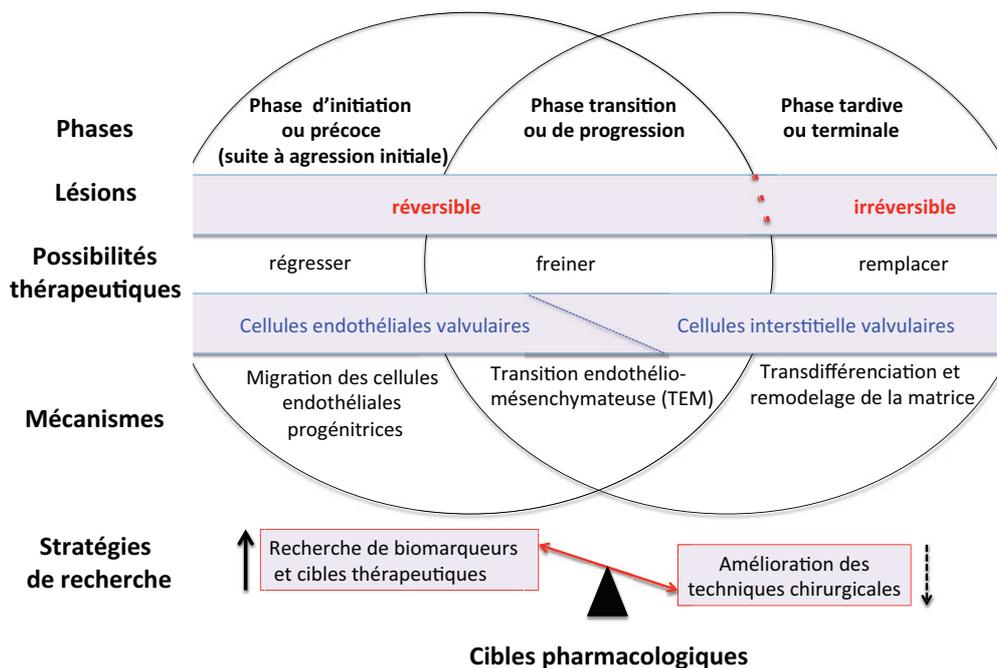


Figure 57. Hypothèse de progression des lésions valvulaires et stratégies de recherche de nouvelles cibles thérapeutiques

Les lésions valvulaires évoluent vers un stade irréversible nécessitant un remplacement valvulaire. La recherche de biomarqueurs d'initiation du processus permettrait de freiner ou régresser le processus et diminuerait sensiblement le recours à la chirurgie.

Le processus de dégénérescence est probablement entretenu par la capacité des cellules progénitrices recrutées à la faveur de la stimulation sérotoninergique à se différencier en d'autres types cellulaires. La stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} induirait les lésions valvulaires par un mécanisme double : un mécanisme extrinsèque au feuillet valvulaire à l'initiation des lésions suivi d'un mécanisme intrinsèque pour leur progression.

A la lumière de ces résultats, nous proposons donc l'existence de 3 phases lésionnelles. La première phase dite précoce ou d'initiation, suivie d'une phase de transition ou de progression active et enfin une phase tardive ou terminale. Si les lésions observées en phase tardive sont probablement irréversibles (avec la chirurgie comme seul recours thérapeutique), les deux premières phases offrent par contre la possibilité d'une intervention thérapeutique pouvant freiner la progression vers le stade irréversible ou faire régresser totalement la lésion. Sur le plan mécanistique, les lésions précoces seraient initiées par la migration au sein de la valve des cellules endothéliales progénitrices d'origine médullaire. Pendant la phase de progression, les cellules endothéliales progénitrices subiraient une transition endothélio-mésenchymateuse et une différenciation vers différents types cellulaires responsables de l'installation d'une mosaïque de lésions irréversibles (Figure 58).

Nous avons également montré à l'aide d'un modèle de valvulopathie carcinoïde que l'inhibition de la synthèse de sérotonine et le blocage des récepteurs 5-HT₂ permettaient de prévenir la survenue des lésions valvulaires. Ces résultats ouvrent la perspective d'un développement d'antagonistes des récepteurs 5-HT₂ pour la prévention des lésions de la cardiopathie carcinoïde.

Au total, l'ensemble des approches expérimentales utilisées dans ce projet, valide l'implication du système sérotoninergique dans la survenue du remodelage valvulaire et oriente vers l'implication des cellules progénitrices d'origine médullaire dans l'initiation des lésions. Ces travaux constituent une avancée majeure vers la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et de biomarqueurs précoces du remodelage valvulaire. Les cibles thérapeutiques potentielles seraient des molécules antagonistes des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2A} ou des agonistes inverses qui n'activeraient pas des voies de signalisation délétères impliquées dans le remodelage. Le diagnostic précoce des lésions valvulaires dans le but de garantir la possibilité de les freiner ou de les faire régresser sera possible par la validation d'un biomarqueur simple, fiable, facilement accessible par dosage dans les humeurs (sang, salive, urine) ou en imagerie fonctionnelle (tomographie par émission de positons ou PET-scan).

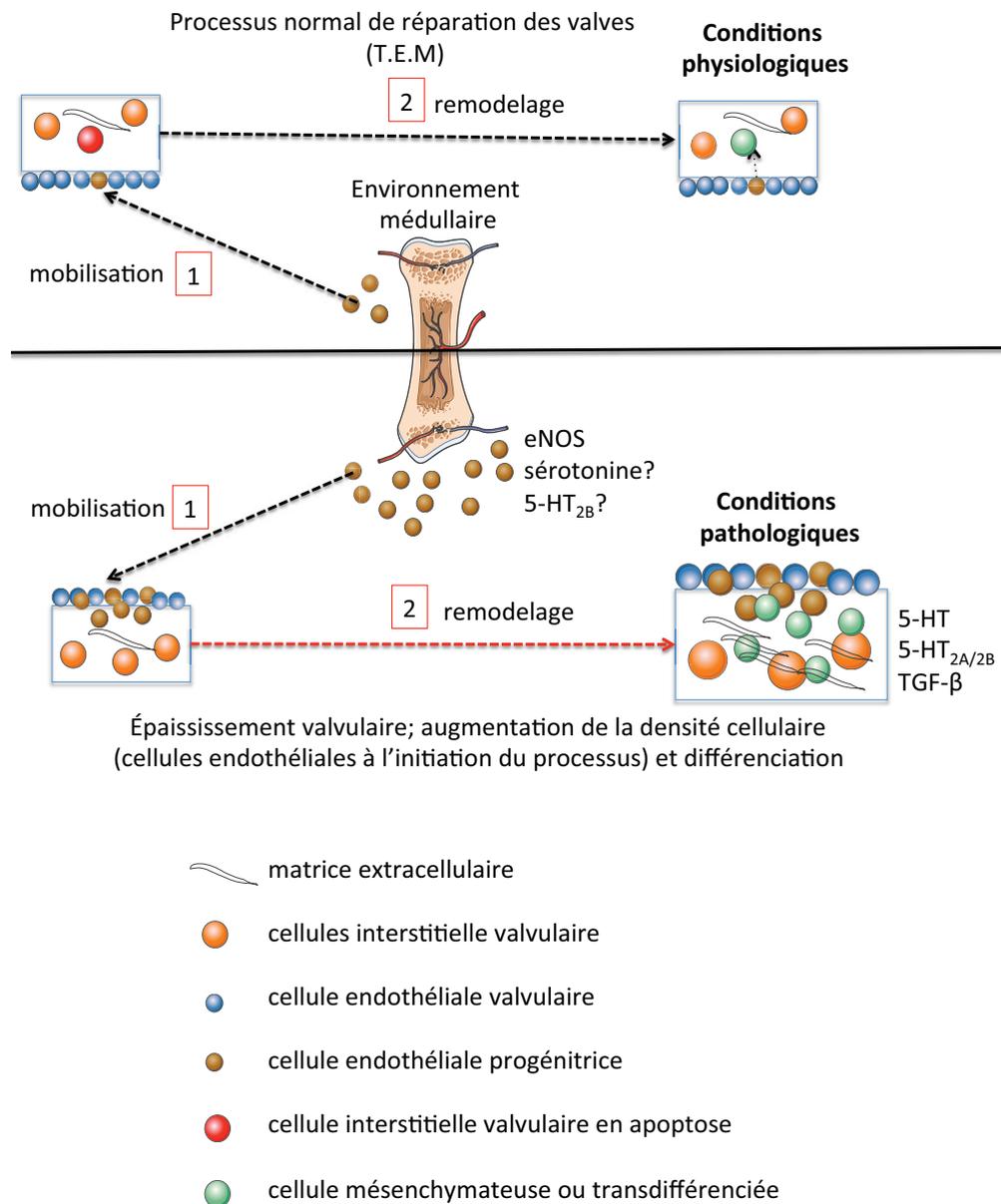


Figure 58. Hypothèses mécanistiques expliquant le remodelage valvulaire pharmacologique induit par les agonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B}.

En condition physiologique, les cellules progénitrices circulantes d'origine médullaire sont recrutées dans la valve pour participer au renouvellement des cellules interstitielles ou endothéliales en apoptose. La stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} provoque une mobilisation massive des cellules progénitrices dans la matrice valvulaire et initie le remodelage du tissu valvulaire.

2. Perspectives : vers la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et l'amélioration de la prise en charge des valvulopathies

Les dégénérescences valvulaires représentent une entité clinique hétérogène reliée à de nombreuses étiologies. Même si les lésions observées sont souvent typiques de l'histoire naturelle de l'atteinte valvulaire, l'analyse des différentes voies de signalisation potentiellement en cause décrit probablement un processus complexe dont les différentes séquences sont révélées, accélérées ou exagérées en fonction de leurs étiologies. Dans certains cas de valvulopathies induites par des dérivés de l'ergot de seigle, les lésions peuvent régresser spontanément à l'arrêt du traitement probablement en fonction du stade évolutif (Zanettini et al., 2011). L'ensemble des recherches menées pour la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires en cause lors de la dégénérescence des valves (quelles que soient leurs étiologies) a pour intérêt de déterminer la suite des événements aboutissant aux divers stades lésionnels. Ces travaux aboutiront à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant permettre de prévenir l'installation et/ou de faire régresser les lésions dans le but de contourner les difficultés liées à la chirurgie de remplacement des valves dégénérées (complications d'une chirurgie thoracique invasive chez le sujet âgé ou remplacement de feuillets valvulaires en pleine croissance en fonction des changements morphologiques du myocarde chez l'enfant).

À l'étape actuelle de nos travaux, nous proposons de focaliser les investigations ultérieures sur les divers phénomènes liés à la mobilisation des cellules endothéliales progénitrices au sein de la valve sous la dépendance de la eNOS, des récepteurs 5-HT_{2B} et sur la détection des biomarqueurs spécifiques des divers stades lésionnels. Les mécanismes liés à la mobilisation des cellules progénitrices partagent de nombreuses similitudes sur le plan mécanistique avec la néoangiogenèse (tumorale ou post-ischémique) au cours de laquelle il a été également démontré la contribution de la sérotonine et de la eNOS dans le recrutement des cellules. La recherche des biomarqueurs pourra donc être guidée par le parallèle réalisé avec les mécanismes connus de la néoangiogenèse. De façon pratique, il conviendrait à court terme, (1) d'approfondir la caractérisation au sein des tissus valvulaires pathologiques des marqueurs spécifiques aux cellules souches hématopoïétiques et en parallèle (2) d'analyser le potentiel de mobilisation à partir du microenvironnement médullaire des cellules souches hématopoïétiques sous le contrôle de la stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₂ et de la eNOS. La preuve de la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques par des agonistes des récepteurs 5-HT₂ pourra être faite sur différentes cohortes de souris sauvages ou transgéniques (5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{2B}^{-/-} ou 5-HT_{2A/2B}^{-/-}) traitées par la NdF avec pour critère de jugement, l'évaluation de la

proportion des différentes sous-populations de cellules souches hématopoiétiques circulantes. La détermination des différents marqueurs des cellules souches hématopoiétiques ou progénitrices impliquées dans le remodelage et leur numération dans des populations de patients à risque (tumeurs carcinoïdes, patients diabétiques ou hémodialysés) pourrait servir de marqueur pour l'évaluation du risque de dégénérescence valvulaire. Le pouvoir mobilisateur des cellules souches hématopoiétiques de certains agonistes des récepteurs 5-HT_{2B} pourra être mis à profit pour le développement d'un modèle pharmacologique pouvant servir au criblage des molécules à haut risque d'induction de valvulopathie au cours des phases précoces du développement des médicaments.

Sur le plan thérapeutique, ces résultats devraient aboutir à long terme, au développement de molécules ciblant les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2A} et/ou les voies de signalisation associées dépendant probablement de la β -arrestine, de la eNOS ou impliquées dans la transdifférentiation des ces cellules endothéliales progénitrices. Ces molécules pourraient trouver leur indication dans des aires thérapeutiques comme dans la valvulopathie du diabétique, des patients hémodialysés, dans la cardiopathie carcinoïde ou même en médecine vétérinaire pour la prise en charge des lésions valvulaires développées par certaines races canines comme le Cavalier King Charles Spaniel.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdelwahid, E., Rice, D., Pelliniemi, L.J., and Jokinen, E. (2001). Overlapping and differential localization of Bmp-2, Bmp-4, Msx-2 and apoptosis in the endocardial cushion and adjacent tissues of the developing mouse heart. *Cell Tissue Res.* *305*, 67–78.

Aboumarzouk, O.M., Agarwal, T., Antakia, R., Shariff, U., and Nelson, R.L. (2011). Cisapride for intestinal constipation. *Cochrane Database Syst Rev* CD007780.

Adham, N., Kao, H.T., Schechter, L.E., Bard, J., Olsen, M., Urquhart, D., Durkin, M., Hartig, P.R., Weinshank, R.L., and Branchek, T.A. (1993). Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 408–412.

Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat. Med.* *9*, 1370–1376.

Aikawa, E., Whittaker, P., Farber, M., Mendelson, K., Padera, R.F., Aikawa, M., and Schoen, F.J. (2006). Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation* *113*, 1344–1352.

Almaula, N., Ebersole, B.J., Zhang, D., Weinstein, H., and Sealfon, S.C. (1996). Mapping the binding site pocket of the serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor. Ser3.36(159) provides a second interaction site for the protonated amine of serotonin but not of lysergic acid diethylamide or bufotenin. *J. Biol. Chem.* *271*, 14672–14675.

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. (Lond.)* *126*, 596–618.

Ansell, S.M., Mahoney, M.R., Green, E.M., and Rubin, J. (2004). Topotecan in patients with advanced neuroendocrine tumors: a phase II study with significant hematologic toxicity. *Am. J. Clin. Oncol.* *27*, 232–235.

Araki, T., Mohi, M.G., Ismat, F.A., Bronson, R.T., Williams, I.R., Kutok, J.L., Yang, W., Pao, L.I., Gilliland, D.G., Epstein, J.A., et al. (2004). Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nat. Med.* *10*, 849–857.

