

Université de Montréal

Effet de la galanine sur le système nerveux cardiaque intrinsèque.

Par

Marwa Abass

Département de la pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise

En pharmacologie

Option cardiovasculaire

Août 2014

© Abass, 2014

Résumé

Les neurones cholinergiques et adrénergiques efférents du système nerveux cardiaque intrinsèque (SNCI) sont impliqués dans la régulation de la fonction cardiaque chronotrope. La galanine, peptide présent et libéré dans les terminaisons nerveuses cardiaques, est capable de diminuer la libération de l'acétylcholine. Notre hypothèse est d'étudier la possibilité que la galanine puisse agir comme un peptide neuromodulateur inhibiteur dans les neurones du SNCI chez le rat. Les oreillettes et les tissus associés du SNCI sont isolés à partir de rats Sprague-Dawley et perfusés en vitro. Les valeurs de la fréquence auriculaire mesurées d'un battement à l'autre sont tirées à partir d'un enregistrement bipolaire auriculaire. La perfusion de la nicotine en forme de bolus (avec des concentrations dans le bain de 20-250 μM) a induit des réponses biphasiques composées d'une réponse chronotrope négative au début suivie d'une réponse chronotrope positive. Au cours de la superfusion de la galanine (170 nM), les réponses chronotropes positives à la nicotine sont réduites chez 12/14 préparations (contrôle : $21,35 \pm 17,4$ à galanine : $5,46 \pm 8,0$ bpm, $n = 14$, $p = 0,02$), tandis que les réponses chronotropes négatives sont réduites chez 8 /14 préparations et affichent une tendance générale vers la réduction (contrôle : $-16,09 \pm 14,7$, galanine : $-12,53 \pm 13,2$ bpm). On peut conclure que la galanine agit comme un peptide neuromodulateur inhibiteur dans les SNCI chez le rat, en modifiant de préférence la stimulation nicotinique de neurones adrénergiques.

Mots-clés : Système nerveux cardiaque intrinsèque, nicotine, galanine, rythme cardiaque, oreillettes isolées de rat.

Abstract

Cholinergic and adrenergic efferent neurons of the intrinsic cardiac nervous system (ICNS) regulate cardiac chronotropic function. Galanin, a peptide present and released in cardiac nerve endings, is able to reduce the acetylcholine release. Our aim was to investigate the proposition that galanin can act as an inhibitory neuromodulatory peptide in the rat ICNS. Atria and associated ICNS tissues were isolated from Sprague-Dawley rats and superfused in vitro. Beat to beat atrial rate measurements were derived from an atrial bipolar recording. Nicotine bolus infusion (bath concentrations of 20-250 μ M) induced biphasic responses consisting of an early negative followed by a positive chronotropic response. During galanin superfusion (170 nM), positive chronotropic responses to nicotine were reduced in 12/14 preparations (control: 21.35 ± 17.4 to galanin: 5.46 ± 8.0 bpm, $n=14$, $p=0.02$) whereas the negative chronotropic responses were reduced in 8/14 preparations and displayed an overall tendency towards reduction (control: -16.09 ± 14.7 , galanin: -12.53 ± 13.2 bpm). It is concluded that galanin may act as an inhibitory neuromodulatory peptide in the rat ICNS, preferentially modifying nicotinic stimulation of adrenergic neurons.

Keywords: Intrinsic cardiac nervous system, nicotine, galanin, heart rate, isolated rat atria

Table des matières

Liste des tableaux _____	vii
Liste des Abréviations : _____	ix
Remerciements : _____	xiv
Introduction _____	1
Chapitre 1 - Le système cardiovasculaire : _____	2
1.1. Le système de conduction cardiaque : _____	2
1.2. Les mécanismes régulateurs du fonctionnement cardiaque : _____	5
1.3. Contrôle nerveux de l'automatisme cardiaque : _____	5
1.4. Contrôle hormonal des fonctions cardiaques : _____	8
1.4.1. Le neuropeptide Y : _____	8
1.4.2. Le peptide intestinal vasoactif (VIP) : _____	9
1.4.3. La substance P : _____	9
1.4.4. L'angiotensine II : _____	9
1.5. Les maladies cardiovasculaires : _____	12
1.5.1. La cardiopathie ischémique : _____	12
1.5.2. L'insuffisance cardiaque : _____	13
1.5.3. L'arythmie cardiaque : _____	13
Chapitre 2 - Le système nerveux cardiaque intrinsèque _____	15
2.1. Découverte du système nerveux cardiaque intrinsèque : _____	15
2.2. L'identification et la morphologie des cellules ganglionnaires du SNCI : _____	17
2.3. L'anatomie du système nerveux cardiaque intrinsèque chez le rat : _____	18
2.3.1. Les plexus neuronaux coronaires droit (PCD) et gauche (PCG) : _____	19
2.3.2. Le plexus ventral de l'oreillette droite (PVOD) : _____	19
2.3.3. Le plexus ventral de l'oreillette gauche (PVOG) : _____	20
2.3.4. Le plexus dorsal de l'oreillette droite (PDOD) : _____	20
2.3.5. Le plexus dorsal de l'oreillette gauche (PDOG) : _____	20
2.4. La structure du système nerveux cardiaque intrinsèque : _____	22
2.4.1. Les neurones afférents cardiaques : _____	23
2.4.2. Les neurones efférents cardiaques : _____	23

2.4.2.1.	Les neurones efférents préganglionnaires parasympathiques :	_____	24
2.4.2.2.	Les neurones efférents préganglionnaires sympathiques :	_____	24
2.4.3.	Les neurones intrathoraciques de circuit local :	_____	25
2.5.	L'importance du système nerveux cardiaque intrinsèque :	_____	27
2.6.	Les maladies qui peuvent être influencées par le contrôle du système nerveux cardiaque intrinsèque :	_____	28
2.6.1.	L'ischémie myocardique régionale :	_____	29
2.6.2.	Les arythmies cardiaques :	_____	30
Chapitre 3 - La nicotine _____			32
3.1.	Structure et composition des récepteurs nicotiniques :	_____	32
3.2.	Les types, formes et sous-unités des récepteurs nicotiniques (nAChR):	_____	34
3.3.	Les sous-types de nAChRs dans le cœur et le système cardiaque intrinsèque :	_____	34
3.4.	Fonctionnement des récepteurs nicotiniques :	_____	35
3.5.	La topologie des récepteurs nicotiniques :	_____	38
3.6.	Contrôle et blocage des récepteurs nicotiniques :	_____	39
3.6.1.	Les agonistes des récepteurs nicotiniques et leurs sites d'adhésion :	_____	39
3.6.2.	Sites des bloqueurs non compétitifs :	_____	40
3.6.3.	Ions, peptides et hormones impliqués dans le contrôle des récepteurs nicotiniques :	_____	41
3.6.4.	L'action des neuropeptides sur les récepteurs nicotiniques :	_____	42
Chapitre 4 - La Galanine _____			43
4.1.	La découverte de la galanine :	_____	43
4.2.	Les récepteurs de la galanine :	_____	43
4.2.1.	Les récepteurs GalR1 :	_____	44
4.2.2.	Les récepteurs GalR2 :	_____	44
4.2.3.	Les récepteurs GalR3 :	_____	45
4.3.	Les ligands natifs et synthétiques de la galanine :	_____	47
4.3.1.	Les peptides natifs de la galanine :	_____	47
4.3.3.	Les peptides chimériques antagonistes :	_____	48
4.3.4.	Les agonistes non peptidiques :	_____	48
4.3.5.	Les antagonistes non peptidiques :	_____	49

4.4.	La distribution du peptide et des récepteurs dans les systèmes nerveux central et périphérique :	51
4.4.1.	La distribution des ARN messagers de la galanine :	51
4.4.2.	La distribution des récepteurs de la galanine :	51
Chapitre 5 - Hypothèse et objectif de recherche :		53
Chapitre 6 – Protocol expérimental et méthodologie :		56
6.1.	La préparation :	56
6.2.	Les solutions physiologiques et médicaments :	57
6.3.	Le système de superfusion :	58
6.3.	L'enregistrement du rythme auriculaire d'un battement à l'autre :	61
6.4.	Protocoles :	62
6.5.	L'analyse des données :	64
Chapitre 7 - L'article:		66
7.1.	Abstract:	67
7.2.	Introduction	68
7.3.	Methods	69
7.3.1.	Animals and preparation	69
7.3.2.	Beat to beat atrial rate measurement	70
7.3.3.	Drugs	70
7.3.4.	Protocols	70
7.3.5.	Data analysis	71
7.4.	Results	72
7.4.1.	Effects of nicotine	72
7.4.2.	Effects of galanin on spontaneous atrial rate and nicotine responses	73
7.4.3.	Involvement of β -adrenergic receptors in the positive chronotropic responses to nicotine	73
7.5.	Discussion	74
7.6.	Acknowledgements	76
7.7.	References:	76
7.8.	Figures:	79
6.9.	Figures legends:	81

Chapitre 8 – La discussion :	82
8.1. Effet de la nicotine sur la fréquence auriculaire :	82
8.2. Effet de la galanine sur la fréquence auriculaire :	83
Chapitre 9 - Conclusion	87
Chapitre 10 – La Bibliographie:	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les ligands fréquemment utilisés pour les récepteurs de la galanine et leurs valeurs de K_i (en nM)
.....50

Liste des figures :

Figure 1 :	4
Figure 2 :	11
Figure 3 :	18
Figure 4 :	21
Figure 5 :	21
Figure 6 :	26
Figure 7 :	33
Figure 8 :	37
Figure 9 :	38
Figure 10 :	46
Figure 11 :	56
Figure 12 :	58
Figure 13 :	60
Figure 14 :	62
Figure 15 :	64

Liste des Abréviations :

AC	adénylate cyclase
Ach	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ARN m	acide ribonucléique messenger
AT I	Angiotensine I
AT II	Angiotensine II
ATP	adénosine triphosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
Bpm	battement par minute
Ca ⁺²	Calcium
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
Ch	Choline
ChAT	Choline acétyltransférase
CREB	protéine de liaison de l'élément de reponse à l'AMPC ou C-AMP Response Element-binding protein
DAG	Diacylglycérol
ERK	Extracellular signal-regulated kinases

FA	fibrillation auriculaire
GABA	acide γ -aminobutyrique
GalR1, GalR2 et GalR3	récepteurs à la galanine 1, 2 et 3
IP3	inositol triphosphate
K ⁺	Potassium
LA	oreillette gauche ;
Lau	Auricule gauche
LCV	veine gauche rostrale
LGIC	les récepteurs canaux membranaires ou Ligand Gated Ion Channel
LPS	Sinus pulmonaire gauche
LV	ventricule gauche
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCV	veine cardiaque moyenne
mM	Millimolaire
nAChR	récepteurs nicotiques de l'acétylcholine
NE	Noradrénaline
Nœud AV	nœud auriculo-ventriculaire
Nœud SA	le nœud sinoauriculaire

NPY	Le neuropeptide Y
PCD	plexus neuronaux coronaires droits
PCG	plexus neuronaux coronaires gauches
PCR	réaction en chaîne par polymérase
PDK-1	phosphoinosotide dépendant protéine-kinase 1;
PDOD	plexus dorsal de l'oreillette droite
PDOG	plexus dorsal de l'oreillette gauche
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP-2	bisphosphate de phosphatidylinositol
PIP-3	phosphatidylinositol triphosphate
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PTX	toxine pertussique
PVLV	veine postérieure du ventricule gauche
PVOD	plexus ventral de l'oreillette droite
PVOG	plexus ventral de l'oreillette gauche
RER	réticulum endoplasmique rugueux
SNC	système nerveux central

SNCI	système nerveux cardiaque intrinsèque
SNP	système nerveux périphérique
VACHT	transporteur vésiculaire d'Acétylcholine
VIP	peptide intestinal vasoactif
μM	Micromolaire

Pour l'esprit de ma décédée mère
Pour tous les défenseurs de la liberté dans le monde entier,
En particulier les héros de la révolution Égyptienne
Puissiez-vous reposer en paix...Amin

Remerciements :

Ce travail n'aurait pas été possible à réaliser depuis le début sans le soutien d'Allah, ensuite au grand appui de mon mari, et de mes bien-aimés enfants, qui ont tous contribué à la conception, l'exécution et l'achèvement du manuscrit sous-jacent. Mon cher père, Dr Farouk Abass, malgré la grande distance entre nos deux lieux, tu n'as jamais cessé de prier Allah pour mon succès, tes mots pleins de la confiance et d'enthousiasme m'ont beaucoup inspiré durant mon trajet. Je suis très chanceuse d'être ta fille. Qu'Allah te protège mon père.

Je présente respectueusement ce mémoire à mon directeur de recherche Dr René Cardinal, à mon codirecteur Dr Frank Smith, au directeur du département, au doyen de la faculté de médecine, et à tous les honorables membres du Jury.

Ma profonde gratitude à Dr René Cardinal pour sa courtoisie de présenter en tant que promoteur de ce travail. Dr Cardinal, vous m'avez donné l'occasion de découvrir le domaine de la recherche fondamentale en pharmacologie cardiovasculaire. Votre enthousiasme et votre confiance ont toujours été des grands soutiens pour moi.

J'ai aussi beaucoup apprécié le soutien précieux de Michel Vermeulen qui m'a accompagné durant mes expériences, pleines de dissections très sophistiquées et d'enregistrements des signaux cardiovasculaires. Avec Michel de mon côté, je n'ai jamais eu à me soucier de problèmes informatiques. Tu m'as toujours aidé afin d'améliorer la qualité de mon travail. Merci Michel.

De plus, je suis très reconnaissant à Caroline Bouchard, la technicienne de l'animalerie du centre de recherche de l'hôpital Sacré-Cœur de Montréal, votre temps et effort au cours de mes expériences étaient vraiment appréciables, votre façon amicale m'a beaucoup fasciné.

Dernier point, mais certainement pas moindre, je veux remercier de nouveau mon mari Waleed Al-Omda et mes cinq enfants ; Youssof, Rahma, Habiba, Sara et Salma. Vous n'avez jamais cessé de m'encourager, malgré mon temps clairement insuffisant dédié pour vous durant le trajet de ma maîtrise. Je vous promets mes chers enfants, de rattraper le temps que nous avons perdu au cours de ces dernières années.

Marwa, août 2014

Introduction

Chapitre 1 - Le système cardiovasculaire :

Depuis la découverte de l'Acétylcholine (ACh) comme premier neurotransmetteur par Otto Loewi (Cheymol 1972), les mécanismes neuronaux qui contrôlent la fonction cardiaque ont attiré un intérêt considérable au cours du siècle passé. Dans cette partie de l'introduction, on va dans un premier temps définir et présenter la conduction cardiaque, les éléments clés entourant sa régulation. Dans un deuxième temps, on discutera sur quelques maladies cardiovasculaires qui ont une importance clinique en relation avec ce travail.

1.1. Le système de conduction cardiaque :

Afin d'assurer que le cœur effectue un pompage uniforme du sang hors de ses cavités vers les différentes parties du corps, une contraction simultanée des cellules myocardiques est provoquée par impulsion qui se déclenche d'une façon périodique. Cette commande est ensuite conduite à travers des voies de conduction aux différentes cellules myocardiques dans un ordre logique : contraction des oreillettes puis des ventricules.

Le nœud sinoauriculaire (nœud SA) est une petite masse de tissu spécialisé juste en dessous de l'épicarde, dans l'oreillette droite. Il est situé à proximité de l'ouverture de la veine cave supérieure, avec des fibres continues avec celles du syncytium auriculaire. Il est aussi mentionné comme un stimulateur cardiaque pour pouvoir produire le rythme de contraction cardiaque.

Le chemin de l'impulsion cardiaque se déplace à partir du nœud SA. Ces cellules sont caractérisées par un potentiel de membrane instable qui, lorsqu'il atteint un certain seuil, déclenche un potentiel d'action. Ce potentiel d'action se propage ensuite dans les oreillettes,

induisant la systole auriculaire (Figure 1) qui est suivie d'une diastole, de sorte que les impulsions passent le long des fibres de jonction du système de conduction vers le nœud atrioventriculaire (nœud AV), situé dans le septum interauriculaire inférieur, au-dessous de l'endocarde. Le nœud AV constitue le seul point de passage possible pour le courant électrique entre les oreillettes et les ventricules, donc la voie de conduction normale entre le syncytium auriculaire et ventriculaire. Les impulsions sont ralenties dans les fibres à faible diamètre du nœud AV, permettant au sang de pénétrer dans les ventricules puisque les oreillettes ont plus de temps pour se contracter et vider tout leur sang dans les ventricules. (Figure 1)

Après que les impulsions cardiaques atteignent les faisceaux distaux AV (faisceau de His), elles suivent leurs trajets vers les fibres de Purkinje. Dépendant de la nature de ces fibres qui possèdent une conduction très rapide, la propagation de l'impulsion électrique est réalisée à travers tous les ventricules. Tout ce processus assure une efficacité optimale pour propulser le sang, ce qui constitue la phase de contraction ou la systole ventriculaire qui provoque un mode de torsion conduisant à forcer le sang à travers l'aorte et le tronc pulmonaire. Cette contraction est suivie par la diastole ventriculaire ; pendant cette relaxation du muscle les membranes des fibres musculaires se repolarisent permettant leur retour à l'état initial. Normalement, le cœur se contracte environ 60 à 100 fois par minute.

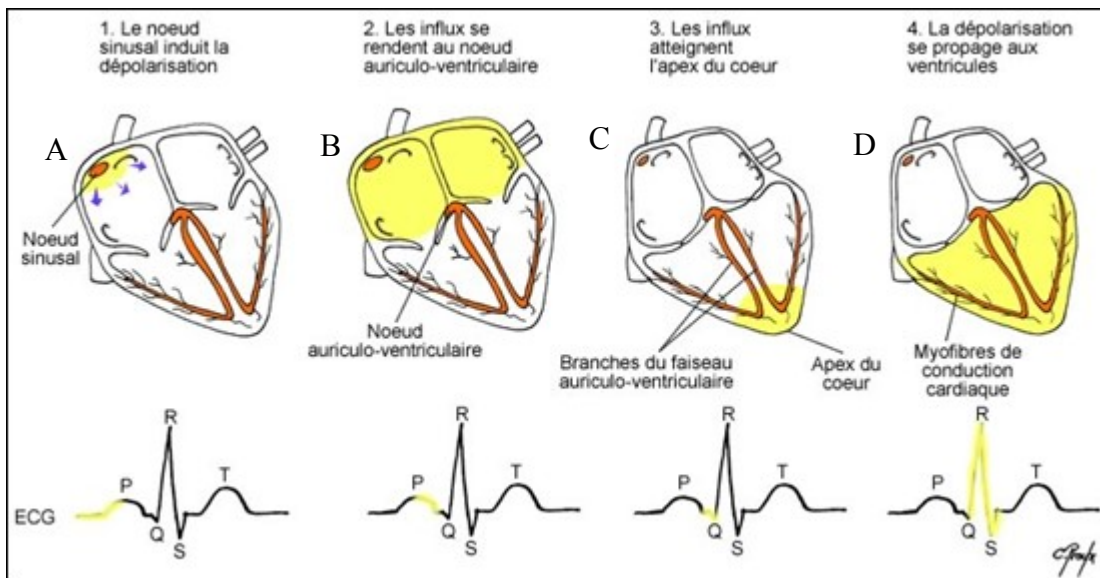


Figure 1 :

Les phases du cycle cardiaque et leur représentation sur l'ECG.

<http://colletemathieu.blog.lemonde.fr/category/cours-sur-la-rigidite-arterielle/>

L'impulsion électrique se propage dans le muscle cardiaque provoquant sa contraction. (A) début de dépolarisation au Nœud sinusal (B) sa propagation dans les oreillettes, contractions auriculaires (systole auriculaire) et l'arrivée de l'impulsion au Nœud AV. (C) la propagation de l'impulsion dans les fibres constituant le faisceau de His. (D) Contraction ventriculaire (systole ventriculaire). Après une période de repolarisation, le cycle du battement cardiaque est terminé et le cœur est prêt pour un nouveau battement.

1.2. Les mécanismes régulateurs du fonctionnement cardiaque :

Afin de permettre à l'organisme de réguler le système cardiovasculaire, plusieurs conditions physiologiques et de nombreux mécanismes neuronaux et/ou hormonaux sont impliqués. Le premier à mentionner est le contrôle par le système nerveux central. Apparaît ensuite l'importance d'avoir une stimulation équilibrée du système nerveux périphérique sympathique et parasympathique. Il est bien noté que la stimulation de la voie sympathique provoque une augmentation de la fréquence cardiaque et de la contractilité du myocarde, alors que la stimulation du parasympathique provoque l'effet inverse. Enfin, les sécrétions hormonales peuvent aussi avoir un rôle régulateur pour le système cardiovasculaire.

1.3. Contrôle nerveux de l'automatisme cardiaque :

Le bulbe rachidien, situé dans le tronc cérébral au-dessus de la moelle épinière, est la région principale du cerveau pour réguler les deux contingents, sympathique et parasympathique (vagal) vers le cœur. Généralement, la division sympathique possède une origine « thoracolombaire », où leurs neurones commencent aux segments (T1- L2/3) de la moelle épinière thoracique et lombaire respectivement. Plus spécifiquement, les neurones sympathiques projettent des segments T1 à T4, vers le cœur. La division parasympathique possède une origine « craniosacrée », où ses neurones commencent au niveau des nerfs crâniens (les nerfs crâniens III, VII, IX et X) et des segments sacrés (S2 — S4) de la moelle épinière. Plus précisément, le nerf vague vers le cœur est le nerf crânien X.

