

Sommaire

PUBLICATIONS	1
ABRÉVIATIONS	3
FIGURES & TABLEAUX.....	5
AVANT-PROPOS.....	9
INTRODUCTION.....	13
LE SYSTÈME SÉROTONINERGIQUE.....	15
I. LA SÉROTONINE.....	15
I.1. La découverte de la sérotonine	15
I.2. Le métabolisme de la sérotonine	16
I.2.1. Biosynthèse, stockage et libération de la 5-HT.....	16
I.2.2. L'inactivation de la 5-HT (recapture et catabolisme).....	17
I.3. Les récepteurs de la sérotonine.....	20
I.4. Anatomie du système 5-HT central et périphérique.	22
I.4.1. Les noyaux 5-HT dans le système nerveux.	22
I.4.2. Les cellules chromaffines de l'intestin	25
I.4.3. Les cellules sérotoninergiques de la glande pineale.....	26
I.5. Fonctions physiologiques de la sérotonine et pathologies associées	27
I.5.1. Dans le système nerveux central	27
I.5.2. Dans les intestins.....	31
II. L'ENZYME TRYPTOPHANE HYDROXYLASE	34
II.1. La famille des hydroxylases des acides aminés aromatiques	34
II.2. Isolement et caractérisation des gènes <i>Tph</i>.....	36
II.2.1. Isolement et caractérisation du premier gène <i>Tph</i>	36
II.2.2. Hypothèse de l'existence d'un deuxième gène <i>Tph</i>	36
II.2.3. Découverte du deuxième gène <i>Tph</i>	38
II.3. Comparaison des deux gènes <i>Tph</i> et des protéines correspondantes	38
II.3.1. Comparaison des deux gènes <i>Tph</i>	38
II.3.2. Comparaison des deux protéines TPH	39
II.4. L'importance des polymorphismes.....	41
III. CONCLUSION	43
LA SÉROTONINE DANS LE MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE	45
I. LA SÉROTONINE ET LE SYSTÈME SANGUIN.....	45
I.1. Rôle de la sérotonine dans la circulation sanguine	46
I.1.1. Plaquettes sanguines et hémostase	46
I.1.2. Les plaquettes COAT.....	47
I.1.3. L'hémostase des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} et le mécanisme de sérotonylation	48
I.1.4. La sérotonine dans le plasma sanguin	50
I.2. Rôle de la sérotonine au cours de l'hématopoïèse	50
I.2.1. Rôle de la sérotonine dans la thrombopoïèse	51
I.2.2. Rôle de la sérotonine dans l'érythropoïèse	51
I.3. Conclusion	52

II.	LA 5-HT DANS LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE.....	52
II.1.	La régulation cardiovasculaire centrale par la sérotonine	54
II.1.1.	Le centre cardiovasculaire et le système nerveux autonome.....	54
II.1.2.	Voies sérotoninergiques centrales et système cardiovasculaire	55
II.2.	La régulation sérotoninergique périphérique du système cardiovasculaire	56
II.2.1.	La sérotonine dans la physiologie vasculaire.....	56
II.2.2.	La sérotonine dans la physiologie cardiaque.....	61
III.	CONCLUSION	67
OBJECTIFS		69
RÉSULTATS & COMMENTAIRES		71
PREMIÈRE PARTIE: RÉGULATION DE LA FONCTION CARDIAQUE PAR LA SÉROTONINE CIRCULANTE.....		73
I.	INVALIDATION DU GÈNE <i>TPH1</i> CHEZ LA SOURIS	73
II.	DÉCOUVERTE DU GÈNE <i>TPH2</i>	75
III.	QUELLES SONT LES CONSÉQUENCES DE L'ABSENCE DE SÉROTONINE CIRCULANTE ?	77
III.1.	Caractérisation fonctionnelle du phénotype cardiaque	79
III.1.1.	Analyse de la contractilité cardiaque en condition basale	79
III.1.2.	L'activité électrique cardiaque est-elle altérée chez les souris <i>Tph1</i> ^{-/-} ?	81
III.1.3.	La réponse mécanique cardiaque est-elle modifiée chez les souris <i>Tph1</i> en condition de stress ?	83
III.2.	Caractérisation moléculaire du phénotype cardiaque	84
III.2.1.	L'expression des récepteurs adrénnergiques est-elle modifiée dans le cœur des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} ?	85
III.2.2.	L'expression des récepteurs sérotoninergiques est-elle modifiée dans le cœur des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} ?	87
IV.	CONCLUSION	88
DEUXIÈME PARTIE: RÔLE CRUCIAL DE LA SÉROTONINE MATERNELLE POUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE		89
I.	CONSÉQUENCES DU FAIBLE TAUX DE 5-HT MATERNELLE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	91
I.1.1.	Importance du taux de sérotonine maternelle circulante	94
I.1.2.	Quelle est l'origine de la sérotonine présente dans l'embryon ?	95
II.	CONCLUSION	96
TROISIÈME PARTIE: L'IMPORTANCE DU TAUX DE SÉROTONINE PLASMATIQUE.....		99
I.	LES SOURIS <i>TPH1</i>^{-/-}(-/-) QUI SURVIVENT DÉVELOPPENT-ELLES UNE CARDIOPATHIE ?	101
II.	LA CARDIOPATHIE EST-ELLE CORRÉLÉE AVEC LE TAUX DE SÉROTONINE CIRCULANTE ?	104
III.	LA STRUCTURE ET LA FONCTION DES PLAQUETTES SANGUINES DES SOURIS <i>TPH1</i>^{-/-}(-/-) SONT-ELLES AFFECTÉES ?	106
IV.	QUEL EST LE RÔLE DE LA SÉROTONINE MATERNELLE DANS LE CONTRÔLE DU TAUX DE SÉROTONINE CIRCULANTE ?.....	107
V.	CONCLUSION	110
QUATRIÈME PARTIE : L'INFLUENCE DU FOND GÉNÉTIQUE DES SOURIS <i>TPH1</i>^{-/-}		111
I.	CARACTÉRISATION DU PHÉNOTYPE CARDIAQUE DES SOURIS <i>TPH1</i>^{-/-} 129SVJ	111

II. QUELS SONT LES TAUX DE 5-HT TOTALE ET PLASMATIQUE DES SOURIS <i>TPH1^{-/-} 129SVJ</i> ?	113
III. LA STRUCTURE ET LA FONCTION DES PLAQUETTES SANGUINES DES SOURIS <i>TPH1^{-/-} 129SVJ</i> SONT-ELLES AFFECTÉES ?	115
IV. CONCLUSION	116
 DISCUSSION & PERSPECTIVES	119
SYNTHÈSE DE LA SÉROTONINE: LA DUALITÉ DU SYSTÈME	123
I. PROFIL D'EXPRESSION DES DEUX GÈNES <i>TPH</i>	123
I.1. Expression chez l'adulte	123
I.2. Expression au cours du développement	125
II. LES GÈNES <i>TPH</i> CHEZ LES NON MAMMALIENS	126
II.1. Deux gènes <i>Tph</i> chez la mouche <i>Drosophila melanogaster</i>	126
II.2. Trois gènes <i>Tph</i> chez le poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	127
III. PLUSIEURS GÈNES POUR LA SYNTHÈSE DE LA 5-HT: QUELLE UTILITÉ ?	127
IV. INVALIDATION DU GÈNE <i>TPH2</i> CHEZ LA SOURIS: QUEL PHÉNOTYPE?	129
LA 5-HT, UNE MOLÉCULE CLEF DE LA RÉGULATION CARDIOVASCULAIRE	131
I. LA SÉROTONINE RÉGULE LA FRÉQUENCE CARDIAQUE	132
I.1. Modification du potentiel d'action cardiaque ?	133
I.2. Modification du tonus sympathique / parasympathique ?	133
II. LA SÉROTONINE RÉGULE LA CONTRACTILITÉ CARDIAQUE	135
II.1. Une implication des récepteurs β_3 ou α_1 adrénnergiques cardiaques ?	137
II.2. Un « cross-talk » entre les voies de signalisation sérotoninergique et adrénnergique cardiaques ?	138
III. LA 5-HT PLASMATIQUE RÉGULERAIT LA CONTRACTILITÉ CARDIAQUE PAR LE MÉCANISME DE SÉROTONYLATION DES PETITES PROTÉINES G ?	139
III.1. La sérotonylation des petites protéines G dans les cardiomyocytes	139
III.2. La sérotonylation dans les cellules sanguines	141
L'IMPORTANCE DU TAUX DE SÉROTONINE PLASMATIQUE	143
I. LA 5-HT PLASMATIQUE, UNE IMPORTANCE SOUS-ÉVALUÉE	143
I.1. Quels sont les mécanismes de contrôle du niveau de 5-HT plasmatique ?	144
I.1.1. Une modification de l'activité du SERT dans les plaquettes sanguines ?	145
I.1.2. Une modification de l'activité du SERT dans les autres types cellulaires ?	146
I.1. Conclusion	147
II. INTÉRÊT DU DOSAGE DE LA 5-HT PLASMATIQUE EN CLINIQUE HUMAINE	147
II.1. Dosage du taux de sérotonine chez la femme enceinte	147
II.1.1. Sérotonine et autisme	147
II.1.2. Sérotonine et phénylcétonurie	148
II.1.3. Une prévention des désordres développementaux par l'administration de sérotonine?	149
II.2. Dosage du taux de sérotonine chez l'adulte pour l'évaluation du risque cardiovasculaire	150
III. CONCLUSION	150
 CONCLUSION GÉNÉRALE	151

MATÉRIELS & MÉTHODES.....	153
I. EVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE PAR ÉCHOCARDIOGRAPHIE	155
I.1. Principe de l'échocardiographie	155
I.2. Protocole de l'échocardiographie.....	156
II. EVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE PAR CATHÉTERISATION DE CONDUCTANCE	157
II.1. Principe de la cathétérisation de conductance	158
II.2. Protocole de la cathéterisation de conductance.....	160
III. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE DU CŒUR PAR ÉLECTROCARDIOGRAPHIE (ECG) 161	
III.1. Principe de l'electrocardiographie	161
III.2. Protocole d'enregistrement des ECG.....	162
IV. EVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE AU COURS DE L'EFFORT PAR CATHÉTERISATION DE CONDUCTANCE.....	163
IV.1. Principe de l'épreuve pharmacologique d'effort	163
IV.2. Protocole de l'épreuve pharmacologique d'effort.....	164
ANNEXES.....	165
ARTICLE 1.....	167
ARTICLE 2.....	177
ARTICLE 3.....	187
ARTICLE 4.....	201
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	207

Publications

Travaux publiés:

Côté F, Thévenot E, **Fligny C**, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, Dandolo L, Hamon M, Mallet J & Vodjdani G.

Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Nov 11;100(23):13525-30.

Côté F, **Fligny C**, Fromes Y, Mallet J & Vodjdani G.

Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function.

Trends Mol Med. 2004 May;10(5):232-8.

Côté F, **Fligny C**, Mallet J & Vodjdani G.

Abnormal cardiac activity in mice in the absence of peripheral serotonin synthesis. *J Soc Biol*. 2004;198(1):7-17. Review. French.

Côté F, **Fligny C**, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J & Vodjdani G.

Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*.

2007 Jan 2;104(1):329-34. Epub 2006 Dec 20.

Travaux en préparation:

Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Bayard E, Hamon M, Launay JM, Côté F, Mallet J & Vodjdani G.

Circulating serotonin is indispensable for cardiac adaptation to stress

Fligny C, Fromes Y, Bonnin P, Bayard E, Launay JM, Vodjdani G, Mallet J & Côté F.

Plasmatic serotonin levels are correlated to the severity of cardiomyopathy in *Tph1*^{-/-} mice.



Abréviations

5-HIAA	acide 5-hydroxyindolacétique
5-HT	5-hydroxytryptamine, sérotonine
5-HTPP	5-hydroxytryptophane
5-HTT	transporteur de la sérotonine (voir aussi SERT)
AADC	décarboxylase des acides aminés aromatiques
ACh	acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire de l'ARN
AMP(c)	adénosine monophosphate (cyclique)
ANP	peptide natriurétique auriculaire
ARN(m)	acide ribonucléique (messager)
BH ₄	tétrahydrobioptérine
BHE	barrière hémato-encéphalique
BMPR2	<i>bone morphogenetic protein receptor type II</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
ChAT	choline acétyltransférase
CK-MB	créatine kinase spécifique des muscles et du cerveau
CMD	cardiomyopathie dilatée
CMH	cardiomyopathie hypertrophique
CML	cellule musculaire lisse
CRL	<i>crown-rump length</i>
DAT	transporteur de la dopamine
DOPA	dihydroxyphénylalanine
E	jour embryonnaire post-coitum
EC	cellules entérochromaffines
EPO	érythropoïétine
HTAP	hypertension artérielle pulmonaire
IBS	syndrome du colon irritable
IL	interleukine
IMAO	inhibiteur des MAO
Lmx1b	<i>Lim homeobox transcription factor 1β</i>
LSD	<i>d-lysergic acid diethylamide</i>
L-trp	L-tryptophane
Mash1	<i>mammalian achaete-schute homolog 1</i>
MAO	monoamine oxydase
MHC	chaîne lourde de la myosine
NA	noradrénaline
NAT	N-acétyltransférase
NET	transporteur de la noradrénaline
Nkx2.2	<i>NK2 transcription factor-related 2.2</i>
NO	monoxyde d'azote
NRD	Noyau du raphe dorsal
PAH	phénylalanine hydroxylase
PCPA	parachlorophénylalanine
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDE	phosphodiesterase
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
Pet1	<i>pheochromocytoma 12ETS factor-1</i>
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
ROS	espèces réactives dérivées de l'oxygène

RT-PCR	rétrotranscription suivie d'une PCR
SCV	système cardiovasculaire
SERT	transporteur de la sérotonine
SNA	système nerveux autonome
SNC	système nerveux central
SNE	système nerveux entérique
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNP	système nerveux périphérique
SSRI	inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
TH	tyrosine hydroxylase
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
<i>TPH</i>	tryptophane hydroxylase
VMAT	transporteur vésiculaire des monoamines

Figures & Tableaux

Figure 1	Voies de synthèse et de dégradation de la sérotonine.	p.11
Figure 2	Mécanisme du transport de sérotonine par le SERT.	p.13
Figure 3	Classification actuelle des récepteurs 5-HT et principales voies de signalisation.	p.16
Figure 4	Efférences des noyaux sérotoninergiques du raphé.	p.17
Tableau 1	Nombre des neurones sérotoninergiques dans le noyau du raphé dorsal.	p.18
Figure 5	Localisation des plexus entériques.	p.19
Figure 6	Localisation des cellules chromaffines intestinales.	p.20
Figure 7	Variation circadienne de la synthèse de mélatonine dans la glande pineale.	p.21
Figure 8	Représentation schématique d'une synapse sérotoninergique et de l'action de la fluoxétine et de la fenfluramine.	p.24
Figure 9	Mécanisme d'action de la Fenfluramine (FEN).	p.24
Figure 10	Modèle d'action de la sérotonine dans l'intestin.	p.27
Figure 11	Hydroxylation des acides aminés aromatiques par les hydroxylases des acides aminés aromatiques.	p.30
Figure 12	Structure des hydroxylases dépendantes de la tétrahydrobioptérine: comparaison des domaines protéiques.	p.30
Figure 13	Comparaison des structures tertiaires des hydroxylases des acides aminés aromatiques.	p.31
Figure 14	Distribution de l'ARNm <i>Tph</i> et de la protéine TPH.	p.32
Figure 15	Comparaison des structures des gènes <i>Tph1</i> et <i>Tph2</i> .	p.34
Figure 16	Comparaison des produits de transcription des gènes <i>Tph2</i> murin et humain.	p.34
Figure 17	Comparaison des séquences protéiques TPH2 et TPH1 chez l'homme, le rat et la souris.	p.35
Tableau 2	Paramètres cinétiques des tryptophane hydroxylases 1 et 2 humaines et murines.	p.36
Figure 18	Phénotype des souris homozygotes <i>Tph1</i> ^{-/-} .	p.39
Figure 19	Rôle de la 5-HT dans la formation des plaquettes COAT.	p.42
Figure 20	Exocytose des granules α plaquettaires induite par la sérotonine durant le processus d'agrégation plaquettaire.	p.43
Figure 21	Phénotype cardiaque des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} .	p.46
Figure 22	Régulation du système cardiovasculaire par la sérotonine.	p.47
Figure 23	Contrôle des fonctions cardiovasculaires par le centre cardiovasculaire.	p.48
Figure 24	Régulation du tonus vasculaire par la 5-HT.	p.51
Figure 25	Voies de signalisation de la 5-HT induisant une prolifération des CML vasculaires.	p.52
Figure 26	Structure de la paroi du cœur.	p.55
Figure 27	Localisation des récepteurs sérotoninergiques dans le cœur humain.	p.56
Figure 28	Cardiomyopathie dilatée développée par les souris 5-HT _{2B} ^{-/-} .	p.59
Figure 29	Mécanismes d'action de la sérotonine menant à l'hypertrophie des cardiomyocytes.	p.60
Figure 30	Stratégie de ciblage du gène <i>Tph1</i> .	p.65
Figure 31	Génotype des souris issues de croisements entre animaux <i>Tph1</i> ^{+/+} .	p.65
Figure 32	Analyse immunohistochimique de la glande pineale et du raphé dorsal des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} .	p.66
Figure 33	Détermination du taux de sérotonine par HPLC chez les souris <i>Tph1</i> ^{-/-} comparées aux contrôles.	p.66

Figure 34	Expression différentielle des enzymes TPH1, TPH2 et β -Gal, révélée par hybridation <i>in situ</i> .	p.67
Figure 35	Phénotype des souris homozygotes <i>Tph1</i> ^{-/-} .	p.68
Figure 36	Morphologie cardiaque externe de souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} , âgées de 26 semaines.	p.68
Figure 37	Comparaison histologique des organes des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} .	p.69
Figure 38	Exploration des caractéristiques hémodynamiques cardiaques des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} par cathéterisation de conductance.	p.70
Figure 39	Corrélation entre les courbes pression-volume et l'histologie cardiaque des deux souris mutantes <i>Tph1</i> ^{-/-} (273 et 296), comparées à une souris contrôle.	p.71
Tableau 3	Variabilité du rythme cardiaque mesuré chez les souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} .	p.73
Figure 40	Représentation de la contractilité cardiaque des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} pendant le test d'effort pharmacologique.	p.74
Tableau 4	Etude de liaison des récepteurs β 1 et β 2 adrénergiques cardiaques des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} .	p.76
Tableau 5	Dosage des catécholamines dans les organes des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} .	p.77
Figure 41	Expression de la protéine TH dans la glande surrénale des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} .	p.77
Tableau 6	Etude de liaison des récepteurs sérotoninergiques 5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} et du SERT dans les cardiomyocytes isolés des ventricules des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} .	p.78
Figure 42	Dosage plasmatique des facteurs d'insuffisance cardiaque	p.81
Tableau 7	Phénotype des embryons <i>Tph1</i> issus des croisements entre parents <i>Tph1</i> sauvages, hétérozygotes, ou mutés.	p.82
Figure 43	Morphologie externe des embryons à E12.5 issues de mères <i>Tph1</i> ^{+/+} (A, embryon 1), <i>Tph1</i> ^{+/+} (A, embryon 2) et <i>Tph1</i> ^{-/-} (A, embryons 3 et 4).	p.83
Figure 44	Coupes longitudinales des embryons 2 et 3 présentés figure 43.	p.83
Figure 45	Analyse de l'activité mitotique des cellules après un pulse de BrdU.	p.84
Figure 46	Détermination des concentrations sanguines de sérotonine circulante chez les souris <i>Tph1</i> par HPLC.	p.85
Figure 47	Profil d'expression de l'ARNm <i>Tph2</i> chez l'embryon.	p.86
Figure 48	Profil d'expression de l'ARNm <i>Tph1</i> chez l'embryon.	p.87
Figure 49	Résumé des travaux précédents et nouvelles questions posées.	p.91
Figure 50	Echocardiogrammes des souris <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce), <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-) et <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-), âgées de 2 mois puis de 5 mois.	p.92
Tableau 8	Paramètres anatomiques des coeurs des souris enregistrés par échocardiographie.	p.93
Figure 51	Détermination du poids des animaux, du poids de leur coeur et du rapport poids du coeur/poids du corps.	p.93
Figure 52	Données échocardiographiques fonctionnelles des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-), <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce) à 2 et 5mois.	p.94
Figure 53	Dosage plasmatique des facteurs d'insuffisance cardiaque.	p.95
Figure 54	Taux de sérotonine dans le sang total et dans le plasma sanguin des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-), <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce).	p.96
Figure 55	Corrélations entre les taux de sérotonine mesurés dans le plasma et les concentrations des marqueurs plasmatique d'insuffisance cardiaque.	p.97
Figure 56	Nombre total de plaquettes sanguines chez les souris <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-), <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce).	p.97
Figure 57	Numération sanguine des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-) et <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce).	p.99
Figure 58	Examen des embryons <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce).	p.100
Figure 59	Dosage plasmatique des facteurs d'insuffisance cardiaque chez les souris de fond génétique 129SvJ.	p.103

Figure 60	Comparaison des niveaux plasmatiques de BNP des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} de fond génétique C57BL/6 et 129SvJ.	p.104
Figure 61	Taux de sérotonine dans le sang total et dans le plasma sanguin des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-), <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) vs. <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce) de fond génétique 129SvJ.	p.105
Figure 62	Corrélations entre les taux de sérotonine mesurés dans le plasma des souris <i>Tph1</i> de fond génétique 129SvJ et les concentrations plasmatiques des marqueurs d'insuffisance cardiaque.	p.105
Figure 63	Numération sanguine des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-) et <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) de fond génétique 129SvJ, en comparaison des animaux contrôles.	p.106
Figure 64	Résumé des expériences comparatives menées sur les souris <i>Tph1</i> ^{-/-} (+/-), <i>Tph1</i> ^{-/-} (-/-) et <i>Tph1</i> ^{+/+} (commerce) des fonds génétiques C57BL/6 et 129SvJ.	p.108
Figure 65	Modèle simplifié de la formation de la variabilité du rythme cardiaque et schéma du contrôle cardiovasculaire.	p.120
Figure 66	Immunohistochimie TPH2 dans le raphé dorsal des souris <i>Tph1</i> ^{-/-} .	p.121
Figure 67	Représentation schématique des vues parasternales du cœur.	p.143
Figure 68	Images échocardiographiques parasternales du cœur de souris selon le petit axe.	p.144
Figure 69	Capteur de pression-volume utilisé lors des expériences.	p.145
Figure 70	Représentation de la boucle pression-volume du ventricule gauche.	p.146
Figure 71	Boucles pression-volume du ventricule gauche.	p.147
Figure 72	Mise en place du cathéter de conductance dans le ventricule gauche de la souris.	p.148
Figure 73	Photographie du système d'enregistrement ECG.	p.149
Figure 74	Conséquences de l'augmentation de la contractilité cardiaque sur la boucle pression-volume du ventricule gauche.	p.150

Avant-propos

L'étude de la tryptophane hydroxylase (TPH), enzyme limitante de la voie de biosynthèse de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) a débuté au laboratoire par l'isolement de l'ADN complémentaire (ADNc) de la TPH de rat en 1986 (Darmon *et coll.*, 1986) et s'est poursuivie par l'isolement du gène *Tph* humain (Boularand *et coll.*, 1995a). Les séquences impliquées dans l'activation de la transcription du gène *Tph*, ainsi que les mécanismes de régulation de la transcription de la TPH en réponse à l'AMP cyclique dans la glande pinéale, ont ensuite été caractérisés (Boularand *et coll.*, 1995b; Cote *et coll.*, 2002).

La sérotonine, synthétisée dans des tissus et cellules très localisés, a une action pléiotrope dans le système nerveux central et à la périphérie. Pour déterminer, *in vivo*, les conséquences de l'absence de sérotonine et définir son rôle dans la mise en place et le maintien des structures sérotoninergiques, la création de modèles animaux dans lesquels le gène *Tph* est inactivé a été initiée au laboratoire. Deux approches complémentaires ont été envisagées: l'inactivation constitutive du gène *Tph* chez la souris par *knock-in* du gène rapporteur *nlslacZ*, et l'inactivation conditionnelle du gène *Tph* spécifiquement dans le système nerveux central (SNC) par le système *Cre/LoxP*. La première approche, menée plus spécifiquement par Francine Côté, a permis la génération en 2002 de la lignée de souris dont le gène *Tph1* est invalidé. Cette lignée de souris a représenté le modèle d'étude pour mon travail de thèse. Le deuxième aspect, que je ne développerai pas dans ce manuscrit, a été mené par Etienne Thévenot, doctorant au laboratoire entre 1998 et 2003. Il a permis de valider le transfert de gène à l'aide de vecteurs viraux, spécifiquement dans le noyau du raphé dorsal de la souris, lieu principal de synthèse de la 5-HT dans le SNC (Thevenot, 2003; Thevenot *et coll.*, 2003). Ces travaux ont permis de mettre en place les conditions nécessaires au ciblage de la recombinase *Cre* dans les noyaux sérotoninergiques centraux. Un troisième aspect, correspondant au *knock-down* du gène *Tph* par l'utilisation d'ARN interférents injectés par stéréotaxie dans les noyaux du raphé, a par la suite été développé, plus particulièrement par Guilan Vodjdani, avec Marion Foenix.

Lors de mon arrivée au laboratoire en février 2002, les souris chimères porteuses de la mutation dans le gène *Tph* venaient de naître. Les premiers animaux *Tph^{+/+}* puis *Tph^{-/-}* furent obtenus en juin 2002. Notre première surprise fut de constater la viabilité et la fertilité des souris homozygotes *Tph^{-/-}*. La 5-HT ayant une action étendue, aussi bien dans le SNC qu'à la périphérie, nous attendions plutôt des défauts du développement embryonnaire et/ou d'importants remodelages du SNC. Des expériences complémentaires, que je décrirai dans le chapitre consacré aux résultats, ont rapidement révélé que l'invalidation du gène *Tph* était spécifique des structures non neuronales (glande pinéale et cellules entérochromaffines), alors que les structures neuronales (neurones des noyaux du

raphé, neurones myentériques) exprimaient toujours une protéine TPH fonctionnelle, permettant une synthèse normale de sérotonine dans ces structures. Ces expériences ont validé l'hypothèse préalablement émise au laboratoire de l'existence de deux gènes *Tph* (Dumas *et coll.*, 1989). Le gène *Tph* invalidé dans la lignée de souris générée au laboratoire correspond au gène maintenant appelé *Tph1*, responsable de la synthèse de sérotonine à la périphérie, par les cellules non-neuronales. Avec un taux de sérotonine réduit uniquement à la périphérie, les souris *Tph1^{-/-}* constituaient un modèle d'étude unique pour définir les rôles respectifs de la sérotonine centrale et périphérique.

D'un point de vue phénotypique, les premières souris *Tph1^{-/-}* présentaient des signes de pâleur générale, de cachexie, ainsi que des difficultés respiratoires, suggérant des anomalies de circulation sanguine. Les premières autopsies révélèrent une cardiomégalie flagrante. Mon travail de thèse a consisté à réaliser une caractérisation précise du phénotype cardiaque des souris *Tph1^{-/-}*, et à préciser l'origine et le mode d'action de la sérotonine sur le muscle cardiaque. Nous montrons que les souris *Tph1^{-/-}* développent progressivement une cardiopathie dilatée, associée à une diminution importante de la contractilité du muscle cardiaque entraînant une grave insuffisance cardiaque. La sévérité du phénotype cardiaque de la souris adulte dépend 1) du taux de sérotonine maternelle au cours du développement embryonnaire, 2) du degré de maturation des plaquettes sanguines et 3) du fond génétique des souris analysées. Finalement, en considérant les données sur le taux de sérotonine maternelle et le fond génétique des souris étudiées, nous démontrons que la sérotonine active dans la régulation de la physiologie cardiovasculaire se situe dans le compartiment plasmatique sanguin.

Avant de présenter puis de discuter l'ensemble de ces résultats, je dresserai tout d'abord un aperçu du système sérotoninergique, ainsi que des données connues dans les domaines de la physiologie et des pathologies associées à ce système. Je détaillerai ensuite plus spécifiquement les aspects reliés aux systèmes sanguin et cardiovasculaire. Dans la seconde partie de ce mémoire, je présenterai les résultats expérimentaux obtenus. L'ensemble des résultats a fait l'objet de deux articles originaux publiés et de deux autres articles en préparation. La troisième partie de ce mémoire sera consacrée à une discussion des résultats expérimentaux, ainsi qu'aux perspectives qui découlent de nos travaux.

Introduction

Le système sérotoninergique

I. La sérotonine

1.1. La découverte de la sérotonine

L'histoire de la sérotonine commence au début des années 1930 en Italie (pour revues, Whitaker-Azmitia, 1999; Richard Green, 2006). L'équipe de Vittorio Erspamer s'intéresse à la contraction des muscles lisses et aux propriétés constrictrices de plusieurs amines trouvées dans la peau et dans le tractus gastro-intestinal du lapin, de la grenouille ou encore de certains mollusques. A partir d'un extrait de muqueuse gastrique de lapin, il isole une substance qui provoque la contraction des muscles lisses, en particulier des muscles utérins. Il identifie cette substance comme étant une indole et la nomme 'entéramine' (Le papier originel qui décrit la découverte de l'entéramine est écrit en italien: Erspamer et Viali, 1937).

Par ailleurs, l'équipe américaine dirigée par Irvine Page travaille sur l'étiologie et le traitement de l'hypertension artérielle. Son hypothèse est la suivante: l'hypertension serait causée par la présence de facteurs sanguins endogènes ayant des propriétés vasoconstrictrices. Avec le chimiste Maurice Rapport et la biochimiste Arda Green, il isole, purifie et cristallise une substance présente dans le sang coagulé qu'il nomme 'sérotonine', "*which indicates its source is serum and its activity is one of causing constriction*" (Rapport et coll., 1948a; Rapport et coll., 1948b). La structure de la 5-hydroxytryptamine fut déterminée l'année suivante (Rapport, 1949) et sa synthèse organique fut obtenue en 1951. C'est à cette période que sérotonine et entéramine furent identifiées comme une seule et même substance (Erspamer et Asero, 1952).

Mais l'avancée majeure concernant la sérotonine allait être faite en 1952 par la biologiste Betty Mack Twarog. Elle démontre le rôle de neurotransmetteur de la sérotonine chez le mollusque (ses travaux ne seront publiés que 2 ans plus tard; Twarog, 1954). Elle montra ensuite la présence de 5-HT dans le cerveau des mammifères (Twarog et Page, 1953). En 1954, Walley et coll. firent le rapprochement entre les structures de la 5-HT et du LSD (*d-lysergic acid diethylamide*), dont les propriétés hallucinogènes avaient été découvertes en 1943. Ils démontrent que ce dernier était un antimétabolite de la 5-HT, c'est-à-dire un

analogue capable d'interférer avec sa fonction, et proposèrent l'implication de la 5-HT dans les maladies mentales. Enfin, se fondant sur les similitudes entre la sérotonine et l'hormone de croissance végétale auxine, ils avancèrent l'idée que la sérotonine joue un rôle dans le développement du cerveau (Woolley et Shaw, 1954).

1.2. Le métabolisme de la sérotonine

1.2.1. Biosynthèse, stockage et libération de la 5-HT

Dans le système nerveux central ou à la périphérie, la sérotonine est synthétisée dans les cellules sérotoninergiques, exclusivement à partir de l'acide aminé essentiel L-tryptophane (L-trp), apporté uniquement par l'alimentation. Absorbé par l'intestin, le L-trp est véhiculé par la circulation générale jusqu'au SNC, où il traverse la barrière hémato-encéphalique puis pénètre dans les tissus. La 5-HT est synthétisée en deux étapes (Figure 1): le L-trp est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase (*TPH*, EC 1.14.16.4) en 5-hydroxytryptophane (5-HTP), précurseur immédiat de la sérotonine. L'hydroxylation du L-tryptophane, qui peut être inhibée par la PCPA (p-chlorophénylalanine), est l'étape limitante de cette biosynthèse. Le 5-HTP est ensuite décarboxylé en 5-hydroxytryptamine ou sérotonine par une enzyme ubiquitaire, la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC: *Aromatic Amino Acid Decarboxylase*), également exprimée par les neurones catécholaminergiques.

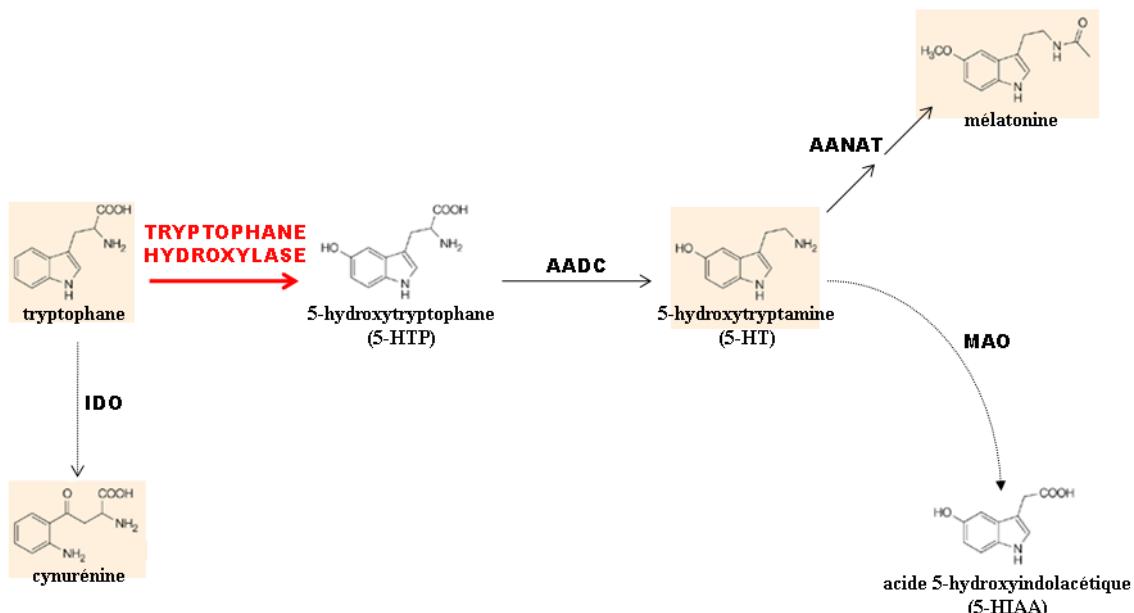


Figure 1: Voies de synthèse et de dégradation de la sérotonine (d'après Rang *et coll.*, 2003).

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

Nous présenterons en détail les propriétés biochimiques et structurales des enzymes *TPH* dans le chapitre II de cette introduction (§II, page 34).

Le devenir de la sérotonine ainsi formée dépend ensuite de sa localisation: dans le SNC, la 5-HT est accumulée dans des vésicules synaptiques de stockage par un système de transport antiport proton/5-HT commun aux monoamines, assuré par le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT. Celui-ci transporte la 5-HT grâce au gradient électrochimique de protons produit par une ATPase localisée dans la membrane des vésicules synaptiques. On recense actuellement deux transporteurs vésiculaires des monoamines, VMAT₁ et VMAT₂, ce dernier étant majoritaire dans le SNC des mammifères à l'âge adulte (Erickson *et coll.*, 1992; Liu *et coll.*, 1992). La 5-HT peut ensuite être libérée par exocytose au niveau des terminaisons sérotoninergiques, à la suite d'une dépolarisation membranaire. Dans la glande pinéale, glande endocrine impliquée dans les phénomènes d'adaptation aux changements de la photopériode, la sérotonine est convertie en mélatonine, molécule clef de la régulation du rythme circadien. Enfin, à la périphérie, la sérotonine néo-synthétisée est libérée dans la circulation sanguine et stockée dans les plaquettes sanguines qui constituent le réservoir principal.

I.2.2. L'inactivation de la 5-HT (recapture et catabolisme)

Une fois libérée, la 5-HT se fixe sur des récepteurs spécifiques, responsables de ses effets physiologiques. Cette activité est limitée dans le temps et en intensité par deux processus d'inactivation qui assurent ainsi l'élimination de l'amine et permettent de réguler finement sa concentration dans l'espace extracellulaire: un mécanisme de recapture et un mécanisme de dégradation enzymatique.

I.2.2.a. La recapture de la sérotonine

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

Le SERT est une protéine à 12 domaines transmembranaires appartenant à la famille des transporteurs Na⁺/Cl⁻ dépendants. Le transport de la 5-HT, en même temps que celui

des ions Na^+ et Cl^- nécessite la liaison des trois composés au SERT (Figure 2, ①). Le SERT subit ensuite une série de changements conformationnels qui empêche l'entrée de molécules supplémentaires et expose le site de liaison au cytoplasme (Figure 2, ②). Après la libération des ions et de la 5-HT à l'intérieur de la cellule (Figure 2, ③), les ions K^+ intracellulaires sont capables de se lier au SERT (Figure 2, ④). Le SERT subit de nouveaux changements de conformation qui empêchent la liaison d'ions K^+ supplémentaires et qui exposent le site de liaison au milieu extracellulaire. La libération du K^+ dans le milieu extracellulaire termine le cycle (Figure 2, ⑤).

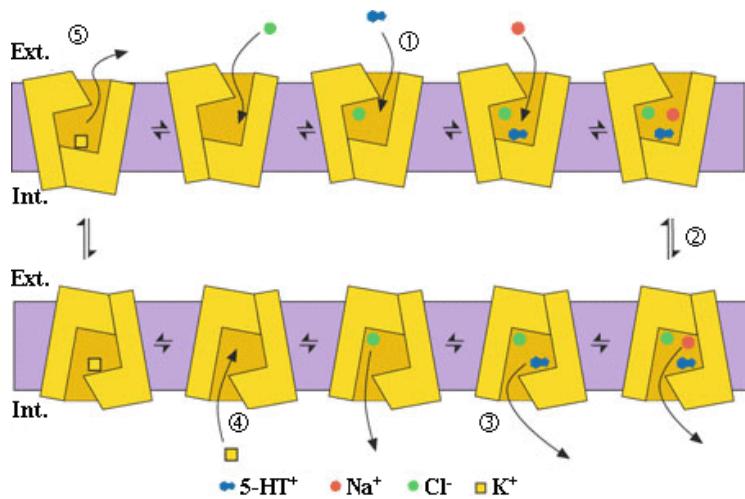


Figure 2: Mécanisme du transport de sérotonine par le SERT (d'après Rudnick, 2007).
Ext.: milieu extracellulaire. Int.: cytoplasme.

La séquence en acides aminés de la protéine SERT purifiée présente des sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases A et C, et par la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendante. L'activité du SERT dépend de son état de phosphorylation (pour revue, Rudnick, 2007).

Dans le SNC, le SERT est localisé dans la membrane plasmique des neurones 5-HT, tant au niveau des corps cellulaires situés dans les noyaux du raphé, que de leurs fibres et leurs terminaisons (Lesch et Gutknecht, 2005).

A la périphérie, le SERT est localisé dans la membrane plasmique des plaquettes sanguines, permettant ainsi l'internalisation de la 5-HT dans les granules denses de sécrétion. La sérotonine ainsi internalisée est libérée lors de l'agrégation plaquettaire (Maurer-Spurej, 2005a; b). Le SERT est également exprimé dans de nombreux tissus (poumons, cœur, intestins) ainsi que dans plusieurs types cellulaires (cellules épithéliales, fibroblastes, neurones du système nerveux périphérique, cellules musculaires lisses).

I.2.2.b. La dégradation enzymatique de la sérotonine

La dégradation enzymatique de la 5-HT est effectuée par les monoamines oxydases (MAO) qui sont de deux types, MAO-A et MAO-B. Ces deux enzymes sont présentes au niveau de la membrane externe des mitochondries, dans plusieurs types cellulaires (neurones, astrocytes, cellules endothéliales, plaquettes sanguines), à la fois dans le SNC et à la périphérie. Elles sont responsables de la désamination oxydative des amines biogènes, dont la sérotonine, et conduisent à la production de 5-hydroxyindole acétaldéhyde, lui-même oxydé par une aldéhyde déshydrogénase pour former le 5-HIAA, métabolite principal et inactif de la sérotonine sécrété dans les urines.

Les MAO possèdent des affinités différentes pour leurs substrats et des inhibiteurs spécifiques. Dans le SNC, la sérotonine est préférentiellement dégradée par la MAO de type A ($K_m=137 \pm 24\mu M$), comme la noradrénaline et l'adrénaline. La MAO de type B, quant à elle, désamine préférentiellement la dopamine, la β -phénylethylamine et la benzylamine. La MAO-B ne semble intervenir dans le catabolisme de la sérotonine que lorsque sa concentration est élevée dans le cytoplasme des cellules ($K_m=1093 \pm 20\mu M$) (Yamada et Yasuhara, 2004; Youdim *et coll.*, 2006).

Dans le SNC, les MAO participent à la régulation et au maintien des niveaux des neurotransmetteurs monoaminergiques (noradrénaline, dopamine, sérotonine). La localisation des MAO ne correspond pas toujours à la localisation de leurs substrats préférentiels. Ainsi, les neurones sérotoninergiques expriment la MAO-B, qui n'utilise normalement pas la 5-HT comme substrat, du fait de sa faible affinité pour l'amine. La sérotonine libérée dans la fente synaptique est désaminée en partie par les astrocytes. Le mécanisme de pénétration de la 5-HT dans les cellules gliales reste controversé, puisqu'il impliquerait, selon les auteurs, soit une diffusion facilitée, soit le transporteur spécifique de la sérotonine SERT (dont l'expression astrocytaire n'est pas établie aujourd'hui). Les MAO sont également présentes dans certains neurones non-monoaminergiques (Luque *et coll.*, 1995; Jahng *et coll.*, 1997; Vitalis *et coll.*, 2002). Dans ces neurones, la sérotonine et les catécholamines agiraient plutôt comme des facteurs trophiques pour le développement neuronal ou seraient impliquées dans la libération ou le stockage d'autres neurotransmetteurs.

Dans les tissus périphériques, les MAO désaminent les monoamines qui agissent de façon endocrine ou paracrine. Elles peuvent être co-exprimées, comme dans le foie humain ou être spécifiquement exprimées, comme la MAO-A dans le placenta ou la MAO-B dans les plaquettes sanguines (Youdim, 1988). Elles jouent également un rôle important de détoxification dans le foie, les intestins et les poumons (Nicotra *et coll.*, 2004).

1.3. Les récepteurs de la sérotonine

Les avancées majeures dans la compréhension du rôle de la sérotonine ont découlé de l'identification de ses différents récepteurs. Par des études pharmacologiques, Gaddum et Picarelli proposèrent dès 1957 la classification "D" et "M" des récepteurs 5-HT, en se basant sur la sensibilité de contraction de l'iléon du cochon d'Inde, en réponse à différentes drogues (Gaddum et Picarelli, 1957). La réponse contractile de l'iléon pouvait être bloquée en partie par la morphine (faisant intervenir les récepteurs de type M) et en partie par la dibenzylidine (faisant intervenir les récepteurs de type D). L'existence de plusieurs récepteurs sérotoninergiques fut admise, au départ pour la périphérie, mais contestée dans le SNC (pour revue, Richard Green, 2006).

En 1979, les études de liaison permirent à Peroutka et Snyder de démontrer l'existence de deux sites distincts de fixation pour la sérotonine (Peroutka et Snyder, 1979). Les deux types de récepteurs seront alors appelés récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₂, ce dernier correspondant pharmacologiquement au récepteur de type D décrit initialement. En 1986, Bradley et ses collaborateurs proposèrent une classification en trois groupes: 5-HT₁-like, 5-HT₂ et 5-HT₃, ce dernier correspondant au récepteur de type M (Bradley *et coll.*, 1986).

Dans les années 1980, l'essor de la biologie moléculaire permit l'isolation des gènes et la caractérisation du premier récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G, le récepteur β_2 -adrénergique (Dixon *et coll.*, 1986). Le premier récepteur sérotoninergique 5-HT_{1A} fut ensuite isolé et caractérisé par homologie de séquence en 1988 (Fargin *et coll.*, 1988). La majorité des 13 autres récepteurs sérotoninergiques a été clonée entre 1988 et 1992 (Hoyer *et coll.*, 1994; Hoyer *et coll.*, 2002); et depuis 1997, année de l'isolation et de la caractérisation du gène codant le récepteur 5-HT₇ (Eglen *et coll.*, 1997), aucun nouveau récepteur 5-HT n'a été identifié. Sur la base de leurs homologies de séquences protéiques et de structures tertiaires, 7 classes de récepteurs 5-HT ont été définies (5-HT₁ à 5-HT₇), représentant ainsi l'une des familles les plus complexes de récepteurs aux neurotransmetteurs.

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

Le couplage des récepteurs 5-HT₅ reste encore incertain: activateur ou inhibiteur de l'adénylate cyclase ?

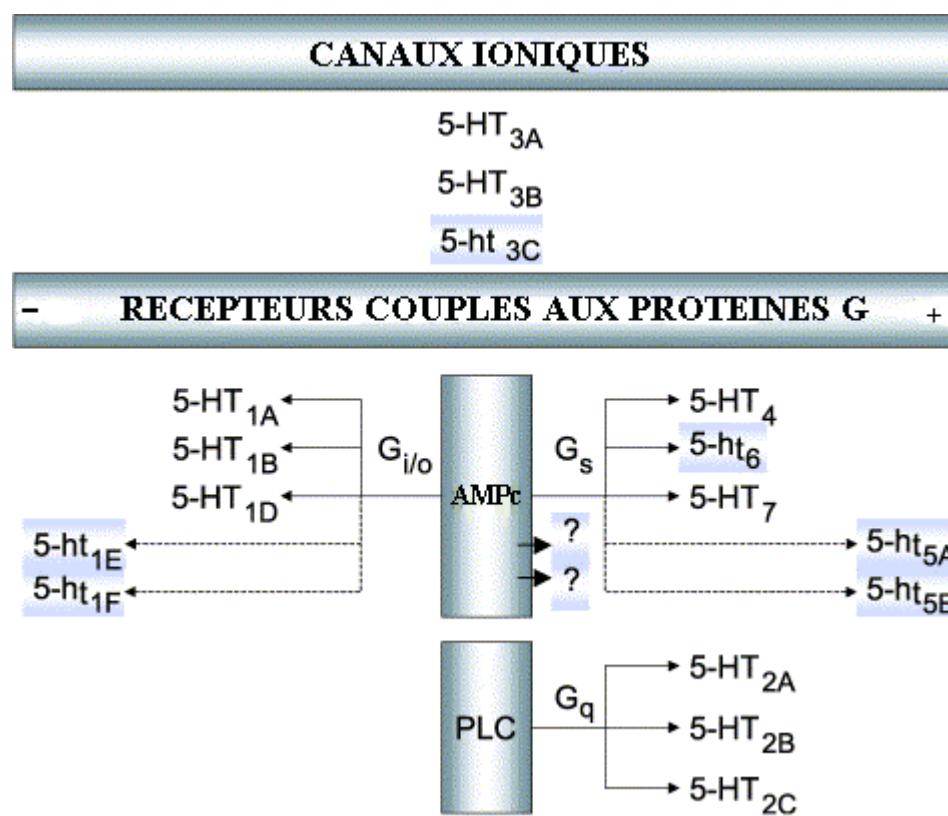


Figure 3: Classification actuelle des récepteurs 5-HT et principales voies de signalisation (d'après Hoyer *et coll.*, 2002).

La fonction des récepteurs représentés sur fond bleu n'a pas encore été clairement identifiée dans un système natif. -: couplage négatif, +: couplage positif.

La diversité des récepteurs métabotropiques est, de plus, augmentée par des modifications post-transcriptionnelles de certains gènes, comme l'épissage alternatif ou l'édition. Ainsi, l'ARN messager du récepteur 5-HT₄ peut subir de multiples combinaisons d'épissage, essentiellement dans la partie codant pour le domaine C-terminal. Chez l'homme, 10 variants fonctionnels du récepteur 5-HT₄ ont été décrits (pour revue, Bockaert *et coll.*, 2006). L'ARN messager du gène du récepteur 5-HT_{2C}, quant à lui, est édité au niveau de 5 sites situés dans l'exon 2 de la séquence codante. Les adénosines sont alors remplacées par des inosines, qui sont ensuite reconnues comme étant des guanines par la machinerie de traduction, changeant la nature des acides aminés incorporés dans la protéine. Chez l'homme, ce mécanisme d'édition de l'ARNm conduit à la formation de 23 transcrits différents qui codent 14 isoformes différentes du récepteur 5-HT_{2C} (Bockaert *et coll.*, 2006). Enfin, la variété des récepteurs sérotoninergiques est encore accrue par la capacité de certains d'entre eux à former des homo- (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2C}, 5-HT₄) ou des

hétéro-dimères (5-HT_{1B/1D}) (Xie *et coll.*, 1999; Salim *et coll.*, 2002; Herrick-Davis *et coll.*, 2004; Berthouze *et coll.*, 2005; Herrick-Davis *et coll.*, 2005).

1.4. Anatomie du système 5-HT central et périphérique.

1.4.1. Les noyaux 5-HT dans le système nerveux.

1.4.1.a. Le système nerveux central

La cartographie des voies sérotoninergiques a d'abord été établie chez le rat grâce à une technique d'histochimie de fluorescence (Dahlstrom et Fuxe, 1964) puis confirmée et affinée à l'aide d'autres approches: autoradiographie de la 5-HT tritiée administrée par voie cérébroventriculaire (Calas *et coll.*, 1974; Descarries *et coll.*, 1990), immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre la 5-HT elle-même (Steinbusch et Nieuwenhuys, 1983), ou contre d'autres marqueurs des neurones 5-HT comme le SERT ou la TPH. Les somas des neurones 5-HT sont presque exclusivement localisés dans les noyaux du raphé, situés dans le plan médio-sagittal du tronc cérébral (Figure 4).

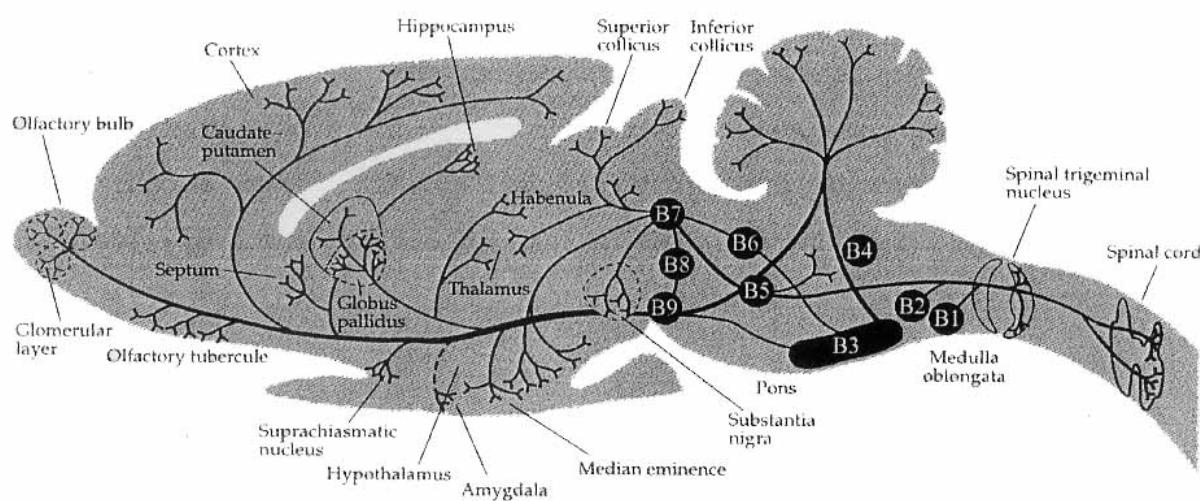


Figure 4: Efférences des noyaux sérotoninergiques du raphé (d'après Dahlstrom et Fuxe, 1964).

Selon Dahlstrom et Fuxe, les neurones sérotoninergiques du SNC sont regroupés en 9 noyaux, dénommés B1 à B9. Ces noyaux du raphé innervent toutes les régions du SNC, depuis le bulbe olfactif jusqu'à la moelle épinière sacrée.

Dahlstrom et Fuxe ont distingué neuf noyaux dénommés B1 à B9 suivant un ordre caudo-rostral, répartis en un groupe antérieur (noyaux B9 à B5) et un groupe postérieur (noyaux B4 à B1). Steinbusch et Nieuwenhuys ont, pour leur part, groupé les neurones 5-HT du raphé en 7 noyaux, dénommés selon l'ordre caudo-rostral: *nucleus raphe obscurus*,

nucleus raphe pallidus, nucleus raphe magnus, nucleus raphe pontis, nucleus raphe dorsalis, nucleus centralis superior et nucleus raphe oralis.

Les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé sont, comme l'on peut le remarquer dans la Figure 4, situés dans une zone anatomique restreinte. Le noyau du raphé dorsal (NRD, B7) contient la plus forte proportion de neurones sérotoninergiques de l'ensemble des noyaux du raphé (Tableau 1): chez la souris, le NRD contient entre 8 000 et 9 000 neurones 5-HT, représentant environ 40% du nombre total de neurones dans le NRD (Thevenot, 2003; Thevenot *et coll.*, 2003). Ils se distinguent cependant par l'importance de leurs projections qui innervent toutes les régions du SNC, depuis le bulbe olfactif jusqu'à la moelle épinière sacrée.

Espèce	Souche	Neurones	% neurones	% 5-HT du	Références
		5-HT du NRD	du NRD	SNC	
souris	BALBc	8 900			(Daszuta et Portalier, 1985)
	C57BL	7 700			(Daszuta et Portalier, 1985)
	Jcl-ICR	9 200		36	(Ishimura <i>et coll.</i> , 1988)
Rat		11 400	32	50	(Descarries <i>et coll.</i> , 1982)
		11 500		56	(Jacobs et Azmitia, 1992)
Chat		24 000	70	40	(Wiklund <i>et coll.</i> , 1981)
Homme		91 000	63	30	(Halliday <i>et coll.</i> , 1993)

Tableau 1: Nombre des neurones sérotoninergiques dans le noyau du raphé dorsal (d'après Thevenot, 2003)

Le nombre de neurones sérotoninergiques du raphé dorsal est rapporté au nombre total de neurones dans le NRD, et au nombre total de neurones 5-HT de l'ensemble du SNC.

Ces données suggèrent que la proportion de neurones non sérotoninergiques au sein du NRD est relativement importante et laisse supposer la présence de neurotransmetteurs autres que la 5-HT dans cette structure. En effet, des neurones noradrénergiques, GABAergiques, enképhalinergiques et CCKergiques y sont également présents. Enfin, certains neurones sérotoninergiques co-expiment d'autres neuromédiateurs, en particulier des neuropeptides (substance P, enképhalines, TRH, VIP, etc).

I.4.1.b. Le système nerveux entérique

Dès 1965, Michael D. Gershon démontrait le rôle de la sérotonine comme neurotransmetteur dans le système nerveux entérique (Gershon *et coll.*, 1965; Gershon et Ross, 1966a; b). Il montra, chez la souris, que la sérotonine tritiée synthétisée après l'administration de [³H]-5-HTP, s'accumulait uniquement dans les terminaisons nerveuses

entériques; et que cette 5-HT tritiée était libérée à partir des terminaisons nerveuses lorsque les neurones étaient stimulés. Quelques années plus tard, il démontra que les neurones entériques eux-mêmes synthétisent et stockent la sérotonine (Robinson et Gershon, 1971; Dreyfus et Bornstein, 1977; Costa *et coll.*, 1982; Furness et Costa, 1982). En outre, ces travaux permirent de révéler que les terminaisons nerveuses contenant de la 5-HT présentent le même mécanisme de recapture que celui utilisé par les neurones sérotoninergiques du SNC (Gershon et Altman, 1971; Robinson et Gershon, 1971; Gershon *et coll.*, 1976; Gershon et Jonakait, 1979).

Le système nerveux entérique est constitué de deux plexus: le plexus myentérique, également appelé plexus d'Auerbach, et le plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner (Figure 5). Les neurones 5-HT du système nerveux périphérique, exclusivement localisés dans le plexus myentérique, représentent une faible proportion des neurones myentériques, qui sont majoritairement cholinergiques (Pour revue, Gershon, 1999). A eux deux, les plexus myentérique et sous-muqueux renferment autant de neurones que la moelle épinière.

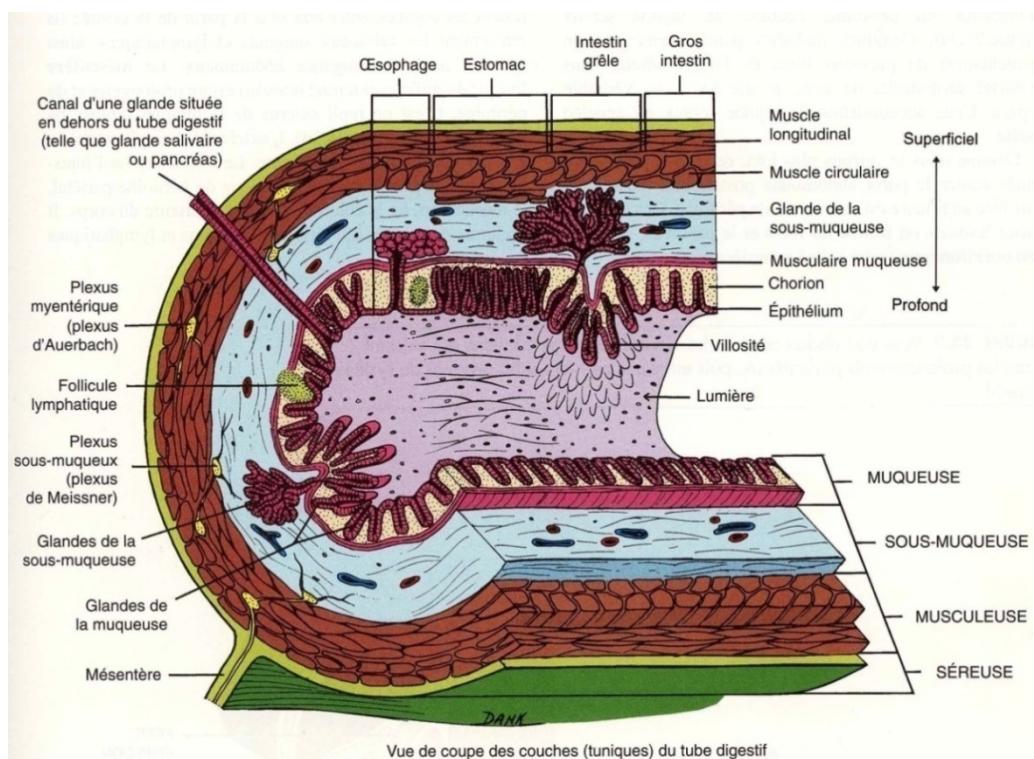


Figure 5: Localisation des plexus entériques (d'après Tortora et Grabowski, 1994).