Arvanitakis, C., Nikopoulos, A., Theoharidis, A., Giannoulis, E., Vagios, I., Anthopoulou, H., Michailidis, D., and Tourkantonis, A. (1993). Cisapride and ranitidine in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease—a comparative randomized double-blind trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *7*, 635–641.

Asada, M., Ebihara, S., Yamanda, S., Niu, K., Okazaki, T., Sora, I., and Arai, H. (2009a). Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia* *11*, 408–417.

Asada, M., Ebihara, S., Yamanda, S., Niu, K., Okazaki, T., Sora, I., and Arai, H. (2009b). Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia* *11*, 408–417.

Ase, A.R., Reader, T.A., Hen, R., Riad, M., and Descarries, L. (2001). Regional changes in density of serotonin transporter in the brain of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} knockout mice, and of serotonin innervation in the 5-HT_{1B} knockout. *J. Neurochem.* *78*, 619–630.

B

Bach, T., Syversveen, T., Kvingedal, A.M., Krobert, K.A., Brattelid, T., Kaumann, A.J., and Levy, F.O. (2001). 5HT₄(a) and 5-HT₄(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *363*, 146–160.

- Bai, F., Yin, T., Johnstone, E.M., Su, C., Varga, G., Little, S.P., and Nelson, D.L. (2004). Molecular cloning and pharmacological characterization of the guinea pig 5-HT1E receptor. *Eur. J. Pharmacol.* *484*, 127–139.
- Baker, L.P., Nielsen, M.D., Impey, S., Metcalf, M.A., Poser, S.W., Chan, G., Obrietan, K., Hamblin, M.W., and Storm, D.R. (1998). Stimulation of type 1 and type 8 Ca²⁺/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the Gs-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT7A receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 17469–17476.
- Baldwin, H.S., Lloyd, T.R., and Solursh, M. (1994). Hyaluronate degradation affects ventricular function of the early postlooped embryonic rat heart in situ. *Circ. Res.* *74*, 244–252.
- Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., and Daszuta, A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* *29*, 450–460.
- 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*, 891–895.
- Banes, A.K.L., and Watts, S.W. (2002). Upregulation of arterial serotonin 1B and 2B receptors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* *39*, 394–398.
- Bax, W.A., Van Heuven-Nolsen, D., Bos, E., Simoons, M.L., and Saxena, P.R. (1992). 5-Hydroxytryptamine-induced contractions of the human isolated saphenous vein: involvement of 5-HT₂ and 5-HT_{1D}-like receptors, and a comparison with grafted veins. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *345*, 500–508.
- Beattie, D.T., Smith, J.A.M., Marquess, D., Vickery, R.G., Armstrong, S.R., Pulido-Rios, T., McCullough, J.L., Sandlund, C., Richardson, C., Mai, N., et al. (2004). The 5-HT₄ receptor agonist, tegaserod, is a potent 5-HT_{2B} receptor antagonist in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* *143*, 549–560.
- Belelli, D., Balcarek, J.M., Hope, A.G., Peters, J.A., Lambert, J.J., and Blackburn, T.P. (1995). Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3A_S receptor subunit. *Mol. Pharmacol.* *48*, 1054–1062.
- Bender, E., Pindon, A., van Oers, I., Zhang, Y.B., Gommeren, W., Verhasselt, P., Jurzak, M., Leysen, J., and Luyten, W. (2000a). Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J. Neurochem.* *74*, 478–489.
- Bender, E., Pindon, A., van Oers, I., Zhang, Y.B., Gommeren, W., Verhasselt, P., Jurzak, M., Leysen, J., and Luyten, W. (2000b). Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J. Neurochem.* *74*, 478–489.
- Bengel, D., Murphy, D.L., Andrews, A.M., Wichems, C.H., Feltner, D., Heils, A., Mössner, R., Westphal, H., and Lesch, K.P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) in serotonin transporter-deficient mice. *Mol. Pharmacol.* *53*, 649–655.
- Benzenhöfer, U., and Passie, T. (2006). [The early history of “Ecstasy”]. *Nervenarzt* *77*, 95–96, 98–99.
- Bernanke, D.H., and Markwald, R.R. (1982). Migratory behavior of cardiac cushion tissue cells in a collagen-lattice culture system. *Dev. Biol.* *91*, 235–245.
- Bert, B., Dere, E., Wilhelmi, N., Kusserow, H., Theuring, F., Huston, J.P., and Fink, H. (2005). Transient overexpression of the 5-HT_{1A} receptor impairs water-maze but not hole-board performance. *Neurobiol Learn Mem* *84*, 57–68.
- Bhattacharya, A., Dang, H., Zhu, Q.-M., Schnegelsberg, B., Rozengurt, N., Cain, G., Prantil, R., Vorp, D.A., Guy, N., Julius, D., et al. (2004). Urothelial observations in mice expressing a constitutively active point mutation in the 5-HT_{3A} receptor subunit. *J. Neurosci.* *24*, 5537–5548.

- Bhattacharyya, S., Davar, J., Dreyfus, G., and Caplin, M.E. (2007). Carcinoid heart disease. *Circulation* 116, 2860–2865.
- Bhattacharyya, S., Schapira, A.H., Mikhailidis, D.P., and Davar, J. (2009). Drug-induced fibrotic valvular heart disease. *Lancet* 374, 577–585.
- Birkeland, J. a. K., Sjaastad, I., Brattelid, T., Qvigstad, E., Moberg, E.R., Krobert, K.A., Bjørnerheim, R., Skomedal, T., Sejersted, O.M., Osnes, J.-B., et al. (2007). Effects of treatment with a 5-HT₄ receptor antagonist in heart failure. *Br. J. Pharmacol.* 150, 143–152.
- Blanpain, C., Le Poul, E., Parma, J., Knoop, C., Detheux, M., Parmentier, M., Vassart, G., and Abramowicz, M.J. (2003). Serotonin 5-HT_{2B} receptor loss of function mutation in a patient with fenfluramine-associated primary pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* 60, 518–528.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Pepin, M.C., Beauchemin, M., Moustakas, A., Lodish, H.F., and O'Connor-McCourt, M.D. (2001). Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 24627–24637.
- 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, 2252–2261.
- Bockaert, J., Sebben, M., and Dumuis, A. (1990). Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine₄(5-HT₄) receptors positively coupled to adenylate cyclase in adult guinea pig hippocampal membranes: effect of substituted benzamide derivatives. *Mol. Pharmacol.* 37, 408–411.
- Boess, F.G., Monsma, F.J., Jr, Carolo, C., Meyer, V., Rudler, A., Zwingelstein, C., and Sleight, A.J. (1997a). Functional and radioligand binding characterization of rat 5-HT₆ receptors stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology* 36, 713–720.
- Boess, F.G., Monsma, F.J., Jr, Meyer, V., Zwingelstein, C., and Sleight, A.J. (1997b). Interaction of tryptamine and ergoline compounds with threonine 196 in the ligand binding site of the 5-hydroxytryptamine₆ receptor. *Mol. Pharmacol.* 52, 515–523.
- Boess, F.G., Riemer, C., Bös, M., Bentley, J., Bourson, A., and Sleight, A.J. (1998). The 5-hydroxytryptamine₆ receptor-selective radioligand [³H]Ro 63-0563 labels 5-hydroxytryptamine receptor binding sites in rat and porcine striatum. *Mol. Pharmacol.* 54, 577–583.
- Bonaventure, P., Schotte, A., Cras, P., and Leysen, J.E. (1997). Autoradiographic mapping of 5-HT_{1B}- and 5-HT_{1D} receptors in human brain using [³H]alniditan, a new radioligand. *Recept. Channels* 5, 225–230.
- Bonhaus, D.W., Flippin, L.A., Greenhouse, R.J., Jaime, S., Rocha, C., Dawson, M., Van Natta, K., Chang, L.K., Pulido-Rios, T., Webber, A., et al. (1999). RS-127445: a selective, high affinity, orally bioavailable 5-HT_{2B} receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1075–1082.
- Bortolozzi, A., Amargós-Bosch, M., Toth, M., Artigas, F., and Adell, A. (2004). In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 88, 1373–1379.
- Boutrel, B., Monaca, C., Hen, R., Hamon, M., and Adrien, J. (2002). Involvement of 5-HT_{1A} receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT_{1A} knock-out mice. *J. Neurosci.* 22, 4686–4692.
- Boyer, A.S., Ayerinkas, I.I., Vincent, E.B., McKinney, L.A., Weeks, D.L., and Runyan, R.B. (1999). TGFbeta₂ and TGFbeta₃ have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev. Biol.* 208, 530–545.
- Brady, C.A., Dover, T.J., Massoura, A.N., Princivalle, A.P., Hope, A.G., and Barnes, N.M. (2007). Identification of 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} receptor subunits in human hippocampus. *Neuropharmacology* 52, 1284–1290.

Brady, C.A., Stanford, I.M., Ali, I., Lin, L., Williams, J.M., Dubin, A.E., Hope, A.G., and Barnes, N.M. (2001). Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT_{3A} receptors versus heteromeric 5-HT_{3A/3B} receptors. *Neuropharmacology* 41, 282–284.

Brattelid, T., Kvingedal, A.M., Krobert, K.A., Andressen, K.W., Bach, T., Hystad, M.E., Kaumann, A.J., and Levy, F.O. (2004). Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT₄ receptor splice variant, 5-HT₄(i). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 616–628.

Brattelid, T., Qvigstad, E., Birkeland, J.A.K., Swift, F., Bekkevold, S.V.S., Krobert, K.A., Sejersted, O.M., Skomedal, T., Osnes, J.-B., Levy, F.O., et al. (2007). Serotonin responsiveness through 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors is differentially regulated in hypertrophic and failing rat cardiac ventricle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 767–779.

Brennan, T.J., Seeley, W.W., Kilgard, M., Schreiner, C.E., and Tecott, L.H. (1997). Sound-induced seizures in serotonin 5-HT_{2c} receptor mutant mice. *Nat. Genet.* 16, 387–390.

Van Buren, G., 2nd, Rashid, A., Yang, A.D., Abdalla, E.K., Gray, M.J., Liu, W., Somcio, R., Fan, F., Camp, E.R., Yao, J.C., et al. (2007). The development and characterization of a human midgut carcinoid cell line. *Clin. Cancer Res.* 13, 4704–4712.

Bürger, A., Benicke, M., Deten, A., and Zimmer, H.G. (2001). Catecholamines stimulate interleukin-6 synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H14–21.

Burnet, P.W., Eastwood, S.L., Lacey, K., and Harrison, P.J. (1995). The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Res.* 676, 157–168.

Butcher, J.T., and Markwald, R.R. (2007). Valvulogenesis: the moving target. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 362, 1489–1503.

Butcher, J.T., and Nerem, R.M. (2007). Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 362, 1445–1457.

Butcher, J.T., Penrod, A.M., García, A.J., and Nerem, R.M. (2004). Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1429–1434.

Buzzi, M.G., Carter, W.B., Shimizu, T., Heath, H., and Moskowitz, M.A. (1991). Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology* 30, 1193–1200.

C

Calloway, T.J., Martin, L.J., Zhang, X., Tandon, A., Benson, D.W., and Hinton, R.B. (2011). Risk factors for aortic valve disease in bicuspid aortic valve: a family-based study. *Am. J. Med. Genet. A* 155A, 1015–1020.

Camenisch, T.D., Schroeder, J.A., Bradley, J., Klewer, S.E., and McDonald, J.A. (2002). Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nat. Med.* 8, 850–855.

Camenisch, T.D., Spicer, A.P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M.L., Calabro, A., Jr, Kubalak, S., Klewer, S.E., and McDonald, J.A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J. Clin. Invest.* 106, 349–360.

Centurión, D., Glusa, E., Sánchez-López, A., Valdivia, L.F., Saxena, P.R., and Villalón, C.M. (2004). 5-HT₇, but not 5-HT_{2B}, receptors mediate hypotension in vagosympathectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 502, 239–242.

- Chambers, C.D., Hernandez-Diaz, S., Van Marter, L.J., Werler, M.M., Louik, C., Jones, K.L., and Mitchell, A.A. (2006). Selective serotonin-reuptake inhibitors and risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *N. Engl. J. Med.* *354*, 579–587.
- Chameau, P., and van Hooft, J.A. (2006). Serotonin 5-HT(3) receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* *326*, 573–581.
- Chan, S.Y., and Loscalzo, J. (2008). Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *44*, 14–30.
- Chandra, M., Gupta, V., Johri, A.K., Misra, R., Kumar, A., Gujrati, V., and Shanker, K. (1994). Serotonergic mechanisms in heart failure. *Indian Heart J* *46*, 153–156.
- Chang, C.-P., Neilson, J.R., Bayle, J.H., Gestwicki, J.E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2004). A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* *118*, 649–663.
- Chen, B., Bronson, R.T., Klamann, L.D., Hampton, T.G., Wang, J.F., Green, P.J., Magnuson, T., Douglas, P.S., Morgan, J.P., and Neel, B.G. (2000). Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat. Genet.* *24*, 296–299.
- Choi, D.S., and Maroteaux, L. (1996). Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT2B receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Lett.* *391*, 45–51.
- Chojnacka-Wójcik, E., Kłodzińska, A., and Dereń-Wesołek, A. (1994). Involvement of 5-HT2C receptors in the m-CPP-induced antinociception in mice. *Pol J Pharmacol* *46*, 423–428.
- Chou-Green, J.M., Holscher, T.D., Dallman, M.F., and Akana, S.F. (2003a). Compulsive behavior in the 5-HT2C receptor knockout mouse. *Physiol. Behav.* *78*, 641–649.
- Chou-Green, J.M., Holscher, T.D., Dallman, M.F., and Akana, S.F. (2003b). Repeated stress in young and old 5-HT(2C) receptor knockout mice. *Physiol. Behav.* *79*, 217–226.
- Claeyssen, S., Faye, P., Sebben, M., Lemaire, S., Bockaert, J., and Dumuis, A. (1997). Cloning and expression of human 5-HT4S receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenylyl cyclase. *Neuroreport* *8*, 3189–3196.
- De Clerck, F., Somers, Y., and Van Gorp, L. (1984). Platelet-vessel wall interactions in hemostasis: implication of 5-hydroxytryptamine. *Agents Actions* *15*, 627–635.
- 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-HT4 receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* *24*, 412–419.
- Le Coniat, M., Choi, D.S., Maroteaux, L., Launay, J.M., and Berger, R. (1996). The 5-HT2B receptor gene maps to 2q36.3-2q37.1. *Genomics* *32*, 172–173.
- 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*, 581–588.
- Cortijo, J., Martí-Cabrera, M., Bernabeu, E., Domènech, T., Bou, J., Fernández, A.G., Beleta, J., Palacios, J.M., and Morcillo, E.J. (1997). Characterization of 5-HT receptors on human pulmonary artery and vein: functional and binding studies. *Br. J. Pharmacol.* *122*, 1455–1463.
- COSH, J., CATES, J.E., and PUGH, D.W. (1959). Carcinoid heart disease. *Br Heart J* *21*, 369–380.
- Côté, F., Thévenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M.-A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., et al. (2003). Disruption of the nonneuronal *tph1* gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 13525–13530.