Le système nerveux autonome est unique en ce qu'il exige d'avoir deux neurones séquentiels dans sa voie efférente ; normalement les corps cellulaires du premier niveau sont situés dans la

substance grise du système nerveux central. Ces neurones préganglionnaires du premier ordre et leur axone quittent le système nerveux central pour atteindre un ganglion dans lequel ils viennent en contact avec un neurone de second ordre.

Au niveau des neurones postganglionnaires, les neurones sympathiques vont faire relais dans la chaîne sympathique latérale dorsale ou dans les ganglions prévertébraux, parmi lesquels le ganglion stellaire pour le contingent cardiaque. À partir de là les nerfs cardiaques se distribuent à l'ensemble des structures nodales et myocardiques. Les neurones parasympathiques postganglionnaires sont caractérisés par leur courte distance puisqu'ils se trouvent dans les parois ou au voisinage de leurs effecteurs. Seulement les oreillettes sont innervées par le tonus vagal, où le nerf vague droit innerve le nœud sinusal et le myocarde auriculaire droit, tandis que le nerf gauche régule l'oreillette gauche et le nœud AV. Il n'y a pas d'innervation parasympathique du ventricule.

Généralement, les deux systèmes sympathique et parasympathique agissent réciproquement et entraînent des réponses physiologiques inverses. La stimulation du système parasympathique ralentit le rythme cardiaque ce qui est désigné un effet chronotrope négatif, et elle réduit la vitesse de conduction ce qui est connu sous le nom d'effet dromotrope négatif. Le frein vagal est médié par la libération de l'ACh par le second neurone ; elle se lie à des récepteurs muscariniques et provoque une hyperpolarisation du potentiel de repos. Cet effet est dû à une augmentation spécifique de la conductance potassique (g_K) qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire au K^+ . Celle-ci accélère la phase de repolarisation, hyperpolarise la membrane et abaisse la pente de dépolarisation diastolique. En présence d'ACh, la vitesse de la

libération de K^+ à partir des tissus est augmentée. (Nutter et Adams 1995, Gabrielsson et Peletier 2014)

Le système nerveux sympathique a une action inverse de celle du parasympathique. Il accélère le cœur. Il a des effets chronotrope et dromotrope positifs. Cette action est réalisée par les catécholamines agissant sur les récepteurs bêta-adrénergiques. La stimulation sympathique augmente la fréquence et la force de contraction cardiaque, augmente la vitesse de conduction à travers le nœud AV, l'oreillette et les ventricules, et augmente la tendance des fibres de Purkinje à montrer une activité pacemaker. Les fibres de Purkinje sont particulièrement sensibles aux catécholamines et en leur présence, elles peuvent décharger spontanément, jouant alors un rôle d'un pacemaker. (Tsien 1974, Tsien et Carpenter 1978) Donc, ces fibres pourraient être la cause derrière la facilité avec laquelle l'administration sur un cœur intact de fortes concentrations d'agents sympathomimétiques provoque des extrasystoles ventriculaires ou même une fibrillation. (Shao, Redfors et coll. 2013)

L'action myocardique des catécholamines sur les récepteurs bêta-adrénergiques est due au moins en partie, à la stimulation de l'enzyme intracellulaire adénylcyclase, qui permet l'augmentation de la concentration de 3,5-AMP cyclique dans la cellule cardiaque et par la suite une augmentation du taux d'accumulation du Ca^{+2} du réticulum sarcoplasmique. La systole est ainsi raccourcie et la contraction est renforcée (Fu, Kim et coll. 2014). La stimulation sympathique cause une accélération momentanée du rythme cardiaque : si on arrête la stimulation, on revient progressivement à la fréquence de repos.

1.4. Contrôle hormonal des fonctions cardiaques :

Le contrôle de la fréquence cardiaque par les systèmes classiques sympathique et parasympathique est bien établi. Cependant, il s'accumule des preuves que les peptides, en particulier les neuropeptides, pourraient jouer un rôle dans la modulation de l'activité du nœud SA. Un neuropeptide libéré localement pourrait donc agir de trois manières différentes : comme un neurotransmetteur, comme un neuromodulateur, ou comme une neurohormone. (FE. 1996)

Il est devenu évident que le système nerveux autonome est un système beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait. En fait, il semble capable, en intégrant de nombreux neuropeptides, d'un réglage fin du contrôle des fonctions cellulaires de concert avec la transmission adrénergique ou cholinergique.

Le concept s'est développé depuis la démonstration de la coexistence de la noradrénaline et des neuropeptides comme la somatostatine dans les neurones périphériques. ((Hokfelt, Elfvén et coll. 1977). Des neuropeptides ont également été localisés dans les neurones autonomes du nœud SA, comme la présence de neuropeptide Y (NPY), du peptide intestinal vasoactif (VIP), et de la substance P. (Steele et Choate 1994, Steele, Gibbins et coll. 1996)

1.4.1. Le neuropeptide Y :

Le neuropeptide Y, composé de 36 acides aminés, a été isolé du cerveau de porc en 1982. (Tatemoto 1982) Il est largement distribué dans le système sympathique. Le peptide est colocalisé avec la noradrénaline dans les terminaisons synaptiques des neurones post-ganglionnaires innervant le système cardiovasculaire. Des concentrations importantes de neuropeptide Y se retrouvent dans le tissu nodal, les oreillettes et les vaisseaux coronaires des

rongeurs. Le neuropeptide Y module la transmission sympathique de deux façons : (1) il inhibe, présynaptiquement, la libération de noradrénaline en réponse à la stimulation sympathique (2) il potentialise les effets post-synaptiques induits par la noradrénaline, particulièrement la vasoconstriction.(Gu, Polak et coll. 1984)

1.4.2. Le peptide intestinal vasoactif (VIP) :

Le peptide intestinal vasoactif, composé de 28 acides aminés, a été isolé pour la première fois dans l'intestin grêle de porc. Il possède une puissante activité vasodilatatrice lorsqu'il est injecté par voie systémique.(Said et Mutt 1970) Ce peptide est généralement colocalisé avec l'ACh dans les neurones parasympathiques, et il a été trouvé dans les fibres neuronales post-ganglionnaires des vaisseaux coronaires et dans le nœud SA. (Rigel et Lathrop 1990) Il s'agit d'un vasodilatateur coronaire qui a des effets chronotropes et inotrope positif puissants dans de nombreuses espèces, y compris les humains.(Franco-Cereceda, Bengtsson et coll. 1987)

1.4.3. La substance P :

La substance P est un peptide qui appartient à la famille des tachykinines. On le retrouve principalement dans les fibres sensitives où il est généralement colocalisé avec le CGRP. Les nerfs immunoréactifs à la substance P sont détectés dans les nœuds SA et AV de la plupart des mammifères. (Steele et Choate 1994) La substance P est un puissant vasodilatateur coronaire.

1.4.4. L'angiotensine II :

L'angiotensine II (AT II) est un octapeptide circulant qui agit sur différents organes cibles après liaison aux récepteurs membranaires. Il joue un rôle, entre autres, dans la régulation de la

pression artérielle, du volume de circulation et de la fonction neuronale. L'angiotensine II facilite la libération de catécholamines du sympathique cardiaque et diminue le tonus vagal par une action centrale. L'angiotensine II cause des effets chronotrope et inotrope positifs dans les préparations auriculaires isolées du chien. (Kobayashi, Furukawa et coll. 1978) De même, l'angiotensine II injectée directement dans l'artère du nœud sinusal chez des chiens anesthésiés provoque des effets chronotropes positifs. (Lambert, Godin et coll. 1991) Les effets d'AT II sur le rythme cardiaque sont indépendants du système adrénergique et sont médiés par les récepteurs ATI qui sont localisés, par autoradiographie, dans les nœuds SA et AV chez le rat. (Saavedra, Viswanathan et coll. 1993, Lambert 1995)

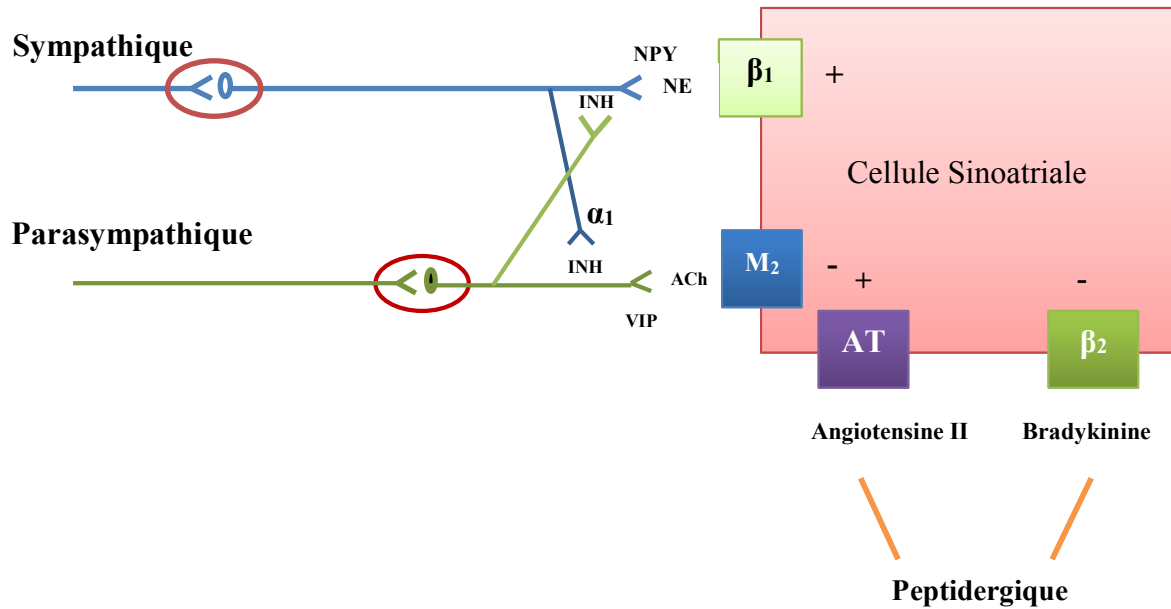


Figure 2 :

Représentation schématique d'une cellule sinoauriculaire et de la régulation de son activité spontanée par le système nerveux autonome sympathique et parasympathique. Une modulation directe et indirecte de la fréquence cardiaque par le système peptidergique est également illustrée pour l'angiotensine II et la bradykinine ainsi que pour le neuropeptide Y (NPY) et le peptide intestinal vasoactif (VIP). Les interactions entre ces systèmes sont probables et pourraient certainement donner lieu à une mise au point du réglage fin de la fréquence cardiaque. NE, la noradrénaline ; ACh, l'acétylcholine, l'INH, l'inhibition, augmentation + et diminution — du rythme cardiaque.

Schéma adapté de (Beaulieu et Lambert 1998)

1.5. Les maladies cardiovasculaires :

Les maladies cardiovasculaires sont définies comme des maladies et des lésions du système cardiovasculaire, y compris le cœur, les vaisseaux sanguins (veines et artères) dans tout le corps et dans le cerveau. Il est important de rechercher un nouveau concept afin de comprendre comment les maladies se développent à l'intérieur de cette principale catégorie de maladies dangereuses. Il est perçu que chaque 7 minutes au Canada, une personne meurt d'une maladie cardiaque ou d'accident vasculaire cérébral (AVC) et les maladies du cœur et les AVC sont parmi les trois principales causes de décès au Canada.(Canada 2009, Canada 2011c)

1.5.1. La cardiopathie ischémique :

Aussi connue comme la maladie de l'artère coronaire, la cardiopathie ischémique est la maladie cardiovasculaire la plus courante au Canada et dans les pays industrialisés. Sur les 56 millions de décès dans le monde entier estimés en 2001, plus de 29 % ont été attribués à des maladies cardiovasculaires. La maladie coronarienne est la manifestation la plus fréquente des maladies cardiovasculaires et représente plus de la moitié des cas d'insuffisance cardiaque dans la population de moins de 75 ans. (Fox, Cowie et coll. 2001) La cardiopathie ischémique est considérée comme une maladie progressive, dans laquelle une obstruction partielle d'une artère coronaire résulte en un état ischémique. Ces lésions ou zones ischémiques déclenchent un processus complexe de remodelage et d'athérosclérose qui entraîne un épaissement de la paroi artérielle ; donc il aggrave la situation et diminue le flux sanguin vers le cœur.

Parmi les symptômes les plus apparents de la maladie coronarienne, on peut citer l'angine ou la douleur thoracique et la dyspnée. L'obstruction complète d'une artère peut entraîner un infarctus du myocarde.

1.5.2. L'insuffisance cardiaque :

L'insuffisance cardiaque congestive est une maladie dans laquelle la fonction du cœur en tant que pompe est défectueuse pour maintenir adéquatement un flux sanguin riche en oxygène pour assurer les fonctions du corps humain. Elle peut être due à la faiblesse du muscle cardiaque, à une fibrose du tissu cardiaque, ou à une augmentation de la demande d'oxygène par les tissus du corps au-delà de la capacité du cœur d'y fournir. Les symptômes de l'insuffisance cardiaque comprennent la fatigue, la diminution de la capacité à l'exercice, l'essoufflement et une enflure des jambes.

1.5.3. L'arythmie cardiaque :

L'arythmie est due à des perturbations dans la séquence d'activation normale du myocarde. Dans un cœur arythmique, les impulsions électriques qui contrôlent le rythme cardiaque se produisent de façon irrégulière ou ne passent pas par les circuits habituels. La durée de l'arythmie varie d'un individu à l'autre selon le type d'arythmie. Les arythmies sont classées en fonction de leur origine, soit auriculaire ou ventriculaire, de leur effet de ralentissement (bradycardie) ou d'accélération (tachycardie) de la fréquence cardiaque.

Nous sommes intéressés au type d'arythmie provoquant une tachycardie d'origine auriculaire, en particulier à la fibrillation auriculaire (FA).

La FA est le type le plus fréquent d'arythmie. Elle survient lorsque les impulsions électriques dans les oreillettes dégénèrent de leur rythme organisé en un modèle chaotique rapide. Cette perturbation se produit en raison de la conduction imprévisible de ces mouvements désordonnés à travers le nœud AV. Ses symptômes varient ; certains patients sont totalement asymptomatiques, d'autres souffrent de la rapidité et de l'irrégularité des réponses ventriculaires. Le plus souvent les symptômes incluent la fatigue, la dyspnée, les étourdissements et les palpitations.

La FA est l'arythmie soutenue la plus fréquente, dont la prévalence augmente avec l'âge. Son risque est relativement rare sous l'âge de 50 ans. Après l'âge de 55 ans, le risque de développer une fibrillation auriculaire double à chaque décennie et peut atteindre 6 % de la population après l'âge de 65 ans. (Sacco, Benjamin et coll. 1997) Il est rapporté que les individus atteints de fibrillation auriculaire ont 3 à 5 fois plus de risque d'accident vasculaire cérébral ischémique (ACV). (European Heart Rhythm, European Association for Cardio-Thoracic et coll. 2010)

Il est important d'indiquer que le système nerveux autonome contrôlant le cœur avec ses deux divisions sympathique et parasympathique, soit extrinsèque ou intrinsèque, est considéré comme un facteur qui pourra contribuer à la pathogénèse de la FA. (Linz, Ukena et coll. 2014)

Chapitre 2 - Le système nerveux cardiaque intrinsèque

Le système nerveux cardiaque a été longtemps conçu en termes de ses deux branches principales qui exercent un contrôle réciproque sur les indices cardiaques. Ce contrôle est bien manifesté par l'influence de contrôle neuronal central due à la régulation sympathique (adrénergique) et parasympathique (cholinergique) qui est identifiée comme activité neuronale des efférents préganglionnaires (Kollai et Koizumi 1979, PJ 1979)

L'augmentation du tonus sympathique cardiaque augmente le chronotropisme, le dromotropisme et l'inotropisme cardiaques, alors que l'inverse est vrai pour les effets exercés par le tonus parasympathique des neurones efférents médullaires préganglionnaires. Dans le modèle classique, les ganglions intrathoraciques extracardiaques sont formés uniquement par le sympathique (Skok 1973) et les ganglions cardiaques intrinsèques, sont composés uniquement par le parasympathique, et ils agissent comme de simples relais efférents qui fonctionnent d'une manière réciproque déterminée par les neurones du tronc cérébral et moelle épinière. (Skok 1973, PJ 1979) Lorsque les neurones inhibiteurs moteurs (efférent parasympathique) sont les plus actifs, l'activité générée par les neurones facilitateurs (efférent sympathique) devient supprimée, et vice versa (Langley 1921, PJ 1979).

2.1. Découverte du système nerveux cardiaque intrinsèque :

Les populations de neurones dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions associés à des organes abdominaux sont impliquées dans la régulation de ces organes et ne sont pas totalement soumises à la commande neuronale centrale. (Cooke 1989) Sur la paroi cardiaque, il a été observé la présence de plusieurs projections distinctes et séparées ; celles provenant des

nerfs vagues droit et gauche (neurones préganglionnaires efférents parasympathiques), ou celles provenant des ganglions stellaires droit et gauche et des ganglions cervicaux moyens (neurones efférents sympathiques). Ces neurones peuvent affecter sélectivement le nœud sinusal, le nœud AV et les fonctions contractiles régionales. Dans le réseau intrapéricardique neuronal qui contrôle le cœur, les points de convergence intracardiaques ou les points bilatéraux des entrées autonomes se réunissent avant leur distribution sélective vers les centres d'automatisme cardiaques ou les tissus contractiles et de conduction. (Pardini, Patel et coll. 1987, Roberts, Slocum et coll. 1989, Roberts 1991)

L'examen histologique de ces points de convergence a révélé plusieurs ganglions encapsulés de taille variable, situés dans le tissu conjonctif adipeux de l'épicarde, en association intime avec un ou plusieurs troncs nerveux. (Randall, Ardell et coll. 1986, Randall, Ardell et coll. 1987, Gagliardi, Randall et coll. 1988, Xi, Randall et coll. 1991)

Des données récentes indiquent que les neurones intrathoraciques extracardiaques et cardiaques intrinsèques comprennent un réseau local de distribution qui traite des informations neuronales pour le contrôle cardiaque. Au cours d'états cardiaques stables, les différents éléments qui composent la hiérarchie cardiaque neuronale périphérique ne semblent pas transférer des informations concernant la fonction des synapses aux neurones centraux. Tandis que, leur fonction d'intégration est toujours sous l'influence tonique des neurones du tronc cérébral et de la moelle épinière. (Andresen MC 2004, Foreman RD 2004), ainsi que des hormones circulantes (JL 2004).

2.2. L'identification et la morphologie des cellules ganglionnaires du SNCI :

La morphologie des cellules ganglionnaires intracardiaques est bien caractérisée par leur forme ronde ou ovoïde, avec de grands noyaux clairs, et une substance de Nissl volumineuse ; elle correspond à des granulations contenant des rosettes de ribosomes libres du réticulum endoplasmique rugueux (RER) qui sont le site de la synthèse protéique. Généralement, les cellules ganglionnaires intracardiaques contiennent de petits nucléoles ronds profondément teintés en brun sombre sur fond blanc en utilisant l'acétylcholinestérase (AChE), et leur nombre varie généralement entre 1-3 par fibre nucléée. Leurs nerfs et des cellules de soutien sont souvent vus intercalés entre les cellules ganglionnaires.(voir figure 3) (Pardini, Patel et coll. 1987)

En comparant la morphologie des neurones ganglionnaires intracardiaques avec celle des neurones sympathiques préganglionnaires, on trouve que ces derniers sont caractérisés par quatre formes somatiques différentes : fusiforme, piriforme, multipolaire et étoilée. Ces neurones présentent généralement des arborisations dendritiques planes, horizontalement alignées avec les principaux rallongements orientés longitudinalement.(Cabot et Bogan 1987, Forehand 1990, Fox et Powley 1992)

Les cellules ganglionnaires intracardiaques sont principalement situées dans le tissu conjonctif et adipeux qui entoure les gros vaisseaux sur la face supérieure du cœur et sont présentes dans la face dorsale du cœur entre les oreillettes, les bronches et l'œsophage.

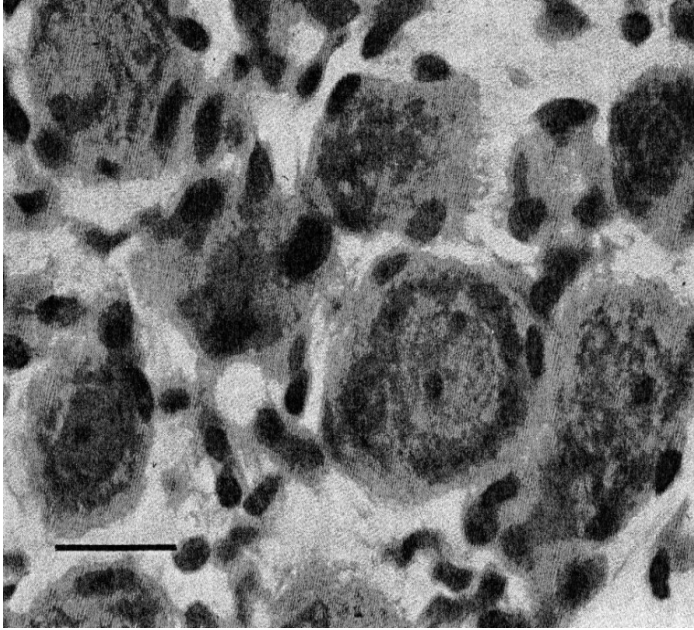


Figure 3 :

Microphotographie capturée en haute magnification, et colorée par l'éosine pour montrer les cellules ganglionnaires intracardiaques dans la région du septum inter auriculaire chez le rat, le trait est égal à 20 μm .