Localisation des couches et structures annexes des différentes sections du tube digestif. Les plexus sous-muqueux et myentérique sont représentés en jaune.

Le rôle exact des neurones sérotoninergiques myentériques, ainsi que la topologie de leurs projections ne sont pas encore totalement connus, mais il semble que ces neurones

agissent comme des interneurones au sein du plexus myentérique, et envoient des projections dans le plexus sous-muqueux. L'on sait cependant que ces neurones n'innervent pas les cellules musculaires lisses de la paroi intestinale (pour revue, Gershon et Tack, 2007).

1.4.2. Les cellules chromaffines de l'intestin

90% de la sérotonine synthétisée dans tout l'organisme provient de la périphérie: 5% sont synthétisés dans les neurones sérotoninergiques myentériques, comme nous l'avons mentionné précédemment, et 95% sont synthétisés dans les cellules entérochromaffines.

Les cellules entérochromaffines (EC) doivent leur nom d'une part à leur localisation au sein de la muqueuse intestinale (Figure 5), et d'autre part à leur capacité à réduire plusieurs sels métalliques. Ce sont des cellules endocrines à granulations basales, qui contiennent également des polypeptides comme la substance P et les enképhalines. Toutes les cellules qui constituent l'épithélium intestinal sont en migration continue, du fait de leur renouvellement. Les nouvelles cellules sont générées à partir de la niche de cellules souches localisée au niveau de la crypte, et deviennent matures au fur et à mesure de leur migration vers l'apex des villosités intestinales, où elles meurent. Elles gagnent alors la lumière intestinale et sont évacuées (Figure 6).

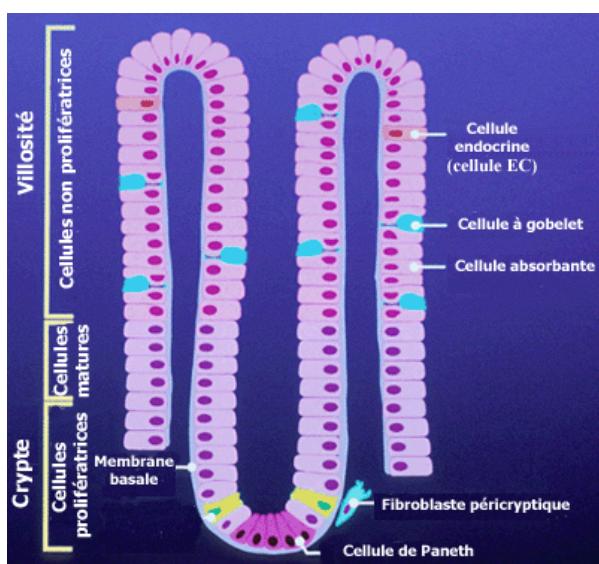


Figure 6: Localisation des cellules chromaffines intestinales.

La majorité des cellules de l'épithélium intestinal sont des cellules non endocrines, telles que les entérocytes, les cellules de Paneth et les cellules à gobelet. Les cellules entéro-endocrines, dont font partie les cellules entérochromaffines, ne représentent qu'1% environ des cellules de l'épithélium intestinal.

La migration des cellules entérochromaffines, de la crypte vers l'extrémité des villosités intestinales, les empêche d'établir des connexions avec les neurones des plexus intestinaux. L'hypersécrétion de sérotonine par les cellules EC pourrait représenter un mécanisme de compensation de l'absence de jonctions cellules EC-nerfs (Gershon et Tack, 2007).

1.4.3. Les cellules sérotoninergiques de la glande pinéale

La glande pinéale, également appelée épiphyse, est constituée de deux types de cellules: les cellules interstitielles d'origine gliale et les cellules parenchymateuses ou pinéalocytes. Les pinéalocytes synthétisent et sécrètent la mélatonine de façon circadienne, *i.e.* en fonction de l'alternance jour/nuit, à partir de la sérotonine (Figure 7). Ils ont une fonction neuroendocrine de transformation d'un signal électrique en signal hormonal. Une succession de relais neuronaux relie les photorécepteurs de la rétine aux neurones du noyau suprachiasmatique puis aux fibres sympathiques du ganglion cervical supérieur qui innervent la glande pinéale.

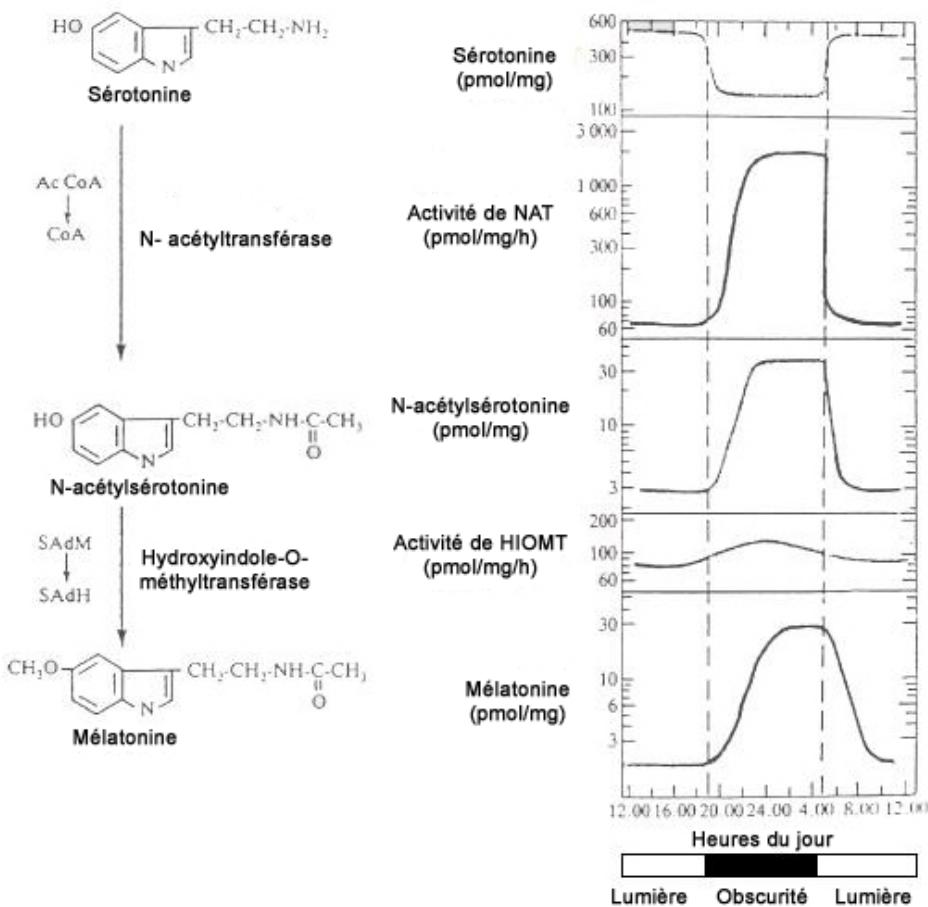


Figure 7: Variation circadienne de la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale (d'après Boularand, 1994).

La production circadienne de mélatonine s'accompagne de la variation d'autres composés (concentration des métabolites et activité des enzymes) impliqués dans la synthèse de la mélatonine.

Durant le jour, la lumière inactive la voie nerveuse qui conduit l'information de la rétine à la glande pinéale. Le taux de 5-HT est élevé et celui de mélatonine est faible. Pendant la phase nocturne, la noradrénaline active les récepteurs β_1 -adrénergiques des pinéalocytes; ce qui a pour conséquence 1) du taux intracellulaire d'AMP cyclique, 2) de l'activité de la N-acétyltransférase (NAT) de 70 à 100 fois et 3) de la

synthèse de la mélatonine. L'hormone est libérée de façon passive dans le sang puis passe dans un second temps dans le liquide céphalo-rachidien. La durée de vie de la molécule n'excède pas 40 minutes, de telle sorte que la quantité de mélatonine circulante est proportionnelle à la quantité produite dans la glande pinéale et varie dans le sang de façon circadienne. L'action cellulaire de la mélatonine s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, localisés principalement dans l'hypothalamus. Chez les mammifères, la glande pinéale est impliquée dans les phénomènes d'adaptation de l'organisme aux changements annuels de la photopériode qui influencent de façon importante le comportement et la fonction sexuelle.

1.5. Fonctions physiologiques de la sérotonine et pathologies associées

Dans ce chapitre, je décrirai brièvement les fonctions physiologiques connues de la sérotonine dans le système nerveux central et les intestins. Dans chaque partie, je présenterai également les pathologies connues qui résultent d'un dysfonctionnement sérotoninergique et qui ont des répercussions au niveau cardiovasculaire.

1.5.1. Dans le système nerveux central

1.5.1.a. Fonctions physiologiques

Dans le système nerveux central, les fonctions physiologiques de la sérotonine sont nombreuses et complexes. Cette pluralité s'explique non seulement par la très large innervation de l'ensemble du SNC par les projections sérotoninergiques (Figure 4), mais également par l'existence d'au moins 14 récepteurs distincts de ce neuromédiateur (Figure 3). La 5-HT est impliquée dans de nombreuses fonctions vitales comme le contrôle du cycle veille/sommeil (Jouvet, 1999), l'activité motrice (Jacobs et Fornal, 1999), le stress (Chaouloff, 2000), la neurogenèse (Banasr *et coll.*, 2004), la thermorégulation (Bruck et Hinckel, 1980), la prise alimentaire (Curzon, 1990), la nociception (Oliveras et Besson, 1992), les régulations endocrines (Cowen *et coll.*, 1990) et neurovégétatives telles que le contrôle du rythme cardiaque et de la pression artérielle (Ni et Watts, 2006), ainsi que le comportement sexuel (Ahlenius *et coll.*, 1980). La 5-HT joue également un rôle dans la cognition (Decker et McGaugh, 1991).

I.5.1.b. Physiopathologies

Outre son rôle avéré dans le contrôle de l'humeur (Staley *et coll.*, 1998), la sérotonine intervient dans les mécanismes de régulation neurobiologique qui sous-tendent les émotions. Le dysfonctionnement du système 5-HT est impliqué dans certains troubles anxieux (Handley, 1995). La 5-HT est également impliquée dans les troubles obsessionnels compulsifs (Charney *et coll.*, 1988), le comportement suicidaire (Mann, 1999), l'agressivité et l'impulsivité (Pucilowski et Kostowski, 1983) et l'alcoolisme (Sellers *et coll.*, 1992). Certains antipsychotiques, dont la clozapine efficace dans le traitement de la schizophrénie, sont de puissants antagonistes des récepteurs de la 5-HT (en particulier les récepteurs 5-HT_{2A}, _{2C}, ₆ et ₇), suggérant le rôle de l'indolamine dans cette maladie (Hery et Hamon, 1993; Meltzer, 1995).

La dépression et les dérèglements de la prise alimentaire sont également des troubles du SNC pour lesquels un dysfonctionnement du système sérotoninergique a été largement décrit. Dans le paragraphe suivant, je présenterai plus en détail la physiopathologie de ces désordres, ainsi que les traitements pharmacologiques utilisés. Dans les deux cas, les traitements, fondés sur l'utilisation de molécules agissant directement sur le transporteur de la sérotonine SERT, entraînent des effets secondaires importants et graves au niveau du système cardiaque.

Actions des substrats du transporteur de la sérotonine

Les drogues qui ciblent les transporteurs des monoamines (SERT pour la 5-HT, NET pour la noradrénaline et DAT pour la dopamine) peuvent être divisées en deux classes: les inhibiteurs de la recapture des neurotransmetteurs et les libérateurs de substrat (*substrate-type releasers*). Pour le système sérotoninergique, les deux classes de composés visent à augmenter la concentration extracellulaire de sérotonine dans la fente synaptique.

Les inhibiteurs de recapture de la sérotonine ou *SSRI* (*Serotonin Selective Reuptake Inhibitor*) les plus couramment prescrits sont la fluoxétine (Prozac[®]), la fluvoxamine (Floxyfral[®]), le citalopram (Seropram[®]), la paroxétine (Deroxat[®]) et la sertraline (Zoloft[®]). Les SSRI se lient au SERT, mais ne sont pas transportés à l'intérieur de la cellule. Ils augmentent la concentration extracellulaire de 5-HT en bloquant son site de liaison au SERT, et inhibent sa recapture depuis la fente synaptique vers la terminaison nerveuse présynaptique (Figure 8).

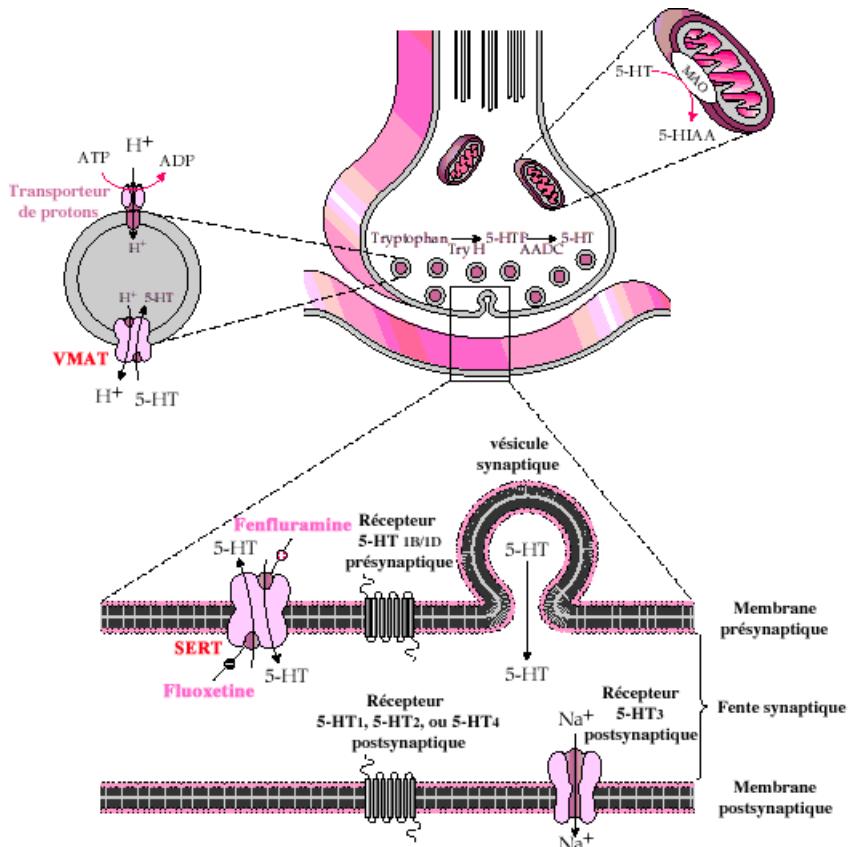


Figure 8: Représentation schématique d'une synapse sérotoninergique et de l'action de la fluoxétine et de la fenfluramine (www.chemistry.emory.edu).

Les endroits spécifiques d'action du SSRI fluoxétine et du libérateur de 5-HT fenfluramine sont indiqués en rose. Dans les deux cas, le blocage du transporteur SERT entraîne une augmentation de la concentration extracellulaire (*i.e.* dans la fente synaptique) de 5-HT.

Les libérateurs de sérotonine sont typiquement la fenfluramine (Fen)(Ponderal®) et la dexfenfluramine (Isomeride®). Ils se lient au SERT, mais à l'inverse des SSRI, ils sont transportés à l'intérieur du cytoplasme de la terminaison nerveuse. Le SERT internalise la fenfluramine dans le cytoplasme en échange de l'efflux de 5-HT dans l'espace extracellulaire (*i.e.* la synapse). De plus, la Fen est un substrat pour le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT, présent à la membrane des vésicules intracellulaires (Figure 9).

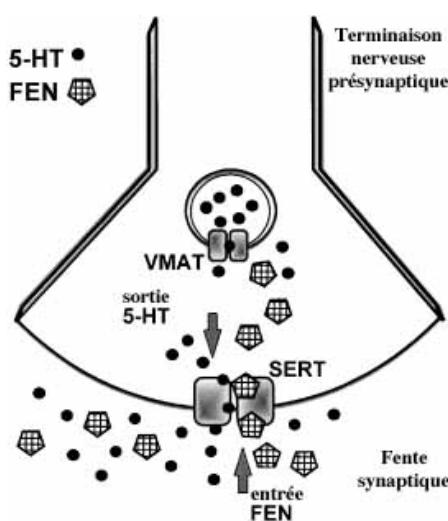


Figure 9: Mécanisme d'action de la Fenfluramine (Fen) (d'après Rothman et Baumann, 2002; Fitzpatrick, 2003).

SERT permet l'entrée de la Fen dans la terminaison nerveuse présynaptique et fait sortir parallèlement des molécules de 5-HT dans la fente synaptique. La Fen est également un substrat de VMAT. En empêchant la compartmentalisation de la 5-HT dans les vésicules synaptiques, la Fen augmente la concentration extracellulaire de 5-HT.

Les libérateurs de 5-HT augmentent donc la concentration extracellulaire du neurotransmetteur par deux mécanismes distincts: 1) ils augmentent l'efflux du neurotransmetteur par un processus d'échange médié par le transporteur, et 2) ils augmentent le niveau cytoplasmique du neurotransmetteur en empêchant le stockage du neurotransmetteur dans les vésicules synaptiques (pour revue, Rudnick et Clark, 1993). La Fen administrée par voie systémique est rapidement métabolisée en norfenfluramine. En outre de son action de libération de la sérotonine, la Fen et son métabolite sont des agonistes des récepteurs de la classe 5-HT₂ (Fitzgerald *et coll.*, 2000; Launay *et coll.*, 2002).

Sérotonine et dépression:

La théorie mono-aminergique de la dépression date du milieu des années 1960. Elle est fondée sur de nombreuses données cliniques qui suggèrent une diminution globale de l'homéostasie sérotoninergique et noradrénergique centrale chez les patients atteints de troubles dépressifs majeurs (Cowen et Wood, 1991).

Les effets thérapeutiques des différentes classes d'antidépresseurs couramment prescrits impliquent une composante sérotoninergique. Ainsi, les tricycliques (par exemple la clomipramine) agissent en inhibant à la fois la recapture de la 5-HT et celle de la noradrénaline. Les inhibiteurs des monoamines oxydases (IMAO) inhibent le catabolisme de la sérotonine en bloquant l'enzyme de dégradation MAO. Les IMAO commercialisés sont la toloxatone (Humoryl[®]) et la moclobémide (Moclamine[®]). Les SSRI, dont nous venons de décrire l'action, sont finalement les antidépresseurs les plus prescrits, en raison de leur bonne efficacité et d'effets secondaires moins gênants que ceux induits par les tricycliques et les IMAO.

Les antidépresseurs entraînent une augmentation de la concentration extracellulaire de sérotonine dans des régions spécifiques du SNC, à l'origine de leurs effets thérapeutiques. Leur action ne se limite malheureusement pas aux seules zones d'intérêt du SNC, mais s'étend à l'ensemble du système nerveux et à tout l'organisme, causant des effets indésirables plus ou moins importants (Pour revue, Carrasco et Sandner, 2005). Les tricycliques augmentent la fréquence cardiaque et diminuent la conduction électrique cardiaque. Ils ont, de plus, un effet hypertenseur important. Ils sont, de ce fait, à utiliser avec précautions chez les patients dépressifs souffrant de problèmes cardiovasculaires. Les SSRI, quant à eux, sont responsables de problèmes gastro-intestinaux (nausées, diarrhées) et neurologiques (céphalées, tremblements) (pour revue, Serebruany, 2006) dans de rares cas. Des cas plus nombreux de saignements ou d'hémorragies, causés par l'action antiplaquettaire des SSRI, ont également été décrits. Ces effets résultent directement du mécanisme d'action des SSRI au niveau du SERT exprimé par les plaquettes sanguines.

Les effets anti-plaquettaires des SSRI sont multiples, et maintenant bien connus: ils regroupent la diminution de l'affinité de liaison des plaquettes, le blocage de la mobilisation du calcium intra-plaquettaire, la réduction de la sécrétion plaquettaire en réponse au collagène comme le facteur plaquettaire 4, les modifications de l'agrégation plaquettaire, l'augmentation du temps de coagulation, etc. L'utilisation des SSRI dans le traitement de la dépression de patients souffrant de problèmes cardiaques pourrait néanmoins réduire le risque de thrombose et avoir des effets cardiaques bénéfiques.

Sérotonine et troubles alimentaires

L'utilisation de la fenfluramine et de la dexfenfluramine comme molécules "anorexigènes" entraîne des effets secondaires très graves, ayant conduit à la mort de certains individus dans de rares cas. En Suisse, à la fin des années 1960, la mise sur le marché d'un de ces médicaments (l'Aminorex®, non commercialisé en France) a été suivie de l'apparition rapide de cas d'hypertension artérielle pulmonaire primitive (HTAP). Cette pathologie est habituellement rare (environ 1 à 2 nouveaux cas/an/million d'habitants). Une étude épidémiologique menée en 1996 aux Etats-Unis a démontré que la prise de ces anorexigènes pendant plus de 3 mois consécutifs augmentait le risque de développer une HTAP de plus de 23 fois (Abenham *et coll.*, 1996). Les causes possibles du développement de l'HTAP en association avec un dérèglement du système sérotoninergique seront discutés plus en détail dans le chapitre introductif consacré aux pathologies vasculaires liées à la sérotonine (§II.2.1.b, page 57).

Le traitement de l'obésité par ces molécules entraîne également des pathologies cardiaques, principalement au niveau des valves. Ainsi, en 1997, l'équipe de Connolly a rapporté l'existence de maladies valvulaires cardiaques chez 24 patients traités avec la fenfluramine ou la phentermine (Connolly *et coll.*, 1997). L'année suivante, l'association entre l'utilisation de ces agents pharmacologiques et l'apparition de régurgitation valvulaire fut confirmée par plusieurs équipes indépendantes (Devereux, 1998; Jick *et coll.*, 1998; Weissman *et coll.*, 1998). Depuis 1997, ces médicaments "coupe-faim" ont été retirés du marché (§II.2.2.d, page 67).

1.5.2. Dans les intestins

1.5.2.a. Fonctions physiologiques

Le bol alimentaire qui arrive dans la lumière intestinale exerce une pression sur la muqueuse qui entraîne la sécrétion de la sérotonine par les cellules entérochromaffines. La 5-HT entre dans la lamina propria, où ses premières cibles sont les projections nerveuses

des neurones primaires afférents (Figure 10). Ils sont de deux types: les neurones extrinsèques, activés par les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₃, qui transmettent les sensations de nausées et d'inconfort intestinal au SNC, et les neurones intrinsèques, activés par les récepteurs 5-HT_{1P} et 5-HT₄. Les neurones intrinsèques cholinergiques localisés dans la sous-muqueuse initient les réflexes péristaltique et de sécrétion, tandis que les neurones intrinsèques myentériques, dont font partie les neurones sérotoninergiques, initient les contractions musculaires.

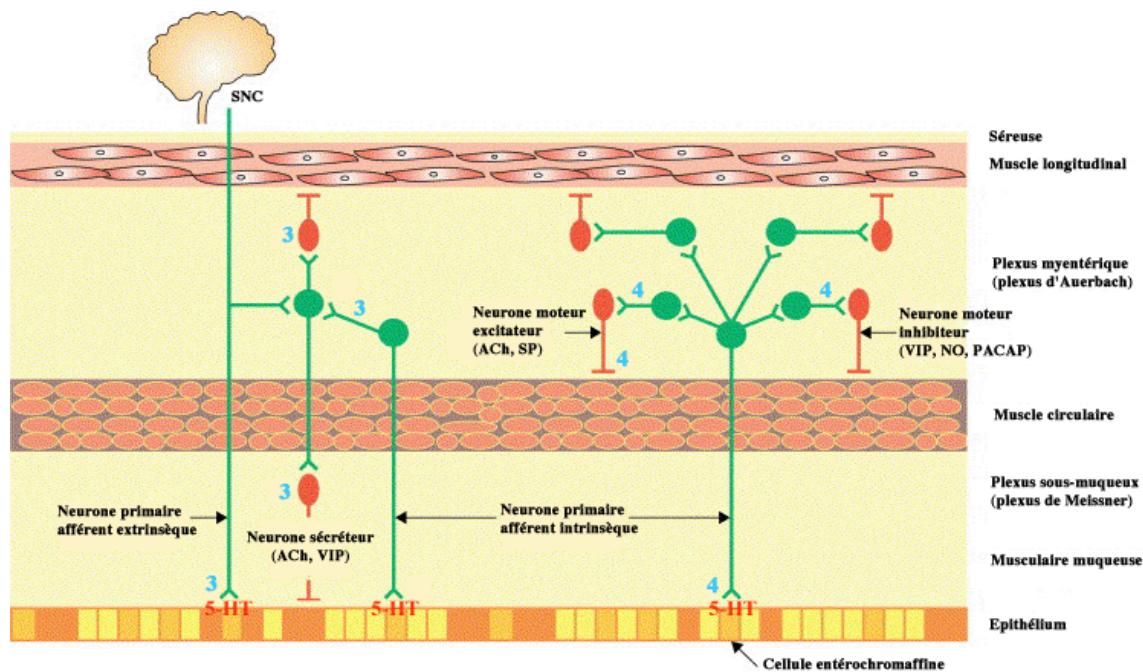


Figure 10: Modèle d'action de la sérotonine dans l'intestin (d'après Talley, 2001).
 3: récepteur 5-HT₃; 4: récepteur 5-HT₄; ACh: acétylcholine; VIP, vasoactive intestinal peptide, SP: substance P; NO: nitric oxide; PACAP: pituitary adenylate cyclase activating polypeptide.

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

Les entérocytes, qui ne sont ni des neurones, ni des cellules sérotoninergiques (ils ne synthétisent pas la 5-HT) expriment le transporteur de la sérotonine SERT. Ils "terminent" l'action de la 5-HT puisqu'ils permettent sa capture et donc son élimination de l'espace interstitiel (pour revue, Crowell, 2004).

I.5.2.b. Physiopathologies

Le syndrome du colon irritable (IBS: Irritable Bowel Syndrome)

Le rôle joué par la sérotonine dans la physiologie normale des intestins laisse penser que des perturbations, même mineures, du système sérotoninergique pourraient avoir des répercussions importantes sur la motilité et les sécrétions intestinales. Le syndrome du colon irritable est le désordre gastro-intestinal le plus courant puisqu'il touche 15 à 20% de la population générale aux Etats-Unis. Ce désordre se manifeste par une douleur abdominale chronique, provoquée par des épisodes de diarrhées suivies de périodes de constipation. La physiopathologie exacte de l'IBS reste, à ce jour, inconnue. Elle ferait intervenir une dérégulation de la communication entre le système nerveux myentérique et le SNC ("brain-gut axis"), modulée par des facteurs environnementaux et psychosociaux. Un dérèglement du système sérotoninergique, soit au niveau du taux de sérotonine, ou encore au niveau de l'expression des principaux récepteurs sérotoninergiques intestinaux (5-HT₃, 5-HT₄) ou du SERT pourrait être impliqué dans l'IBS. Récemment, Coates et coll. ont confirmé le rôle clef du système sérotoninergique dans la physiopathologie de ce syndrome puisqu'ils ont montré une diminution de la quantité des transcrits *Tph1*, associée à une diminution de la synthèse de sérotonine chez des patients souffrant d'IBS (Coates *et coll.*, 2004).

Les tumeurs carcinoïdes

Les tumeurs carcinoïdes résultent de la prolifération lente de cellules neuroendocrines (pour revues, Kulke et Mayer, 1999; Fox et Khattar, 2004). Approximativement 90% des tumeurs carcinoïdes sont localisées dans le système gastro-intestinal, dans lequel les sites d'apparition des tumeurs les plus fréquents sont l'appendice et la partie terminale de l'iléon. Les sites moins fréquents de développement de ces tumeurs incluent les poumons, l'estomac ou encore les gonades. Les tumeurs carcinoïdes les plus malignes dérivent de l'iléon. Elles sont invasives et le développement de métastases provoque le syndrome carcinoïde, caractérisé par des troubles digestifs (diarrhées), ainsi que des "flush" faciaux. L'incidence des tumeurs carcinoïdes est approximativement de 1 à 2 cas pour 100 000 individus dans la population générale. 50% des patients atteints développent une maladie carcinoïde du cœur ("carcinoïd heart disease"), qui cause des lésions au niveau du cœur droit.

Les manifestations cardiaques des tumeurs sont causées par la libération de sérotonine et d'autres substances vasoactives (histamine, tachykinines, prostaglandines) par les cellules tumorales. La sérotonine, normalement synthétisée par les cellules endocrines

intestinales, est dégradée dans le foie ou les poumons. La présence de métastases hépatiques entraîne une sécrétion de ces facteurs directement dans la veine hépatique. Une quantité accrue de sérotonine arrive alors au niveau du cœur droit. Les lésions cardiaques qui en résultent se traduisent par la formation de plaques de tissu fibreux qui dérivent principalement des valves (tricuspidé, pulmonaire), entraînant une sténose valvulaire, une régurgitation ou les deux à la fois. Chez les patients souffrant de tumeurs carcinoïdes, un taux élevé de 5-HT dans la circulation systémique ainsi qu'une excréption urinaire accrue de 5-HIAA sont mesurés.

Plusieurs arguments sont en faveur de l'implication directe du taux de sérotonine dans cette pathologie. Une étude récente, menée chez le rat, a montré que l'administration répétée de sérotonine exogène pendant 3 mois, entraînait le développement d'une pathologie cardiaque similaire à celle rencontrée chez les patients souffrant de la maladie carcinoïde cardiaque (Gustafsson *et coll.*, 2005). D'autre part, un modèle animal de tumeurs carcinoïdes, développé chez la souris, a également montré les mêmes pathologies du cœur droit et des valves (Musunuru *et coll.*, 2005). Enfin, comme nous venons de l'expliquer dans le paragraphe précédent, l'utilisation des agents anorexigènes fenfluramine et dextrofenfluramine, qui interfèrent avec le métabolisme de la sérotonine, a été associée à l'apparition de lésions valvulaires cardiaques identiques à celles développées dans la maladie du cœur carcinoïde.

II. L'enzyme tryptophane hydroxylase

II.1. La famille des hydroxylases des acides aminés aromatiques

La tryptophane hydroxylase constitue, avec la tyrosine hydroxylase (TH) et la phénylalanine hydroxylase (PAH), la famille restreinte des mono-oxygénases des acides aminés aromatiques. Ces trois enzymes utilisent les tétrahydrobioptérines (BH₄) comme donneurs d'électrons pour réduire l'O₂ en H₂O afin d'hydroxyler leurs substrats préférentiels (Figure 11) (pour revue, Fitzpatrick, 1999; 2003). La PAH est une enzyme hépatique qui catalyse la transformation de la phénylalanine en tyrosine. La TH, quant à elle, est exprimée essentiellement dans le système nerveux central et dans la glande surrénale où elle catalyse l'étape limitante de la biosynthèse des catécholamines, c'est-à-dire la transformation de la tyrosine en L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine).

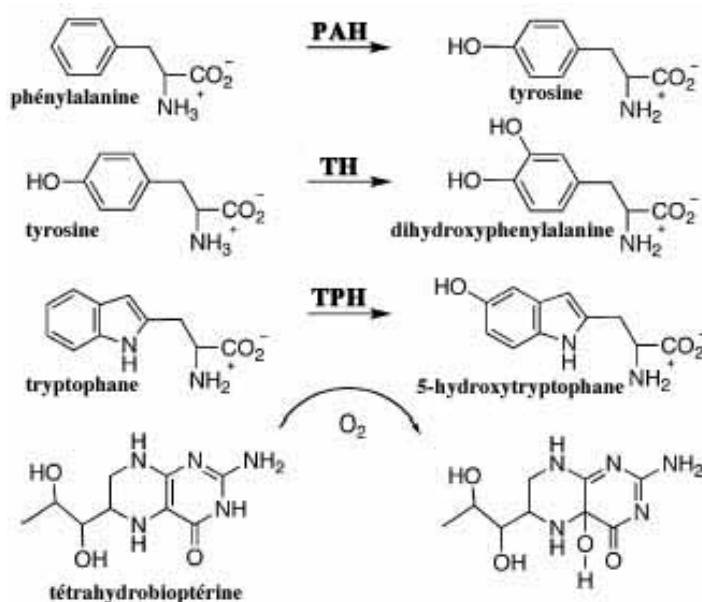


Figure 11: Hydroxylation des acides aminés aromatiques par les hydroxylases des acides aminés aromatiques (d'après Fitzpatrick, 2003).

L'hydroxylation des acides aminés aromatiques est réalisée par les HAAA, en présence de tétrahydrobioptérine (BH₄) et d'oxygène.

Chez les eucaryotes, la structure primaire des trois enzymes est composée d'un domaine catalytique homologue, auquel sont attachés le domaine de régulation N-terminal et le domaine C-terminal de tétramérisation (Figure 12). Ces domaines N- et C-terminaux sont absents des enzymes bactériennes. L'homologie de séquence en acides aminés entre les trois enzymes humaines atteint 60% au niveau de la région catalytique, tandis que le domaine N-terminal de régulation, plus différent, représente le domaine de spécificité de chaque enzyme. Chaque enzyme contient un ion ferreux unique lié à deux histidines et un glutamate. La phosphorylation réversible de résidus sérine dans les domaines de régulation modifie, à court terme, l'activité des trois enzymes.

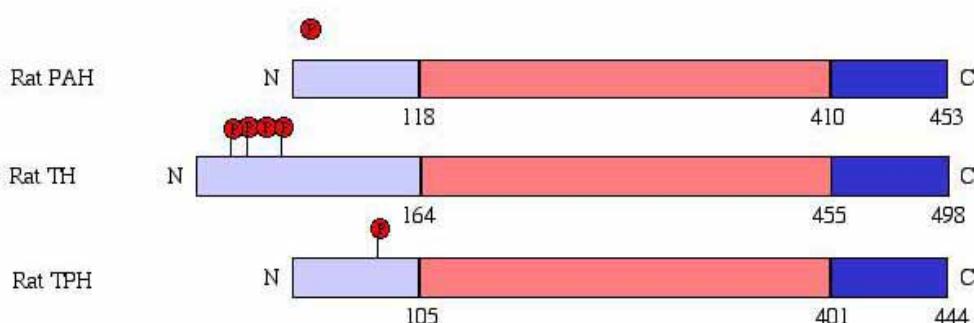


Figure 12: Structure des hydroxylases dépendantes de la tétrahydrobioptérine: comparaison des domaines protéiques (d'après Akashi *et coll.*, 2000; Fitzpatrick, 2003; Thevenot, 2003).

Les domaines fonctionnels, identifiés grâce à l'utilisation de protéines tronquées, sont représentés comme suit: les domaines de régulation en violet, les domaines catalytiques en orange et les domaines de tétramérisation en bleu. Les sites de phosphorylation dans les domaines de régulation sont représentés en ronds rouges.

Les structures secondaires et tertiaires des enzymes (Figure 13) sont également très proches, conférant à chacune des trois enzymes, la capacité d'hydroxyler les trois acides aminés aromatiques tryptophane, phénylalanine et tyrosine. Leurs affinités pour les substrats sont cependant très différentes.

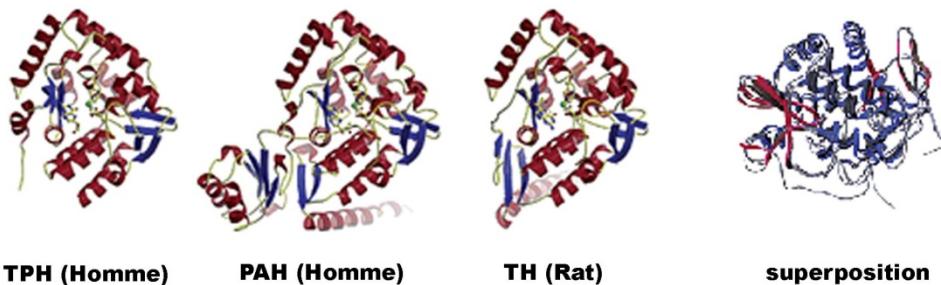


Figure 13: Comparaison des structures tertiaires des hydroxylases des acides aminés aromatiques (d'après Wang *et coll.*, 2002; Fitzpatrick, 2003).

Les hélices α des domaines catalytiques sont représentées en rouge, les feuillets β en bleu et le site actif contenant le fer est représenté en vert. La superposition des 3 structures montre la très forte homologie entre les trois enzymes.

II.2. Isolement et caractérisation des gènes *Tph*

II.2.1. Isolement et caractérisation du premier gène *Tph*

Le premier ADNc partiel codant la TPH a été isolé au laboratoire en 1986 à partir d'une banque d'ADNc de glande pinéale de rat, sur la base de trois critères: 1) Le criblage différentiel des clones ADNc de glande pinéale avec des sondes ADNc synthétisées à partir d'ARN messager de glande pinéale (tissu exprimant la TPH) et de foie (tissu n'exprimant pas la TPH) avait permis d'isoler un clone spécifiquement exprimé dans la glande pinéale. 2) Ce clone était reconnu par un anticorps polyclonal dirigé contre la TPH, purifié à partir de cerveau de rat. 3) La séquence protéique du clone positif était homologue aux séquences protéiques de la TH et de la PAH (Darmon *et coll.*, 1986). La glande pinéale avait, à l'époque, été le tissu de choix car, malgré sa petite taille, sa dissection reste plus aisée et efficace que la dissection des noyaux du raphé.

Par la suite, un ADNc complet a été isolé chez le lapin (Grenett *et coll.*, 1987) puis deux chez le rat. La même phase ouverte de lecture pour ces trois ADNc est traduite en une protéine de 444 acides aminés (Darmon *et coll.*, 1988).

II.2.2. Hypothèse de l'existence d'un deuxième gène *Tph*

L'étude de la distribution de l'ARNm *Tph* par la technique de Northern blot ne révéla aucun signal dans le tronc cérébral (Darmon *et coll.*, 1986). Une étude quantitative par

hybridation *in situ* révéla que l'ARNm *Tph* était bien présent dans les noyaux du raphé, mais dans une proportion 150 fois plus faible que dans la glande pinéale, alors que la protéine TPH était détectée par immunohistochimie et western blot en quantité 3 fois plus importante dans le raphé comparé à la glande pinéale (Figure 14) (Dumas *et coll.*, 1989).

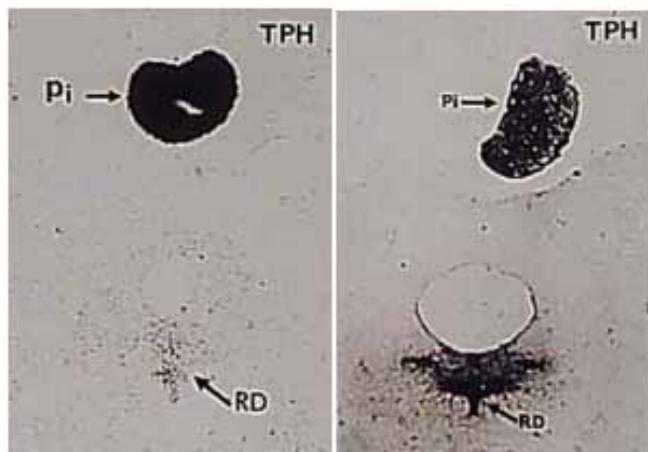


Figure 14: Distribution de l'ARNm *Tph* et de la protéine TPH (d'après Dumas *et coll.*, 1989).

Gauche: Hybridation d'une coupe frontale du tronc cérébral de rat avec une sonde correspondant à la région codante du gène *Tph* de rat. Droite: Immunodétection de la protéine TPH sur une coupe frontale adjacente. Grossissement x15. Pi: glande pinéale RD: noyau du raphé dorsal.

Deux hypothèses furent alors proposées pour expliquer ces différences d'expression: soit l'expression du gène *Tph* était régulée différemment selon les deux structures, soit il existait un deuxième gène *Tph* exprimé dans le raphé (Dumas *et coll.*, 1989). L'hypothèse de l'existence des deux isoformes TPH différentes dans la glande pinéale et le cerveau avait été avancée auparavant, sur la base d'arguments biochimiques et pharmacologiques: La demi-vie de la protéine est de 75 minutes dans la glande pinéale (Sitaram et Lees, 1978) alors qu'elle est de 2-3 jours dans le tronc cérébral (Meek et Neff, 1972). Par ailleurs, l'action de la PCPA sur la TPH est différente selon les deux structures. Chez le rat, l'injection *in vivo* de PCPA inactive de façon irréversible la TPH dans le tronc cérébral et se comporte *in vitro* comme un inhibiteur compétitif (Koe et Weissman, 1966), tandis que dans la glande pinéale, ce composé est uniquement un inhibiteur compétitif de l'activité enzymatique (Deguchi *et coll.*, 1973; Ichiyama *et coll.*, 1976). Le point isoélectrique de la TPH isolée du tronc cérébral (raphé) diffère de celui de la TPH de la glande pinéale (Kim *et coll.*, 1991). Kim et coll. ont cependant amplifié par PCR différents ADNc TPH à partir d'ARN de glande pinéale et de tronc cérébral et montré une taille et une séquence nucléotidique identiques pour tous les fragments d'ADNc (Kim *et coll.*, 1991). La plupart des auteurs ont alors considéré que les différences biochimiques et pharmacologiques observées entre l'enzyme TPH de tronc cérébral et de glande pinéale résultaient de modifications post-traductionnelles (Kim *et coll.*, 1991; Haycock *et coll.*, 2002), d'autant que le séquençage complet du génome du nématode *Caenorhabditis elegans* indiquait l'existence d'un gène *Tph* unique dans cette espèce (Sze *et coll.*, 2000).

II.2.3. Découverte du deuxième gène *Tph*

L'inactivation constitutive du gène *Tph* chez la souris, réalisée au laboratoire, a révélé un site de synthèse de sérotonine non aboli dans le SNC chez ces animaux. Par recherche d'homologie de séquence protéique à la TPH dans la nouvelle banque de séquences génomiques de souris, disponible depuis novembre 2002, nous avons mis en évidence l'existence d'un deuxième gène *Tph*, le gène *Tph2*. Ces travaux, auxquels j'ai participé, seront présentés en détail dans la première partie du chapitre consacré aux résultats. A la même période, en générant également une lignée de souris invalidée pour le gène *Tph*, un autre groupe a également fait cette découverte (Walther *et coll.*, 2003a).

Comme nous le verrons dans le chapitre des résultats, le gène *Tph* invalidé dans la lignée de souris générée au laboratoire est le gène exprimé dans la glande pinéale et dans les cellules entérochromaffines. Il a été nommé *Tph1* car il correspond au premier gène isolé au laboratoire en 1986 (Darmon *et coll.*, 1986). Le gène *Tph2*, exprimé dans les noyaux du raphé et les neurones myentériques, n'est pas invalidé dans la lignée de souris.

Depuis l'annonce de l'existence de deux gènes *Tph*, de nombreux travaux ont été effectués afin de caractériser les lieux et temps d'expression des deux gènes *Tph*, ainsi que les propriétés biochimiques et pharmacologiques des deux protéines TPH.

II.3. Comparaison des deux gènes *Tph* et des protéines correspondantes

II.3.1. Comparaison des deux gènes *Tph*

Les deux gènes *Tph1* et *Tph2* sont situés sur des chromosomes différents. Chez la souris, le gène *Tph1* (N° d'accès GenBank: P17532) est localisé sur le chromosome 7, tout comme le gène de la TH, alors que le gène *Tph2* (N° d'accès GenBank: AY090565) est situé sur le chromosome 10, non loin du locus de la PAH. Les deux gènes sont constitués de 11 exons. Pour le gène *Tph2*, la traduction commence dès le premier exon puisque son site d'initiation de la traduction se situe dans l'exon 1. Pour le gène *Tph1*, la traduction du messager commence au niveau du deuxième exon, où est localisé l'ATG. Les deux gènes s'étendent sur 20,16 kb pour *Tph1* et sur 103,67 kb pour *Tph2*, la taille des introns étant beaucoup plus importante pour *Tph2* (Figure 15). Il est cependant intéressant de noter que les jonctions exon/intron se font au niveau des mêmes séquences nucléotidiques pour les deux gènes (données provenant du site Ensembl Genome Browser, www.ensembl.org).

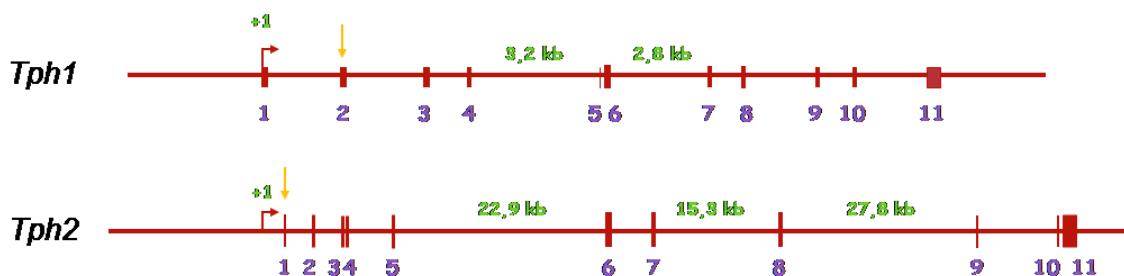


Figure 15: Comparaison des structures des gènes *Tph1* et *Tph2*.

Les exons sont numérotés en bleu. La taille des introns est indiquée en vert. Les flèches jaunes représentent les sites d'initiation de la traduction.

Le produit de transcription du gène *Tph2* nouvellement identifié, est hautement conservé (Figure 16). Les différences majeures inter-espèces se situent essentiellement dans les régions non traduites et dans les régions régulatrices (exons 1 et 2).

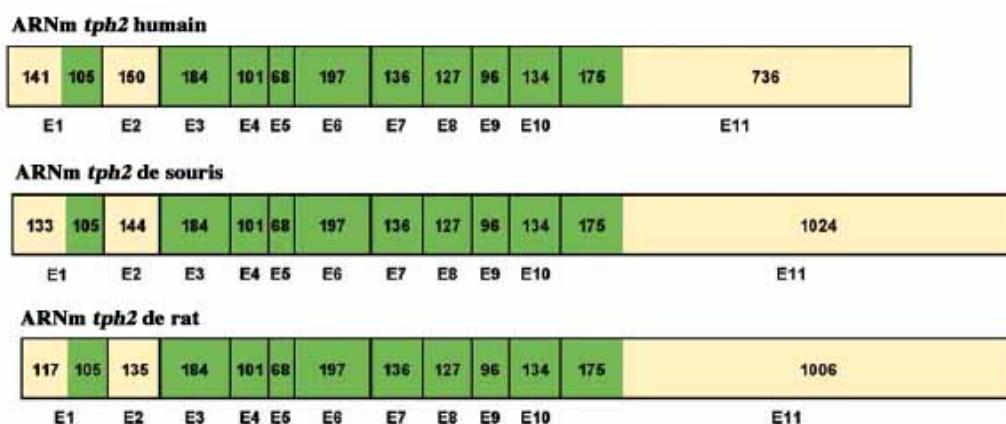


Figure 16: Comparaison des produits de transcription des gènes *Tph2* murin et humain (d'après Walther *et coll.*, 2003a).

Les chiffres indiquent la taille de chacun des exons. Entre les trois espèces, les différences majeures des ARNm *Tph2* se situent au niveau des régions non traduites et de l'exon 2 (représentées en jaune).

II.3.2. Comparaison des deux protéines TPH

Chez la souris, les gènes *Tph1* et *Tph2* codent respectivement des protéines de 447 et 488 résidus d'acides aminés. Les séquences peptidiques présentent une identité globale de 65% qui atteint 83% au niveau du domaine catalytique. Chez l'homme et le rat, l'identité entre la TPH1 et la TPH2 est respectivement de 72% et 70% (Walther *et coll.*, 2003a). Chez les trois espèces qui nous intéressent (homme, rat, souris), les divergences entre les deux enzymes se situent essentiellement dans la région N-terminale (Figure 17) et au niveau de la région 3' non traduite.

hsTPH2	MQPAMMMF5 SKYWARRGFSLDSAVPFEHQLLGSSTLNKPHSGKMDDKNGKGSKREAAATEGK2AVVFSLKHEVGGLVKALJLFQEKRVNQVHIESRKSR	100
musTPH2	MQPAMMMF5 SKYWARRGFSLDSAVPFEHQLLGSLTQNKAIKSE--DKESGKEPGKGDTESSKTAVVPSLKHEVGGLVKALJLFQEKRVNQVHIESRKSR	98
ratTPH2	MQPAMMMF5 SKYWARRGFSLDSAVPFEHQILQGLTQNKAT---AKESEDKRSGKDTSESSKTAVVPSLKHEVGGLVKALJLFQEKRVNQVHIESRKSR	95
hsTPH1	-----MIEDNKE--NKHDSSEGRATLIFSLKHEVGGLIKALKIFQEKRVNQVHIESRKSR	54
musTPH1	-----MIEDNKEKENKDKSSSERGRVTLIFSLKHEVGGLIKALKIFQEKRVNQVHIESRKSR	57
ratTPH1	-----MIEDNKE--NKHDSSEGRVTLIFSLKHEVGGLIKALKIFQEKRVNQVHIESRKSR	54
hsTPH2	RRSEVEIFVDCCGKTEPHELIQKLEPQTTIVTLNPENINTEEEELDVPWNPFRK15ELDKCSKRVLMYGSLEDAHNP3FEDNVYHQRRKTYFVDVANG	200
musTPH2	RRSEVEIFVDCCGKTEPHELIQKLEPQTTIVTLNPESINWTEELDVPWNPFRK15ELDKCSKRVLMYGTLEDAHNP3FEDNVYHQRRKTYFVDVANG	198
ratTPH2	RRSEVEIFVDCCGKTEPHELIQKLEPQTTIVTLNPEDINWTEEEELDVPWNPFRK15ELDKCSKRVLMYGTLEDAHNP3FEDNVYHQRRKTYFVDVANG	195
hsTPH1	RRSEVEIFVDCDTRNREGQIENDIFMLKSKRNLVLSVTPFQDFTMKEGHEGVWNPFRK15ELDKCSKRVLMYGSLEDAHNP3FEDNVYHQRRKTYFAD5AHS	154
musTPH1	QRSEVEIFVDCDISREQLNDIFPLLESHATVLSVTPFQDFTMKEGHEGVWNPFRK15ELDKCSKRVLMYGSLEDAHNP3FEDNVYHQRRKTYFAD5AHS	157
ratTPH1	RRSEVEIFVDCDISREQLNDIFPLLESHATVLSVTPFQDFTMKEGHEGVWNPFRK15ELDKCSKRVLMYGSLEDAHNP3FEDNVYHQRRKTYFAD5AHS	154
hsTPH2	YKYGQFIPRVEYTERIKTWTGVVTFRELSKLYPTAACREYKLQHPLLTCKYCGYREDHVPQLEDVSMPLKERSGFTVRFVAGYLSPDFLAGLAYRVFVHCTQ	300
musTPH2	YKYGQFIPRVEYTERIKTWTGVVTFRELSKLYPTAACREYKLQHPLLTCKYCGYREDHVPQLEDVSMPLKERSGFTVRFVAGYLSPDFLAGLAYRVFVHCTQ	298
ratTPH2	YKYGQFIPRVEYTERIKTWTGVVTFRELSKLYPTAACREYKLQHPLLTCKYCGYREDHVPQLEDVSMPLKERSGFTVRFVAGYLSPDFLAGLAYRVFVHCTQ	295
hsTPH1	YKYGDFIPRVEYTERIKTWTGVVTFRELNLKLYPTAACREYKLQHPLLTCKYCGYREDHVPQLEDVSNFLKERTGFSIRFVAGYLSPDFPLSGLAYRVFVHCTQ	256
musTPH1	YKYGDFIPKIEPTTERIKTWTGTVTFRELNLKLYPTAACREYKLQHPLLTCKYCGYREDHVPQLEDVSNFLKERTGFSIRFVAGYLSPDFPLSGLAYRVFVHCTQ	254
ratTPH1	YKYGDFIPKIEPTTERIKTWTGTVTFRELNLKLYPTAACREYKLQHPLLTCKYCGYREDHVPQLEDVSNFLKERTGFSIRFVAGYLSPDFPLSGLAYRVFVHCTQ	257
hsTPH2	YVRNGSDPLTPEPDTCHELLGNVPLLAQSFQSEIGLGLASLGASD6VQKLATCIFTFIEFGGLCKQESQQLRAYGAGLLESIGELIHALSDQACVNSP	400
musTPH2	YVRNGSDPLTPEPDTCHELLGNVPLLAQSFQSEIGLGLASLGASD6VQKLATCIFTFIEFGGLCKQESQQLRAYGAGLLESIGELIHALSDQACVNSP	398
ratTPH2	YVRNGSDPLTPEPDTCHELLGNVPLLAQSFQSEIGLGLASLGASD6VQKLATCIFTFIEFGGLCKQESQQLRAYGAGLLESIGELIHALSDQACVNSP	395
hsTPH1	YVRNSSDPLTPEPDTCHELLGNVPLLAQSFQSEIGLGLASLGASEAVQKLATCIFTFIEFGGLCKQDQDQLRVTGAGLLESISELIOVLSGHAKVNSP	354
musTPH1	YVRNSSDPLTPEPDTCHELLGNVPLLAQSFQSEIGLGLASLGASEAVQKLATCIFTFIEFGGLCKQDQDQLRVTGAGLLESISELIOVLSGHAKVNSP	357
ratTPH1	YVRNSSDPLTPEPDTCHELLGNVPLLAQSFQSEIGLGLASLGASEAVQKLATCIFTFIEFGGLCKQDQDQLRVTGAGLLESISELIOVLSGHAKVNSP	354

Figure 17: Comparaison des séquences protéiques TPH2 et TPH1 chez l'homme, le rat et la souris (d'après Walther et Bader, 2003).

L'alignement des séquences protéiques TPH2 et TPH1 chez ces trois espèces montre la très forte homologie, à la fois entre les deux enzymes et entre les espèces. L'identité protéique (en vert) entre les deux enzymes est de 72% chez l'homme, 68% chez la souris et 70% chez le rat. Le domaine catalytique correspond à la région de plus forte homologie (acides aminés 150 à 450 chez l'homme).

La forte identité de séquence protéique entre les deux TPH et les autres hydroxylases d'acides aminés aromatiques (TH et PAH) dans la région centrale renforce l'hypothèse de l'évolution de ces hydroxylases à partir d'un gène ancestral commun (Craig *et coll.*, 1986).

Depuis la découverte des deux gènes *Tph*, des études comparatives ont été menées sur les propriétés biochimiques des deux enzymes, chez l'homme (McKinney *et coll.*, 2005) et chez la souris (Nakamura *et coll.*, 2006), mettant en évidence des différences importantes dans la régulation de leur activité enzymatique. Ainsi, pour la réaction d'hydroxylation, les deux enzymes utilisent le L-trp comme substrat préférentiel, avec la tétrahydrobioptérine (BH₄) comme cofacteur. L'affinité des enzymes pour ces deux composants n'est cependant pas la même. Chez l'homme, l'affinité de la TPH1 pour le BH₄ est environ 2 fois moins importante que celle de la TPH2; mais son affinité pour le L-tryptophane l'est quatre fois plus (Tableau 2; Km BH₄ et Km L-trp). Finalement, dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité enzymatique de la TPH1 est 3 fois plus importante que celle de la TPH2 (Tableau 2, Vmax) (McKinney *et coll.*, 2005). Chez la souris, pour toutes les concentrations de L-trp et de BH₄ testées, l'efficacité de formation de 5-HTP par la TPH1

est plus importante. De plus, l'activité enzymatique de la TPH1 est maintenue, même avec des concentrations faibles de L-trp et de BH₄ (Nakamura *et coll.*, 2006).

	Vmax (nmol/min/mg)	Km BH ₄ (μM)	Km L-trp (μM)	Km L-phe (μM)
TPH1	646	39/20	10/7.5	34
TPH2	194	20/20	43/20	284

Tableau 2: Paramètres cinétiques des tryptophane hydroxylases 1 et 2 humaines et murines (d'après McKinney *et coll.*, 2005; Nakamura *et coll.*, 2006).

Le Vmax représente la vitesse maximale de formation du complexe enzyme-substrat. Le Km représente la constante de Michaelis, inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. L'affinité des deux enzymes murines pour le BH₄ et le L-trp est indiquée en rouge.

Cette activité enzymatique importante de la TPH1 ne reflète cependant pas sa plus faible spécificité de substrat puisque la TPH1 a, en plus de son affinité importante pour le L-tryptophane, une affinité également importante pour la phénylalanine (Tableau 2, Km L-phe), autre acide aminé aromatique hydroxylable par les HAAA. La TPH1 serait donc plus efficace pour la synthèse de sérotonine, mais moins spécifique que la TPH2.

II.4. L'importance des polymorphismes

Comme nous venons de le voir, la TPH1 a longtemps été considérée comme l'unique enzyme responsable de la synthèse de la sérotonine dans tout l'organisme. De nombreuses études ont été menées sur la TPH1 dans le système nerveux central, en particulier sur la recherche de polymorphismes dans le gène *Tph1* et leurs possibles associations avec les maladies psychiatriques. En particulier, deux polymorphismes introniques dans le gène *Tph1* (A218C et A779C) ont été étudiés de façon extensive pour leur possible association avec des maladies psychiatriques comme le comportement suicidaire, les dépressions unipolaire et bipolaire ou encore la schizophrénie (Arango *et coll.*, 2003; Zhang *et coll.*, 2006).

La découverte du second gène *Tph2*, et de l'enzyme TPH2, exprimée préférentiellement dans le cerveau, a conduit plusieurs équipes à rechercher l'existence de polymorphismes dans le gène *Tph2*, pouvant être associés au développement des maladies psychiatriques. Jusqu'à aujourd'hui, environ 500 SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ont été identifiés dans les gènes *Tph2* de différentes espèces, dont près de 300 chez l'homme (Zhang *et coll.*, 2006). La séquence codante du gène *Tph2* ne représente que 1,5% environ du gène; c'est pourquoi la majorité des SNP se situe dans les régions non codantes (régions promotrices, régions non traduites, introns)

Deux polymorphismes aux répercussions fonctionnelles importantes ont été retrouvés dans les séquences codantes des gènes *Tph2* chez la souris et chez l'homme. En 2004, Zhang et coll. ont mis en évidence un polymorphisme dans la séquence codante du gène *Tph2*, par des expériences de rétro-transcription suivies de réactions de PCR réalisées sur du tissu cérébral de différentes souches de souris. Ils ont montré la substitution d'une proline (aa 447, CCC), présente chez les souris de souches 129X1/SvJ, C57BL/6J et C57Bl/6N par une arginine (aa 447, CGC), présente dans les souches Balb/cJ, DBA/2J, DBA/2N et BALB/c par une (Zhang *et coll.*, 2004). La proline en position 447 (Pro⁴⁴⁷) est hautement conservée au sein de la famille des HAAA, chez l'homme, le rat et la souris puisque le polymorphisme (C1473G) n'est détecté que dans le gène *Tph2* de souris. Ce polymorphisme a des répercussions fonctionnelles importantes: bien que la quantité d'ARNm *Tph2* soit la même dans le cerveau, les souris Balb/c ont une activité tryptophane hydroxylase réduite de 40% à 70% par rapport aux souris 129X1/SvJ. Cette découverte est d'autant plus intéressante que ces souches de souris ont des comportements différents et qu'elles répondent différemment aux antidépresseurs (Lucki *et coll.*, 2001; Cervo *et coll.*, 2005; Crowley *et coll.*, 2005).