Cox, D.A., and Cohen, M.L. (1995). 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptor signaling in rat stomach fundus: role of voltage-dependent calcium channels, intracellular calcium release and protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *272*, 143–150.

Crowell, M.D., Mathis, C., Schettler, V.A., Yunus, T., and Lacy, B.E. (2005). The effects of tegaserod, a 5-HT receptor agonist, on gastric emptying in a murine model of diabetes mellitus. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 738–743.

D

Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G., and Kirkness, E.F. (1999). The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* *397*, 359–363.

Deraet, M., Manivet, P., Janoshazi, A., Callebert, J., Guenther, S., Drouet, L., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2005). The natural mutation encoding a C terminus-truncated 5-hydroxytryptamine 2B receptor is a gain of proliferative functions. *Mol. Pharmacol.* *67*, 983–991.

Desgrosellier, J.S., Mundell, N.A., McDonnell, M.A., Moses, H.L., and Barnett, J.V. (2005). Activin receptor-like kinase 2 and Smad6 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Dev. Biol.* *280*, 201–210.

Dizeyi, N., Bjartell, A., Nilsson, E., Hansson, J., Gadaleanu, V., Cross, N., and Abrahamsson, P.-A. (2004). Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. *Prostate* *59*, 328–336.

Doménech, T., Beleta, J., Fernández, A.G., Gristwood, R.W., Cruz Sánchez, F., Tolosa, E., and Palacios, J.M. (1994). Identification and characterization of serotonin 5-HT₄ receptor binding sites in human brain: comparison with other mammalian species. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *21*, 176–180.

Doménech, T., Beleta, J., and Palacios, J.M. (1997). Characterization of human serotonin 1D and 1B receptors using [3H]-GR-125743, a novel radiolabelled serotonin 5HT_{1D/1B} receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *356*, 328–334.

Droogmans, S., Cosyns, B., D'haenen, H., Creeten, E., Weytjens, C., Franken, P.R., Scott, B., Schoors, D., Kemdem, A., Close, L., et al. (2007). Possible association between 3,4-methylenedioxymethamphetamine abuse and valvular heart disease. *Am. J. Cardiol.* *100*, 1442–1445.

Droogmans, S., Roosens, B., Cosyns, B., Degallier, C., Hernot, S., Weytjens, C., Garbar, C., Caveliers, V., Pipeleers-Marichal, M., Franken, P.R., et al. (2009). Dose dependency and reversibility of serotonin-induced valvular heart disease in rats. *Cardiovasc. Toxicol.* *9*, 134–141.

Druce, M., Rockall, A., and Grossman, A.B. (2009). Fibrosis and carcinoid syndrome: from causation to future therapy. *Nat Rev Endocrinol* *5*, 276–283.

Dubin, A.E., Huvar, R., D'Andrea, M.R., Pyati, J., Zhu, J.Y., Joy, K.C., Wilson, S.J., Galindo, J.E., Glass, C.A., Luo, L., et al. (1999). The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J. Biol. Chem.* *274*, 30799–30810.

Dukat, M., Smith, C., Herrick-Davis, K., Teitler, M., and Glennon, R.A. (2004). Binding of tryptamine analogs at h5-HT_{1E} receptors: a structure-affinity investigation. *Bioorg. Med. Chem.* *12*, 2545–2552.

Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M., Cory, R., and Bockaert, J. (1988). A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol. Pharmacol.* *34*, 880–887.

E

Eddahibi, S., Humbert, M., Fadel, E., Raffestin, B., Darmon, M., Capron, F., Simonneau, G., Darteville, P., Hamon, M., and Adnot, S. (2001). Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* *108*, 1141–1150.

Egan, C., Grinde, E., Dupre, A., Roth, B.L., Hake, M., Teitler, M., and Herrick-Davis, K. (2000). Agonist high and low affinity state ratios predict drug intrinsic activity and a revised ternary complex mechanism at serotonin 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors. *Synapse* 35, 144–150.

El-Khodor, B.F., Dimmler, M.H., Amara, D.A., Hofer, M., Hen, R., and Brunner, D. (2004). Juvenile 5HT(1B) receptor knockout mice exhibit reduced pharmacological sensitivity to 5HT(1A) receptor activation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 405–413.

Elhousseiny, A., and Hamel, E. (2001). Sumatriptan elicits both constriction and dilation in human and bovine brain intracortical arterioles. *Br. J. Pharmacol.* 132, 55–62.

Ellis, E.S., Byrne, C., Murphy, O.E., Tilford, N.S., and Baxter, G.S. (1995). Mediation by 5-hydroxytryptamine_{2B} receptors of endothelium-dependent relaxation in rat jugular vein. *Br. J. Pharmacol.* 114, 400–404.

Erickson, S.L., O’Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H., and Moore, M.W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development* 124, 4999–5011.

Eriksson, B., and Oberg, K. (1999). Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: future outlook. *Ann. Oncol.* 10 Suppl 2, S31–38.

Erlander, M.G., Lovenberg, T.W., Baron, B.M., de Lecea, L., Danielson, P.E., Racke, M., Slone, A.L., Siegel, B.W., Foye, P.E., and Cannon, K. (1993). Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3452–3456.

Erspamer, V., and Asero, B. (1952). Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the Enterochromaffin Cell System, as 5-Hydroxytryptamine. *Nature* 169, 800–801.

ERSPAMER, V., and BORETTI, G. (1951). Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 88, 296–332.

Esaki, T., Cook, M., Shimoji, K., Murphy, D.L., Sokoloff, L., and Holmes, A. (2005). Developmental disruption of serotonin transporter function impairs cerebral responses to whisker stimulation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5582–5587.

Etienne, Y., Jobic, Y., Frachon, I., Fatemi, M., Castellant, P., and Quintin-Roué, I. (2011). Mitral and aortic valvular disease associated with benfluorex use. *J. Heart Valve Dis.* 20, 348–350.

Even, J., Eskander, M., and Kang, J. (2012). Bone Morphogenetic Protein in Spine Surgery: Current and Future Uses. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 20, 547–552.

F

Fargin, A., Raymond, J.R., Regan, J.W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1989). Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 14848–14852.

Fedouloff, M., Hossner, F., Voyle, M., Ranson, J., Powles, J., Riley, G., and Sanger, G. (2001). Synthesis and pharmacological activity of metabolites of the 5-HT(4) receptor antagonist SB-207266. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 2119–2128.

Ferrari, M.D. (1998). Migraine. *Lancet* 351, 1043–1051.

Fink, K.B., and Göthert, M. (2007). 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol. Rev.* 59, 360–417.

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*, G877–893.

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. (2000a). Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* *57*, 75–81.

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. (2000b). Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* *57*, 75–81.

Fone, K.C., Austin, R.H., Topham, I.A., Kennett, G.A., and Punhani, T. (1998). Effect of chronic m-CPP on locomotion, hypophagia, plasma corticosterone and 5-HT_{2C} receptor levels in the rat. *Br. J. Pharmacol.* *123*, 1707–1715.

Fonseca, M.I., Ni, Y.G., Dunning, D.D., and Miledi, R. (2001). Distribution of serotonin 2A, 2C and 3 receptor mRNA in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *89*, 11–19.

Ford, A.P., Baxter, G.S., Eglén, R.M., and Clarke, D.E. (1992). 5-Hydroxytryptamine stimulates cyclic AMP formation in the tunica muscularis mucosae of the rat oesophagus via 5-HT₄ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *211*, 117–120.

Foxx-Orenstein, A.E., Kuemmerle, J.F., and Grider, J.R. (1996). Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology* *111*, 1281–1290.

Frachon, I., Etienne, Y., Jobic, Y., Le Gal, G., Humbert, M., and Leroyer, C. (2010). Benfluorex and unexplained valvular heart disease: a case-control study. *PLoS ONE* *5*, e10128.

Frank, M.G., Stryker, M.P., and Tecott, L.H. (2002). Sleep and sleep homeostasis in mice lacking the 5-HT_{2c} receptor. *Neuropsychopharmacology* *27*, 869–873.

Fu, L.-W., and Longhurst, J.C. (2002). Activated platelets contribute to stimulation of cardiac afferents during ischaemia in cats: role of 5-HT(3) receptors. *J. Physiol. (Lond.)* *544*, 897–912.

Fujita, M., Shimada, S., Maeno, H., Nishimura, T., and Tohyama, M. (1993). Cellular localization of serotonin transporter mRNA in the rat brain. *Neurosci. Lett.* *162*, 59–62.

Fuller, R.W., and Wong, D.T. (1990). Serotonin uptake and serotonin uptake inhibition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *600*, 68–78; discussion 79–80.

Furness, J.B., and Costa, M. (1982). Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: Their projections in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* *7*, 341–349.

G

Gaddum, J.H., and Picarelli, Z.P. (1957). Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* *12*, 323–328.

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., and Branchek, T.A. (1995). The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J.* *14*, 2806–2815.

Ghevariya, V., Malieckal, A., Ghevariya, N., Mazumder, M., and Anand, S. (2009). Carcinoid tumors of the gastrointestinal tract. *South. Med. J.* *102*, 1032–1040.

Giorgetti, M., and Tecott, L.H. (2004). Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur. J. Pharmacol.* *488*, 1–9.

- Gitler, A.D., Lu, M.M., Jiang, Y.Q., Epstein, J.A., and Gruber, P.J. (2003a). Molecular markers of cardiac endocardial cushion development. *Dev. Dyn.* 228, 643–650.
- Gitler, A.D., Zhu, Y., Ismat, F.A., Lu, M.M., Yamauchi, Y., Parada, L.F., and Epstein, J.A. (2003b). Nf1 has an essential role in endothelial cells. *Nat. Genet.* 33, 75–79.
- Glusa, E., and Pertz, H.H. (2000). Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT(2B) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 130, 692–698.
- Goadsby, P.J., Lipton, R.B., and Ferrari, M.D. (2002). Migraine--current understanding and treatment. *N. Engl. J. Med.* 346, 257–270.
- Gould, S.T., Matherly, E.E., Smith, J.N., Heistad, D.D., and Anseth, K.S. (2014). The role of valvular endothelial cell paracrine signaling and matrix elasticity on valvular interstitial cell activation. *Biomaterials* 35, 3596–3606.
- Goumans, M.-J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., and ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 21, 1743–1753.
- Graham, J.R. (1967a). Cardiac and pulmonary fibrosis during methysergide therapy for headache. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 78, 79–92.
- Graham, J.R. (1967b). Cardiac and pulmonary fibrosis during methysergide therapy for headache. *Am. J. Med. Sci.* 254, 1–12.
- Graham, J.R., Suby, H.I., LeCompte, P.R., and Sadowsky, N.L. (1966). Fibrotic disorders associated with methysergide therapy for headache. *N. Engl. J. Med.* 274, 359–368.
- 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, 157–167.
- Grailhe, R., Waeber, C., Dulawa, S.C., Hornung, J.P., Zhuang, X., Brunner, D., Geyer, M.A., and Hen, R. (1999). Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT(5A) receptor. *Neuron* 22, 581–591.
- Grånäs, C., and Larhammar, D. (1999). Identification of an amino acid residue important for binding of methiothepin and sumatriptan to the human 5-HT(1B) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 380, 171–181.
- GREENBERG, M.J. (1960a). Structure-activity relationship of tryptamine analogues on the heart of *Venus mercenaria*. *Br J Pharmacol Chemother* 15, 375–388.
- GREENBERG, M.J. (1960b). The responses of the *Venus* heart to catechol amines and high concentration of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother* 15, 365–374.
- Greene, R.M., Nugent, P., Mukhopadhyay, P., Warner, D.R., and Pisano, M.M. (2003). Intracellular dynamics of Smad-mediated TGFbeta signaling. *J. Cell. Physiol.* 197, 261–271.
- Groenendijk, B.C.W., Hierck, B.P., Gittenberger-De Groot, A.C., and Poelmann, R.E. (2004). Development-related changes in the expression of shear stress responsive genes KLF-2, ET-1, and NOS-3 in the developing cardiovascular system of chicken embryos. *Dev. Dyn.* 230, 57–68.
- Guscott, M.R., Egan, E., Cook, G.P., Stanton, J.A., Beer, M.S., Rosahl, T.W., Hartmann, S., Kulagowski, J., McAllister, G., Fone, K.C.F., et al. (2003). The hypothermic effect of 5-CT in mice is mediated through the 5-HT7 receptor. *Neuropharmacology* 44, 1031–1037.
- Gustafson, A., King, C., and Rey, J.A. (2013). Lorcaserin (Belviq): A Selective Serotonin 5-HT2C Agonist In the Treatment of Obesity. *P T* 38, 525–534.

Gustafsson, B.I., Tømmerås, K., Nordrum, I., Loennechen, J.P., Brunsvik, A., Solligård, E., Fossmark, R., Bakke, I., Syversen, U., and Waldum, H. (2005). Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation* *111*, 1517–1522.

H

Hafizi, S., Taylor, P.M., Chester, A.H., Allen, S.P., and Yacoub, M.H. (2000). Mitogenic and secretory responses of human valve interstitial cells to vasoactive agents. *J. Heart Valve Dis.* *9*, 454–458.

Hanada, T., Hashimoto, M., Nosaka, S., Sasaki, T., Nakayama, K., Masumura, S., Yamauchi, M., and Tamura, K. (2000). Shear stress enhances prostacyclin release from endocardial endothelial cells. *Life Sci.* *66*, 215–220.

Harte, S.E., Kender, R.G., and Borszcz, G.S. (2005). Activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in the parafascicular nucleus suppresses the affective reaction of rats to noxious stimulation. *Pain* *113*, 405–415.

Hauso, Ø., Gustafsson, B.I., Loennechen, J.P., Stunes, A.K., Nordrum, I., and Waldum, H.L. (2007). Long-term serotonin effects in the rat are prevented by terguride. *Regul. Pept.* *143*, 39–46.

Hedlund, P.B., Kelly, L., Mazur, C., Lovenberg, T., Sutcliffe, J.G., and Bonaventure, P. (2004). 8-OH-DPAT acts on both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* *487*, 125–132.

Hegde, S.S., Wong, A.G., Perry, M.R., Ku, P., Moy, T.M., Loeb, M., and Eglen, R.M. (1995). 5-HT₄ receptor mediated stimulation of gastric emptying in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *351*, 589–595.

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-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 15049–15054.

Hertig, C.M., Kubalak, S.W., Wang, Y., and Chien, K.R. (1999). Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis. *J. Biol. Chem.* *274*, 37362–37369.

Hervé, P., Launay, J.M., Scrobocaci, 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*, 249–254.

Hirota, N., McCuaig, S., O’Sullivan, M.J., and Martin, J.G. (2014). Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res* *12*, 599–609.

Holbrook, J.D., Gill, C.H., Zebda, N., Spencer, J.P., Leyland, R., Rance, K.H., Trinh, H., Balmer, G., Kelly, F.M., Yusaf, S.P., et al. (2009). Characterisation of 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E} receptor subunits: evolution, distribution and function. *J. Neurochem.* *108*, 384–396.

Holmes, A., Murphy, D.L., and Crawley, J.N. (2002). Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl.)* *161*, 160–167.