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3668165>

2.3. L'anatomie du système nerveux cardiaque intrinsèque chez le rat :

Les premières études ont démontré la présence, chez le rat, des cellules ganglionnaires intracardiaques dans 4 régions auriculaires épocardiques, qui semblent avoir des sites discrets de projection dans le cœur. Ces ganglions sont tous situés au-dessus de la rainure auriculo-ventriculaire : (1) entre la veine cave supérieure et l'aorte (2) dans la région supérieure du septum interauriculaire (3) dans la région postérieure de l'oreillette gauche (4) enfin, dans la région postérieure entre le septum interauriculaire inférieur et l'oreillette droite. Seules quelques cellules ganglionnaires étaient submergées en sous-épiscardique dans le repli de la cloison interauriculaire dorsale. (voir figures 4 et 5) (Pardini, Patel et coll. 1987)

Les nerfs cardiaques intrinsèques sont regroupés en lignes bien étalées, par lesquelles ils projettent d'une manière sélective aux différentes régions auriculaires et/ou ventriculaires. Il est

prouvé que les nerfs cardiaques intrinsèques sont regroupés en six groupes répartis à travers les différentes régions du cœur :

- La paroi ventrale des ventricules est alimentée par trois plexus neuronaux,
- La paroi ventriculaire dorsale est alimentée par un seul plexus neuronal,
- Chaque oreillette reçoit des nerfs de deux plexus neuronaux distincts.

En plus des détails, ces six plexus neuronaux sont :

2.3.1. Les plexus neuronaux coronaires droit (PCD) et gauche (PCG) :

Le plexus neuronal de la coronaire droite pénètre l'épicarde sur les parois ventrales et latérales du tronc pulmonaire et de l'aorte ascendante. Puis il continue à avancer le long de la rainure coronaire droite, jusqu'à ce que les nerfs se ramifient sur les parois latérales et ventrales du ventricule droit. Quant au plexus neuronal de la coronaire gauche, il pénètre dans l'épicarde entre l'aorte ascendante et le tronc pulmonaire, se prolonge le long de la rainure coronaire gauche, puis il s'élargit sur les côtés latéraux et ventraux du ventricule gauche en suivant les branches de l'artère coronaire gauche.

2.3.2. Le plexus ventral de l'oreillette droite (PVOD) :

Les nerfs de ce plexus entrent par le dessous de la rainure droite du hile cardiaque, puis ils passent à droite dans la rainure ventrale interauriculaire supérieure. Les fines branches de ce plexus atteignent l'oreillette droite jusqu'à la gauche de la racine aortique, et peuvent atteindre même le côté ventral et les parois supérieures du ventricule droit.

2.3.3. Le plexus ventral de l'oreillette gauche (PVOG) :

Ce plexus est assuré par les nerfs provenant de la face ventrale du canal gauche du plexus neuronal du hile cardiaque. Ces nerfs se dirigent principalement vers le côté ventral de l'oreillette gauche.

2.3.4. Le plexus dorsal de l'oreillette droite (PDOD) :

Ces nerfs arrivent du côté droit dorsal du plexus nerveux entre la veine du sinus crânien et les sinus pulmonaires droits. Ces nerfs se lancent dans les parties dorsales et latérales de l'oreillette droite et vers le nœud sinusal.

2.3.5. Le plexus dorsal de l'oreillette gauche (PDOG) :

Ce plexus a des caractéristiques exceptionnelles. Il contient de gros ganglions épicaudiques qui se prolongent constamment le long ou entre les nerfs de la face dorsale de l'oreillette gauche. Ces ganglions épicaudiques sont dispersés sur la face dorsale de l'oreillette gauche et ils se prolongent jusqu'à la face dorsale de la coronaire gauche.

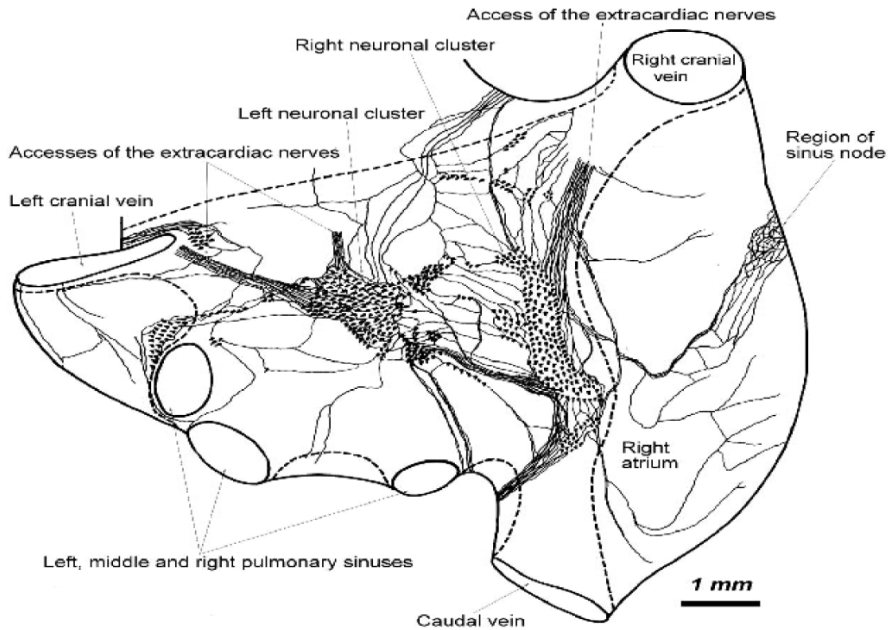


Figure 4 :

Macrophotographie de la paroi dorsale du cœur du rat avec coloration pour l’AChE montrant la structure de plexus neuronal dorsal. (Batulevicius, Pauziene et coll. 2004)

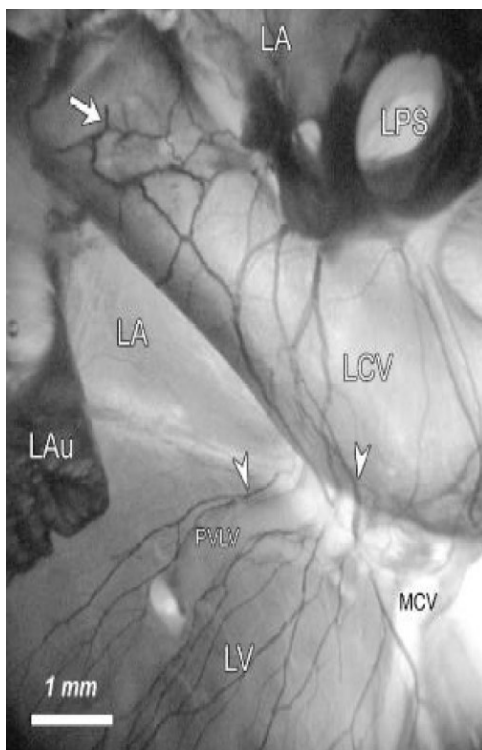


Figure 5 :

Flèche pointe vers les nerfs qui accèdent au cœur via la face dorsale de la veine gauche rostrale (LCV). Des pointes de flèche indiquent les nerfs qui s’étendent à la paroi dorsale des ventricules à travers la rainure coronaire. Notez le réseau de neurones de premier plan sur le sinus de la LCV. LA, oreillette gauche ; LAu, Auricule gauche ; LPS, Sinus pulmonaire gauche ; LV, ventricule gauche ; MCV, veine cardiaque moyenne ; PVLV, veine postérieure du ventricule gauche. (Batulevicius, Pauziene et coll. 2004)

2.4. La structure du système nerveux cardiaque intrinsèque :

Le système nerveux cardiaque intrinsèque a été classiquement considéré contenir seulement des neurones post-ganglionnaires efférents parasympathiques qui reçoivent les projections de neurones efférents préganglionnaires parasympathiques médullaires. D'un tel point de vue, le système cardiaque intrinsèque agirait comme simple relais des projections neuronales parasympathiques efférentes vers le cœur. Ainsi, le principal contrôle autonome du cœur résiderait uniquement dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Mais les données rapportées au cours de ces dernières décennies indiquent que le traitement des informations cardiaques pourra s'effectuer dans le système nerveux cardiaque intrinsèque lui-même. En tant que tel, les interactions ganglionnaires dans le système cardiaque intrinsèque représentent la composante distale des boucles d'asservissement intrathoraciques imbriquées qui assurent la coordination réflexe rapide et appropriée des projections neuronales autonomes au cœur. Selon un tel concept, le système nerveux cardiaque intrinsèque agit comme un processeur distributif, afin d'assurer l'intégration des informations des voies efférentes parasympathique et sympathique au cœur en fonction des informations centripètes résultant d'axones sensoriels cardiaques.

Le système nerveux intrinsèque contient tous les composants nécessaires pour le traitement des informations nerveuses. Dans la partie suivante, nous allons discuter en détail de sa structure qui comprend des neurones afférents avec leurs axones sensoriels, des neurones efférents qui innervent le cœur et des neurones interconnecteurs aux neurones cardiaques afférents et efférents :

2.4.1. Les neurones afférents cardiaques :

La fonction des neurones moteurs qui innervent la substance du cœur dépend dans une large mesure de la capacité des neurones afférents situés dans les ganglions intrathoraciques extracardiaques (Armour 1986, Bosnjak et Kampine 1989, Horackova, Croll et coll. 1996) et dans les ganglions cardiaques intrinsèques . (Ardell, Butler et coll. 1991, Yuan, Ardell et coll. 1994, Arora, Waldmann et coll. 2003) Certains neurones cardiaques intrinsèques projettent des axones non seulement dans le même plexus ganglionnaire (Skok Tokyo, 1973), mais aussi vers d'autres plexus ganglionnaires. (Gray, Johnson et coll. 2004) De telles projections contribuent sans doute à la capacité des neurones en un locus intrathoracique d'exercer un contrôle sur des régions auriculaires très divergentes (Page, Dandan et coll. 1995) ainsi qu'aux régions ventriculaires. (Yuan, Ardell et coll. 1993)

2.4.2. Les neurones efférents cardiaques :

Le système nerveux central contrôle les myocytes cardiaques et les vaisseaux coronaires à travers ses neurones post-ganglionnaires efférents sympathiques et parasympathiques. (Feigl 1998) Même si ces deux branches efférentes du système nerveux autonome ont des actions réciproques (Loffelholz et Pappano 1985), les fonctions efférentes sympathique et parasympathique peuvent être stimulées ou supprimées simultanément. (Kollai et Koizumi 1979) Un traitement neuronal complexe est fait par plusieurs neurones post-ganglionnaires efférents localisés dans chacune des parties du système nerveux cardiaque intrinsèque pour exercer un contrôle sur des régions discrètes à travers le cœur.(Yuan, Ardell et coll. 1993)

2.4.2.1. Les neurones efférents préganglionnaires parasympathiques :

En 1984, l'anatomie des corps cellulaires des neurones efférents préganglionnaires parasympathiques était identifiée (McAllen et Spyer 1976, Hopkins et Armour 1984). Ils sont situés principalement dans la région ventrale latérale du noyau ambigu, de même que dans le noyau dorsal moteur et la zone intermédiaire entre les deux noyaux médullaires. (Cheng, Powley et coll. 1999) Il a été proposé que les neurones moteurs cardiaques situés dans le noyau dorsal moteur sont principalement responsables de la régulation inotrope cardiaque, tandis que ceux du noyau ambigu peuvent être principalement actifs sur la régulation de la fréquence cardiaque (Gatti, Johnson et coll. 1995). Les corps cellulaires des neurones préganglionnaires projettent des axones à des neurones efférents post-ganglionnaires parasympathiques situés dans les différents plexus ganglionnaires auriculaires ou ventriculaires. (Plecha, Randall et coll. 1988)

2.4.2.2. Les neurones efférents préganglionnaires sympathiques :

Les neurones efférents préganglionnaires sympathiques de la moelle épinière entre les segments T1-T4 font synapse avec les neurones post-ganglionnaires efférents sympathiques cardiaques (Norris, Lippincott et coll. 1977). Ces derniers sont détectés parmi plusieurs plexus ganglionnaires notamment dans les deux ganglions cervicaux supérieurs et intermédiaires, ainsi qu'aux pôles crâniens des ganglions stellaires. De même, ils sont également situés au niveau des ganglions médiastinaux qui se trouvent à côté du cœur. (Hopkins et Armour 1984) En plus, ils se retrouvent dans chaque grand plexus neuronal du système nerveux cardiaque intrinsèque. (Moravec et Moravec 1987, Horackova, Armour et coll. 1999)

Les corps cellulaires des neurones post-ganglionnaires sympathiques dans chaque plexus ganglionnaire cardiaque intrinsèque projettent leurs axones dans des régions étendues du cœur (Hopkins et Armour 1984). Un tel arrangement anatomique assure que le corps cellulaire des neurones efférents post-ganglionnaires sympathiques situés dans un locus ganglionnaire intrathoracique peut influencer largement des régions cardiaques divergentes. Cette divergence est démontrée lors des changements fonctionnels apportés au nœud sinusal ou au nœud AV. (Hou, Scherlag et coll. 2007) En parallèle, il est signalé que des changements de forme d'onde unipolaire suivent des configurations spatiales distinctes, selon le plexus ganglionnaire stimulé. (Cardinal, Pagé et coll. 2009) Ceci suggère que le raccourcissement des intervalles de repolarisation ventriculaire peut se produire en réponse à l'activation des neurones efférents adrénergiques situés dans le système nerveux cardiaque intrinsèque.

2.4.3. Les neurones intrathoraciques de circuit local :

Par définition, un neurone de circuit local est un neurone multipolaire qui établit de multiples connexions entre un réseau afférent et un réseau efférent. Ce terme a été d'abord utilisé pour décrire certains neurones dans l'hippocampe qui projettent sur d'autres neurones dans les régions divergentes des mêmes structures. (Hamos, Van Horn et coll. 1985) Dans le contexte du système cardiovasculaire, les corps cellulaires de nombreux neurones dans les ganglions intrathoraciques, y compris ceux sur le cœur, projettent des axones sur d'autres neurones dans le même ganglion. D'autres projettent des axones vers des neurones situés dans des ganglions intrathoraciques différents (JA 1991). Ces données impliquent la présence de traitement de l'information localement dans le cadre du système nerveux cardiaque intrinsèque. Ces interconnexions à l'intérieur de système nerveux cardiaque intrinsèque rendent la puissance du

traitement supérieure à celui effectué par des neurones individuels pour influencer les propriétés cardiodynamiques.

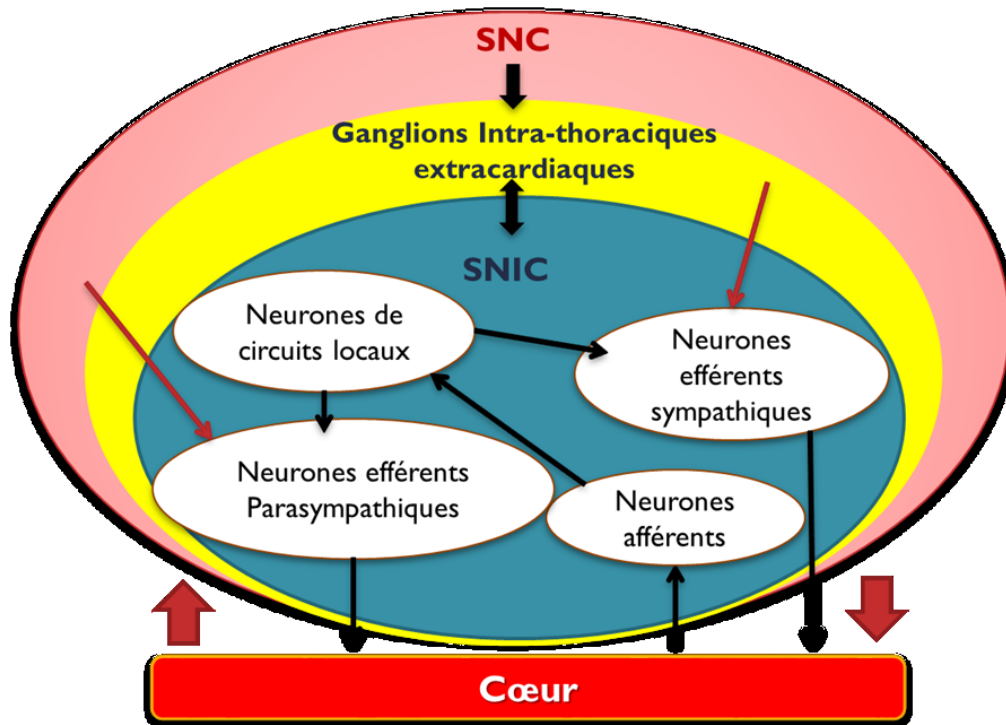


Figure 6 :

Le **SNCI (système nerveux cardiaque intrinsèque)** comprend les corps cellulaires de neurones : efférents parasympathiques, efférents sympathiques, afférents, et neurones de circuit local s'interposant entre les neurones afférents et efférents. Il y a ainsi possibilité de constituer une activité réflexe complète à l'intérieur du SNCI lui-même. Toutefois, ce système s'insère aussi à l'intérieur d'une hiérarchie de contrôle cardiovasculaire, et les neurones du SNCI interagissent avec : les neurones des **ganglions thoraciques (jaune)** comme les stellaires et les neurones de **la moelle épinière (rose)** et du bulbe rachidien.

2.5. L'importance du système nerveux cardiaque intrinsèque :

L'activation de certaines populations de neurones efférents cholinergiques qui innervent soit le nœud sinusal ou le nœud AV peut supprimer la fréquence cardiaque ou la transmission nodale, respectivement. Bien qu'il ait été rapporté que les neurones du plexus ganglionnaire dans l'oreillette droite projettent à proximité du nœud SA, tandis que ceux qui forment le plexus ganglionnaire inférieur à la veine cave inférieure projetteraient uniquement au nœud AV (Chiou et Zipes 1998, Zhang, Mowrey et coll. 2002), les neurones efférents cholinergiques ganglionnaires qui contrôlent le nœud SA ou la fonction du nœud AV sont situés tout au long du système nerveux cardiaque intrinsèque . (Yuan, Ardell et coll. 1993) Ainsi, la conduction nodale retardée du nœud AV peut amener à stabiliser la fréquence ventriculaire en présence de tachycardie auriculaire par l'activation des neurones non seulement dans le plexus ganglionnaire de l'oreillette droite, mais aussi ceux d'autres plexus ganglionnaires.

La décentralisation aiguë (vagotomie bilatérale et stellectomie) peut réduire l'incidence des réponses chronotrope et inotrope à l'injection de nicotine, dans l'oreillette droite et dans les plexus ganglionnaires ventriculaires médiaux chez le chien. (Yuan, Ardell et coll. 1993) Ceci suggère que les neurones centraux pourraient être impliqués dans la production d'un sous-ensemble de ces réponses. En outre, les interactions neuronales qui se produisent dans le système nerveux cardiaque intrinsèque peuvent contribuer à la génération de réponses chronotropes et dromotropes indépendamment du système nerveux central. (Randall, Brown et coll. 2003, Hou, Scherlag et coll. 2007)

2.6. Les maladies qui peuvent être influencées par le contrôle du système nerveux cardiaque intrinsèque :

Le remodelage de la hiérarchie neuronale cardiaque pourra commencer ou aggraver une maladie cardiaque. Le remodelage des neurones cardiaques intrinsèques est une composante lors de l'évolution de l'insuffisance cardiaque (Cardinal, Nadeau et coll. 1996). Ce remodelage est présent même après l'élimination à long terme de leurs entrées de neurones centraux (Murphy, Thompson et coll. 2000), ce qui est confirmé par le fait que la transduction des barorécepteurs artériels réinitialise au cours de l'évolution de l'hypertension (Andresen et Yang 1989) ou durant l'insuffisance cardiaque (IH 1991). Lorsque l'apport sanguin artériel à certains des neurones du système cardiaque intrinsèque devient compromis, ces neurones peuvent résister à un tel dysfonctionnement, peut-être parce que la capacité de filtrage de cette population de neurones est relativement importante dû à la stabilisation faite par les neurones intrathoraciques de circuit local en présence d'un stress sensoriel excessif résultant d'une ischémie du myocarde (Armour 1996 a, Foreman, Linderth et coll. 2000). Comme suite à une réduction d'approvisionnement en sang artériel, le remodelage du système nerveux cardiaque intrinsèque survient en l'absence de dommages cellulaires et, à ce titre, il représente un changement d'état fonctionnel qui peut être par la suite récupéré. (Hopkins, Macdonald et coll. 2000) Par contre, les cardiomyocytes présentent des dommages ischémiques irréversibles.(AN. 2002)

2.6.1. L'ischémie myocardique régionale :

Lorsque les neurones de deuxième ordre dans la hiérarchie cardiaque neuronale réagissent à l'ischémie myocardique (Brown 1967, Recordati, Schwartz et coll. 1971), certains neurones peuvent devenir suffisamment activés pour influencer les neurones suprabulbaires (par exemple, le système limbique, l'hypothalamus) et augmenter les symptômes de l'ischémie. (Sylvén 1989)

Les neurones efférents préganglionnaires parasympathiques et sympathiques s'activent lorsque des populations suffisantes des neurones afférents cardiaques signalent l'ischémie myocardique aux neurones centraux. (Minisi et Thames 1993) L'ischémie myocardique déclenche des réflexes cardiaques dépresseurs ou facilitateurs, selon la façon dont les altérations dans le milieu cardiaque local sont transmises par les axes neuronaux. (Neely et Hageman 1990)

Le blocage des récepteurs β — adrénergiques ou des récepteurs de l'angiotensine pourrait également cibler certaines populations de neurones cardiaques intrathoraciques. (Farrell, Wei et coll. 2001, Tallaj, Wei et coll. 2003) Malgré une réduction de la teneur en noradrénaline ventriculaire chez les modèles canins de l'insuffisance cardiaque, les neurones efférents adrénergiques lorsqu'ils sont activés libèrent suffisamment de catécholamines dans le tissu interstitiel du myocarde (Tallaj, Wei et coll. 2003) afin d'améliorer la contractilité ventriculaire (Cardinal, Nadeau et coll. 1996). Cela est dû, en partie, à la rétention de la fonction de surface cellulaire des récepteurs β — adrénergiques des cardiomyocytes. (Laurent, Cardinal et coll. 2001)

Non seulement les cardiomyocytes possèdent-ils des récepteurs β — adrénergiques (HR. 1994), mais en plus les neurones intrathoraciques cardiaques en possèdent aussi. Ces derniers sont

également sensibles à l'angiotensine II, donc le blocage des récepteurs β — adrénergiques ou de l'angiotensine II pourrait affecter les neurones dans le système nerveux intrathoracique ce qui indique que ces thérapies partagent un objectif commun. (JA. 1991, Horackova et Armour 1997)

Par exemple, le blocage des récepteurs de l'angiotensine II réduit les influences sympathiques des neurones efférents sur le nœud SA et les ventricules, ce qui contribue en partie à la baisse concomitante de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. Ces thérapies minimisent le remodelage cardiaque au cours de l'évolution de l'insuffisance cardiaque. (Armour 2004)

2.6.2. Les arythmies cardiaques :

La genèse des arythmies cardiaques pourra être favorisée par l'activation des neurones du cortex insulaire au niveau central ou même au niveau des neurones du système nerveux cardiaque intrinsèque. Certaines populations des neurones efférents extracardiaques sympathiques et parasympathiques, lorsqu'ils sont activés au maximum, peuvent déclencher des arythmies auriculaires ou ventriculaires. (Randall et Armour 1974, René 1994) La fibrillation ventriculaire peut se produire lorsque suffisamment de neurones cardiaques intrinsèques sont activés, expérimentalement, par l'application locale de substances neurochimiques comme les agonistes adrénergiques, l'angiotensine II, ou même l'endothéline I. (Armour 1996 a, Armour 1996 b)

D'un point de vue thérapeutique, il peut être pertinent de limiter l'augmentation de l'activité neuronale cardiaque d'un myocarde ischémié. (Linderoth et Foreman 1999) Ainsi, l'inhibition des conséquences néfastes de l'activation de grandes populations de neurones cardiaques intrinsèques consécutives à l'ischémie ventriculaire pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique.