En 2005, la même équipe a identifié un SNP dans la séquence codante du gène *Tph2* humain (Zhang *et coll.*, 2005). Ce polymorphisme (G1463A) remplace l'arginine conservée en position 441 (Arg 441, CGT) par une histidine (His 441, CAT). Cette substitution entraîne une perte de synthèse de 5-HT de près de 80%, lorsque la protéine TPH2 mutée est exprimée dans des cellules PC12. L'examen d'une cohorte de 87 patients souffrant de dépression unipolaire a révélé la présence de ce polymorphisme chez 9 d'entre eux; et chez 3 patients contrôles parmi les 219 étudiés. L'examen d'une cohorte de 60 patients souffrant de désordre bipolaire n'a pas révélé la présence de ce polymorphisme. L'analyse d'autres cohortes de patients atteints de troubles psychiatriques par trois équipes indépendantes n'a cependant pas permis de confirmer l'association entre le polymorphisme (G1463A) et ces troubles psychiatriques (dépression, troubles bipolaires) (Glatt *et coll.*, 2005; Van Den Bogaert *et coll.*, 2005; Zhou *et coll.*, 2005).

De façon intéressante, la mutation R408W dans la région correspondante du gène *Pah* abolit totalement l'activité enzymatique de la PAH et est la cause de la forme la plus sévère d'hyperphénylalaninémie, la phénylcétonurie. Nous reparlerons de cette pathologie dans la discussion de nos résultats.

Les deux polymorphismes trouvés dans les gènes *Tph2* humain et murin sont situés dans des régions extrêmement proches: la proline substituée chez la souris en position 447 correspond à la proline 449 chez l'homme, ce qui est très proche de l'arginine substituée en

position 441 chez l'homme. Ces données suggèrent que cette région des gènes *Tph2* est une région extrêmement importante pour l'activité enzymatique de la TPH2.

III. Conclusion

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

La sérotonine dans le maintien de l'homéostasie

Les souris dont le gène *Tph1* est invalidé, générées au laboratoire, constituent un modèle d'étude unique pour définir les rôles respectifs de la sérotonine centrale et de la sérotonine périphérique dans la régulation et le maintien de l'homéostasie. Comme nous l'expliquerons en détail dans le chapitre consacré aux résultats, les premières souris *Tph1*^{-/-} étaient cachectiques et présentaient une pâleur générale (Figure 18) et des difficultés respiratoires, suggérant des anomalies de circulation sanguine. A l'autopsie, une cardiomégalie flagrante était observée.



Figure 18: Phénotype des souris homozygotes *Tph1*^{-/-}.

Les souris mutées *Tph1*^{-/-} présentent des signes d'épuisement, des difficultés respiratoires et une pâleur générale.

Nos premières observations nous ont conduits à axer nos travaux sur l'analyse du rôle de la sérotonine circulante particulièrement dans deux systèmes de régulation de l'homéostasie: les systèmes sanguin et cardiovasculaire. Dans cette deuxième partie introductory, je décrirai tout d'abord les connaissances actuelles reliant la sérotonine aux cellules sanguines et à leur fonction. J'exposerai ensuite les liens connus entre la sérotonine et le système vasculaire, puis cardiaque.

I. La sérotonine et le système sanguin

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la sérotonine synthétisée par les cellules chromaffines intestinales, est sécrétée dans le sang. Elle est alors immédiatement capturée par les plaquettes sanguines qui l'internalisent dans la cellule et la stockent dans

les granules denses de sécrétion, respectivement via SERT et VMAT₂. Les plaquettes expriment à leur surface un seul récepteur sérotoninergique, le récepteur 5-HT_{2A} (Killam et Cohen, 1991).

Contrairement à d'autres facteurs plaquettaires comme les facteurs de coagulation dont la fonction est maintenant bien connue, l'intérêt porté au rôle de la 5-HT dans les fonctions plaquettaires est assez récent. Cela s'explique par le fait que dans les années 1970, plusieurs équipes ont montré que les plaquettes sanguines et les neurones présentaient de fortes similitudes quant aux mécanismes de recapture de la 5-HT (Sneddon, 1973; Plein et Stahl, 1977; Stahl et Meltzer, 1978; Berk, 2001). La découverte des effets antidépresseurs des SSRI, qui agissent à la fois sur le SERT des neurones et des plaquettes (§I.5.1.b, page 28), et l'obtention aisée des plaquettes sanguines en avaient fait un "modèle de synapse" de choix.

I.1. Rôle de la sérotonine dans la circulation sanguine

L'internalisation de la sérotonine dans les granules denses de sécrétion des plaquettes sanguines protège l'organisme de ses effets vaso-actifs puissants, mais la nature exacte du rôle de la sérotonine dans la fonction des plaquettes reste peu connue. Les années 2000 ont vu un regain d'intérêt pour l'étude du rôle de la sérotonine dans la fonction plaquettaire, avec les travaux de l'équipe de George L. Dale. Ces auteurs ont d'une part, confirmé que les plaquettes sanguines constituaient une population cellulaire hétérogène au niveau structural et fonctionnel (Alberio *et coll.*, 2000), hypothèse préalablement émise dans les années 1990. Ils ont, d'autre part, montré que les plaquettes activées utilisaient la sérotonine pour lier des protéines pro-coagulantes à leur surface (Dale *et coll.*, 2002), et ainsi favoriser leur agrégation et la coagulation.

Afin de mieux comprendre les perspectives qui découlent de ces observations, revenons brièvement sur le processus d'hémostase assuré par les plaquettes sanguines.

I.1.1. Plaquettes sanguines et hémostase

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

Nous n'aborderons dans le paragraphe qui suit que la première étape d'hémostase primaire, dans laquelle la sérotonine intervient.

Ainsi que nous le verrons dans le chapitre plus particulièrement consacré aux propriétés vaso-actives de la sérotonine (§II.2.1, page 56), la paroi des vaisseaux sanguins est tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales qui assurent son intégrité et qui n'autorisent ni l'activation des plaquettes, ni le processus de coagulation. Dès lors qu'une brèche vasculaire est formée, les plaquettes adhèrent aux protéines sous-endothéliales mises à nu par l'intermédiaire de leurs récepteurs membranaires glycoprotéiques spécifiques. Les protéines sous-endothéliales sont le collagène ou encore le facteur de von Willebrand, qui sont également trouvées dans le plasma sanguin ainsi que dans les granules α des plaquettes.

L'adhésion plaquettaire va induire leur changement de forme. Les plaquettes, normalement discoïdes, deviennent sphériques et forment des pseudopodes qui leur permettent de mieux adhérer entre elles et au substrat. Une première couche monocellulaire de plaquettes se constitue. Les plaquettes adhérentes sont activées, libèrent le contenu de leurs granules et recrutent d'autres plaquettes circulantes. Les granules denses contiennent de l'ATP, de l'ADP, du Ca^{2+} et de la 5-HT. Les granules α , quant à eux, contiennent des protéines pro-agrégantes dont le fibrinogène, ou le facteur de von Willebrand.

Les glycoprotéines de surface IIb/IIIa subissent une modification conformationnelle qui leur permet de fixer le fibrinogène en présence de calcium. L'agrégation plaquettaire se fait ainsi, grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes, créant un premier thrombus fragile (agrégation réversible). Grâce à la libération des enzymes et du contenu granulaire des plaquettes, le caillot se solidifie (agrégation irréversible), constituant le clou plaquettaire.

1.1.2. Les plaquettes COAT

En se fondant sur des différences morphologiques et biochimiques, Behnke et coll. furent les premiers à montrer dans les années 1990 que les plaquettes sanguines ne constituaient pas une population homogène de cellules (Behnke et Forer, 1993; Behnke, 1995). En 2000, Alberio et coll. mirent en évidence l'existence d'une population de plaquettes activées par le collagène et la thrombine, et qui exprimaient à leur surface une forte proportion d'un facteur contenu dans les granules α , le facteur V (Alberio *et coll.*, 2000). Ces plaquettes furent nommées plaquettes COAT pour "*Collagen And Thrombin activated platelets*". Par la suite, plusieurs équipes montrèrent que de nombreux autres

facteurs contenus dans les granules α pouvaient être exprimés à la surface de cette sous-population de plaquettes, avec la particularité d'être fixés à la membrane avec une très grande affinité (pour revue, Dale, 2005).

Une des caractéristiques portées par toutes les protéines α -granulaires fixées à la membrane des plaquettes COAT est d'être des substrats des transglutaminases (TGases). Ces dernières catalysent la formation calcium-dépendante de ponts peptidiques entre des résidus glutamine d'une séquence peptidique (donneur de groupements acyle) et des résidus lysine (donneur de groupements amine) ou des monoamines: c'est le phénomène de transamidation.

En 2002, Dale et coll. montrèrent que le composant donneur du groupement amine pour la réaction de transamidation à la surface des plaquettes COAT était la sérotonine, libérée en grande quantité par les plaquettes activées (Dale *et coll.*, 2002) (Figure 19). Les interactions multiples des protéines α -granulaires avec les molécules de surface des plaquettes stabilisent le réseau de protéines pro-agrégantes à la surface des plaquettes COAT et augmentent ainsi l'agrégation plaquettaire.

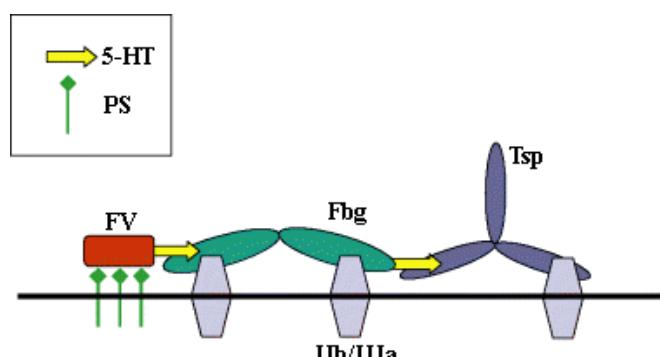


Figure 19: Rôle de la 5-HT dans la formation des plaquettes COAT (d'après Dale, 2005).

1. Les protéines pro-coagulantes se lient à leurs récepteurs traditionnels: le facteur V (FV) à la phosphatidylsérine (PS) et le fibrinogène (Fbg) aux glycoprotéines IIb/IIIa. 2. Les protéines des granules α , ici FV et Fbg, sont liées de façon covalente à la surface des plaquettes COAT par l'intermédiaire d'une réaction de transglutamination initiée par la sérotonine (flèches jaunes). 3. Le Fbg et la thrombospondine (Tsp) possèdent des sites de liaison qui reconnaissent la sérotonine conjuguée. Sur cette figure, la tête de la flèche jaune est liée aux sites de liaison de la sérotonine du Fbg et de la Tsp.

I.1.3. L'hémostase des souris *Tph1^{-/-}* et le mécanisme de sérotonylation

Le mécanisme que nous venons d'évoquer, se déroule à l'extérieur de la cellule, après une lésion vasculaire. Les transglutaminases étant également présentes à l'intérieur des plaquettes, Walther et coll. ont formulé l'hypothèse qu'un mécanisme de transglutamination initié par la sérotonine puisse se dérouler dans les plaquettes sanguines.

Afin de démontrer la validité de cette hypothèse, les auteurs ont tout d'abord évalué le processus hémostatique des souris *Tph1^{-/-}* (Walther *et coll.*, 2003a).

La capacité d'agrégation des plaquettes des souris *Tph1^{-/-}* dépourvues en sérotonine, en réponse au collagène ou à la thrombine n'est pas altérée *in vitro*, permettant la formation du clou plaquettaire (Walther *et coll.*, 2003b). En revanche, *in vivo*, la capacité d'adhésion des plaquettes est réduite et le clou plaquettaire formé est instable. Cela se traduit par une augmentation du temps de saignement des vaisseaux des souris *Tph1^{-/-}* après lésion. Au niveau ultrastructural, aucun défaut n'a été détecté dans les plaquettes des souris mutées (Holtje *et coll.*, 2003).

Les plaquettes des souris *Tph1^{-/-}* analysées par ce groupe expriment tous les composants sérotoninergiques plaquettaires connus: SERT, VMAT₂, et le récepteur 5-HT_{2A}. Une augmentation de la recapture de la sérotonine tritiée par le VMAT₂ a été mise en évidence dans les plaquettes des animaux *Tph1^{-/-}* (Holtje *et coll.*, 2003). Chez ces animaux, le faible contenu intravésiculaire en 5-HT diminue l'activation des protéines G_{aq} situées au niveau de la membrane vésiculaire ; ce qui a pour conséquence d'augmenter l'activité de VMAT₂.

L'analyse des fonctions plaquettaires des souris *Tph1^{-/-}* a conduit Walther et coll. à identifier un nouveau mécanisme de signalisation intracellulaire par la sérotonine, responsable de l'exocytose des granules α plaquettaires (Figure 20) (Walther *et coll.*, 2003b).

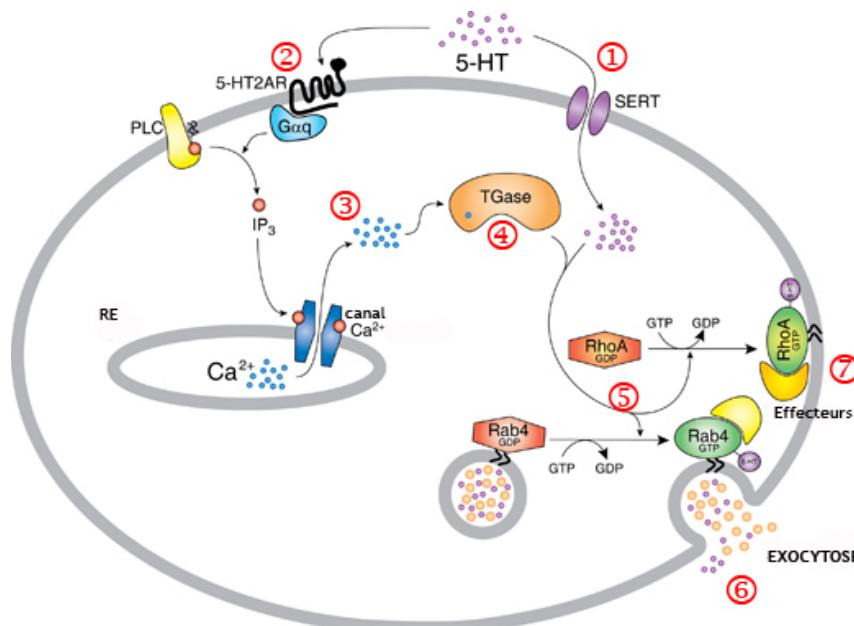


Figure 20: Exocytose des granules α plaquettaires induite par la sérotonine durant le processus d'agrégation plaquettaire (d'après Walther *et coll.*, 2003b, <http://www.molgen.mpg.de>).

La sérotonine activement importée dans le cytoplasme plaquettaire par le SERT^①, est normalement stockée dans les granules denses de sécrétion. D'autre part, la stimulation du récepteur 5-HT_{2A} couplé aux protéines G_{αq}^② aboutit à l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire^③. Les TGases sont activées par le Ca²⁺ ^④ et utilisent la 5-HT pour transamider les petites protéines G RhoA et Rab4^⑤, les rendant ainsi constitutivement actives car incapables d'hydrolyser le GTP en GDP. L'activation des GTPases RhoA et Rab4 aboutit à des réarrangements du cytosquelette et à l'exocytose des granules α . Le contenu des granules α est déversé dans la circulation sanguine^⑥ ou est lié de façon covalente aux glycoprotéines de la membrane plasmique^⑦.

Ce mécanisme, appelé « sérotonylation », fait intervenir à la fois le récepteur 5-HT_{2A} et le transporteur SERT. Il pourrait être initié plus largement par toutes les monoamines, comme l'histamine ou les catécholamines, et donc correspondre à un mécanisme général de "monoaminylation" (Walther *et coll.*, 2003b). En 2006, Guilluy *et coll.* ont montré l'existence de ce mécanisme dans un second type cellulaire, les cellules musculaires lisses artérielles de rat et de souris, *in vitro* et *in vivo* (Guilluy *et coll.*, 2006). Nous reparlerons de ce mécanisme dans le chapitre de discussion de nos résultats.

I.1.4. La sérotonine dans le plasma sanguin

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'internalisation de la sérotonine dans les plaquettes sanguines a également pour but de protéger l'organisme de ses effets vaso-actifs excessifs, et de sa toxicité connue. En conséquence, le plasma sanguin contient des taux très faibles de 5-HT puisque sa concentration est de l'ordre de quelques nanomoles par litre (Callebert *et coll.*, 2006), tandis que sa concentration plaquettaire est de l'ordre de plusieurs micromoles par litre, chez la souris comme chez l'homme. La sérotonine qui n'est pas internalisée dans les plaquettes est rapidement métabolisée par la MAO dans les poumons et dans le foie.

Ainsi que nous l'exposerons dans les chapitres consacrés aux résultats et à la discussion, nos travaux indiquent cependant que le rôle de la sérotonine plasmatique a été largement sous-évalué.

I.2. Rôle de la sérotonine au cours de l'hématopoïèse

Nous avons vu que les fonctions de la sérotonine dans la physiologie de l'hémostase sont importantes, bien que certainement encore sous-évaluées. L'analyse du phénotype des

souris *Tph1^{-/-}* nous a conduits, nous verrons de quelle façon dans le chapitre consacré aux résultats, à nous interroger sur le rôle qu'elle pourrait également jouer dans la formation des plaquettes sanguines et également des erythrocytes.

1.2.1. Rôle de la sérotonine dans la thrombopoïèse

Peu de travaux ont recherché une implication éventuelle de la sérotonine dans la formation des plaquettes sanguines, ou thrombopoïèse. En 1972, Tranzer et coll. ont montré une recapture de sérotonine dans les mégacaryocytes, précurseurs immédiats des plaquettes sanguines (Tranzer *et coll.*, 1972). En 1996, l'expression du récepteur sérotoninergique 5-HT₂ a été montrée dans les mégacaryocytes, et la fonction de ce récepteur dans la mégacaryocytopoïèse a été établie (Yang *et coll.*, 1996b). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'application de sérotonine sur les cellules en culture de moelle osseuse de souris induisait la formation de colonies de mégacaryocytes de façon dose-dépendante. L'effet de la sérotonine est relayé par le récepteur 5-HT₂ puisqu'il est bloqué par l'addition de l'antagoniste 5-HT₂ kétansérine à 1µM dans le milieu de culture. La sérotonine pourrait donc exercer un effet mitogène, *in vivo*, sur la mégacaryocytopoïèse, puisque les concentrations de 5-HT utilisées dans cette étude (0 à 200nM) correspondent aux taux physiologiques mesurés chez l'animal. Les mêmes auteurs ont confirmé la capacité d'internalisation et de stockage de 5-HT par des cellules mégacaryocytoblastiques humaines Meg-01 en culture (Yang *et coll.*, 1996a). L'utilisation de la fluoxetine, un inhibiteur du SERT, dans le milieu de culture des cellules permettait alors d'exclure une synthèse locale de sérotonine.

1.2.2. Rôle de la sérotonine dans l'érythropoïèse

Là encore, peu de travaux ont recherché une éventuelle implication de la sérotonine dans la formation des erythrocytes.

En 1968, Mietkiewski et coll. ont administré quotidiennement par voie intramusculaire de la 5-HT (3mg/kg) à un lapin. Après 4 jours de traitement, le plasma du lapin était isolé puis injecté à un second lapin dont l'érythropoïèse était arrêtée expérimentalement. Une augmentation du nombre d'erythrocytes immatures chez ce dernier était alors mesurée (Mietkiewski *et coll.*, 1968). Une autre équipe a rapporté, en 1967, que l'injection de sérotonine chez le rat entraînait une augmentation de l'activité mitotique des cellules myéloïdes et érythroïdes de la moelle osseuse (Pukhal'skaya et Golubkova, 1967). Plusieurs auteurs ont alors proposé que la sérotonine puisse stimuler la

production d'érythropoïétine (EPO) par le rein, qui à son tour stimulerait l'érythropoïèse chez l'animal adulte (Lowy *et coll.*, 1970; Noveck et Fisher, 1971).

1.3. Conclusion

L'internalisation de la sérotonine dans les granules denses de sécrétion des plaquettes a longtemps été considérée comme un mécanisme de protection de l'organisme contre ses effets vaso-actifs excessifs et contre sa toxicité connue. Depuis le début des années 2000, un nombre croissant d'études montre que la sérotonine joue un rôle important dans les fonctions plaquettaires, et vraisemblablement dans certaines étapes de l'hématopoïèse.

II. La 5-HT dans le système cardiovasculaire

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le phénotype apparent observé chez les souris dont le gène *Tph1* est invalidé est une augmentation flagrante de la taille du cœur (26% en moyenne) (Figure 21).

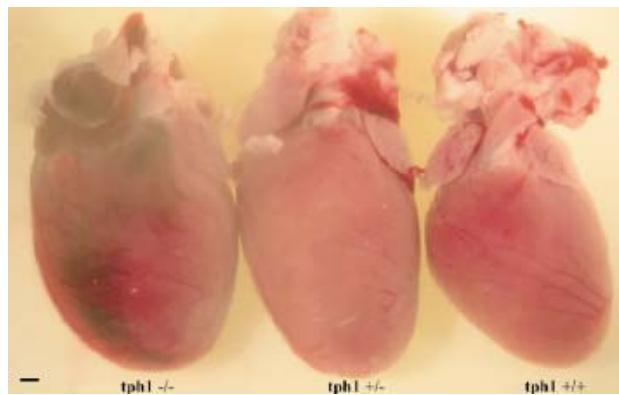


Figure 21: Phénotype cardiaque des souris *Tph1*^{-/-} (d'après Cote *et coll.*, 2004). Morphologie externe du cœur des souris *Tph1*^{+/+}, *Tph1*⁺⁻ et *Tph1*^{-/-} âgées de 26 semaines. La taille du cœur des souris *Tph1*^{-/-} est augmentée en moyenne de 26%.

Nous nous sommes interrogés sur les mécanismes d'action connus de la sérotonine au niveau du système cardiovasculaire, qui pourraient expliquer une telle observation.

L'implication de la sérotonine dans les fonctions vasculaires est connue depuis sa découverte, puisqu'elle fut isolée pour ses propriétés vasoconstrictrices. Son rôle dans les fonctions cardiaques ne fut découvert que plus tard, avec l'émergence des outils de biologie moléculaire qui permirent l'isolement et la caractérisation des récepteurs sérotoninergiques, puis leur invalidation.

Les effets physiologiques de la 5-HT sur le système cardiovasculaire (SCV) sont multiples: bradycardie ou tachycardie, hypotension ou hypertension, vasoconstriction ou vasodilatation. Ces effets multiples sont dus à la présence de sérotonine à la fois dans le SNC et à la périphérie (Figure 22).

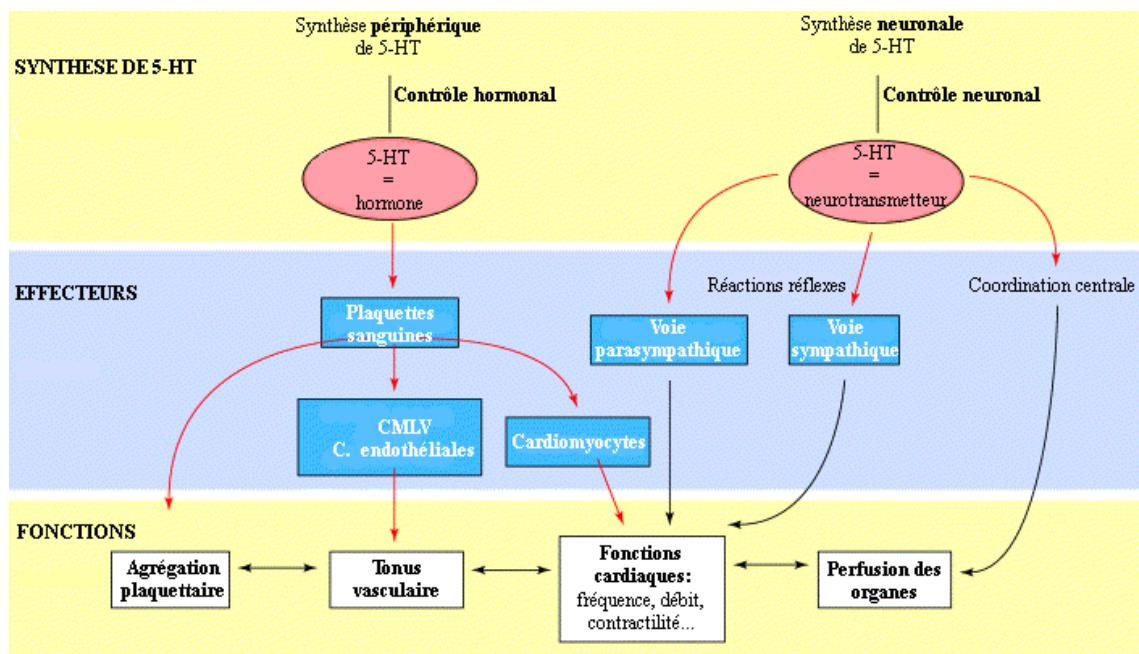


Figure 22: Régulation du système cardiovasculaire par la sérotonine (d'après Cote *et coll.*, 2004).

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

Certains effets résultent de l'action de la sérotonine dans le SNC qui peut alors participer à la régulation des voies réflexes sympathiques ou parasympathiques. D'autres effets résultent de l'action locale de la 5-HT périphérique sur les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules cardiaques (cardiomyocytes, fibroblastes) ou encore, comme nous venons de le voir, sur les plaquettes sanguines.

L'essentiel de nos travaux ont été axés sur le rôle de la sérotonine périphérique sur les fonctions cardiaques. Nous décrirons donc brièvement les fonctions centrales connues de la sérotonine sur le système cardiovasculaire, pour nous concentrer sur son action locale, particulièrement au niveau cardiaque.

II.1. La régulation cardiovasculaire centrale par la sérotonine

Avant de nous intéresser aux fonctions de la sérotonine centrale sur le système cardiovasculaire, l'organisation du système autonome qui régule les fonctions cardiovasculaires sera décrite.

II.1.1. Le centre cardiovasculaire et le système nerveux autonome

Le contrôle des fonctions cardiovasculaires par le système nerveux se fait essentiellement à partir du centre cardiovasculaire logé dans le bulbe rachidien (Figure 23).

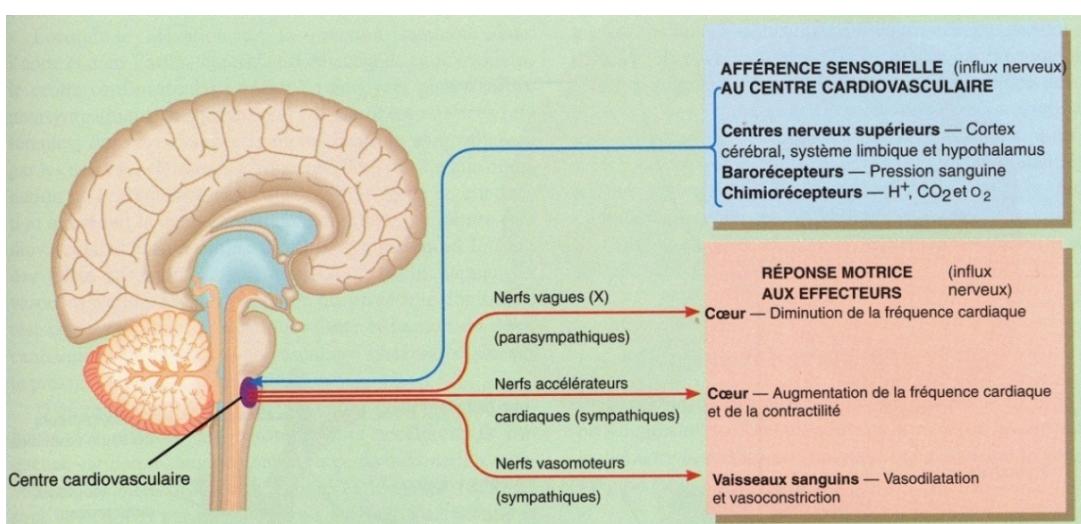


Figure 23: Contrôle des fonctions cardiovasculaires par le centre cardiovasculaire (d'après Tortora et Grabowski, 1994).

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

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

Le système parasympathique contrôle les activités qui permettent la conservation et le rétablissement de l'énergie corporelle pendant les périodes de repos ou de récupération. Le système sympathique, quant à lui, prépare le corps aux situations d'urgence. Il est

surtout relié aux processus qui entraînent une dépense d'énergie. Lorsque l'organisme est en homéostasie, la fonction principale du système sympathique est de combattre suffisamment les effets parasympathiques pour permettre le maintien des fonctions qui nécessitent de l'énergie.

La stimulation du cœur par le système sympathique augmente la fréquence cardiaque et la contractilité. Les influx sympathiques atteignent le cœur par l'intermédiaire des nerfs accélérateurs cardiaques (Figure 23). La stimulation parasympathique du cœur, transmise par le nerf vague (X), abaisse la fréquence cardiaque. Ainsi, le contrôle du cœur par le SNA résulte d'influences opposées, celle du système sympathique, stimulatrice, et celle du système parasympathique, inhibitrice.

Par ailleurs, le centre cardiovasculaire envoie continuellement des influx au muscle lisse des parois des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire des nerfs vasomoteurs sympathiques (Figure 23). Le contrôle de la vasomotricité des vaisseaux sanguins par le SNA dépend exclusivement de la division sympathique.

II.1.2. Voies sérotoninergiques centrales et système cardiovasculaire

Les voies sérotoninergiques centrales innervent certaines zones impliquées dans la régulation du système cardiovasculaire (Ramage, 2001). Chez le rat, dès le jour embryonnaire 14, des fibres sérotoninergiques issues des noyaux du raphé les plus caudaux (noyaux *pallidus* et *obscurus*) descendant dans la moelle épinière (Wallace et Lauder, 1983). Ces fibres sérotoninergiques descendantes innervent les neurones moteurs somatiques et également les neurones pré-ganglionnaires sympathiques.

La majorité des travaux axés sur les effets centraux de la sérotonine sur le système cardiovasculaire, ont été réalisés chez le rat. Les expériences consistaient essentiellement à injecter de la sérotonine ou ses analogues dans le SNC, ou à léser les neurones sérotoninergiques centraux, puis à mesurer le rythme cardiaque ou la pression artérielle des animaux. Il apparaît que les effets de la sérotonine sont multiples, excitateurs ou inhibiteurs du système sympathique. Ils dépendent du site exact d'administration de la sérotonine, dans le SNC, de l'espèce animale considérée, du statut anesthésique des animaux, et également des récepteurs sérotoninergiques mis en jeu, qui sont au nombre de trois: les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} et 5-HT₃.

Les récepteurs 5-HT_{1A}: Des études pharmacologiques ont démontré que l'injection de 8-OH-DPAT, un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, provoque une inhibition sympathique centrale et une augmentation du tonus vagal chez la plupart des espèces étudiées. Les aires

cérébrales majeures impliquées dans cette sympatho-inhibition sont la moelle ventro-latérale rostrale et le tegmentum latéral (Ramage, 2001; Wang et Ramage, 2001).

Les récepteurs 5-HT_{2A}: L'injection centrale de DOI (2,5-diméthoxy-4-iodoamphétamine), un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT₂, couplée à l'inhibition périphérique des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} induit une profonde sympatho-excitation et une augmentation de la pression artérielle systémique. Comme pour les récepteurs 5-HT_{1A}, l'aire majeure responsable de l'excitation sympathique après stimulation du récepteur 5-HT₂ est la moelle ventro-latérale rostrale (Ramage, 2001; Jones et Blackburn, 2002; Yusuf *et coll.*, 2003).

Les récepteurs 5-HT₃: Ils sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire périphérique, et donc de la pression artérielle. L'activation de ces récepteurs situés au niveau des terminaisons afférentes vagales entraîne une bradycardie et une diminution de la pression artérielle (Yusuf *et coll.*, 2003). Chez l'homme et chez l'animal, la stimulation des récepteurs 5-HT₃ des terminaisons vagales contribuerait à la sensation de douleur cardiaque suite à une ischémie myocardique (Fu et Longhurst, 2002a; b).

II.2. La régulation sérotoninergique périphérique du système cardiovasculaire

La cardiomégalie développée par les souris *Tph1^{-/-}* pourrait résulter d'un défaut de signalisation de la sérotonine directement au niveau cardiaque ou indirectement au niveau des vaisseaux sanguins. Je décrirai, dans les deux chapitres suivants, les rôles connus de la sérotonine dans la physiologie vasculaire puis cardiaque. Pour chacun des deux systèmes, j'aborderai également les pathologies qui impliquent un dysfonctionnement du système sérotoninergique.

II.2.1. La sérotonine dans la physiologie vasculaire

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

II.2.1.a. Régulation du tonus vasculaire par la sérotonine

La sérotonine régule le tonus vasculaire par l'intermédiaire de cinq de ses récepteurs et de son transporteur, exprimés à la fois au niveau des cellules endothéliales vasculaires et des CML (Ullmer *et coll.*, 1995) (Figure 24). Les cellules endothéliales vasculaires expriment les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, et en moindre proportion 5-HT₄. Les CML, quant à elles, expriment les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇, et dans certains cas particuliers 5-HT_{2B}. Le niveau d'expression de chacun des récepteurs dépend très largement de l'espèce et du tissu étudié.

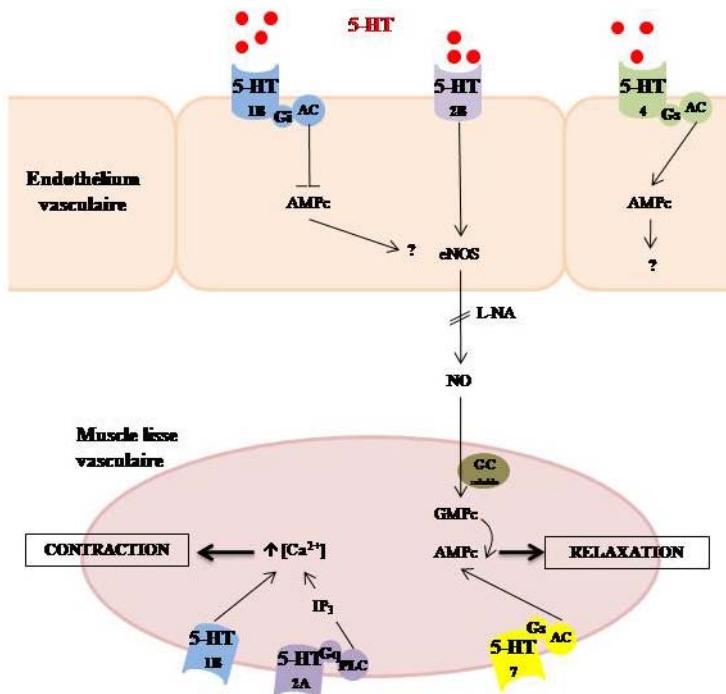


Figure 24: Régulation du tonus vasculaire par la 5-HT (d'après Ullmer *et coll.*, 1995).

L'activation des récepteurs sérotoninergiques présents à la surface des cellules endothéliales induit une vasodilatation, tandis que la stimulation par la sérotonine des cellules musculaires lisses produit une vasoconstriction (Figure 24).

II.2.1.b. Pathologies vasculaires et sérotonine

Dans certains conditions pathologiques, telles que l'hypertension artérielle pulmonaire ou systémique dont nous exposerons l'étiologie dans la suite de ce chapitre, les CML se "dédifférencient" et acquièrent la capacité de produire des cytokines et des facteurs de croissance, d'y répondre par l'expression de récepteurs spécifiques et de synthétiser une grande quantité de matrice extracellulaire. Au cours de cette modification phénotypique, le système contractile est modifié et réorganisé de telle sorte que les CML adoptent une morphologie de type fibroblastique, perdent leur propriété contractile et acquièrent la capacité de migrer et de proliférer en réponse à différents stimuli.

Un de ces stimuli est une élévation de la concentration en 5-HT dans le microenvironnement des cellules musculaires lisses. L'application de sérotonine, à une concentration physiologique (1 μ M), sur des cultures de CML d'aortes d'origine bovine entraîne une augmentation de l'incorporation de [3 H]thymidine. Cet effet est signalisé par le récepteur 5-HT₂ (Nemecek *et coll.*, 1986). Un effet synergique de la réponse mitogène à la sérotonine a été observé en présence de PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), autre facteur normalement libéré par les plaquettes sanguines. Plus récemment, il a été montré que la sérotonine a également une action synergique avec le thromboxane A2 sur la prolifération des CML d'aorte de chien; effet bloqué par l'antagoniste des récepteurs 5-HT₂ LY281067 (Pakala *et coll.*, 1994).

Des données récentes montrent que l'effet mitogène de la sérotonine nécessite non seulement la présence d'un de ces récepteurs à la surface de la cellule, mais également de son transporteur SERT (Figure 25) (Fanburg et Lee, 1997; Eddahibi *et coll.*, 1999; Liu *et coll.*, 2004; Guilluy *et coll.*, 2006).

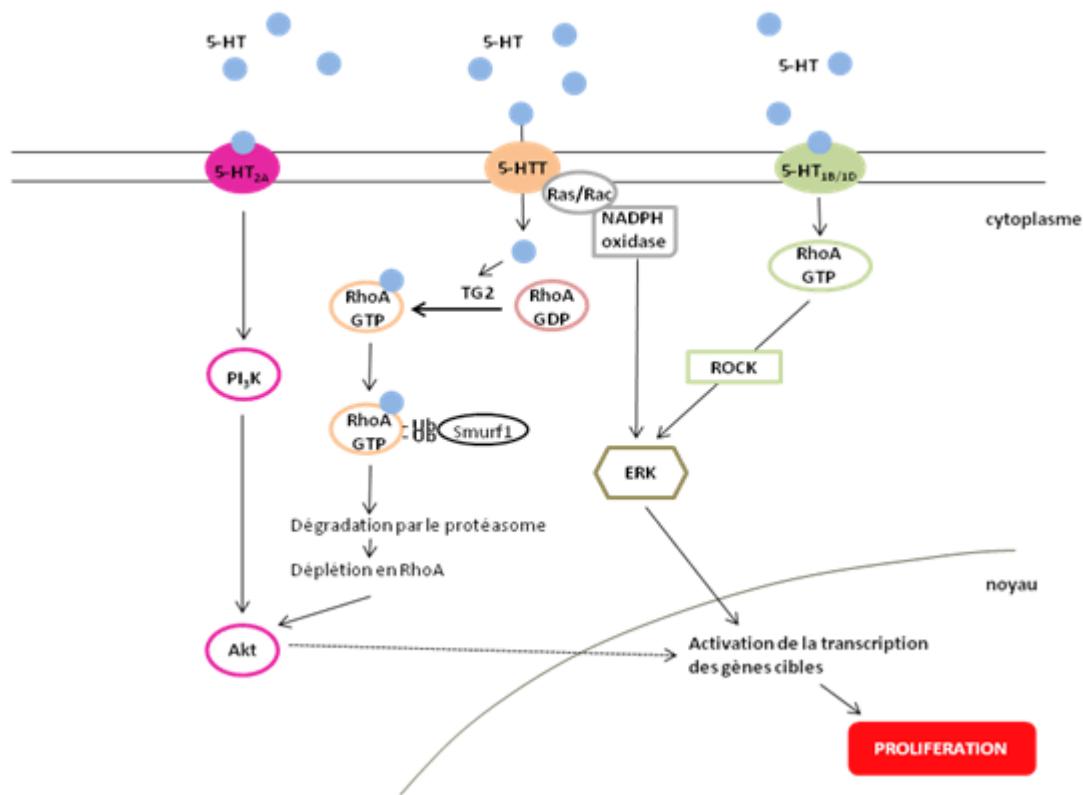


Figure 25: Voies de signalisation de la 5-HT induisant une prolifération des CML vasculaires (d'après Guilluy *et coll.*, 2006; Liu et Fanburg, 2006; Liu *et coll.*, 2004).

La prolifération des CML requiert la coopération entre les kinases ERK, ROCK et PI₃K. L'internalisation de la 5-HT via le SERT active la NADPH oxidase qui produira des ions superoxyde, rapidement transformés en H₂O₂. L'H₂O₂, à son tour, activera la kinase ERK. La 5-HT internalisée peut également être liée de façon covalente sur la protéine RhoA et conduire à sa déplétion, qui aura comme effet d'activer Akt. D'autre part, le récepteur 5-HT_{1B/1D} active la kinase ROCK via la petite protéine RhoA. ROCK active finalement ERK. Enfin, l'activation du récepteur 5-HT_{2A} active la voie PI3K/Akt.

Guilluy et coll. ont récemment confirmé le rôle du SERT dans la prolifération des CML vasculaires, en démontrant que la sérotonine internalisée dans la cellule par le SERT est liée de façon covalente aux petites protéines RhoA grâce à une transglutaminase (Guilluy *et coll.*, 2006). La protéine RhoA constitutivement activée par la 5-HT, est ubiquitinée par Smurf1 et dégradée par le protéasome. La déplétion intracellulaire en protéine RhoA augmente l'activité de la kinase Akt, responsable de l'activation de la transcription des gènes, et de la prolifération cellulaire. Ce nouveau mécanisme d'action de la sérotonine pourrait être à l'origine du remodelage vasculaire observé chez les patients souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire.

L'hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est définie comme une élévation progressive de la pression artérielle pulmonaire, associée à un remodelage vasculaire irréversible. Elle est le plus souvent causée par une hypoxie. L'HTAP est une pathologie de mauvais pronostic avec une mortalité à 3 ans d'environ 50%.

La compréhension des mécanismes qui aboutissent au développement de l'HTAP fait l'objet d'une recherche active. En 1995, Hervé et coll. ont montré pour la première fois une augmentation du taux de sérotonine dans le plasma des patients souffrant d'HTAP (Hervé *et coll.*, 1995). Depuis, de nombreuses études ont été menées sur le développement de l'HTAP en relation avec le système sérotoninergique, avec deux préoccupations majeures: définir l'origine de la sérotonine dans la vasculature pulmonaire et identifier les mécanismes qui aboutissent à une augmentation de la concentration plasmatique en 5-HT en réponse à l'hypoxie.

Deux écoles de pensée s'opposent sur l'étiologie de l'HTAP: la première implique majoritairement une signalisation par les récepteurs 5-HT_{2B}, la seconde implique une surexpression du SERT dans les CML vasculaires pulmonaires, et une synthèse locale de sérotonine dans les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires.

Les travaux menés par l'équipe de Luc Maroteaux ont montré que les souris dont le gène codant le récepteur 5-HT_{2B} est invalidé, ou les souris prétraitées par un antagoniste du récepteur 5-HT_{2B} sont totalement résistantes au développement de l'HTAP, provoquée par une hypoxie chronique ou par l'utilisation de dextrofluoramine (Launay *et coll.*, 2002). Cette étude montre également une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} dans des biopsies de patients souffrant d'HTAP. Le rôle du récepteur 5-HT_{1B} dans la physiopathologie de l'HTAP a été confirmé par l'étude des souris 5-HT_{1B}^{-/-} qui sont partiellement résistantes à l'HTAP induite par l'hypoxie (Keegan *et coll.*, 2001). Finalement,

une modification de l'activité du SERT est mesurée chez les souris sauvages et 5-HT_{2B}^{-/-} soumises à une hypoxie; modification totalement bloquée par l'utilisation de la dexamfétamine. Cette dernière observation indique que l'activité du SERT n'est pas suffisante pour induire une réponse hypertensive chez les animaux soumis à une hypoxie chronique, et que seul le récepteur 5-HT_{2B} est limitant dans le développement de l'HTAP (pour revue, Esteve *et coll.*, 2007).

L'équipe de Serge Adnot montre également une forte augmentation du niveau d'ARNm SERT dans des cultures de CML d'artères pulmonaires de rat soumises à une hypoxie (Eddahibi *et coll.*, 1999). Les auteurs démontrent que les souris dont le gène SERT est invalidé sont partiellement résistantes à l'HTAP induite par l'hypoxie (Eddahibi *et coll.*, 2000), et qu'une mutation dans le gène SERT aboutissant à la surexpression du SERT chez des patients, est associée au développement de l'HTAP. En revanche, cette équipe ne trouve pas de modification de l'expression des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} examinée dans une cohorte de patients souffrant d'HTAP (Marcos *et coll.*, 2004). Finalement, Eddahibi et coll. ont montré une synthèse locale de sérotonine par la TPH dans des cultures de cellules endothéliales vasculaires pulmonaires de patients souffrant d'HTAP. L'enzyme responsable de cette synthèse locale est la TPH1 (Eddahibi *et coll.*, 2006). Les travaux de cette équipe sur l'étiologie de l'HTAP montrent que la surexpression du SERT dans les CML est responsable du développement de l'HTAP ; et que la sérotonine internalisée par ces cellules est synthétisée par les cellules endothéliales chez l'homme.

Finalement, une équipe a montré que les animaux *Tph1*^{-/-} sont protégés du risque de développer une HTAP induite par l'hypoxie (Morecroft *et coll.*, 2007) , confirmant le rôle clef de la sérotonine dans le développement de cette pathologie.

L'hypertension artérielle systémique

Le système sérotoninergique a également été impliqué dans l'étiologie de l'hypertension artérielle systémique.

Les travaux de Watts et coll. ont mis en évidence l'implication du récepteur 5-HT_{2B} dans l'hypertension artérielle systémique. Ces auteurs ont montré une modification de la pharmacologie vasculaire contractile chez les rats hypertendus selon différents modèles (Watts et Webb, 1994). La contractilité en réponse à la sérotonine, normalement signalisée par le récepteur 5-HT_{2A}, devient dépendante du récepteur 5-HT_{2B} chez les rats hypertendus (Watts *et coll.*, 1996). L'administration de l'antagoniste spécifique du récepteur 5-HT_{2B}, LY272015, permet de diminuer la pression artérielle systolique des animaux les plus sévèrement hypertendus, alors qu'il augmente légèrement celle des animaux normotendus.

De plus, l'agoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2B}, BW723C86, s'est révélé être un agent vasoconstricteur de l'artère mésentérique des rats hypertendus mais pas des rats normotendus (Watts et Fink, 1999). Là encore, une augmentation du niveau de 5-HT circulante a été détectée chez des patients hypertendus et dans des modèles animaux expérimentaux d'hypertension provoquée (pour revue, Watts, 2005).

II.2.1.c. Conclusion

Des modifications des niveaux de sérotonine circulante et/ou de l'expression de ses récepteurs vasculaires et de son transporteur sont à l'origine d'importants remodelages anatomiques des vaisseaux et de graves pathologies fonctionnelles telles que l'hypertension artérielle pulmonaire ou systémique. Quelles sont les répercussions de telles modifications au niveau cardiaque ?

II.2.2. La sérotonine dans la physiologie cardiaque

Le cœur constitue l'organe moteur du système cardiovasculaire. Sa paroi est constituée de trois couches tissulaires: l'épicarde (couche externe), le myocarde (couche médiane) et l'endocarde (couche interne) (Figure 26).

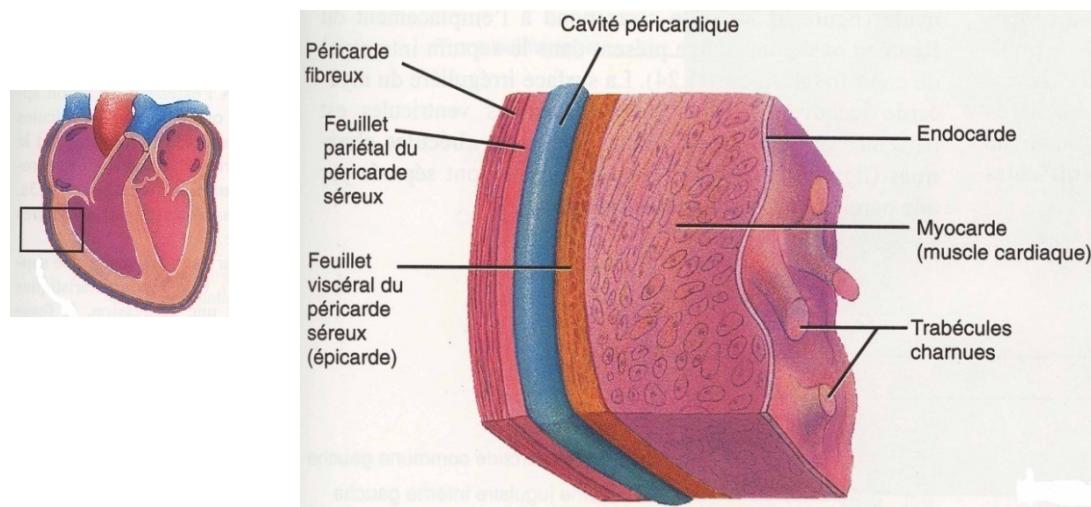


Figure 26: Structure de la paroi du cœur (d'après Tortora et Grabowski, 1994).

Le myocarde, structure qui nous intéressera dans la suite de ce chapitre, constitue le tissu musculaire cardiaque, responsable de son action de pompage. Les cellules musculaires qui le constituent représentent dans le cœur adulte de mammifère 20 à 30% du nombre de

cellules, et 70 à 80% de la masse du tissu. Les autres cellules sont soit des fibroblastes, soit des neurones, soit des cellules endothéliales.

Les deux actions de la sérotonine au niveau cardiaque sont la régulation de la fréquence cardiaque et la régulation de la contractilité cardiaque. Là encore, le rôle de la sérotonine au niveau cardiaque dépend des récepteurs activés. Parmi les 15 types de récepteurs sérotoninergiques identifiés, 4 ont été détectés au niveau du cœur: il s'agit des récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT₄ (Figure 27). Leur expression dépend cependant de l'espèce considérée.

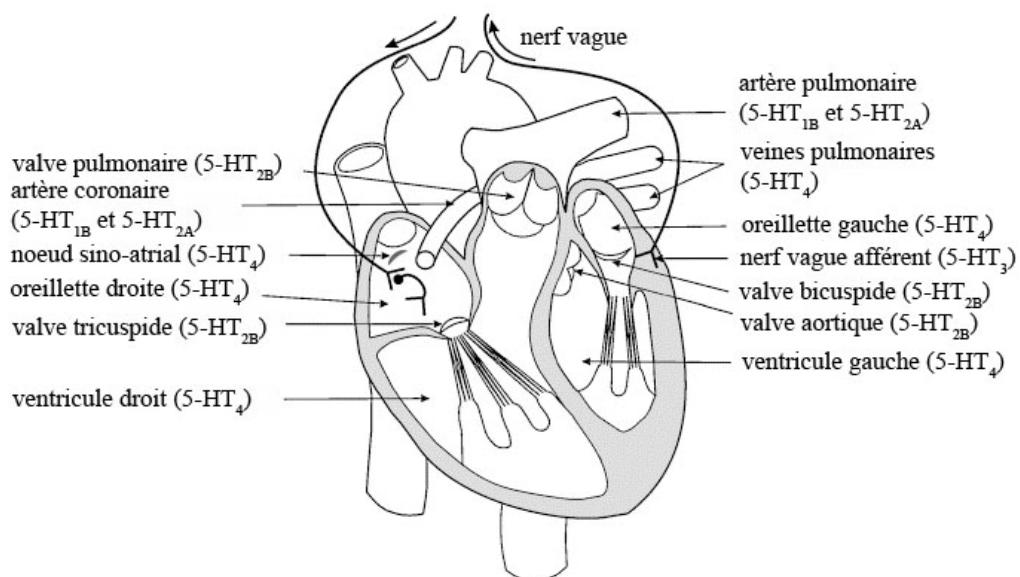


Figure 27: Localisation des récepteurs sérotoninergiques dans le cœur humain (d'après Kaumann et Levy, 2006)

L'expression du SERT dans les cardiomycocytes en condition physiologique est restreinte aux cardiomycocytes fœtaux (Sari et Zhou, 2003) puisqu'à notre connaissance, aucun article ne montre une expression de SERT dans le cœur adulte.

II.2.2.a. Récepteurs sérotoninergiques cardiaques chez l'homme

Chez l'homme, les effets de la sérotonine au niveau du muscle cardiaque font intervenir principalement la signalisation du récepteur 5-HT₄. L'administration de 5-HT par voie intraveineuse induit une bradycardie (Harris *et coll.*, 1960), ou une tachycardie (Hollander *et coll.*, 1957; Lemessurier *et coll.*, 1959; Parks *et coll.*, 1960). L'activation des récepteurs 5-HT₄ exprimés au niveau des trabécules des oreillettes et au niveau du myocarde serait la cause des effets arythmogènes observés (Kaumann, 1994; Lezoualc'h *et coll.*, 2007). La 5-HT active les récepteurs 5-HT₄ auriculaires, ce qui entraîne

l'augmentation de la contractilité cardiaque en accélérant la relaxation du myocarde (Kaumann *et coll.*, 1990; Sanders et Kaumann, 1992; Kaumann *et coll.*, 1996). Chez les patients souffrant de fibrillation atriale chronique, une surexpression de l'isoforme 5-HT_{4B} est détectée dans les oreillettes (Lezoualc'h *et coll.*, 2007). Les récepteurs 5-HT₄ sont également exprimés dans les ventricules cardiaques humains (Bach *et coll.*, 2001), leur fonction est alors plus difficile à mettre en évidence. En effet, le récepteur 5-HT₄ est couplé positivement à l'adénylate cyclase via une protéine Gs; et son activation entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. Dans les ventricules cardiaques, l'AMPc est hydrolysé par les phosphodiestérases (PDE), estompant ainsi l'effet de l'activation du récepteur ventriculaire 5-HT₄. L'utilisation d'un inhibiteur non spécifique des PDE, l'IBMX (*isobutyl-methyl-xanthine*), a cependant permis de confirmer le rôle inotrope positif de la sérotonine, associée à une accélération de la relaxation et à une arythmie de contraction des trabécules ventriculaires (Brattelid *et coll.*, 2004). Finalement, l'augmentation de la quantité des transcrits du récepteur 5-HT₄ d'un facteur 4 observée dans les cœurs défaillants chez l'homme confirme le rôle important de ce récepteur dans la physiologie cardiaque (Brattelid *et coll.*, 2004).

II.2.2.b. Récepteurs sérotoninergiques cardiaques chez le rat

Chez le cochon d'inde et le rat, l'expression et la fonctionnalité des récepteurs 5-HT₄ ont également été montrées (Qvigstad *et coll.*, 2005a). Chez le rat, la sérotonine a un effet inotrope positif uniquement dans les cœurs défaillants, cette action étant alors relayée par une surexpression des récepteurs 5-HT₄ et 5-HT_{2A} dans le cœur infarctué (Qvigstad *et coll.*, 2005a; Qvigstad *et coll.*, 2005b).

Une étude réalisée en 2005 par Gustafsson *et coll.*, montre l'expression du SERT par la technique de RT-PCR dans les valves aortiques de rat (Gustafsson *et coll.*, 2005).

II.2.2.c. Récepteurs sérotoninergiques cardiaques chez la souris

La signalisation sérotoninergique cardiaque chez la souris est assez différente de celle décrite chez l'homme ou chez le rat, en partie parce que le récepteur 5-HT₄ n'y est pas exprimé. Le récepteur sérotoninergique murin majeur dans la régulation des fonctions cardiaques par la sérotonine est le récepteur 5-HT_{2B}. En effet, les travaux pionniers menés par l'équipe de Luc Maroteaux sur le récepteur 5-HT_{2B} ont révélé son importance, tout d'abord dans le développement cardiaque, puis dans la physiologie cardiaque.

Implication du récepteur 5-HT_{2B} dans le développement du cœur de souris: La sérotonine et le récepteur 5-HT_{2B} sont impliqués dans les mouvements morphogénétiques cardiaques dès le jour embryonnaire 8 (Yavarone *et coll.*, 1993; Choi *et coll.*, 1997). Le traitement d'embryons de souris entre E8 et E9 par la ritansérine, un antagoniste des récepteurs 5-HT₂, induit une organisation anormale des sarcomères de la couche sous-endocardique ainsi qu'une forte réduction du nombre de cellules trabéculaires dans le myocarde ventriculaire. Ces résultats ont été confirmés par l'étude du phénotype des souris dont le gène codant le récepteur 5-HT_{2B} est invalidé. Ainsi, la délétion de ce récepteur provoque des anomalies du développement cardiaque qui induisent une létalité embryonnaire et néonatale partielle qui survient vers le 10^{ème} jour de développement (Nebigil *et coll.*, 2000). Cette première phase de létalité conduit à la mort *in utero* de 30% des embryons. Durant la première semaine de vie postnatale, une seconde phase de létalité affecte 30% des souriceaux nouveau-nés. L'étude histologique de la couche compacte du myocarde des embryons 5-HT_{2B}^{-/-} à 10 jours montre une différenciation prématuée des cellules trabéculaires qui formeront le myocarde, affectant ainsi l'organisation des sarcomères. La différenciation précoce s'accompagne d'un défaut de prolifération et de migration des cellules trabéculaires, conduisant à l'hypoplasie des ventricules dont les parois se trouvent très amincies. La rupture de ces parois est sans doute la cause de cette létalité.

Implication du récepteur 5-HT_{2B} dans la fonction cardiaque: La sérotonine, en stimulant le récepteur 5-HT_{2B}, est impliquée dans la structure et la fonction des cardiomyocytes adultes. En effet, les souris 5-HT_{2B}^{-/-} qui survivent présentent à l'âge adulte des caractéristiques morphologiques, moléculaires et biochimiques similaires à celles de patients souffrant d'une cardiomyopathie dilatée (CMD) (Nebigil *et coll.*, 2001b).

Les animaux mutants présentent à l'âge de 6 semaines une CMD qui se caractérise par une réduction de 24% de la masse ventriculaire cardiaque, une dilatation de la chambre ventriculaire gauche accompagnée d'un amincissement des parois ventriculaires (paroi postérieure et septum) (Figure 28). Ces anomalies morphologiques, d'abord identifiées par une analyse histologique ont été confirmées par échocardiographie chez des souris âgées de 19 semaines.