Hope, A.G., Peters, J.A., Brown, A.M., Lambert, J.J., and Blackburn, T.P. (1996). Characterization of a human 5-hydroxytryptamine₃ receptor type A (h5-HT_{3R-AS}) subunit stably expressed in HEK 293 cells. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 1237–1245.

Hoskin, K.L., Kaube, H., and Goadsby, P.J. (1996). Sumatriptan can inhibit trigeminal afferents by an exclusively neural mechanism. *Brain* *119* (Pt 5), 1419–1428.

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*, 112–120.

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*, 533–554.

Huang, X.-P., Setola, V., Yadav, P.N., Allen, J.A., Rogan, S.C., Hanson, B.J., Revankar, C., Robers, M., Doucette, C., and Roth, B.L. (2009). Parallel functional activity profiling reveals valvulopathogens are potent 5-hydroxytryptamine(2B) receptor agonists: implications for drug safety assessment. *Mol. Pharmacol.* *76*, 710–722.

Hur, J., Yoon, C.-H., Kim, H.-S., Choi, J.-H., Kang, H.-J., Hwang, K.-K., Oh, B.-H., Lee, M.-M., and Park, Y.-B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 288–293.

Hurle, J.M., Kitten, G.T., Sakai, L.Y., Volpin, D., and Solursh, M. (1994). Elastic extracellular matrix of the embryonic chick heart: an immunohistological study using laser confocal microscopy. *Dev. Dyn.* *200*, 321–332.

Hurlstone, A.F.L., Haramis, A.-P.G., Wienholds, E., Begthel, H., Korving, J., Van Eeden, F., Cuppen, E., Zivkovic, D., Plasterk, R.H.A., and Clevers, H. (2003). The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* *425*, 633–637.

Hutcheson, J.D., Setola, V., Roth, B.L., and Merryman, W.D. (2011). Serotonin receptors and heart valve disease--it was meant 2B. *Pharmacol. Ther.* *132*, 146–157.

I

Icardo, J.M., and Colvee, E. (1995). Atrioventricular valves of the mouse: II. Light and transmission electron microscopy. *Anat. Rec.* *241*, 391–400.

Ilan, N., Mahooti, S., Rimm, D.L., and Madri, J.A. (1999). PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *J. Cell. Sci.* *112 Pt 18*, 3005–3014.

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

Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., et al. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 3221–3226.

J

Jackson, L.F., Qiu, T.H., Sunnarborg, S.W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., and Lee, D.C. (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J.* *22*, 2704–2716.

Jackson, L.N., Chen, L.A., Larson, S.D., Silva, S.R., Rychahou, P.G., Boor, P.J., Li, J., Defreitas, G., Stafford, W.L., Townsend, C.M., Jr, et al. (2009). Development and characterization of a novel in vivo model of carcinoid syndrome. *Clin. Cancer Res.* *15*, 2747–2755.

Jaffré, F., Bonnin, P., Callebert, J., Debbabi, H., Setola, V., Doly, S., Monassier, L., Mettauer, B., Blaxall, B.C., Launay, J.-M., et al. (2009a). Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* *104*, 113–123.

Jaffré, F., Bonnin, P., Callebert, J., Debbabi, H., Setola, V., Doly, S., Monassier, L., Mettauer, B., Blaxall, B.C., Launay, J.-M., et al. (2009b). Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* *104*, 113–123.

Jaffré, 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_{2B} receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α cytokine production by ventricular fibroblasts. *Circulation* *110*, 969–974.

Jian, B., Xu, J., Connolly, J., Savani, R.C., Narula, N., Liang, B., and Levy, R.J. (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor- β 1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* *161*, 2111–2121.

Jin, H., Oksenberg, D., Ashkenazi, A., Peroutka, S.J., Duncan, A.M., Rozmahel, R., Yang, Y., Mengod, G., Palacios, J.M., and O'Dowd, B.F. (1992). Characterization of the human 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor. *J. Biol. Chem.* *267*, 5735–5738.

Johansson, L., Sohn, D., Thorberg, S.O., Jackson, D.M., Kelder, D., Larsson, L.G., Rényi, L., Ross, S.B., Wallsten, C., Eriksson, H., et al. (1997). The pharmacological characterization of a novel selective 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor antagonist, NAD-299. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *283*, 216–225.

John, G.W., Pauwels, P.J., Perez, M., Halazy, S., Le Grand, B., Verscheure, Y., Valentin, J.P., Palmier, C., Wurch, T., Chopin, P., et al. (1999). F 11356, a novel 5-hydroxytryptamine (5-HT) derivative with potent, selective, and unique high intrinsic activity at 5-HT_{1B/1D} receptors in models relevant to migraine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *290*, 83–95.

Johnson, E.N., Lee, Y.M., Sander, T.L., Rabkin, E., Schoen, F.J., Kaushal, S., and Bischoff, J. (2003). NFATc1 mediates vascular endothelial growth factor-induced proliferation of human pulmonary valve endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 1686–1692.

Jonnakuty, C., and Gagnoli, C. (2008). What do we know about serotonin? *J. Cell. Physiol.* *217*, 301–306.

K

Kalipatnapu, S., Pucadyil, T.J., Harikumar, K.G., and Chattopadhyay, A. (2004). Ligand binding characteristics of the human serotonin_{1A} receptor heterologously expressed in CHO cells. *Biosci. Rep.* *24*, 101–115.

Kalkman, H.O. (1994). Is migraine prophylactic activity caused by 5-HT_{2B} or 5-HT_{2C} receptor blockade? *Life Sci.* *54*, 641–644.

Kalueff, A.V., Jensen, C.L., and Murphy, D.L. (2007). Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain Res.* *1169*, 87–97.

Kamm, M.A. (2002). Review article: the complexity of drug development for irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *16*, 343–351.

Van de Kar, L.D., Javed, A., Zhang, Y., Serres, F., Raap, D.K., and Gray, T.S. (2001). 5-HT_{2A} receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J. Neurosci.* *21*, 3572–3579.

Karnovsky, A.M., Gotow, L.F., McKinley, D.D., Piechan, J.L., Ruble, C.L., Mills, C.J., Schellin, K.A.B., Slightom, J.L., Fitzgerald, L.R., Benjamin, C.W., et al. (2003). A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene* *319*, 137–148.

Kaumann, A.J., and Levy, F.O. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* *111*, 674–706.

Kaumann, A.J., Parsons, A.A., and Brown, A.M. (1993). Human arterial constrictor serotonin receptors. *Cardiovasc. Res.* *27*, 2094–2103.

Kaumann, A.J., and Sanders, L. (1994). 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* *349*, 331–337.

Kéreveur, A., Callebert, J., Humbert, M., Hervé, 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*, 2233–2239.

Kim, J., Lee, J.H., Yeo, S.M., Chung, H.M., and Chae, J.-I. (2013). Stem cell recruitment factors secreted from cord blood-derived stem cells that are not secreted from mature endothelial cells enhance wound healing. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*

Kim, L., Kim, D.K., Yang, W.I., Shin, D.H., Jung, I.M., Park, H.K., and Chang, B.C. (2008). Overexpression of transforming growth factor-beta 1 in the valvular fibrosis of chronic rheumatic heart disease. *J. Korean Med. Sci.* *23*, 41–48.

Kim, R.Y., Robertson, E.J., and Solloway, M.J. (2001). Bmp6 and Bmp7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart. *Dev. Biol.* *235*, 449–466.

Kjekshus, J.K., Torp-Pedersen, C., Gullestad, L., Køber, L., Edvardsen, T., Olsen, I.C., Sjaastad, I., Qvigstad, E., Skomedal, T., Osnes, J.-B., et al. (2009). Effect of piboserod, a 5-HT₄ serotonin receptor antagonist, on left ventricular function in patients with symptomatic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* *11*, 771–778.

Klöppel, G., Perren, A., and Heitz, P.U. (2004). The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1014*, 13–27.

Knight, A.R., Misra, A., Quirk, K., Benwell, K., Revell, D., Kennett, G., and Bickerdike, M. (2004). Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *370*, 114–123.

Kohen, R., Metcalf, M.A., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J.E., Meltzer, H.Y., Sibley, D.R., Roth, B.L., and Hamblin, M.W. (1996). Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J. Neurochem.* *66*, 47–56.

Kretschmar, M., Doody, J., and Massagué, J. (1997). Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* *389*, 618–622.

Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., and Shibata, Y. (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* *127*, 3501–3512.

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_{2B} receptor. *Mol. Pharmacol.* *46*, 227–234.

Kusserow, H., Davies, B., Hörtnagl, H., Voigt, I., Stroh, T., Bert, B., Deng, D.R., Fink, H., Veh, R.W., and Theuring, F. (2004). Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *129*, 104–116.

L

Lacerda, C.M.R., Maclea, H.B., Kisiday, J.D., and Orton, E.C. (2012). Static and cyclic tensile strain induce myxomatous effector proteins and serotonin in canine mitral valves. *J Vet Cardiol* *14*, 223–230.

Lacroix, L.P., Dawson, L.A., Hagan, J.J., and Heidbreder, C.A. (2004). 5-HT₆ receptor antagonist SB-271046 enhances extracellular levels of monoamines in the rat medial prefrontal cortex. *Synapse* *51*, 158–164.

Laforest, B., Andelfinger, G., and Nemer, M. (2011). Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J. Clin. Invest.* *121*, 2876–2887.

Laforest, B., and Nemer, M. (2011). GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Dev. Biol.* *358*, 368–378.

Laforest, B., and Nemer, M. (2012). Genetic insights into bicuspid aortic valve formation. *Cardiol Res Pract* *2012*, 180297.

- Lai, Y.T., Beason, K.B., Brames, G.P., Desgrosellier, J.S., Cleggett, M.C., Shaw, M.V., Brown, C.B., and Barnett, J.V. (2000). Activin receptor-like kinase 2 can mediate atrioventricular cushion transformation. *Dev. Biol.* 222, 1–11.
- Lakkis, M.M., and Epstein, J.A. (1998). Neurofibromin modulation of ras activity is required for normal endocardial-mesenchymal transformation in the developing heart. *Development* 125, 4359–4367.
- Lange, A.W., Molkentin, J.D., and Yutzey, K.E. (2004). DSCR1 gene expression is dependent on NFATc1 during cardiac valve formation and colocalizes with anomalous organ development in trisomy 16 mice. *Dev. Biol.* 266, 346–360.
- Laporte, A.M., Doyen, C., Nevo, I.T., Chauveau, J., Hauw, J.J., and Hamon, M. (1996). Autoradiographic mapping of serotonin 5-HT1A, 5-HT1D, 5-HT2A and 5-HT3 receptors in the aged human spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 11, 67–75.
- Launay, J.-M., Hervé, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebert, J., Nebigil, C.G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G., et al. (2002a). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* 8, 1129–1135.
- Launay, J.-M., Hervé, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebert, J., Nebigil, C.G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G., et al. (2002b). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* 8, 1129–1135.
- Launay, J.-M., Schneider, B., Loric, S., Da Prada, M., and Kellermann, O. (2006). Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT2B receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J.* 20, 1843–1854.
- Layer, P., Keller, J., Mueller-Lissner, S., Rüegg, P., and Loeffler, H. (2005). Tegaserod: long-term treatment for irritable bowel syndrome patients with constipation in primary care. *Digestion* 71, 238–244.
- Lee, Y.M., Cope, J.J., Ackermann, G.E., Goishi, K., Armstrong, E.J., Paw, B.H., and Bischoff, J. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor signaling is required for cardiac valve formation in zebrafish. *Dev. Dyn.* 235, 29–37.
- Lefebvre, H., Gonzalez, K.N., Contesse, V., Delarue, C., Vaudry, H., and Kuhl, J.M. (1998). Effect of prolonged administration of the serotonin4 (5-HT4) receptor agonist cisapride on aldosterone secretion in healthy volunteers. *Endocr. Res.* 24, 749–752.
- Leonhardt, S., Herrick-Davis, K., and Titeler, M. (1989). Detection of a novel serotonin receptor subtype (5-HT1E) in human brain: interaction with a GTP-binding protein. *J. Neurochem.* 53, 465–471.
- Levy, F.O., Holtgreve-Grez, H., Taskén, K., Solberg, R., Ried, T., and Gudermann, T. (1994). Assignment of the gene encoding the 5-HT1E serotonin receptor (S31) (locus HTR1E) to human chromosome 6q14-q15. *Genomics* 22, 637–640.
- Levy, F.O., Qvigstad, E., Krobert, K.A., Skomedal, T., and Osnes, J.-B. (2008). Effects of serotonin in failing cardiac ventricle: signalling mechanisms and potential therapeutic implications. *Neuropharmacology* 55, 1066–1071.
- Leysen, J.E., Gommeren, W., Heylen, L., Luyten, W.H., Van de Weyer, I., Vanhoenacker, P., Haegeman, G., Schotte, A., Van Gompel, P., Wouters, R., et al. (1996). Alniditan, a new 5-hydroxytryptamine1D agonist and migraine-abortive agent: ligand-binding properties of human 5-hydroxytryptamine1D alpha, human 5-hydroxytryptamine1D beta, and calf 5-hydroxytryptamine1D receptors investigated with [3H]5-hydroxytryptamine and [3H]alniditan. *Mol. Pharmacol.* 50, 1567–1580.
- Li, N., Wallén, N.H., Ladjevardi, M., and Hjerdahl, P. (1997). Effects of serotonin on platelet activation in whole blood. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 8, 517–523.

Li, Q., Wichems, C., Heils, A., Van De Kar, L.D., Lesch, K.P., and Murphy, D.L. (1999). Reduction of 5-hydroxytryptamine (5-HT)(1A)-mediated temperature and neuroendocrine responses and 5-HT(1A) binding sites in 5-HT transporter knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 999–1007.

Linder, A.E., Beggs, K.M., Burnett, R.J., and Watts, S.W. (2009). Body distribution of infused serotonin in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 599–601.

Linder, A.E., Ni, W., Szasz, T., Burnett, R., Diaz, J., Geddes, T.J., Kuhn, D.M., and Watts, S.W. (2008). A serotonergic system in veins: serotonin transporter-independent uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 714–722.

Lindroos, M., Kupari, M., Heikkilä, J., and Tilvis, R. (1993). Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J. Am. Coll. Cardiol.* 21, 1220–1225.

Liu, A.C., Joag, V.R., and Gotlieb, A.I. (2007). The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am. J. Pathol.* 171, 1407–1418.

Liu, M., Geddis, M.S., Wen, Y., Setlik, W., and Gershon, M.D. (2005). Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G1148–1163.

Liu, Y., Suzuki, Y.J., Day, R.M., and Fanburg, B.L. (2004). Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ. Res.* 95, 579–586.

Long, L., MacLean, M.R., Jeffery, T.K., Morecroft, I., Yang, X., Rudarakanchana, N., Southwood, M., James, V., Trembath, R.C., and Morrell, N.W. (2006). Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ. Res.* 98, 818–827.

López-Meraz, M.-L., González-Trujano, M.-E., Neri-Bazán, L., Hong, E., and Rocha, L.L. (2005). 5-HT1A receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats. *Neuropharmacology* 49, 367–375.