Parmi ces nouvelles pistes thérapeutiques, on peut citer la neuromodulation et plus spécifiquement la stimulation médullaire. Elle peut stabiliser les neurones de circuit local du système nerveux cardiaque intrinsèque afin d'atténuer les arythmies auriculaires médiées au niveau neuronal. (Gibbons, Southerland et coll. 2012) En plus, les interactions aléatoires des mêmes neurones peuvent contrôler les fonctions cardiaques régionales et leurs activations excessives précédant et persistant tout le long des épisodes de fibrillation auriculaire dans plusieurs modèles chez le chien. (Schauerte, Scherlag et coll. 2001) En outre, la stimulation à haute fréquence électrique de ganglions autonomes dans la zone de la veine pulmonaire a conduit à des épisodes de fibrillation auriculaire et de tachycardie auriculaire qui peuvent être inhibées par le blocage pharmacologique à la fois sympathique et vagal chez le chien.(Beaumont, Salavatian et coll. 2013)

Chapitre 3 - La nicotine

La nicotine est un agoniste de certains récepteurs à ACh, d'où vient la nomenclature « les récepteurs nicotiniques ». La transmission ganglionnaire dans les neurones périphériques autonomes est médiée par ces récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR). Ce type de récepteurs est à la fois activé et désensibilisé par la nicotine. (Fee, Randall et coll. 1987)

Il était connu dès 1907 que la nicotine produit des contractions toniques de certains muscles de grenouille et que ces contractions sont abolies par le curare. (Langley 1907) Au niveau cardiaque, il est bien noté que l'introduction de la nicotine exogène induit une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle ; ceci est associé à une augmentation des concentrations plasmatiques de catécholamines. Les effets cardiovasculaires de la nicotine évoqués par l'inhalation de fumée de tabac sont médiés par l'activation sympathique, puisqu'ils sont nettement atténués par les bloquants adrénergiques alpha et bêta. (Cryer, Haymond et coll. 1976)

3.1. Structure et composition des récepteurs nicotiniques :

En 1982, les nAChR ont été purifiés, clonés et caractérisés au niveau moléculaire comme récepteur-canal ionique. (Noda, Takahashi et coll. 1982, Claudio, Ballivet et coll. 1983) Ils possèdent une structure pentamérique et transversent la membrane cellulaire neuronale. Leurs structures sont composées de cinq sous-unités (une combinaison des sous-unités α , β , γ et δ) ; cette combinaison varie selon le type des nAChRs. Les sous-unités du nAChR sont disposées autour d'un axe pseudosymétrique perpendiculaire au plan de la membrane, formant un pore central qui possède les propriétés d'un canal cationique. Le canal possède une sélectivité

relativement faible pour les ions. Cette cavité empêche, en absence d'activation des récepteurs, le passage des cations. Lorsque le récepteur se lie à deux molécules d'ACh, un changement de conformation est fait, induisant la rentrée des cations, tels que le sodium, dans le cytosol (état actif); ensuite les nAChRs deviennent « désensibilisés » (temporairement inactifs). Cette désensibilisation se résorbe après le retrait de l'agoniste.

Il fut possible d'obtenir une structure en trois dimensions de ce récepteur, en faisant la moyenne des plusieurs images obtenues par la microscopie électronique des cristaux tubulaires des membranes post-synaptiques de l'organe électrique du poisson *Torpedo*. Selon cette structure, les nAChRs sont des pentamères dont la structure détaillée sera discutée plus loin dans ce chapitre. (voir figure 7) (Miyazawa, Fujiyoshi et coll. 1999)

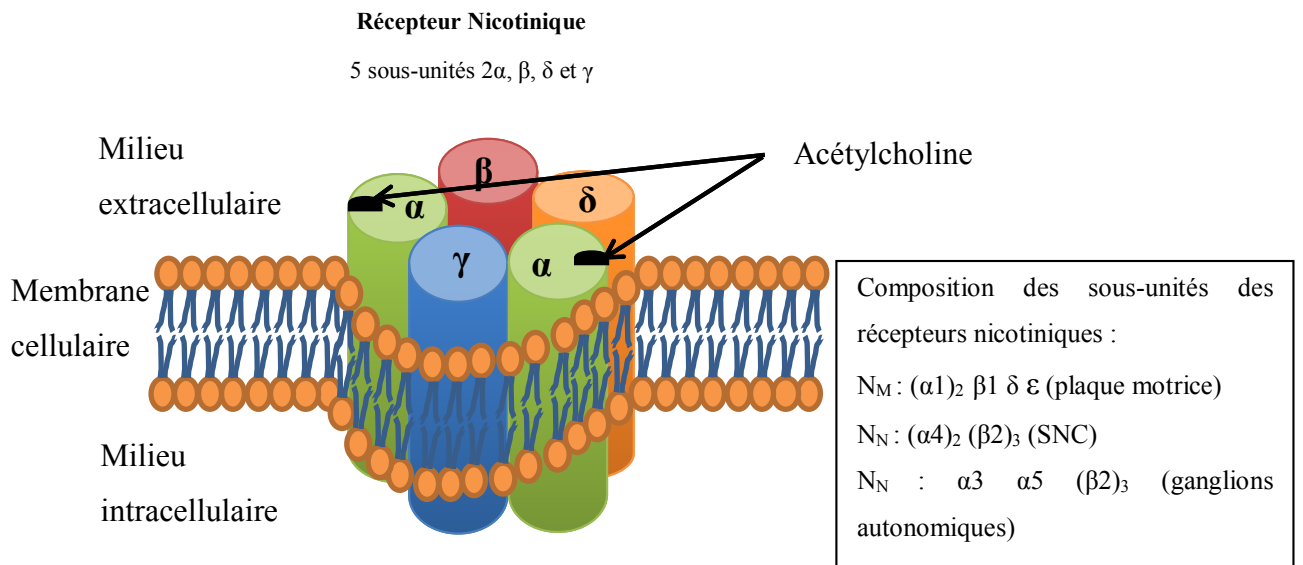


Figure 7 :

Dessin schématique montrant la composition des récepteurs nicotiniques, ses sous-unités

3.2. Les types, formes et sous-unités des récepteurs nicotiques (nAChR):

Il est bien noté que les nAChRs appartiennent à la grande famille des récepteurs canaux membranaires (LGIC1 ou Ligand Gated Ion Channel). (Ortells et Lunt 1995) Ils sont constitués de différentes sous-unités. Dix-sept gènes et plus qui encodent des sous-unités pour les nAChRs musculaires et neuronaux ont été clonés chez les vertébrés. Ces récepteurs ont été détectés dans les neurones du système nerveux central et périphérique et, en outre, dans plusieurs types de cellules non neuronales, y compris les fibres musculaires squelettiques. (Brehm et Henderson 1988) Dans le muscle squelettique, ce récepteur est classé en deux types, le premier est le type de la jonction neuromusculaire composé des sous-unités α , β , δ et ϵ , tandis que l'autre est un type extrajonctionnel, dans lequel une sous-unité γ remplace la sous-unité ϵ . (Brehm et Henderson 1988) En revanche, les types de nAChRs neuronaux sont constitués de différents arrangements des sous-unités $\alpha 2$ - $\alpha 10$ et $\beta 2$ - $\beta 4$. (voir figure 7) (Lukas, Changeux et coll. 1999)

3.3. Les sous-types de nAChRs dans le cœur et le système cardiaque intrinsèque :

Les différents sous-types de nAChRs peuvent contrôler les réponses opposées évoquées par la nicotine dans la préparation de cœur isolé de rat, surtout lorsque l'on considère que les neurones cardiaques intrinsèques de rat expriment la plupart des sous-unités du nAChR identifiées à ce jour. (Poth, Nutter et coll. 1997)

De même, la réponse biphasique à la nicotine pourra être médiée, dans sa phase initiale de la diminution de la fréquence cardiaque, par l'activation de la sous-unité $\alpha 7$ des nAChRs situés sur les neurones cholinergiques du système cardiaque intrinsèque, alors que l'augmentation subséquente de la fréquence cardiaque pourra être médiée par l'activation de la sous-unité $\beta 4$

des nAChRs dans les neurones sympathiques ou dans les neurones adrénérgiques du système nerveux cardiaque intrinsèque. (Westfall et Brasted 1972, Marano, Ramirez et coll. 1999)

3.4. Fonctionnement des récepteurs nicotiques :

Généralement, les nAChR sont des transducteurs rapides de signaux activés par la libération de l'ACh, ou par l'application directe de la nicotine. (Changeux 1990, Karlin 1993, Ortells et Lunt 1995, Lindstrom, Anand et coll. 1996) Chaque sous-unité α est indispensable au fonctionnement des nAChRs, car elle porte le site de fixation de l'ACh. Le reste des sous-unités (sauf α) sont nécessaires aussi pour leur contribution à la liaison de ces ligands. Chez les mammifères, la sous-unité ϵ remplace la sous-unité γ dans la forme adulte du récepteur, et ce remplacement est accompagné d'un changement dans les propriétés du canal. (voir figure 7) (Duclert et Changeux 1995)

Les nAChRs sont des récepteurs canaux situés au niveau des synapses cholinergiques. Ils sont en concurrence avec l'AChE afin de réguler l'intensité et la durée du signal. En effet, l'influx nerveux circulant dans les nerfs présynaptiques provoque une libération soudaine d'une forte concentration d'ACh dans la synapse cholinergique. Cet ACh se lie au nAChR, et provoque l'activation du récepteur. Suite à cette activation, un changement de conformation structurale est induit, provoquant l'ouverture du canal des nAChRs. La membrane post-synaptique devient temporairement perméable aux cations. L'influx sodique accompagné par la sortie potassique provoque la dépolarisation de la membrane et la propagation du signal nerveux. Comme suite au contact continu des nAChRs avec l'ACh, un état de désensibilisation des récepteurs est produit. (Voir figure 8) De tout ce qui précède, on pourra conclure qu'il y a trois états différents des nAChRs : premièrement un état de repos où les récepteurs sont fermés, suivis par un état

actif où les récepteurs sont ouverts par liaison de l'ACh et enfin un état désensibilisé où les récepteurs sont non sensibles à l'ACh.

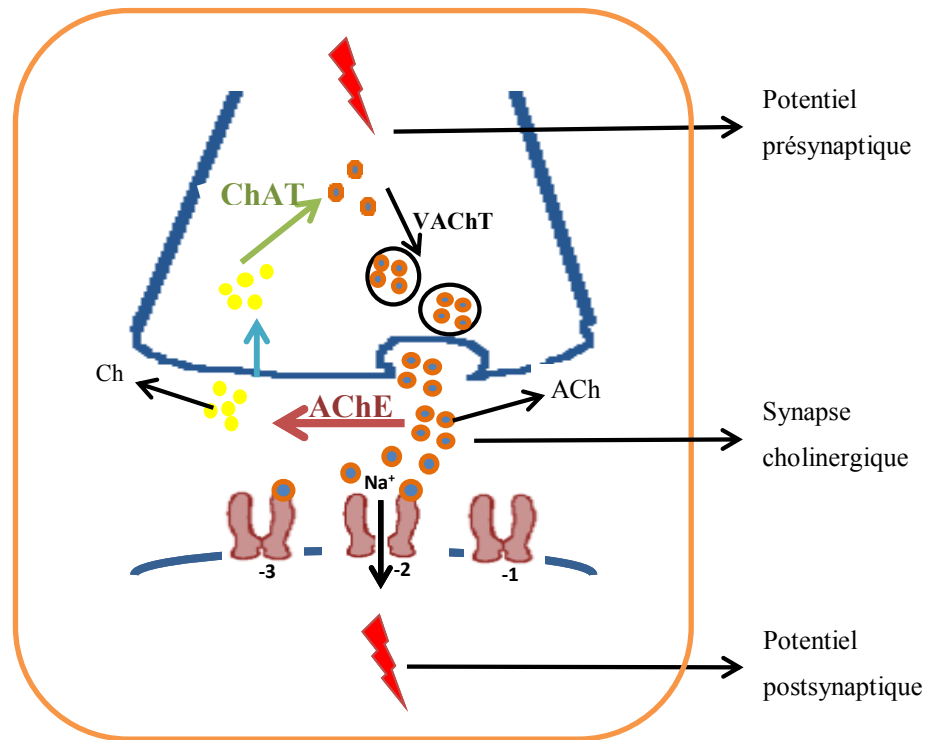


Figure 8 :

Schéma qui montre l'activation des nAChRs par la liaison d'ACh libérée par le potentiel présynaptique, la dégradation d'ACh en Ch (choline) par l'AChE, (acétylcholinestérase) et la recapture de la Ch, suivie par la synthèse d'ACh par ChAT (choline acétyltransférase), et sa stockage par VAChT (transporteur vésiculaire d'ACh) et les numéro 1,2 et 3 sont les différents états des nAChRs d'être respectivement inactif ou fermer, active et désensibilisé .

Schéma modifié de (Changeux, Galzi et coll. 1992)

3.5. La topologie des récepteurs nicotiniques :

Chacune des cinq sous-unités formant le nAChR est composée d'un grand domaine extracellulaire (avec l'extrémité N terminale), suivi de quatre segments transmembranaires (M1-M4), interconnectés entre (M1 - M3) et (M3 - M4) par de petites boucles avec un domaine intracytoplasmique variable contenant les sites de phosphorylation, et un quatrième segment transmembranaire (M4) porte l'extrémité C terminale dans la fente synaptique. Les cinq sous-unités sont assemblées en pentamères autour d'un canal ionique central. (Voir figure 9) (Devillers-Thiery, Giraudat et coll. 1983, Popot et Changeux 1984)

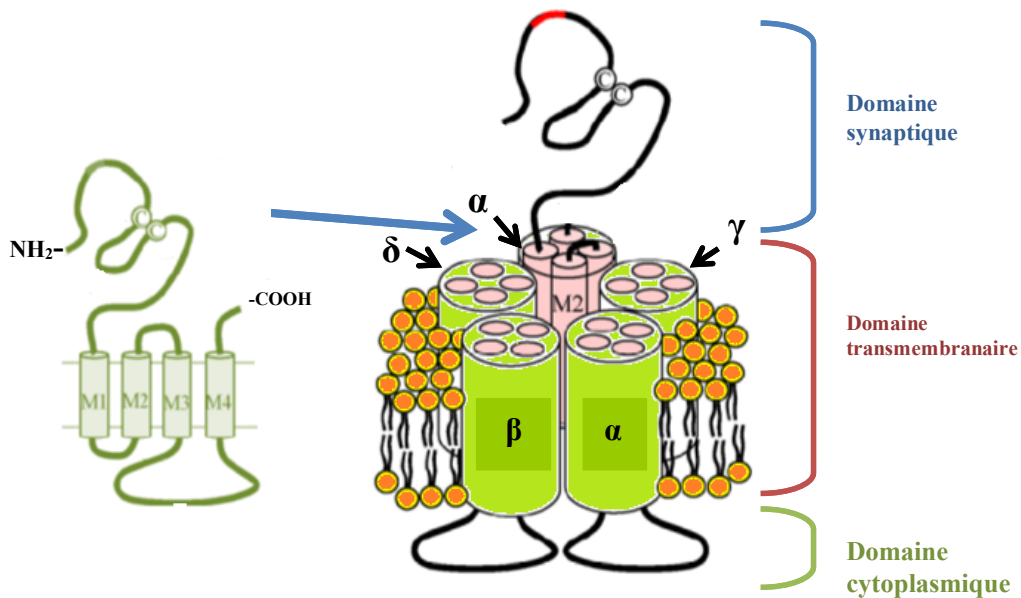


Figure 9 :

Dessin schématique pour montrer l'organisation des cinq sous-unités (α , β , δ , et γ ou ϵ), avec le canal ionique par lequel transitent les cations. Chaque sous-unité contient un domaine synaptique, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui contient les sites de phosphorylation.

Schéma modifié de <http://www.neur-one.fr/>

3.6. Contrôle et blocage des récepteurs nicotiniques :

Plusieurs sites pharmacologiques sont déterminés sur les récepteurs nicotiniques selon leurs modes d'action. La diversité des agonistes et antagonistes avec de nombreuses actions de plusieurs éléments ou ions sur les nAChRs sont discutés dans cette partie afin de comprendre l'importance des nAChRs.

3.6.1. Les agonistes des récepteurs nicotiniques et leurs sites d'adhésion :

3.6.1.1. Le site d'agoniste endogène : nommé site d'ACh puisqu'il est leur agoniste endogène. De même les autres agonistes peuvent activer ce site sur les nAChRs, comme la nicotine (en faible dose); quelques antagonistes compétitifs comme le d-tubocurarine peuvent se lier à ce site. Ce site se trouve dans la partie N-terminale synaptique du récepteur sur l'interface de deux sous-unités; une sous-unité principale (α) et une autre sous-unité complémentaire (β , δ , γ ou ϵ pour les nAChRs musculaires, β pour les nAChRs neuronaux).

3.6.1.2. Les agonistes allostériques : ils agissent sur un autre site de liaison différent de celui de l'ACh et ils sont capables d'activer les nAChRs. Ce site a été découvert en 1985 en étudiant l'action de l'ésérine (nommée encore physostigmine). (Shaw, Aracava et coll. 1985) L'ésérine est connue comme un inhibiteur de l'AChE, mais elle peut se fixer sur le nAChR dans un site distinct du site de l'ACh et induit des courants ioniques. (Neubig et Cohen 1980, Pascuzzo, Akaike et coll. 1984, Okonjo, Kuhlmann et coll. 1991) Les

courants induits par l'ésérine ne sont pas inhibés par les antagonistes compétitifs comme le d-tubocurarine. (Shaw, Aracava et coll. 1985) Notamment, l'ésérine est même capable d'induire des courants sur le récepteur désensibilisé.(Kuhlmann, Okonjo et coll. 1991) D'autres ligands comme le benzoquinonium, la galantamine et la codéine semblent avoir les mêmes propriétés que l'ésérine. (Storch, Schrattenholz et coll. 1995, Atkinson, Baguet et coll. 2011, Kita, Ago et coll. 2014) Il est bien important de noter que hors d'exposition aux fortes concentrations, ces ligands inhibent les nAChRs en agissant comme des bloqueurs non compétitifs. (Zwart, van Kleef et coll. 2000) Le site ésérine possède deux sites de liaison par récepteur, localisés dans la partie N-terminale extracellulaire des nAChRs. (Schrattenholz, Godovac-Zimmermann et coll. 1993) Il semble également possible que la sérotonine puisse se fixer à ce site et y agir comme antagoniste non compétitif, pour réguler ainsi de manière endogène les nAChRs (Schrattenholz, Pereira et coll. 1996).