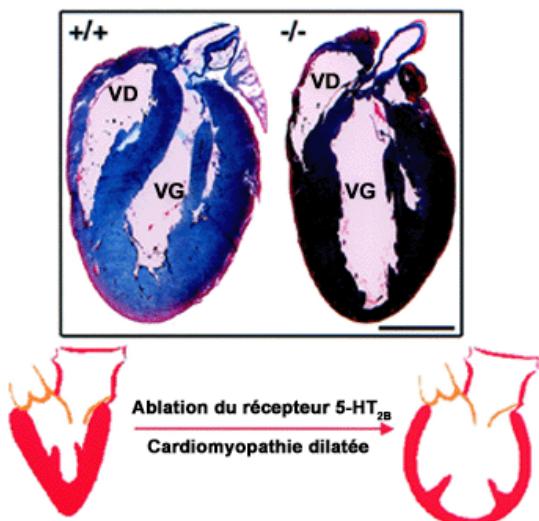
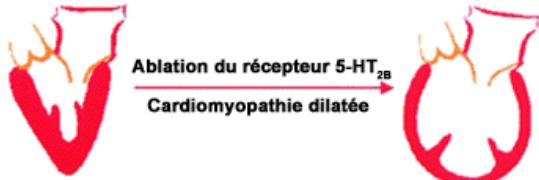


Figure 28: Cardiomyopathie dilatée développée par les souris 5-HT_{2B}^{-/-} (d'après Nebigil et Maroteaux, 2003).

Coupes sagittales représentatives du cœur adulte d'un souris 5-HT_{2B}^{+/+} vs. 5-HT_{2B}^{-/-}. VD: ventricule droit ; VG: ventricule gauche. Barre d'échelle: 200μM.



La mesure des diamètres du ventricule gauche en systole et en diastole permet d'évaluer la contractilité cardiaque, en mesurant la fraction d'éjection systolique. Ce paramètre est significativement diminué chez les mâles 5-HT_{2B}^{-/-}, démontrant ainsi un défaut de contractilité (Nebigil *et coll.*, 2001a; Nebigil *et coll.*, 2001b). Ce défaut est lié à la diminution significative des N-cadhéries, molécules d'adhésion, et à la présence de disques intercalaires anormaux entre les cardiomyocytes de ces souris. Par ailleurs, l'analyse biochimique de marqueurs de souffrance cardiaque couramment utilisés en pathologie humaine tels que la CK-MB (*Creatin Kinase-Muscle Brain*) ou la troponine I cardio-spécifique, a montré une augmentation du taux de ces marqueurs dans le sérum des souris 5-HT_{2B}^{-/-} par rapport aux souris sauvages.

De façon inattendue, la cardiopathie dilatée induite par la délétion du gène du récepteur 5-HT_{2B} n'est pas compensée par un phénomène de type hypertrophique, comme l'on pourrait s'y attendre. En effet, un stress biomécanique induit par la réduction de la masse ventriculaire provoque généralement la réexpression de gènes embryonnaires impliqués dans l'hypertrophie compensatrice, tels que la protéine β-MHC (*Myosin Heavy Chain*) ou l'ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*). Cette réexpression n'est pas observée dans les coeurs des animaux 5-HT_{2B}^{-/-} (Nebigil *et coll.*, 2001b).

En revanche, la surexpression du récepteur 5-HT_{2B} spécifiquement dans les cardiomyocytes entraîne le développement d'une cardiomyopathie hypertrophique (CMH) chez les souris transgéniques (Nebigil *et coll.*, 2003). Les parois ventriculaires gauches sont alors épaissies, sans que les paramètres hémodynamiques (contractilité cardiaque, pression artérielle et fréquence cardiaque) ne soient altérés. Les caractéristiques morphologiques de la CMH sont confirmées par la surexpression des marqueurs biochimiques de l'hypertrophie cardiaque β-MHC et ANP. Enfin, le cœur des souris transgéniques présente un nombre anormalement élevé de mitochondries ainsi qu'une augmentation de l'activité

enzymatique de la succinate déshydrogénase et de la cytochrome c oxydase, enzymes associées au métabolisme mitochondrial (Nebigil *et coll.*, 2003).

Dans le processus d'hypertrophie cardiaque, la sérotonine intervient préférentiellement au niveau des fibroblastes cardiaques. En effet, l'invalidation génétique ou pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B} chez la souris empêche en partie le développement de l'hypertrophie cardiaque provoquée par perfusion chronique d'isoprénaline (agoniste β -adrénergique). L'augmentation attendue du taux plasmatique de certaines cytokines, normalement sécrétées par les fibroblastes cardiaques dans ce modèle d'hypertrophie provoquée, parmi lesquelles l'IL-1 β (interleukine 1 β) et le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) n'est alors pas retrouvée chez les souris invalidées génétiquement ou pharmacologiquement pour ce récepteur. Par son action sur la libération des cytokines hypertrophiantes par les fibroblastes cardiaques, le récepteur 5-HT_{2B} est indispensable au développement de l'hypertrophie cardiaque induite par la stimulation β adrénnergique (Jaffre *et coll.*, 2004).

Finalement, le transport de la sérotonine à l'intérieur des cardiomycocytes favoriserait le développement de l'hypertrophie cardiaque (Bianchi *et coll.*, 2005). La sérotonine est internalisée dans le cardiomycocyte de rat, dans lequel elle est dégradée par la monoamine oxydase A mitochondriale. La MAO-A est alors la source de production d' H_2O_2 qui, convertie en ROS (*Reactive Oxygen Species*), active les kinases ERK hypertrophiantes (Figure 29). Dans cette étude, le mécanisme d'entrée de la sérotonine dans les cardiomycocytes de rat en culture est bloqué par l'ajout d'imipramine, molécule de la famille des antidépresseurs tricycliques (§I.5.1.b, page 28). Cette molécule agissant à la fois sur le SERT et sur le NET, le mécanisme de recapture de la sérotonine dans les cardiomycocytes reste à élucider.

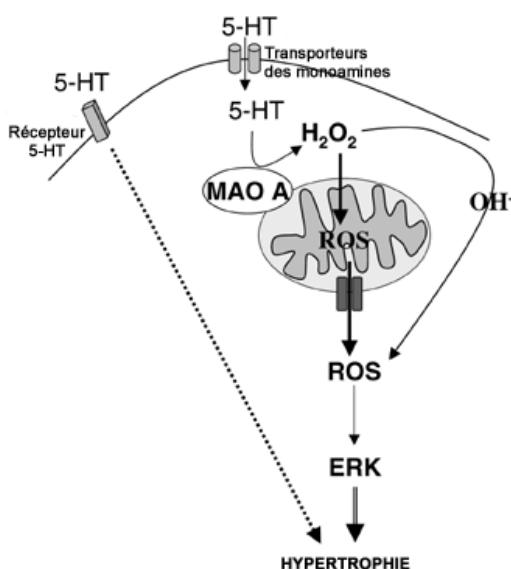


Figure 29: Mécanismes d'action de la sérotonine menant à l'hypertrophie des cardiomycocytes (d'après Bianchi *et coll.*, 2005).

La sérotonine, internalisée dans le cardiomycocyte par un transporteur spécifique des monoamines, est dégradée par les MAO-A mitochondrielles. La déamination produit de l' H_2O_2 dont la transformation en ROS active les kinases hypertrophiantes ERK. Par ailleurs, la sérotonine a également un rôle hypertrophiant par l'intermédiaire de ses récepteurs exprimés par les cardiomycocytes, dont le récepteur 5-HT_{2B}.

II.2.2.d. Pathologies cardiaques et sérotonine

Le récepteur 5-HT_{2B} humain est exprimé au niveau des valves (Figure 27). Il est une cible des molécules "anorexigènes" évoquées précédemment, en particulier la norfenfluramine, et est à l'origine de ses effets secondaires au niveau des valves cardiaques. La cardiopathie valvulaire se définit comme un épaississement fibreux de l'endocarde conduisant à des anomalies de fonctionnement des valves tricuspidé et pulmonaire, de type régurgitation. La pathologie valvulaire induite par l'utilisation de médicaments anorexigènes de type dexfenfluramine, se caractérise par une prolifération de myofibroblastes. Cette atteinte est identique, sur le plan histopathologique à celle que l'on peut observer dans la maladie carcinoïde ou après une utilisation prolongée des dérivés de l'ergot de seigle présentant une forte affinité pour les récepteurs 5-HT_{2B} (ergotamine, methysergide) (Connolly *et coll.*, 1997; Kulke et Mayer, 1999). La norfenfluramine, principal métabolite de la dexfenfluramine, présente une très forte affinité pour les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}, les transcrits du premier étant 300 fois plus importants que les transcrits du second dans les valves cardiaques. La stimulation préférentielle du récepteur 5-HT_{2B} valvulaire par la norfenfluramine, les dérivés de l'ergot de seigle ou la sérotonine (provenant par exemple des tumeurs carcinoïdes) serait à l'origine de la fibroplasie observée chez l'homme (Fitzgerald *et coll.*, 2000).

III. Conclusion

Par sa présence dans les plaquettes sanguines, et par l'expression de ses récepteurs dans tous les organes, la sérotonine agit sur tous les systèmes qui régulent l'homéostasie d'un organisme, parmi lesquels les systèmes sanguin et cardiovasculaire.

La recherche des mécanismes d'action de la sérotonine périphérique dans la régulation de la physiologie cardiovasculaire a été axée principalement sur les récepteurs sérotoninergiques mis en jeu. Dans ce sens, la 5-HT régule la fréquence et la contractilité cardiaques chez la souris par la signalisation intracellulaire qui dépend des récepteurs de type 5-HT_{2B}. Des variations du taux de sérotonine, en particulier à la périphérie, peuvent également avoir des répercussions majeures sur le fonctionnement du système cardiovasculaire. Les souris *Tph1*^{-/-}, avec un taux réduit de 5-HT uniquement à la périphérie constituent un modèle de choix pour étudier les effets de telles variations.

Objectifs

L'objectif principal de ce travail de thèse était de caractériser les souris dont le gène *Tph1* est invalidé.

L'étude moléculaire et biochimique des souris *Tph1*^{-/-} nous a conduits à mettre en évidence l'existence d'un second gène *Tph*, le gène *Tph2*. Les souris *Tph1*^{-/-}, avec un taux réduit de sérotonine uniquement à la périphérie, présentaient un phénotype cardiaque flagrant.

Le second objectif était de préciser le rôle spécifique de la sérotonine circulante dans la régulation de la fonction cardiaque. Le travail a été mené en 2 temps: La caractérisation fonctionnelle du phénotype cardiaque des souris *Tph1*^{-/-}, puis la recherche des mécanismes d'action de la sérotonine circulante sur le muscle cardiaque.

Ces travaux nous ont amenés à considérer le rôle de la sérotonine circulante au cours du développement embryonnaire. Le troisième objectif était de préciser les rôles respectifs de la sérotonine maternelle et de la sérotonine de l'embryon puis de l'animal adulte dans la régulation de la fonction cardiaque.

Résultats & Commentaires

Dans la première partie de ce chapitre, je présenterai la lignée de souris *Tph1*^{-/-} générée au laboratoire avant mon arrivée, qui a constitué le modèle d'étude de mon travail de thèse. J'exposerai ensuite les observations initiales que nous avons faites sur les premiers animaux *Tph1*^{-/-}, dont ont découlé nos travaux.

Pour une meilleure compréhension, j'ai choisi de regrouper au sein d'un même chapitre des résultats expérimentaux publiés séparément, dans la mesure où un des articles en cours de préparation est la continuité de notre premier travail. Les résultats présentés dans ce chapitre sont complétés par rapport à ceux présentés dans les publications. Des informations complémentaires non publiées sont également présentées.

Ce travail a déjà donné lieu à deux articles et une revue. Nos derniers travaux feront l'objet de deux autres publications, dont les manuscrits sont en cours de rédaction. Les articles publiés sont joints en annexe.

Première partie: Régulation de la fonction cardiaque par la sérotonine circulante

I. Invalidation du gène *Tph1* chez la souris

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du rôle de la sérotonine *in vivo* par inactivation du gène *Tph* chez la souris. L'inactivation constitutive du gène *Tph* (qui s'est révélé être le gène *Tph1*) chez la souris a été réalisée par recombinaison homologue. Cette approche permet d'introduire des mutations spécifiques au niveau d'un gène donné et de transmettre cette mutation aux cellules de la lignée germinale. La stratégie de *knock-in* du gène rapporteur *nlsLacZ* (*nuclear localization signal LacZ*) a été adoptée, de manière à faire exprimer le gène *LacZ* en lieu et place du gène *Tph*.

Au moment où ces constructions ont été réalisées, un seul gène *Tph* était connu: le gène *Tph1*. Le gène *nlsLacZ* a été inséré dans l'exon 2 du gène *Tph*, en phase avec le codon ATG d'initiation de la traduction (Figure 30).

Les régions d'homologies en amont et en aval de la cassette *nlsLacZneo* ont une taille de 500 pb et de 6,5 kb respectivement. Après plusieurs cycles d'électroporation, un clone ES recombiné homologue portant le gène *nlsLacZ* dans le locus *Tph* a été isolé parmi les 768

clones testés. Par les techniques classiques d'injection de cellules ES dans des blastocystes, 9 souris chimères ont été obtenues, parmi lesquelles 5 présentaient un taux de chimérisme supérieur à 99%. Une transmission efficace de la mutation dans la lignée germinale a permis l'obtention des descendances hétérozygotes et homozygotes pour la mutation.

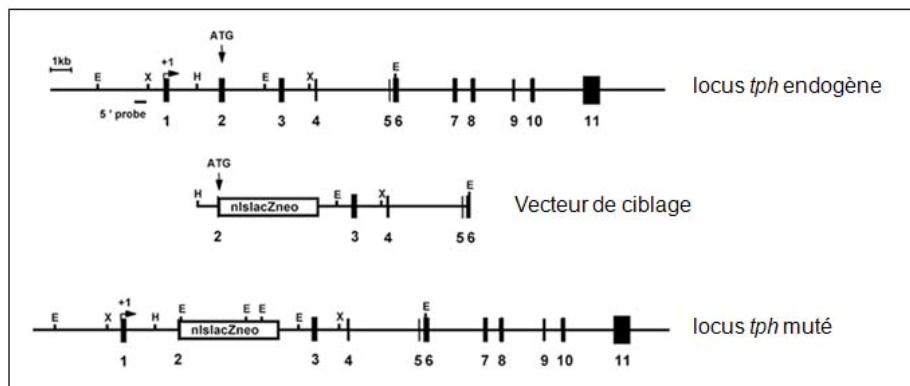


Figure 30: Stratégie de ciblage du gène *Tph1* (d'après Cote *et coll.*, 2003).

La sonde nucléotidique utilisée pour l'analyse de l'événement de recombinaison est située dans la partie 5' non traduite du locus *Tph* endogène.

Deux lignées de souris ont été dérivées sur les fonds génétiques 129/SvJ (fond pur) et C57BL/6-129SvJ (fond mixte). Lors de mon arrivée au laboratoire en février 2002, les souris chimères porteuses de la mutation dans le gène *Tph1* étaient disponibles. Les premiers animaux *Tph1^{+/−}* puis *Tph1^{−/−}* furent obtenus en juin 2002. Dans les deux lignées de souris générées, les animaux *Tph1^{−/−}* qui proviennent de croisements entre parents hétérozygotes sont obtenus avec la fréquence mendélienne attendue, ce qui indique l'absence de létalité embryonnaire (Figure 31). Les souris mutées sont viables et se développent jusqu'à l'âge adulte.

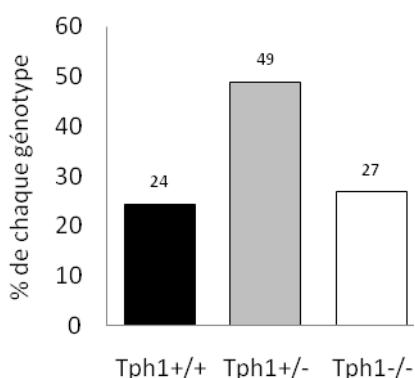


Figure 31: Génotype des souris issues de croisements entre animaux *Tph1^{+/−}*.

Le pourcentage de chaque génotype a été calculé à partir de 410 animaux issus de 52 portées. Les homozygotes mutants (110 sur 410) représentent 27% des animaux.

II. Découverte du gène *Tph2*

L'observation, *a priori* inattendue, de la viabilité des souris *Tph1^{-/-}*, nous a conduits à vérifier chez les souris mutantes *Tph1^{-/-}* que le gène *Tph1* était bien invalidé. Par une approche immunohistochimique, nous avons mis en évidence l'expression de la β -galactosidase dans la glande pinéale des animaux mutants, à la place de la TPH, tandis que dans les noyaux du raphé dorsal, la TPH est toujours détectée par immunohistochimie (Figure 32).

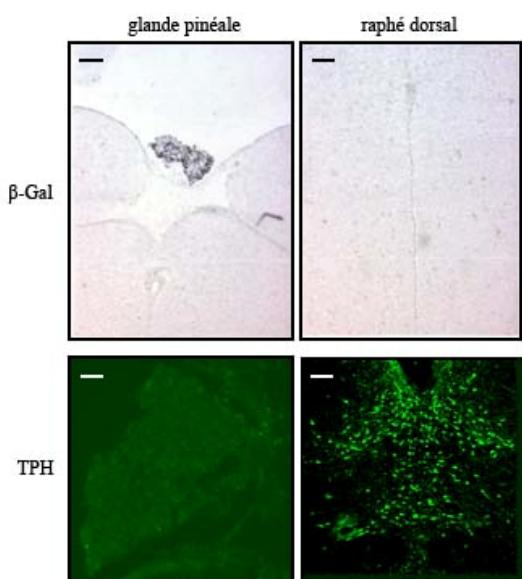


Figure 32: Analyse immunohistochimique de la glande pinéale et du raphé dorsal des souris *Tph1^{-/-}* (d'après Cote *et coll.*, 2003).
Barre d'échelle = 0.1mm.

Les dosages des taux de sérotonine par HPLC ont montré la présence de 5-HT dans le tronc cérébral (Figure 33). En revanche, un effondrement du taux de 5-HT est observé dans la glande pinéale, les intestins et dans le sang des souris *Tph1^{-/-}*. Le taux résiduel moyen de 5-HT est de 4% et 8% dans les intestins et le sang respectivement (Figure 33).

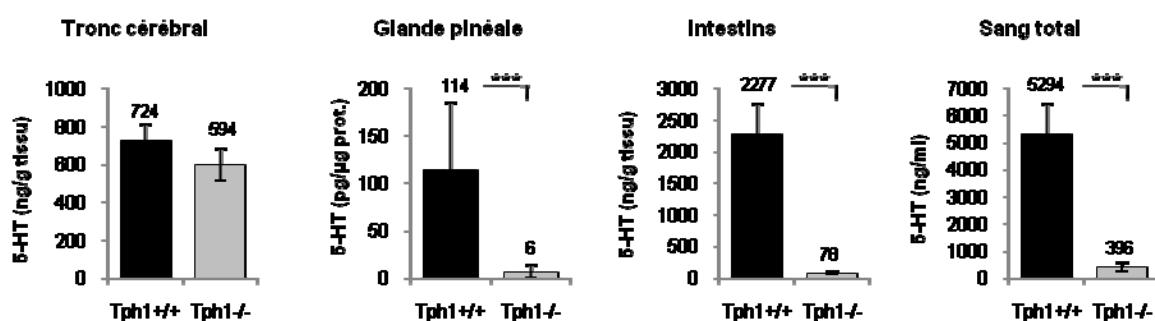


Figure 33: Détermination du taux de sérotonine par HPLC chez les souris *Tph1^{-/-}* comparées aux souris *Tph1^{+/+}* (d'après Cote *et coll.*, 2003).

Les calculs ont été effectués sur 71 souris: tronc cérébral (*Tph1^{-/-}*, n=11 et *Tph1^{+/+}*, n=8), glande pinéale (*Tph1^{-/-}*, n=17 et *Tph1^{+/+}*, n=7), intestins (*Tph1^{-/-}*, n=10 et *Tph1^{+/+}*, n=4) et sang (*Tph1^{-/-}*, n=7 et *Tph1^{+/+}*, n=7). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard. ***p<0.001.

Ces données indiquent que l'inactivation du gène *Tph* a eu lieu uniquement dans la glande pinéale et les intestins. Prises dans leur ensemble, ces observations suggéraient l'existence d'un second gène *Tph*, en accord avec l'hypothèse préalablement émise au laboratoire (§II.2.2, page 36). Le criblage *in silico* de la banque de séquence génomique de souris, disponible depuis novembre 2002 (www.ensembl.org) a confirmé l'existence d'un deuxième gène *Tph*, le gène *Tph2*.

L'identification d'une nouvelle enzyme de biosynthèse de la sérotonine nous a amenés à déterminer par hybridation *in situ* le profil d'expression de chacun des deux gènes *Tph* au niveau des sites connus de synthèse de 5-HT. Aucun signal correspondant à l'ARNm *Tph1* n'est détecté dans le noyau du raphé dorsal des animaux, aussi bien sauvages que mutants (Figure 34). L'analyse de l'expression des ARNm β -Gal dans cette structure a conduit au même résultat. En revanche, l'ARNm *Tph2* est présent dans le noyau du raphé dorsal des souris sauvages et mutantes (Figure 34). Dans la glande pinéale, la très forte expression de l'ARNm *Tph1* observée chez les animaux sauvages (Figure 34) coïncide avec une très forte expression de l'ARNm β -Gal chez les animaux mutants (Figure 34). Aucune expression d'ARNm *Tph2* n'est détectée dans la glande pinéale des animaux sauvages et mutants.

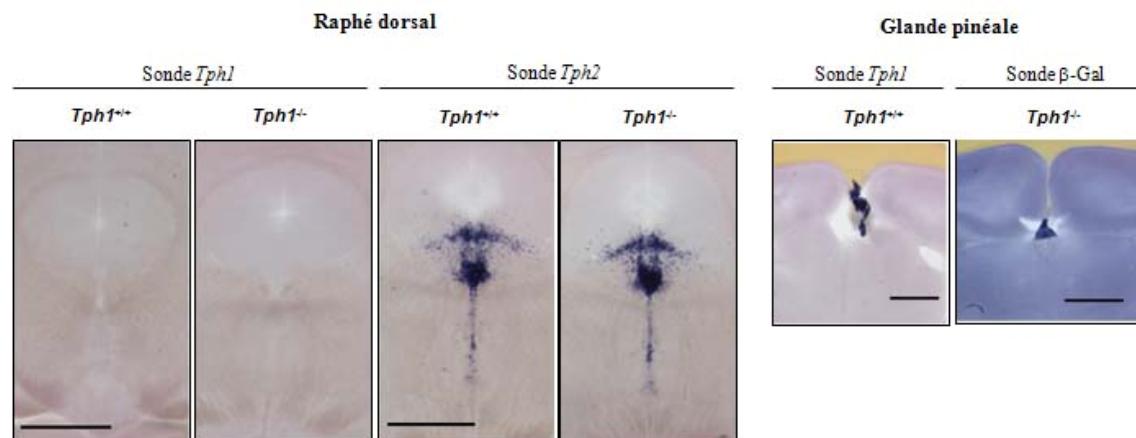


Figure 34: Expression différentielle des enzymes TPH1, TPH2 et β -Gal, révélée par hybridation *in situ* (d'après Cote *et coll.*, 2003).
Barre d'échelle = 1mm.

III. Quelles sont les conséquences de l'absence de sérotonine circulante ?

Quelles sont les conséquences physiologiques et physiopathologiques de l'effondrement du taux de sérotonine circulante chez les animaux *Tph1*^{-/-}? D'un point de vue phénotypique, les premières souris *Tph1*^{-/-} étaient de façon générale de plus petite taille que les souris *Tph1*^{+/+} et sauvages. Parmi les animaux mutants, un certain nombre présentait des signes de pâleur générale, de cachexie, ainsi que des difficultés respiratoires, suggérant des anomalies de circulation sanguine (Figure 35). Ces symptômes étaient graduels, tant au niveau de leur sévérité qu'au niveau de l'âge des souris étudiées.



Figure 35: Phénotype des souris homozygotes *Tph1*^{-/-}.

Les 3 souris mutées *Tph1*^{-/-} présentent des signes d'épuisement, des difficultés respiratoires et une pâleur générale.

Les premières autopsies révélèrent une cardiomégalie flagrante (Figure 36), sans montrer de lésions histologiques apparentes au niveau cardiovasculaire (Figure 37). Nous avons confirmé l'absence d'anomalies structurales sur deux autres organes, les reins et les poumons (Figure 37).

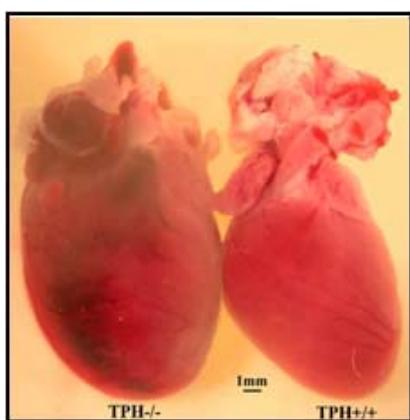


Figure 36: Morphologie cardiaque externe de souris *Tph1*^{-/-} vs. *Tph1*^{+/+}, âgées de 26 semaines (d'après Cote et coll., 2003). La taille du cœur de l'animal mutant est augmentée de 26% par rapport à celle de l'animal sauvage. Barre d'échelle = 1mm

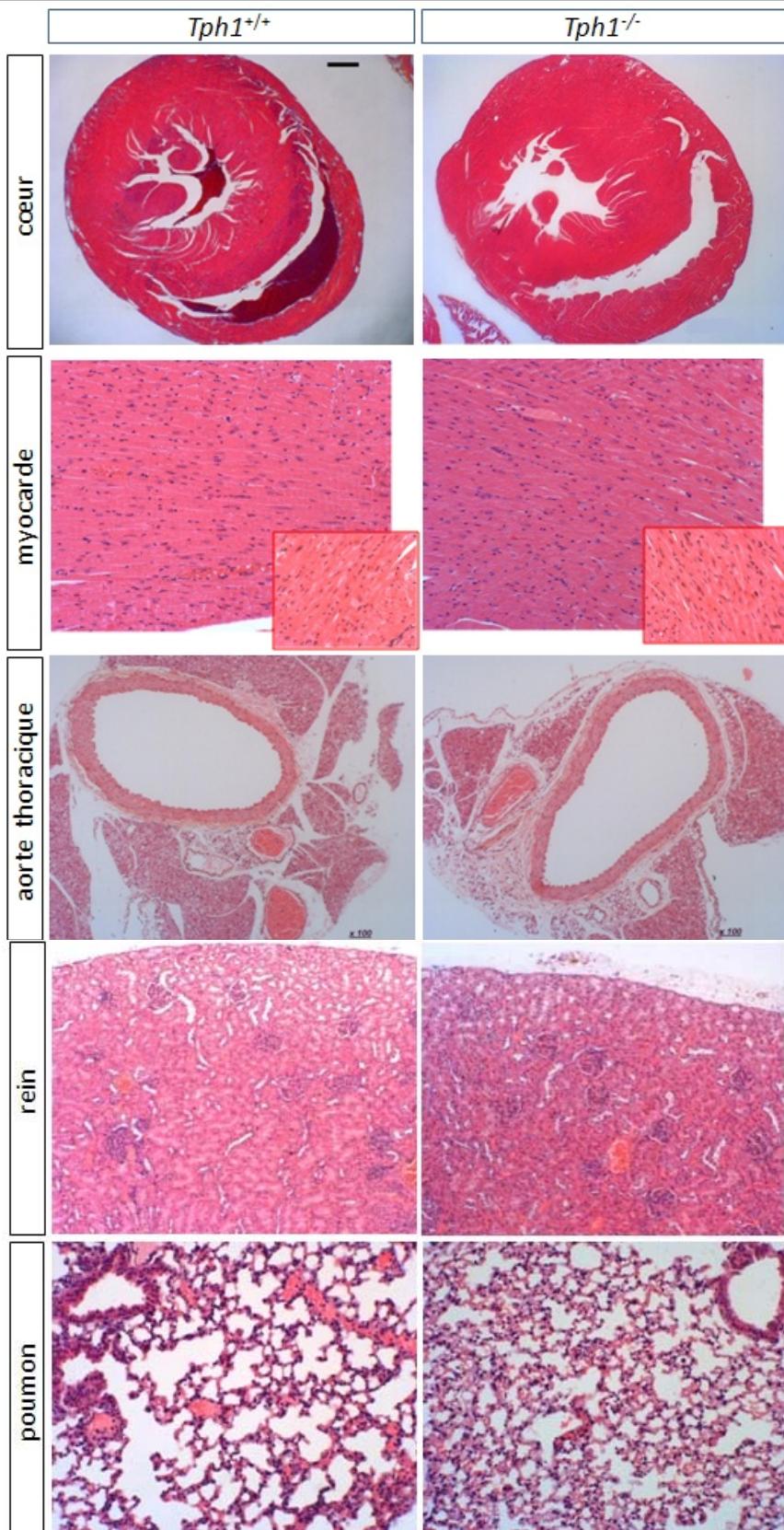


Figure 37: Comparaison histologique des organes des souris *Tph1*^{-/-} vs. *Tph1*^{+/+}.

Après prélèvement, les organes sont fixés dans la paraformaldéhyde 4% puis inclus dans des blocs de paraffine. Des coupes de 10 μ M d'épaisseur sont réalisées puis les tissus sont colorés à l'hématoxyline-éosine afin de mettre en évidence l'organisation cytologique et histologique de chaque organe. Grossissements: myocarde Gx400, aorte thoracique Gx100, rein Gx100, poumon Gx200.

III.1. Caractérisation fonctionnelle du phénotype cardiaque

L'organisation histologique cardiaque conservée chez les souris *Tph1*^{-/-} suggère que la taille aberrante du cœur est la conséquence d'un dysfonctionnement plutôt que d'une malformation.

III.1.1. Analyse de la contractilité cardiaque en condition basale

L'analyse des paramètres hémodynamiques cardiaques de ces souris par cathéterisation de conductance a révélé que les souris *Tph1*^{-/-} présentent un rythme cardiaque significativement plus élevé que les souris sauvages (Figure 38). La moyenne de la variation maximale de la pression intra-ventriculaire (dP/dt max), qui est un indicateur de la contractilité du myocarde, n'est en revanche pas modifiée entre les 2 groupes d'animaux (Figure 38).

De façon remarquable, le spectre de distribution des valeurs de fréquence cardiaque et de dP/dt max était beaucoup plus large chez les animaux *Tph1*^{-/-} que chez les animaux contrôles (Figure 38), révélant l'hétérogénéité importante du phénotype cardiaque des souris mutées. Des souris du même âge, par exemple les souris n° 273 et 296, présentaient des stades différents de l'évolution de la pathologie. Cette observation indiquait que l'hétérogénéité du phénotype cardiaque des souris *Tph1*^{-/-} n'était pas liée à l'âge.

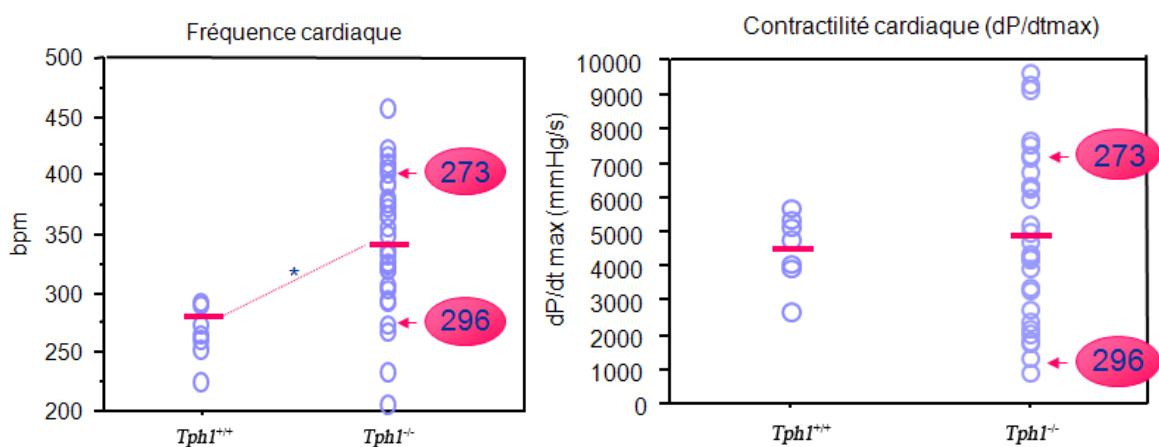


Figure 38: Exploration des caractéristiques hémodynamiques cardiaques des souris *Tph1*^{-/-} vs. *Tph1*^{+/+} par cathéterisation de conductance (d'après Cote *et coll.*, 2003).

La fréquence cardiaque dérive de la pression exercée par le sang sur le ventricule gauche. La moyenne des valeurs individuelles de dP/dt max n'est pas modifiée chez les souris *Tph1*^{-/-}. En revanche, le spectre de distribution de ces valeurs individuelles est beaucoup plus large chez les animaux mutés. *Tph1*^{-/-} (n=30), *Tph1*^{+/+} (n=7). *p<0.05.

Nous avons analysé les paramètres hémodynamiques cardiaques des deux souris *Tph1*^{-/-} n°273 et 296 qui présentaient des valeurs extrêmes de fréquence cardiaque et de contractilité. Les paramètres dérivés de l'analyse d'une série de courbes pression-volume obtenues en faisant varier les conditions de charge du ventricule gauche sont reportés Figure 39 pour ces deux souris, comparées au contrôle. La souris mutante n° 273 développe les premiers signes d'atteinte cardiaque puisqu'elle est contrainte d'augmenter sa fréquence cardiaque pour compenser la perte de contractilité de son cœur. De cette façon, elle est capable de maintenir le débit sanguin nécessaire à la bonne oxygénation de son organisme. Cette étape correspond à une phase de compensation. Cette augmentation de la fréquence cardiaque ne peut être maintenue pendant une longue période et le muscle cardiaque se relâche alors progressivement. C'est le cas de la souris n° 296 qui n'est plus apte à maintenir un débit cardiaque suffisant, puisque son cœur perd ses capacités de contractilité. Ceci correspond à une phase de décompensation qui entraîne une insuffisance cardiaque sévère, fatale pour l'animal.

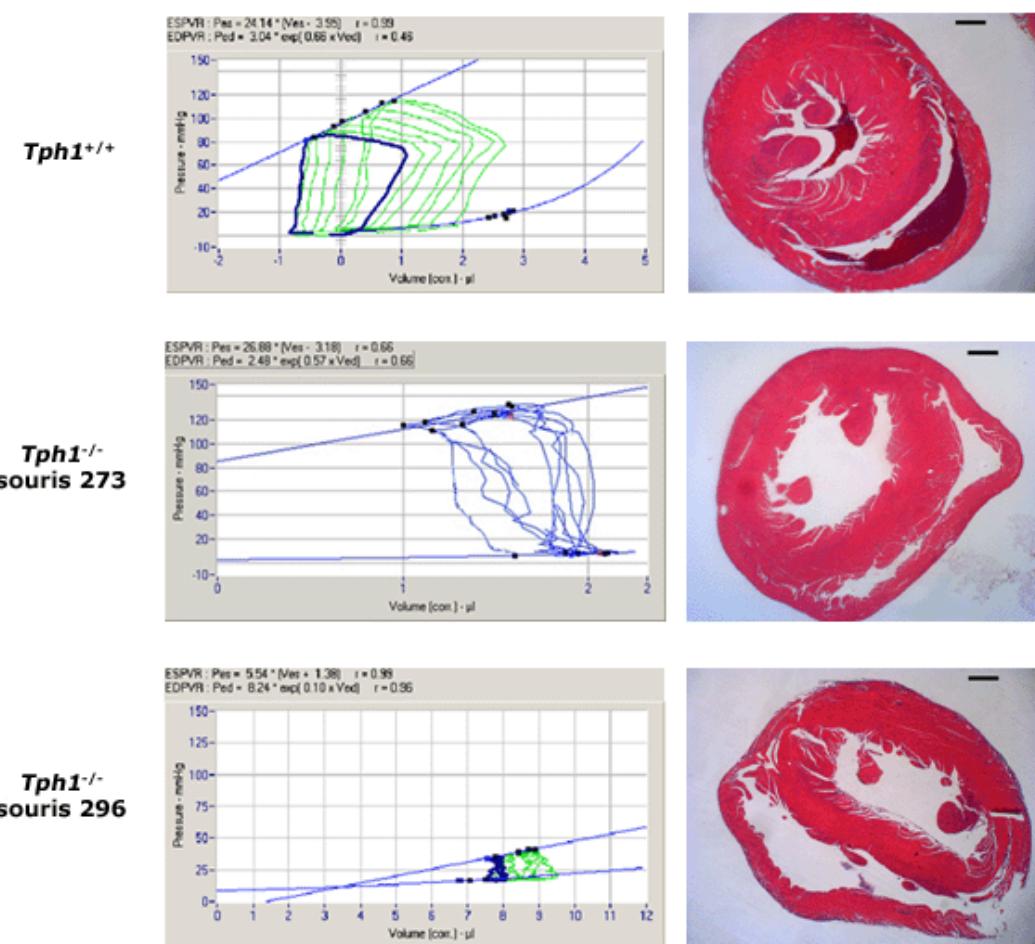


Figure 39: Corrélation entre les courbes pression-volume et l'histologie cardiaque des deux souris mutantes *Tph1*^{-/-} (273 et 296), comparées à une souris contrôle (d'après (Cote et coll., 2003)).
Barre d'échelle = 1 mm.

L'analyse histopathologique du cœur de ces deux souris (273 et 296) ainsi que de deux souris *Tph1^{+/+}* n'a pas montré d'anomalies majeures de l'organisation cytologique et histologique cardiaque, comme nous l'avons montré précédemment (Figure 37). La souris 273 présente cependant une surface ventriculaire gauche diminuée par rapport à l'animal sauvage (4,16 mm relatif à 7,15 mm). La souris 296, quant à elle, présente une cavité gauche ovalaire augmentée, avec un diamètre multiplié par 3 en comparaison du diamètre ventriculaire gauche de la souris contrôle.

Deux paramètres cardiaques apparaissaient particulièrement affectés par le faible taux de sérotonine circulante: la fréquence cardiaque (FC) et la contractilité cardiaque. L'activité contractile du cœur est précédée et déclenchée par une activité électrique qui permet une modulation précise de la fréquence et de l'intensité des battements, la synchronisation de la contraction des cellules d'une même cavité cardiaque, ainsi que l'enchaînement séquentiel des contractions des différentes régions du cœur. Nous avons alors cherché à déterminer si les modifications de FC et de contractilité cardiaque observées étaient la conséquence d'une modification de l'activité électrique cardiaque ou de la réponse mécanique du muscle cardiaque.

III.1.2. L'activité électrique cardiaque est-elle altérée chez les souris *Tph1^{-/-}* ?

La fréquence cardiaque des animaux *Tph1^{-/-}* a été mesurée par électrocardiographie (ECG) sur des animaux vigiles, afin de nous affranchir des effets de l'anesthésie.

L'enregistrement d'un grand nombre de battements cardiaques (~17 000 par animal) a permis de mettre en évidence une diminution significative de la fréquence cardiaque chez les animaux *Tph1^{-/-}* (Tableau 3), due à un allongement de la durée entre deux battements consécutifs (intervalle RR, Tableau 3), sans que la déviation standard autour de la moyenne ne soit modifiée (SDNN, Tableau 3). Cette dernière donnée indique qu'à l'inverse des valeurs de contractilité cardiaque, celles de fréquence cardiaque mesurées chez les souris *Tph1^{-/-}* sont homogènes.

Ce résultat peut paraître surprenant dans la mesure où nous venons de montrer une augmentation de la FC lorsque les mesures étaient réalisées par cathéterisation de conductance (Figure 38, page 79). Ceci peut s'expliquer par le fait que les deux séries d'expériences n'ont pas été réalisées à la même période, et que les animaux analysés par cathéterisation de conductance étaient générés au départ sur un fond génétique mixte C57BL/6-129SvJ, tandis que le fond génétique des animaux analysés par ECG était pur

C57BL/6. Nous reviendrons sur les différences de phénotypes entre les deux fonds génétiques dans le dernier chapitre des résultats.

Nous avons réalisé une analyse plus poussée de l'activité électrique cardiaque des souris *Tph1*^{-/-}. L'index triangulaire de la variabilité du rythme cardiaque (HRV) est une mesure géométrique de la variabilité du rythme cardiaque, dont le calcul dérive du nombre d'intervalles RR, de leur durée et de leur répartition dans un intervalle de temps donné. Il reflète l'activité générale du système nerveux autonome, entre autre la régulation du tonus sympathique/parasympathique. L'index de la HRV est significativement augmenté chez les animaux *Tph1*^{-/-} (Tableau 3). Cette observation indique que le faible taux de sérotonine circulante chez les souris *Tph1*^{-/-} affecte la régulation du tonus sympathique/parasympathique, et en conséquence, la fréquence cardiaque. Nous reviendrons sur ce point dans la suite de ce mémoire.

	N	RR (ms)	SDNN (ms)	index triangulaire de la HRV
<i>Tph1</i> ^{+/+}	17228 ± 5410	80.100 ± 2.459	2.090 ± 0.690	3.567 ± 0.805
<i>Tph1</i> ^{-/-}	16667 ± 1253	83.476 ± 2.605*	2.707 ± 0.757	5.000 ± 1.305*

Tableau 3: Variabilité du rythme cardiaque mesuré par électrocardiographie chez les souris *Tph1*^{-/-} vs. *Tph1*^{+/+}.

N: nombre de battements cardiaques analysés ; RR: intervalle de temps entre deux battements cardiaques consécutifs ; SDNN: déviation standard de la moyenne des intervalles RR. Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard, pour n=5 souris *Tph1*^{-/-} et n=6 souris *Tph1*^{+/+}. *p<0.05.

La variabilité du rythme cardiaque est essentielle pour l'adaptation de l'organisme aux changements environnementaux permanents. L'augmentation de la HRV mesurée chez les souris *Tph1*^{-/-} pourrait donc représenter un avantage pour l'adaptation de leur fonction cardiaque à une modification de l'équilibre homéostatique.

L'observation parallèle de l'exacerbation du phénotype cardiaque des souris mutées en conditions de stress, lors de travaux effectués à proximité de l'animalerie, permettaient toutefois de penser que l'augmentation de la HRV des souris *Tph1*^{-/-} ne permettaient pas d'assurer une fonction cardiaque normale. Afin d'évaluer la capacité d'adaptation du cœur des souris *Tph1*^{-/-} à un changement de l'équilibre homéostatique, un test d'effort a été réalisé par l'injection d'un agent pharmacologique, la dobutamine.

III.1.3. La réponse mécanique cardiaque est-elle modifiée chez les souris *Tph1* en condition de stress ?

Nous avons choisi de réaliser ce test avec la dobutamine, qui est un analogue des catécholamines, couramment utilisé en clinique pour ce genre d'évaluation. Via sa fixation majoritaire au niveau des récepteurs β_1 -adrénergiques, la dobutamine a un effet inotrope (force de contraction), chronotrope (fréquence) et bathmotrope (conduction) positif.

Quinze souris *Tph1*^{-/-} ont subi ce test d'effort sous cathéterisation de conductance (Figure 40). Quatre d'entre elles ont un profil normal (souris *Tph1*^{-/-} non sensibles, courbe verte), i.e. conforme à celui des animaux sauvages: juste après le début de l'administration de la drogue, la contractilité cardiaque augmente jusqu'à atteindre un plateau, se maintient à un niveau élevé, puis diminue lentement jusqu'à retrouver sa valeur initiale dès lors que l'on arrête l'injection. En revanche, pour les onze autres animaux (souris *Tph1*^{-/-} sensibles, courbe rouge), l'injection provoque une faible augmentation de la contractilité puis la mort des animaux par arrêt cardiaque dans les 5 minutes qui suivent le début de l'injection. Ces expériences démontrent que les souris *Tph1*^{-/-} sont incapables de maintenir une activité cardiaque soutenue.

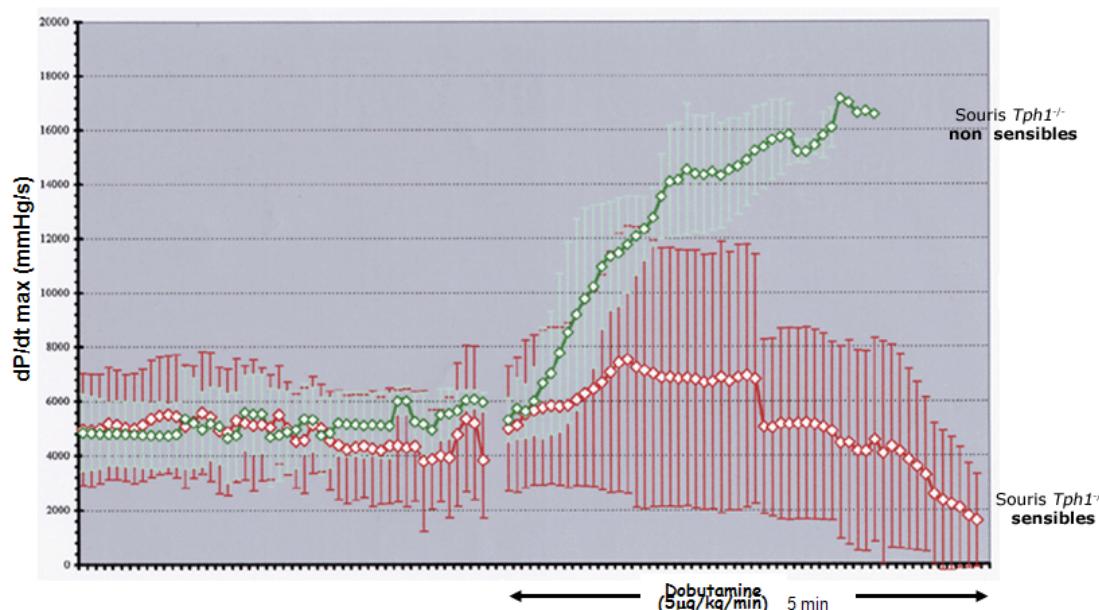


Figure 40: Représentation de la contractilité cardiaque des souris *Tph1*^{-/-} pendant le test d'effort pharmacologique.

La contractilité du muscle cardiaque des souris *Tph1*^{-/-} est enregistrée par cathéterisation de conductance en condition de base. La dobutamine est administrée à la dose de 5 μ g/kg/min, par voie jugulaire, en continu pendant 5 min. 15 souris *Tph1*^{-/-} ont subi ce test. 4 d'entre elles ont un profil conforme à celui des animaux sauvages (vert), et 11 meurent d'un arrêt cardiaque dans les 5 minutes qui suivent le début de l'infusion (rouge). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard.

Entre les deux groupes de souris *Tph1*^{-/-} (sensibles et non sensibles), les valeurs de contractilité cardiaque enregistrées dans les conditions de base n'étaient pas différentes. Nous ne pouvions donc pas prédire la sensibilité ou non à la dobutamine. Là encore, cette expérience mettait en évidence l'hétérogénéité du phénotype cardiaque des souris *Tph1*^{-/-}.

Ces observations indiquent que les souris *Tph1*^{-/-} ne possèdent aucune réserve contractile, c'est-à-dire qu'elles sont incapables de soutenir un effort et ainsi d'assurer une perfusion correcte de l'organisme. A notre connaissance, les souris *Tph1*^{-/-} représentent la seule lignée de souris développant une insuffisance cardiaque, qui meurent suite à l'injection de dobutamine. Nous discuterons de l'implication de ces observations dans le chapitre II, page 135.

III.2. Caractérisation moléculaire du phénotype cardiaque

La dobutamine est un agoniste β_1 adrénergique. En réponse à une augmentation du taux de catécholamines circulantes, ou dans notre cas, suite à l'administration de dobutamine, les récepteurs β -adrénergiques cardiaque augmentent la FC et la force de contraction. Les récepteurs β -adrénergiques cardiaques sont, comme certains des récepteurs sérotoninergiques, couplés aux protéines G activatrices de l'adénylate cyclase (G_s) pour les récepteurs β_1 et β_2 , soit inhibitrices de l'adénylate cyclase (G_i) pour le récepteur β_2 .

Chez les mammifères, le cœur insuffisant est caractérisé par une réduction de la stimulation de l'adénylate cyclase, qui résulte d'une désensibilisation des récepteurs, d'une diminution du nombre de récepteurs ou du découplage des récepteurs. Le phénotype cardiaque des souris *Tph1*^{-/-} pourrait être la conséquence d'une modification de l'expression des récepteurs β -adrénergiques cardiaques, ou d'une désensibilisation de ces récepteurs causée par une augmentation des taux circulants de catécholamines.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce mémoire, l'action de la sérotonine sur le cœur de souris est relayée par les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2B}, et par un transporteur des monoamines, dont la nature n'est pas connue. Le faible taux de sérotonine circulante chez les souris *Tph1*^{-/-} pourrait entraîner des modifications de l'expression de ces composants et en conséquence modifier la régulation de la fréquence et de la contractilité cardiaques.

Nous avons recherché, par des études de liaison, l'expression d'une part des récepteurs β adrénergiques cardiaques, et d'autre part, des récepteurs 5-HT₂ et du transporteur de la sérotonine SERT chez les souris *Tph1^{-/-}* en comparaison avec des souris *Tph1^{+/+}*.

III.2.1. L'expression des récepteurs adrénergiques est-elle modifiée dans le cœur des souris *Tph1^{-/-}* ?

Les études de liaison des récepteurs β -adrénergiques cardiaques réalisées sur des membranes de ventricules de souris *Tph1^{-/-}* en comparaison des souris sauvages établissent clairement qu'il n'y a aucune différence i) dans le nombre des récepteurs (Bmax), ii) dans l'affinité des ligands utilisés pour les récepteurs (Kd), iii) ou encore dans la proportion respective des récepteurs β_1/β_2 entre les cœurs des souris mutées et des souris sauvages (Tableau 4).

	<i>Tph1^{+/+}</i>	<i>Tph1^{-/-}</i>
Kd (nM)	0.03 ± 0.00	0.045 ± 0.02
Bmax (fmol/mg prot)	39.66 ± 2.24	42.42 ± 3.08
β_1/β_2 (%)	51/49	52/48

Tableau 4: Etude de liaison des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques cardiaques des souris *Tph1* vs. *Tph1^{+/+}*.

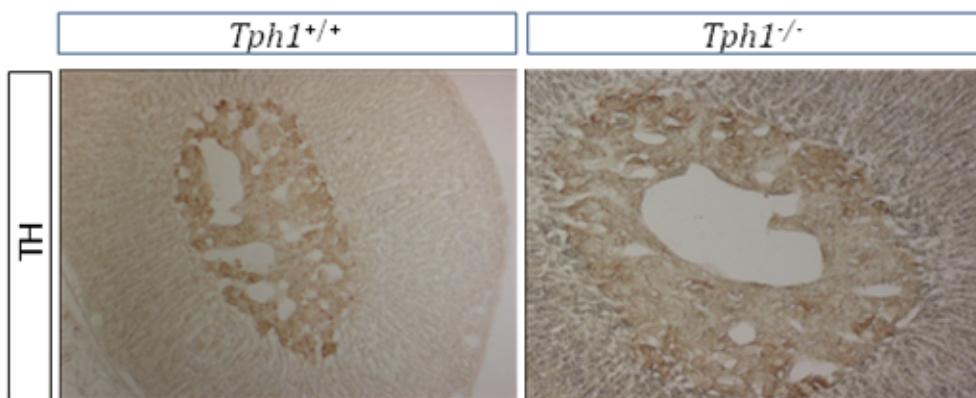
Les études de liaison ont été réalisées sur des préparations de membranes de ventricules cardiaques. Les ligands utilisés sont: le cyanopindolol iodé (¹²⁵I-CYP), le CGP 20712A (antagoniste des récepteurs β_1), l'ICI 118551 (antagoniste spécifique des récepteurs β_2) et le propranolol (antagoniste non spécifique des récepteurs β). Les expériences ont été réalisées en "triplicate" sur 10 animaux dans chaque groupe et les résultats sont exprimés en moyenne des 3 expériences ± SEM

Le dosage par HPLC des catécholamines dans le SNC et dans différents organes des souris *Tph1^{-/-}* exclut également une modification des niveaux de catécholamines (Tableau 5). L'expression de l'enzyme de synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase (TH), reste également inchangée chez les souris *Tph1^{-/-}* par rapport aux souris *Tph1^{+/+}* (Figure 41). Ce dernier résultat exclut une compensation du faible taux de sérotonine circulante par la surexpression de la TH, qui appartient avec la TPH à la famille des hydroxylases des acides aminés aromatiques.

	génotype	DA (µg/g)	NA (µg/g)
tronc cérébral	<i>Tph1</i> ^{+/+}	0.0815 ± 0.0158	0.6855 ± 0.1269
	<i>Tph1</i> ^{-/-}	0.0903 ± 0.0172	0.7840 ± 0.0850
cerveau antérieur	<i>Tph1</i> ^{+/+}	1.7483 ± 0.1058	0.4000 ± 0.0149
	<i>Tph1</i> ^{-/-}	1.6888 ± 0.1869	0.4075 ± 0.0186
cœur	<i>Tph1</i> ^{+/+}	0.0423 ± 0.0085	0.7498 ± 0.1233
	<i>Tph1</i> ^{-/-}	0.0408 ± 0.0043	0.6203 ± 0.0973
glandes surrénales	<i>Tph1</i> ^{+/+}	15.11 ± 3.77	306.42 ± 81.63
	<i>Tph1</i> ^{-/-}	11.93 ± 2.85	320.68 ± 40.90

Tableau 5: Dosage des catécholamines dans les organes des souris *Tph1*^{-/-} vs. *Tph1*^{+/+}.

La quantité de dopamine (DA) et de noradrénaline (NA) a été déterminée par HPLC dans les différents organes des animaux *Tph1*^{-/-} (n=4) en comparaison des animaux *Tph1*^{+/+} (n=4). Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard.

**Figure 41: Expression de la protéine TH dans la glande surrénale des souris *Tph1*^{-/-} vs. *Tph1*^{+/+}.**

L'expression de la protéine TH dans la glande surrénale des souris *Tph1*^{-/-} et contrôles a été évaluée par immunohistochimie sur des cryocoupes de 12µM d'épaisseur, à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la TH de souris (Jacques Boy, dilution 1/1000).

L'ensemble de ces données montre que la réponse cardiaque singulière des souris *Tph1*^{-/-} à une stimulation adrénnergique n'est causée ni par une modification de l'expression des récepteurs β -adrénnergiques cardiaques, ni par une modification des niveaux des catécholamines synthétisées dans le SNC ou à la périphérie. Nous discuterons des hypothèses permettant d'expliquer la réponse singulière du cœur des souris *Tph1*^{-/-} suite à l'administration de dobutamine dans le chapitre II, page 135.

Dans le but de préciser le mécanisme d'action de la sérotonine circulante dans la régulation de la fonction cardiaque, nous avons déterminé le niveau d'expression des récepteurs sérotoninergiques exprimés dans les cardiomyocytes, chez les souris *Tph1*^{-/-} par rapport aux souris *Tph1*^{+/+}.

III.2.2. L'expression des récepteurs sérotoninergiques est-elle modifiée dans le cœur des souris *Tph1*^{-/-} ?

Les études de liaison, réalisées sur des cardiomyocytes isolés, ont montré une surexpression d'un facteur 2 des récepteurs sérotoninergiques de type 2B chez les souris *Tph1*^{-/-} (Tableau 6). L'expression des récepteurs 5-HT_{2A} n'est en revanche pas modifiée. De façon inattendue, nous avons montré une surexpression du transporteur SERT d'un facteur 4,5 dans les cardiomyocytes des souris *Tph1*^{-/-}.

	5-HT _{2A} (fmol/mg prot)	5-HT _{2B} (fmol/mg prot)	SERT (fmol/mg prot)
<i>Tph1</i> ^{+/+}	67	107	13
<i>Tph1</i> ^{-/-}	51	211	57

Tableau 6: Etude de liaison des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et du SERT dans les cardiomyocytes isolés des ventricules des souris *Tph1*^{-/-} vs. *Tph1*^{+/+}.

Les études de liaison ont été réalisées sur des cardiomyocytes isolés des ventricules droits et gauches cardiaques. Les ligands utilisés sont: le [³H]-MDL100907 pour le récepteur 5-HT_{2A}, le [³H]-LY26609 pour le récepteur 5-HT_{2B} et le [¹²⁵I]-RTI55 pour SERT. Les résultats de ces expériences doivent être confirmés sur un plus grand nombre d'animaux.

La littérature rapporte l'expression du SERT dans les cardiomyocytes en culture uniquement pendant le développement foetal (Sari et Zhou, 2003). Bien que nous ne puissions pas totalement exclure une contamination de la préparation de cardiomyocytes par des fibroblastes cardiaques qui expriment le SERT, l'augmentation de l'expression du SERT dans les cardiomyocytes de souris *Tph1*^{-/-} adultes par rapport aux souris *Tph1*^{+/+} pourrait correspondre à une néo-expression du SERT dans ces cellules plutôt qu'à une surexpression.

Ces résultats, associés aux données de la littérature qui montrent le pic d'expression du récepteur 5-HT_{2B} dans le cœur aux jours embryonnaires E8-E9 (Choi *et coll.*, 1997), indiquent que la néo-expression du SERT et la surexpression du récepteur 5-HT_{2B} dans les cardiomyocytes des souris *Tph1*^{-/-} pourraient correspondre à un maintien de l'expression des gènes embryonnaires dans les cardiomyocytes, ou à une néo-expression de ces gènes. Nous développerons cette hypothèse dans le chapitre de discussion, à la lumière des résultats obtenus récemment.

IV. Conclusion

L'invalidation du gène *Tph1* entraîne un effondrement du niveau de sérotonine circulante dû à l'absence d'expression de la TPH1 dans les cellules entérochromaffines. La présence de 5-HT à un taux normal dans les noyaux du raphé est due à l'existence du second gène *Tph2*. Ce gène est exprimé exclusivement dans les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé et du plexus myentérique. Les souris *Tph1*^{-/-} disposent d'un taux suffisant de sérotonine pour le développement normal du cœur et pour leur viabilité. Ce taux résiduel (3-15%) est par contre insuffisant pour permettre le bon fonctionnement du cœur. En particulier, le maintien d'un taux normal de sérotonine circulante apparaît indispensable pour l'adaptation cardiaque au stress.

Au cours de ces deux études, l'observation du large spectre de distribution des paramètres cardiaques mesurés chez les souris *Tph1*^{-/-} nous a particulièrement interpelés. Nos expériences mettaient en évidence une évolution du phénotype cardiaque ; les animaux *Tph1*^{-/-} analysés pouvant être classés en trois catégories selon leurs paramètres hémodynamiques cardiaques :

- un groupe d'animaux dits "non atteints", présentant une fonction cardiaque normale, voire supérieure à celle des animaux contrôles, et capables de maintenir une activité cardiaque soutenue lors du test d'effort à la dobutamine.
- un groupe d'animaux dits "en phase de compensation", avec une contractilité cardiaque diminuée compensée par l'augmentation du débit cardiaque.
- un groupe d'animaux dits "en phase de décompensation", avec une contractilité cardiaque très diminuée, qui n'est plus compensable par l'augmentation du débit cardiaque. Ces animaux présentent alors une insuffisance cardiaque, létale dans certains cas.