M

Ma, Q.P. (2001). Co-localization of 5-HT(1B/1D/1F) receptors and glutamate in trigeminal ganglia in rats. *Neuroreport* 12, 1589–1591.

Machado, R.D., Koehler, R., Glissmeyer, E., Veal, C., Suntharalingam, J., Kim, M., Carlquist, J., Town, M., Elliott, C.G., Hooper, M., et al. (2006). Genetic association of the serotonin transporter in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 793–797.

MacLean, M.R. (2007). Pulmonary hypertension and the serotonin hypothesis: where are we now? *Int J Clin Pract Suppl* 27–31.

MacLean, M.R., Herve, P., Eddahibi, S., and Adnot, S. (2000). 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 131, 161–168.

Makarenko, I.G., Meguid, M.M., and Ugrumov, M.V. (2002). Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT(1B)) receptors in the normal rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 328, 155–159.

Malaquin, F., Urban, T., Ostinelli, J., Ghedira, H., and Lacronique, J. (1989). Pleural and retroperitoneal fibrosis from dihydroergotamine. *N. Engl. J. Med.* 321, 1760.

Manzke, T., Guenther, U., Ponimaskin, E.G., Haller, M., Dutschmann, M., Schwarzacher, S., and Richter, D.W. (2003). 5-HT4(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science* 301, 226–229.

Marazziti, D., Ori, M., Nardini, M., Rossi, A., Nardi, I., and Cassano, G.B. (2001). mRNA expression of serotonin receptors of type 2C and 5A in human resting lymphocytes. *Neuropsychobiology* 43, 123–126.

- Marchetti, E., Dumuis, A., Bockaert, J., Soumireu-Mourat, B., and Roman, F.S. (2000). Differential modulation of the 5-HT(4) receptor agonists and antagonist on rat learning and memory. *Neuropharmacology* 39, 2017–2027.
- Marcondes, S., Lafay, M., Brohard-Bohn, B., de Nucci, G., and Rendu, F. (2000). Platelets induce human umbilical vein endothelial cell proliferation through P-selectin. *Life Sci.* 66, 1817–1826.
- Maroteaux, L., Saudou, F., Amlaiky, N., Boschert, U., Plassat, J.L., and Hen, R. (1992). Mouse 5HT1B serotonin receptor: cloning, functional expression, and localization in motor control centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3020–3024.
- Marsden, P.A., Heng, H.H., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.M., Tsui, L.C., and Schappert, K.T. (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268, 17478–17488.
- Masson, J., Sagné, C., Hamon, M., and El Mestikawy, S. (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51, 439–464.
- Maurer-Spurej, E. (2005a). Circulating serotonin in vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1881–1889.
- Maurer-Spurej, E. (2005b). Serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular diseases: a platelet connection. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 159–170.
- McAlindon, E., Peterson, M., Bryan, A., and Townsend, M. (2011). Quadruple valve replacement for valve destruction in carcinoid heart disease. *Eur. Heart J.* 32, 1946.
- McAllister, G., Charlesworth, A., Snodin, C., Beer, M.S., Noble, A.J., Middlemiss, D.N., Iversen, L.L., and Whiting, P. (1992). Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): a fifth 5HT1-like subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5517–5521.
- McLean, P.G., and Coupar, I.M. (1996). Stimulation of cyclic AMP formation in the circular smooth muscle of human colon by activation of 5-HT4-like receptors. *Br. J. Pharmacol.* 117, 238–239.
- Mekontso-Dessap, A., Brouri, F., Pascal, O., Lechat, P., Hanoun, N., Lanfumey, L., Seif, I., Benhaiem-Sigaux, N., Kirsch, M., Hamon, M., et al. (2006). Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation* 113, 81–89.
- Mertens, M.J., Pfaffendorf, M., and van Zwieten, P.A. (1991). Cardiac effects of serotonin in hypertension. *J. Hypertens Suppl* 9, S156–157.
- Mialet, J., Berque-Bestel, I., Eftekhari, P., Gastineau, M., Giner, M., Dahmoune, Y., Donzeau-Gouge, P., Hoebeke, J., Langlois, M., Sicsic, S., et al. (2000a). Isolation of the serotonergic 5-HT4(e) receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Br. J. Pharmacol.* 129, 771–781.
- Mialet, J., Berque-Bestel, I., Sicsic, S., Langlois, M., Fischmeister, R., and Lezoualc'h, F. (2000b). Pharmacological characterization of the human 5-HT(4(d)) receptor splice variant stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmacol.* 131, 827–835.
- Michel, K., Zeller, F., Langer, R., Nekarda, H., Kruger, D., Dover, T.J., Brady, C.A., Barnes, N.M., and Schemann, M. (2005). Serotonin excites neurons in the human submucous plexus via 5-HT3 receptors. *Gastroenterology* 128, 1317–1326.
- Millan, F.A., Denhez, F., Kondaiah, P., and Akhurst, R.J. (1991). Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* 111, 131–143.
- Millan, M.J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., Rivet, J.-M., and Cussac, D. (2003). The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine2C receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 954–964.

- Millan, M.J., Maioriss, L., Cussac, D., Audinot, V., Boutin, J.-A., and Newman-Tancredi, A. (2002a). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *303*, 791–804.
- Millan, M.J., Maioriss, L., Cussac, D., Audinot, V., Boutin, J.-A., and Newman-Tancredi, A. (2002b). Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *303*, 791–804.
- Miller, K.J., and Teitler, M. (1992). Quantitative autoradiography of 5-HT-sensitive (5-HT_{1D}) and 5-HT-insensitive (5-HT_{1E}) serotonin receptors in human brain. *Neurosci. Lett.* *136*, 223–226.
- Miquerol, L., Gertsenstein, M., Harpal, K., Rossant, J., and Nagy, A. (1999). Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev. Biol.* *212*, 307–322.
- Miquerol, L., Langille, B.L., and Nagy, A. (2000). Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* *127*, 3941–3946.
- Miyake, A., Mochizuki, S., Takemoto, Y., and Akuzawa, S. (1995). Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine₃ receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol. Pharmacol.* *48*, 407–416.
- Mjaatvedt, C.H., Yamamura, H., Capehart, A.A., Turner, D., and Markwald, R.R. (1998). The *Cspg2* gene, disrupted in the *hdf* mutant, is required for right cardiac chamber and endocardial cushion formation. *Dev. Biol.* *202*, 56–66.
- Mochizuki, D., Yuyama, Y., Tsujita, R., Komaki, H., and Sagai, H. (1992). Cloning and expression of the human 5-HT_{1B}-type receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *185*, 517–523.
- Mochizuki, S., Miyake, A., and Furuichi, K. (1999). Ion permeation properties of a cloned human 5-HT₃ receptor transiently expressed in HEK 293 cells. *Amino Acids* *17*, 243–255.
- Modlin, I.M., Kidd, M., Latich, I., Zikusoka, M.N., and Shapiro, M.D. (2005). Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* *128*, 1717–1751.
- Modlin, I.M., and Sandor, A. (1997). An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer* *79*, 813–829.
- Mohr, B., Bom, A.H., Kaumann, A.J., and Thämer, V. (1987). Reflex inhibition of efferent renal sympathetic nerve activity by 5-hydroxytryptamine and nicotine is elicited by different epicardial receptors. *Pflugers Arch.* *409*, 145–151.
- Monassier, L., Laplante, M.-A., Jaffré, F., Bousquet, P., Maroteaux, L., and de Champlain, J. (2008). Serotonin 5-HT_{2B} receptor blockade prevents reactive oxygen species-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertension* *52*, 301–307.
- Monassier, L., Laplante, M.A., Ayadi, T., Doly, S., and Maroteaux, L. (2010). Contribution of gene-modified mice and rats to our understanding of the cardiovascular pharmacology of serotonin. *Pharmacol. Ther.* *128*, 559–567.
- Montastruc, F., Montastruc, G., Vigreux, P., Bruneval, P., Guilbeau-Frugier, C., Cron, C., Bagheri, H., Delisle, B., Lapeyre-Mestre, M., Pathak, A., et al. (2012). Valvular heart disease in a patient taking 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”). *Br J Clin Pharmacol* *74*, 547–548.
- Moorman, A.F.M., and Christoffels, V.M. (2003). Development of the cardiac conduction system: a matter of chamber development. *Novartis Found. Symp.* *250*, 25–34; discussion 34–43, 276–279.
- Morikawa, H., Manzoni, O.J., Crabbe, J.C., and Williams, J.T. (2000). Regulation of central synaptic transmission by 5-HT_{1B} auto- and heteroreceptors. *Mol. Pharmacol.* *58*, 1271–1278.

Mota, A., Bento, A., Peñalva, A., Pombo, M., and Dieguez, C. (1995). Role of the serotonin receptor subtype 5-HT1D on basal and stimulated growth hormone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *80*, 1973–1977.

Musunuru, S., Carpenter, J.E., Sippel, R.S., Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2005a). A mouse model of carcinoid syndrome and heart disease. *J. Surg. Res.* *126*, 102–105.

Musunuru, S., Carpenter, J.E., Sippel, R.S., Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2005b). A mouse model of carcinoid syndrome and heart disease. *J. Surg. Res.* *126*, 102–105.

Muto, T., Hotta, Y., Miyazeki, K., Ando, H., Ishikawa, N., Hasegawa, T., Sugimoto, Y., Yamada, J., and Miki, Y. (2005). Protective effects of sarpogrelate, a 5-HT_{2A} antagonist, against postischemic myocardial dysfunction in guinea-pig hearts. *Mol. Cell. Biochem.* *272*, 119–132.

N

Najib, M.Q., Vittala, S.S., Lanza, L.A., Lee, H.R., and Chaliki, H.P. (2011). Early bioprosthetic valve failure due to carcinoid heart disease. *Eur J Echocardiogr* *12*, 637.

Nakajima, Y., Mironov, V., Yamagishi, T., Nakamura, H., and Markwald, R.R. (1997). Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor beta3. *Dev. Dyn.* *209*, 296–309.

Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S., and Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat. Rec.* *258*, 119–127.

Napier, C., Stewart, M., Melrose, H., Hopkins, B., McHarg, A., and Wallis, R. (1999). Characterisation of the 5-HT receptor binding profile of eletriptan and kinetics of [³H]eletriptan binding at human 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *368*, 259–268.

Nebigil, C.G., Choi, D.S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J.M., and Maroteaux, L. (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 9508–9513.

Nebigil, C.G., Hickel, P., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Douchet, M.P., Monassier, L., György, K., Matz, R., Andriantsitohaina, R., Manivet, P., et al. (2001). Ablation of serotonin 5-HT_{2B} receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* *103*, 2973–2979.

Nebigil, C.G., Jaffré, F., Messaddeq, N., Hickel, P., Monassier, L., Launay, J.-M., and Maroteaux, L. (2003). Overexpression of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy. *Circulation* *107*, 3223–3229.

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*, 674–678.

Newman-Tancredi, A., Audinot, V., Moreira, C., Verrièle, L., and Millan, M.J. (2000). Inverse agonism and constitutive activity as functional correlates of serotonin h5-HT_{1B} receptor/G-protein stoichiometry. *Mol. Pharmacol.* *58*, 1042–1049.

Newman-Tancredi, A., Gavaudan, S., Conte, C., Chaput, C., Touzard, M., Verrièle, L., Audinot, V., and Millan, M.J. (1998a). Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [³⁵S]GTPgammaS binding study. *Eur. J. Pharmacol.* *355*, 245–256.

Newman-Tancredi, A., Verrièle, L., Chaput, C., and Millan, M.J. (1998b). Labelling of recombinant human and native rat serotonin 5-HT_{1A} receptors by a novel, selective radioligand, [³H]-S 15535: definition of its binding profile using agonists, antagonists and inverse agonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *357*, 205–217.

Newman-Tancredi, A., Wootton, R., and Strange, P.G. (1992). High-level stable expression of recombinant 5-HT_{1A} 5-hydroxytryptamine receptors in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* *285* (Pt 3), 933–938.

Ni, W., Fink, G.D., and Watts, S.W. (2007). The 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor is involved in (+)-norfenfluramine-induced arterial contraction and blood pressure increase in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *321*, 485–491.

Ni, W., Geddes, T.J., Priestley, J.R.C., Szasz, T., Kuhn, D.M., and Watts, S.W. (2008). The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.* *154*, 663–674.

Nichols, R.A., and Mollard, P. (1996). Direct observation of serotonin 5-HT₃ receptor-induced increases in calcium levels in individual brain nerve terminals. *J. Neurochem.* *67*, 581–592.

Niesler, B., Frank, B., Kapeller, J., and Rappold, G.A. (2003). Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* *310*, 101–111.

Niesler, B., Walstab, J., Combrink, S., Möller, D., Kapeller, J., Rietdorf, J., Bönisch, H., Göthert, M., Rappold, G., and Brüss, M. (2007). Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, and 5-HT_{3E}. *Mol. Pharmacol.* *72*, 8–17.

Nilsson, T., Longmore, J., Shaw, D., Olesen, I.J., and Edvinsson, L. (1999a). Contractile 5-HT_{1B} receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry. *Br. J. Pharmacol.* *128*, 1133–1140.

Nilsson, T., Longmore, J., Shaw, D., Pantev, E., Bard, J.A., Brancheck, T., and Edvinsson, L. (1999b). Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. *Eur. J. Pharmacol.* *372*, 49–56.

Nishikawa, T., Tsuno, N.H., Shuno, Y., Sasaki, K., Hongo, K., Okaji, Y., Sunami, E., Kitayama, J., Takahashi, K., and Nagawa, H. (2010). Antiangiogenic effect of a selective 5-HT₄ receptor agonist. *J. Surg. Res.* *159*, 696–704.

Noda, M., Higashida, H., Aoki, S., and Wada, K. (2004). Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol. Neurobiol.* *29*, 31–39.

Noda, M., Yasuda, S., Okada, M., Higashida, H., Shimada, A., Iwata, N., Ozaki, N., Nishikawa, K., Shirasawa, S., Uchida, M., et al. (2003). Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *J. Neurochem.* *84*, 222–232.

Nonogaki, K., Abdallah, L., Goulding, E.H., Bonasera, S.J., and Tecott, L.H. (2003). Hyperactivity and reduced energy cost of physical activity in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Diabetes* *52*, 315–320.

Norum, J.H., Hart, K., and Levy, F.O. (2003). Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT₄(b) and 5-HT₇(a). *J. Biol. Chem.* *278*, 3098–3104.

Noseda, M., McLean, G., Niessen, K., Chang, L., Pollet, I., Montpetit, R., Shahidi, R., Dorovini-Zis, K., Li, L., Beckstead, B., et al. (2004). Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ. Res.* *94*, 910–917.

O

Oberg, K., Norheim, I., Lundqvist, G., and Wide, L. (1987). Cytotoxic treatment in patients with malignant carcinoid tumors. Response to streptozocin--alone or in combination with 5-FU. *Acta Oncol* *26*, 429–432.

Okamoto, K., Imbe, H., Morikawa, Y., Itoh, M., Sekimoto, M., Nemoto, K., and Senba, E. (2002). 5-HT_{2A} receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. *Pain* *99*, 133–143.