3.6.2. Sites des bloqueurs non compétitifs :

Le site d'adhésion de ces bloqueurs diffère selon leur affinité. A haute affinité, ils peuvent inhiber le récepteur en bloquant le passage des ions de manière stérique. Les autres sites de basse affinité sont localisés à l'interface lipide-protéine et bloquent le canal de manière allostérique, comme la chlorpromazine et la phencyclidine (Heidmann et Changeux 1984)

3.6.3. Ions, peptides et hormones impliqués dans le contrôle des récepteurs nicotiques :

3.6.3.1. **Le Calcium** : Une caractéristique importante des nAChRs neuronaux est l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire évoquée par l'ACh indépendamment des canaux calciques voltage-dépendants. (Mulle, Choquet et coll. 1992) Il est noté que les ions calcium peuvent se lier avec grande affinité aux nAChRs, jusqu'à 45 ions/récepteur. (Neumann et Chang 1976) Les ions de calcium potentialisent la réponse physiologique des nAChRs neuronaux en augmentant l'amplitude des courants ioniques, l'affinité apparente des agonistes et la coopérativité. (Mulle, Lena et coll. 1992, Vernino, Amador et coll. 1992)

3.6.3.2. **Le zinc** : les ions du zinc sont récemment reconnus comme des modulateurs endogènes ; ils sont capables de moduler l'activité des récepteurs qui contiennent des boucles de cystéine, malgré que leurs sites d'action sur les nAChRs demeurent inconnus.(Hsiao, Mihalak et coll. 2006, Hsiao, Mihalak et coll. 2008)

3.6.3.3. **Les stéroïdes** : Les hormones stéroïdes et leurs métabolites représentent une grande famille de molécules avec divers effets modulateurs allostériques sur les nAChRs. (Rupprecht et Holsboer 1999) Ils sont reconnus pour leur capacité d'inhiber les nAChRs neuronaux.(Ke et Lukas 1996, Paradiso, Sabey et coll. 2000) L'action des stéroïdes ne semble pas se produire via le bloc du canal ouvert du récepteur (Valera, Ballivet et coll. 1992), mais serait

probablement due à son installation dans l'interface lipide-protéine du segment M₄.(Bouzat et Barrantes 1996) En outre, l'hormone stéroïdienne estradiol semble être capable de potentialiser les nAChRs en se liant spécifiquement à la sous-unité $\alpha 4$.(Curtis, Buisson et coll. 2002)

3.6.3.4. **L'ATP** : l'ATP peut se lier aux nAChRs, sur un site de liaison déterminé, identifié par marquage de photoaffinité, situé dans la région extracellulaire de la sous-unité - β dans l'organe électrique du poisson *Torpedo*.(Schrattenholz, Roth et coll. 1997) L'ATP agit comme un potentialisateur des nAChRs. Il produit cet effet soit en agissant comme un agoniste des nAChRs de type musculaire, ou en modulant la sensibilité des récepteurs envers leur agoniste. Notamment, ceci est basé sur les résultats démontrant que l'application d'ATP produit une augmentation de 2 à 3 fois de l'affinité des nAChRs pour l'ACh.(Igusa 1988, Mozrzymas et Ruzzier 1992)

3.6.4. L'action des neuropeptides sur les récepteurs nicotiques :

Il y a peu d'information jusqu'à ce jour sur l'implication des neuropeptides sur les nAChRs. Quelques recherches ont testé l'effet indirect de plusieurs neuropeptides, comme le peptide intestinal vasoactif (VIP) et la substance P, de potentialiser les courants induits par l'ACh sur le nAChR. Le VIP augmentant l'affinité des agonistes via le changement des signaux de transduction faisant intervenir la protéine G,(Margiotta et Pardi 1995, Gardner et Liu 2001) tandis que la substance P est capable de potentialiser la liaison de l'ACh sur le récepteur (Min et Weiland 1993) et d'inhiber les nAChRs neuronaux.(Simasko, Durkin et coll. 1987).

Chapitre 4 - La Galanine

4.1. La découverte de la galanine :

Le neuropeptide galanine est un peptide formé de 29 acides aminés, isolé initialement à partir de l'intestin de porc (Tatemoto, Rokaeus et coll. 1983), mais plus tard dans de nombreuses autres espèces. Les segments N-terminaux de 1-15 acides aminés sont fortement conservés, même dans la structure de la galanine humaine qui est composée de 30 acides aminés. (Evans et Shine 1991)

4.2. Les récepteurs de la galanine :

Trois récepteurs de galanine sont caractérisés pharmacologiquement, appelés respectivement GalR1, GalR2 et GalR3, et identifiés par clonage moléculaire.(Branchek, Smith et coll. 2000) Les trois sous-types de récepteurs de la galanine sont membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ; pourtant ils possèdent des différences très importantes dans leurs couplages fonctionnels et leur activité ultérieure de signalisation, ce qui contribue à la diversité des effets physiologiques possibles de la galanine. Les voies de signalisation des différents sous-types de récepteurs de galanine sont décrites dans la figure 10.

Le GalR1 était le premier récepteur de la galanine à être cloné à partir de cellules de mélanome de Bowes en 1994(Habert-Ortoli, Amiranoff et coll. 1994), alors que GalR2 et GalR3 ont d'abord été clonés à partir de l'hypothalamus de rat en 1997.(Howard 1997, Smith 1997b)

4.2.1. Les récepteurs GalR1 :

Les études pharmacologiques ont démontré que la stimulation des récepteurs GalR1, clonés chez le rat ou les humains et exprimés dans des lignées cellulaires transfectées, inhibe la production d'AMPC stimulée par la forskoline. L'activation de GalR1 exprimé dans des cellules de carcinome épidermique induit une forte activation prolongée d'ERK 1/2 (Kanazawa, Iwashita et coll. 2007). La liaison de la galanine à GalR1 conduit à l'internalisation des récepteurs transfectés dans des cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO), qui peut être un mécanisme de régulation de la cascade de signalisation endogène dans les cellules sauvages. (Wang, Hashemi et coll. 1998)

4.2.2. Les récepteurs GalR2 :

Les récepteurs GalR2 provoquent leurs signaux par l'intermédiaire de plusieurs classes de protéines G et par stimulation de plusieurs voies intracellulaires. La voie la plus fréquemment rapportée est celle qui implique l'activation de la phospholipase-C (PLC), ce qui augmente l'hydrolyse du phosphatidylinositol, la libération de Ca^{+2} de ses réserves intracellulaires dans le cytoplasme et l'ouverture des canaux calciques. Ces effets intracellulaires ne sont pas affectés par la toxine pertussique (PTX), ce qui démontre que GalR2 peut agir sur les protéines de type $G_{q/11}$. (Fathi, Cunningham et coll. 1997)

Les récepteurs GalR2 sont également capables d'activer les MAPK à travers une classe de PKC et des protéines G / $G_{\alpha 0}$. (Wang, Hashemi et coll. 1998) Cela peut à son tour entraîner la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB) PI3K-dépendante conduisant à la suppression de l'activité de la caspase-3 et de la caspase-9. (Ding, MacTavish et coll. 2006) L'activation de

GalR2 peut également inhiber la production de cAMP stimulée de manière PTX-sensible par la forskoline, ce qui suggère l'activation d'autres types de protéines G comme le $G_{\alpha i / \alpha o}$. (Wang, Hashemi et coll. 1997) Par conséquent, l'activation à la fois de GalR1 et GalR2 peut inhiber la protéine CREB. (Badie-Mahdavi, Lu et coll. 2005)

4.2.3. Les récepteurs GalR3 :

Les récepteurs de la galanine de type 3 (GalR3) ont d'abord été isolés dans les banques de cADN de l'hypothalamus chez le rat et plus tard à partir de cADN humain. La répartition des GalR3 est un peu floue, mais on suppose que ce récepteur a un profil d'expression plus restreint par rapport aux deux autres récepteurs. Les niveaux de transcription sont les plus importants dans l'hypothalamus (Mennicken, Hoffert et coll. 2002) bien que dans certaines études, les auteurs rapportent une plus large diffusion des GalR3 dans les tissus centraux et périphériques. (Waters et Krause 2000) Les propriétés de signalisation de GalR3 sont encore mal définies. L'activation de GalR3 conduit à l'activation de la protéine $G_{i/o}$ et une activation sensible à la PTX des courants K^+ dans des ovocytes de *Xenopus*. (Smith, Walker et coll. 1998) La participation d'une protéine G de type G_i dans la signalisation des récepteurs GalR3 est également soutenue par des études avec GalR3 humain transfecté dans des mélanophores de *Xenopus*. (Kolakowski, O'Neill et coll. 1998)

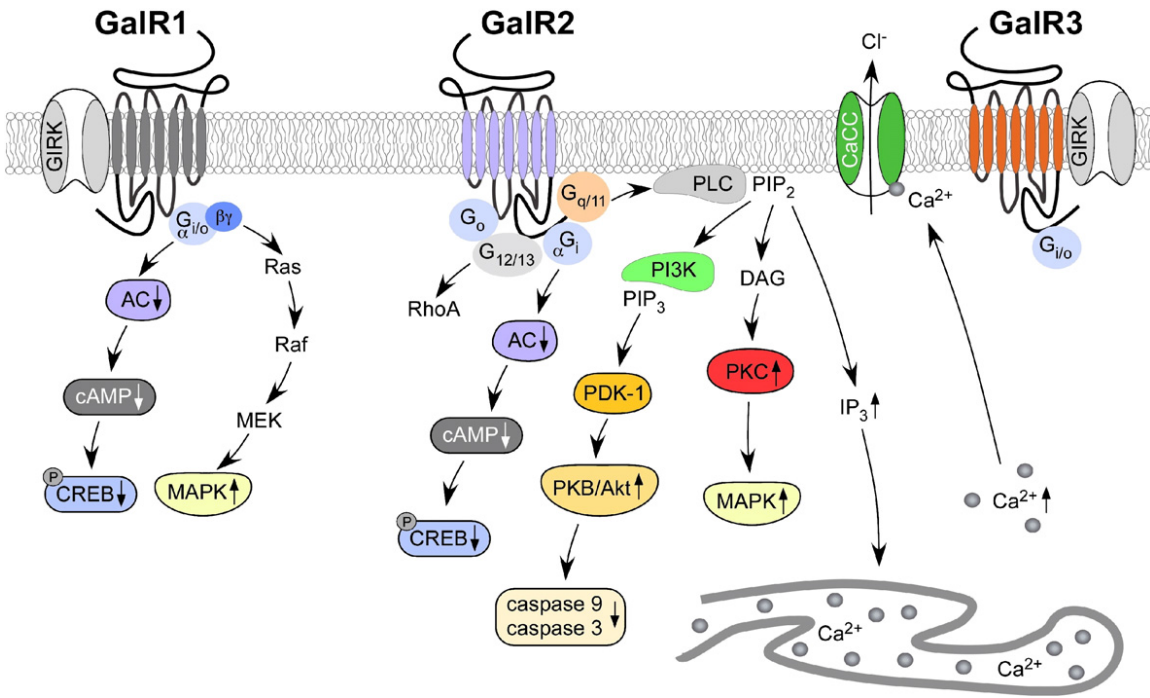


Figure 10 :

Les voies de signalisation de sous-types de récepteurs de galanine. Abréviations: AC, l'adénylate cyclase; CaCC, canal chlorure Ca²⁺dépendant; AMPc, 3', 5'-adénosine monophosphate cyclique; (p) CREB, (phosphorylé) protéine de liaison de l'élément de réponse à l'AMPc; DAG, diacylglycérol; IP₃, l'inositol triphosphate; MEK, kinase induite par la mtogène extracellulaire ; PDK-1, phosphoinositide dépendant de la protéine-kinase 1; PIP₂, bisphosphate de phosphatidylinositol; PIP₃, phosphatidylinositol triphosphate; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKB, protéine kinase B; PLC, la phospholipase C

(Lang, Gundlach et coll. 2007)

4.3. Les ligands natifs et synthétiques de la galanine :

4.3.1. Les peptides natifs de la galanine :

Des études de déplacement avec galanine-[I¹²⁵] ont démontré une affinité approximativement égale de la galanine de rat (1-29), porcine (1-29), et humaine (1-30) pour les récepteurs GalR1 endogènes exprimé dans les cellules de mélanome de Bowes, ainsi que pour ceux clonés chez le rat et même pour le GalR1 humain exprimés dans les lignées cellulaires d'origine différentes. GalR2 a montré une affinité similaire à celle de GalR1 pour la galanine de rat, de porc, et la galanine humaine. Toutefois, en comparaison avec GalR1 et GalR2, l'affinité de la galanine de rat et d'humain pour GalR3 est plus faible.

4.3.2. Les fragments agonistes de galanine :

Les trois récepteurs de galanine caractérisés révèlent une forte affinité pour le peptide galanine endogène. Les fragments du peptide galanine (tableau 1), la galanine (1-16) et la galanine (1-15) ont montré une efficacité pour l'activation de GalR1 et GALR2, mais avec moins d'affinité pour GalR3, démontrant ainsi la faible importance du segment C-terminal des acides aminés de la galanine au-delà des positions 15-16 pour l'affinité envers le récepteur galanine. La galanine (1-12) a une affinité transitoire relativement élevée pour les récepteurs humains GalR2, tandis que le retrait supplémentaire de 2 acides aminés conduit à une perte d'activité. En revanche, la galanine (1-10) inhibe efficacement la liaison de la [I¹²⁵]-galanine aux récepteurs de galanine exprimés dans les cellules musculaires lisses gastriques. Il n'est pas encore prouvé si d'autres fragments avec N-terminaux ou C-terminaux plus courts peuvent montrer une grande affinité.

4.3.3. Les peptides chimériques antagonistes :

Les rôles pharmacologiques et physiologiques des trois récepteurs de galanine ont été difficiles à définir en raison de l'absence de ligands sélectifs des sous-types de ces récepteurs. Plusieurs ligands chimériques, non spécifiques, de hautes affinités ont été synthétisés à partir de la galanine (1-13) tel que le C7 [galanine (1-13) — spantide I], le M15 ou la galantine [galanine (1-13) — SP (5-11)], le M35 [galanine (1-13) — bradykinine (2-9)], et le M40 [galanine (1-13) — Pro-Pro — (Ala-Leu)₂-Ala-amide]. (Langel, Land et coll. 1992, Xu, Wiesenfeld-Hallin et coll. 1995, Fitzgerald, Patterson et coll. 1998)

Récemment, une version modifiée du peptide chimérique M35, appelée le M617 [galanine (1-13) — Gln14-bradykinine (2-9) amide], est rapportée comme un nouveau ligand sélectif avec une affinité 25 fois plus élevée pour le GalR1 que pour le GalR2. (Lundstrom 2005) (tableau 1)

4.3.4. Les agonistes non peptidiques :

Sur la base des pharmacophores principaux de galanine impliqués dans l'interaction avec le récepteur, deux petites molécules ont été conçues comme agonistes des récepteurs de la galanine (tableau 1). Le galnon et le galmic ont été synthétisés, respectivement, en utilisant un échafaudage tripeptomimétique (Saar, Mazarati et coll. 2002), ou un échafaudage oxazole. (Bartfai, Lu et coll. 2004) Les composés, contrairement aux analogues de la galanine, ont une action systémique et sont plus résistants contre la dégradation. Cependant, l'affinité pour le récepteur est relativement faible et le ligand est observé au niveau des récepteurs supplémentaires, ce qui a considérablement limité leur utilisation. (Lu, Lundstrom et coll. 2005)

4.3.5. Les antagonistes non peptidiques :

La spirocoumaranone (202 596 Sch) (Chu 1997) et plus tard le dithiepine-1, 1, 4,4- tétroxyde (Scott 2000), ont été les premiers des antagonistes non peptidiques rapportés agir sur le récepteur de galanine (tableau 1). Les composés ont une faible affinité, une faible solubilité et leur nature chimique est active, ce qui pourrait expliquer le manque d'optimisation des composés et l'évaluation de systèmes modèles différents d'un point de vue thérapeutique. L'introduction récente d'un certain nombre de composés de haute affinité avec une sélectivité pour GalR3 est susceptible de devenir une étape importante dans la recherche de ligands de récepteurs galanine sélectifs à un sous-type. Deux composés, SNAP-398299 et SNAP-37889, sont à l'étude comme des antagonistes avec une affinité et une sélectivité élevées pour GalR3.(Swanson, Blackburn et coll. 2005)

Tableau 1 : Les ligands fréquemment utilisés pour les récepteurs de la galanine et leurs valeurs de K_i (en nM)

Ligands	K_i (nM)			Référence
	GALR1	GALR2	GALR3	
Ligands peptidique :				
Galanine porcine (1-29)	0.23(h)	0.95(h)	9.8(h)	Borowsky et al.1998
Galanine de rat (1-29)	0.3(h)	1.6(h)	12(h)	Borowsky et al.1998
Galanine humaine (1-30)	0.4(h)	2.3(h)	69(h)	Borowsky et al.1998
Gal (1-16)	4.8	5.7	50	Wang et al. 1997
Gal (2-29)	85	1.9	12	Wang et al. 1997
Gal (1-29) D-Trp ²	407	28	>1000	Smith et al.1998
GALP	4.3	0.24	--	Ohtaki et al.1999
Gal (2-11)	>5000(h)	88	271	Lu et al.2005
	879 ¹ (h)	1.8 ¹	--	Liu et al. 2001
M35	4.8	8.2	4.7	Lu et al.2005
M40	1.8	5.1	63	Lu et al.2005
Ligands non- peptidiques :				
Galnon	11.7 μ M(h)	34.1 μ M	--	Bartfai et al.2004
Galmic	34.2 μ M(h)	>100 μ M	--	Bartfai et al.2004
Spirocoumaranon,Sch 202596	1.4 ¹ (h)	--	--	Chu et al.1997
Dithiepine-1,1,4,4-tetroxide	190 ¹ μ M(h)	--	--	Scott et al.2000
SNAP 37889	>10,000	>10,000	17.4(h)	Swanson et al.2005
SNAP 398299	>1,000	>1,000	5.3(h)	Swanson et al.2005
GalR3ant	>10,000	>10,000	15(h)	Barr et al.2006 Konkel et al.2004

Note : déterminées par des études de déplacement avec [I125]-galanine pour les trois sous-types de récepteurs. le déplacement est effectué sur les récepteurs de la galanine de rat sauf si indiqué un (h) où les récepteurs humains ont été utilisés ; ¹ présenté comme valeurs de IC_{50} ; -- non déterminé.

(Lundström 2006)

4.4. La distribution du peptide et des récepteurs dans les systèmes nerveux central et périphérique :

4.4.1. La distribution des ARN messagers de la galanine :

L'ARNm de la galanine est distribué dans tout le SNC de plusieurs espèces, y compris le rat (Melander, Hokfelt et coll. 1986, Ryan et Gundlach 1996), la souris (Cheung, Hohmann et coll. 2001), et l'homme (Gentleman, Falkai et coll. 1989), chez lesquelles il coexiste avec les neurotransmetteurs classiques (Jacobowitz, Kresse et coll. 2004). L'ARNm de la galanine est co-exprimé avec différents neurotransmetteurs et des neuropeptides dans différents types de neurones. L'ARNm de la galanine est détecté chez le rat, dans 80 % des neurones du locus coeruleus noradrénergique, et 60 % des neurones à sérotonine du raphé dorsal contiennent aussi de la galanine (Xu, Farkas-Szallasi et coll. 1997); on le trouve dans quelques populations de neurones GABAergiques dans la moelle épinière (Simmons, Spike et coll. 1995), dans les neurones cholinergiques du septum (Dutar, Lamour et coll. 1989) et enfin il est co-exprimé avec l'histamine dans le noyau tubéromammillaire. (Sherin, Elmquist et coll. 1998)

4.4.2. La distribution des récepteurs de la galanine :

Plusieurs études utilisant divers tests de détection d'ARNm ont présenté un rapport sur le profil d'expression tissulaire de l'ARNm des trois récepteurs de galanine GalR1, GalR2 et GalR3. Les trois récepteurs sont largement exprimés dans le SNC et le SNP des mammifères. (O'Donnell, Ahmad et coll. 1999, Mennicken, Hoffert et coll. 2002, Hohmann, Jureus et coll. 2003)

Dans les tissus périphériques, les résultats concernant la présence des récepteurs de la galanine sont bien controversés. Chez les rats, en utilisant la technique du PCR, les deux

récepteurs GalR2 et GalR3 sont seulement détectés dans les tissus périphériques, avec une forte expression de GalR2 dans le cœur et le foie.(Waters et Krause 2000)

En utilisant l'analyse d'hybridation avec un bavardage Northern, la distribution tissulaire montre une forte expression d'ARNm du GalR1chez le rat et l'humain, particulièrement abondante dans le cœur, le gros intestin et les testicules.(Sullivan, Shiao et coll. 1997)

Chapitre 5 - Hypothèse et objectif de recherche :

Selon le modèle classique, les fonctions cardiaques sont contrôlées par le système nerveux autonome grâce à des réflexes composés de fibres afférentes, qui projettent au système nerveux central pour y subir de nombreuses intégrations centrales (ultimement dans le bulbe rachidien) et ensuite leurs réponses sont transmises vers les fibres efférentes sympathiques et parasympathiques. D'après ce modèle, les ganglions nerveux autonomes, à travers les deux branches sympathique et parasympathique, représentent de simples relais des neurones efférents dont l'activité est modulée principalement par le système nerveux central, en route vers leurs cibles dans le myocarde. Cependant, il est établi dans des travaux rapportés dans les années 1970 qu'il existe un certain niveau de régulation locale en ce qui concerne la sécrétion de neurotransmetteurs. Elle est effectuée au niveau des terminaisons nerveuses. Cette régulation est effectuée par des autorécepteurs et des hétérorécepteurs. Cette régulation permet d'une part, une interaction réciproque entre les neurones sympathiques et parasympathiques, et d'autre part, une influence des hormones en circulation sur ces terminaisons nerveuses.