Les trois groupes décrits ci-dessus correspondent-ils à des étapes de l'évolution d'une physiologie cardiaque normale vers une insuffisance cardiaque ? Existe-t-il une continuité entre ces étapes, telle que les animaux *Tph1*^{-/-} soient tout d'abord en phase de compensation, avant d'être en phase de décompensation ? Cette progression ne semblait pas dépendre de l'âge des animaux analysés, puisque les souris n°273 et 296 étaient toutes les deux âgées de 26 semaines. La question de l'origine de l'hétérogénéité du phénotype cardiaque des souris *Tph1*^{-/-} se posait. Existerait-il une corrélation entre la concentration de sérotonine circulante chez les animaux *Tph1*^{-/-} et le degré d'atteinte cardiaque ? Les souris *Tph1*^{-/-} présentant le taux de sérotonine résiduel les plus faible (3%) seraient-elles les plus atteintes ?

Deuxième partie:

Rôle crucial de la sérotonine maternelle pour le développement embryonnaire

La détermination des causes de l'hétérogénéité de la cardiopathie développée par les souris *Tph1*^{-/-} nous apparaissait être un élément clef pour la compréhension des mécanismes d'action de la sérotonine dans la fonction cardiaque.

Afin de tester la validité de notre première hypothèse, c'est-à-dire l'existence d'une corrélation entre le taux 5-HT circulante et la gravité de la cardiopathie, nous avons analysé les paramètres fonctionnels cardiaques des souris *Tph1*^{-/-}, et déterminé la concentration de sérotonine dans le sang total de chaque souris étudiée. Cette démarche impliquait:

- L'analyse d'un grand nombre d'animaux *Tph1*^{-/-}: A ce stade de notre étude, nous ne disposions pas de test prédictif du degré d'atteinte cardiaque des animaux. Nous n'avions pas non plus d'informations sur la proportion d'animaux « non atteints », en phase de compensation et en phase de décompensation. La répartition des souris *Tph1*^{-/-} selon ces trois groupes de phénotype ne pouvait être réalisée qu'*a posteriori*, c'est-à-dire après la cathéterisation de conductance, et nécessitait donc un nombre élevé de souris.
- La réduction au maximum des autres causes possibles de variations phénotypiques interindividuelles: nous avons pour cela entrepris d'effectuer nos expériences sur des souris mâles, afin de s'affranchir de l'influence des variations dues aux cycles hormonaux.

Les croisements entre souris *Tph1*^{+/+} permettaient d'obtenir des souris mutées selon le ratio mendélien, mais en nombre relativement réduit (environ 2 souris *Tph1*^{-/-} par portée). Nous avons alors considéré la possibilité d'accroître considérablement le nombre de souris mutées générées, en réalisant des croisements entre souris *Tph1*^{-/-}. L'analyse des souris provenant d'une même portée pouvait également minimiser les variabilités entre les individus. Dans ces conditions, les souris contrôles ne seraient plus des souris "littermates", c'est-à-dire issues de la même portée, mais proviendraient du commerce.

A ce stade de notre étude, deux observations déterminantes ont modifié notre vision concernant l'analyse des animaux *Tph1*^{-/-} générés à partir de croisements entre souris *Tph1*^{-/-}, et plus particulièrement à partir de mères *Tph1*^{-/-}.

- Les croisements réalisés entre animaux *Tph1*^{-/-}, dans le but de générer un nombre important de souris mutées, se sont avérés très peu productifs. Les portées obtenues étaient de petite taille (2 à 3 sourceaux par portées), ce qui suggérait une forte létalité embryonnaire.
- Le dosage des facteurs plasmatiques augmentés dans les cas de défaillance cardiaque de souris sauvages *Tph1* provenant du commerce (souris *Tph1*^{+/+}(commerce)) révéla des différences par rapport aux mêmes facteurs mesurés chez des animaux sauvages nés de parents *Tph1*^{+/+} (souris *Tph1*^{+/+}(+/-)) (Figure 42). Ces données indiquaient que des animaux de même génotype présentaient des différences importantes de phénotype.

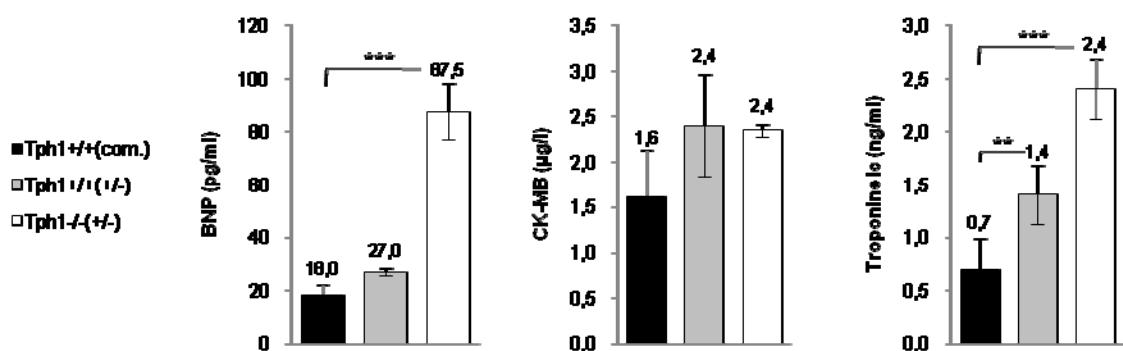


Figure 42: Dosage plasmatique des facteurs d'insuffisance cardiaque.

Le dosage des trois facteurs BNP, CK-MB et troponine I dans le plasma des souris contrôles et *Tph1* mutées révèle la différence de phénotype entre les souris contrôles du commerce (souris *Tph1*^{+/+}(commerce)) et les souris contrôles nées de mères *Tph1*^{+/+} (souris *Tph1*^{+/+}(+/-)). Chez les souris *Tph1*^{+/-(+/-)}, le niveau d'expression des facteurs mesurés dans la plasma est soit identique à celui mesuré chez les animaux mutés (CK-MB), soit intermédiaire entre les niveaux mesurés chez les animaux contrôles du commerce ou mutées (BNP, Troponine Ic), mais n'est jamais identique à ceux mesurés chez les animaux contrôles du commerce. Souris *Tph1*^{+/+(commerce)}, n=7; souris *Tph1*^{+/-(+/-)}, n=3; souris *Tph1*^{-/-} (+/-), n=3. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard. **p<0,01, ***p<0,001.

L'impact de ces résultats pourrait être considérable. L'influence du génotype maternel, et plus particulièrement l'influence du niveau de sérotonine maternelle au cours de la gestation, pourrait ne pas se limiter aux seules fonctions cardiaques. Nous avons donc recherché les conséquences développementales du faible taux de sérotonine maternelle chez les embryons issus de mères *Tph1*^{-/-}.

I. Conséquences du faible taux de 5-HT maternelle au cours du développement embryonnaire

Nous avons entrepris une analyse systématique des animaux provenant de toutes les combinaisons possibles de croisements entre mâles et femelles des trois génotypes *Tph1*^{+/+}, *Tph1*⁺⁻ et *Tph1*^{-/-}. Notre étude a été réalisée sur un total de 170 embryons provenant de ces différents croisements. Nous avons rapidement constaté que 80% environ des embryons issus de mères *Tph1*^{-/-} présentaient des malformations évidentes au 12^{ème} jour de développement embryonnaire. Nous avons donc étudié les embryons à ce stade. Les combinaisons des croisements effectués, leurs nombres, ainsi que le nombre et la taille des embryons obtenus et analysés à 12.5 jours de développement embryonnaire sont résumés dans le Tableau 7 ci-dessous.

Génotype maternel	Génotype paternel	Nombre de croisements	Génotype des embryons			% d'embryons petits et/ou malformés
			+/+	+-	-/-	
+/+	+/+	3	28	-	-	3.6
	+-	1	4	6	-	0
	-/-	2	-	27	-	3.7
+-	+/+	1	6	4	-	0
	+-	4	11	24	10	6.7
	-/-	2	-	4	3	0
-/-	+/+	3	-	10	-	80
	+-	2	-	9	9	88.9
	-/-	2	-	-	15	86.7

Tableau 7: Phénotype des embryons *Tph1* issus des croisements entre parents *Tph1* sauvages, hétérozygotes, ou mutés (d'après Cote et coll., 2007).

Les données présentées récapitulent le nombre de croisements effectués, le génotype des parents pour chacun des croisements, le génotype et le nombre des embryons obtenus ainsi que le pourcentage d'embryons petits (mesure du CRL) et/ou malformés.

Nous avons évalué la morphologie générale des embryons par la mesure du CRL (*crown-rump length*), qui représente la relation entre le stade de développement embryonnaire et la taille des embryons. De façon remarquable, 80 à 90% des embryons qui proviennent d'une mère *Tph1*^{-/-} ont une taille réduite de 15 à 30% (Figure 43, embryons 3 et 4) par rapport aux embryons qui proviennent d'une mère sauvage ou *Tph1*⁺⁻ (Figure 43, embryons 1 et 2). Ces animaux ont également un poids plus faible que les embryons

sauvages issus d'une mère sauvage. De façon remarquable, la diminution de taille n'est retrouvée que chez 3 à 7 % des embryons provenant de mères $Tph1^{+/+}$ ou de mères sauvages (Figure 43, embryons 1 et 2).

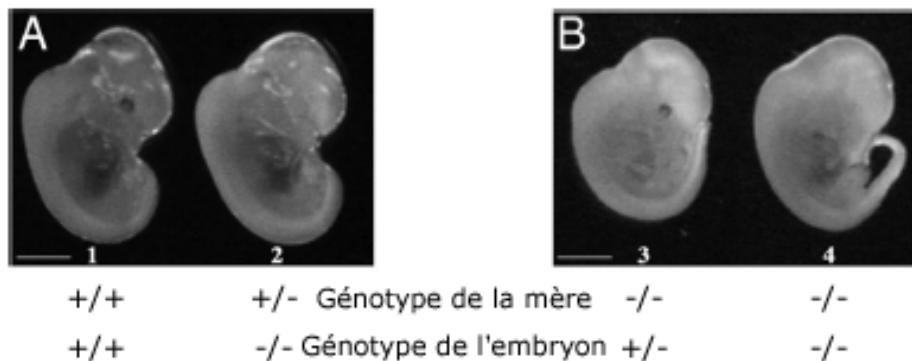


Figure 43: Morphologie externe des embryons à E12.5 issus de mères $Tph1^{+/+}$ (A, embryon 1), $Tph1^{+/+}$ (A, embryon 2) et $Tph1^{-/-}$ (A, embryons 3 et 4) (d'après Cote et coll., 2007). Les embryons issus de mères sauvages ou hétérozygotes ne présentent pas d'anomalies macroscopiques. En revanche, les embryons issus de mères $Tph1^{-/-}$ ont une taille réduite. Les valeurs de CRL pour les 4 embryons sont: embryon 1: 7.8 mm ; embryon 2: 7.7 mm ; embryon 3: 6.8 mm et embryon 4: 7 mm. Barre d'échelle=0.25cm

L'examen microscopique des embryons 2 et 3 présentés ci-dessus révèle d'importantes malformations, en particulier au niveau du SNC (Figure 44). Nous avons également observé une diminution de 30% de l'activité mitotique des cellules localisées dans la région du cerveau (Figure 45). Ceci pourrait en partie expliquer les malformations observées ainsi que la petite taille des embryons issus de mère $Tph1^{-/-}$.

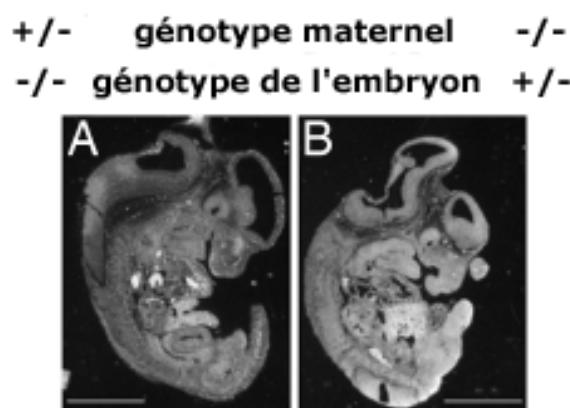


Figure 44: Coupes longitudinales des embryons 2 et 3 présentés figure 43 (d'après Cote et coll., 2007).

L'embryon 2 (A), de génotype $Tph1^{-/-}$, est issu d'un croisement entre une mère $Tph1^{+/+}$ et un père $Tph1^{+/+}$, alors que l'embryon 3 (B), de génotype $Tph1^{+/+}$, est issu d'un croisement entre une mère $Tph1^{-/-}$ et un père $Tph1^{+/+}$. L'examen de la région du cerveau révèle des défauts de morphologie au niveau du 4^{ème} ventricule de l'embryon B.

+/- génotype maternel	-/-
-/- génotype de l'embryon	+/-

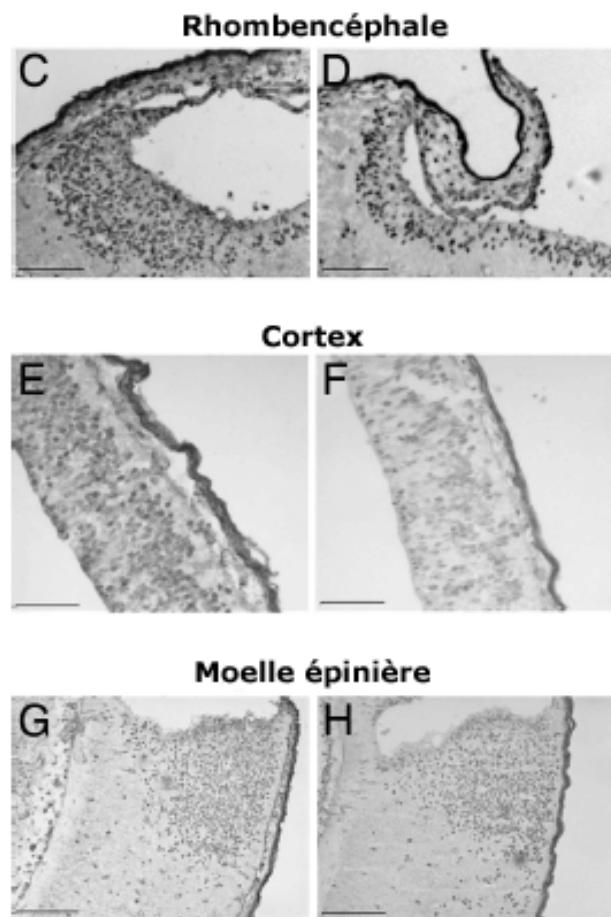


Figure 45: Analyse de l'activité mitotique des cellules après un pulse de BrdU (d'après Cote *et coll.*, 2007).

L'analyse immunohistochimie de l'incorporation de BrdU dans les cellules de l'embryon *Tph1^{+/}(-/-)* révèle une diminution de 30% du nombre de cellules marquées dans la zone ventriculaire (D en comparaison de C) et de 24% dans les cellules du cortex (F en comparaison de E). Aucune différence significative n'est détectée dans les cellules de la moelle épinière (H en comparaison de G). Barre d'échelle = 100 μ M.

Nos travaux révèlent que les malformations détectées chez les embryons issus de mères *Tph1^{-/-}* ne dépendent pas du génotype de l'embryon lui-même. En effet, deux embryons de génotypes différents, l'un *Tph1^{+/}*, l'autre *Tph1^{-/-}*, présentent les mêmes défauts morphologiques lorsqu'ils sont issus d'une mère *Tph1^{-/-}* (Figure 43, embryons 3 et 4). De manière surprenante, deux embryons du même génotype *Tph1^{-/-}*, sont morphologiquement très différents, selon qu'ils sont issus de mères *Tph1^{+/}* ou de mères *Tph1^{-/-}* (Figure 43, embryons 2 et 4).

1.1.1. Importance du taux de sérotonine maternelle circulante

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les souris *Tph1^{-/-}* ont un taux normal de sérotonine dans le SNC, tandis qu'elles ne possèdent plus que 3 à 15% de 5-HT dans la circulation sanguine, en comparaison avec des souris sauvages. Dans ce contexte, les souris sauvages et mutantes diffèrent par leurs niveaux de sérotonine contenue dans le sang. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que les malformations observées chez les embryons issus de mères *Tph1^{-/-}* sont dues à la faible quantité de sérotonine qu'ils reçoivent au cours de leur développement embryonnaire.

En première analyse, la morphologie des embryons issus de mères hétérozygotes est semblable à celle des embryons issus de mères sauvages. Le niveau de sérotonine circulante des souris hétérozygotes est-il identique à celui des animaux sauvages ?

Nous avons déterminé et comparé les niveaux de sérotonine circulante chez les animaux *Tph1^{+/+}*, *Tph1^{+/-}* et *Tph1^{-/-}* (Figure 46). Le niveau de sérotonine circulante mesuré chez les souris *Tph1^{+/-}* est diminué de moitié par rapport à celui des animaux *Tph1^{+/+}*.

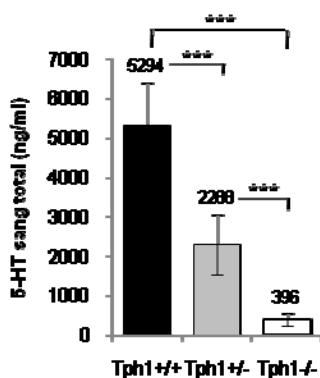


Figure 46: Détermination des concentrations sanguines de sérotonine circulante chez les souris *Tph1* par HPLC. *Tph1^{+/+}*, n=7; *Tph1^{+/−}*, n=6; *Tph1^{−/−}*, n=7. Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard. ***p<0.001.

Le dosage de sérotonine circulante chez les souris *Tph1^{+/−}* et *Tph1^{−/−}*, conjugué aux observations morphologiques des embryons *Tph1* issus des différents croisements suggèrent que:

- Le niveau de sérotonine maternelle des souris *Tph1^{+/−}* (50%) est suffisant pour assurer le développement embryonnaire normal, et permettre la survie de l'animal. Les embryons issus de mères *Tph1^{+/−}* présentent néanmoins des anomalies à l'âge adulte, car les concentrations plasmatiques des marqueurs d'insuffisance cardiaque sont augmentées chez les souris sauvages provenant des mères *Tph1^{+/−}*, par rapport aux souris sauvages du commerce (Figure 42, page 90).
- Le niveau de sérotonine maternelle des souris *Tph1^{−/−}* (3-15%) n'est pas suffisant pour le développement embryonnaire normal, puisque 80 à 90% des embryons nés de mères *Tph1^{−/−}* sont petits et/ou présentent des malformations (Figure 43).

En conclusion, la sérotonine fournie par la mère serait nécessaire au cours du développement embryonnaire. Il existerait un taux "critique" de sérotonine nécessaire pour le développement embryonnaire, en deçà duquel les embryons ne seraient pas viables. La concentration de sérotonine indispensable à la survie se situerait alors entre 15 et 50% du niveau de sérotonine circulante mesuré chez les souris sauvages. Qu'en est-il de l'embryon ? Est-il capable de synthétiser sa propre sérotonine ?

1.1.2. Quelle est l'origine de la sérotonine présente dans l'embryon ?

Afin de déterminer si l'embryon est capable de synthétiser sa propre sérotonine, nous avons recherché les lieux et temps d'expression des deux gènes *Tph* au cours du développement par hybridation *in situ*, sur des embryons à partir du jour embryonnaire 8.5.

Le gène exprimé le plus précocement est le gène *Tph2*. L'ARNm *Tph2* est détecté à E10.5 dans le SNC, dans la partie ventrale du cerveau postérieur (Figure 47, A). Cette région correspond à la région rhombencéphalique des futurs neurones du raphé. Dans les intestins, l'ARNm *Tph2* est détecté à partir de E12.5 (Figure 47, B), au moment de la formation des premiers neurones myentériques. L'expression du gène *Tph2* est maintenue au niveau de ces mêmes sites, pendant les périodes du développement embryonnaire et post-natal et pendant la vie adulte.

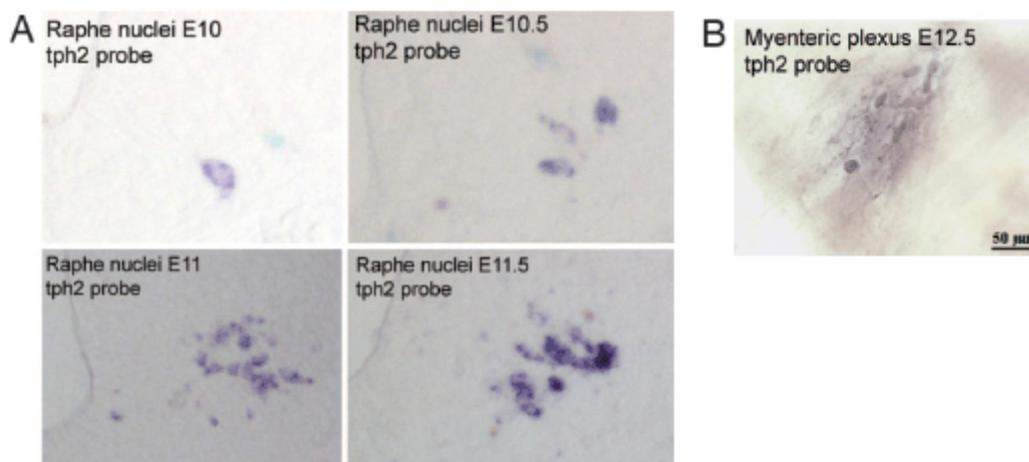


Figure 47: Profil d'expression de l'ARNm *Tph2* chez l'embryon (d'après Cote *et coll.*, 2007). Les expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées avec une sonde nucléotidique spécifique de la région 3' non traduite de l'ARNm *Tph2*. L'ARNm *Tph2* est exprimé dans le système nerveux central à partir de E10 (A) et dans les neurones du plexus myentérique à partir de E12.5 (B).

Chez les embryons *Tph1^{-/-}*, les transcrits *Tph2* sont détectés dans les mêmes lieux et aux mêmes temps que chez l'embryon sauvage. Cette donnée indique que l'absence de synthèse de sérotonine par la TPH1 chez les embryons *Tph1^{-/-}* n'est pas compensée par une surexpression du gène *Tph2*.

Les transcrits *Tph1* sont détectés plus tard au cours du développement embryonnaire. L'ARNm *Tph1* est détecté au moment de l'apparition des premières cellules de la glande pinéale, à partir de E14.5 (Figure 48, A), et au niveau des intestins à partir de E15.5 (Figure 48, B). Chez les embryons *Tph1^{-/-}*, les transcrits β -gal sont détectés au niveau des mêmes sites, avec les mêmes temps d'apparition.

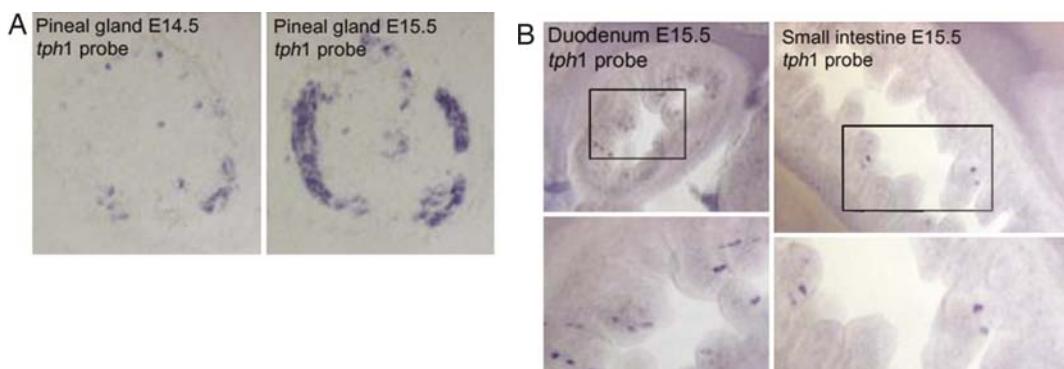


Figure 48: Profil d'expression de l'ARNm *Tph1* chez l'embryon (d'après Cote *et coll.*, 2007). Les expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées avec une sonde nucléotidique spécifique de la région 3' non traduite de l'ARNm *Tph1*. L'ARNm *Tph1* est exprimé dans la glande pinéale à partir de E14.5 (A) et dans les cellules entérochromaffines à partir de E15.5 (B).

Nos résultats montrent que l'embryon exprime ses propres gènes de synthèse de 5-HT à partir de E10.5. Ces données sont cohérentes la littérature qui rapporte que la 5-HT est détectée dans les embryons par immunohistochimie à partir de E11- E11.5 dans la région du futur raphé.

II. Conclusion

Dans ce travail, nous avons montré que l'expression des gènes de synthèse de la sérotonine débute au jour embryonnaire E10.5 chez la souris. La littérature rapporte l'expression plus précoce de certains composants du système sérotoninergique comme le récepteur 5-HT_{2B} à partir de E8 (Choi et Maroteaux, 1996) ou du SERT à partir de E9 (Shuey *et coll.*, 1993). Ces données indiquent que l'embryon utilise la sérotonine avant

d'être lui-même capable de la synthétiser, suggérant fortement que la 5-HT utilisée par l'embryon soit alors d'origine maternelle.

Ces résultats sont à rapprocher des observations faites au début des années 1990 par l'équipe de Jean Lauder. Les expériences *in vitro* réalisées par cette équipe montraient que la présence de sérotonine, associée à l'expression de ses récepteurs très tôt au cours du développement étaient indispensables à l'organogenèse, notamment cérébrale (Lauder et Krebs, 1978; Yavarone *et coll.*, 1993; pour revue, Gaspar *et coll.*, 2003). Les auteurs attribuaient alors à l'amine un rôle de molécule morphogène, c'est-à-dire que la sérotonine serait une molécule sécrétée capable d'induire des types cellulaires différents à des concentrations différentes.

L'analyse comparée des embryons *Tph1^{+/+}* et *Tph1^{-/-}* issus de mères *Tph1^{+/+}* d'une part, et issus de mères *Tph1^{-/-}* d'autre part, a permis de montrer sans ambiguïté le rôle crucial de la sérotonine au cours du développement embryonnaire *in vivo*. La sérotonine apportée par la mère serait donc un agent morphogène, bien avant que la 5-HT produite par l'embryon n'agisse en tant que neurotransmetteur.

Nos travaux soulèvent un nombre important de questions:

- Comment se fait le passage de la sérotonine sanguine de la mère vers l'embryon ? Le placenta exprime à la fois des quantités importantes de MAO de type A, qui possède une forte affinité pour la sérotonine, et qui dégrade la 5-HT en 5-HIAA, ainsi que le SERT. Le SERT pourrait permettre à la sérotonine maternelle de traverser la barrière placentaire ; les MAO-A pourraient réguler le taux de sérotonine placentaire disponible pour le SERT. Des expériences de traçage du transport de sérotonine, réalisées en injectant de la 5-HT radio-marquée à une souris gestante permettraient de démontrer formellement le passage de la sérotonine de la mère à l'embryon. Elles permettront de préciser l'intervalle de temps durant lequel la sérotonine maternelle agit. Il serait également important de déterminer les concentrations de sérotonine maternelle à fournir à l'embryon pour assurer son développement normal.

- 80% environ des embryons issus de mères *Tph1^{-/-}* meurent *in utero*, la létalité débute autour de E12.5-E13.5. Au sein d'une même portée, certains embryons meurent *in utero*, alors que d'autres embryons survivent. Bien que l'environnement maternel soit alors identique pour tous les embryons, reçoivent-ils tous la même quantité de sérotonine ? L'existence d'un gradient de sérotonine dans la trompe utérine pourrait être envisagée. Dans ce sens, la détermination de la position de l'embryon dans la corne utérine de la

souris, corrélée avec la détermination de la concentration intra-embryonnaire de 5-HT avant E10.5 pourraient s'avérer très informatives.

- Quelle est la fenêtre temporelle pendant laquelle la sérotonine maternelle est indispensable au développement? Les malformations observées chez les embryons *Tph1^{+/-(−)}* indiquent que la quantité de 5-HT synthétisée par l'embryon à partir de E10.5 n'est pas, à elle seule, suffisante pour assurer un développement embryonnaire normal.
- Quel rôle joue la 5-HT synthétisée par l'embryon dans le développement embryonnaire ? L'observation des souris *Tph1^{+/-(−)}* nous renseigne sur le fait que la 5-HT produite par l'embryon n'est pas suffisante pour assurer son développement correct. Ces données sont renforcées par la viabilité des souris *Tph1^{−/+(+−)}* qui ne synthétisent pas de sérotonine à la périphérie, et dont la mère a un taux de sérotonine circulante réduit de moitié. L'ensemble de ces résultats suggère que la sérotonine maternelle est indispensable au développement embryonnaire correct, contrairement à la sérotonine périphérique synthétisée par l'embryon lui-même.

Une limite à notre travail réside dans le fait que la synthèse de sérotonine n'est pas totalement abolie chez les souris *Tph1^{−/−}* puisque le gène *Tph2* est présent. Cette donnée nous empêche de conclure de façon formelle quant à la fenêtre temporelle de l'action de la 5-HT maternelle circulante. Le transfert d'embryons *Tph1^{−/−}* et *Tph1^{+/−}* chez des femelles sauvages pseudogestantes du commerce permettra de s'affranchir totalement du niveau de la sérotonine maternelle pour ne considérer que celui des embryons. Inversement, le transfert d'embryons sauvages chez des femelles *Tph1^{+/−}* et *Tph1^{−/−}* pseudogestantes permettra de s'affranchir du niveau de sérotonine synthétisée par l'embryon pour se concentrer sur l'effet des différentes concentrations de sérotonine maternelle.

Troisième partie

L'importance du taux de sérotonine plasmatique

A la lumière des résultats précédents, nous sommes revenus sur notre question de départ qui était de déterminer les causes de l'hétérogénéité du phénotype cardiaque développé par les souris *Tph1*^{l/-}(+/-). Notre hypothèse était que la sévérité de la cardiopathie dépendait du taux individuel de sérotonine circulante. La découverte du rôle crucial de la sérotonine maternelle dans le développement embryonnaire correct des animaux apportait la notion nouvelle de concentration "critique" ou "seuil" de sérotonine.

L'ensemble de nos observations, résumé dans la Figure 49, suggérait fortement que le taux individuel de sérotonine circulante était l'élément clef de la régulation, à la fois du développement embryonnaire de la souris, et de la fonction cardiaque de l'animal adulte. En effet:

- Un taux de sérotonine circulante réduit de moitié (=50%) est détecté chez les souris *Tph1* hétérozygotes. Ce taux est suffisant pour la viabilité des animaux qui sont obtenus avec la fréquence mendélienne attendue. Ce taux réduit de sérotonine fourni par les mères *Tph1*^{l/-} au cours de la gestation cause néanmoins des anomalies subtiles au cours du développement embryonnaire qui se répercutent chez l'adulte, comme en témoigne l'augmentation des niveaux plasmatiques de BNP, CK-MB et troponine Ic chez les souris *Tph1*^{l/-}(+/-), par rapport aux souris *Tph1*^{l/-}(+/-) (Figure 42, page 90).

Les souris *Tph1*^{l/-}(+/-), ayant été exposé à un taux de sérotonine maternelle réduit de moitié pendant leur développement embryonnaire, ont à l'âge adulte un taux de sérotonine circulante compris entre 3 et 15 % du taux détecté chez les souris sauvages. Ces animaux développent progressivement une cardiopathie, puis une grave insuffisance cardiaque. Un taux de 5-HT circulante de 3-15% ne permet donc pas d'assurer une physiologie cardiaque normale.

- Le taux de 5-HT circulante réduit dramatiquement à 3-15% est, comme nous venons de le dire, détecté chez les animaux *Tph1*^{l/-}(+/-). Il est insuffisant pour le développement embryonnaire normal car 80% des embryons issus de mères *Tph1*^{l/-} meurent *in utero* vers E12.5. Qu'en est-il des 20% des souris *Tph1*^{l/-}(-/-) qui vivent jusqu'à l'âge adulte ? Quel est le taux de sérotonine circulante chez ces animaux ? Développent-ils une pathologie

cardiaque ? Est-elle de même nature que la cardiopathie développée par les souris $Tph1^{-/-}$ (+/-) ?

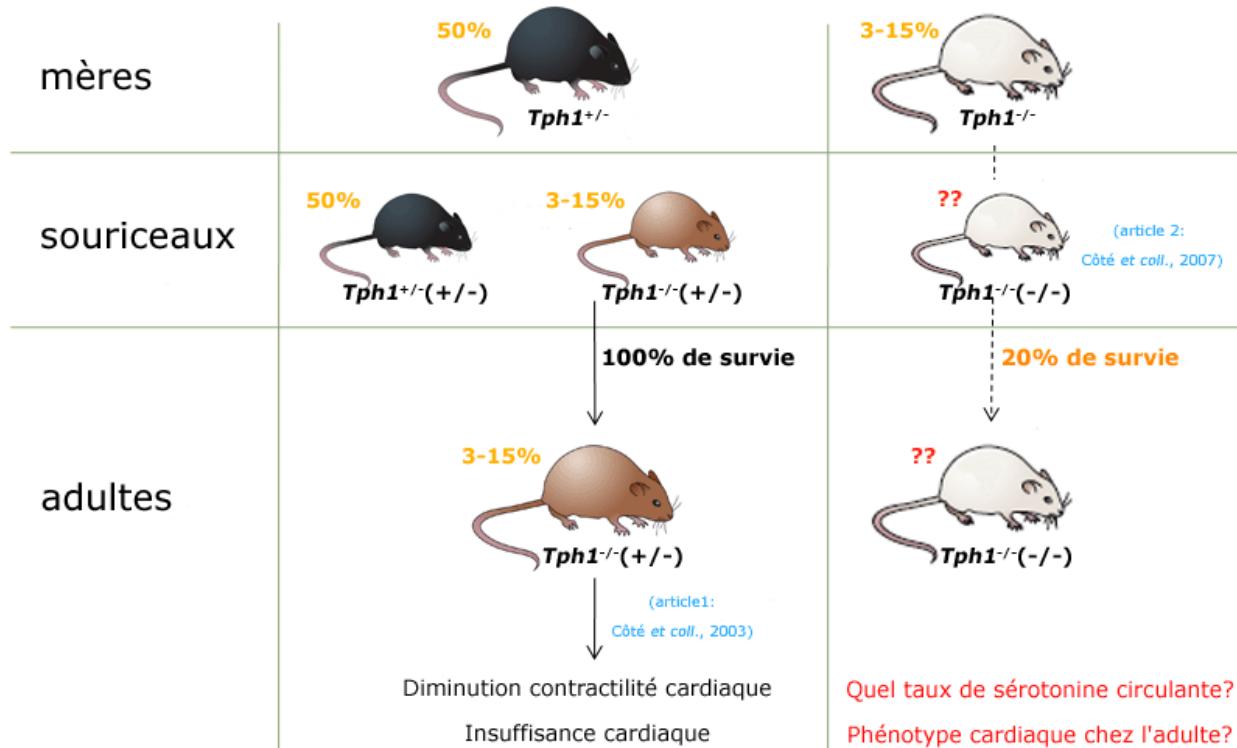


Figure 49: Résumé des travaux précédents et nouvelles questions posées.

Les trois couleurs des souris ont été choisies afin de différencier à la fois leur génotype, et le génotype de leur mère. Ainsi, les souris noires sont hétérozygotes pour la mutation $Tph1$, les souris marrons sont mutées issues de mères hétérozygotes ($Tph1^{-/-}(+/-)$), et les souris blanches sont mutées, issues de mères mutées ($Tph1^{-/-}(-/-)$). En rouge sont représentés les points restant à déterminer.

Afin de déterminer si la cardiopathie des souris $Tph1^{-/-}$ dépendait du taux de sérotonine circulante, nous avons tiré profit du fait que la population de souris $Tph1^{-/-}$ présente des niveaux individuels de sérotonine circulante variables. Nous avons mesuré le taux individuel de sérotonine circulante des souris $Tph1^{-/-}(+/-)$ et suivi dans le temps le développement de la cardiopathie qu'elles développent, par échocardiographie. Nous avons utilisé cette technique non invasive pour déterminer si les souris $Tph1^{-/-}(-/-)$ développaient également une cardiopathie.

I. Les souris *Tph1*^{-/-} qui survivent développent-elles une cardiopathie ?

A deux mois, les paramètres anatomiques cardiaques mesurés chez les animaux *Tph1*^{+/-(+/-)} et *Tph1*^{-/-(-/-)} ne diffèrent pas des paramètres mesurés chez les animaux sauvages du commerce (Figure 50 et Tableau 8). A cinq mois, les mêmes souris *Tph1*^{-/-(-/-)} présentent les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles d'une cardiomyopathie dilatée (CMD), telle qu'elle est définie chez l'homme: l'augmentation significative du diamètre interne de la cavité ventriculaire gauche est accompagnée d'un affinement des parois (paroi postérieure et septum) (Figure 50 et Tableau 8).

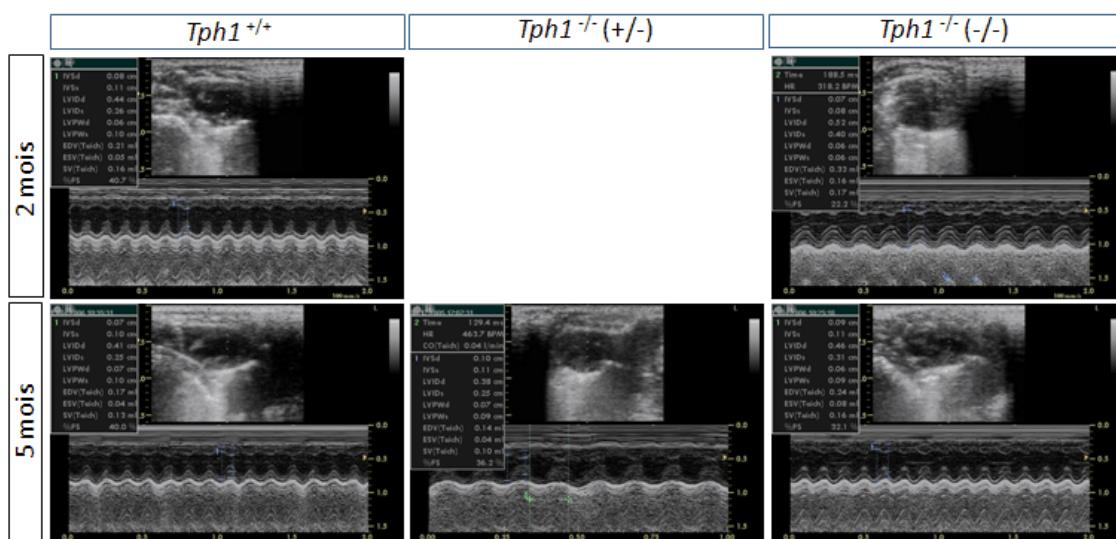


Figure 50: Echocardiogrammes des souris *Tph1*^{+/+(commerce)}, *Tph1*^{-/-(+/-)} et *Tph1*^{-/-(-/-)}, âgées de 2 mois puis de 5 mois.

	<i>Tph1</i> ^{+/+(commerce)}		<i>Tph1</i> ^{-/-(+/-)}		<i>Tph1</i> ^{-/-(-/-)}	
	2 mois	5 mois	5 mois	2 mois	5 mois	
PPVGd (cm)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01 ^Y	
PPVGs (cm)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.01*** ^{YY}	
Sd (cm)	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	
Ss (cm)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01* ^Y	
DIVGd (cm)	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.05	0.48 ± 0.05*** ^Y	
DIVGs (cm)	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.05	0.29 ± 0.04	0.35 ± 0.05*** ^Y	
longueur VG (cm)	0.82 ± 0.03	0.80 ± 0.06	0.77 ± 0.07	0.86 ± 0.07	0.84 ± 0.05	

Tableau 8: Paramètres anatomiques des coeurs des souris enregistrés par échocardiographie.

VG: ventricule gauche ; PP: paroi postérieure ; S: septum ; DI: diamètre interne ; d: diastole ; s: systole.

*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001, en comparaison avec les souris *Tph1*^{+/+(commerce)}. ^Yp<0.05 ;

^{YY}p<0.01 ; ^{YY}p<0.001, en comparaison avec les souris *Tph1*^{-/-(+/-)}. *Tph1*^{+/+(commerce)} n= 8 ; *Tph1*^{-/-(+/-)} n=6 ; *Tph1*^{-/-(-/-)} n=4.

Ces modifications anatomiques sont particulièrement visibles en systole, c'est-à-dire pendant la contraction ventriculaire. La CMD est compensée par une légère hypertrophie du ventricule gauche (Figure 51).

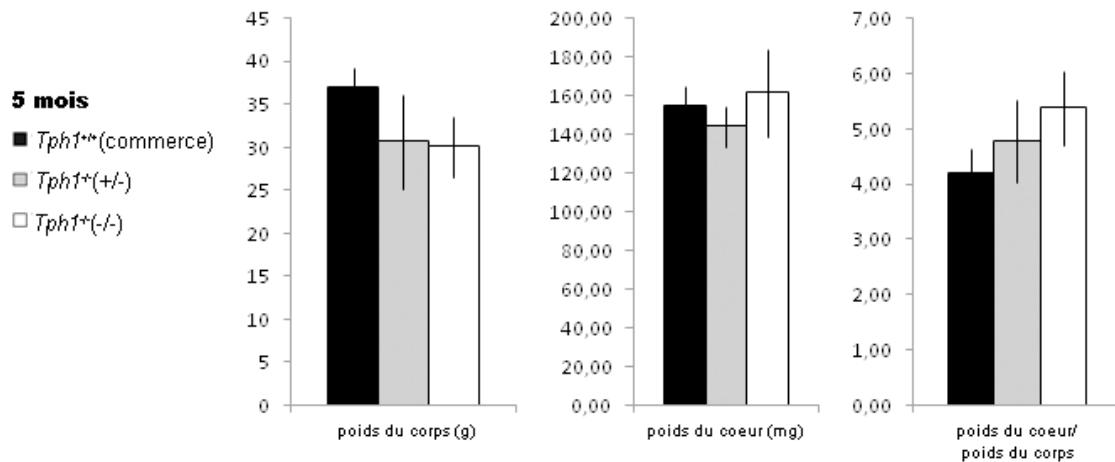


Figure 51: Détermination du poids des animaux, du poids de leur cœur et du rapport poids du cœur/poids du corps.

Tph1^{+/+} (commerce) n= 8 ; *Tph1*^{+/-} (+/-) n=6 ; *Tph1*^{+/-} (-/-) n=4. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

D'un point de vue fonctionnel, l'échocardiographie révèle une diminution significative de la fraction de raccourcissement, indicative de la contractilité du cœur, sans modification significative de la fréquence cardiaque (Figure 52). De façon surprenante, les animaux *Tph1*^{+/-} (+/-) du même âge (5 mois), ne présentent pas de signe de pathologie cardiaque détectables par échocardiographie (Figure 52). Seuls les animaux mutés issus de mères *Tph1*^{+/-} développent une cardiopathie de type dilatée, qui se met en place entre le deuxième et le cinquième mois des animaux. Le suivi de ces mêmes souris à des temps plus tardifs n'a pas révélé d'aggravation du phénotype.

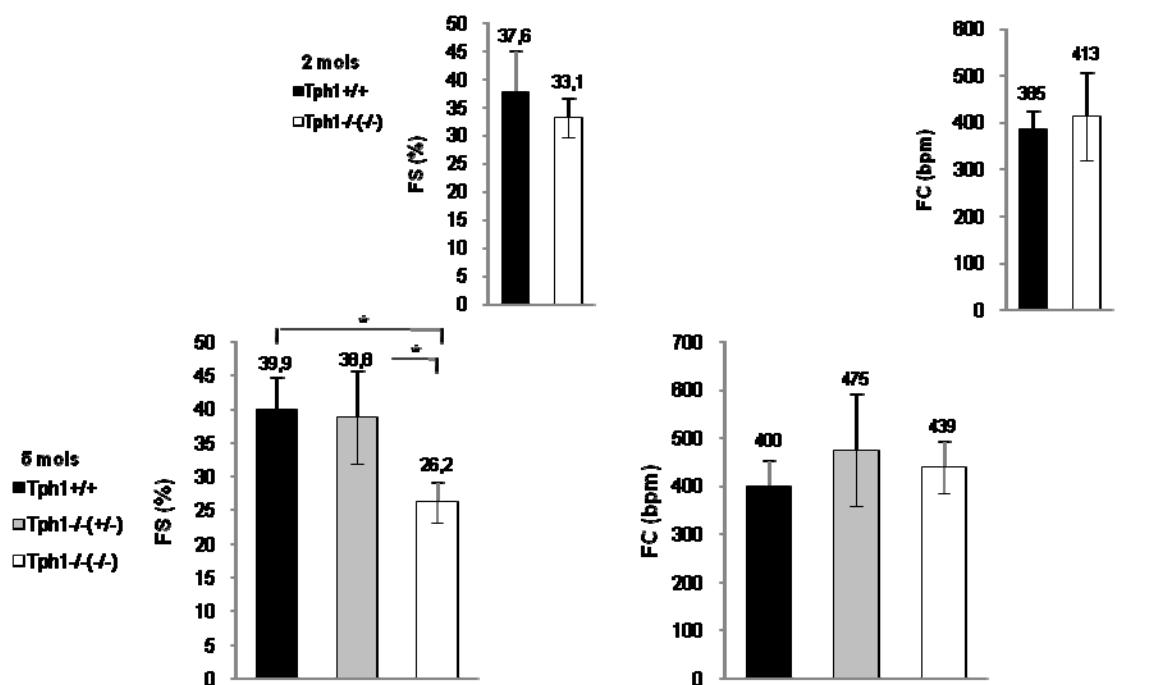


Figure 52: Données échocardiographiques fonctionnelles des souris *Tph1*^{-/-}(+/-), *Tph1*^{-/-}(-/-) vs. *Tph1*^{+/+}(commerce) à 2 et 5 mois.

FS: fraction de raccourcissement ; FC: fréquence cardiaque. *Tph1*^{+/+}(commerce) n= 8 ; *Tph1*^{-/-}(+/-) n=6 ; *Tph1*^{-/-}(-/-) n=4. Les données sont exprimées en moyenne \pm déviation standard. *p<0.05.

Les animaux *Tph1*^{-/-}(+/-) analysés dans notre première étude présentaient une diminution significative de la contractilité cardiaque mesurée par cathéterisation de conductance. Nous montrons cependant ici, par échocardiographie, que des animaux de même génotype et de même âge ne semblent pas développer de cardiopathie. Comment expliquer ces différentes observations ? En fait, les groupes d'animaux analysés dans les deux études diffèrent au niveau de leur fond génétique. Les premières souris *Tph1*^{-/-}(+/-) étaient générées sur un fond génétique hybride C57BL/6-129SvJ. Depuis, le fond génétique des animaux a été purifié par « backcross » et les animaux sont maintenant générés sur un fond génétique C57BL/6 pur. Nous reviendrons sur l'importance du fond génétique des souris *Tph1*^{-/-} dans le dernier chapitre des résultats.

La dilatation du ventricule gauche des souris *Tph1*^{-/-}(-/-) décelée par échocardiographie est corrélée avec l'augmentation dramatique des trois facteurs plasmatiques indicatifs d'un stress cardiaque (Figure 53): les facteurs BNP, CK-MB et troponine Ic. L'augmentation intermédiaire du taux de ces marqueurs dans le plasma des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) laisse penser que ces souris développeront une cardiomyopathie à un âge plus avancé, et explique le fait que nous n'ayons pas détecté d'anomalies morphologiques ou fonctionnelles chez ces animaux.

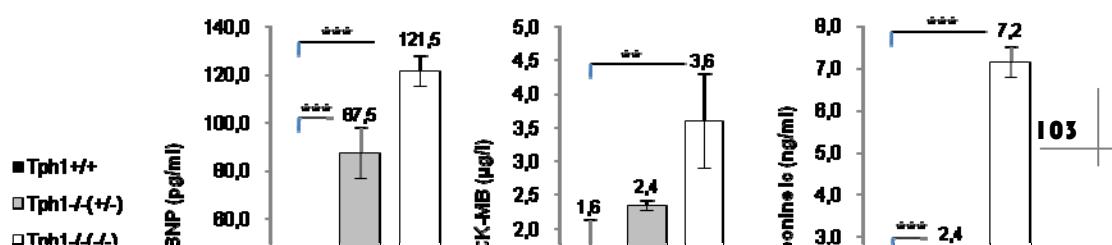


Figure 53: Dosage plasmatique des facteurs d'insuffisance cardiaque.

Souris *Tph1*^{+/+}(commerce), n=7; souris *Tph1*^{-/-}(+/-), n=3; souris *Tph1*^{-/-}(-/-), n=4. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard. **p<0.01 ; ***p<0.001.

En conclusion, les souris *Tph1*^{-/-}(-/-) développent une cardiomyopathie dilatée entre 2 et 5 mois. Les paramètres anatomiques et fonctionnels de la CMD, mesurés par échocardiographie, sont corrélés avec une augmentation drastique des marqueurs de souffrance cardiaque dans le plasma. L'augmentation intermédiaire de ces facteurs chez les souris *Tph1*^{-/-}(+/-), associée aux mesures échocardiographiques suggèrent que la cardiopathie des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) se met en place chez des animaux plus âgés.

La différence d'âge des animaux atteints reflète-t-elle une différence dans le taux de sérotonine circulante ? Autrement dit, la cardiopathie est-elle corrélée avec le taux de sérotonine circulante ?

II. La cardiopathie est-elle corrélée avec le taux de sérotonine circulante ?

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, la sérotonine circulante synthétisée par les cellules entérochromaffines ou les neurones myentériques, est libérée dans le sang, rapidement capturée puis stockée dans les granules denses des plaquettes sanguines. Sa concentration est alors de l'ordre de quelques micromoles/litre. Dans le plasma sanguin, sa concentration est de l'ordre de quelques nanomoles/litres.

Nous avons mesuré les taux de sérotonine dans les deux compartiments sanguins des souris *Tph1*^{-/-}. Comme nous l'attendons chez les souris dont le gène *Tph1* est invalidé, la quantité de sérotonine mesurée dans le sang total (5-HT totale) est dramatiquement réduite par rapport à la quantité présente chez les souris sauvages (Figure 54). Nous ne détectons

pas de diminution supplémentaire du taux de 5-HT totale chez les souris *Tph1*^{-/-}(-/-) par rapport aux souris *Tph1*^{-/-}(+/-) (Figure 54).

Le taux de sérotonine plasmatique des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) est diminué par rapport aux quantités mesurées chez les souris sauvages, reflétant aussi l'absence de synthèse de 5-HT par la TPH1 chez ces animaux. De façon remarquable, le taux de sérotonine plasmatique des animaux *Tph1*^{-/-}(-/-) est significativement réduit par rapport à celui des animaux *Tph1*^{-/-}(+/-). Il existe donc une gradation des niveaux de sérotonine plasmatique en fonction du génotype maternel.

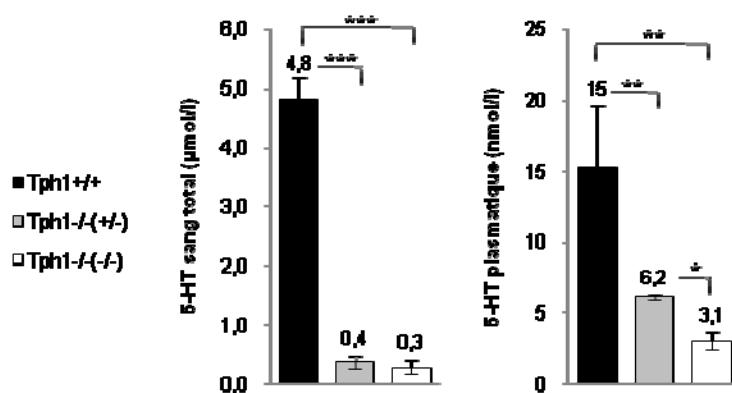


Figure 54: Taux de sérotonine dans le sang total et dans le plasma sanguin des souris *Tph1*^{-/-}(+/-), *Tph1*^{-/-}(-/-) vs. *Tph1*^{+/+}(commerce).

La sérotonine est mesurée par HPLC sur des échantillons de sang provenant de souris *Tph1*^{+/+}(commerce), n=7; souris *Tph1*^{-/-}(+/-), n=3; souris *Tph1*^{-/-}(-/-), n=6. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Les coefficients de corrélation calculés à partir des niveaux individuels de sérotonine plasmatique et des niveaux des facteurs plasmatiques d'insuffisance cardiaque montrent sans ambiguïté que plus la quantité de sérotonine plasmatique est faible, plus les taux plasmatiques des marqueurs de souffrance cardiaque sont élevés (Figure 55). Ces données établissent clairement que l'âge des animaux auquel se développe la cardiopathie, ainsi que le degré de l'atteinte cardiaque dépendent des niveaux de sérotonine plasmatique.

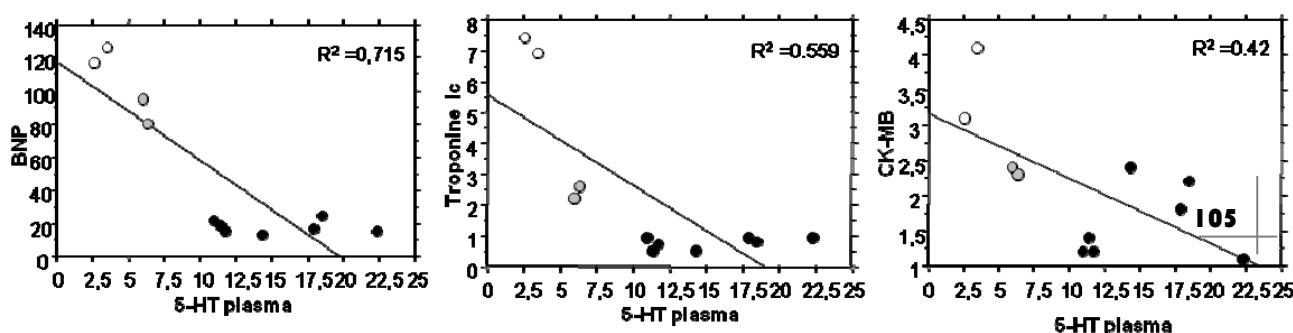


Figure 55: Corrélations entre les taux de sérotonine mesurés dans le plasma et les concentrations des marqueurs plasmatique d'insuffisance cardiaque.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer les différences de concentration de sérotonine plasmatique observées entre les souris *Tph1^{-/-}*(+/-) et *Tph1^{-/-}*(-/-): i) une diminution de la synthèse de 5-HT par la TPH2 dans les intestins, ii) une augmentation du catabolisme de la 5-HT chez les souris *Tph1^{-/-}*(-/-), et/ou iii) une modification du nombre, de la fonction (capture de 5-HT, capacité de dégranulation), ou de la structure (capacité de stockage de la 5-HT) des plaquettes sanguines, qui constituent le réservoir principal de sérotonine à la périphérie.

Les deux premiers mécanismes paraissent peu probables dans la mesure où nous n'avons pas détecté de diminution de la quantité de 5-HT dans le sang total. Nous avons alors entrepris l'analyse de la structure et de la fonction des plaquettes sanguines des souris *Tph1^{-/-}*(-/-), par rapport aux souris *Tph1^{-/-}*(+/-) et *Tph1^{+/+}*(commerce).

III. La structure et la fonction des plaquettes sanguines des souris *Tph1^{-/-}*(-/-) sont-elles affectées ?

Les numérations sanguines effectuées sur le sang des souris *Tph1^{-/-}*(+/-) et *Tph1^{-/-}*(-/-) versus sauvages révèlent que le nombre total moyen de plaquettes sanguines diminue graduellement, en fonction du génotype maternel (Figure 56).

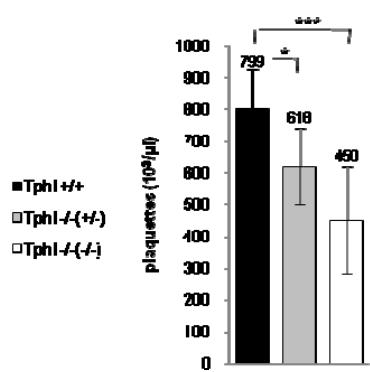


Figure 56: Nombre total de plaquettes sanguines chez les souris *Tph1^{-/-}*(+/-), *Tph1^{-/-}*(-/-) vs. *Tph1^{+/+}*(commerce).
Les mesures ont été effectuées sur des animaux âgés de 20 semaines. n=6 souris dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard. *p<0.05, ***p<0.001.

Ces résultats montrent que le faible taux de sérotonine maternelle au cours de la gestation a des répercussions bien après la période du développement embryonnaire puisqu'il affecte le nombre de plaquettes sanguines des animaux *Tph1^{-/-}* adultes. Nous reviendrons sur ces résultats dans le chapitre suivant des résultats.

La fonction des plaquettes est-elle également perturbée ? L'analyse des plaquettes sanguines d'un point de vue structural et fonctionnel est en cours de réalisation. Nous avons d'ores et déjà réalisés les prélèvements sanguins sur les animaux de chaque génotype. La structure des plaquettes ainsi que le nombre de granules denses qu'elles contiennent seront déterminés par microscopie de fluorescence. L'évaluation de la quantité de sérotonine radio-marquée internalisée dans les plaquettes nous permettra de déterminer les capacités de recapture de sérotonine par les plaquettes sanguines. Enfin, nous déterminerons les capacités de relarguage de la sérotonine par les plaquettes par des tests d'agrégation plaquettaire suivis de la mesure de la quantité de sérotonine libérée.

IV. Quel est le rôle de la sérotonine maternelle dans le contrôle du taux de sérotonine circulante ?

Nos résultats permettent de conclure que le taux de sérotonine circulante, et plus particulièrement le taux de sérotonine plasmatique, n'est pas dépendant du génotype de l'embryon mais du génotype de la mère. Comment le génotype maternel, autrement dit comment le taux de sérotonine maternelle présent au cours du développement embryonnaire, contrôle-t-il le niveau de sérotonine plasmatique de l'animal adulte ?

Nos observations préliminaires indiquent que la sérotonine maternelle régulerait l'hématopoïèse fœtale. En effet, la numération sanguine des souris *Tph1^{-/-}*(+/-) et *Tph1^{-/-}*(-/-) révèle non seulement la diminution du nombre de plaquettes sanguines comme nous venons de l'indiquer, mais également une diminution du nombre de globules rouges, une augmentation du volume corpusculaire moyen (VCM) et une diminution de l'hématocrite chez les souris *Tph1^{-/-}*(-/-) (Figure 57). La diminution à la fois du nombre de plaquettes sanguines et du nombre de globules rouges montre que la sérotonine maternelle est impliquée dans l'hématopoïèse fœtale.