Orton, E.C., Lacerda, C.M.R., and MacLea, H.B. (2012). Signaling pathways in mitral valve degeneration. *J Vet Cardiol* *14*, 7–17.

Osei-Owusu, P., James, A., Crane, J., and Scrogin, K.E. (2005). 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus mediate oxytocin and adrenocorticotropin hormone release and some behavioral components of the serotonin syndrome. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *313*, 1324–1330.

P

PAGE, I.H., RAPPORT, M.M., and GREEN, A.A. (1948). The crystallization of serotonin. *J. Lab. Clin. Med.* *33*, 1606.

Pakala, R., Willerson, J.T., and Benedict, C.R. (1994). Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation* *90*, 1919–1926.

Paranya, G., Vineberg, S., Dvorin, E., Kaushal, S., Roth, S.J., Rabkin, E., Schoen, F.J., and Bischoff, J. (2001). Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro. *Am. J. Pathol.* *159*, 1335–1343.

Parekh, D., Ishizuka, J., Townsend, C.M., Jr, Haber, B., Beauchamp, R.D., Karp, G., Kim, S.W., Rajaraman, S., Greeley, G., Jr, and Thompson, J.C. (1994). Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* *9*, 83–90.

Parker, E.M., Izzarelli, D.G., Lewis-Higgins, L., Palmer, D., and Shapiro, R.A. (1996a). Two amino acid differences in the sixth transmembrane domain are partially responsible for the pharmacological differences between the 5-HT_{1D} beta and 5-HT_{1E} 5-hydroxytryptamine receptors. *J. Neurochem.* *67*, 2096–2103.

Parker, R.M., Barnes, J.M., Ge, J., Barber, P.C., and Barnes, N.M. (1996b). Autoradiographic distribution of [³H]-(-)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in human brain. *J. Neurol. Sci.* *144*, 119–127.

Parks, C.L., Robinson, P.S., Sibille, E., Shenk, T., and Toth, M. (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 10734–10739.

Patel, C., Mathur, M., Escarcega, R.O., and Bove, A.A. (2014). Carcinoid heart disease: Current understanding and future directions. *Am. Heart J.* *167*, 789–795.

Perez-García, G., and Meneses, A. (2005a). Oral administration of the 5-HT₆ receptor antagonists SB-357134 and SB-399885 improves memory formation in an autoshaping learning task. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *81*, 673–682.

Perez-García, G.S., and Meneses, A. (2005b). Effects of the potential 5-HT₇ receptor agonist AS 19 in an autoshaping learning task. *Behav. Brain Res.* *163*, 136–140.

Persico, A.M., Mengual, E., Moessner, R., Hall, F.S., Revay, R.S., Sora, I., Arellano, J., DeFelipe, J., Gimenez-Amaya, J.M., Conciatori, M., et al. (2001). Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J. Neurosci.* *21*, 6862–6873.

Person, A.D., Klewer, S.E., and Runyan, R.B. (2005). Cell biology of cardiac cushion development. *Int. Rev. Cytol.* *243*, 287–335.

Piñeyro, G., de Montigny, C., and Blier, P. (1995). 5-HT_{1D} receptors regulate 5-HT release in the rat raphe nuclei. In vivo voltammetry and in vitro superfusion studies. *Neuropsychopharmacology* *13*, 249–260.

Pompeiano, M., Palacios, J.M., and Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* *12*, 440–453.

Pompeiano, M., Palacios, J.M., and Mengod, G. (1994). Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *23*, 163–178.

Popova, N.K., Naumenko, V.S., Plyusnina, I.Z., and Kulikov, A.V. (2005). Reduction in 5-HT_{1A} receptor density, 5-HT_{1A} mRNA expression, and functional correlates for 5-HT_{1A} receptors in genetically defined aggressive rats. *J. Neurosci. Res.* *80*, 286–292.

Pritchett, A.M., Morrison, J.F., Edwards, W.D., Schaff, H.V., Connolly, H.M., and Espinosa, R.E. (2002). Valvular heart disease in patients taking pergolide. *Mayo Clin. Proc.* 77, 1280–1286.

Purohit, A., Smith, C., Herrick-Davis, K., and Teitler, M. (2005). Stable expression of constitutively activated mutant h5HT6 and h5HT7 serotonin receptors: inverse agonist activity of antipsychotic drugs. *Psychopharmacology (Berl.)* 179, 461–469.

Q

Qian, Y., Melikian, H.E., Rye, D.B., Levey, A.I., and Blakely, R.D. (1995). Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J. Neurosci.* 15, 1261–1274.

Qiao, W., Niu, L., Liu, Z., Qiao, T., and Liu, C. (2010). Endothelial nitric oxide synthase as a marker for human endothelial progenitor cells. *Tohoku J. Exp. Med.* 221, 19–27.

Qvigstad, E., Brattelid, T., Sjaastad, I., Andressen, K.W., Krobert, K.A., Birkeland, J.A., Sejersted, O.M., Kaumann, A.J., Skomedal, T., Osnes, J.-B., et al. (2005). Appearance of a ventricular 5-HT₄ receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 65, 869–878.

R

Ramage, A.G., and Villalón, C.M. (2008). 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 472–481.

Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D.A., Kung, H.F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J.J., Brunner, D., and Hen, R. (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14476–14481.

Ramsdell, A.F., and Markwald, R.R. (1997). Induction of endocardial cushion tissue in the avian heart is regulated, in part, by TGFβ₃-mediated autocrine signaling. *Dev. Biol.* 188, 64–74.

Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Crystalline Serotonin. *Science* 108, 329–330.

RAPPORT, M.M., GREEN, A.A., and PAGE, I.H. (1948a). Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation. *J. Biol. Chem.* 176, 1237–1241.

RAPPORT, M.M., GREEN, A.A., and PAGE, I.H. (1948b). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 176, 1243–1251.

Rashid, M., Manivet, P., Nishio, H., Pratuangdejkul, J., Rajab, M., Ishiguro, M., Launay, J.M., and Nagatomo, T. (2003a). Identification of the binding sites and selectivity of sarpogrelate, a novel 5-HT₂ antagonist, to human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor subtypes by molecular modeling. *Life Sci.* 73, 193–207.

Rashid, M., Manivet, P., Nishio, H., Pratuangdejkul, J., Rajab, M., Ishiguro, M., Launay, J.M., and Nagatomo, T. (2003b). Identification of the binding sites and selectivity of sarpogrelate, a novel 5-HT₂ antagonist, to human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor subtypes by molecular modeling. *Life Sci.* 73, 193–207.

Raymond, J.R., Kim, J., Beach, R.E., and Tisher, C.C. (1993). Immunohistochemical mapping of cellular and subcellular distribution of 5-HT_{1A} receptors in rat and human kidneys. *Am. J. Physiol.* 264, F9–19.

Rees, S., den Daas, I., Foord, S., Goodson, S., Bull, D., Kilpatrick, G., and Lee, M. (1994). Cloning and characterisation of the human 5-HT_{5A} serotonin receptor. *FEBS Lett.* 355, 242–246.

Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of β-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 179–197.

Ritzel, U., Leonhardt, U., Stöckmann, F., and Ramadori, G. (1995). Treatment of metastasized midgut carcinoids with dacarbazine. *Am. J. Gastroenterol.* 90, 627–631.

Roberts, W.C. (1997). A unique heart disease associated with a unique cancer: carcinoid heart disease. *Am. J. Cardiol.* *80*, 251–256.

Rocha-González, H.I., Meneses, A., Carlton, S.M., and Granados-Soto, V. (2005). Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT₇ receptors in the formalin test. *Pain* *117*, 182–192.

Rogers, D.C., and Hagan, J.J. (2001). 5-HT₆ receptor antagonists enhance retention of a water maze task in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* *158*, 114–119.

Rogines-Velo, M.P., Pelorosso, F.G., Zold, C.L., Brodsky, P.T., and Rothlin, R.P. (2002). Characterization of 5-HT receptor subtypes mediating contraction in human umbilical vein. 2. Evidence of involvement of 5-HT_{1B} receptors using functional studies. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* *366*, 596–604.

Romano, L.A., and Runyan, R.B. (2000). Slug is an essential target of TGFβ₂ signaling in the developing chicken heart. *Dev. Biol.* *223*, 91–102.

Rothman, R.B., Baumann, M.H., Blough, B.E., Jacobson, A.E., Rice, K.C., and Partilla, J.S. (2010). Evidence for noncompetitive modulation of substrate-induced serotonin release. *Synapse* *64*, 862–869.

Rothman, R.B., Baumann, M.H., Savage, J.E., Rauser, L., McBride, A., Hufeisen, S.J., and Roth, B.L. (2000). Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* *102*, 2836–2841.

S

Sakurai-Yamashita, Y., Yamashita, K., Kanematsu, T., and Taniyama, K. (1999). Localization of the 5-HT₄ receptor in the human and the guinea pig colon. *Eur. J. Pharmacol.* *383*, 281–285.

Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. (1997). TGFβ₂ knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFβ knockout phenotypes. *Development* *124*, 2659–2670.

Sanganalmath, S.K., Barta, J., Takeda, N., Kumamoto, H., and Dhalla, N.S. (2008). Antiplatelet therapy mitigates cardiac remodeling and dysfunction in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *86*, 180–189.

Sari, Y., Miquel, M.C., Brisorgueil, M.J., Ruiz, G., Doucet, E., Hamon, M., and Vergé, D. (1999). Cellular and subcellular localization of 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors in the rat central nervous system: immunocytochemical, autoradiographic and lesion studies. *Neuroscience* *88*, 899–915.

Satomura, K., Takase, B., Hamabe, A., Ashida, K., Hosaka, H., Ohsuzu, F., and Kurita, A. (2002). Sarpogrelate, a specific 5HT₂-receptor antagonist, improves the coronary microcirculation in coronary artery disease. *Clin Cardiol* *25*, 28–32.

Saudou, F., Amara, D.A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M.C., and Hen, R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science* *265*, 1875–1878.

Schlüter, T., and Bohnensack, R. (1999). Serotonin-induced secretion of von Willebrand factor from human umbilical vein endothelial cells via the cyclic AMP-signaling systems independent of increased cytoplasmic calcium concentration. *Biochem. Pharmacol.* *57*, 1191–1197.

Schmuck, K., Ullmer, C., Engels, P., and Lübbert, H. (1994). Cloning and functional characterization of the human 5-HT_{2B} serotonin receptor. *FEBS Lett.* *342*, 85–90.

Schmuck, K., Ullmer, C., Kalkman, H.O., Probst, A., and Lübbert, H. (1996). Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur. J. Neurosci.* *8*, 959–967.

- Schoeffter, P., Ullmer, C., Bobirnac, I., Gabbiani, G., and Lübbert, H. (1996). Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* *117*, 993–994.
- Schoeffter, P., Ullmer, C., Gutierrez, M., Weitz-Schmidt, G., and Lübbert, H. (1995). Functional serotonin 5-HT_{1D} receptors and 5-HT_{1D} beta receptor mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *352*, 580–582.
- Schoen, F.J. (2005). Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement. *Cardiovasc. Pathol.* *14*, 189–194.
- Schotte, A., Janssen, P.F., Gommeren, W., Luyten, W.H., Van Gompel, P., Lesage, A.S., De Loore, K., and Leysen, J.E. (1996). Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology (Berl.)* *124*, 57–73.
- Setola, V., Hufeisen, S.J., Grande-Allen, K.J., Vesely, I., Glennon, R.A., Blough, B., Rothman, R.B., and Roth, B.L. (2003). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”) induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* *63*, 1223–1229.
- Seuwen, K., Magnaldo, I., and Pouysségur, J. (1988). Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT_{1B} receptors coupled to a Gi-protein. *Nature* *335*, 254–256.
- Shapiro, D.A., Kristiansen, K., Kroeze, W.K., and Roth, B.L. (2000). Differential modes of agonist binding to 5-hydroxytryptamine(2A) serotonin receptors revealed by mutation and molecular modeling of conserved residues in transmembrane region 5. *Mol. Pharmacol.* *58*, 877–886.
- Shimizu, Y., Minatoguchi, S., Hashimoto, K., Uno, Y., Arai, M., Wang, N., Chen, X., Lu, C., Takemura, G., Shimomura, M., et al. (2002). The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* *40*, 1347–1355.
- Shippenberg, T.S., Hen, R., and He, M. (2000). Region-specific enhancement of basal extracellular and cocaine-evoked dopamine levels following constitutive deletion of the Serotonin(1B) receptor. *J. Neurochem.* *75*, 258–265.
- Shworak, N.W. (2004). Angiogenic modulators in valve development and disease: does valvular disease recapitulate developmental signaling pathways? *Curr. Opin. Cardiol.* *19*, 140–146.
- Silberstein, S.D. (2000). Practice parameter: evidence-based guidelines for migraine headache (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* *55*, 754–762.
- Singh, B., Biswas, I., Garg, I., Sugadev, R., Singh, A.K., Dey, S., and Khan, G.A. (2014). von Willebrand factor antagonizes nitric oxide synthase to promote insulin resistance during hypoxia. *Biochemistry* *53*, 115–126.
- Singh, S., Johnson, P.I., Javed, A., Gray, T.S., Lonchyna, V.A., and Wurster, R.D. (1999). Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. *Circulation* *99*, 411–419.
- Sinning, A.R., and Hewitt, C.C. (1996). Identification of a 283-kDa protein component of the particulate matrix associated with cardiac mesenchyme formation. *Acta Anat (Basel)* *155*, 219–230.
- Sole, M.J., Shum, A., and Van Loon, G.R. (1979). Serotonin metabolism in the normal and failing hamster heart. *Circ. Res.* *45*, 629–634.
- Song, W., Jackson, K., and McGuire, P.G. (2000). Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelial-mesenchymal transformation of the endocardial cushions. *Dev. Biol.* *227*, 606–617.

Sprouse, J., Reynolds, L., Braselton, J., and Schmidt, A. (2004). Serotonin-induced phase advances of SCN neuronal firing in vitro: a possible role for 5-HT_{5A} receptors? *Synapse* 54, 111–118.

Stam, N.J., Van Huizen, F., Van Alebeek, C., Brands, J., Dijkema, R., Tonnaer, J.A., and Olijve, W. (1992). Genomic organization, coding sequence and functional expression of human 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptor genes. *Eur. J. Pharmacol.* 227, 153–162.

Stam, N.J., Roesink, C., Dijkcs, F., Garritsen, A., van Herpen, A., and Olijve, W. (1997). Human serotonin 5-HT₇ receptor: cloning and pharmacological characterisation of two receptor variants. *FEBS Lett.* 413, 489–494.

Stam, N.J., Vanderheyden, P., van Alebeek, C., Klomp, J., de Boer, T., van Delft, A.M., and Olijve, W. (1994). Genomic organisation and functional expression of the gene encoding the human serotonin 5-HT_{2C} receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 269, 339–348.

Stamford, J.A., Davidson, C., McLaughlin, D.P., and Hopwood, S.E. (2000). Control of dorsal raphe 5-HT function by multiple 5-HT(1) autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality? *Trends Neurosci.* 23, 459–465.