Au sein de ce plexus ganglionnaire, les neurones sont logés à l'intérieur de coussinets adipeux situés sur la surface de l'oreillette et la base des ventricules. Ils sont décrits chez l'homme (Hoover, Isaacs et coll. 2009) et chez plusieurs espèces animales comme le chien (Cardinal, Pagé et coll. 2009), le rat (Richardson, Grkovic et coll. 2003) et la souris (Rysevaite, Saburkina et coll. 2011). Par la suite, il est suggéré que le cœur possède un système nerveux intrinsèque, qui représente une station de relais final pour la coordination des fonctions cardiaques régionales. Ce «petit cerveau» situé sur le cœur est composé des corps cellulaires de neurones cholinergiques efférents (fibres parasympathiques classiques) ainsi que des neurones

adrénergiques efférents et des neurones de circuits locaux (négligés dans le modèle classique), le tout sous l'influence tonique de la commande neuronale centrale et des catécholamines circulantes.

Récemment, ce nouveau modèle a pris encore plus d'importance afin de découvrir les mécanismes de modulation de l'activité des ganglions autonomiques, en particulier dans les plexus ganglionnaires cardiaques, dont l'organisation neurochimique s'est avérée être plus complexe que précédemment escompté. (Hoover, Isaacs et coll. 2009) Ces neurones cardiaques intrinsèques reçoivent des projections influencées par plusieurs peptides, parmi lesquels nous pouvons citer; la substance P, le CGRP et la galanine (Rigel et Lathrop 1990, Zhang, Tompkins et coll. 2001, Hoover, Isaacs et coll. 2009). La présence de plusieurs de ces neuropeptides peut jouer un rôle facilitateur car ils sont capables de potentialiser l'action de l'ACh. L'application de la substance P aux neurones intracardiaques, chez le cochon de Guinée, provoque le ralentissement de la dépolarisation et augmente leur excitabilité. (Zhang, Tompkins et coll. 2001) Ils sont sensibles aux changements dans le milieu interne cardiaque (activité contractile et métabolique).

Dans des conditions pathologiques telles que l'ischémie myocardique, les signaux cardiaques associés peuvent produire une hyperactivité du système nerveux cardiaque intrinsèque, ce qui peut augmenter en plus le taux d'activation des neurones efférents et donc aggraver la pathologie de l'ischémie myocardique et provoquer des arythmies cardiaques. (Huang, Wolf et coll. 1994, Armour 1999) Les neurones efférents cardiaques pré-ganglionnaires parasympathiques et sympathiques sont activés lorsque des populations suffisantes de projections des neurones afférents cardiaques signalent l'ischémie myocardique aux neurones centraux. (Minisi et Thames 1991) L'ischémie myocardique émet des réflexes cardiaques

dépresseurs ou accélérateurs dépendamment des modifications dans le milieu cardiaque local.(Neely et Hageman 1990) Il est donc très important pour des motifs thérapeutiques, d'étudier l'existence des neuromodulateurs inhibiteurs qui puissent inhiber l'exacerbation ganglionnaire du plexus cardiaque dans le cas de plusieurs maladies afin de diminuer leurs conséquences néfastes.(Armour 2004)

Notre hypothèse de recherche est basée sur la question suivante : l'activité des neurones efférents cholinergiques et adrénergiques du système nerveux cardiaque peut-elle être modulée à la baisse sous l'influence de peptides neuromodulateurs ou non ? Le candidat plus particulièrement étudié est la galanine.

Notre objectif est d'étudier l'action des neuropeptides sur les réponses chronotropes médiées par la stimulation de neurones cardiaques par la nicotine exogène dans une préparation d'oreillettes de rat isolées à fréquence de battement spontanée. Les résultats attendus sont : en présence de la galanine, les réponses chronotropes induites par un bolus de nicotine seront réduites par rapport à l'état contrôle (sans neuropeptide).

Chapitre 6 – Protocol expérimental et méthodologie :

6.1. La préparation :

Les rats sont anesthésiés avec un mélange de kétamine/xylazine (le dosage est de 100 /10 mg/kg, respectivement). Une incision de la peau est faite, en utilisant des ciseaux et une sonde, sur la poitrine vers la région du cou. La cavité abdominale supérieure est ensuite exposée, suivie par la cavité thoracique juste au-dessus du diaphragme pour être capable de visualiser l'apex cardiaque. Afin d'exposer l'ensemble du cœur, une thoracotomie latérale est effectuée sur les deux côtés pour soulever la face ventrale du thorax (figure 11).

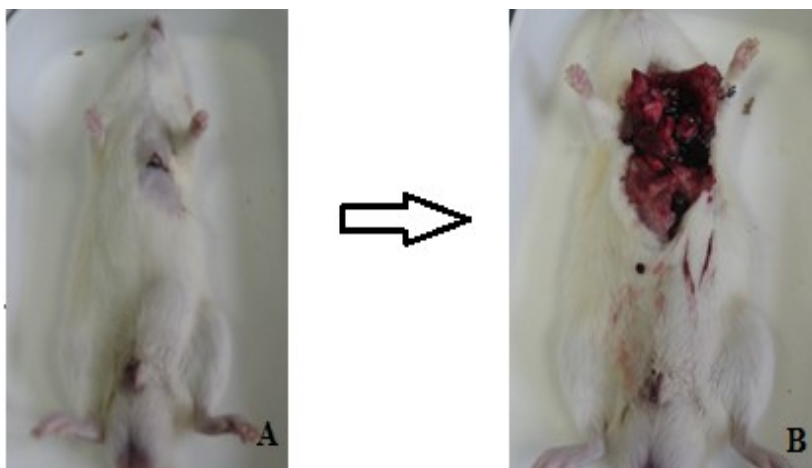


Figure 11 :

Schéma démontrant la dissection d'un rat pour la visualisation complète de l'apex cardiaque.

Lorsque le cœur et les tissus pulmonaires et médiastinaux adjacents sont enlevés, une première dissection est réalisée dans une solution de Tyrode froid pour isoler le cœur et les origines des artères et des veines, où les ventricules sont soigneusement ôtés jusqu'à la base. Ensuite, les oreillettes (avec leurs plexus neuraux associés) sont transférées dans la chambre de superfusion et plaquées au fond de revêtu Silastic par des épines qui doivent modérément tirer les muscles

afin de ne pas paralyser leur mouvement. Afin d'obtenir une préparation plane, les appendices auriculaires gauches et droits sont découpés. La région située dans la paroi de l'oreillette gauche qui sous-tend la région du sinus coronaire est ouverte. Les parties résiduelles des artères pulmonaires sont enlevées. À la fin, lorsque l'ouverture de toutes les cavités est effectuée on dispose d'une préparation planaire comme supposé. La chambre est superfusée continuellement par une solution de Tyrode aérée avec du carbogène et maintenue à une température de 34 °C (figure2).

6.2. Les solutions physiologiques et médicaments :

La solution de Tyrode est composée de NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ et glucose avec des concentrations mM respectives de 140, 6, 1 ou 2.5, 1 et 10, à un pH de 7.4.

Une solution de réserve de nicotine (1 ou 2 mM) est maintenue congelée (-4 °C) ; au moment de l'utilisation, elle est diluée dans une solution de Tyrode à des concentrations souhaitées. La nicotine est introduite dans la solution de perfusion en bolus qui durent 30 secondes, toujours en maintenant sa température à 34 °C à travers la chambre de chauffage de la pompe de circulation. La galanine est dissous aussi dans la solution de Tyrode pour obtenir une concentration stable dans le bain de superfusion de 170 nM (Parsons, Mulvaney et coll. 1998).

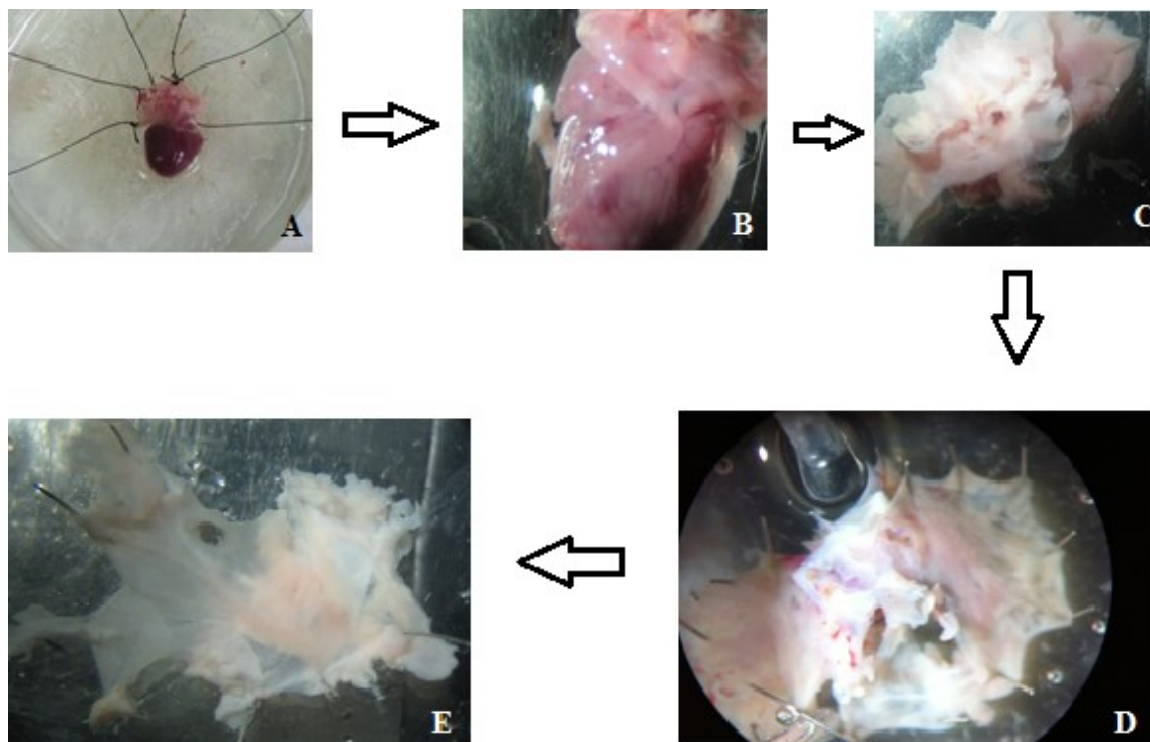


Figure 12 :

Série d'images qui montrent les différentes étapes de dissection de cœur avec son plexus neuronal. Dans les photos A-B, le cœur est fixé dans une boîte de pétrie dans une solution de Tyrode froid et les ventricules sont soigneusement ôtés. Dans les photos C- E la préparation est dans la chambre de superfusion, où la dissection est continuée afin de rendre la préparation le plus plane possible. Photos prises avec un agrandissement de 10X sauf A sans agrandissement.

6.3. Le système de superfusion :

Notre système de superfusion se compose :

- Un bain de superfusion de 15 ml de capacité. (position d'adhésion de la préparation).

- Le bain est fixé à un microscope avec un grossissement de 10X et 50X.
- Un système de conduction ; par lequel on introduit nos solutions physiologiques et médicaments dans le bain de superfusion. Ce système est entouré par un autre système de chauffage pour maintenir la température du système à 34 °C. En même temps, ce système est connecté à une source d'aération avec du carbogène. Le volume est toujours maintenu au même niveau dans le bain par un tube de suction, afin d'enlever l'excès de volume dans le bain.
- Une pompe pour le contrôle du volume du débit durant les expériences pour être toujours stable à 6 ml/min.
- Une paire d'électrodes est reliée à un amplificateur, qui est à son tour connecté à l'ordinateur pour l'enregistrement.
- Une électrode de référence.

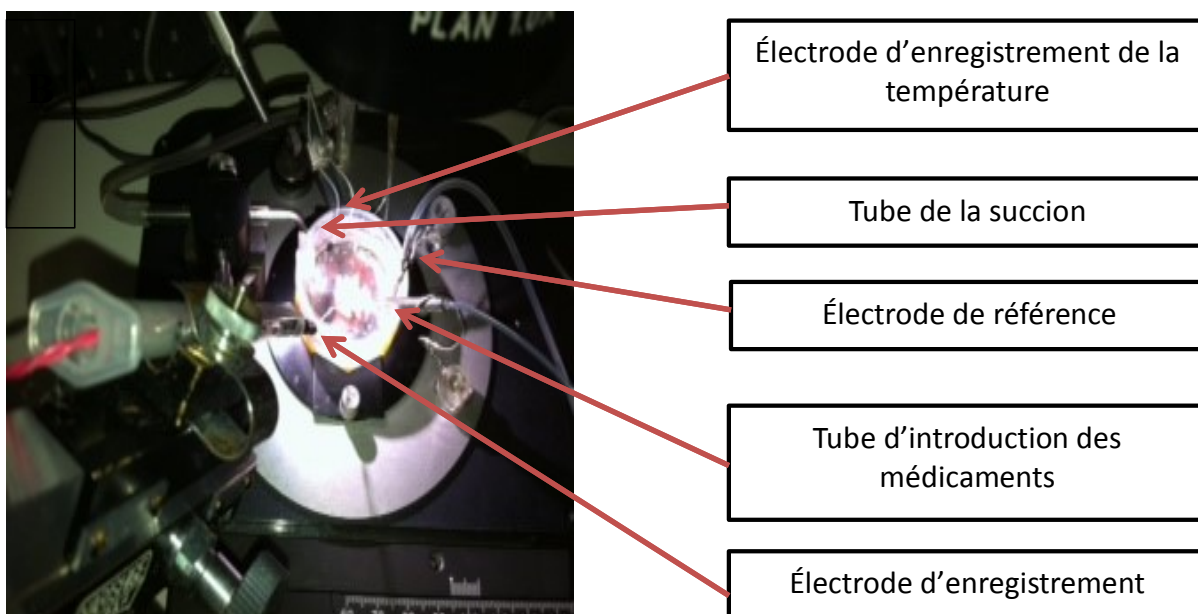
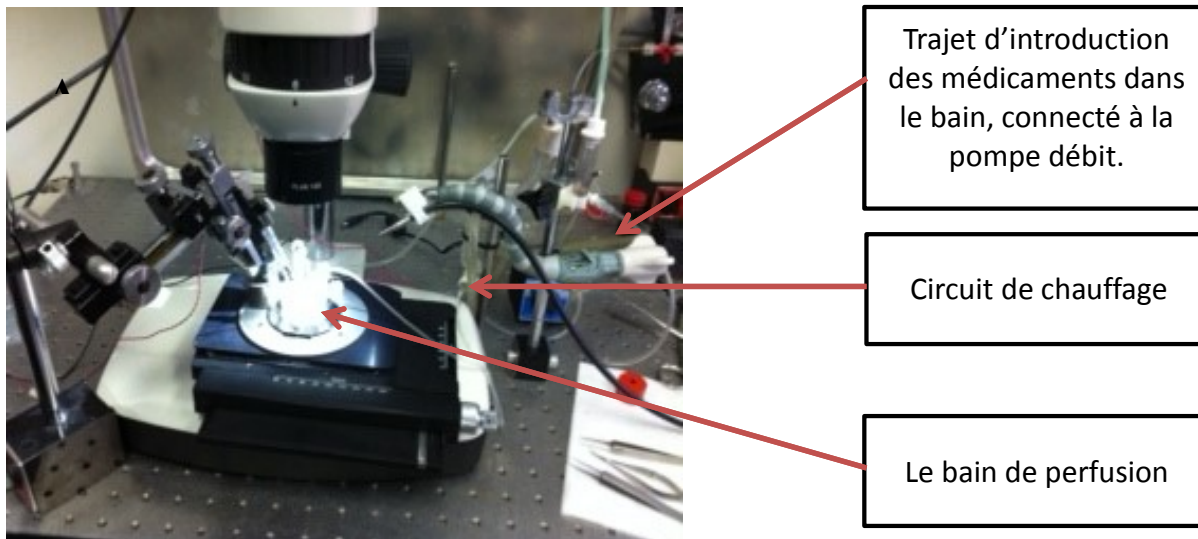


Figure 13 :

Des images qui montrent les différents composants du système et d'équipements.

A- les différentes parties du système en total, B- les composants détaillés du bain de superfusion.

6.3. L'enregistrement du rythme auriculaire d'un battement à l'autre :

Une paire d'électrodes extracellulaires bipolaire est positionnée sur la paroi auriculaire droite entre la veine cave supérieure et la veine pulmonaire supérieure droite. Ces électrodes sont reliées à un amplificateur différentiel qui conduit à son tour à un module d'acquisition de conversion analogique/numérique à 10 000 échantillons/s. Le système d'acquisition est contrôlé par un micro-ordinateur et un logiciel commercial de Spike2 (Cambridge Électronique Design, Cambridge, Royaume-Uni :<http://www.ced.co.uk/pru.shtml?spk7wglu.htm>). Les signaux sont enregistrés en continu et stockés sur le disque pour une analyse ultérieure en utilisant un logiciel de Spike 2. Le rythme auriculaire est exprimé en vitesse instantanée en battements par minute (bpm), extraits des intervalles entre les complexes d'activation successive des électrogrammes bipolaires.

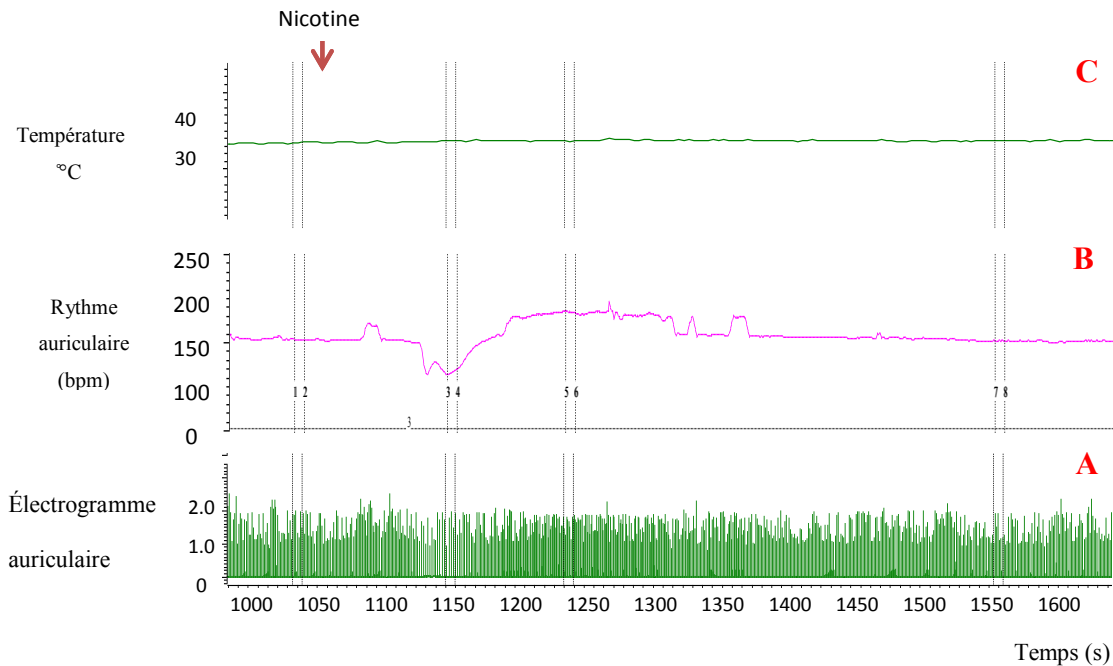


Figure 14 :

A-Exemple d'un électrogramme auriculaire en mV, **B**- Le rythme auriculaire mesuré en battements/minute, alors que **C** - L'enregistrement de la température.

6.4. Protocoles :

Chaque expérience est composée de cinq étapes successives ; qui sont par ordre :

Étape 1 : la première étape commence par une période d'équilibrage de la préparation elle dure entre 30 à 60 min, lorsque le rythme auriculaire de la préparation est stable un bolus de solution de Tyrode est introduit dans le milieu de perfusion (véhicule). Donc cette étape est utilisée comme contrôle négatif.

Étape 2 : la nicotine est ensuite introduite en bolus successifs de durée 30 s en concentration croissante 0,3 ml (1 mM) - 1,65 ml (2 mM), calibrés pour obtenir des concentrations dans le bain de 20 μ M à un maximum de 250 μ M.

Le but de cette étape, dans chaque expérience, est de déterminer la concentration de référence. Cette concentration est définie d'être celle à laquelle une réponse chronotrope claire est obtenue, et elle sera choisie pour être répétée aux étapes qui suivent en présence de la galanine.

Étape 3 : c'est l'étape où la superfusion en galanine (170 nM) est instaurée en continu pendant 20 min, au cours de laquelle le bolus d'une durée de 30 sec. de la dose de référence de la nicotine déjà choisie est répété deux fois à 12 et 18 min après le début de la superfusion en galanine.

Étape 4 : après une période de lavage (dans laquelle un nettoyage contrôlé est effectué par la solution de Tyrode pour une durée de 45 minutes au minimum), la dose de référence de nicotine est répétée afin de tester la persistance de l'intégrité e la préparation.