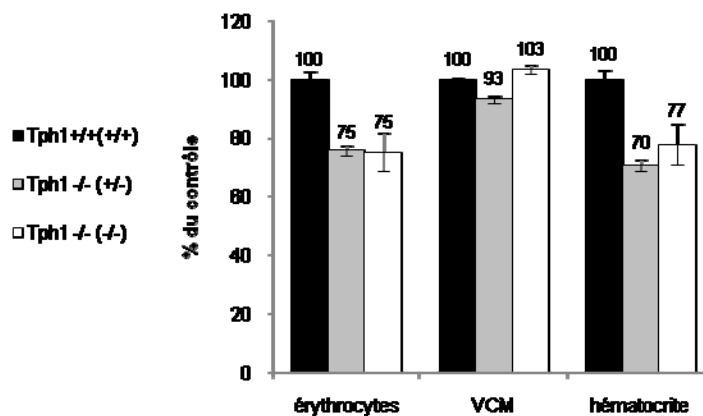


Figure 57: Numération sanguine des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) et *Tph1*^{-/-}(-/-) vs. *Tph1*^{+/+}(commerce).

Le volume corpusculaire moyen (VCM) donne une indication sur la taille moyenne des érythrocytes. Les mesures ont été effectuées sur des animaux âgés de 20 semaines. n=6 souris dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard.

L'observation macroscopique des embryons *Tph1*^{-/-}(-/-) à E13.5 montre que le foie, organe hématopoïétique fœtal à ce stade du développement, est pâle et de plus petite taille que celui des embryons sauvages (Figure 58). L'analyse histologique préliminaire des foies des embryons *Tph1*^{-/-}(-/-), comparée aux embryons *Tph1*^{+/+}(commerce) révèle une désorganisation de l'architecture du tissu chez les animaux mutés. Enfin, l'observation microscopique du sang de cordon à E13.5 démontre un plus grand nombre de globules rouges (GR) immatures chez les embryons mutés. Les GR sont de tailles variables, leur noyau plus gros est centré dans la cellule, contrairement aux GR des souris sauvages, dont le noyau est excentré, prêt à être expulsé.

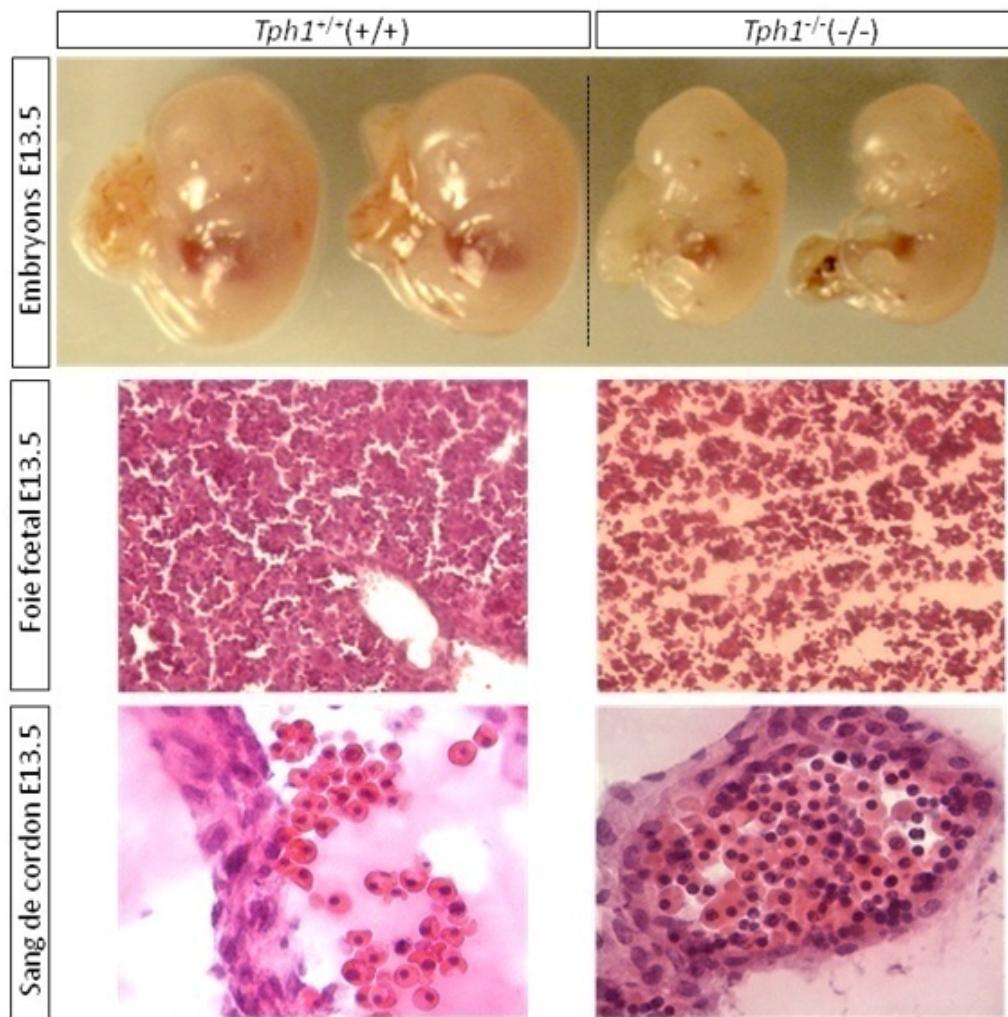


Figure 58: Examen des embryons *Tph1*^{-/-}(-/-) vs. *Tph1*^{+/+}(commerce).

Haut: morphologie externe des embryons *Tph1*^{-/-}(-/-) au jour embryonnaire 13.5 en comparaison des embryons *Tph1*^{+/+}(++). Les embryons mutés sont de plus petite taille (cf. article 3) et présentent un foie plus petit. Milieu: cryocoupes de foie à E13.5, colorées à l'hématoxyline-éosine. L'architecture du foie est totalement modifiée chez les embryons mutés. Bas: érythrocytes du sang de cordon colorés à l'hématoxyline-éosine. Les érythrocytes des embryons contrôles ont un noyau excentré, prêt à être expulsé de la cellule. Les érythrocytes des embryons mutés ont un noyau plus gros, centré dans la cellule.

La sérotonine maternelle agirait également sur le développement des plaquettes sanguines. Le faible taux de sérotonine pendant le développement embryonnaire affecterait la maturation des mégacaryocytes en plaquettes sanguines. Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction de ce mémoire, les mégacaryocytes expriment à leur surface le récepteur 5-HT_{2B} et le SERT, et contiennent de la sérotonine. L'absence de sérotonine au cours du développement embryonnaire empêcherait la signalisation par le récepteur 5-HT_{2B} et l'internalisation de la sérotonine par le SERT. En conséquence, les mégacaryocytes resteraient dans un état immature.

V. Conclusion

Nos résultats mettent en exergue le rôle crucial de la sérotonine plasmatique dans le développement de l'atteinte cardiaque. Deux résultats majeurs ressortent de notre analyse:

La concentration de sérotonine plasmatique individuelle est directement corrélée avec l'augmentation du taux individuel des marqueurs plasmatiques d'insuffisance cardiaque. Nous confirmons ici la validité de notre hypothèse de départ.

La concentration de sérotonine dans le plasma des souris *Tph1^{-/-}* adultes dépend du génotype maternel. La sérotonine maternelle régulerait la formation ou la maturation des plaquettes sanguines et des globules rouges au cours du développement embryonnaire par un mécanisme qui reste à déterminer.

Nos résultats soulèvent d'importantes questions:

- Les cellules sanguines sont renouvelées en continu pendant toute la vie d'un organisme. Le fait que la sérotonine maternelle influence la formation ou la maturation des cellules sanguines chez la souris adulte suggère des malformations des organes hématopoïétiques de la souris adulte. L'analyse des fonctions hématopoïétiques de la moelle osseuse des souris *Tph1^{-/-}* permettra de préciser le rôle exact de la sérotonine fournie par la mère sur la formation de ces organes.
- Les mégacaryocytes contiennent de la sérotonine. Sont-ils capables de la synthétiser ? sont-ils capables de la libérer ? La sérotonine contenue dans les plaquettes sanguines matures provient-elle de sa recapture par le SERT exprimé à leur surface ou provient-elle, pour partie, des mégacaryocytes ?
- Quel est le mode d'action de la sérotonine internalisée dans les mégacaryocytes ? Comment régule-t-elle leur maturation ?

Quatrième partie

L'influence du fond génétique des souris

Tph1^{-/-}

Comme nous venons de le voir, la caractérisation du phénotype cardiaque des souris *Tph1^{-/-}*(+/-) en conditions basales par cathéterisation de conductance a révélé une hétérogénéité interindividuelle très importante dans la population des souris mutées. Nous avons alors recherché à réduire au maximum la variabilité entre individus en préférant les mâles aux femelles pour la suite des expériences.

Un autre paramètre qui pouvait expliquer l'hétérogénéité du phénotype cardiaque était le fond génétique des animaux. En effet, les premières souris *Tph1^{-/-}*(+/-) que nous avons étudiées étaient générées sur un fond génétique hybride C57BL/6-129SvJ. La mixité du fond génétique pouvait constituer un facteur supplémentaire de variabilité interindividuelle. Ainsi que nous l'avons mentionné dans la première partie des résultats, nous disposions d'une seconde lignée de souris *Tph1^{-/-}*, générée sur un fond génétique pur 129SvJ. Afin de nous affranchir de l'influence de la mixité du fond génétique, nous avons en toute logique caractérisé le phénotype cardiaque des souris 129SvJ.

I. Caractérisation du phénotype cardiaque des souris *Tph1^{-/-}* 129SvJ

L'analyse des paramètres hémodynamiques cardiaques par échocardiographie et cathéterisation de conductance de souris *Tph1^{-/-}*(+/-) mâles 129SvJ, âgées de 5 à 8 mois, n'a pas révélé d'anomalies, ni dans l'anatomie, ni dans la fonction de leur cœur, par rapport aux souris *Tph1^{+/+}*(commerce). De façon encore plus surprenante, les souris *Tph1^{-/-}*(-/-) ne développaient pas non plus de cardiopathie. Enfin, aucune souris *Tph1^{-/-}* 129SvJ ne montrait une réponse cardiaque particulière pendant le test d'effort pharmacologique à la dobutamine. Le phénotype cardiaque des souris *Tph1^{-/-}* mis en évidence jusqu'à présent ne dépendrait-il que du fond génétique des animaux ?

Afin de confirmer l'absence de phénotype cardiaque chez les souris *Tph1^{-/-}* 129SvJ, nous avons analysé, comme pour les souris C57BL/6, les marqueurs plasmatiques d'insuffisance cardiaque (§III.1, page 79). A l'inverse des résultats obtenus sur les souris

Tph1^{-/-}(+/-) C57BL/6, les souris *Tph1^{-/-}(+/-)* 129SvJ âgées de 5 mois ne montrent pas de signes biochimiques de souffrance cardiaque (Figure 59). Ces données confirment l'absence de cardiopathie chez les animaux *Tph1^{-/-}(+/-)* 129SvJ.

Les souris *Tph1^{-/-}(-/-)* 129SvJ, en revanche, présentent une augmentation des facteurs plasmatiques d'insuffisance cardiaque en comparaison avec les souris *Tph1^{+/+}*(commerce) (Figure 59).

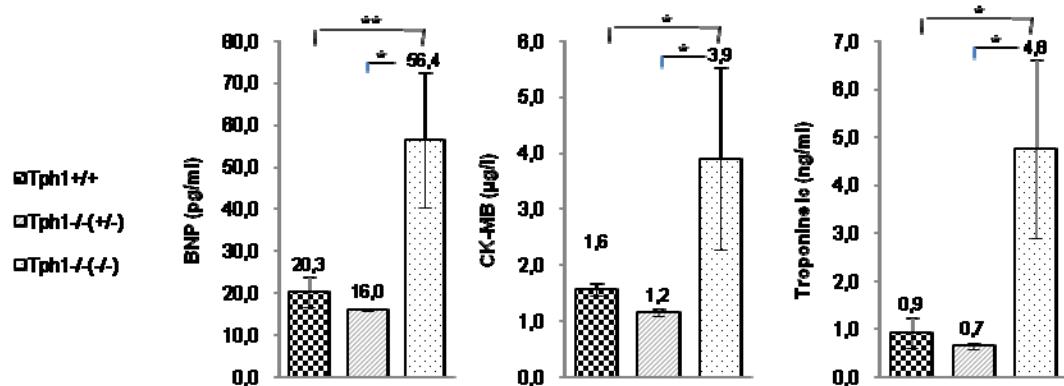


Figure 59: Dosage plasmatique des facteurs d'insuffisance cardiaque chez les souris de fond génétique 129SvJ.

Souris *Tph1^{+/+}*(commerce), n=7; souris *Tph1^{-/-(+/-)}*, n=3; souris *Tph1^{-/-(-/-)}*, n=4. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard. *p<0,05, **p<0,01.

Comment expliquer alors que nous n'ayons pas détecté d'anomalies anatomiques ou fonctionnelles cardiaques par échocardiographie chez les souris *Tph1^{-/-(-/-)}* 129SvJ ?

La comparaison du niveau d'augmentation des trois facteurs plasmatiques d'insuffisance cardiaque, par exemple le BNP (Figure 60), met en évidence un phénotype très atténué chez les souris *Tph1^{-/-(-/-)}* de souche 129SvJ par rapport aux souris *Tph1^{-/-(-/-)}* de souche C57BL/6 du même âge, mais également atténué par rapport aux souris *Tph1^{-/-(+/-)}* C57BL/6. Les souris *Tph1^{-/-(+/-)}* C57BL/6 ne présentaient pas de phénotype cardiaque détectable par échocardiographie avec un taux plasmatique de BNP à 90 pg/ml. A la lumière de ces résultats, il n'est pas surprenant que les souris *Tph1^{-/-(-/-)}* 129SvJ, avec un taux plasmatique de BNP à 55 pg/ml, ne présentent pas de phénotype cardiaque.

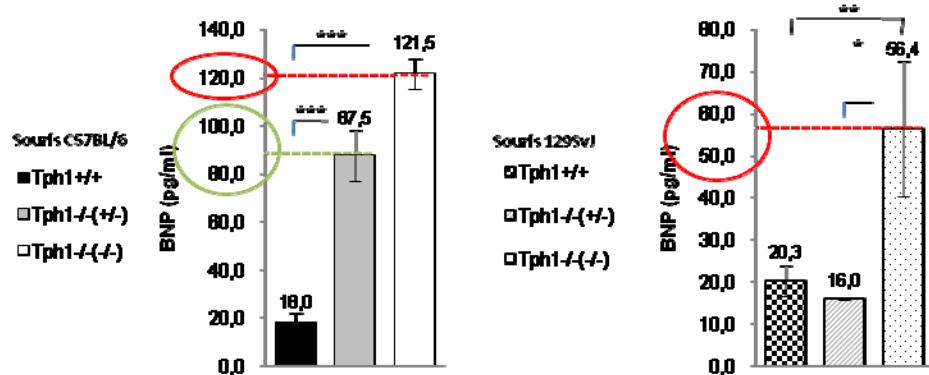


Figure 60: Comparaison des niveaux plasmatiques de BNP des souris *Tph1*^{-/-} de fonds génétiques C57BL/6 et 129SvJ.

Les valeurs présentées sont extraites des Figure 53 et Figure 59.

Le niveau d'expression des marqueurs d'insuffisance cardiaque dans le plasma des souris *Tph1*^{-/-} 129SvJ est inférieur à celui des souris *Tph1*^{-/- (+/-)} C57BL/6. Cette observation pouvait signifier le développement d'une cardiopathie retardée dans le temps chez les animaux *Tph1*^{-/-} 129SvJ. Les différences d'expression de ces marqueurs entre les souris *Tph1*^{-/-} C57BL/6 et 129SvJ pourraient-elles être dues à des taux de sérotonine circulante différents ?

II. Quels sont les taux de 5-HT totale et plasmatique des souris *Tph1*^{-/-} 129SvJ ?

Comme pour les souris *Tph1*^{-/- (+/-)} et *Tph1*^{-/- (-/-)} de souche C57BL/6, le taux de sérotonine dans le sang total ne diffère pas entre les deux groupes de souris mutées 129SvJ. (Figure 61). En revanche, la concentration de 5-HT plasmatique mesurée chez les souris *Tph1*^{-/- (-/-)} 129SvJ est diminuée par rapport aux souris *Tph1*^{+/+} (commerce) et *Tph1*^{-/- (-/-)}, de la même façon que chez les souris C57BL/6. Nous observons, de façon inexpliquée, que le taux de 5-HT plasmatique est augmenté chez les animaux *Tph1*^{-/- (+/-)} par rapport aux animaux sauvages du commerce.

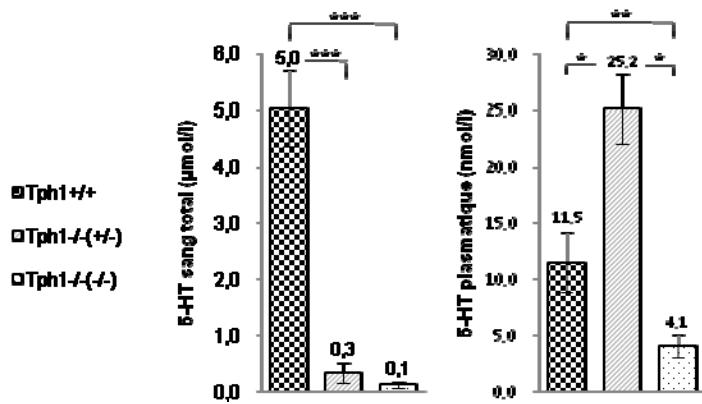


Figure 61: Taux de sérotonine dans le sang total et dans le plasma sanguin des souris *Tph1*^{-/-(+/-)}, *Tph1*^{-/-(-/-)} vs. *Tph1*^{+/+}(commerce) de fond génétique 129SvJ.

La sérotonine est mesurée par HPLC sur des échantillons de sang provenant de souris *Tph1*^{+/+}(commerce), n=7; souris *Tph1*^{-/-(+/-)}, n=3; souris *Tph1*^{-/-(-/-)}, n=6. Les résultats sont présentés en moyenne \pm déviation standard. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Malgré cette observation étonnante, les courbes de corrélation calculées à partir des niveaux individuels de sérotonine plasmatique et les niveaux individuels des marqueurs plasmatiques d'insuffisance cardiaque, montrent sans ambiguïté que plus le niveau de sérotonine plasmatique est faible, plus les taux plasmatiques des marqueurs de souffrance cardiaque sont élevés (Figure 62).

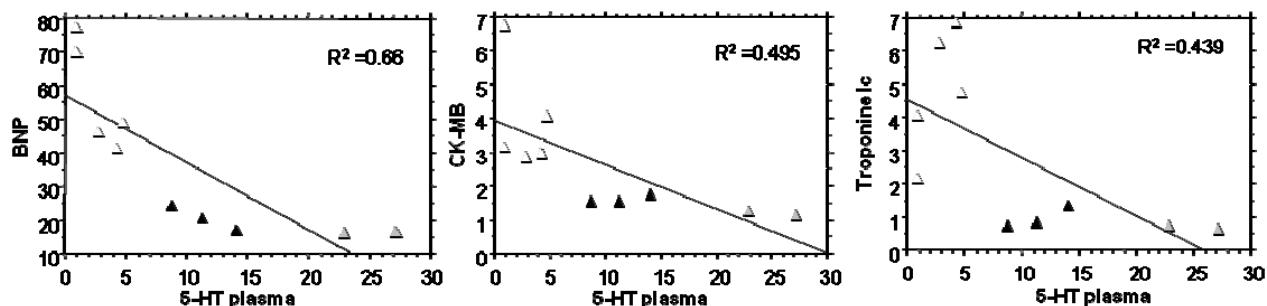


Figure 62: Corrélations entre les taux de sérotonine mesurés dans le plasma des souris *Tph1* de fond génétique 129SvJ et les concentrations plasmatiques des marqueurs d'insuffisance cardiaque.

Ces données confirment nos précédents résultats sur les souris C57BL/6 et démontrent clairement que l'âge des animaux auquel se développe la cardiopathie, ainsi que le degré de l'atteinte cardiaque dépendent des niveaux de sérotonine plasmatique. De plus, ces données démontrent que le taux de sérotonine plasmatique et par conséquent la sévérité de la cardiopathie des souris *Tph1*^{-/-(-/-)} dépendent du génotype de la mère, et non pas de leur propre génotype.

Les taux de sérotonine dans le sang total et dans le plasma sanguin des souris *Tph1*^{-/-} (-/-) ne diffèrent pas entre les deux souches de souris. Comment expliquer alors les différences de phénotypes entre les souris *Tph1*^{-/-} de fond génétique C57BL/6 et 129SvJ ?

III. La structure et la fonction des plaquettes sanguines des souris *Tph1*^{-/-} (-/-) 129SvJ sont-elles affectées ?

La numération sanguine effectuée chez les souris *Tph1* de souche 129SvJ permet d'apporter une première explication. Une diminution du nombre de plaquettes sanguines et de globules rouges chez les souris *Tph1*^{-/-} (-/-) C57BL/6, a été observée. Au contraire, le nombre de plaquettes sanguines est augmentée de façon graduelle chez les souris *Tph1*^{-/-} 129SvJ, en fonction du génotype maternel (Figure 63). De plus, une augmentation du nombre de GR, moins importante que l'augmentation du nombre de plaquettes, est également détectée chez les souris *Tph1*^{-/-} (-/-) vs. *Tph1*^{+/+} (commerce) (Figure 63).

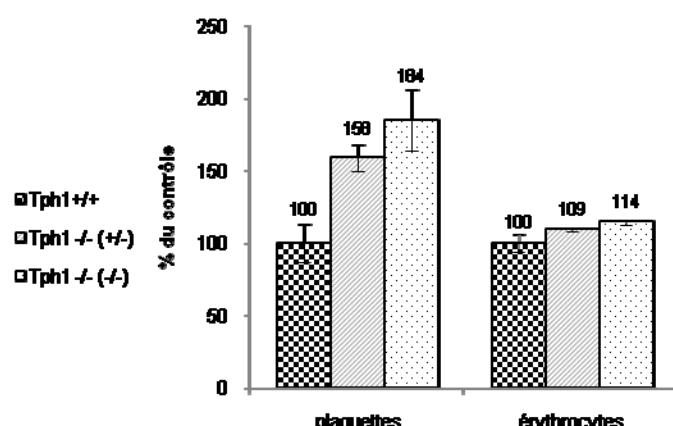


Figure 63: Numération sanguine des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) et *Tph1*^{-/-}(-/-) de fond génétique 129SvJ, en comparaison des animaux contrôles.

Les nombres de plaquettes sanguines et d'érythrocytes sont augmentés dans le sang des souris 129SvJ *Tph1*^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Les mesures ont été effectuées sur des animaux âgés de 20 semaines. n=6 souris dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm déviation standard.

Dans la lignée de souris 129SvJ, la sérotonine semble également participer à la formation et/ou à maturation des plaquettes sanguines et des globules rouges. La comparaison des numérations sanguines des souris *Tph1*^{-/-} C57BL/6 versus 129SvJ révèle cependant que la 5-HT maternelle induit des effets "en miroir" selon le fond génétique.

De la même façon que pour les souris de la lignée C57BL/6, la recherche de défaut dans la structure et la fonction des plaquettes sanguines des souris mutées 129SvJ est actuellement en cours. Ces données s'avéreront cruciales pour comprendre le mécanisme d'action de la sérotonine maternelle dans l'hématopoïèse fœtale et pour définir l'origine des observations "en miroir" faites entre les lignées de souris mutées des deux fonds génétiques.

IV. Conclusion

La Figure 64 résume les caractéristiques anatomiques, fonctionnelles, biochimiques et moléculaires cardiaques des souris *Tph1*^{+/+}(commerce), *Tph1*^{/-}(+/-), et *Tph1*^{/-}(-/-), dans les deux fonds génétiques étudiés. Il ressort très clairement que les souris *Tph1*^{/-}(-/-) 129SvJ présentent des caractéristiques biochimiques et moléculaires proches de celles des animaux *Tph1*^{/-}(+/-) C57BL/6.

Les souris 129SvJ *Tph1*^{/-}(-/-), avec des niveaux intermédiaires de facteurs plasmatiques d'insuffisance cardiaque, développeront vraisemblablement la même cardiopathie que les souris *Tph1*^{/-}(-/-), mais plus tard dans le temps.

L'ensemble des résultats établit clairement que la cardiopathie développée par les souris *Tph1*^{/-}, qu'elles soient issues de mères *Tph1*^{+/+} ou *Tph1*^{/-} dépend de leur taux de sérotonine plasmatique. Celui-ci est déterminé par la quantité de sérotonine maternelle que les souris ont reçue au cours de leur développement embryonnaire. Pendant le développement embryonnaire, la sérotonine maternelle serait une molécule essentielle pour la formation ou la maturation des plaquettes sanguines et des globules rouges. Des facteurs additionnels spécifiques du fond génétique des animaux seraient également impliqués dans les mécanismes d'action de la sérotonine maternelle au cours du développement embryonnaire.

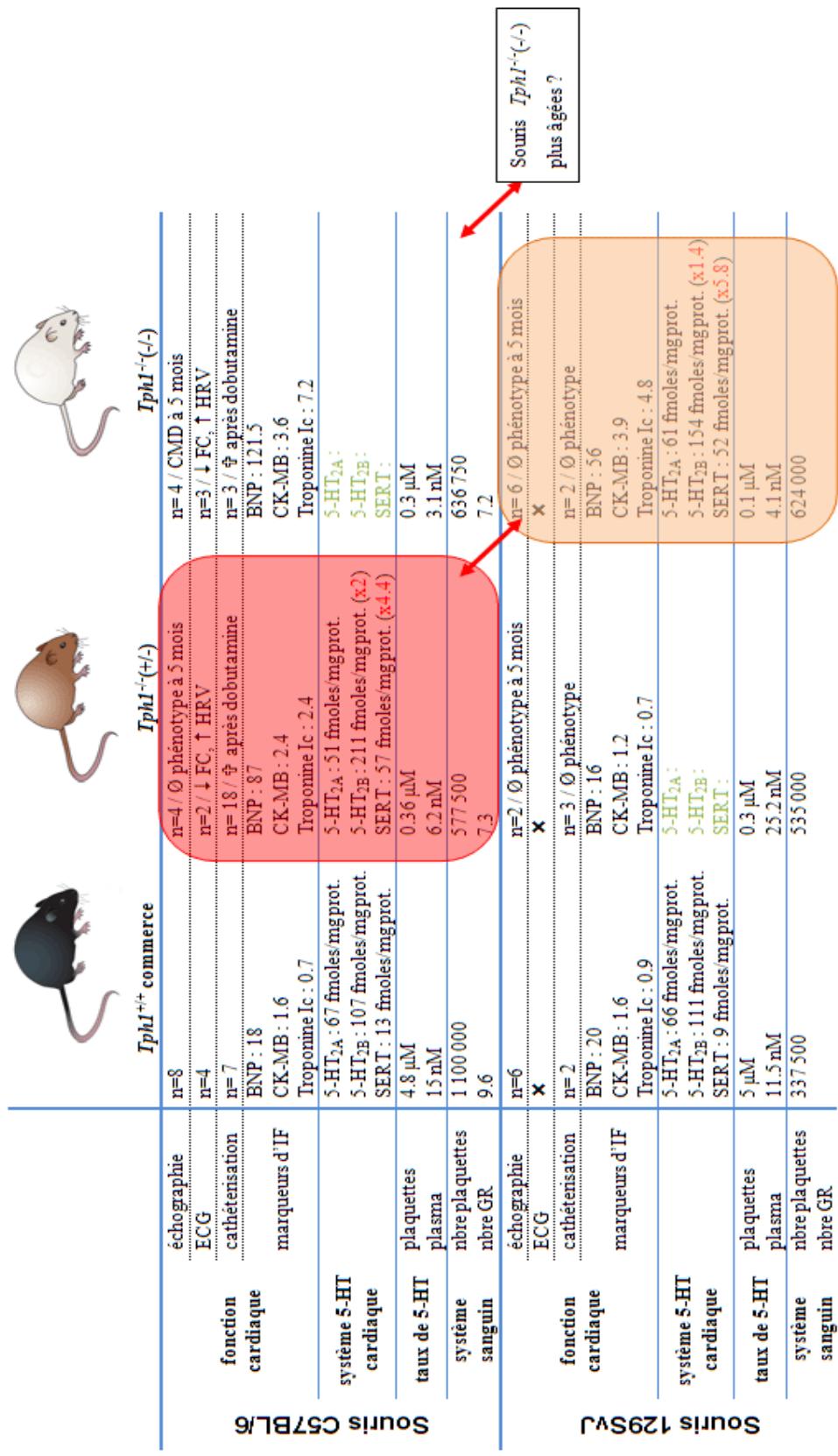


Figure 64: Résumé des expériences comparatives menées sur les souris $Tph1^{-/-}$ (+/-), $Tph1^{-/-}$ (-/-) et $Tph1^{+/+}$ (commerce) des fonds génétiques C57BL/6 et 129SvJ.

En vert sont mentionnées les expériences en cours de réalisation. Les cadres rouge et orange mettent en évidence les caractéristiques biochimique et moléculaire très proches des souris *Tph1*^{-/-} (129SvJ) et des souris *Tph1*^{+/+} (C57BL/6).

Discussion & Perspectives

La caractérisation des composants clef de la neurotransmission sérotoninergique centrale et des actions physiologiques de la sérotonine à la périphérie a connu un essor considérable dans les années 1980, grâce aux nouvelles approches de la biologie moléculaire. Cette technologie a conduit à l'identification du gène de la tryptophane hydroxylase, l'enzyme hautement spécifique et limitante de sa synthèse, d'une pluralité de récepteurs spécifiques et d'un transporteur de haute affinité situé dans la membrane plasmique, et dont l'activité influe directement sur la concentration extracellulaire de l'amine, au voisinage immédiat de ses récepteurs. La connaissance des mécanismes qui régulent l'expression du gène de la TPH est de première importance; c'est la raison pour laquelle le laboratoire s'est consacré à son étude dès le début des années 1980.

Après avoir isolé le gène *Tph* humain et caractérisé les mécanismes de régulation de sa transcription en réponse à l'AMP cyclique dans les années 1990, l'axe de recherche développé au laboratoire a consisté à étudier *in vivo* les conséquences de l'absence de sérotonine dans l'organisme par inactivation du gène *Tph* chez la souris. En 2002, les premières souris homozygotes mutées pour le gène *Tph* furent obtenues par *knock-in* du gène rapporteur *LacZ* en lieu et place du gène *Tph1*.

L'analyse de la distribution de la sérotonine chez les souris *Tph1*^{-/-} a montré que l'invalidation est spécifique de la glande pinéale et des cellules entérochromaffines. La présence de sérotonine à un taux normal dans les noyaux du raphé et les neurones myentériques des souris mutantes est due à l'existence d'un second gène, le gène *Tph2* que nous avons identifié. L'invalidation du gène *Tph1* entraîne un effondrement du niveau de sérotonine circulante du à l'absence d'expression de la TPH1 dans les cellules entérochromaffines. Les souris *Tph1*^{-/-} présentent une cardiomyopathie dilatée (CMD) dont la cinétique de progression dépend de leur fond génétique et du génotype de leurs mères. La CMD entraîne progressivement une grave insuffisance cardiaque, causée par un défaut de la commande électrique cardiaque, ainsi que la réponse mécanique du myocarde. L'absence de sérotonine circulante entraîne des modifications de l'expression d'au moins 2 de ses composants au niveau cardiaque: le récepteur 5-HT_{2B} et le SERT.

Dans ce chapitre, nous discuterons de la dichotomie du système de synthèse de la sérotonine, puis nous formulerais des hypothèses quant aux mécanismes d'action de la sérotonine circulante dans la régulation des fonctions cardiaques et hématopoïétiques. Enfin, nous aborderons les perspectives thérapeutiques qui découlent de nos observations.

Synthèse de la sérotonine: la dualité du système

Au moment de la naissance des premiers animaux *Tph*^{−/−}, notre première surprise fut de constater leur viabilité et leur fertilité. Etant donné l'action étendue de la sérotonine, aussi bien dans le SNC que dans le système périphérique, nous attendions des défauts de développement embryonnaire et/ou d'importants remodelages du SNC.

Nous avons mis en évidence le maintien de la synthèse de sérotonine dans les noyaux du raphé et les neurones myentériques des souris *Tph*^{−/−} par un second gène *Tph*, le gène *Tph2*. Le gène *Tph* invalidé dans la lignée de souris générée au laboratoire est le gène *Tph1*, exprimé dans la glande pinéale et les cellules entérochromaffines.

I. Profil d'expression des deux gènes *Tph*

Nous avons recherché les lieux et temps d'expressions des deux gènes *Tph*, tout d'abord chez l'animal adulte, puis au cours du développement. Ne disposant pas d'anticorps spécifiques de chacune des deux protéines TPH, nous avons réalisé le profil d'expression des deux gènes par les techniques de RT-PCR et d'hybridation *in situ* grâce à des sondes nucléotidiques spécifiques, reconnaissant les régions 3' non traduites de chacun des deux gènes. Nous avons également tiré profit du fait que le gène rapporteur *LacZ* est situé en phase de lecture sous le contrôle du promoteur de la *Tph1* chez les souris *Tph1*^{−/−}, permettant ainsi de suivre l'expression de la β-galactosidase dans les lieux d'expression de la TPH1.

I.1. Expression chez l'adulte

Dans notre premier travail, nous avons montré, par hybridation *in situ* chez la souris adulte, l'expression spécifique du gène *Tph2* dans les noyaux du raphé et du gène *Tph1* dans la glande pinéale. Les expériences de RT-PCR, couplées avec les dosages de 5-HT par HPLC, ont montré une expression de *Tph2* dans les intestins de souris sauvages et mutantes et une expression de *Tph1* uniquement dans les intestins de souris sauvages. La dissection des plexus myentériques des intestins des souris *Tph1*^{−/−} vs. contrôles, réalisée en

collaboration avec le laboratoire de Michael D. Gershon a permis de visualiser par hybridation *in situ* l'expression du gène *Tph2* dans les neurones myentériques.

En résumé, notre étude a révélé la dichotomie du système de synthèse de la sérotonine : le gène *Tph1* est non neuronal et permet la synthèse de sérotonine principalement à la périphérie; et le gène *Tph2* est neuronal, permettant la synthèse de sérotonine au niveau des systèmes nerveux central et périphérique. Nous démontrons sans ambiguïté que les deux gènes *Tph* sont exprimés dans des types cellulaires distincts, le gène *Tph1* dans les cellules non neuronales, le gène *Tph2* dans les cellules neuronales.

Depuis la publication de notre premier travail en 2003 (Cote *et coll.*, 2003), six études ont rapporté l'expression du gène *Tph1* dans des cellules neuronales (Di Lieto *et coll.*, 2007) ou dans le cerveau de rat et de souris (Berman *et coll.*, 2006), ou sur des cerveaux post-mortem humains (Zill *et coll.*, 2007). Par opposition à ces données, nous n'avons jamais détecté le gène *Tph1* dans le cerveau des souris sauvages, ou la β -galactosidase dans le cerveau des souris *Tph1*^{-/-}. Cette contradiction pourrait être due aux techniques utilisées dans chacun des travaux cités. La spécificité des oligonucléotides et des ribosondes que nous avons utilisés pour nos expériences de RT-PCR et d'hybridation *in situ*, la stringence de nos hybridations, ainsi que le fait que nous n'ayons jamais détecté de *Tph1* dans le SNC nous font penser que le gène *Tph* détecté dans les études citées en référence peut être le gène *Tph2*. Nous ne pouvons cependant pas exclure l'expression du gène *Tph1* dans le cerveau, dans des conditions pathologiques.

Dans notre étude, nous avons recherché l'expression des gènes *Tph1* et *Tph2*, dans les lieux de synthèse de sérotonine déjà décrits. Des nouveaux sites d'expression des gènes *Tph* ont depuis été clairement démontrés. Ainsi, une étude de la physiologie de la lactation réalisée en 2004 par Matsuda et coll. a révélé une expression du gène *Tph1* et de la protéine correspondante dans les cellules épithéliales des glandes mammaires de souris; expression particulièrement élevée durant les périodes de gestation et de lactation (Matsuda *et coll.*, 2004). Aucune expression du gène *Tph2* n'a été détectée dans ce tissu. L'expression du gène *Tph1* a également été détectée dans les glandes mammaires humaines, ainsi que dans les deux lignées de cellules mammaires humaines MCF10A (cellules épithéliales mammaires humaines) et T47D (cellules tumorales mammaires humaines). La TPH1, exprimée dans les cellules épithéliales des glandes mammaires, serait induite indirectement par la prolactine et jouerait un rôle sur le développement des glandes mammaires et sur la lactation. Le gène *Tph1* est également exprimé dans des cellules osseuses pré-ostéoclastiques (cellules RAW264.7 et cellules MLO-Y4) et -ostéoblastiques (cellules

MC3T3-E1) immortalisées, différencier ou non; ainsi que dans des cellules ostéoblastiques humaines (Gustafsson *et coll.*, 2006; von Mentzer *et coll.*, 2007).

1.2. Expression au cours du développement

Nous avons montré, par les techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, que le gène *Tph2* est le gène le plus précocement exprimé au cours du développement chez la souris. Ses transcrits sont détectés à partir du jour embryonnaire 10.5 dans le système nerveux central en développement, et dans les premiers neurones sérotoninergiques du SNE à partir de E12.5. Les transcrits du gène *Tph1*, quant à eux, sont détectés à partir des jours embryonnaires 14.5 dans la glande pinéale et 15.5 dans l'intestin. Nos travaux ont établi que l'embryon exprime les gènes de synthèse de la sérotonine à partir du jour embryonnaire E10. En conséquence, la sérotonine détectée chez l'embryon avant le 10^{ème} jour de développement embryonnaire est d'origine maternelle.

De la même façon que chez l'animal adulte, de nouveaux lieux d'expression des gènes *Tph* au cours du développement ont été décrits. Ces données sont compatibles avec les temps d'expression au cours du développement embryonnaire que nous rapportons pour chacun des deux gènes. Ortiz-Alvarado et coll. ont montré, par RT-PCR, l'expression des deux gènes à E13 au niveau de la langue chez la souris (Ortiz-Alvarado *et coll.*, 2006). Une protéine TPH est détectée par immunohistochimie dans les fibres gustatives afférentes au cours du développement, sans qu'il soit possible de faire une distinction entre la TPH1 et la TPH2. Etant donné la spécificité neuronale de la TPH2, ces fibres expriment vraisemblablement la TPH2. Les expériences d'hybridation *in situ* réalisées au laboratoire sur des coupes d'embryons sauvages et *Tph1*^{-/-} confirment l'expression de la *Tph2* dans la langue (Francine Côté, communication personnelle).

Une étude convaincante de l'expression du gène *Tph1* dans le SNC de souris après la naissance a été publiée en 2006. L'équipe du Dr. Nakamura a montré une expression de la TPH1 dans le système nerveux central au cours des premiers jours du développement post-natal de la souris (Nakamura *et coll.*, 2006). La TPH1 est exprimée dans le cerveau après le jour post-natal 7 (P7), et son niveau d'expression est maximal au jour 21. Chez la souris adulte, une expression extrêmement faible est détectée. Nous n'avons pas réalisé d'étude de l'expression des gènes *Tph* chez la souris au cours du développement post-natal. Néanmoins, l'expression de la TPH1 dans le SNC de souris pendant les trois premières semaines de vie suggère que la TPH1 est impliquée dans la régulation des niveaux de 5-HT dans le cerveau, uniquement au cours du développement post-natal.

La production récente d'anticorps spécifiques des deux protéines TPH (Sakowski *et coll.*, 2006) permettra de discriminer les deux enzymes dans les études où cela n'a pas été possible.

II. Les gènes *Tph* chez les non mammaliens

L'analyse, en 2000, du génome séquencé de *Caenorhabditis elegans* avait révélé l'existence d'un gène tryptophane hydroxylase unique, nommé *Tph-1* (wormbase ZK1290.2) (Sze *et coll.*, 2000). Cette analyse avait également établi l'existence de deux autres membres supposés de la famille des hydroxylase des acides aminés aromatiques: le gène B0432.5, orthologue de la TH des mammifères, et le gène K08F8.4, orthologue probable de la PAH des mammifères.

L'existence de deux gènes *Tph* chez les mammifères, rapportée en 2003 (Cote *et coll.*, 2003; Walther *et coll.*, 2003a), et le séquençage du génome disponible pour un nombre croissant d'espèces ont ouvert un nouveau champ de recherche dans l'étude du système sérotoninergique. Les recherches *in silico* ont montré que l'existence de plusieurs gènes *Tph* n'était pas restreinte aux mammifères.

II.1. Deux gènes *Tph* chez la mouche *Drosophila melanogaster*

Chez les insectes, et en particulier chez *Drosophila melanogaster*, la sérotonine a été impliquée dans les sécrétions des glandes salivaires, les contractions du cœur et de l'oviducte, les rythmes circadiens, ainsi que dans les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation. A la différence du gène *Tph-1* de *C. elegans*, un premier gène capable d'hydroxyler à la fois le tryptophane et la phénylalanine a été cloné, et nommé *DTPH* (*Drosophila Tryptophan Phenylalanine Hydroxylase*) (Neckameyer et White, 1992).

Sur la base d'annotation du génome séquencé de *Drosophila*, la même équipe a suggéré en 2005 l'existence d'un autre gène capable d'hydroxyler le tryptophane, le gène *DTRH* (*Drosophila Tryptophan Hydroxylase*). Ce gène est en fait capable, *in vitro* dans un système d'expression dans la bactérie, d'hydroxyler la phénylalanine, mais de façon beaucoup moins efficace que le tryptophane (Coleman et Neckameyer, 2005). Les auteurs suggèrent que le gène *DTRH* serait le gène à prédominance neuronale, et agirait alors

comme le gène *Tph2* des mammifères; et le gène *DTPH* serait le gène périphérique, et agirait comme le gène *Tph1* des mammifères.

II.2. Trois gènes *Tph* chez le poisson zèbre *Danio rerio*

Deux gènes *Tph* ont tout d'abord été clonés chez le poisson zèbre (Bellipanni *et coll.*, 2002). Ces deux gènes sont principalement exprimés au niveau du diencéphale, et ont donc été nommés *TphD1* et *TphD2*. Leur expression est corrélée avec la présence de sérotonine. Bien que la présence de sérotonine dans la région du raphé ait été révélée, aucun de ces deux gènes n'y est exprimé. Ces résultats sont surprenants dans la mesure où chez les mammifères, la présence de sérotonine dans le diencéphale est due à sa recapture par le transporteur SERT, et non pas à une synthèse locale. Les neurones du raphé de mammifères expriment des niveaux très importants de *Tph2*, non détecté dans cette étude. Les auteurs ont alors suggéré qu'un troisième gène puisse être exprimé dans le raphé chez cette espèce. Le troisième gène *Tph*, nommé *TphR*, exprimé dans les neurones du raphé, a été cloné en 2004 par une équipe indépendante (Teraoka *et coll.*, 2004). A la différence des gènes *Tph* de mammifères dont les expressions apparaissent exclusives, le gène *TphR* est exprimé à la fois dans les neurones du raphé, et dans la glande pinéale avec le gène *TphD1*.

Finalement, l'analyse de la banque de séquence génomique du poisson zèbre révèle une quatrième séquence *Tph*, correspondant à un gène *Tph* putatif (Teraoka *et coll.*, 2004). L'équipe de Teraoka n'a cependant pas été en mesure de détecter son expression par hybridation *in situ* dans cette espèce.

L'existence de trois, voire quatre gènes *Tph* chez le poisson zèbre reflète vraisemblablement l'épisode de duplication du génome qui s'est produit au cours de l'évolution chez les téléostéens. De ce fait, certaines gènes exprimés chez les mammifères ont plusieurs gènes dits paralogues chez les poissons, en particulier chez le poisson zèbre (pour revue, Hill *et coll.*, 2005).

III. Plusieurs gènes pour la synthèse de la 5-HT: quelle utilité ?

L'existence de deux gènes *Tph* chez les mammifères reflète l'adaptation physiologique de l'organisme aux différents besoins en sérotonine, au cours du temps (développement embryonnaire puis vie adulte) et selon les organes. Nous pouvons nous

interroger sur l'utilité, pour un organisme, d'exprimer deux gènes distincts pour synthétiser la même molécule. Plusieurs explications peuvent être proposées:

- Les taux de sérotonine sont très différents dans le cerveau et dans la circulation sanguine. L'expression de deux gènes et donc de deux protéines différentes selon les organes et les types cellulaires pourrait permettre des régulations différentielles des deux enzymes adaptées aux besoins des organes dans lesquels ils sont exprimés. Cette explication est cohérente avec les activités enzymatiques différentes des deux enzymes (§II.3.2, page 39). La TPH1 est plus efficace que la TPH2 pour la synthèse de sérotonine, mais sa spécificité pour le substrat L-trp est plus faible. L'efficacité plus importante de la TPH1 est en rapport avec le niveau élevé de sérotonine qu'elle synthétise dans les cellules entérochromaffines.
- Nous avons montré que la sérotonine est synthétisée dans au moins deux types cellulaires différents: des cellules endocrines qui synthétisent la 5-HT qui agit principalement comme une hormone, et des cellules neuronales qui synthétisent la sérotonine qui agit comme un neurotransmetteur dans les systèmes nerveux central et périphérique. La spécification de ces types cellulaires différents s'effectue en réponse à des cascades de facteurs de transcription spécifiques, qui induiront l'expression de l'un ou l'autre des deux gènes *Tph*. Aujourd'hui, les facteurs de transcription qui gouvernent l'expression du gène *Tph2* dans les neurones du SNC commencent à être bien définis. Ils incluent, entre autres, les facteurs *Lmx1b* et *Pet1*, dont nous reparlerons dans la suite de ce mémoire. La spécification des cellules endocrines sérotoninergiques est en revanche mal connue.
- L'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), constituée par des cellules endothéliales spécialisées, sépare les compartiments sanguins central et périphérique. Dans des conditions physiologiques, ce filtre vasculaire spécialisé laisse passer le L-tryptophane, acide aminé essentiel précurseur de la sérotonine, mais pas la sérotonine (O'Kane et Hawkins, 2003). Des échanges seraient cependant possibles dans des conditions extrêmes, notamment en présence de fortes concentrations de sérotonine circulante (Sharma *et coll.*, 1995; Bianchi *et coll.*, 2002). Nous avons démontré, par l'étude des embryons *Tph1^{+/−}* et *Tph1^{−/−}* issus de mères *Tph1^{+/−}* ou *Tph1^{−/−}*, que la sérotonine circulante est un facteur clef du développement embryonnaire, fournie par la mère bien avant que l'embryon ne soit capable de synthétiser sa propre sérotonine. La formation progressive de la BHE qui commence à E11 chez les rongeurs (Weidenfeller *et coll.*, 2007) isolerait alors progressivement le cerveau de l'embryon de tout ou partie de l'apport maternel en sérotonine et rendrait alors indispensable la synthèse de sérotonine dans le cerveau embryonnaire.

IV. Invalidation du gène *Tph2* chez la souris: quel phénotype?

Les souris *Tph1*^{+/−}(+/−), qui ont reçu une quantité de 5-HT réduite de moitié pendant leur développement embryonnaire, ont un taux de sérotonine réduit seulement à la périphérie et sont viables et fertiles. A l'inverse, seulement 20% des animaux *Tph1*^{−/−}(−/−), qui n'ont reçu que 3 à 15% du taux normal de 5-HT pendant leur développement embryonnaire, survivent. Ces données démontrent que la sérotonine circulante fournie par la mère à ses embryons au cours de leur développement, est essentielle à leur survie.

L'absence de synthèse de sérotonine dans le SNC par invalidation du gène *Tph2* conduira-t-elle à des défauts du développement ? Les animaux *Tph2*^{−/−} seront-ils viables ? Quel sera leur phénotype ? Jusqu'à ce jour, aucun article ne rapporte l'invalidation de ce gène chez la souris. Néanmoins, les études de mutations de gènes impliqués dans la mise en place du phénotype sérotoninergique central chez la souris, sont en faveur de la viabilité des souris *Tph2*^{−/−}.

Deux facteurs de transcription indispensables pour l'expression du phénotype sérotoninergique dans les neurones centraux, les facteurs *Pet1* et *Lmx1b*, ont été invalidés chez la souris. Les animaux *Pet1*^{−/−} ne possèdent plus qu'un faible nombre de neurones sérotoninergiques centraux (~20 à 30%) (Hendricks *et coll.*, 2003). Dans le SNC de ces animaux, les niveaux de sérotonine et de son métabolite 5-HIAA ne sont plus qu'à 10 à 15% des niveaux détectés dans le SNC des souris contrôles. Le faible niveau de 5-HT résulte de l'absence de différenciation des progéniteurs sérotoninergiques générés et de la diminution significative de l'expression de la TPH (*a priori* TPH2) dans les neurones sérotoninergiques qui persistent. Avec ce faible taux de 5-HT centrale, les souris *Pet1*^{−/−} sont viables et fertiles.

Le facteur de transcription *Lmx1b* est situé en amont de *Pet1* dans la cascade des facteurs nécessaires à la mise en place du phénotype sérotoninergique dans les neurones. Son invalidation conditionnelle, spécifiquement dans les neurones sérotoninergiques, abolit totalement la synthèse de sérotonine dans le SNC chez les souris mutées. Les souris *Lmx1b*^{−/−} sont néanmoins viables et fertiles (Zhao *et coll.*, 2006). Bien que les animaux *Lmx1b*^{−/−} et *Pet1*^{−/−}, avec des degrés divers d'atteinte du système sérotoninergique central soient viables, ils présentent d'importants désordres fonctionnels. Ainsi, les souris *Pet1*^{−/−} sont de façon générale plus agressives que les souris contrôles dans le test d'intrusion, et plus anxieuses dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Hendricks *et coll.*, 2003). Les tests de locomotion n'ont pas révélé de différence fonctionnelle chez les souris *Lmx1b*^{−/−}, en

comparaison des animaux sauvages (Zhao *et coll.*, 2006). Dans la mesure où la mise en place du système sérotoninergique a été perturbée très tôt au cours du développement embryonnaire dans ces deux lignées de souris génétiquement modifiées, l'absence de graves anomalies anatomiques et fonctionnelles peut être due, par exemple, à la plasticité du système nerveux central qui développe des mécanismes de compensation. Une seconde explication serait que ces animaux ont reçu une quantité de sérotonine maternelle suffisante pendant les premiers jours du développement embryonnaire.

La création et l'utilisation de mutations conditionnelles grâce au système Cre/Lox, ou encore le développement de stratégies telles que l'ARN interférence (ARNi) permettront d'inhiber la synthèse de 5-HT dans des circuits nerveux déjà établis. Ces systèmes permettront de générer des mutations chez l'animal adulte, à des temps et au niveau de structures définis. Des différences anatomiques ou des dysfonctionnements plus fins, non compensés par d'autres systèmes, pourront alors éventuellement être mis en évidence.

De tels outils sont en cours de développement au laboratoire.

La 5-HT, une molécule clef de la régulation cardiovasculaire

Dans l'organisme, seulement 5% de la sérotonine sont produits dans le système nerveux central. A la périphérie, 90% sont produits par les cellules entérochromaffines (exprimant le gène *Tph1*) et 5% par les neurones myentériques (exprimant le gène *Tph2*). Les souris *Tph1^{-/-}*, avec une synthèse de sérotonine abolie uniquement à la périphérie, développent une cardiopathie progressive, qui entraîne une insuffisance cardiaque létale chez certains animaux.

Nous avons réalisé une caractérisation approfondie du phénotype cardiaque des souris *Tph1^{-/-}*, à la fois au niveau anatomique et au niveau fonctionnel. Pour cela, nous avons conduit des recherches sur l'activité électrique ainsi que sur la réponse mécanique du muscle cardiaque. Nous avons corrélé ces données fonctionnelles aux caractéristiques anatomiques du cœur des souris *Tph1^{-/-}*. Il apparaît très clairement que les souris *Tph1^{-/-}*:

1. présentent une cardiomyopathie dilatée, dont la cinétique de progression dépend du fond génétique et du génotype de leur mère.
2. présentent une altération de la commande électrique cardiaque, ainsi qu'une réponse mécanique du myocarde très altérée.
3. ne possèdent aucune réserve contractile puisqu'elles meurent d'un arrêt cardiaque lorsque la pompe cardiaque est sollicitée par voie pharmacologique.
4. présentent une modification de l'expression d'au moins deux composants du système sérotoninergique au niveau des cardiomycocytes: le récepteur 5-HT_{2B} et le transporteur de la sérotonine SERT.

Les informations complémentaires, obtenues par l'enregistrement de l'activité électrique du cœur par électrocardiographie et de sa réponse contractile par cathéterisation de conductance montrent que la sérotonine circulante régule à la fois la fréquence et la contractilité cardiaque.

I. La sérotonine régule la fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque (FC) est dictée par les cellules « pacemaker » du nœud sinoatrial et est modifiée par les influx nerveux des systèmes sympathique et parasympathique. L'intervalle de temps entre deux battements cardiaques consécutifs est légèrement irrégulier, reflétant l'oscillation rythmique des composants qui régulent la FC: c'est la variabilité du rythme cardiaque ou HRV (*Heart Rate Variability*) (Figure 65). Tous les individus sont soumis à des rythmes biologiques intrinsèques, spécifiques à chaque espèce, qui dépendent de la durée de vie de l'espèce, de son mode de vie, de la taille des individus, etc. L'oscillateur biologique de chaque espèce est donc dépendant de l'âge, de la saison, du moment de la journée, et va dicter les périodes de reproduction, les fréquences respiratoire et cardiaque, etc. La HRV est quantifiable par la mesure de l'intervalle RR (*R-wave to R-wave*), qui représente la durée entre deux battements consécutifs (exprimé en ms).

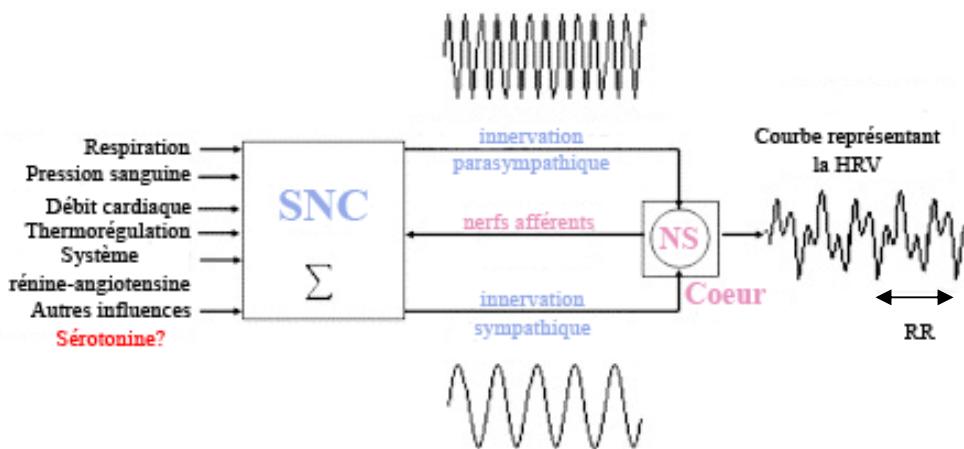


Figure 65: Modèle simplifié de la formation de la variabilité du rythme cardiaque et schéma du contrôle cardiovasculaire (d'après von Borell *et coll.*, 2007).
SNC: système nerveux central; NS: nœud sinoatrial.

Les animaux *Tph1* mutés, qu'ils soient issus de mères *Tph1^{-/-}* ou *Tph1^{+/-}*, présentent une diminution significative de la fréquence cardiaque par rapport aux animaux contrôles. Cette diminution de la FC résulte d'un allongement de la moyenne des intervalles RR. De plus, les modifications de la HRV indiquent que le rythme cardiaque des animaux mutés *Tph1^{-/-}* est non seulement diminué mais qu'il est également plus variable, comparativement à celui des animaux contrôles.

Quels pourraient être les mécanismes de régulation de la fréquence cardiaque par la sérotonine circulante ?

1.1. Modification du potentiel d'action cardiaque ?

L'allongement de l'intervalle RR entre deux battements cardiaques chez les souris *Tph1*^{-/-} pourrait résulter de défauts directement au niveau des cellules « pacemaker » qui contrôlent l'activité cardiaque. La région du nœud sinoatrial chez les mammifères contient un nombre important de récepteurs β_1 et β_2 adrénnergiques, et de récepteurs muscariniques de type M₂ (GRRC, 2002). Ces récepteurs permettent la modulation du rythme cardiaque par le système nerveux autonome. Une stimulation des récepteurs β -adrénnergiques engendre une augmentation du rythme des cellules sinusales, tandis que l'activation des récepteurs M₂ le diminue.

L'invalidation du gène *Tph1*, et donc le faible niveau de sérotonine circulante qui en résulte, pourrait modifier l'expression ou le couplage de ces récepteurs, diminuant ainsi la fréquence cardiaque. Cette possibilité s'avère assez peu probable puisque le niveau des catécholamines dans le plasma sanguin des souris *Tph1*^{-/-} n'est pas modifié en comparaison des animaux contrôles (Tableau 5, page 86). De plus, les études de liaison des récepteurs β -adrénnergiques, effectuées sur les ventricules et donc en dehors de la zone sinoatriale, n'ont pas révélé de modifications du niveau d'expression (Bmax) ou de l'affinité (Km) des récepteurs β_1 et β_2 adrénnergiques dans le cœur des animaux mutés, en comparaison des animaux contrôles (Tableau 4, page 85). Une modification du couplage de ces récepteurs n'est cependant pas à exclure, comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre.

1.2. Modification du tonus sympathique / parasympathique ?

L'allongement de l'intervalle RR entre deux battements cardiaques et l'augmentation de la HRV chez les animaux *Tph1*^{-/-} pourraient être dus à une modification de l'activité sérotoninergique centrale chez ces animaux.

Nous avons montré dans la première partie des résultats, une diminution de la quantité de sérotonine centrale chez les animaux *Tph1*^(+/-) (Figure 33, page 16). Walther et coll. ont fait les mêmes observations sur la lignée de souris *Tph1*^{-/-} qu'ils ont générée, comme en témoigne cette image (Figure 66), présentée sur le site internet de leur laboratoire (<http://www.molgen.mpg.de>).

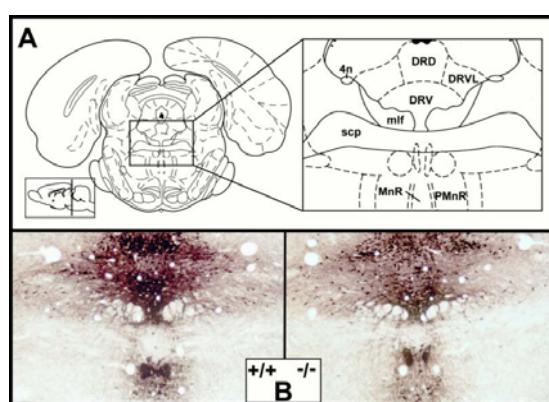


Figure 66: Immunohistochimie TPH2 dans le raphé dorsal des souris *Tph1*^{-/-} (d'après Diego J. Walther, résultats non publiés, <http://www.molgen.mpg.de>).