Stefulj, J., Jernej, B., Cicin-Sain, L., Rinner, I., and Schauenstein, K. (2000). mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain Behav. Immun.* 14, 219–224.

Sugi, Y., Ito, N., Szebenyi, G., Myers, K., Fallon, J.F., Mikawa, T., and Markwald, R.R. (2003). Fibroblast growth factor (FGF)-4 can induce proliferation of cardiac cushion mesenchymal cells during early valve leaflet formation. *Dev. Biol.* 258, 252–263.

Sugi, Y., Yamamura, H., Okagawa, H., and Markwald, R.R. (2004). Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice. *Dev. Biol.* 269, 505–518.

T

Tack, J., Camilleri, M., Chang, L., Chey, W.D., Galligan, J.J., Lacy, B.E., Müller-Lissner, S., Quigley, E.M.M., Schuurkes, J., De Maeyer, J.H., et al. (2012). Systematic review: cardiovascular safety profile of 5-HT(4) agonists developed for gastrointestinal disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 745–767.

Tadano, M., Edamatsu, H., Minamisawa, S., Yokoyama, U., Ishikawa, Y., Suzuki, N., Saito, H., Wu, D., Masago-Toda, M., Yamawaki-Kataoka, Y., et al. (2005). Congenital semilunar valvulogenesis defect in mice deficient in phospholipase C epsilon. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2191–2199.

Takano, S., Hoshino, Y., Li, L., Matsuoka, I., Ono, T., and Kimura, J. (2004). Dual roles of 5-hydroxytryptamine in ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 9, 43–50.

Takeda, H., Tsuji, M., Ikoshi, H., Yamada, T., Masuya, J., Iimori, M., and Matsumiya, T. (2005). Effects of a 5-HT₇ receptor antagonist DR4004 on the exploratory behavior in a novel environment and on brain monoamine dynamics in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 518, 30–39.

Temsah, R.M., Kumamoto, H., Takeda, N., and Dhalla, N.S. (2001). Sarpogrelate diminishes changes in energy stores and ultrastructure of the ischemic-reperfused rat heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79, 761–767.

Terrón, J.A. (1997). Role of 5-HT₇ receptors in the long-lasting hypotensive response induced by 5-hydroxytryptamine in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 121, 563–571.

Terrón, J.A., Bouchelet, I., and Hamel, E. (2001). 5-HT₇ receptor mRNA expression in human trigeminal ganglia. *Neurosci. Lett.* 302, 9–12.

Thomas, D.R., Melotto, S., Massagrande, M., Gribble, A.D., Jeffrey, P., Stevens, A.J., Deeks, N.J., Eddershaw, P.J., Fenwick, S.H., Riley, G., et al. (2003). SB-656104-A, a novel selective 5-HT₇ receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *Br. J. Pharmacol.* 139, 705–714.

Thompson, A.J., Jarvis, G.E., Duke, R.K., Johnston, G.A.R., and Lummis, S.C.R. (2011). Ginkgolide B and bilobalide block the pore of the 5-HT₃ receptor at a location that overlaps the picrotoxin binding site. *Neuropharmacology* 60, 488–495.

Thompson, A.J., and Lummis, S.C.R. (2006). 5-HT₃ receptors. *Curr. Pharm. Des.* 12, 3615–3630.

Torres, G.E., Holt, I.L., and Andrade, R. (1994). Antagonists of 5-HT₄ receptor-mediated responses in adult hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 255–261.

Towler, D.A. (2013). Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circ. Res.* 113, 198–208.

Tribouilloy, C., Jeu, A., Maréchaux, S., Jobic, Y., Rusinaru, D., and Andréjak, M. (2011). [Benfluorex and valvular heart disease]. *Presse Med* 40, 1008–1016.

Tuladhar, B.R., Costall, B., and Naylor, R.J. (1996). Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor mediating relaxation in the rat isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.* 119, 303–310.

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, 157–161.

Tzemos, N., Therrien, J., Yip, J., Thanassoulis, G., Tremblay, S., Jamorski, M.T., Webb, G.D., and Siu, S.C. (2008). Outcomes in adults with bicuspid aortic valves. *JAMA* 300, 1317–1325.

Uçeyler, N., Schütt, M., Palm, F., Vogel, C., Meier, M., Schmitt, A., Lesch, K.-P., Mössner, R., and Sommer, C. (2010). Lack of the serotonin transporter in mice reduces locomotor activity and leads to gender-dependent late onset obesity. *Int J Obes (Lond)* 34, 701–711.

U

Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H.O., and Lübbert, H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.* 370, 215–221.

V

Varnäs, K., Hall, H., Bonaventure, P., and Sedvall, G. (2001). Autoradiographic mapping of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors in the post mortem human brain using [(3)H]GR 125743. *Brain Res.* 915, 47–57.

Verbeuren, T.J., Menecier, P., and Laubie, M. (1991). 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilatation in the isolated perfused rat kidney: are endothelial 5-HT_{1A} receptors involved? *Eur. J. Pharmacol.* 201, 17–27.

Verheggen, R., Hundeshagen, A.G., Brown, A.M., Schindler, M., and Kaumann, A.J. (1998). 5-HT_{1B} receptor-mediated contractions in human temporal artery: evidence from selective antagonists and 5-HT receptor mRNA expression. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1345–1354.

Vermot, J., Forouhar, A.S., Liebling, M., Wu, D., Plummer, D., Gharib, M., and Fraser, S.E. (2009). Reversing blood flows act through *klf2a* to ensure normal valvulogenesis in the developing heart. *PLoS Biol.* 7, e1000246.

Vikenes, K., Farstad, M., and Nordrehaug, J.E. (1999). Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. *Circulation* 100, 483–489.

Vilaró, M.T., Doménech, T., Palacios, J.M., and Mengod, G. (2002). Cloning and characterization of a novel human 5-HT₄ receptor variant that lacks the alternatively spliced carboxy terminal exon. RT-PCR distribution in human brain and periphery of multiple 5-HT₄ receptor variants. *Neuropharmacology* 42, 60–73.

De Vry, J., Schohe-Loop, R., Heine, H.G., Greuel, J.M., Mauler, F., Schmidt, B., Sommermeyer, H., and Glaser, T. (1998). Characterization of the aminomethylchroman derivative BAY x 3702 as a highly potent 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 1082–1094.

W

- WALDENSTROM, J., and LJUNGBERG, E. (1955). Studies on the functional circulatory influence from metastasizing carcinoid (argentaffine, enterochromaffine) tumours and their possible relation to enteramine production. I. Symptoms of carcinoidosis. *Acta Med Scand* 152, 293–309.
- Walsh, E.C., and Stainier, D.Y. (2001). UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish. *Science* 293, 1670–1673.
- Waltenberger, J., Lundin, L., Oberg, K., Wilander, E., Miyazono, K., Heldin, C.H., and Funai, K. (1993). Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. *Am. J. Pathol.* 142, 71–78.
- Walther, D.J., Peter, J.-U., Winter, S., Hölftje, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinckel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C.S., Ahnert-Hilger, G., et al. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 115, 851–862.
- Watson, J.M., Burton, M.J., Price, G.W., Jones, B.J., and Middlemiss, D.N. (1996). GR127935 acts as a partial agonist at recombinant human 5-HT1D alpha and 5-HT1D beta receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 314, 365–372.
- Watts, S.W. (1998). The development of enhanced arterial serotonergic hyperresponsiveness in mineralocorticoid hypertension. *J. Hypertens.* 16, 811–822.
- Watts, S.W., Baez, M., and Webb, R.C. (1996). The 5-hydroxytryptamine2B receptor and 5-HT receptor signal transduction in mesenteric arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 1103–1113.
- Watts, S.W., and Fink, G.D. (1999). 5-HT2B-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 276, H944–952.
- Watts, S.W., Gilbert, L., and Webb, R.C. (1995a). 5-Hydroxytryptamine2B receptor mediates contraction in the mesenteric artery of mineralocorticoid hypertensive rats. *Hypertension* 26, 1056–1059.
- Watts, S.W., Gilbert, L., and Webb, R.C. (1995b). 5-Hydroxytryptamine2B receptor mediates contraction in the mesenteric artery of mineralocorticoid hypertensive rats. *Hypertension* 26, 1056–1059.
- Weill, A., Païta, M., Tuppin, P., Fagot, J.-P., Neumann, A., Simon, D., Ricordeau, P., Montastruc, J.-L., and Allemand, H. (2010). Benfluorex and valvular heart disease: a cohort study of a million people with diabetes mellitus. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 19, 1256–1262.
- Weinshank, R.L., Zgombick, J.M., Macchi, M.J., Branchek, T.A., and Hartig, P.R. (1992). Human serotonin 1D receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT1D alpha and 5-HT1D beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3630–3634.
- Weir, E.K., Obreztchikova, M., and Hong, Z. (2008). Fenfluramine: riddle or Rosetta stone? *Eur. Respir. J.* 31, 232–235.
- Weiss, R.M., Miller, J.D., and Heistad, D.D. (2013). Fibrocalcific aortic valve disease: opportunity to understand disease mechanisms using mouse models. *Circ. Res.* 113, 209–222.
- Welsh, D.J., Harnett, M., MacLean, M., and Peacock, A.J. (2004). Proliferation and signaling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine2A receptor and transporter. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 252–259.
- Whitaker-Azmitia, P.M. (1999). The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21, 2S–8S.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9, 2105–2116.

Wisor, J.P., Wurts, S.W., Hall, F.S., Lesch, K.P., Murphy, D.L., Uhl, G.R., and Edgar, D.M. (2003). Altered rapid eye movement sleep timing in serotonin transporter knockout mice. *Neuroreport* *14*, 233–238.

Woolley, M.L., Bentley, J.C., Sleight, A.J., Marsden, C.A., and Fone, K.C. (2001). A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology* *41*, 210–219.

Wunsch, A.M., Little, C.D., and Markwald, R.R. (1994). Cardiac endothelial heterogeneity defines valvular development as demonstrated by the diverse expression of JB3, an antigen of the endocardial cushion tissue. *Dev. Biol.* *165*, 585–601.

Van den Wyngaert, I., Gommeren, W., Verhasselt, P., Jurzak, M., Leysen, J., Luyten, W., and Bender, E. (1997). Cloning and expression of a human serotonin 5-HT₄ receptor cDNA. *J. Neurochem.* *69*, 1810–1819.

X

Xu, J., Jian, B., Chu, R., Lu, Z., Li, Q., Dunlop, J., Rosenzweig-Lipson, S., McGonigle, P., Levy, R.J., and Liang, B. (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* *161*, 2209–2218.

Y

Yabanoglu, S., Akkiki, M., Seguelas, M.-H., Mialet-Perez, J., Parini, A., and Pizzinat, N. (2009). Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT_{2A} receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *46*, 518–525.

Yoshioka, M., Matsumoto, M., Togashi, H., Mori, K., and Saito, H. (1998). Central distribution and function of 5-HT₆ receptor subtype in the rat brain. *Life Sci.* *62*, 1473–1477.

Young, W.B., Silberstein, S.D., and Dayno, J.M. (1997). Migraine treatment. *Semin Neurol* *17*, 325–333.

Z

Zanettini, R., Antonini, A., Gatto, G., Gentile, R., Tesei, S., and Pezzoli, G. (2007a). Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *356*, 39–46.

Zanettini, R., Antonini, A., Gatto, G., Gentile, R., Tesei, S., and Pezzoli, G. (2007b). Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *356*, 39–46.

Zanettini, R., Antonini, A., Gatto, G., Gentile, R., Tesei, S., and Pezzoli, G. (2011). Regression of cardiac valvulopathy related to ergot-derived dopamine agonists. *Cardiovasc Ther* *29*, 404–410.

Zgombick, J.M., Schechter, L.E., Macchi, M., Hartig, P.R., Branchek, T.A., and Weinshank, R.L. (1992). Human gene S31 encodes the pharmacologically defined serotonin 5-hydroxytryptamine_{1E} receptor. *Mol. Pharmacol.* *42*, 180–185.

Zhang, J.Y., Nawoschik, S., Kowal, D., Smith, D., Spangler, T., Ochalski, R., Schechter, L., and Dunlop, J. (2003). Characterization of the 5-HT₆ receptor coupled to Ca²⁺ signaling using an enabling chimeric G-protein. *Eur. J. Pharmacol.* *472*, 33–38.

Zhao, Z., and Rivkees, S.A. (2000). Programmed cell death in the developing heart: regulation by BMP4 and FGF2. *Dev. Dyn.* *217*, 388–400.

Zhou, J., Cheng, M., Liao, Y.-H., Hu, Y., Wu, M., Wang, Q., Qin, B., Wang, H., Zhu, Y., Gao, X.-M., et al. (2013). Rosuvastatin enhances angiogenesis via eNOS-dependent mobilization of endothelial progenitor cells. *PLoS ONE* *8*, e63126.

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de la RT-PCR

Extraction de l'ARNm

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide du kit RNA Isolation Kit[®] (Roche[®]) au moyen de l'appareil MagNA Pure Compact[®] (Roche[®]) : le culot d'environ 10⁶ cellules est repris dans 100 µL de PBS, auquel on ajoute 100 µL de tampon de lyse. Le protocole d'extraction commence par l'application d'une solution de désoxyribonucléases aux cellules lysées, afin d'éliminer l'ADN pouvant interférer au cours de l'amplification par PCR, et de ne conserver que les ARNs. Ensuite, une fois le lysat inséré dans l'appareil, des billes magnétiques lient par affinité l'ARN dans une solution hypertonique. Ces billes sont lavées et l'ARN qui leur est lié est élué dans 50µL de solution. La concentration en ARN de l'éluat obtenu est déterminée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop[®] ND-1000 par mesure d'absorbance à 260 nm. Le rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm permet d'apprécier le degré de pureté de l'ARN. Les contaminants comme les protéines absorbent à 280 nm. L'ARN pur a un rapport d'environ 2.

Conversion des ARNs totaux en ADN complémentaires (ADNc)

La conversion des ARNs totaux en ADN complémentaire est réalisée avec le kit iScript cDNA Synthesis (BioRad[®]). On prépare ainsi 20µl d'une solution contenant la transcriptase inverse, l'inhibiteur de RNase, un mélange de désoxyribonucléotides, des amorces oligo (dT)₁₈ et des amorces hexamères aléatoires. La quantité d'ARN total de chaque solution est normalisée pour avoir 500 ng/20µl.

Le mélange (volume total de 20µl) comprend : iScript Reaction Mix (5×) 4µl ; iScript Reverse Transcriptase 1µl ; ARNs totaux qsp 500ng ; Eau PCR-grade qsp 20µl

Le mélange ainsi obtenu est ensuite placé dans un Thermocycler Biorad[®] avec les paramètres suivants : 5 min à 25°C (activation de l'enzyme), 30 min à 42°C (transcription), puis 5 minutes à 85°C (inactivation de l'enzyme).

PCR en temps réel

PCR en temps réel permet d'apprécier la quantité relative d'ADNc correspondant à un ARN particulier rapporté à celui d'un gène ménageur (ou de référence). Il est ainsi possible de comparer l'expression d'un ARN messenger entre différents groupes, en effectuant dans chaque groupe le rapport de la quantité d'ADNc considéré par celle d'ADNc correspondant au gène utilisé comme référence. Nous avons choisi l'ARNr 18S comme référence, son expression variant très peu dans les populations cellulaires.