Étape 5 : la dose de référence de nicotine est répétée sous perfusion continue avec le timolol (10 ou 100 uM)

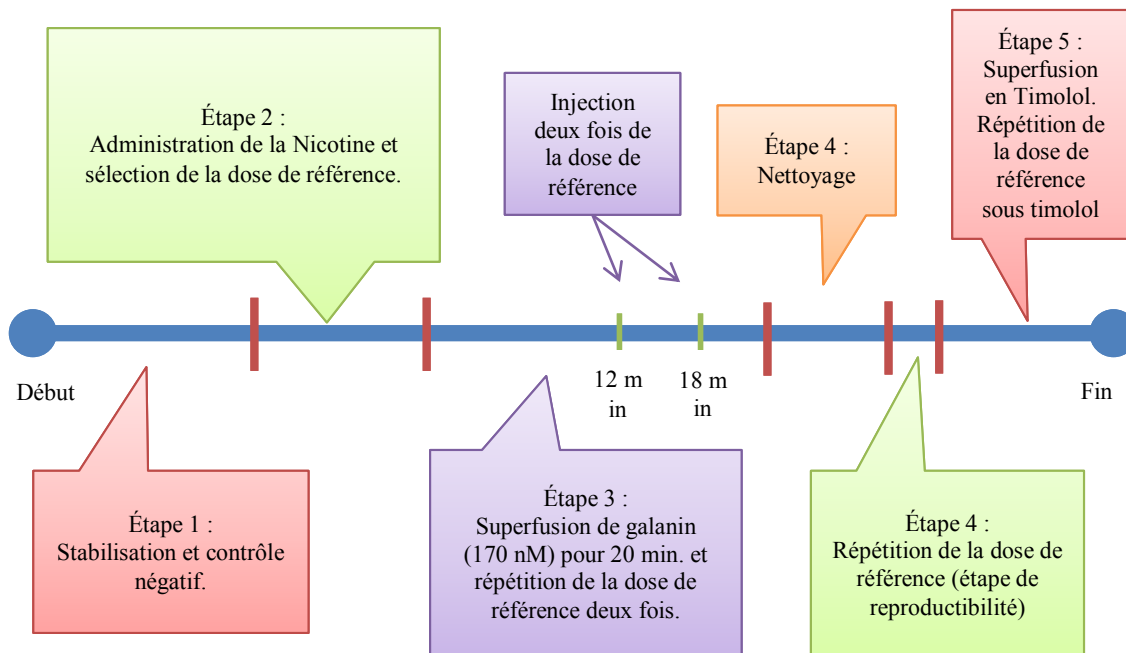


Figure 15 :

Le protocole effectué durant tous les expériences, avec ses 5 étapes.

6.5. L'analyse des données :

Les réponses chronotropes à la nicotine sont mesurées comme une différence entre le taux auriculaire sous effet de la nicotine et le taux de base auriculaire avant l'injection de cette dose de nicotine. Les réponses chronotropes au véhicule, ainsi qu'à différentes concentrations de nicotine sont comparées en faisant l'analyse de variance ANOVA pour les valeurs répétées. Les réponses chronotropes obtenues pour la concentration de référence de nicotine en contrôle et celles sous la superfusion de galanine sont comparées contre les conditions de contrôle en utilisant un ANOVA pour des mesures répétées avec un post-hoc de Bonferroni, en cas d'obtention d'une dégré de sphéricité significatives ; une correction de Greenhouse-Geisser est utilisé. Les exigences de rejet de l'hypothèse nulle et de différences statistiquement

significatives sont fixées à $p < 0,05$. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un logiciel de SPSS statistique par IBM. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type.

Dans notre série d'expériences ($n=17$), une expérience fut exclue dès le début à cause de l'instabilité de ses réponses, quatre expériences ont montré seulement une réponse monophasique (une accélération $n=2$, ou une décélération $n=2$). Le reste des expériences, $n=12$, ont montré une réponse biphasique à la suite de l'introduction de la nicotine. Chaque phase d'effet provoqué par la nicotine est étudiée séparément. Alors le total pour la phase d'accélération est de quatorze expériences ($n=14 = 12+2$) et ce même nombre d'expériences est utilisé pour la phase de décélération ($n=14 = 12+2$). Parmi ces 12 expériences biphasiques, seulement 8 expériences sont utilisées pour calculer notre courbe dose-réponse. La raison, derrière notre choix pour ces expériences, est que durant ces expériences on a pu utiliser au minimum trois doses croissantes de nicotine, tandis que dans le reste des expériences, une seule dose de la nicotine était utilisée tout le long de ces expériences, sans être capable de l'augmenter afin de ne pas dépasser le seuil de la désensibilisation de nos récepteurs.

Chapitre 7 - L'article:

Galanin Modulation of Chronotropic Responses to Nicotine in the Isolated Heart of Rats

Abass M¹, Smith FM², Vermeulen M¹, Cardinal R¹

1- Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, et Centre de recherche, Hôpital Sacré-Cœur, 5400 boulevard Gouin Ouest, Montréal (Québec), Canada H4J 1C5.

2- Department of Anatomy and Neurosciences, Faculty of Medicine, Dalhousie University

7.1. Abstract:

Cholinergic and adrenergic efferent neurons of the intrinsic cardiac nervous system (ICNS) regulate cardiac chronotropic function. The galanin, a peptide present and released in cardiac nerve endings, is able to reduce the acetylcholine release. Our aim was to investigate the proposition that galanin can act as an inhibitory neuromodulatory peptide in the rat ICNS. Atria and associated ICNS tissues were isolated from Sprague-Dawley rats and superfused in vitro. Beat to beat atrial rate measurements were derived from an atrial bipolar recording. Nicotine bolus infusion (bath concentrations of 20-250 μM) induced usually a biphasic responses consisting of an early negative followed by a positive chronotropic response. During galanin superfusion (170 nM), positive chronotropic responses to nicotine were reduced in 12/14 preparations (control: 21.35 ± 17.4 to galanin: 5.46 ± 8.0 bpm, $n=14$, $p=0.02$) whereas the negative chronotropic responses were reduced in 8/14 preparations and displayed an overall tendency towards reduction (control: -16.09 ± 14.7 , galanin: -12.53 ± 13.2 bpm). It is concluded that galanin may act as an inhibitory neuromodulatory peptide in the rat ICNS, preferentially modifying nicotinic stimulation of adrenergic neurons.

Keywords: Intrinsic cardiac nervous system, nicotine, galanin, heart rate, isolated rat atria

7.2. Introduction

The intrinsic cardiac nervous system is the final common regulator of regional cardiac function. Its main constituents are interconnected neuronal aggregates termed ganglionated plexuses nested in epicardial fatty tissues at several atrial loci in mammals, including humans (Armour, Murphy et coll. 1997), canines (Pauza, Skripka et coll. 1999) and rats (Batulevicius, Pauziene et coll. 2004). Immunohistochemical studies (Hoover, Isaacs et coll. 2009) indicate that intrinsic cardiac neurons receive neuromodulatory inputs from 'sensory neuropeptides' which are presumably contained within the terminals of collateral fibers from afferent cardiac fibers *en route* towards the central nervous system, transducing chemical and mechanical stimuli. Under pathologic conditions (*e.g.* myocardial ischemia), such cardiac afferents can cause hyperactivation of the intrinsic cardiac nervous system which, in turn, may cause further exacerbation of the primary pathology *via* efferent cholinergic and adrenergic neurons.(Foreman, Linderoth et coll. 2000) We therefore postulate that inhibitory neuropeptides may be released in the intrinsic cardiac nervous system to downregulate such amplification of noxious stimuli.

Galanin is an attractive candidate to play an inhibitory neuromodulatory role in view of previous reports that it causes membrane hyperpolarization and reduces excitability of parasympathetic neurons in amphibian (bullfrog) heart (Parsons et al. 1998). This hypothesis was tested herein with the use of a classical isolated atrial paradigm in which biphasic responses consisting of atrial rate deceleration followed by acceleration can be induced by nicotine *via* stimulation of intrinsic cardiac cholinergic and adrenergic neurons, respectively.(Ren, Furukawa et coll. 1991, Yin, Pagé et coll. 1999, Ji, Tosaka et coll. 2002)

7.3. Methods

7.3.1. Animals and preparation

All experimental procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care after approval by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal. Seventeen male Sprague Dawley rats (Charles River, St-Constant, Québec) weighing 300-490g were anesthetized using a mixture of ketamine/xylazine (100/10 mg/kg, respectively). A skin incision was made over the chest up to the neck region using scissors and a probe was used to tease away muscle, exposing the chest. The upper abdominal cavity was opened, followed by the thoracic cavity just above the diaphragm to visualize the cardiac apex. A lateral thoracotomy was then performed on both sides to lift the ventral aspect of the thorax and expose the entire heart. The heart and adjacent pulmonary and mediastinal tissues were removed. A first dissection was conducted in cold Tyrode's solution to isolate the heart and origins of the arteries and veins; the ventricles were carefully trimmed away up to the base. Tyrode's solution composition was as follows (mM): NaCl 140, KCl 6, CaCl₂ 1 or 2.5, MgCl₂ 1, glucose 10, pH = 7.4. The atria (and associated neural plexus) were transferred to a superfusion chamber (15 ml volume), pinned to the Silastic-coated bottom, and continuously superfused at 6 ml/min with Tyrode's solution aerated with carbogene and maintained at 34°C.

7.3.2. Beat to beat atrial rate measurement

A pair of bipolar extracellular electrodes was positioned onto the right atrial wall between the superior vena cava and superior right pulmonary vein, and connected to a differential amplifier leading to an acquisition module (analog/digital conversion at 10000 samples/s) and controlled by a PC microcomputer and commercial (Spike 2) software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK: <http://www.ced.co.uk/pru.shtml?spk7wglu.htm>). Signals were continuously recorded and stored on disk for later analysis using Spike 2 software. Atrial rate was expressed as instantaneous rate in beats per min (bpm) extracted from intervals between successive activation complexes of bipolar electrograms.

7.3.3. Drugs

Nicotine (1mM or 2 mM) stock solution was kept frozen (-4°C) and, at the time of utilization, was diluted in Tyrode's solution to desired concentrations. Nicotine was introduced into the superfusion solution as a 30-second bolus as the solution entered the heating chamber of the circulating pump before reaching the organ chamber. Galanin was added to the Tyrode's solution reservoir to achieve a stable bath concentration of 170 nM.(Parsons, Mulvaney et coll. 1998)

7.3.4. Protocols

Each experiment was in 5 steps, as follows. Step 1: after an equilibration period (30-60 min), a bolus of Tyrode's solution (1 ml) was introduced into the superfusion medium (vehicle). Step 2: nicotine was introduced in successive 30-s boluses of 0.3 (1mM) - 1.65 (2mM) ml calibrated to achieve bath concentrations of 20 up to a maximum of 250 µM. In each experiment, a

reference concentration at which a detectable chronotropic response was achieved was selected for trials in the presence of galanin. Step 3: galanin superfusion (170 nM) was instituted continuously for 20 min, during which 30-s boluses of the previously selected reference dose of nicotine were repeated at 12 and 18 min from the onset of galanin superfusion, where the average of these two responses was used in later calculation. Step 4: after a period of washout (control Tyrode's solution for 45 min), the reference dose of nicotine was repeated. Step 5: in 6 preparations, the reference dose of nicotine was repeated under continuous superfusion with timolol (10 or 100 μ M, n=4 and 2, respectively).

7.3.5. Data analysis

Chronotropic responses to nicotine were measured as the difference between atrial rate at peak nicotine effect and baseline atrial rate. Chronotropic responses to vehicle and to different nicotine concentrations were compared by ANOVA for repeated values; Chronotropic responses to nicotine under the superfusion galanin are compared against control conditions using an ANOVA for repeated measures with post hoc Bonferroni, in case of obtaining a significant degree of sphericity; Greenhouse- Geisser correction is used. Requirements for rejection of the null hypothesis and statistically significant differences were set at $p < 0.05$. Statistical analyses were conducted using an IBM-SPSS statistical package. Data are presented as mean \pm SD.

7.4. Results

7.4.1. Effects of nicotine

In 12 among the 17 experiments, nicotine bolus concentrations ranging from 20 to 250 μM produced biphasic responses (atrial rate reduction followed by acceleration); an example of this effect is illustrated in Fig.1. Peak negative chronotropic responses occurred after $154 \pm 41\text{s}$ with reference to the onset of the 30-s nicotine bolus infusion whereas peak positive chronotropic responses occurred after $225 \pm 77\text{s}$.

In 2 other experiments, the responses consisted of rate acceleration only, whereas in yet another 2, only rate reduction occurred. In the remaining experiment, which was not included in the calculation, the responses to nicotine were inconsistent, displaying either rate reduction or acceleration from one bolus to another.

In 8 among the 12 experiments displaying typical biphasic responses, nicotine was applied over a range of low (20 μM), moderate (60-100 μM) and high (150-250 μM) concentrations, yielding consistent concentration-response relationships (Fig.2). No chronotropic response was elicited following Tyrode's solution infusion without nicotine (0). Negative and positive chronotropic responses of -4.86 ± 4.9 and 7.95 ± 9.4 bpm (respectively) were induced at low concentrations, -8.27 ± 9.1 and 10.87 ± 8.7 bpm at moderate, and -13.46 ± 11.3 and 15.10 ± 7.7 bpm at high concentrations. Statistically significant incremental differences were detected for rate reduction as well as for rate acceleration (ANOVA for repeated measures: $p=0.04$ and 0.01 , respectively, and $p<0.05$ comparing any response with the measurement made at the preceding concentration).

7.4.2. Effects of galanin on spontaneous atrial rate and nicotine responses

Atrial rate was slightly, albeit significantly, increased during galanin (170 nM) superfusion (207.68 ± 35.7) in comparison with control Tyrode's solution superfusion (195.36 ± 38.0 , $p=0.04$; Fig.3,A).

In the presence of galanin, the negative chronotropic responses to nicotine (median reference concentration of 150 μ M) were reduced in 8/14 preparations while being unaffected or increased in the others, and displayed overall a slight, but statistically insignificant, reduction (control: -16.09 ± 14.7 , galanin: -12.53 ± 13.2 bpm, $n=14$; Fig.3, B). The positive chronotropic responses to nicotine were reduced in 12/14 preparations and the overall reduction was from 21.35 ± 17.4 bpm in the control state to 5.46 ± 8.0 bpm in the presence of galanin ($n=14$, $p=0.02$; Fig.3,B).

After 45-min washout, the negative and positive chronotropic responses to nicotine recovered to -14.6 ± 9 and 19.5 ± 10.7 bpm, respectively (not significantly different from pre-galanin nicotine responses; Fig.3,B).

7.4.3. Involvement of β -adrenergic receptors in the positive chronotropic responses to nicotine

In order to test the involvement of the β -adrenergic receptors for the positive chronotropic effect of nicotine, in 6 preparations in which the reference concentration of nicotine was repeated after 20-min exposure to timolol, the positive chronotropic responses to nicotine were reduced from 14.1 ± 4.1 (washout) to 8.0 ± 5.6 bpm (timolol).

7.5. Discussion

In isolated heart preparations, nicotine administration induces biphasic responses consisting of an initial atrial rate deceleration followed by acceleration that are dependent on muscarinic cholinergic and β -adrenergic cardiac stimulation, respectively. (Ren, Furukawa et coll. 1991, Ji, Tosaka et coll. 2002) Moreover, both the negative and positive chronotropic responses to nicotine are abolished by hexamethonium pretreatment (Ren, Furukawa et coll. 1991, Yin, Pagé et coll. 1999) pointing to the involvement of nicotinic cholinergic receptors (nAChR) at intrinsic cardiac autonomic ganglia. Accordingly, the negative chronotropic responses occurred at nicotine concentrations (20-250 μ M) that were lower than the ones (300 μ M-1mM) at which nicotine can exert direct depressant actions on cardiac pacemaker cell currents. (Satoh 1997) The main findings reported herein are that *i*) galanin exerted an inhibitory effect on the chronotropic responses to nicotine and that *ii*) the positive chronotropic responses were preferentially modified. In previous studies, an inhibitory effect of galanin on the negative chronotropic cardiac responses induced by vagus nerve stimulation was reported (Potter et Smith-White 2005) but galanin influences on sympathetic responses were not considered.

All three galanin receptors (GalR1, GalR2, GalR3) are expressed in rat peripheral as well as central nervous tissues (Waters et Krause 2000) and can exert inhibitory actions on neuronal membrane excitability as demonstrated by Parsons' group in mudpuppy cardiac ganglia. (Konopka, McKeon et coll. 1989, Parsons, Mulvaney et coll. 1998) Such effects are related to GalR coupling to Gi/o-type (subtypes 1-3) or Gq-type (subtype 2) leading to modulation of various membrane currents among which inwardly rectifying K⁺ channels and voltage-dependent Ca⁺² channels. (Branchek, Smith et coll. 2000)

The differential galanin influences on muscarinic cholinergic *versus* β -adrenergic chronotropic cardiac responses to nicotine reported herein might be related to the molecular heterogeneity of nAChRs that exists among intrinsic cardiac neurons from rat intracardiac ganglia. (Poth, Nutter et coll. 1997) Accordingly, pharmacological evidence is available (Ji, Tosaka et coll. 2002) suggesting that, in isolated rat hearts, the pentameric nAChRs mediating the negative chronotropic responses to nicotine contain $\alpha 7$ -subunits (sensitive to the antagonist α -bungarotoxin) whereas nAChRs mediating positive chronotropic responses contain $\beta 4$ -subunits (sensitive to the agonist cytosine). It remains to be investigated whether nAChRs expressed by cholinergic *versus* adrenergic intrinsic cardiac neurons display differential sensitivity to galanin, and to investigate if this is the reason behind the obtained differential effect of galanin through the whole experiments.

The present study supports the notion that the intrinsic cardiac nervous system is an exquisitely regulated entity including facilitatory (Liu, Cuevas et coll. 2000) as well as inhibitory modulatory substances. The latter may be crucial for the clinical efficacy of therapeutic neurostimulatory strategies that might exert antiischemic (Cardinal, Ardell et coll. 2004) and antiarrhythmic (Cardinal, Pagé et coll. 2006, Lopshire, Zhou et coll. 2009) actions by presumably inducing the release of such inhibitory modulatory substances and preventing hyperactivation of the intrinsic cardiac nervous system under pathologic conditions. (Foreman, Linderroth et coll. 2000)

7.6. Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to Drs. René Cardinal and Frank M. Smith, as well as by a grant from the Heart & Stroke Foundation of Quebec to Dr. Cardinal.

7.7. References:

Armour, J.A., Murphy, D.A., Yuan, B.X., MacDonald, S., Hopkins, D.A. 1997. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat. Rec.* 247:289-298.

Armour, J.A., Kember, G.C. 2004. Cardiac sensory neurons. In: *Basic and Clinical Neurocardiology*. edited by Armour, J.A., Ardell, J.L. New York, NY, Oxford, UK: Oxford University Press, p.79-117.

Batulevicius, D., Pauziene, N., Pauza, D.H. 2004. Key anatomic data for the use of rat heart in electrophysiological studies of the intracardiac nervous system. *Medicina* 40(3):253-259.

Branchek, T.A., Smith, K.E., Gerald, C., and Walker, M.W. 2000. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 21(3):109-117.

Cardinal, R., Ardell, J.L., Linderth, B., Vermeulen, M., Foreman, R.D., Armour, J.A. 2004. Spinal cord activation differentially modulates ischaemic electrical responses to different stressors in canine ventricles. *Auton. Neurosci.: Basic and Clinical* 111:37-47.

Cardinal, R., Pagé, P., Vermeulen, M., Bouchard, C., Ardell, J.L., Foreman, R.D., Armour, J.A. 2006. Spinal cord stimulation suppresses atrial tachyarrhythmias induced by mediastinal nerve stimulation in canines. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291:R1369-R1375.

Foreman, R.D., Linderoth, B., Ardell, J.L., Barron, K.W., Chandler, M.J., Hull, S.S., TerHorst, G.J., DeJongste, M.J.L., Armour J.A. 2000. Modulation of intrinsic cardiac neurons by spinal cord stimulation: implications for its therapeutic use in angina pectoris. *Cardiovasc. Res.* 47:367-375.

Hoover, D.B., Isaacs, E.R., Jacques, F., Hoard, J.L., Pagé, P., Armour, J.A. 2009. Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. *Neuroscience* 164:1170-1179.

Ji, S., Tosaka, T., Whitfield, B. H., Katchman, A. N., Kandil, A., Knollmann, B. C., Ebert, S. N. 2002. Differential rate responses to nicotine in rat heart: evidence for two classes of nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301(3):893-899.

Konopka, L.M., McKeon, T.W., Parsons, R.L. 1989. Galanin-induced hyperpolarization and decreased excitability of neurones in mudpuppy cardiac ganglia. *J. Physiol.* 410:107-122.

Liu, D.M., Cuevas, J., Adams, D.J. 2000. VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation. *Eur. J. Neurosci.* 12:2243-2251.

Lopshire, J.C., Zhou, X., Dusa, C., Ueyama, T., Rosenberger, J., Courtney, N., Ujhelyi, M., Mullen, T., Das, M., Zipes, D.P. 2009. Spinal cord stimulation improves ventricular function and reduces ventricular arrhythmias in a canine postinfarction heart failure model. *Circulation* 120:286-294.

- Parsons R.L., Mulvaney, J.M., Merriam, L.A. 1998. Galanin activates an inwardly rectifying potassium conductance and inhibits a voltage-dependent calcium conductance in mudpuppy parasympathetic neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 863:156-169.
- Pauza, D.H., Skripka, V., Pauziene, N., Stropus, R. 1999. Anatomical study of the neural ganglionated plexus in the canine right atrium: Implications for selective denervation and electrophysiology of the sinoatrial node in dog. *Anat. Rec.* 255:271-294.
- Poth, K., Nutter, T.J., Cuevas, J., Parker, M.J., Adams, D.J., Luetje, C.W. 1997. Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. *J. Neurosci.* 17(2):586-596.
- Potter, E. K., Smith-White, M. A. 2005. Galanin modulates cholinergic neurotransmission in the heart. *Neuropeptides* 39(3):345-348. doi: 10.1016/j.npep.2004.12.006
- Ren, L.M., Furukawa, Y., Karasawa, Y., Murakami, M., Takei, M., Narita, M., Chiba, S. 1991. Effects of tetrodotoxin and imipramine on the cardiac responses to nicotine in isolated, blood-perfused canine heart preparations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18(1):77-84.
- Satoh, H. 1997. Effects of nicotine on spontaneous activity and underlying ionic currents in rabbit sinoatrial nodal cells. *Gen. Pharmacol.* 28(1):39-44.
- Waters, S. M., Krause, J. E. 2000. Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95(1):265-271.
- Yin, Y., Pagé, P., Cardinal, R. 1999. Concentration-dependent effects of angiotensin II on sinus rate in canine isolated right atrial preparations. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77(1):36-41.