L'ensemble de ces données est en faveur d'une modification de l'activité sérotoninergique centrale chez les souris *Tph1*^{-/-}. Mais ces résultats sont à reconsidérer à la lumière de nos travaux sur la sérotonine maternelle, et sur l'effet du fond génétique des animaux. En effet, les souris contrôles que nous avons utilisées comme référence pour la détermination du taux de 5-HT dans le SNC étaient générées par croisements entre des souris *Tph1*^{+/+} de fond génétique mixte C57BL/6-129SvJ. Les souris utilisées par Walther et coll. sont également, d'après les informations données dans leurs publications, générées par croisements entre souris *Tph1*^{+/+} de fond génétique mixte C57BL/6-129SvJ.

Les concentrations variables de sérotonine plasmatique chez les souris *Tph1*^{-/-}(+/-) et *Tph1*^{-/-}(-/-), ajoutées aux différences dues au fond génétique pourraient être à l'origine des variabilités dans le taux de 5-HT mesuré dans le SNC. Il apparaît désormais primordial de réaliser de nouveaux dosages sur les souris *Tph1*^{-/-}(+/-) et *Tph1*^{-/-}(-/-) des deux fonds génétiques purs, en comparaison de souris *Tph1*^{+/+} provenant du commerce.

La diminution du niveau de sérotonine dans les noyaux du raphé dorsal des souris *Tph1*^{-/-}, si elle est avérée, pourrait être la conséquence d'une modification de leur rythme circadien. En effet, la synthèse de sérotonine est abolie dans la glande pinéale de ces animaux, ce qui entraîne l'absence de synthèse de mélatonine, molécule clef de la régulation des rythmes circadiens. Malek et coll. ont montré que les quantités de transcrits *Tph2* dans les noyaux du raphé, et de la protéine correspondante, sont variables au cours du nycthémère (Malek *et coll.*, 2005; Malek *et coll.*, 2004).

Si l'expression de la TPH2 est diminuée dans le noyau du raphé dorsal des souris *Tph1*^{-/-}, elle peut l'être également dans les noyaux du raphé les plus caudaux qui innervent la moelle épinière. La modification du tonus sympathique/parasympathique observée chez les souris *Tph1*^{-/-} pourrait résulter de la diminution de l'influx nerveux des efférences sympathiques et parasympathiques de la moelle vers le cœur.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la connaissance du rôle de la sérotonine centrale dans la régulation du tonus sympathique/parasympathique reste partielle. En absence de lignée de souris dont le gène *Tph2* est invalidé, l'analyse du phénotype cardiaque des souris *Lmx1b*^{-/-} ou *Pet1*^{-/-}, dépourvues en sérotonine dans le SNC, permettrait de montrer le rôle de la sérotonine centrale dans la régulation du système nerveux autonome. Ces résultats pourront être affinés par l'invalidation ciblée des transcrits *Tph2* dans les noyaux du raphé de souris sauvages. L'injection stéréotaxique d'ARN interférants actuellement développés au laboratoire permettra de discriminer et d'étudier le rôle des

noyaux sérotoninergiques centraux impliqués dans la régulation du système nerveux autonome.

Enfin, des recherches plus approfondies de l'activité du SNA dans les groupes de souris *Tph1^{-/-}* qui présenteraient des taux variables de sérotonine dans le SNC permettraient, quant à elles, de mettre en évidence des mécanismes plus fins de la régulation du tonus sympathique/parasympathique par le taux de sérotonine centrale. Dans ce but, des expériences de cathéterisation de conductance seront réalisées sur des souris *Tph1^{-/-}(+/-)* et *Tph1^{-/-}(-/-)* générées sur les deux fonds génétiques purs C57BL/6 et 129SvJ, après section du nerf vague ou en utilisant des combinaisons de molécules antagonistes des récepteurs β -adrénergiques (« β -bloquants »).

II. La sérotonine régule la contractilité cardiaque

Les variations de la FC correspondent à la réponse de l'organisme à une perturbation de l'équilibre homéostatique ou aux oscillations cycliques des paramètres cardiovasculaires, qui dépendent, comme nous venons de le voir, du rythme circadien, des saisons, de l'âge, etc. La variabilité du rythme cardiaque est, en conséquence, essentielle à l'adaptation et à la survie de l'organisme aux changements environnementaux permanents.

Cette variabilité est plus élevée chez les souris *Tph1^{-/-}*. Elle ne représente pourtant pas un avantage en terme d'adaptation à un changement brutal de l'équilibre homéostatique de l'organisme, puisque l'augmentation de l'activité cardiaque imposée par l'injection de dobutamine aux animaux *Tph1^{-/-}* entraîne leur mort dans les quelques minutes qui suivent l'injection de la drogue. Cette observation met en évidence l'absence totale de réserve contractile chez les souris *Tph1^{-/-}*.

Ce phénotype est singulier à plusieurs égards:

1. La dobutamine, analogue synthétique des catécholamines, est un agent pharmacologique principalement inotrope et chronotrope positif, par la stimulation préférentielle des récepteurs β_1 -adrénergiques cardiaques. L'administration de dobutamine aux souris *Tph1^{-/-}* produit, au départ, l'effet attendu puisque nous observons une augmentation de la fréquence et de la contractilité cardiaque dans les quelques secondes qui suivent le début de l'injection. Par contre, les souris *Tph1^{-/-}* sont incapables de maintenir

une activité cardiaque soutenue puisqu'elles meurent quelques minutes après le début de l'administration de dobutamine.

Ces résultats sont inattendus dans la mesure où les souris dépourvues de récepteurs β -adrénergiques cardiaques (souris β -AR $^{-/-}$) ne présentent pas un phénotype aussi marqué que les animaux $Tph1^{-/-}$ en réponse à l'administration d'un agoniste adrénnergique. Les souris β_1 -AR $^{-/-}$ qui survivent à l'âge adulte ont une fréquence cardiaque et une pression artérielle moyenne normales en conditions basales. Leur réponse cardiaque à un exercice, simulé par voie pharmacologique grâce à l'administration d'isoprotérenol, un agoniste non sélectif des récepteurs β adrénnergiques, est totalement abrogée (Rohrer *et coll.*, 1996). Les animaux β_2 -AR $^{-/-}$, quant à eux, ne présentent pas de phénotype fonctionnel important en réponse à un exercice (Chruscinski *et coll.*, 1999). Les auteurs montrent que leur fréquence cardiaque en réponse à l'administration d'isoprotérenol n'est pas modifiée en comparaison avec les animaux contrôles.

L'ensemble de ces données est en accord avec le fait que nous n'avons pas détecté de modifications, ni dans le nombre ou l'affinité des récepteurs β_1/β_2 -adrénnergiques cardiaques ni dans les taux circulants de catécholamines, et renforcent l'hypothèse selon laquelle les récepteurs $\beta 1$ - et $\beta 2$ -adrénnergiques ne sont pas impliqués dans le phénotype cardiaque des souris $Tph1^{-/-}$.

2. Le faible niveau de sérotonine circulante entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs de type 2B dans les cardiomycocytes ventriculaires des souris $Tph1^{-/-}$. Compte tenu de l'importance de la signalisation intracellulaire de ce récepteur à la fois pour la différenciation et la prolifération des cardiomycocytes pendant le développement embryonnaire (Nebigil *et coll.*, 2000), et pour la fonction cardiaque normale chez l'animal adulte (Nebigil *et coll.*, 2001b), sa surexpression dans le cœur des souris $Tph1^{-/-}$ n'est pas surprenante. Cette observation est cohérente avec la pharmacologie de ce récepteur. En effet, le taux de 5-HT plasmatique mesuré chez les souris $Tph1^{-/-}(+/-)$ (6.2nM) et $Tph1^{-/-}(-/-)$ (3.1nM) est théoriquement insuffisant pour activer la signalisation dépendante du récepteur 5-HT_{2B}, contrairement à celui mesurée dans le plasma des animaux contrôles (15nM). La surexpression du récepteur 5-HT_{2B} serait donc déterminante pour assurer une signalisation sérotoninergique suffisante pour la fonction cardiaque chez les souris $Tph1$ mutées.

Dans la mesure où le récepteur 5-HT_{2B} est surexprimé dans le cœur des animaux $Tph1^{-/-}$, leur phénotype cardiaque serait à rapprocher de celui des souris transgéniques qui surexpriment le récepteur 5-HT_{2B} spécifiquement dans le cœur (souris 5-HT_{2B} TG). Les souris 5-HT_{2B} TG, à l'inverse des souris 5-HT_{2B} $^{-/-}$ et $Tph1^{-/-}$, présentent une cardiomyopathie hypertrophique, accompagnée d'une prolifération anormale des mitochondries et d'une

activité enzymatique accrue de certaines enzymes mitochondrielles (Nebigil *et coll.*, 2003). Le niveau de surexpression du récepteur dans les deux modèles animaux étant du même ordre de grandeur, le phénotype cardiaque singulier des souris *Tph1*^{-/-} n'est vraisemblablement pas causé par la seule modification de la signalisation dépendante du récepteur 5-HT_{2B}.

3. Le phénotype mis en évidence lors de l'administration de dobutamine aux animaux *Tph1*^{-/-}(+/-) pourrait être la conséquence d'une défaillance énergétique, d'autant plus que nous venons de voir que la surexpression du récepteur 5-HT_{2B} dans le myocarde entraîne des modifications de l'activité de certaines enzymes mitochondrielles. A notre connaissance, aucun modèle animal de cardiopathie provoquée par l'invalidation de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ne présente cette réponse à l'administration de dobutamine.

Comment expliquer alors la réponse si particulière du cœur des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) à l'administration de dobutamine ? Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

II.1. Une implication des récepteurs β_3 ou α_1 adrénnergiques cardiaques ?

Dans notre étude du système adrénnergique cardiaque des souris *Tph1*^{-/-}, nous avons considéré uniquement les récepteurs de type β_1 et β_2 . Ces deux sous-types de β -AR ne sont pas les seuls récepteurs adrénnergiques exprimés dans le cœur des mammifères. Un troisième type de récepteur β -adrénnergique, le récepteur β_3 , est exprimé au niveau cardiaque. Dans le myocarde ventriculaire, sa stimulation active une protéine G_{i/o}, puis une NO synthase de type endothérial dont l'activation est responsable d'une augmentation de la production de GMPc. Le GMPc inhibe l'entrée de calcium dans la cellule par les canaux calciques de type L, ce qui conduit à une diminution de la contractilité du cœur. L'expression du récepteur β_3 adrénnergique est très faible ou inexistante dans le cœur sain de souris (Tavernier *et coll.*, 2003), contrairement à d'autres mammifères comme l'homme, le cochon ou le chien (pour revue, Rozec et Gauthier, 2006). Une néo-expression ou une surexpression de ce récepteur pourrait intervenir dans le cœur défaillant des souris *Tph1*^{-/-}, comme cela a été montré chez l'homme (Moniotte *et coll.*, 2001) ou chez le chien (Morimoto *et coll.*, 2004).

Les récepteurs adrénnergiques cardiaques comprennent également les récepteurs de type α . Le récepteur α_1 est couplé à une protéine G_{q/11} qui stimule la phospholipase C,

conduisant à la formation d'IP₃ (phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate) et de DAG (diacylglycérol). L'IP₃ se lie à son récepteur au niveau du réticulum sarcoplasmique, ce qui provoque un changement de conformation de ce dernier et induit la sortie du calcium hors du réticulum. Ces effets conduisent à une augmentation de la force contractile (effet inotrope positif). De plus, la stimulation α_1 -adrénergique augmente la sensibilisation des myofilaments au calcium, l'flux calcique trans-sarcolemmal, et induit une alcalinisation cellulaire via l'activation de l'échangeur Na⁺/H⁺, ainsi qu'une phosphorylation des chaînes légères de la myosine par des kinases spécifiques (Rho kinases, protéine kinase C). Une modification de l'expression, ou plus vraisemblablement, du couplage de ce récepteur dans le cœur des souris *Tph1*^{-/-} pourrait être à l'origine de la diminution de la contractilité observée en conditions basales et après perfusion de dobutamine.

II.2. Un « cross-talk » entre les voies de signalisation sérotoninergique et adrénnergique cardiaques ?

Comme la plupart des récepteurs sérotoninergiques, les récepteurs adrénnergiques sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Nous montrons que l'expression des récepteurs β adrénnergiques reste inchangée dans le ventricule des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) en comparaison des animaux contrôles, tandis que l'expression du récepteur 5-HT_{2B} est significativement augmentée dans le cœur de ces animaux. L'expression des protéines de la voie de signalisation du récepteur 5-HT_{2B} est probablement augmentée également.

Dans la mesure où certaines protéines sont communes aux deux voies de signalisation sérotoninergiques et adrénnergiques, la modification de leur expression peut entraîner des modifications de signalisation intracellulaire sans que l'expression du récepteur lui-même ne soit modifiée. L'analyse de l'expression de certaines de ces protéines, comme la phospholipase C ou la protéine kinase C, ou encore le dosage du niveau d'AMPc produit dans le cœur des animaux *Tph1*^{-/-}(+/-) devrait permettre de préciser les mécanismes moléculaires aboutissant à l'insuffisance cardiaque associée au manque de sérotonine circulante.

Dans ce sens, l'administration d'autres molécules agonistes du système adrénnergique comme l'isoprotérenol (agoniste non sélectif des récepteurs β), ou d'agonistes spécifiques des récepteurs α -adrénnergiques, combinée avec des agonistes et antagonistes des récepteurs sérotoninergiques de type 2 permettra d'obtenir une information supplémentaire sur les molécules impliquées dans le développement du phénotype des souris *Tph1*^{-/-}.

Enfin, nous montrons une néoexpression de SERT dans les cardiomyocytes des souris *Tph1*^{-/-}(+/-). Nous n'avons pas mené de recherches sur le rôle que pourrait jouer la

sérotonine à l'intérieur des cardiomyocytes. Nous pouvons néanmoins formuler l'hypothèse d'une implication de la 5-HT dans un mécanisme de sérotonylation des petites protéines G dans les cardiomyocytes, tel que cela a été décrit dans les plaquettes sanguines (Walther *et coll.*, 2003b), ou dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Guilluy *et coll.*, 2006). Nous développerons cette hypothèse dans le chapitre suivant.

III. La 5-HT plasmatique réguleraient la contractilité cardiaque par le mécanisme de sérotonylation des petites protéines G ?

Nos résultats qui montrent que la sérotonine plasmatique régule la contractilité du muscle cardiaque, conjugués à nos données préliminaires qui révèlent le rôle primordial de la sérotonine maternelle dans la formation et/ou la maturation des plaquettes sanguines et des globules rouges, pourraient résulter du même mécanisme d'action de la 5-HT: la sérotonylation des petites protéines G.

III.1. La sérotonylation des petites protéines G dans les cardiomyocytes

Chez l'homme, les mutations connues qui affectent le système cardiovasculaire touchent l'architecture cellulaire cardiaque primaire. Elles affectent les composants du sarcomère contractile cardiaque et le cytosquelette intra et extrasarcomérique, et la cardiomyopathie développée résulte d'une anomalie dans la cascade de signalisation qui dirige la contraction cardiaque (Chen et Chien, 1999; Hoshijima et Chien, 2002). Le phénotype des souris *Tph1*^{-/-} semble *a priori* différent de celui observé chez l'homme ou dans d'autres modèles animaux de dysfonctionnement cardiaque puisque les analyses anatomo-pathologiques ne montrent pas d'anomalies histologiques et cytologiques primaires.

Un mécanisme de remodelage du cytosquelette contractile des cardiomyocytes des souris *Tph1*^{-/-} pourrait cependant être envisagé. Le mécanisme de sérotonylation des petites protéines G, proposé par Walther et coll. et Guilluy et coll. (Guilluy *et coll.*, 2006; Walther *et coll.*, 2003b) conduit à des modifications du cytosquelette. Celui-ci est à l'origine de la dégranulation des granules α plaquettaires et de la fixation covalente des facteurs α -granulaires à la surface des plaquettes ; il est aussi à l'origine de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et vraisemblablement d'une diminution de leur contractilité.

Dans ces deux études, le mécanisme de sérotonylation des petites protéines G fait intervenir le SERT et le récepteur 5-HT_{2A}.

Nous montrons que les cardiomycocytes des souris *Tph1*^{-/-} expriment à la fois les deux récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}, et le SERT. L'expression du SERT dans ces cellules est inattendue dans la mesure où la littérature ne rapporte pas son expression dans les cardiomycocytes adultes. Néanmoins, son expression dans des cultures primaires de cardiomycocytes foetaux de rat à E13 a été montrée (Sari et Zhou, 2003). La sérotonine ajoutée à des doses physiologiques (0.04nM-4μM) dans le milieu de culture exerce alors un effet mitogène sur les cellules cardiaques, musculaires ou non, par l'intermédiaire du SERT. D'autre part, l'expression du récepteur 5-HT_{2B} chez la souris est indispensable au développement cardiaque (Nebigil *et coll.*, 2000), et son pic d'expression dans le cœur se situe pendant le développement embryonnaire, entre E8 et E9 (Loric *et coll.*, 1992).

Le manque de sérotonine circulante au cours du développement embryonnaire, puis au cours de la vie adulte des animaux *Tph1*^{-/-} maintiendrait un phénotype de type foetal dans les cardiomycocytes adultes des souris *Tph1*^{-/-}, c'est-à-dire maintiendrait une expression élevée du SERT et du récepteur 5-HT_{2B}.

Les petites protéines G sont exprimées dans le cœur des mammifères. L'activation de RhoA et Ras dans des cultures primaires de cardiomycocytes néonatals de rat participe à la réponse hypertrophique des cellules suite à l'activation des récepteurs α_1 -AR (Sah *et coll.*, 1996). Dans cette étude, les gènes codant l'ANF (*Atrial Natriuretic Factor*) et les chaînes légères régulatrices de la myosine (MLC-2) constituent les cibles des protéines Rho et Ras. De plus, la surexpression de RhoA dans les cardiomycocytes active la formation et l'organisation des myofibrilles, observées lors de l'hypertrophie des cardiomycocytes (Hoshijima *et coll.*, 1998).

Sur la base de nos observations et des données de la littérature que nous venons d'exposer, nous proposons que la sérotonine plasmatique puisse agir dans les cardiomycocytes des souris *Tph1*^{-/-} selon le mécanisme suivant:

- Au cours du développement embryonnaire normal, les petites protéines RhoA des cardiomycocytes sont activées d'une part par la signalisation intracellulaire dépendante des récepteurs 5-HT_{2B}, couplés aux protéines G_q, et d'autre part par l'entrée de sérotonine dans les cardiomycocytes via le SERT. Les protéines RhoA actives participent alors à la

mise en place et à l'organisation des myofibrilles, ainsi qu'à l'effet mitogène de la sérotonine.

- Dans les cardiomycocytes embryonnaires des souris *Tph1*^{+/−}, l'activation des protéines RhoA par un niveau de sérotonine réduit de moitié fourni par la mère serait suffisante. En revanche, dans les cardiomycocytes embryonnaires des souris *Tph1*^{−/−}, le taux de sérotonine délivré par la mère serait insuffisant pour stimuler correctement les récepteurs 5-HT_{2B} cardiaques, et pour entrer dans la cellule par l'intermédiaire du SERT. L'activation des protéines RhoA serait alors réduite et la formation et l'organisation du cytosquelette cardiaque seraient anormales. Cette hypothèse pourrait être une des causes de la létalité embryonnaire observée uniquement chez les souris *Tph1*^{−/−} qui proviennent de mères *Tph1*^{−/−}.

- Dans les cardiomycocytes adultes des souris *Tph1*^{+/−} et des souris *Tph1*^{−/−} qui survivent, le nombre réduit de protéines RhoA activées par le faible niveau de sérotonine circulante conduirait à une baisse de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine par la kinase dépendante de Rho ROCK. Cela aurait pour conséquence la baisse de la contractilité cardiaque. Dans ce contexte, la surexpression du récepteur 5-HT_{2B}, ainsi que le maintien de l'expression de SERT correspondrait à un mécanisme de compensation de la diminution de la contractilité cardiaque. Le phénotype de type fœtal exprimé par les cardiomycocytes adultes des souris *Tph1*^{−/−} permettrait alors d'activer un plus grand nombre de protéines RhoA.

III.2. La sérotonylation dans les cellules sanguines

Nous avons montré une diminution graduelle du nombre de plaquettes dans le sang des animaux *Tph1*^{+/−} et *Tph1*^{−/−} de fond génétique C57BL/6. L'observation des embryons *Tph1*^{−/−} à E13.5 indiquent que cette diminution serait la conséquence de l'arrêt de la maturation d'une partie des mégacaryocytes, précurseurs directs des plaquettes.

Nous montrons également une anomalie de morphologie des érythroblastes des animaux *Tph1*^{−/−} C57BL/6, qui serait également causée par une réduction de leur maturation. Les érythroblastes des animaux *Tph1*^{−/−} semblent arrêtés à des stades précoces de leur développement, leurs noyaux sont moins denses et leurs cytoplasmes plus basiques. A l'inverse des érythrocytes des embryons *Tph1*^{+/+} (commerce) à E13.5 qui possèdent un noyau excentré dans la cellule, prêt à être expulsé, les noyaux des érythrocytes des embryons *Tph1*^{−/−} au même stade de développement restent au centre de la cellule.

Le processus de formation des plaquettes à partir des extensions cytoplasmiques des mégacaryocytes, appelées pro-plaquettes, ainsi que l'expulsion des noyaux des érythroblastes pour former des réticulocytes, précurseurs des érythrocytes matures, font intervenir d'importants mouvements du cytosquelette (Koury *et coll.*, 1989; Patel *et coll.*, 2005). Dans ces deux types cellulaires, des petites protéines G à activité GTPasique, telles que Rab27 dans les mégacaryocytes (Tiwari *et coll.*, 2003) et Rac dans les érythroblastes (Kalfa *et coll.*, 2006) régulent les mouvements du cytosquelette.

Comme nous venons de le voir, le mécanisme de sérotonylation nécessite la présence du SERT et d'un récepteur sérotoninergique, le récepteur 5-HT_{2A}. Ce mécanisme, initialement mis en évidence dans les plaquettes sanguines (Walther *et coll.*, 2003b), pourrait également exister à un stade plus précoce de la thrombopoïèse puisque nous avons vu dans l'introduction que le SERT et un récepteur de la famille 5-HT₂, probablement 5-HT_{2B}, étaient exprimés dans les mégacaryocytes. Ces deux composants du système sérotoninergiques pourraient alors participer à la formation des plaquettes sanguines à partir des pro-plaquettes, en régulant les mouvements du cytosquelette grâce à la transamidation des petites protéines G par la sérotonine.

A notre connaissance, aucune recherche sur l'expression des composants du système sérotoninergique dans les cellules de la lignée rouge n'a été menée. Si une telle expression était avérée dans les érythroblastes, la sérotonylation des petites protéines G pourrait également participer à la régulation des mouvements du cytosquelette dans ces cellules et ainsi participer au mécanisme d'énucléation des érythroblastes.

En conclusion, la sérotonine circulante initierait, au moins en partie, les mouvements du cytosquelette cruciaux pour la maturation et la fonction de plusieurs types cellulaires, parmi lesquels les plaquettes sanguines, les cellules musculaires lisses vasculaires, et probablement les érythrocytes. De tels mouvements du cytosquelette, rendus moins efficaces ou inexistantes par le faible taux de 5-HT plasmatique chez les souris *Tph1*^{-/-} adultes ou par le faible taux de sérotonine délivrée par la mère au cours du développement embryonnaire, entraîneraient de profondes modifications de la fonction cardiaque, et des fonctions vitales telles que l'hématopoïèse embryonnaire ou adulte.

L'importance du taux de sérotonine plasmatique

Une fois synthétisée, la sérotonine est déversée dans la circulation sanguine. Elle est immédiatement captée par les plaquettes sanguines et internalisée dans les granules denses de sécrétion, afin de protéger l'organisme de ses effets vaso-actifs excessifs et de sa toxicité connue. En conséquence, le plasma sanguin contient des taux très faibles de 5-HT puisque sa concentration est de l'ordre de quelques nanomoles par litre, tandis que sa concentration plaquettaire est de l'ordre de plusieurs micromoles par litre, chez l'homme comme chez la souris. Les plaquettes sanguines constituent le principal réservoir de sérotonine à la périphérie.

I. La 5-HT plasmatique, une importance sous-évaluée

La sérotonine présente dans le compartiment plasmatique sanguin en faible concentration a été longtemps considérée comme une quantité négligeable. La sensibilité de la technique de dosage à mettre en œuvre pour la doser dans le plasma, et la fragilité des plaquettes sanguines dont la mauvaise manipulation peut causer leur dégranulation massive, ont concouru au peu de recherches effectuées sur son rôle.

Plusieurs arguments sont néanmoins en faveur d'un rôle important du niveau de sérotonine plasmatique dans le développement de certaines pathologies chez l'homme. En 1995, Hervé et coll. ont montré que le défaut du stockage de la 5-HT dans les plaquettes entraînait l'augmentation du taux de sérotonine plasmatique et le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) chez l'homme (Hervé *et coll.*, 1995). La prise pendant plus de trois mois consécutifs de l'anorexigène dextrofenfluramine, molécule qui augmente la libération de sérotonine par les plaquettes et qui bloque sa recapture, augmente l'incidence de l'HTAP (Abenham *et coll.*, 1996). Enfin, pendant la crise d'asthme, une élévation du niveau de sérotonine plasmatique a également été décrite (Lechin *et coll.*, 1996).

L'ensemble de ces données, associé à notre hypothèse sur l'existence d'une corrélation entre le taux de sérotonine circulante des souris *Tph1*^{-/-} et le degré de leur atteinte cardiaque, nous ont amenés à déterminer les taux de sérotonine circulante, non seulement dans le sang total (qui reflète la sérotonine plaquettaire), mais aussi dans le plasma sanguin des souris *Tph1*^{-/-}. Nous avons mis en évidence que la cardiopathie développée par les souris *Tph1*^{-/-} est associée à une diminution du taux de sérotonine plasmatique.

Nos résultats ainsi que les travaux que nous venons de mentionner montrent que la régulation de la concentration de 5-HT plasmatique est cruciale puisque son élévation entraîne le développement de l'HTAP et que sa diminution entraîne le développement d'une cardiopathie chez les souris *Tph1*^{-/-}. Ceci nous amène à nous interroger sur les mécanismes qui interviennent dans la régulation du taux de sérotonine plasmatique, en condition physiologique et chez les souris *Tph1*^{-/-}.

1.1. Quels sont les mécanismes de contrôle du niveau de 5-HT plasmatique ?

Le transporteur de la sérotonine SERT est le régulateur central du taux de sérotonine extracellulaire, dans le SNC comme à la périphérie. Il transporte la sérotonine du compartiment extracellulaire au compartiment intracellulaire de la cellule, en échange d'un efflux de K⁺. A la périphérie, il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, parmi lesquels les plaquettes sanguines, les entérocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires ou encore les cellules endothéliales, dans de nombreux tissus (poumons, intestins, foie...). Une dérégulation de l'activité du SERT dans un des tissus peut rapidement provoquer une modification du taux de sérotonine plasmatique, et modifier en cascade, l'équilibre des autres organes.

Comme nous l'avons mentionné en préambule de ce chapitre, les plaquettes sanguines constituent le réservoir principal de sérotonine à la périphérie. La diminution de la concentration plasmatique de sérotonine chez les souris *Tph1*^{-/-} par rapport aux souris *Tph1*^(+/-) pourraient résulter d'une modification de l'activité du SERT exprimé à la surface des différents types cellulaires que nous venons de citer.

1.1.1. Une modification de l'activité du SERT dans les plaquettes sanguines ?

Nos données révèlent le rôle indispensable de la sérotonine maternelle pour la formation et/ou la maturation normale des plaquettes sanguines. En effet, nous avons montré que le faible de taux de 5-HT fourni par la mère entraîne une diminution du nombre de plaquettes sanguines chez les souris *Tph1^{-/-}* C57BL/6 par rapport aux souris *Tph1^{+/+}*(commerce), et une augmentation chez les animaux *Tph1^{-/-}* 129SvJ par rapport aux souris *Tph1^{+/+}*(commerce).

A la première approche, les travaux réalisés par Walther et coll. sur la lignée de souris *Tph1^{-/-}* qu'ils ont générée (Walther *et coll.*, 2003b) sont contradictoires avec nos données. Ces chercheurs ont montré un nombre normal de plaquettes sanguines dans les souris *Tph1^{-/-}* en comparaison des souris sauvages. L'analyse des plaquettes des animaux mutés n'a pas révélé de défauts dans leur morphologie, ni dans leur capacité de recapture de la sérotonine par le SERT (Walther *et coll.*, 2003b). L'analyse plus précise des résultats qu'ils présentent révèle que le nombre moyen de plaquettes sanguines ne diffère effectivement pas entre les souris *Tph1* mutées et les souris contrôles. Les valeurs sont cependant beaucoup plus dispersées chez les souris mutées ($790\,000 \pm 200\,000/\mu\text{l}$, n=5) par rapport aux souris sauvages ($730\,000 \pm 70\,000/\mu\text{l}$, n=5). Si nous reconsidérons ces résultats à la lumière de nos découvertes sur le rôle de la sérotonine maternelle et sur les différences que nous avons mises en évidence entre les deux fonds génétiques des souris étudiées, il apparaît que les souris *Tph1^{-/-}* et *Tph1^{+/+}* analysées dans l'étude de Walther et coll. sont issus de mères *Tph1* hétérozygotes, et qu'elles sont générées sur le fond génétique mixte C57BL/6-129SvJ. Les données de structure et de fonctions présentées dans l'article de Walther et coll. doivent donc être reconsidérées.

Nous avons recherché les causes de la modification du nombre de plaquettes sanguines dans la lignée de souris *Tph1^{-/-}* générée au laboratoire, dans un premier temps chez les souris de souche C57BL/6. Les expériences préliminaires entreprises en parallèle dans notre laboratoire indiquent que la diminution du nombre de plaquettes sanguines chez les souris *Tph1^{-/-}* est la conséquence d'un arrêt de la maturation des mégacaryocytes. Les plaquettes sanguines dénombrées dans notre étude sont-elles totalement matures ? Leur structure est-elle normale ? Le SERT fonctionne t-il normalement dans celle-ci ?

Ainsi que nous l'avons mentionné dans le chapitre des résultats, l'analyse de la structure et des fonctions de recapture, de stockage, et de libération de la sérotonine par les plaquettes sanguines est en cours de réalisation. Les résultats obtenus nous permettront de déterminer i) le stade de maturation des plaquettes que nous avons dénombrées dans le

sang des souris *Tph1*^{−/−}(−/−) vs. *Tph1*^{+/+}(commerce), ii) de préciser l'activité du SERT dans ces plaquettes et iii) de conclure sur le rôle du SERT dans la régulation de la concentration de sérotonine plasmatique. Enfin, ces résultats préciseront le rôle de la sérotonine maternelle dans la formation et la maturation des mégacaryocytes en plaquettes matures.

L'activité du SERT dans les autres types cellulaires mentionnés précédemment, par exemple les cellules musculaires lisses vasculaires ou les cellules endothéliales, participe également à la régulation du taux de sérotonine plasmatique. L'activité du SERT dans ces cellules est-elle modifiée chez les souris *Tph1*^{−/−}(−/−) par rapport aux souris *Tph1*^{−/−}(+−) ?

1.1.2. Une modification de l'activité du SERT dans les autres types cellulaires ?

Les travaux effectués par Callebert et coll. ont montré, chez la souris en condition d'hypoxie, une régulation de la concentration plasmatique de sérotonine indépendante de l'activité du SERT des plaquettes sanguines (Callebert *et coll.*, 2006). Les auteurs rapportent une corrélation entre le niveau de surexpression du récepteur 5-HT_{2B} dans les poumons et l'élévation du taux de sérotonine plasmatique, élévation augmentée en présence du libérateur de substrat nordexfenfluramine (Callebert *et coll.*, 2006). L'augmentation du taux de sérotonine circulante en condition d'hypoxie est abrogée chez les souris 5-HT_{2B}^{−/−} ou chez les souris +/+ traitées avec l'antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} BW-723C86. Cette étude démontre que le taux de sérotonine plasmatique en condition d'hypoxie est dépendant du récepteur 5-HT_{2B} et du SERT exprimé dans les cellules endothéliales pulmonaires. Les plaquettes, dépourvues de 5-HT_{2B}, n'interviennent pas dans la régulation du taux de 5-HT circulante en condition d'hypoxie. L'hypothèse proposée par les auteurs serait alors une régulation de la phosphorylation du SERT exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires, directement par le récepteur 5-HT_{2B}.

Les travaux de Callebert et coll. que nous venons de mentionner indiquent que la régulation de la concentration plasmatique de sérotonine est, en partie, indépendante des plaquettes sanguines. Une telle régulation est plausible chez les souris *Tph1*^{−/−}.

Nous avons montré une surexpression du récepteur 5-HT_{2B} et du SERT dans les cardiomyocytes des souris *Tph1*^{−/−}(+−). La surexpression du SERT pourrait entraîner une recapture accrue de sérotonine dans les cardiomyocytes et par conséquent, une diminution de la quantité de sérotonine dans le plasma. L'activité du SERT dans les cardiomyocytes des souris *Tph1*^{−/−} pourrait également être modifiée par la surexpression du récepteur 5-HT_{2B}, selon le principe proposé par Callebert et coll. Une augmentation éventuelle de

l'activité du SERT pourrait engendrer une déplétion encore plus importante de la sérotonine plasmatique.

I.1. Conclusion

Nos résultats conjugués à l'ensemble des études auxquelles nous avons fait référence démontrent l'importance de la régulation fine du taux de sérotonine plasmatique, à la fois pour le développement embryonnaire normal, et pour la régulation de la fonction cardiaque chez l'adulte. Ils apportent un éclairage nouveau sur le rôle de la sérotonine circulante, et en particulier plasmatique, longtemps sous-évalué au profit du rôle de la sérotonine présente dans le système nerveux central.

II. Intérêt du dosage de la 5-HT plasmatique en clinique humaine

Aujourd'hui, l'indication médicale du dosage de la sérotonine circulante est le dépistage des tumeurs carcinoïdes, qui synthétisent de grandes quantités de sérotonine. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'intérêt de doser la sérotonine circulante à des fins de dépistages de pathologies développementales telles que l'autisme ou la phénylcétonurie, ou des pathologies de l'adulte, comme l'hypertension artérielle pulmonaire. Les informations obtenues pourraient s'avérer cruciales pour mieux caractériser l'hétérogénéité de ces maladies, comprendre les mécanismes de leur développement et proposer des thérapeutiques plus adaptées.

II.1. Dosage du taux de sérotonine chez la femme enceinte

II.1.1. Sérotonine et autisme

L'autisme est un trouble du développement du système nerveux caractérisé par un déficit des interactions sociales et de la communication, associé à un répertoire de comportements restreints, répétitifs et stéréotypés. Les comportements autistiques apparaissent chez l'enfant avant l'âge de trois ans, et la prévalence est d'1 enfant sur 100, avec une fréquence 4 fois plus importante chez les garçons que chez les filles. Le lien entre l'autisme et la sérotonine fut proposé dans les années 1970, lorsque des niveaux élevés de la concentration de sérotonine dans les plaquettes sanguines ont été mesurés chez des patients

autistes. Depuis, l'hypersérotoninémie périphérique a été détectée dans 25 à 33% des patients autistes (Anderson *et coll.*, 1987; Launay *et coll.*, 1988; Leboyer *et coll.*, 1999), dans plusieurs cohortes de patients d'origine ethnique variée.

Nos travaux sur les souris dont le gène *Tph1* est invalidé, et sur l'analyse du phénotype de leur descendance, nous ont permis de confirmer l'idée précédemment émise par l'équipe de Jean Lauder, du rôle morphogène de la sérotonine au cours du développement embryonnaire. L'étude de ces animaux a également révélé l'importance de la sérotonine située dans le compartiment plasmatique, à la fois pour le développement normal des embryons, et pour la fonction cardiaque normale.

Un faible niveau de sérotonine plasmatique accessible à l'embryon pendant la grossesse pourrait être une des causes des anomalies développementales du SN observées chez les enfants autistes. Dans ce sens, une étude épidémiologique récente a été menée sur 17 mères d'enfants autistes et 8 mères d'enfants non autistes. Les taux plasmatiques de L-tryptophane et de sérotonine ont été déterminés, et confrontés aux mesures réalisées chez les proches parents des familles d'enfants autistes (Connors *et coll.*, 2006). En moyenne, le taux de 5-HT plasmatique est significativement plus faible chez les mères d'enfants autistes ainsi que chez les enfants autistes eux-mêmes, comparativement aux taux mesurés chez les pères et chez les frères et sœurs. Les taux de L-tryptophane mesurés ne sont, quant à eux, jamais modifiés. Cette première étude, bien qu'incluant un nombre insuffisant de patients, confirmerait l'importance du niveau de sérotonine plasmatique pendant la grossesse.

Les études menées jusqu'à présent sur les familles de patients autistes comportent cependant d'importantes limites: le diagnostic de l'autisme est fait dans les trois premières années de vie des enfants atteints. Les familles d'enfants autistes sont donc recrutées après le diagnostic et les dosages de sérotonine sont réalisés sur le sang ou le plasma des mères bien après leur grossesse. Une recherche systématique à grande échelle des taux de 5-HT plasmatiques et plaquettaires des femmes enceintes, associée à une étude épidémiologique *a posteriori* des familles dont un ou plusieurs membres sont autistes permettraient de préciser l'importance de la sérotonine maternelle dans le développement de cette maladie.

II.1.2. Sérotonine et phénylcétonurie

La phénylcétonurie (PCU) est une maladie métabolique et héréditaire, transmise sur le mode autosomique récessif. Il s'agit d'une maladie très fréquente (son incidence est d'environ 1 enfant sur 15 000 dans la population générale française) qui fait l'objet d'un dépistage systématique à la naissance depuis 1978 (pour revue, Ghozlan et Munnich, 2004). Cette affection est due au déficit partiel ou total en phénylalanine hydroxylase (PAH) dans la majorité des cas, enzyme qui comme nous l'avons évoqué dans

l'introduction, transforme la phénylalanine en tyrosine. La PAH utilise le BH₄ comme cofacteur, et 2% des cas de PCU sont dus à une mutation dans le gène responsable de la biosynthèse de BH₄. Ces mutations entraînent une accumulation de phénylalanine dans l'organisme, les concentrations plasmatiques pouvant alors être 20 à 30 fois plus élevées que la normale.

Le tableau clinique des patients non traités souffrant de PCU est très variable. Il inclut un développement psychomoteur retardé, un retard mental, des troubles psychologiques et neurologiques importants. Une diète pauvre en phénylalanine dans les premières années de vie prévient le développement de ces symptômes. Cette diète, très contraignante, est souvent arrêtée progressivement à l'adolescence ou chez les jeunes adultes. Plusieurs études ont montré que les mères atteintes de PCU devaient reprendre la diète pauvre en phénylalanine avant la conception d'un enfant et pendant la grossesse pour assurer le développement normal de l'enfant.

L'accumulation de phénylalanine dans l'organisme des patients souffrant de PCU a des répercussions importantes sur la synthèse de sérotonine. La phénylalanine en excès inhibe la TH et la TPH, ce qui entraîne une diminution de sérotonine dans le sang.

II.1.3. Une prévention des désordres développementaux par l'administration de sérotonine?

Il apparaît donc qu'un taux anormalement élevé ou bas de sérotonine pendant la grossesse pourrait, sinon être la seule cause, du moins participer à l'étiologie de certaines pathologies développementales telles que l'autisme ou la PCU. Des études épidémiologiques à grande échelle permettraient de confirmer ces données et de déterminer les concentrations "critiques" de sérotonine plasmatiques nécessaires au développement embryonnaire normal chez l'homme.

Sur le modèle du traitement proposé aux patients atteints de phénylcétonurie, une médication qui permettrait d'augmenter le taux de sérotonine chez les femmes hyposérotoninémiques pourrait être envisagée. Selon les effets désirés, i.e. centraux ou périphériques, plusieurs traitements peuvent être proposés:

- L'administration de L-tryptophane ne semble pas être indiquée dans la mesure où chez les patients autistes, les concentrations plasmatiques de L-tryptophane ne sont pas modifiées. De plus, une surcharge en tryptophane aboutirait vraisemblablement à l'inhibition de la PAH et de la TH, comme dans les cas d'hyperphénylalaninémie des patients souffrant de PCU.

- L'administration de sérotonine semble séduisante puisqu'elle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique en conditions physiologiques. Elle est cependant

difficilement envisageable dans la mesure où la sérotonine libre est peu stable, toxique, et a des effets cardiovasculaires importants. Il a été montré que la peau de banane contenait environ 100 fois plus de sérotonine (environ 40 μ g/g) que l'hippocampe de rat, par exemple (0.4 μ g/g) (Azmitia, 2007). Un régime intégrant la banane pourrait constituer une alternative simple, physiologique, et peu onéreuse à l'administration de sérotonine.

- Le 5-HTP, précurseur direct de la sérotonine, augmente la concentration cérébrale de sérotonine, puisqu'il traverse la BHE. Il peut être délivré par voie orale sous forme d'un complément alimentaire, et 70% de la dose délivrée est retrouvé dans le sang (Turner *et coll.*, 2006).

II.2. Dosage du taux de sérotonine chez l'adulte pour l'évaluation du risque cardiovasculaire

Nos travaux sur le phénotype cardiaque des souris *Tph1*^{-/-}(+/-) et *Tph1*^{-/-}(-/-) montrent une relation directe entre le taux de sérotonine circulante et les performances contractiles du muscle cardiaque. Malgré le nombre important d'études épidémiologiques menées dans le domaine de la cardiologie, aucune n'a cherché à établir un lien entre le taux de sérotonine et le développement d'une cardiopathie, qu'elle soit de type hypertrophique, dilatée ou restrictive.

Des études rétrospectives pourraient néanmoins être envisagées, puisqu'un prélèvement de sang est toujours pratiqué chez les patients inclus dans les études épidémiologiques ou cliniques en cardiologie. Un simple dosage des taux de sérotonine dans le sang de ces patients, voire dans le plasma sanguin lorsque celui-ci a été isolé et conservé, permettrait de vérifier chez l'homme, la validité des observations que nous avons faites chez la souris.

III. Conclusion

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le traitement des affections neurologiques ou des maladies psychiatriques qui impliquent un dysfonctionnement du système sérotoninergique entraîne souvent des effets secondaires importants. La découverte de deux gènes pour la synthèse de la sérotonine ouvre des perspectives thérapeutiques très importantes, puisqu'il sera désormais envisageable de cibler spécifiquement la TPH2 neuronale dans le système nerveux central, sans affecter le compartiment sérotoninergique périphérique, et inversement.

Conclusion générale

La caractérisation des composants clef de la neurotransmission sérotoninergique centrale et des actions physiologiques de la sérotonine à la périphérie a conduit à l'identification de la tryptophane hydroxylase (TPH), l'enzyme hautement spécifique et limitante de sa synthèse, d'une pluralité de récepteurs spécifiques et d'un transporteur de haute affinité situé dans la membrane plasmique, et dont l'activité influe directement sur la concentration extracellulaire de l'amine, au voisinage immédiat de ses récepteurs.

La régulation de la synthèse de la sérotonine est un des points de contrôle majeurs du maintien de son niveau dans l'organisme. L'invalidation constitutive du gène *Tph1* chez la souris par recombinaison homologue, et l'analyse du phénotype des souris *Tph1^{-/-}* ont révélé l'existence d'un second gène *Tph*, le gène *Tph2*. Nous avons clairement démontré que le gène *Tph1* est le gène non-neuronal. L'enzyme TPH1 permet la synthèse de la sérotonine dans la glande pinéale et dans les cellules entérochromaffines, et pourvoit à la quasi-totalité de la sérotonine présente dans la circulation sanguine. En parallèle, le versant neuronal de la synthèse de sérotonine dans les systèmes nerveux central et périphérique est assuré par l'expression du gène *Tph2*.

Les résultats, présentés dans ce mémoire, obtenus suite à l'invalidation du gène *Tph1* chez la souris, ont permis de mettre en évidence le rôle de la sérotonine circulante et les implications de la sérotonine maternelle dans la fonction cardiaque. Le taux de sérotonine dans la circulation sanguine et plus particulièrement dans le compartiment plasmatique sanguin s'avère déterminant pendant toute la vie des souris *Tph1^{-/-}*, des premiers stades du développement embryonnaire à la vie adulte. L'étude du phénotype cardiaque des différents groupes de souris *Tph1^{-/-}* adultes démontre d'autant plus la nécessité d'un contrôle fin de la concentration en sérotonine plasmatique pour la physiologie cardiaque.

Compte tenu des enjeux et des coûts en santé publique des maladies cardiovasculaires, la nouvelle vision de l'axe sérotonine/cardiovasculaire, proposée dans ce mémoire, présente un intérêt majeur dans ce contexte. Le fait que les souris soient à des stades différents de la maladie ou bien qu'elles développent au cours du temps des pathologies cardiaques, présente l'avantage de pouvoir disposer de modèles d'étude de pathologies humaines qui se développent avec la même variabilité (fonction de l'âge, du stress...). Dans la mesure où le transporteur de la sérotonine SERT et ses nombreux

récepteurs sont exprimés dans tous les organes, l'implication de nos travaux dépasse largement le cadre de la régulation des fonctions cardiaques.

Ainsi, l'étude des pathologies liées à des anomalies du taux de sérotonine, telles que les troubles gastro-intestinaux et les maladies du développement (autisme, phénylcétonurie) est de grande importance. De plus, l'existence de deux gènes *Tph* engage, en particulier, à reconstruire un certain nombre de travaux en génétique psychiatrique, travaux dans lesquels les résultats contradictoires associaient ou non les polymorphismes et mutations du gène *Tph1* aux troubles de la personnalité et du comportement.

Dans le domaine de la pharmacologie, le défi sera de développer de nouvelles molécules qui cibleront spécifiquement l'un ou l'autre des gènes *Tph*. Cette perspective constitue une alternative très prometteuse pour réduire les effets secondaires des molécules qui traversent la barrière hémato-encéphalique, comme par exemple les SSRI ou les anorexigènes.

A terme, la possibilité de classer les perturbations sérotoninergiques selon leur origine de synthèse, *i.e.* neuronale (*Tph2*), périphérique (*Tph1*), maternelle (*Tph1*) ou encore une situation pour laquelle les systèmes agiraient de manière synergique, permettrait d'ouvrir de nouvelles voies pour la mise en place de traitements appropriés.

Matériels & Méthodes

Lorsque j'ai débuté ce projet, le domaine de la cardiologie et des méthodes d'explorations de l'activité cardiaque chez l'animal étaient peu familiers des approches du laboratoire. Dans ce chapitre Matériels et Méthodes, j'ai donc souhaité détailler particulièrement les parties relatives aux expériences d'explorations fonctionnelles cardiaques, en apportant pour chacune d'elles le maximum de détails sur l'intérêt de leur utilisation ainsi que sur leur principe et sur l'analyse des résultats. Les expériences d'histologie et de biologie moléculaire, plus classiques au laboratoire sont, quant à elles, décrites dans les chapitres 'materials and methods' des articles publiés, et ne sont donc pas détaillées ici.

Chez l'homme, l'évaluation de la fonction cardiaque est une étape capitale qui renseigne sur la sévérité et le pronostic des patients, et qui permet de guider le choix thérapeutique et d'apprécier l'impact de nouveaux traitements. Elle repose sur des techniques d'imagerie qui mesurent la taille des cavités, ainsi que l'épaisseur, le déplacement et l'épaississement des parois cardiaques; et sur des techniques de cathéterisation et de doppler qui mesurent les pressions et les vitesses intracardiaques générées par la contraction et le remplissage. Enfin, l'électrocardiographie informe sur la genèse et la propagation de l'activité électrique du cœur, activité largement influencée par le système nerveux autonome. D'autres approches dynamiques permettant une évaluation de la physiologie cardiaque lors d'un effort ou au cours d'un stress pharmacologique sont également très informatives. Enfin, l'utilisation, plus récente, de marqueurs biologiques de la dysfonction cardiaque permet une évaluation simple et sans doute pertinente dans une stratégie de dépistage et de suivi.

I. Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie

I.1. Principe de l'échocardiographie

L'échographie cardiaque est basée sur l'utilisation des ultrasons et sur leurs propriétés physiques. Ainsi, à la frontière entre les différents tissus (interface), les ondes envoyées par la sonde échographique sont réfractées et réfléchies, puis ces réflexions ou échos sont enregistrés. L'acquisition des images en mode TM (*Time Motion*) permet d'obtenir une représentation des déplacements des points situés sur une ligne échographique au cours du temps et de mesurer les dimensions des parois et de la cavité

cardiaque en diastole et en systole. La combinaison de ces données permet d'extraire des paramètres fonctionnels de contraction myocardique.

La validité et la reproductibilité des mesures réalisées par échocardiographie dépend très largement de l'expérimentateur et de la fréquence cardiaque des animaux. Pour contourner ces deux sources de variabilité, les mesures ont toutes été réalisées en collaboration avec le Dr. Philippe Bonnin, à l'hôpital Lariboisière. L'anesthésie gazeuse légère a été privilégiée car elle permet à la fois de manipuler aisément les souris tout en conservant une fréquence cardiaque la plus proche possible de celle d'une souris vigile (entre 450 et 550 battements par minute/bpm).

1.2. Protocole de l'échocardiographie

- Les souris sont anesthésiées avec un mélange gazeux d'isoflurane 0,5-1% dans O₂ puis rasées au niveau du thorax. Un gel améliorant la transmission du signal de la sonde échographique est ensuite appliquée sur le thorax.
- Les mesures sont réalisées à l'aide d'un échographe Vivid 7 (GE Healthcare) et d'une sonde échographique à haute fréquence 15MHz.
- Afin d'augmenter la précision des mesures, trois images sont enregistrées dans le plan petit axe du cœur (Figure 67), et trois autres dans le plan grand axe (Figure 67). Les valeurs des mesures reportées dans le chapitre résultats correspondent à la moyenne des mesures individuelles réalisées sur les 6 images.

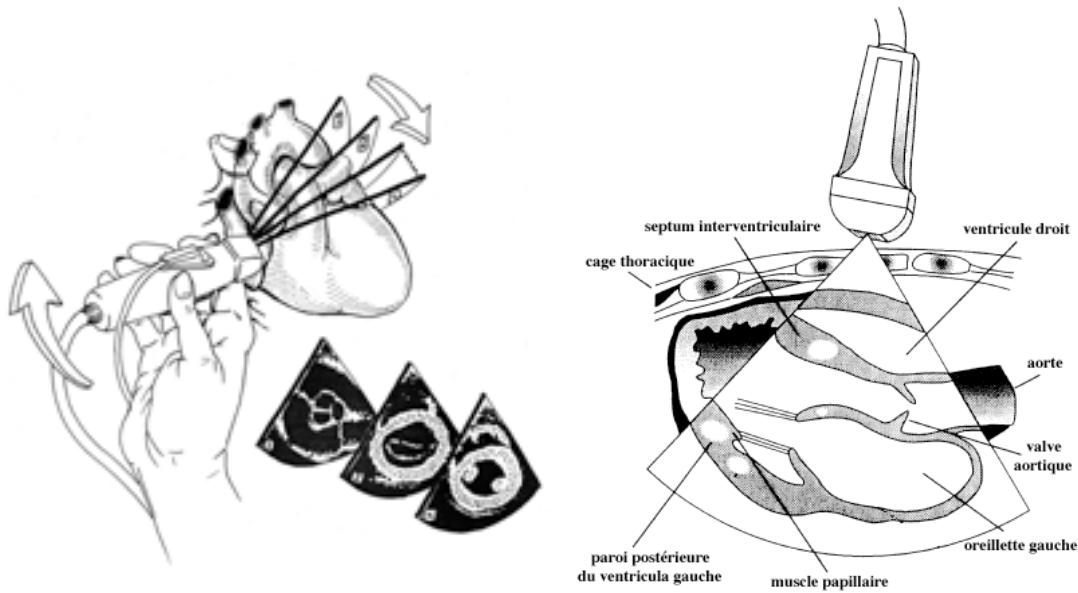


Figure 67: Représentation schématique des vues parasternales du cœur.

Gauche: vue parasternale en petit axe du cœur. Droite: vue parasternale en grand axe du cœur.

- Les images sont enregistrées en mode 2D et TM permettant de déterminer (Figure 68):

Le diamètre télé-systolique (LVESD: *Left Ventricular End Systolic Diameter*)

Le diamètre télé-diastolique (LVEDD: *Left Ventricular End Diastolic Diameter*)

L'épaisseur du septum interventriculaire (ST: *Septum Thickness*)

L'épaisseur de la paroi postérieure (PWT: *Posterior Wall Thickness*)

Le diamètre de l'aorte (AD: *Aortic Diameter*)

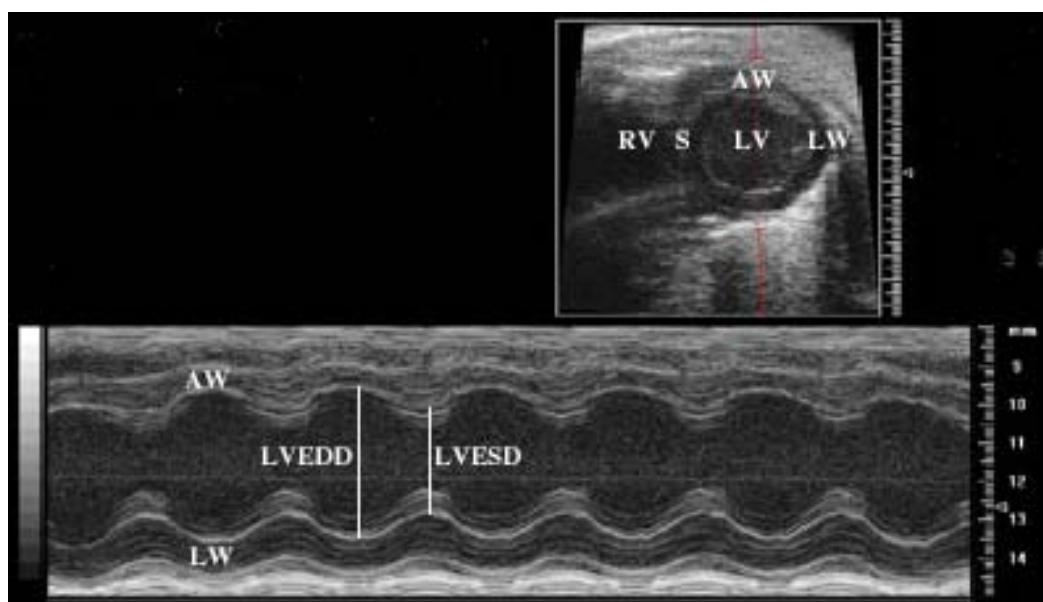


Figure 68: Images échocardiographiques parasternales du cœur de souris selon le petit axe.

Haut: image en mode 2D des ventricules gauche et droit. Bas: image en mode TM du ventricule gauche. RV: right ventricle; LV: left ventricle; AW: anterior wall; LW: lateral wall; S:septum.

On calcule ensuite:

La fraction de raccourcissement FR% (FR=[(LVEDD-LVEDS) / LVEDD]x100)

La fraction d'éjection FE% (FE==[(LVEDD²-LVESD²) / LVEDD²]x100)

- Finalement, l'utilisation du mode doppler, basé sur les fréquences d'ondes sonores, permet de déterminer les flux sanguins, et en particulier le flux aortique.

II. Evaluation de la fonction cardiaque par cathéterisation de conductance

Les techniques invasives d'exploration cardiaques, bien que de moins en moins pratiquées, sont encore considérées comme les méthodes de référence pour l'évaluation de la fonction cardiaque car elles permettent un recueil simultané des pressions intra-cavitaires

et des paramètres de fonction pompe. Leur principale limitation est qu'elles ne peuvent pas être facilement répétées dans le temps.

II.1. Principe de la cathétérisation de conductance

Le cathétérisme droit permet la mesure du débit cardiaque et des pressions pulmonaires. Il est indiqué essentiellement lors d'une suspicion d'hypertension artérielle pulmonaire primitive ou secondaire à une pathologie pulmonaire ou cardiaque. Le cathétérisme gauche, quant à lui, permet le recueil des pressions ventriculaires gauches et permet d'obtenir les courbes pression-volume qui traduisent la relation entre la pression et le volume ventriculaire tout au long du cycle cardiaque. Les observations macroscopiques du cœur des souris *Tph1^{-/-}* suggéraient des anomalies de taille et/ou de fonction du ventricule gauche. Pour l'étude de ces souris, le cathétérisme gauche a été réalisé, en collaboration avec le Dr. Yves Fromes.

La détermination de la courbe pression-volume utilise la propriété suivante: le volume d'un conducteur électrique uniforme (ici, le sang) est directement proportionnel à sa conductance électrique, ou inversement proportionnel à sa résistance. Le cathéter utilisé comporte 4 électrodes et un capteur de pression (Figure 69). Le cathéter est inséré dans le ventricule gauche de la souris puis un courant constant est envoyé par les 4 électrodes à travers le ventricule gauche. Le courant crée un champ électrique dans le ventricule. La résistance du sang contenu dans le ventricule varie durant le cycle cardiaque, en fonction de son volume. Les potentiels électriques résultant sont mesurés par les électrodes et sont inversement proportionnels aux volumes internes du ventricule.



Figure 69: Capteur de pression-volume utilisé lors des expériences.

Le capteur de pression-volume (Millar, modèle SPR-839) est, par son diamètre, spécialement adapté à l'étude des souris.

Les courbes pression-volume traduisent la relation entre la pression et le volume tout au long du cycle cardiaque, et forment une boucle dont la hauteur et la largeur sont déterminés respectivement par la pression systolique et le volume d'éjection systolique. La

boucle pression-volume se lit dans le sens antihoraire et comporte quatre phases successives (Figure 70):

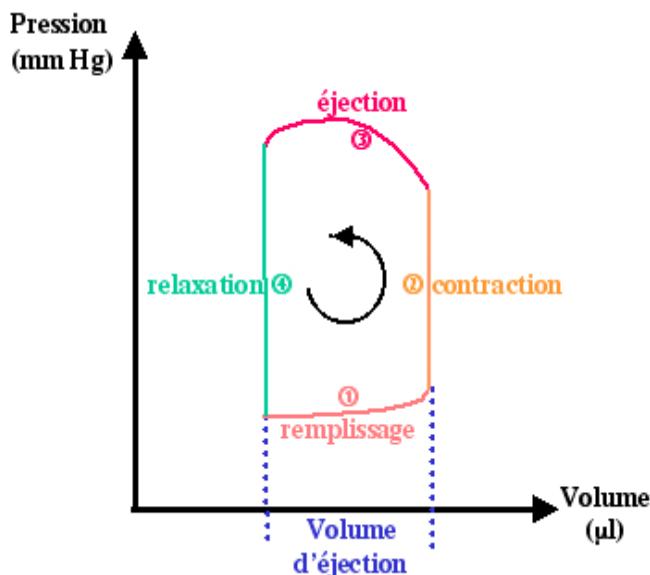


Figure 70: Représentation de la boucle pression-volume du ventricule gauche.