Les amorces sont spécifiques du gène à doser. La quantité d'amplicons correspondant à cet ADNc est donc doublée à chaque cycle, mais la concentration des autres brins reste inchangée.

Le SYBR Green est une molécule qui n'est pas détectable en solution, mais qui par contre exprime une forte fluorescence, lorsqu'elle s'intercale entre des plateaux de base sur l'ADN double brin. Ainsi, la fluorescence mesurée à la fin de chaque cycle est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présente dans le milieu.

Le kit LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I[®] (Roche[®]) a été employé. Dans chaque capillaire, 2µL de la solution d'ADNc à analyser sont ajoutés à 18µL de milieu réactionnel contenant un mélange d'amorces sens et antisens (concentration finale 500nM).

Le mélange (volume total de 20µl) comprend :

- Eau PCR-grade 14µl
- MgCl₂ (25mM) 1,6µl (3mM concentration finale)
- Amorces sens (50µM) 0,2µl (500nM concentration finale)
- Amorces anti-sens (50µM) 0,2µl (500nM concentration finale)
- SYBR Green Mix (10×) 2 µl
- ADNc 2µl

Un réplicon a été réalisé pour chaque échantillon. Les capillaires ont ensuite été placés dans un LightCycler[®] (Roche[®]) avec le protocole d'amplification suivant : pré-incubation à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles d'amplification (dénaturation : 15s à 94°C ; hybridation : 5s à 63°C ; extension et mesure de la fluorescence : 20s à 72°C).

Après les cycles d'amplification, le LightCycler[®] mesure en continu la fluorescence dans chaque échantillon pendant que la température passe progressivement de 63°C à 94°C. Lorsque la température de fusion d'un amplicon approche, les brins de celui-ci se séparent, libérant les molécules de SYBR Green. On observe donc une diminution de la fluorescence. Le tableau 6 présente la séquence des amorces utilisées.

Migration du produit de PCR sur gel d'agarose

La visualisation des bandes correspondant à l'ADNc des gènes amplifiés est réalisée par électrophorèse (sous une tension électrique de 90 Volts) sur gel d'agarose à 2% (masse/volume) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL), un agent intercalant qui marque les acides nucléiques et qui devient fortement fluorescent (rouge-orangée) lié à ces derniers lorsqu'il est exposé au rayonnement ultra-violet.

Annexe 2 : Evaluation de l'activité NO synthase (Validation des conditions analytiques)

Des expériences préliminaires nous ont permis de déterminer les quantités de cellules et les longueurs d'ondes analytiques optimales (spectrofluorimétrie).

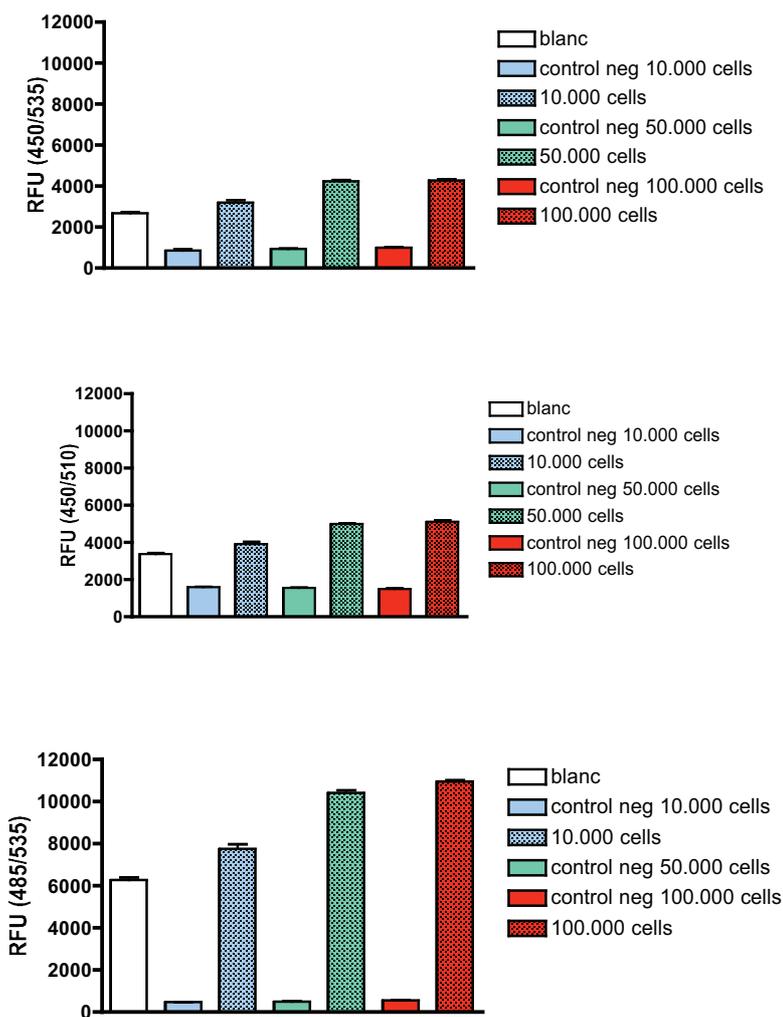


Figure Annexe 2 : détermination des quantités optimales de cellules et des longueurs d'ondes optimales de mesure.

La longueur d'onde optimale de stimulation est de 485 nm et celle d'émission est de 535 nm. Une quantité de 10.000 cellules par puits permet de déterminer de façon significative l'activité de la NO synthase. Nous choisirons donc cette quantité pour l'étude pharmacologique.

Annexe 3 : Composition des milieux de culture des cellules BON, CNDT2.5 et HT29

Types cellulaires	Cellules BON	Cellules CNDT 2.5	Cellules HT29
Composition des milieux de culture	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml DMEM-F12K (1:1) Gibco® - 10% Sérum de veau foetal (inactivé 1h à 56°C) - 1% Glutamine - 1% Penicilline-streptomycine 	<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml DMEM-F12K (1:1) Gibco® - 10% Sérum de veau foetal (inactivé 1h à 56°C) - 1% Glutamine - 1% Penicilline-streptomycine - 1% Sodium – pyruvate - 1% Acides aminés essentiels - 1% Vitamines 	<ul style="list-style-type: none"> - 500ml McCoy's 5A medium Gibco® - 10% Sérum de veau foetal - 1% Penicilline-spreptomycine

Annexe 4 : Protocole du Western blot

Préparation des échantillons : Le culot d'une boîte de culture après centrifugation est traité par 500 µl de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et phosphatases puis laissé quelques minutes sur glace. Une nouvelle centrifugation est effectuée pour éliminer les débris cellulaires et la solution protéique est récupérée en plusieurs aliquotes dont un servira au dosage des protéines.

Dosage des protéines : L'albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumine : BSA) sert d'étalon pour le dosage des protéines. L'échantillon à doser doit être compris dans le domaine de linéarité de la mesure soit entre 0 et 10 µg par tube. Pour cela, il est procédé à une dilution de l'échantillon (généralement au 1/100). On effectue un dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Bradford. Ainsi à 100 µl de la solution de protéine on ajoute 1000 µl du réactif de Bradford puis on évalue la concentration en protéine par lecture d'absorbance à 595 nm.

Western blot : La technique du Western blot est une immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques sur une membrane de nitrocellulose. 50µg de protéines sont mélangés à un volume équivalent de tampon de chargement, puis porté à 95°C pendant une minute pour dénaturer les protéines. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur un gel à 6% de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) puis transférées sur membrane de nitrocellulose (PROTRAN). Le blocage des sites d'interaction non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé pendant 1 heure en plongeant la membrane dans une solution de lait sans matières grasses (4%) en présence d'un détergent : 0,01% Tween[®] 20.

La membrane est ensuite sondée pour la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps primaire (pour lequel il faut optimiser la concentration) à 4°C pendant toute la nuit. Le lendemain, la membrane est rincée avec la solution de lavage puis plongée dans la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La présence d'anticorps sur la membrane est révélée à l'aide du Kit ECL[™] (GE Healthcare) permettant de visualiser l'activité de la peroxydase par chimioluminescence. Enfin, l'exposition de la membrane à un film photographique permet d'obtenir une image de la protéine spécifiquement révélée.

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS**

PUBLICATIONS:

- 1- Estelle Ayme-Dietrich, **Roland Lawson**, Bernard Gasser, Robert Dallemand, Nicolas Bischoff and Laurent Monassier. Mitral bioprosthesis hypertrophic scarring and native aortic valve fibrosis during benfluorex therapy. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2012; 26(2): 215-218.
- 2- **Roland Lawson**, Estelle Ayme-Dietrich, Laurent Monassier. Sérotonine et dégénérescence valvulaire cardiaque: de la valvulopathie carcinoïde aux atteintes médicamenteuses. *CARDINALE – cardiologie* 2012; 6(51).
- 3- Marzak, Halim, Estelle Ayme-Dietrich, **Roland Lawson**, Walid Mokni, Roy Combe, Julien Becker, Lahcen El Fertak, Marie-France Champy, and Laurent Monassier. “Old spontaneously hypertensive rats gather together typical features of human chronic left-ventricular dysfunction with preserved ejection fraction.” *Journal of hypertension* 32, no. 6 (June 2014): 1307–1316.

En preparation

- 1- Marzak, Halim, Estelle Ayme-Dietrich, **Roland Lawson**, Walid Mokni, Roy Combe, Julien Becker, Lahcen El Fertak, Marie-France Champy, and Laurent Monassier. “Contribution of serotonin to cardiac remodeling associated with hypertensive diastolic ventricular dysfunction in rats.” *Journal of hypertension*.
- 2- **Roland Lawson**, Estelle Ayme-Dietrich, Béatrice Hechler, Christian Gachet, Claudia de Tapia, Hélène Rouillard, Luc Maroteaux, Bernard Gasser and Laurent Monassier. “Contribution of endothelial cells, serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors and eNOS in early processes of valve degeneration due to nordexfenfluramine in mice.” *Circulation research*.

COMMUNICATIONS ORALES:

“Serotonergic pharmacological mechanisms in cardiac valve remodelling: the carcinoid heart as an experimental model.” **R. Lawson**, E. Bui, F. Zorres, L. Maroteaux and L. Monassier. 2010, 6th Annual Congress of Physiology, Pharmacology and Therapeutic (P2T), Grenoble, France.

“Mechanisms involving serotonergic 5-HT_{2B} receptors in drug-induced valvulopathy: pharmacological approach in mice.” **R. Lawson**, B. Gasser, E. Ayme-Dietrich, L. Maroteaux and L. Monassier. 2013. 8th Annual Congress of Physiology, Pharmacology and Therapeutic (P2T), Angers, France.

“New insights on the role of serotonergic 5-HT_{2B} receptors in drug-induced valvulopathy: contribution of endothelial cells?” **R. Lawson**, B. Gasser, E. Ayme-Dietrich, L. Maroteaux and L. Monassier. 2013. Printemps de la Cardiologie (PC), Marseille, France.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES:

“New insight in cardiac valve remodelling mechanisms: the role of serotonergic system in carcinoid heart disease.” **R. Lawson**, E. Bui, F. Zorres, L. Maroteaux and L. Monassier. 2010, Printemps de la Cardiologie (PC), Lyon, France.

“New insights on the role of serotonergic 5-HT_{2B} receptors in drug-induced valvulopathy: contribution of endothelial cells?” **R. Lawson**, B. Gasser, E. Ayme-Dietrich, L. Maroteaux and L. Monassier. 2013, Printemps de la Cardiologie (PC), Marseille, France.

“Pharmacological mechanisms involving serotonergic 5-HT₂ receptors in drug induced valvulopathy.” **R. Lawson**, B. Gasser, E. Ayme-Dietrich, L. Maroteaux and L. Monassier. 2013, European Society of Cardiology congress, Amsterdam, Netherlands.

“Contribution of endothelial cells, serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors and eNOS in early processes of valve degeneration due to nordexfenfluramine in mice.” **R. Lawson**, B. Gasser, E. Ayme-Dietrich, L. Maroteaux and L. Monassier. 2014, Printemps de la Cardiologie (PC), Strasbourg, France.

Implication de la 5-HT et des récepteurs 5-HT₂ dans le remodelage valvulaire cardiaque

Résumé : « **Implication de la 5-HT et des récepteurs 5-HT₂ dans le remodelage valvulaire cardiaque** » L'existence d'un lien entre certaines dysfonctions du système sérotoninergique et la survenue de valvulopathies est suggéré par les lésions valvulaires observées au cours de l'utilisation chronique de certains agonistes des récepteurs 5-HT₂ (dérivés de l'ergot de seigle, fenfluramine) et des atteintes tumorales carcinoïdes (qui entraînent une augmentation des taux de 5-HT circulante). Les lésions dégénératives associent une fibrose, une sténose et/ou une régurgitation des valves pouvant conduire à de nombreuses complications cardiovasculaires. À l'heure actuelle, outre la chirurgie de remplacement des valves par des prothèses, il n'existe aucune thérapeutique validée pouvant freiner ou faire régresser les lésions. Nos travaux apportent une lumière sur les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement en cause en démontrant à partir de modèles animaux et cellulaires, l'implication effective des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2A} dans l'initiation des lésions. L'analyse histologique des valves à partir de nos modèles animaux a révélé la contribution des cellules endothéliales au cours des stades précoces de développement des lésions. Ces cellules sont des progéniteurs endothéliaux (CD34+) recrutés à partir de la moelle au sein de la valve sous la stimulation des récepteurs 5-HT₂ et par un mécanisme intracellulaire impliquant la eNOS. Des travaux ultérieurs permettront de mieux caractériser les différents types cellulaires recrutés et de trouver les biomarqueurs d'initiation du processus. Ces résultats aboutiront à la détermination de nouvelles pistes thérapeutiques autour du système sérotoninergique.

Abstract: « **Involvement of 5-HT and 5-HT₂ receptors in cardiac valve remodelling** » Several studies have reported a strong correlation between the development of cardiac valve injury and some dysfunctions of the serotonergic system. Valve lesions are observed during the chronic use of some 5-HT₂ receptors agonists (ergot derivatives or fenfluramine derivatives) or are secondary to metastatic carcinoid tumours (with increased circulating 5-HT amount). These lesions show fibrosis, with thickened leaflets, valves stenosis and/or regurgitation followed by several cardiovascular complications. There is no medical treatment to stop or alter the natural course of the lesions. Surgical replacement by prosthesis is the only effective therapy. Our study based on animal and cellular pharmacological models, demonstrates the serotonergic system contribution through 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} receptors in the pathogenesis of valve degeneration. Histological analysis of the lesions reveals the contribution of endothelial cells to the initiation process. These cells are probably endothelial progenitors (CD34+) recruited inside the valve implying a NO-dependent mechanism. Further studies will characterize the specific cells to find biomarkers of valve remodelling initiation and at term, will identify best therapeutic targets around the serotonergic system.