Les "4 temps" du cycle cardiaque sont représentés par les numéros. Les angles correspondent aux changements de configuration des valves cardiaques. Les segments verticaux (② et ④) correspondent aux phases isovolumétriques (où le volume ne change pas car les valves sont fermées). Les segments horizontaux (① et ③) correspondent aux phases de remplissage et d'éjection ventriculaire.

1. Le premier segment, horizontal, correspond au remplissage ventriculaire, depuis l'ouverture de la valve atrio-ventriculaire (valve mitrale) jusqu'à sa fermeture. Dans un premier temps, la pression diminue (lorsque le volume de la cavité ventriculaire augmente, la paroi revient à sa position de repos, réalisant une "aspiration") puis augmente progressivement lorsque le sang afflue depuis l'atrium.
2. Le second segment, vertical, correspond à la contraction isovolumétrique, jusqu'au moment de l'ouverture de la valve aortique. La pression ventriculaire s'élève rapidement.
3. Le troisième segment, horizontal, correspond à l'éjection ventriculaire. La pression continue à augmenter dans la première partie de cette phase, puis décroît jusqu'à la fermeture de la valve aortique.
4. Le quatrième segment, vertical, correspond à la relaxation isovolumétrique: la pression ventriculaire décroît rapidement, jusqu'à l'ouverture de la valve mitrale.

La courbe de fonction ventriculaire gauche peut être matérialisée par une ligne joignant les différents points télésystoliques des boucles pression-volume obtenues en faisant varier les conditions de charge (Figure 71).

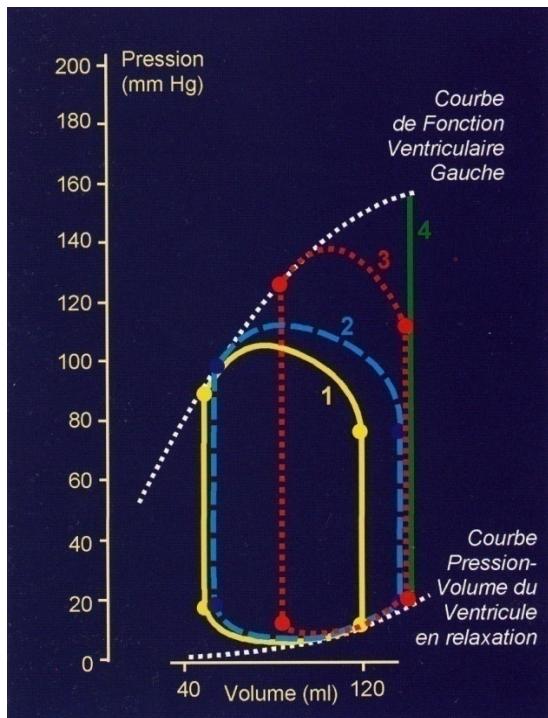


Figure 71: Boucles pression-volume du ventricule gauche

- (1) Dans les conditions de base;
- (2) Lors de l'augmentation du remplissage diastolique ventriculaire: l'augmentation de pression télodiastolique du ventricule entraîne une augmentation de la force d'éjection systolique. La pression artérielle systémique (PAS) étant initialement inchangée, il s'en suit une augmentation du volume d'éjection systolique;
- (3) Celle-ci entraîne rapidement une augmentation de la PAS, donc un accroissement de la post-charge, qui réduit le volume d'éjection systolique;
- (4) Pour référence, le résultat qui serait obtenu en cas de post-charge infinie (clampage total de l'aorte), amenant la pression au niveau de la courbe de fonction ventriculaire.

II.2. Protocole de la cathéterisation de conductance

- Après avoir été pesés, les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (50mg/kg), xylazine (8mg/kg), et midazolam (0,1mg/kg).
- Une cervicotomie verticale est réalisée et la carotide droite des animaux est disséquée.
- Une ligature distale de la carotide est réalisée et le cathéter de conductance (Millar Instruments, Houston, TX, modèle SPR-839) est introduit dans la carotide après hémisection de celle-ci. Il est ensuite inseré jusque dans le ventricule gauche et une ligature proximale de la carotide est réalisée autour du cathéter (Figure 72).
- La veine jugulaire droite est dégagée puis une aiguille permettant l'injection d'une solution saline dans la circulation est fixée.
- Après stabilisation des paramètres cardiaques de l'animal (pressions et volumes intra-ventriculaires stables), les paramètres de pression et de volume sont enregistrés en condition de base pendant 5 minutes.
- L'établissement des courbes pression-volume est réalisé en faisant varier les conditions de charge du ventricule: l'injection de 100µl de solution saline entraîne une augmentation de la volémie, tandis que l'occlusion de la veine cave inférieure mime une diminution de la volémie.

- A la fin de l'expérience, les animaux sont sacrifiés par l'injection d'une dose létale d'anesthésiques. Le cœur de chaque souris est ensuite prélevé, pesé puis fixé dans de la paraformaldéhyde 4% pour les expériences d'histologie.

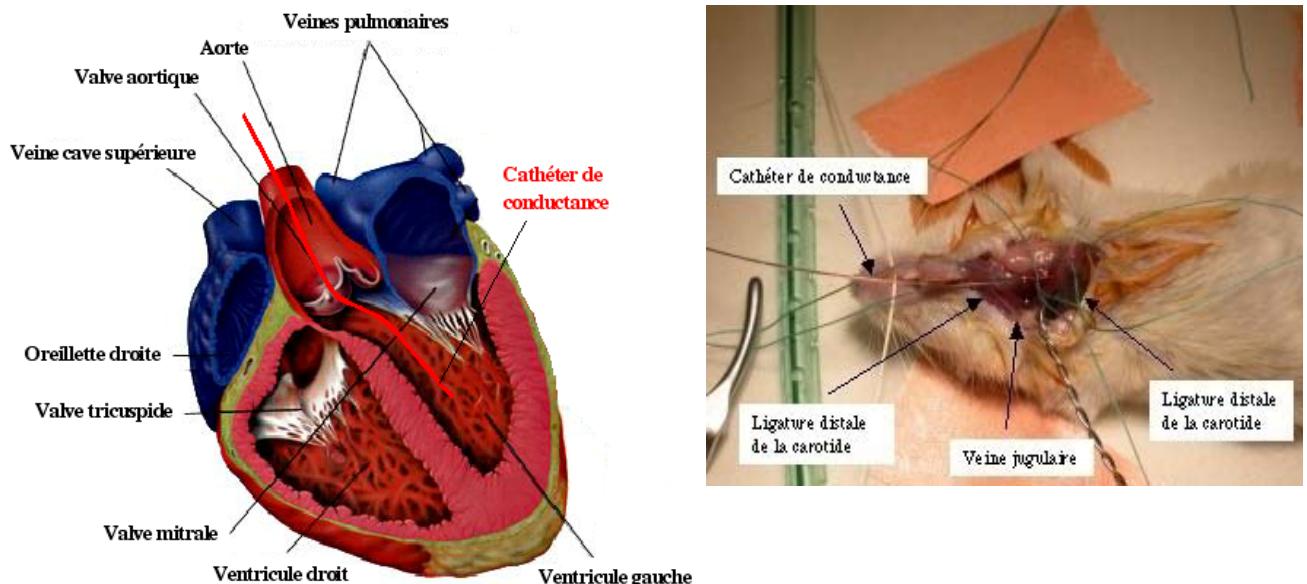


Figure 72: Mise en place du cathéter de conductance dans le ventricule gauche de la souris.

III. Evaluation de l'activité électrique du cœur par électrocardiographie (ECG)

L'activité électrique rythmique du cœur est assurée par des fibres cardiaques qui possèdent des caractéristiques intrinsèques uniques d'auto-excitabilité, c'est-à-dire une capacité de produire spontanément et de façon rythmée des potentiels d'action. Ces fibres autorythmiques ont deux fonctions principales: 1/ servir de stimulateur cardiaque (pacemaker) en établissant le rythme de tout le cœur, et 2/ former le système de conduction des ondes d'excitation dans le muscle cardiaque. Grâce à ce système, les cavités cardiaques se contractent de manière coordonnée, faisant du cœur une pompe efficace.

III.1. Principe de l'électrocardiographie

L'électrocardiographie est la technique de choix pour enregistrer, à la surface de l'organisme, les modifications électriques qui accompagnent chaque révolution cardiaque.

Largement utilisé en clinique humaine, l'électrocardiogramme est enregistré en plaçant des électrodes sur les bras et les jambes (dérivation des membres), ainsi qu'à plusieurs emplacements sur la poitrine. L'électrocardiographe amplifie l'activité électrique du cœur et produit des tracés spécifiques à partir des différentes combinaisons de dérivations des membres et de la poitrine. La comparaison de ces tracés avec des tracés de référence permet de déterminer si la voie de conduction est normale.

L'adaptation de cette technique à l'étude du petit animal a été rendue très difficile par la petite taille des animaux à étudier, ainsi que par la nécessité de leur immobilité, obtenue après sédation. Une des limitations des premiers systèmes d'enregistrement concerne justement ce dernier point, puisqu'il est connu que les anesthésiques utilisés interfèrent avec l'activité électrique du cœur, en particulier en modifiant la fréquence cardiaque. En 2006, l'équipe d'Yves Fromes a été parmi les premières à utiliser un nouveau système d'enregistrement adapté pour le petit animal, qui comprend (Figure 73):

- Une plate-forme d'enregistrement pour chaque patte de l'animal
- Un tunnel permettant de contraindre l'animal vigile à poser chacune de ses pattes sur une plate-forme, sans qu'il soit anesthésié.



Figure 73: Photographie du système d'enregistrement ECG (d'après Mongue-Din *et coll.*, 2007). Le système d'enregistrement utilisé (EasyCG tools system, EMKA technologies) est constitué de 4 capteurs ECG et d'un tunnel permettant de contraindre légèrement l'animal.

III.2. Protocole d'enregistrement des ECG

Comme nous venons de l'expliquer, les animaux sont légèrement contraints à l'intérieur du demi-cylindre qui forme un tunnel, de façon à les obliger à poser leurs pattes sur les plaques d'enregistrement. Afin d'habituer les animaux à cette contrainte, et d'éliminer ainsi d'éventuels artéfacts liés au stress, chaque animal testé a été enregistré au cours de trois séances d'enregistrement indépendantes, réalisées trois jours différents. Le protocole d'enregistrement est décrit précisément dans (Mongue-Din *et coll.*, 2007).

La souris est installée à l'intérieur du tunnel dans un endroit calme, et l'enregistrement est effectué sur une période de 30 minutes.

IV. Evaluation de la fonction cardiaque au cours de l'effort par cathéterisation de conductance

L'évaluation de la fonction cardiaque au cours de l'effort est capitale puisqu'une des premières fonctions du cœur est de pouvoir augmenter son débit au cours de l'effort, afin de répondre à l'augmentation des besoins musculaires. Afin d'évaluer la réserve contractile du cœur des souris *Tph1^{-/-}* ainsi que ses capacités d'adaptation à un surcroît de travail, un test pharmacologique d'effort a été effectué dans une seconde série d'expériences, et les performances cardiaques ont été mesurées par cathéterisation de conductance.

IV.1. Principe de l'épreuve pharmacologique d'effort

L'agent pharmacologique choisi pour cette expérience est la dobutamine. La dobutamine est un analogue de synthèse des catécholamines utilisé dès le début des années 1980 comme test diagnostique en cardiologie nucléaire. C'est un agoniste β -adrénergique (β -AR) ayant aux doses thérapeutiques une affinité plus importante pour les récepteurs β_1 -AR et beaucoup moins prononcée pour les récepteurs α_2 -AR et β_2 -AR. La dobutamine a des effets inotropes positifs prédominants (augmentation de la force de contraction), chronotropes positifs modérés (augmentation de la fréquence cardiaque), bathmotropes (augmentation de l'excitabilité des cellules cardiaques) et dromotropes (augmentation de la vitesse de conduction du potentiel d'action) positifs discrets (Figure 74).

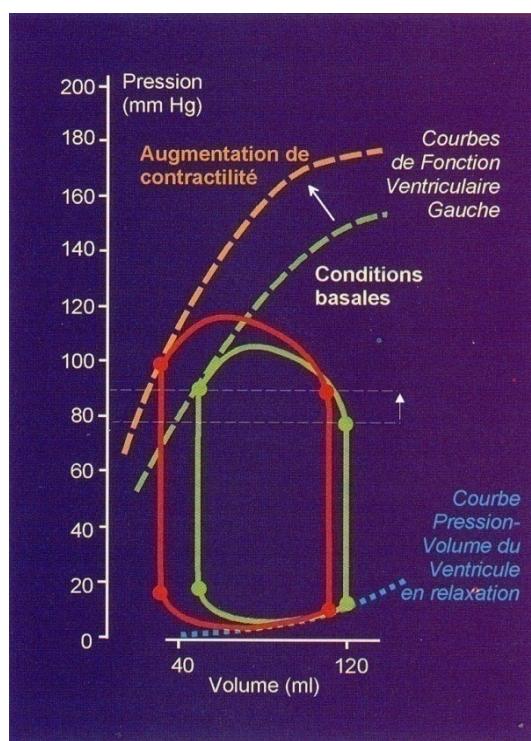


Figure 74: Conséquences de l'augmentation de la contractilité cardiaque sur la boucle pression-volume du ventricule gauche.

L'effet d'un agent inotrope positif comme la dobutamine entraîne un décalage de la courbe ventriculaire gauche, dont la pente augmente.

Chez l'homme, la dobutamine est également utilisée pour une épreuve pharmacologique d'effort, lorsqu'une épreuve d'effort physique est contre-indiquée. Le protocole communément employé aujourd'hui comporte une dose initiale de 10 μ g/kg/min incrémentée de 10 μ g/kg/min toutes les 5 minutes jusqu'au palier de 40 μ g/kg/min. A cette dose maximale, le flux sanguin coronaire est multiplié par 3 environ chez le sujet normal, effet proche de celui obtenu au cours d'un effort physique maximal. La demi-vie plasmatique de la dobutamine est de l'ordre de 2min, permettant de suivre rapidement les effets secondaires de l'administration.

IV.2. Protocole de l'épreuve pharmacologique d'effort

Le protocole de cathéterisation de conductance avec épreuve pharmacologique d'effort est adapté du protocole décrit précédemment.

- Après la mise en place du cathéter de conductance dans le ventricule gauche, puis la pose de l'aiguille dans la veine jugulaire, les paramètres hémodynamiques cardiaques de base sont enregistrés comme précédemment.
- Après une brève période de stabilisation, la dobutamine est administrée par la veine jugulaire, en continu pendant 5min, à la dose de 5 μ g/kg/min (dose adaptée au petit animal). Les modifications des paramètres de pression et de volume sont enregistrées pendant toute la durée de l'infusion de dobutamine.
- La perfusion de dobutamine est ensuite arrêtée et les paramètres hémodynamiques cardiaques sont mesurés pendant 10min supplémentaires, jusqu'à leur retour aux niveaux de base.

Annexes

Article 1

Disruption of the nonneuronal *Tph1* gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function.

Francine Côté, Etienne Thévenot, Cécile Fligny, Yves Fromes, Michèle Darmon, Marie-Anne Ripoche, Elisa Bayard, Naïma Hanoun, Françoise Saurini, Philippe Lechat, Luisa Dandolo, Michel Hamon, Jacques Mallet & Guilan Vodjdani.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003

Article 2

Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function.

Francine Côté, Cécile Fligny, Jacques Mallet & Guilan Vodjdani

Trends in Molecular Medicine, 2004

Article 3

Troubles de la fonction cardiaque chez la souris en l'absence de synthèse périphérique de sérotonine.

Francine Côté, Cécile Fligny, Yves Fromes, Jacques Mallet & Guilan Vodjdani

Journal de la Société Française de Biologie, 2004

Article 4

Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development.

Francine Côté, Cécile Fligny, Elisa Bayard, Jean-Marie Launay, Michael D. Gershon, Jacques Mallet & Guilan Vodjdani

Proceedings of the national Academy of Sciences, 2007

Références bibliographiques

- Abenham L., Moride Y., Brenot F., Rich S., Benichou J., Kurz X., Higenbottam T., Oakley C., Wouters E., Aubier M., Simonneau G., et Begaud B. (1996). Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. The New England journal of medicine 335, 609-616.
- Ahlenius S., Larsson K., et Svensson L. (1980). Further evidence for an inhibitory role of central 5-HT in male rat sexual behavior. Psychopharmacology 68, 217-220.
- Akashi K., Traver D., Miyamoto T., et Weissman I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 404, 193-197.
- Alberio L., Safa O., Clemetson K.J., Esmon C.T., et Dale G.L. (2000). Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. Blood 95, 1694-1702.
- Anderson G.M., Freedman D.X., Cohen D.J., Volkmar F.R., Hoder E.L., McPhedran P., Minderaa R.B., Hansen C.R., et Young J.G. (1987). Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines 28, 885-900.
- Arango V., Huang Y.Y., Underwood M.D., et Mann J.J. (2003). Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. Journal of psychiatric research 37, 375-386.
- Azmitia E.C. (2007). Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. International review of neurobiology 77, 31-56.
- Bach T., Syversveen T., Kvingedal A.M., Krobart K.A., Brattelid T., Kaumann A.J., et 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-Schmiedeberg's archives of pharmacology 363, 146-160.
- Banasr M., Hery M., Printemps R., et 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.
- Behnke O. (1995). Blood platelet heterogeneity: a functional hierarchy in the platelet population. British journal of haematology 91, 991-999.
- Behnke O., et Forer A. (1993). Blood platelet heterogeneity: evidence for two classes of platelets in man and rat. British journal of haematology 84, 686-693.
- Bellipanni G., Rink E., et Bally-Cuif L. (2002). Cloning of two tryptophan hydroxylase genes expressed in the diencephalon of the developing zebrafish brain. Mechanisms of development 119 Suppl 1, S215-220.
- Berman N.E., Puri V., Chandrala S., Puri S., Macgregor R., Liverman C.S., et Klein R.M. (2006). Serotonin in trigeminal ganglia of female rodents: relevance to menstrual migraine. Headache 46, 1230-1245.
- Berthouze M., Ayoub M., Russo O., Rivail L., Sicsic S., Fischmeister R., Berque-Bestel I., Jockers R., et Lezoualc'h F. (2005). Constitutive dimerization of human serotonin 5-HT4 receptors in living cells. FEBS letters 579, 2973-2980.
- Bianchi M., Moser C., Lazzarini C., Vecchiato E., et Crespi F. (2002). Forced swimming test and fluoxetine treatment: in vivo evidence that peripheral 5-HT in rat platelet-rich plasma mirrors cerebral extracellular 5-HT levels, whilst 5-HT in isolated platelets mirrors neuronal 5-HT changes. Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung 143, 191-197.
- Bianchi P., Pimentel D.R., Murphy M.P., Colucci W.S., et Parini A. (2005). A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation. Faseb J 19, 641-643.
- Bockaert J., Claeysen S., Becamel C., Dumuis A., et Marin P. (2006). Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. Cell and tissue research 326, 553-572.
- Boularand S. (1994). Etude du gène de la tryptophane hydroxylase humaine (Université Paris VII).
- Boularand S., Darmon M.C., et Mallet J. (1995a). The human tryptophan hydroxylase gene. An unusual splicing complexity in the 5'-untranslated region. The Journal of biological chemistry 270, 3748-3756.

- Boularand S., Darmon M.C., Ravassard P., et Mallet J. (1995b). Characterization of the human tryptophan hydroxylase gene promoter. Transcriptional regulation by cAMP requires a new motif distinct from the cAMP-responsive element. *The Journal of biological chemistry* 270, 3757-3764.
- Bradley P.B., Engel G., Feniuk W., Fozard J.R., Humphrey P.P., Middlemiss D.N., Mylecharane E.J., Richardson B.P., et Saxena P.R. (1986). Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 25, 563-576.
- Brattelid T., Qvigstad E., Lynham J.A., Molenaar P., Aass H., Geiran O., Skomedal T., Osnes J.B., Levy F.O., et Kaumann A.J. (2004). Functional serotonin 5-HT4 receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT4 mRNA in heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 370, 157-166.
- Bruck K., et Hinckel P. (1980). Thermoregulatory noradrenergic and serotonergic pathways to hypothalamic units. *The Journal of physiology* 304, 193-202.
- Calas A., Alonso G., Arnauld E., et Vincent J.D. (1974). Demonstration of indolaminergic fibres in the media eminence of the duck, rat and monkey. *Nature* 250, 241-243.
- Callebert J., Esteve J.M., Herve P., Peoc'h K., Tournois C., Drouet L., Launay J.M., et Maroteaux L. (2006). Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine(2B) receptors in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317, 724-731.
- Cardiovasculaire) G.G.d.r.s.I.R. (2002). Biologie et Pathologie du Coeur et des Vaisseaux.
- Carrasco J.L., et Sandner C. (2005). Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview. *Int J Clin Pract* 59, 1428-1434.
- Cervo L., Canetta A., Calcagno E., Burbassi S., Sacchetti G., Caccia S., Fracasso C., Albani D., Forloni G., et Invernizzi R.W. (2005). Genotype-dependent activity of tryptophan hydroxylase-2 determines the response to citalopram in a mouse model of depression. *J Neurosci* 25, 8165-8172.
- Chaouloff F. (2000). Serotonin, stress and corticoids. *J Psychopharmacol* 14, 139-151.
- Charney D.S., Goodman W.K., Price L.H., Woods S.W., Rasmussen S.A., et Heninger G.R. (1988). Serotonin function in obsessive-compulsive disorder. A comparison of the effects of tryptophan and m-chlorophenylpiperazine in patients and healthy subjects. *Archives of general psychiatry* 45, 177-185.
- Chen J., et Chien K.R. (1999). Complexity in simplicity: monogenic disorders and complex cardiomyopathies. *The Journal of clinical investigation* 103, 1483-1485.
- Choi D.S., et Maroteaux L. (1996). Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT2B receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS letters* 391, 45-51.
- Choi D.S., Ward S.J., Messadeq N., Launay J.M., et Maroteaux L. (1997). 5-HT2B receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* (Cambridge, England) 124, 1745-1755.
- Chruscinski A.J., Rohrer D.K., Schauble E., Desai K.H., Bernstein D., et Kobilka B.K. (1999). Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 274, 16694-16700.
- Coates M.D., Mahoney C.R., Linden D.R., Sampson J.E., Chen J., Blaszyk H., Crowell M.D., Sharkey K.A., Gershon M.D., Mawe G.M., et Moses P.L. (2004). Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 1657-1664.
- Coleman C.M., et Neckameyer W.S. (2005). Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 59, 12-31.
- Connolly H.M., Crary J.L., McGoan M.D., Hensrud D.D., Edwards B.S., Edwards W.D., et Schaff H.V. (1997). Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *The New England journal of medicine* 337, 581-588.
- Connors S.L., Matteson K.J., Sega G.A., Lozzio C.B., Carroll R.C., et Zimmerman A.W. (2006). Plasma serotonin in autism. *Pediatric neurology* 35, 182-186.

- Costa M., Furness J.B., Cuello A.C., Verhofstad A.A., Steinbusch H.W., et Elde R.P. (1982). Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their visualization and reactions to drug treatment. *Neuroscience* 7, 351-363.
- Cote F., Fligny C., Bayard E., Launay J.M., Gershon M.D., Mallet J., et Vodjdani G. (2007). From the Cover: Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 329-334.
- Cote F., Fligny C., Fromes Y., Mallet J., et Vodjdani G. (2004). Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med* 10, 232-238.
- Cote F., Schussler N., Boularand S., Peirotes A., Thevenot E., Mallet J., et Vodjdani G. (2002). Involvement of NF-Y and Sp1 in basal and cAMP-stimulated transcriptional activation of the tryptophan hydroxylase (TPH) gene in the pineal gland. *Journal of neurochemistry* 81, 673-685.
- Cote F., Thevenot E., Fligny C., Fromes Y., Darmon M., Ripoche M.A., Bayard E., Hanoun N., Saurini F., Lechat P., Dandolo L., Hamon M., Mallet J., et Vodjdani G. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13525-13530.
- Cowen P.J., Anderson I.M., et Gartside S.E. (1990). Endocrinological responses to 5-HT. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600, 250-257; discussion 257-259.
- Cowen P.J., et Wood A.J. (1991). Biological markers of depression. *Psychological medicine* 21, 831-836.
- Craig S.P., Buckle V.J., Lamouroux A., Mallet J., et Craig I. (1986). Localization of the human tyrosine hydroxylase gene to 11p15: gene duplication and evolution of metabolic pathways. *Cytogenet Cell Genet* 42, 29-32.
- Crowell M.D. (2004). Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *British journal of pharmacology* 141, 1285-1293.
- Crowley J.J., Blendy J.A., et Lucki I. (2005). Strain-dependent antidepressant-like effects of citalopram in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology* 183, 257-264.
- Curzon G. (1990). Serotonin and appetite. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600, 521-530; discussion 530-521.
- Dahlstrom A., et Fuxe K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.
- Dale G.L. (2005). Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost* 3, 2185-2192.
- Dale G.L., Friese P., Batar P., Hamilton S.F., Reed G.L., Jackson K.W., Clemetson K.J., et Alberio L. (2002). Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* 415, 175-179.
- Darmon M.C., Grima B., Cash C.D., Maitre M., et Mallet J. (1986). Isolation of a rat pineal gland cDNA clone homologous to tyrosine and phenylalanine hydroxylases. *FEBS letters* 206, 43-46.
- Darmon M.C., Guibert B., Leviel V., Ehret M., Maitre M., et Mallet J. (1988). Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *Journal of neurochemistry* 51, 312-316.
- Daszuta A., et Portalier P. (1985). Distribution and quantification of 5-HT nerve cell bodies in the nucleus raphe dorsalis area of C57BL and BALBc mice. Relationship between anatomy and biochemistry. *Brain research* 360, 58-64.
- Decker M.W., et McGaugh J.L. (1991). The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7, 151-168.
- Deguchi T., Sinha A.K., et Barchas J.D. (1973). Biosynthesis of serotonin in Raphe nuclei of rat brain: effect of p-chlorophenylalanine. *Journal of neurochemistry* 20, 1329-1336.
- Descarries L., Audet M.A., Doucet G., Garcia S., Oleskevich S., Seguela P., Soghomonian J.J., et Watkins K.C. (1990). Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationships. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600, 81-92.

- Descarries L., Watkins K.C., Garcia S., et Beaudet A. (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *The Journal of comparative neurology* 207, 239-254.
- Devereux R.B. (1998). Appetite suppressants and valvular heart disease. *The New England journal of medicine* 339, 765-766.
- Di Lieto A., Leo D., Volpicelli F., di Porzio U., et Colucci-D'Amato L. (2007). FLUOXETINE modifies the expression of serotonergic markers in a differentiation-dependent fashion in the mesencephalic neural cell line A1 mes c-myc. *Brain research*.
- Dixon R.A., Kobilka B.K., Strader D.J., Benovic J.L., Dohlman H.G., Frielle T., Bolanowski M.A., Bennett C.D., Rands E., Diehl R.E., et al. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75-79.
- Dreyfus C.F., et Bornstein M.B. (1977). Synthesis of serotonin by neurons of the myenteric plexus in situ and in organotypic tissue culture. *Brain research* 128, 125-139.
- Dumas S., Darmon M.C., Delort J., et Mallet J. (1989). Differential control of tryptophan hydroxylase expression in raphe and in pineal gland: evidence for a role of translation efficiency. *Journal of neuroscience research* 24, 537-547.
- Eddahibi S., Fabre V., Boni C., Martres M.P., Raffestin B., Hamon M., et Adnot S. (1999). Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circulation research* 84, 329-336.
- Eddahibi S., Guignabert C., Barlier-Mur A.M., Dewachter L., Fadel E., Darteville P., Humbert M., Simonneau G., Hanoun N., Saurini F., Hamon M., et Adnot S. (2006). Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113, 1857-1864.
- Eddahibi S., Hanoun N., Lanfumey L., Lesch K.P., Raffestin B., Hamon M., et Adnot S. (2000). Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *The Journal of clinical investigation* 105, 1555-1562.
- Eglen R.M., Jasper J.R., Chang D.J., et Martin G.R. (1997). The 5-HT7 receptor: orphan found. *Trends in pharmacological sciences* 18, 104-107.
- Erickson J.D., Eiden L.E., et Hoffman B.J. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10993-10997.
- Erspamer V., et Asero B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169, 800-801.
- Erspamer V., et Viali M. (1937). Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll d Soc Med-chir Pavia* 51, 357-363.
- Esteve J.M., Launay J.M., Kellermann O., et Maroteaux L. (2007). Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell biochemistry and biophysics* 47, 33-44.
- Fanburg B.L., et Lee S.L. (1997). A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *The American journal of physiology* 272, L795-806.
- Fargin A., Raymond J.R., Lohse M.J., Kobilka B.K., Caron M.G., et Lefkowitz R.J. (1988). The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT1A receptor. *Nature* 335, 358-360.
- 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., Largent B.L., Hartig P.R., Hollis G.F., Meunier P.C., Robichaud A.J., et Robertson D.W. (2000). Possible role of valvular serotonin 5-HT(2B) receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Molecular pharmacology* 57, 75-81.
- Fitzpatrick P.F. (1999). Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 68, 355-381.
- Fitzpatrick P.F. (2003). Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* 42, 14083-14091.

- Fox D.J., et Khattar R.S. (2004). Carcinoid heart disease: presentation, diagnosis, and management. *Heart* 90, 1224-1228.
- Fu L.W., et Longhurst J.C. (2002a). Activated platelets contribute to stimulation of cardiac afferents during ischaemia in cats: role of 5-HT(3) receptors. *The Journal of physiology* 544, 897-912.
- Fu L.W., et Longhurst J.C. (2002b). Role of activated platelets in excitation of cardiac afferents during myocardial ischemia in cats. *American journal of physiology* 282, H100-109.
- Furness J.B., et 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.
- Gaddum J.H., et Picarelli Z.P. (1957). Two kinds of tryptamine receptor. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 12, 323-328.
- Gaspar P., Cases O., et Maroteaux L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature reviews* 4, 1002-1012.
- Gershon M.D. (1999). The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract (Minneapolis)* 34, 31-32, 35-38, 41-32 passim.
- Gershon M.D., et Altman R.F. (1971). An analysis of the uptake of 5-hydroxytryptamine by the myenteric plexus of the small intestine of the guinea pig. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 179, 29-41.
- Gershon M.D., Drakontides A.B., et Ross L.L. (1965). Serotonin: Synthesis and Release from the Myenteric Plexus of the Mouse Intestine. *Science* 149, 197-199.
- Gershon M.D., et Jonakait G.M. (1979). Uptake and release of 5-hydroxytryptamine by enteric 5-hydroxytryptaminergic neurones: effects of fluoxetine (Lilly 110140) and chlorimipramine. *British journal of pharmacology* 66, 7-9.
- Gershon M.D., Robinson R.G., et Ross L.L. (1976). Serotonin accumulation in the guinea-pig myenteric plexus: ion dependence, structure-activity relationship and the effect of drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 198, 548-561.
- Gershon M.D., et Ross L.L. (1966a). Location of sites of 5-hydroxytryptamine storage and metabolism by radioautography. *The Journal of physiology* 186, 477-492.
- Gershon M.D., et Ross L.L. (1966b). Radioisotopic studies of the binding, exchange, and distribution of 5-hydroxytryptamine synthesized from its radioactive precursor. *The Journal of physiology* 186, 451-476.
- Gershon M.D., et Tack J. (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132, 397-414.
- Ghozlan A., et Munnich A. (2004). [MAOB: a modifier gene in phenylketonuria?]. *Med Sci (Paris)* 20, 929-932.
- Glatt C.E., Carlson E., Taylor T.R., Risch N., Reus V.I., et Schaefer C.A. (2005). Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron* 48, 704-705; author reply 705-706.
- Grenett H.E., Ledley F.D., Reed L.L., et Woo S.L. (1987). Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5530-5534.
- Guilluy C., Rolli-Derkinderen M., Tharaux P.L., Melino G., Pacaud P., et Loirand G. (2006). Transglutaminase-dependent rhoa activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*.
- Gustafsson B.I., Thommesen L., Stunes A.K., Tommeras K., Westbroek I., Waldum H.L., Slordahl K., Tamburstuen M.V., Reseland J.E., et Syversen U. (2006). Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 98, 139-151.
- Gustafsson B.I., Tommeras K., Nordrum I., Loennechen J.P., Brunsvik A., Solligard E., Fosmark R., Bakke I., Syversen U., et Waldum H. (2005). Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation* 111, 1517-1522.

- Halliday G., Ellis J., Heard R., Caine D., et Harper C. (1993). Brainstem serotonergic neurons in chronic alcoholics with and without the memory impairment of Korsakoff's psychosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 52, 567-579.
- Handley S.L. (1995). 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacology & therapeutics* 66, 103-148.
- Harris P., Fritts H.W., Jr., et Cournand A. (1960). Some circulatory effects of 5-hydroxytryptamine in man. *Circulation* 21, 1134-1139.
- Haycock J.W., Kumer S.C., Lewis D.A., Vrana K.E., et Stockmeier C.A. (2002). A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *Journal of neuroscience methods* 114, 205-212.
- Hendricks T.J., Fyodorov D.V., Wegman L.J., Lelutiu N.B., Pehek E.A., Yamamoto B., Silver J., Weeber E.J., Sweatt J.D., et Deneris E.S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* 37, 233-247.
- Herrick-Davis K., Grinde E., Harrigan T.J., et Mazurkiewicz J.E. (2005). Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine2c receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *The Journal of biological chemistry* 280, 40144-40151.
- Herrick-Davis K., Grinde E., et Mazurkiewicz J.E. (2004). Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT2C receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* 43, 13963-13971.
- Herve P., Launay J.M., Scrobohaci M.L., Brenot F., Simonneau G., Petitpretz P., Poubeau P., Cerrina J., Duroux P., et Drouet L. (1995). Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *The American journal of medicine* 99, 249-254.
- Hery F., et Hamon M. (1993). [Neuroleptics and serotonin]. *Encephale* 19, 525-532.
- Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., et Peterson R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 86, 6-19.
- Hollander W., Michelson A.L., et Wilkins R.W. (1957). Serotonin and antiserotonin. I. Their circulatory, respiratory, and renal effects in man. *Circulation* 16, 246-255.
- Holtje M., Winter S., Walther D., Pahner I., Hortnagl H., Ottersen O.P., Bader M., et Ahnert-Hilger G. (2003). The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *The Journal of biological chemistry* 278, 15850-15858.
- Hoshijima M., et Chien K.R. (2002). Mixed signals in heart failure: cancer rules. *The Journal of clinical investigation* 109, 849-855.
- Hoshijima M., Sah V.P., Wang Y., Chien K.R., et Brown J.H. (1998). The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 7725-7730.
- Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., et 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., et Martin G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 71, 533-554.
- Ichiyama A., Hasegawa H., Tohyama C., Dohmoto C., et Kataoka T. (1976). Some properties of bovine pineal tryptophan hydroxylase. *Advances in experimental medicine and biology* 74, 103-117.
- Ishimura K., Takeuchi Y., Fujiwara K., Tominaga M., Yoshioka H., et Sawada T. (1988). Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neuroscience letters* 91, 265-270.
- Jacobs B.L., et Azmitia E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews* 72, 165-229.
- Jacobs B.L., et Fornal C.A. (1999). Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 21, 9S-15S.

- Jaffre F., Callebert J., Sarre A., Etienne N., Nebigil C.G., Launay J.M., Maroteaux L., et Monassier L. (2004). 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* 110, 969-974.
- Jahng J.W., Houpt T.A., Wessel T.C., Chen K., Shih J.C., et Joh T.H. (1997). Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by *in situ* hybridization. *Synapse* 25, 30-36.
- Jick H., Vasilakis C., Weinrauch L.A., Meier C.R., Jick S.S., et Derby L.E. (1998). A population-based study of appetite-suppressant drugs and the risk of cardiac-valve regurgitation. *The New England journal of medicine* 339, 719-724.
- Jones B.J., et Blackburn T.P. (2002). The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 71, 555-568.
- Jouvet M. (1999). Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology* 21, 24S-27S.
- Kalfa T.A., Pushkaran S., Mohandas N., Hartwig J.H., Fowler V.M., Johnson J.F., Joiner C.H., Williams D.A., et Zheng Y. (2006). Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood* 108, 3637-3645.
- Kaumann A.J. (1994). Do human atrial 5-HT4 receptors mediate arrhythmias? *Trends in pharmacological sciences* 15, 451-455.
- Kaumann A.J., et Levy F.O. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & therapeutics* 111, 674-706.
- Kaumann A.J., Lynham J.A., et Brown A.M. (1996). Comparison of the densities of 5-HT4 receptors, beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353, 592-595.
- Kaumann A.J., Sanders L., Brown A.M., Murray K.J., et Brown M.J. (1990). A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *British journal of pharmacology* 100, 879-885.
- Keegan A., Morecroft I., Smillie D., Hicks M.N., et MacLean M.R. (2001). Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Circulation research* 89, 1231-1239.
- Killam A.L., et Cohen M.L. (1991). Characterization of rat platelet serotonin receptors with tryptamine agonists and the antagonists: ketanserin and SCH 23390. *Thrombosis research* 64, 331-340.
- Kim K.S., Wessel T.C., Stone D.M., Carver C.H., Joh T.H., et Park D.H. (1991). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding tryptophan hydroxylase from rat central serotonergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 9, 277-283.
- Koe B.K., et Weissman A. (1966). p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 154, 499-516.
- Koury S.T., Koury M.J., et Bondurant M.C. (1989). Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *The Journal of cell biology* 109, 3005-3013.
- Kulke M.H., et Mayer R.J. (1999). Carcinoid tumors. *The New England journal of medicine* 340, 858-868.
- Lauder J.M., et Krebs H. (1978). Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Developmental neuroscience* 1, 15-30.
- Launay J.M., Ferrari P., Haimart M., Bursztein C., Tabuteau F., Braconnier A., Pasques-Bondoux D., Luong C., et Dreux C. (1988). Serotonin metabolism and other biochemical parameters in infantile autism. A controlled study of 22 autistic children. *Neuropsychobiology* 20, 1-11.
- Launay J.M., Herve P., Peoc'h K., Tournois C., Callebert J., Nebigil C.G., Etienne N., Drouet L., Humbert M., Simonneau G., et Maroteaux L. (2002). Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nature medicine* 8, 1129-1135.
- Leboyer M., Philippe A., Bouvard M., Guilloud-Bataille M., Bondoux D., Tabuteau F., Feingold J., Mouren-Simeoni M.C., et Launay J.M. (1999). Whole blood serotonin and plasma beta-endorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biological psychiatry* 45, 158-163.

- Lechin F., van der Dijs B., Orozco B., Lechin M., et Lechin A.E. (1996). Increased levels of free serotonin in plasma of symptomatic asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 77, 245-253.
- Lemessurier D.H., Schwartz C.J., et Whelan R.F. (1959). Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 14, 246-250.
- Lesch K.P., et Gutknecht L. (2005). Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 1062-1073.
- Lezoualc'h F., Steplewski K., Sartiani L., Mugelli A., Fischmeister R., et Bril A. (2007). Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT(4) receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. *Biochemical and biophysical research communications* 357, 218-224.
- Liu Y., et Fanburg B.L. (2006). Serotonin-induced growth of pulmonary artery smooth muscle requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine protein kinase B/mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal S6 kinase 1. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34, 182-191.
- Liu Y., Peter D., Roghani A., Schuldiner S., Prive G.G., Eisenberg D., Brecha N., et Edwards R.H. (1992). A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70, 539-551.
- Liu Y., Suzuki Y.J., Day R.M., et Fanburg B.L. (2004). Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circulation research* 95, 579-586.
- Loric S., Launay J.M., Colas J.F., et Maroteaux L. (1992). New mouse 5-HT2-like receptor. Expression in brain, heart and intestine. *FEBS letters* 312, 203-207.
- Lowy P.H., Keighley G., et Cohen N.S. (1970). Stimulation by serotonin of erythropoietin-dependent erythropoiesis in mice. *British journal of haematology* 19, 711-718.
- Lucki I., Dalvi A., et Mayorga A.J. (2001). Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology* 155, 315-322.
- Luque J.M., Kwan S.W., Abell C.W., Da Prada M., et Richards J.G. (1995). Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 363, 665-680.
- Malek Z.S., Dardente H., Pevet P., et Raison S. (2005). Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *The European journal of neuroscience* 22, 895-901.
- Malek Z.S., Pevet P., et Raison S. (2004). Circadian change in tryptophan hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei. *Neuroscience* 125, 749-758.
- Mann J.J. (1999). Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 21, 99S-105S.
- Marcos E., Fadel E., Sanchez O., Humbert M., Darteville P., Simonneau G., Hamon M., Adnot S., et Eddahibi S. (2004). Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circulation research* 94, 1263-1270.
- Matsuda M., Imaoka T., Vomachka A.J., Gudelsky G.A., Hou Z., Mistry M., Bailey J.P., Nieport K.M., Walther D.J., Bader M., et Horseman N.D. (2004). Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev Cell* 6, 193-203.
- 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.
- McKinney J., Knappskog P.M., et Haavik J. (2005). Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *Journal of neurochemistry* 92, 311-320.
- Meek J.L., et Neff N.H. (1972). Tryptophan 5-hydroxylase: approximation of half-life and rate of axonal transport. *Journal of neurochemistry* 19, 1519-1525.
- Meltzer H.Y. (1995). The role of serotonin in schizophrenia and the place of serotonin-dopamine antagonist antipsychotics. *J Clin Psychopharmacol* 15, 2S-3S.

- Mietkiewski E., Kosmicki B., et Mizgirt W. (1968). On erythropoietic activity of serotonin in rabbits. Proceedings of the 24th International Congress of Physiological Sciences 7, 294.
- Mongue-Din H., Salmon A., Fiszman M.Y., et Fromes Y. (2007). Non-invasive restrained ECG recording in conscious small rodents: a new tool for cardiac electrical activity investigation. *Pflugers Arch.*
- Moniotte S., Vaerman J.L., Kockx M.M., Larrouy D., Langin D., Noirhomme P., et Balligand J.L. (2001). Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33, 2121-2133.
- Morecroft I., Dempsie Y., Bader M., Walther D.J., Kotnik K., Loughlin L., Nilsen M., et MacLean M.R. (2007). Effect of tryptophan hydroxylase 1 deficiency on the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Hypertension* 49, 232-236.
- Morimoto A., Hasegawa H., Cheng H.J., Little W.C., et Cheng C.P. (2004). Endogenous beta3-adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *American journal of physiology* 286, H2425-2433.
- Musunuru S., Carpenter J.E., Sippel R.S., Kunnimalaiyaan M., et Chen H. (2005). A mouse model of carcinoid syndrome and heart disease. *J Surg Res* 126, 102-105.
- Nakamura K., Sugawara Y., Sawabe K., Ohashi A., Tsurui H., Xiu Y., Ohtsuji M., Lin Q.S., Nishimura H., Hasegawa H., et Hirose S. (2006). Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J Neurosci* 26, 530-534.
- Nebigil C.G., Choi D.S., Dierich A., Hickel P., Le Meur M., Messaddeq N., Launay J.M., et Maroteaux L. (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9508-9513.
- Nebigil C.G., Etienne N., Schaerlinger B., Hickel P., Launay J.M., et Maroteaux L. (2001a). Developmentally regulated serotonin 5-HT2B receptors. *Int J Dev Neurosci* 19, 365-372.
- Nebigil C.G., Hickel P., Messaddeq N., Vonesch J.L., Douchet M.P., Monassier L., Gyorgy K., Matz R., Andriantsitohaina R., Manivet P., Launay J.M., et Maroteaux L. (2001b). Ablation of serotonin 5-HT(2B) receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. *Circulation* 103, 2973-2979.
- Nebigil C.G., Jaffre F., Messaddeq N., Hickel P., Monassier L., Launay J.M., et Maroteaux L. (2003). Overexpression of the serotonin 5-HT2B receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy. *Circulation* 107, 3223-3229.
- Nebigil C.G., et Maroteaux L. (2003). Functional consequence of serotonin/5-HT2B receptor signaling in heart: role of mitochondria in transition between hypertrophy and heart failure? *Circulation* 108, 902-908.
- Neckameyer W.S., et White K. (1992). A single locus encodes both phenylalanine hydroxylase and tryptophan hydroxylase activities in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry* 267, 4199-4206.
- Nemecek G.M., Coughlin S.R., Handley D.A., et Moskowitz M.A. (1986). Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 674-678.
- Ni W., et Watts S.W. (2006). 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 33, 575-583.
- Nicotra A., Pierucci F., Parvez H., et Senatori O. (2004). Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology* 25, 155-165.
- Noveck R.J., et Fisher J.W. (1971). Erythropoietic effects of 5-hydroxytryptamine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, NY) 138, 103-107.
- O'Kane R.L., et Hawkins R.A. (2003). Na⁺-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the abluminal membrane of the blood-brain barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E1167-1173.
- Oliveras J., et Besson M. (1992). Serotonin, stimulation-produced analgesia and spinal mechanisms of antinociception. (Pergamon Press).

- Ortiz-Alvarado R., Guzman-Quevedo O., Mercado-Camargo R., Haertle T., Vignes C., et Bolanos-Jimenez F. (2006). Expression of tryptophan hydroxylase in developing mouse taste papillae. *FEBS letters* *580*, 5371-5376.
- Pakala R., Willerson J.T., et Benedict C.R. (1994). Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation* *90*, 1919-1926.
- Parks V.J., Sandison A.G., Skinner S.L., et Whelan R.F. (1960). The stimulation of respiration by 5-hydroxytryptamine in man. *The Journal of physiology* *151*, 342-351.
- Patel S.R., Hartwig J.H., et Italiano J.E., Jr. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of clinical investigation* *115*, 3348-3354.
- Peroutka S.J., et Snyder S.H. (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]lysergic acid diethylamide and [³H]spiroperidol. *Molecular pharmacology* *16*, 687-699.
- Plein H., et Berk M. (2001). The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness. *Hum Psychopharmacol* *16*, 229-236.
- Pucilowski O., et Kostowski W. (1983). Aggressive behaviour and the central serotonergic systems. *Behavioural brain research* *9*, 33-48.
- Pukhal'skaya E., et Golubkova S. (1967). Proliferation reaction of the bone marrow of rats to administration of serotonin. *Chemical Abstracts* *66*, 114425k.
- 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 Levy F.O. (2005a). Appearance of a ventricular 5-HT₄-receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovascular research* *65*, 869-878.
- Qvigstad E., Sjaastad I., Brattelid T., Nunn C., Swift F., Birkeland J.A., Krobert K.A., Andersen G.O., Sejersted O.M., Osnes J.B., Levy F.O., et Skomedal T. (2005b). Dual serotonergic regulation of ventricular contractile force through 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors induced in the acute failing heart. *Circulation research* *97*, 268-276.
- Ramage A.G. (2001). Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain research bulletin* *56*, 425-439.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., et Moore P.K. (2003). Other peripheral mediators: 5-hydroxytryptamine and purines, fifth edition edn (Edinburgh).
- Rapport M.M. (1949). Serum vasoconstrictor serotonin. V. The presence of creatinine in the complex: A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *The Journal of biological chemistry* *180*, 961-969.
- Rapport M.M., Green A.A., et Page I.H. (1948a). Crystalline Serotonin. *Science* *108*, 329-330.
- Rapport M.M., Green A.A., et Page I.H. (1948b). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *The Journal of biological chemistry* *174*, 735-741.
- Richard Green A. (2006). Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *British journal of pharmacology* *147 Suppl 1*, S145-152.
- Robinson R.G., et Gershon M.D. (1971). Synthesis and uptake of 5-hydroxytryptamine by the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. A histochemical study. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *178*, 311-324.
- Rohrer D.K., Desai K.H., Jasper J.R., Stevens M.E., Regula D.P., Jr., Barsh G.S., Bernstein D., et Kobilka B.K. (1996). Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 7375-7380.
- Rothman R.B., et Baumann M.H. (2002). Serotonin releasing agents. *Neurochemical, therapeutic and adverse effects. Pharmacology, biochemistry, and behavior* *71*, 825-836.
- Rozec B., et Gauthier C. (2006). beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacology & therapeutics* *111*, 652-673.
- Rudnick G. (2007). Serotonin Transporters - Structure and Function. *J Membr Biol*.

- Rudnick G., et Clark J. (1993). From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* **1144**, 249-263.
- Sah V.P., Hoshijima M., Chien K.R., et Brown J.H. (1996). Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *The Journal of biological chemistry* **271**, 31185-31190.
- Sakowski S.A., Geddes T.J., Thomas D.M., Levi E., Hatfield J.S., et Kuhn D.M. (2006). Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain research* **1085**, 11-18.
- Salim K., Fenton T., Bacha J., Urien-Rodriguez H., Bonnert T., Skynner H.A., Watts E., Kerby J., Heald A., Beer M., McAllister G., et Guest P.C. (2002). Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 15482-15485.
- Sanders L., et Kaumann A.J. (1992). A 5-HT4-like receptor in human left atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **345**, 382-386.
- Sari Y., et Zhou F.C. (2003). Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. *Int J Dev Neurosci* **21**, 417-424.
- Sellers E.M., Higgins G.A., et Sobell M.B. (1992). 5-HT and alcohol abuse. *Trends in pharmacological sciences* **13**, 69-75.
- Serebruany V.L. (2006). Selective serotonin reuptake inhibitors and increased bleeding risk: are we missing something? *The American journal of medicine* **119**, 113-116.
- Sharma H.S., Westman J., Navarro J.C., Dey P.K., et Nyberg F. (1995). Probable involvement of serotonin in the increased permeability of the blood-brain barrier by forced swimming. An experimental study using Evans blue and 131I-sodium tracers in the rat. *Behavioural brain research* **72**, 189-196.
- Shuey D.L., Sadler T.W., Tamir H., et Lauder J.M. (1993). Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anatomy and embryology* **187**, 75-85.
- Sitaram B.R., et Lees G.J. (1978). Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *Journal of neurochemistry* **31**, 1021-1026.
- Sneddon J.M. (1973). Blood platelets as a model for monoamine-containing neurones. *Progress in neurobiology* **1**, 151-198.
- Stahl S.M. (1977). The human platelet. A diagnostic and research tool for the study of biogenic amines in psychiatric and neurologic disorders. *Archives of general psychiatry* **34**, 509-516.
- Stahl S.M., et Meltzer H.Y. (1978). A kinetic and pharmacologic analysis of 5-hydroxytryptamine transport by human platelets and platelet storage granules: comparison with central serotonergic neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **205**, 118-132.
- Staley J.K., Malison R.T., et Innis R.B. (1998). Imaging of the serotonergic system: interactions of neuroanatomical and functional abnormalities of depression. *Biological psychiatry* **44**, 534-549.
- Steinbusch H.W., et Nieuwenhuys R. (1983). The raphe nuclei of the rat brainstem: a cytoarchitectonic and immunohistochemical study. (New-York, Raven Press).
- Sze J.Y., Victor M., Loer C., Shi Y., et Ruvkun G. (2000). Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* **403**, 560-564.
- Talley N.J. (2001). Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet* **358**, 2061-2068.
- Tavernier G., Toumaniantz G., Erfanian M., Heymann M.F., Laurent K., Langin D., et Gauthier C. (2003). beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovascular research* **59**, 288-296.
- Teraoka H., Russell C., Regan J., Chandrasekhar A., Concha M.L., Yokoyama R., Higashi K., Take-Uchi M., Dong W., Hiraga T., Holder N., et Wilson S.W. (2004). Hedgehog and Fgf signaling pathways regulate the development of tphR-expressing serotonergic raphe neurons in zebrafish embryos. *Journal of neurobiology* **60**, 275-288.

- Thevenot E. (2003). Mutagenèse conditionnelle dans le système sérotoninergique central de la souris par transfert viral de la recombinase cre. (Paris, Université Paris VI), pp. 125.
- Thevenot E., Cote F., Colin P., He Y., Leblois H., Perricaudet M., Mallet J., et Vodjdani G. (2003). Targeting conditional gene modification into the serotonin neurons of the dorsal raphe nucleus by viral delivery of the Cre recombinase. *Mol Cell Neurosci* 24, 139-147.
- Tiwari S., Italiano J.E., Jr., Barral D.C., Mules E.H., Novak E.K., Swank R.T., Seabra M.C., et Shivdasani R.A. (2003). A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation. *Blood* 102, 3970-3979.
- Tortora G.J., et Grabowski S.R. (1994). Principles of Anatomy and Physiology, Seventh edition / Deuxième édition française edn (De Boeck Université).
- Tranzer J.P., da Prada M., et Pletscher A. (1972). Storage of 5-hydroxytryptamine in megakaryocytes. *The Journal of cell biology* 52, 191-197.
- Turner E.H., Loftis J.M., et Blackwell A.D. (2006). Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacology & therapeutics* 109, 325-338.
- Twarog B.M. (1954). Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J Cell Physiol* 44, 141-163.
- Twarog B.M., et Page I.H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *The American journal of physiology* 175, 157-161.
- Ullmer C., Schmuck K., Kalkman H.O., et Lubbert H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS letters* 370, 215-221.
- Van Den Bogaert A., De Zutter S., Heyrman L., Mendlewicz J., Adolfsson R., Van Broeckhoven C., et Del-Favero J. (2005). Response to Zhang et al (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major Depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron* 48, 704; author reply 705-706.
- Vitalis T., Fouquet C., Alvarez C., Seif I., Price D., Gaspar P., et Cases O. (2002). Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *The Journal of comparative neurology* 442, 331-347.
- von Borell E., Langbein J., Despres G., Hansen S., Leterrier C., Marchant-Forde J., Marchant-Forde R., Minero M., Mohr E., Prunier A., Valance D., et Veissier I. (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals - A review. *Physiol Behav*.
- von Mentzer B., Murata Y., Ahlstedt I., Lindstrom E., et Martinez V. (2007). Functional CRF receptors in BON cells stimulate serotonin release. *Biochemical pharmacology* 73, 805-813.
- Wallace J.A., et Lauder J.M. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain research bulletin* 10, 459-479.
- Walther D.J., et Bader M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical pharmacology* 66, 1673-1680.
- Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hortschagl H., Voits M., Fink H., et Bader M. (2003a). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299, 76.
- Walther D.J., Peter J.U., Winter S., Holtje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinkel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm C.S., Ahnert-Hilger G., et Bader M. (2003b). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 115, 851-862.
- Wang L., Erlandsen H., Haavik J., Knappskog P.M., et Stevens R.C. (2002). Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry* 41, 12569-12574.
- Wang Y., et Ramage A.G. (2001). The role of central 5-HT(1A) receptors in the control of B-fibre cardiac and bronchoconstrictor vagal preganglionic neurones in anaesthetized cats. *The Journal of physiology* 536, 753-767.
- Watts S.W. (2005). 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin Sci (Lond)* 108, 399-412.

- Watts S.W., Baez M., et Webb R.C. (1996). The 5-hydroxytryptamine2B receptor and 5-HT receptor signal transduction in mesenteric arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 277, 1103-1113.
- Watts S.W., et Fink G.D. (1999). 5-HT2B-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *The American journal of physiology* 276, H944-952.
- Watts S.W., et Webb R.C. (1994). Mechanism of ergonovine-induced contraction in the mesenteric artery from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 269, 617-625.
- Weidenfeller C., Svendsen C.N., et Shusta E.V. (2007). Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *Journal of neurochemistry*.
- Weissman N.J., Tighe J.F., Jr., Gottdiener J.S., et Gwynne J.T. (1998). An assessment of heart-valve abnormalities in obese patients taking dextroamphetamine, sustained-release dextroamphetamine, or placebo. *Sustained-Release Dexfenfluramine Study Group. The New England journal of medicine* 339, 725-732.
- Whitaker-Azmitia P.M. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21, 2S-8S.
- Wiklund L., Leger L., et Persson M. (1981). Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. *The Journal of comparative neurology* 203, 613-647.
- Woolley D.W., et Shaw E. (1954). A Biochemical and Pharmacological Suggestion About Certain Mental Disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 40, 228-231.
- Xie Z., Lee S.P., O'Dowd B.F., et George S.R. (1999). Serotonin 5-HT1B and 5-HT1D receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS letters* 456, 63-67.
- Yamada M., et Yasuhara H. (2004). Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology* 25, 215-221.
- Yang M., Srikiatkachorn A., Anthony M., Chesterman C.N., et Chong B.H. (1996a). Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaryoblasts. *International journal of hematology* 63, 137-142.
- Yang M., Srikiatkachorn A., Anthony M., et Chong B.H. (1996b). Serotonin stimulates megakaryocytopoiesis via the 5-HT2 receptor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7, 127-133.
- Yavarone M.S., Shuey D.L., Tamir H., Sadler T.W., et Lauder J.M. (1993). Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology* 47, 573-584.
- Youdim M.B. (1988). Platelet monoamine oxidase B: use and misuse. *Experientia* 44, 137-141.
- Youdim M.B., Edmondson D., et Tipton K.F. (2006). The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature reviews* 7, 295-309.
- Yusuf S., Al-Saady N., et Camm A.J. (2003). 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? *Journal of cardiovascular electrophysiology* 14, 209-214.
- Zhang X., Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R., et Caron M.G. (2006). Functional polymorphisms of the brain serotonin synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase-2. *Cell Mol Life Sci* 63, 6-11.
- Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., et Caron M.G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* 305, 217.
- Zhang X., Gainetdinov R.R., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Burch L.H., Williams R.B., Schwartz D.A., Krishnan K.R., et Caron M.G. (2005). Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16.
- Zhao Z.Q., Scott M., Chiechio S., Wang J.S., Renner K.J., Gereau R.W.t., Johnson R.L., Deneris E.S., et Chen Z.F. (2006). Lmx1b is required for maintenance of central serotonergic neurons and mice lacking central serotonergic system exhibit normal locomotor activity. *J Neurosci* 26, 12781-12788.
- Zhou Q.Y., Quaife C.J., et Palmiter R.D. (1995). Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 374, 640-643.

- Zhou Z., Peters E.J., Hamilton S.P., McMahon F., Thomas C., McGrath P.J., Rush J., Trivedi M.H., Charney D.S., Roy A., Wisniewski S., Lipsky R., et Goldman D. (2005). Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron* 48, 702-703; author reply 705-706.
- Zill P., Buttner A., Eisenmenger W., Moller H.J., Ackenheil M., et Bondy B. (2007). Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *Journal of psychiatric research* 41, 168-173.