7.8. Figures:

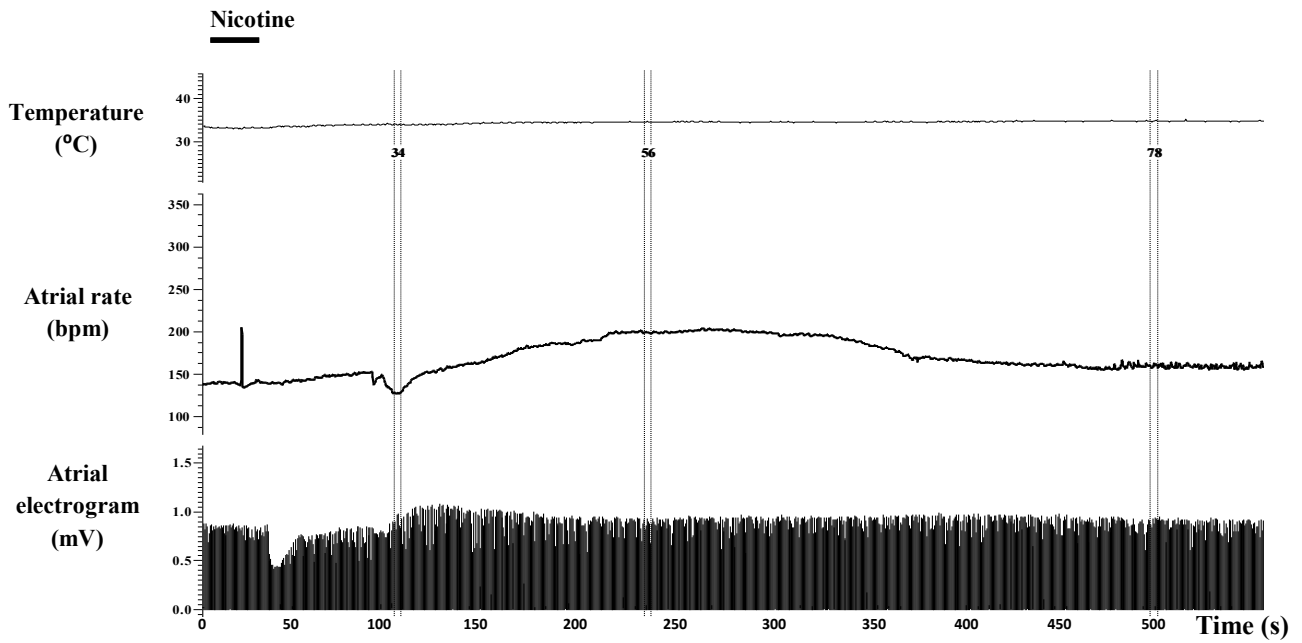


Figure 1

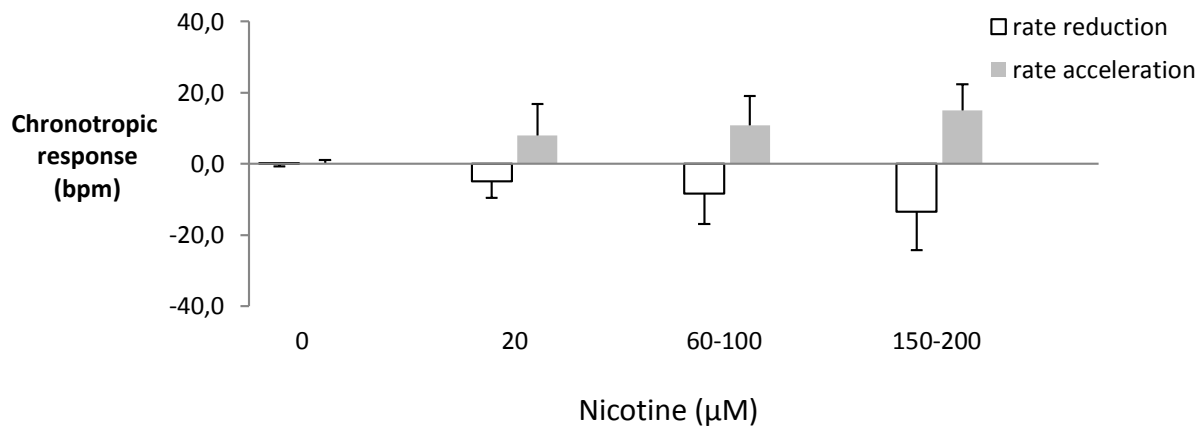
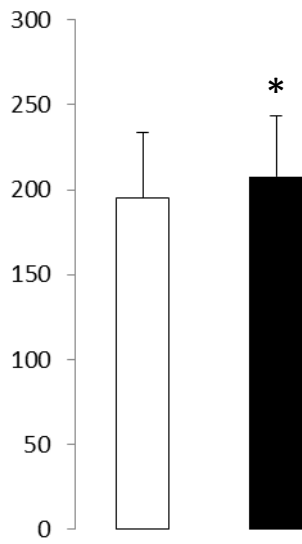


Figure 2

**A- Atrial rate
(bpm)**



**B- Chronotropic response
(bpm)**

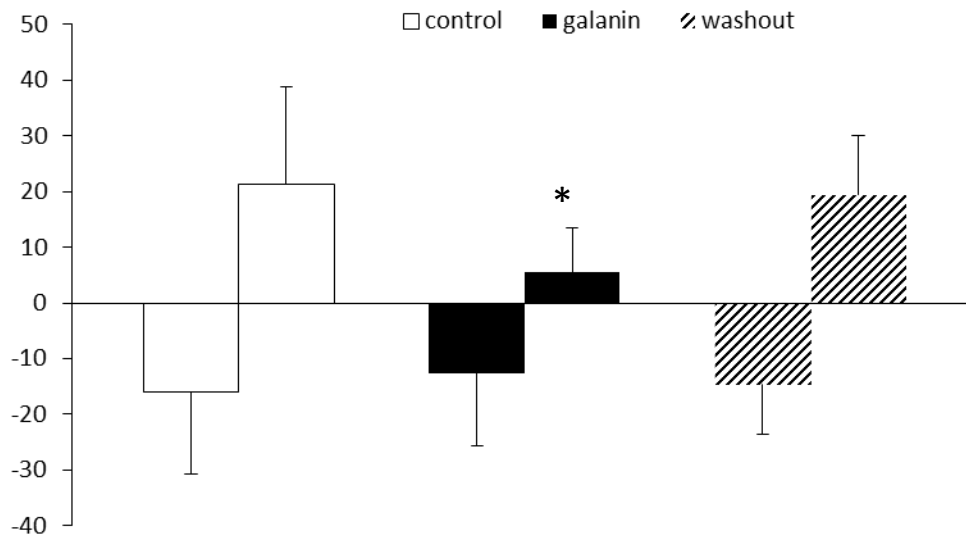


Figure 3

6.9. Figures legends:

Figure 1: Biphasic chronotropic response to a 30-s nicotine bolus infusion. In this example, the nicotine bolus infusion (horizontal bar) yielded a bath concentration of 20 μM . Abscissa: time base (s). Ordinate: lower tracing shows the atrial bipolar electrogram from which beat to beat atrial rate was derived; middle tracing : rate expressed in beats per minute (bpm). Upper tracing shows that temperature remained constant (34°C). The three pairs of vertical cursors define 5-s intervals during which 1) peak negative (left hand pair), 2) peak positive (middle pair) chronotropic responses, and 3) return to baseline (right hand pair) occurred.

Figure 2: Nicotine concentration – response relationship for rate reduction (negative chronotropic response) and acceleration (positive chronotropic response). Bar diagrams (mean \pm SD) show data derived from 8 experiments in which nicotine was infused at doses yielding low (20 μM), middle (60-100 μM) and high (150-200 μM) bath concentrations. Null concentration (0) corresponds to vehicle (Tyrode's solution) infusion.

Figure 3: Effects of galanin (170 nM) on baseline atrial rate (A) and chronotropic responses to nicotine (reference dose in each of 14 preparations). Galanin caused a slight albeit statistically significant increase (*: $p < 0.05$) in baseline atrial rate (A) as well as a statistically significant reduction in the positive chronotropic response to nicotine, which displayed recovery after 45- min washout.

Chapitre 8 – La discussion :

8.1. Effet de la nicotine sur la fréquence auriculaire :

Il est ici rapporté que l'administration de la nicotine stimule les neurones ganglionnaires cholinergiques du système nerveux cardiaque intrinsèque et que par conséquent, elle produit un effet chronotrope négatif sur la fréquence cardiaque. Cet effet inhibiteur est observé dans les préparations du cœur isolé et, dans ce travail, d'oreillettes isolées (après élimination du reste du cœur) maintenues vivantes par superfusion.

Dans la plupart des préparations de cœurs isolés chez le rat, l'administration de nicotine induit des réponses biphasiques constituées d'une phase initiale de décélération de la fréquence auriculaire suivie par une phase d'accélération. (Burn 1960, Leaders 1963) Ces effets dépendent de la stimulation des récepteurs cholinergiques muscariniques et de la stimulation des récepteurs β — adrénergiques au niveau du cœur, respectivement. (Ren, Furukawa et coll. 1991, Yin, Pagé et coll. 1999) En outre, les deux réponses chronotropes positive et négative qui font suite à l'administration de la nicotine sont abolies en prétraitant avec de l'hexaméthonium (Ren, Furukawa et coll. 1991, Yin, Pagé et coll. 1999), ce qui démontre l'implication des récepteurs nicotiniques cholinergiques (nAChR) au niveau des ganglions autonomes cardiaques intrinsèques. Ces réponses à la nicotine sont réversibles après lavage de la nicotine; l'activité spontanée est complètement rétablie. (Satoh 1997) La même tendance a été reproduite dans notre préparation d'oreillettes isolées chez le rat. Lors de l'administration de doses croissantes de nicotine, un changement de la fréquence auriculaire se présente sous forme d'une courbe doses-réponse bien définie. Concernant les doses de nicotine administrées, les réponses chronotropes négatives qui font suite à l'administration de faibles concentrations de nicotine (de

20 à 250 μM), reflètent un effet indirect par rapport à celles observées à la suite de l'administration de doses plus élevées (300 μM -1mM), auxquelles la nicotine peut exercer des effets dépresseurs directs sur les courants membranaires des cellules pacemakers. (Sato 1997)

8.2. Effet de la galanine sur la fréquence auriculaire :

La galanine peut contribuer à l'atténuation prolongée du ralentissement parasympathique du cœur en réponse à l'activation du nerf vague. (Potter et Smith-White 2005) Dans notre préparation, nous avons constaté que la fréquence cardiaque (calculée par le rapport battement/minute) est augmentée de façon significative durant la superfusion de la galanine (208 \pm 36 bpm) par rapport à la ligne de base sous la superfusion de solution de Tyrode (contrôle, 195 \pm 38 bpm).

Sous la superfusion de la galanine, nous avons obtenu une diminution significative des effets chronotrope négatif et une diminution probable des effets chronotrope positif provoqués par la dose de référence de la nicotine (contrôle : -16 \pm 15, galanine : -13 \pm 13, et contrôle : 21 \pm 17, galanine : 6 \pm 8).

Comme mentionné précédemment, les effets de la galanine sont médiés par l'activation de trois récepteurs à la galanine (les GalRs) nommés : GalR1, GalR2, et GalR3. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à la protéine G. (Branchek, Smith et coll. 2000) Le GalR1 est négativement couplé à la protéine G sensible à la toxine pertussique capable d'inhiber l'adénylyl-cyclase et la formation de l'adénosine cyclique monophosphate. (Branchek, Smith et coll. 2000) En outre, l'activation de GalR1 est capable d'ouvrir les canaux des courants potassiques rectifiants entrants via la protéine G (Smith, Walker et coll. 1998). Concernant la voie prédominante pour les GalR2, elle implique le couplage via la protéine G de sous type Gq

et la stimulation de la phospholipase C ; son activation résulte dans la formation d'inositol triphosphate, et assure la libération de Ca^{+2} à partir de réserves intracellulaires. (Borowsky, Walker et coll. 1998) À l'égard des récepteurs GalR3, ils peuvent activer les courants GIRK dans des ovocytes de *Xenopus*, ce qui démontre que GalR3 peut se coupler avec une protéine G de la classe Gi/Go. (Smith, Walker et coll. 1998)

Il est rapporté aussi que la galanine produit un état d'hyperpolarisation et réduit l'excitabilité de la membrane dans les neurones des ganglions cardiaques de *Necturus*. La galanine diminue l'amplitude et la durée d'activation des canaux potassiques calcium-dépendante, insensible à la TTX, dans les neurones parasympathiques de *Necturus*. Ce qui suggère que la galanine déprime les courants calciques voltages-dépendants. (Parsons et Konopka 1990)

L'ARNm de GalR1 est détecté dans toutes les régions du système nerveux central, mais avec plusieurs controversions sur son présence dans les tissus périphériques. L'ARNm de GalR2 est largement distribué dans les tissus centraux et périphériques avec en particulier des niveaux détectables dans le cœur et le foie. L'ARNm de GalR3 est présent dans les tissus centraux et périphériques. (Waters et Krause 2000)

La combinaison de l'ensemble de ces observations nous permet de suggérer que la galanine peut exprimer son action à travers l'activation de GalR2, qui peut être présent dans le système nerveux cardiaque intrinsèque sur la paroi de l'oreillette du cœur de rat, conduisant à l'activation de la phospholipase C et entraînant une augmentation de la formation de l'inositol triphosphate, et une libération de Ca^{+2} à partir des réserves intracellulaires. Un état d'hyperpolarisation est produit et conduit par la suite à une dépression de courants calciques voltages-dépendants dans ces neurones.

Les principaux résultats rapportés dans ce mémoire sont les suivants : i) la galanine exerce un effet inhibiteur sur la réponse chronotrope à la nicotine. ii) les réponses chronotropes positives sont modifiées de manière préférentielle. Dans des études précédentes, un effet inhibiteur de la galanine sur les réponses cardiaques chronotropes négatives induites par la stimulation du nerf vague a déjà été rapporté (Potter et Smith-White, 2005), mais les influences de la galanine sur les réponses sympathiques n'ont pas été considérées antérieurement.

Tous les récepteurs à la galanine (GalR1, GalR2, GalR3) sont exprimés, chez le rat, en périphérie ainsi que dans les tissus du système nerveux central (Waters et Krause 2000), ils peuvent exercer une action inhibitrice sur l'excitabilité neuronale de la membrane déjà démontrée par le groupe de Parsons dans les ganglions cardiaques chez *Necturus*. (Konopka, McKeon et coll. 1989, Konopka et Parsons 1989, Kennedy, Harakall et coll. 1998) Ces effets sont liés au couplage des GalRs à la protéine Gi/o de sous-types (1-3) ou Gq (sous-type 2) conduisant à la modulation de divers courants membranaires parmi lesquels les canaux potassiques voltage-dépendants à rectification entrante et les canaux calciques (Branchek, Smith et coll. 2000).

8.3. Effet de la galanine sur l'administration nicotinique :

Les effets différentiels de la galanine via les récepteurs cholinergiques nicotiques rapportés ici pourraient être reliés à l'hétérogénéité moléculaire des nAChRs qui existe entre les neurones cardiaques intrinsèques des ganglions intracardiaques chez le rat (Poth, Nutter et coll. 1997) . En conséquence, on suggère que, dans les cœurs isolés de rat, les nAChRs pentamériques qui médient les réponses chronotropes négatives à la nicotine contiennent une sous-unité $\alpha 7$ (ils sont sensibles à l'antagoniste α — bungarotoxine) alors que les nAChRs responsable des réponses

chronotropes positives contiennent une sous-unité $\beta 4$ (sensible à la cytosine agoniste). Il nous reste encore à voir si les nAChRs exprimés par les neurones adrénérgiques ou par les neurones cholinérgiques cardiaques intrinsèques affichent des sensibilités différentielles à la galanine ou non. (Ji, Tosaka et coll. 2002)

La nicotine stimule les nAChRs dans les cellules cardiaques, et il a été rapporté que les nAChRs contenant des sous-unités $\beta 4$ qui sont médiatrices de la neurotransmission adrénérgique et responsables de l'effet chronotrope positif, alors que les sous-unités $\alpha 7$ des nAChRs sont des médiatrices de la neurotransmission cholinérgique et responsables de l'effet chronotrope négatif. (Robertson, Tseng et coll. 1988, Ji, Tosaka et coll. 2002). Différents ARNm codant pour les sous-unités nAChRs sont localisés dans les neurones intrinsèques cardiaques isolés à partir des oreillettes de rat nouveau-né, notamment on pourra dire celles d' $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$. (Poth, Nutter et coll. 1997)

Chapitre 9 - Conclusion

La présente étude soutient l'idée que le système nerveux cardiaque intrinsèque peut jouer un rôle dans le réglage neuronal comme un facilitateur (Liu, Cuevas et coll. 2000) ainsi que sécréter des substances modulatrices inhibitrices. Ce dernier effet peut être crucial pour l'efficacité clinique de quelques stratégies de neurostimulation thérapeutique qui pourraient exercer un rôle anti-ischémique (Cardinal, Ardell et coll. 2004) ou encore des actions anti-arythmiques. (Cardinal, Pagé et coll. 2006, Lopshire, Zhou et coll. 2009) Ceci est réalisé en induisant probablement la libération de telles substances modulatrices inhibitrices et empêchant l'hyperactivation du système nerveux cardiaque intrinsèque dans les conditions pathologiques. (Foreman, Linderorth et coll. 2000)

Chapitre 10 – La Bibliographie:

- AN., R. M. a. P. (2002). "The pharmacology of cardiac memory." Pharmacol Ther(94): 63–75.
- Andresen MC, K. D. M. D. (2004). "Central nervous system regulation of the heart." In Basic and Clinical Neurocardiology, ed. Armour JA & Ardell JL: 187–219.
- Andresen, M. C.etM. Yang (1989). "Arterial baroreceptor resetting: contributions of chronic and acute processes." Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl **15**: 19-30.
- Ardell, J. L., C. K. Butler, et coll. (1991). "Activity of in vivo atrial and ventricular neurons in chronically decentralized canine hearts." Am J Physiol **260**(3 Pt 2): H713-721.
- Armour, J. A. (1986). "Neuronal activity recorded extracellularly in chronically decentralized in situ canine middle cervical ganglia." Can J Physiol Pharmacol **64**(7): 1038-1046.
- Armour, J. A. (1996 a). "Comparative effects of endothelin and neurotensin on intrinsic cardiac neurons in situ." Peptides **17**(6): 1047-1052.
- Armour, J. A. (1996 b). "Histamine-sensitive intrinsic cardiac and intrathoracic extracardiac neurons influence cardiodynamics." Am J Physiol **270**(4 Pt 2): R906-913.
- Armour, J. A. (1999). "Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system." Cardiovasc Res **41**(1): 41-54.
- Armour, J. A. (2004). "Cardiac neuronal hierarchy in health and disease." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(2): R262-271.
- Armour, J. A., D. A. Murphy, et coll. (1997). "Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system." Anat Rec **247**(2): 289-298.
- Arora, R. C., M. Waldmann, et coll. (2003). "Porcine intrinsic cardiac ganglia." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **271**(1): 249-258.
- Atkinson, A. P., E. Baguet, et coll. (2011). "Structural features and hydrogen-bond properties of galanthamine and codeine: an experimental and theoretical study." Chemistry **17**(41): 11637-11649.
- Badie-Mahdavi, H., X. Lu, et coll. (2005). "Role of galanin receptor 1 and galanin receptor 2 activation in synaptic plasticity associated with 3',5'-cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation in the dentate gyrus: studies with a galanin receptor 2 agonist and galanin receptor 1 knockout mice." Neuroscience **133**(2): 591-604.
- Bartfai, T.,X. Lu, et coll. (2004). "Galmic, a nonpeptide galanin receptor agonist, affects behaviors in seizure, pain, and forced-swim tests." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10470-10475.
- Batulevicius, D., N. Pauziene, et coll. (2004). "Key anatomic data for the use of rat heart in electrophysiological studies of the intracardiac nervous system." Medicina (Kaunas) **40**(3): 253-259.
- Beaulieu, P.etC. Lambert (1998). "Peptidic regulation of heart rate and interactions with the autonomic nervous system." Cardiovasc Res **37**(3): 578-585.
- Beaumont, E., S. Salavatian, et coll. (2013). "Network interactions within the canine intrinsic cardiac nervous system: implications for reflex control of regional cardiac function." J Physiol **591**(Pt 18): 4515-4533.
- Borowsky, B., M. W. Walker, et coll. (1998). "Cloning and characterization of the human galanin GALR2 receptor." Peptides **19**(10): 1771-1781.

Bosnjak, Z. J. et J. P. Kampine (1989). "Cardiac sympathetic afferent cell bodies are located in the peripheral nervous system of the cat." Circ Res **64**(3): 554-562.

Bouzat, C. et F. J. Barrantes (1996). "Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade." J Biol Chem **271**(42): 25835-25841.

Branchek, T. A., K. E. Smith, et coll. (2000). "Galanin receptor subtypes." Trends Pharmacol Sci **21**(3): 109-117.

Brehm, P. et L. Henderson (1988). "Regulation of acetylcholine receptor channel function during development of skeletal muscle." Dev Biol **129**(1): 1-11.

Brown, A. M. (1967). "Excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibres during myocardial ischaemia." J Physiol **190**(1): 35-53.

Burn, J. H. (1960). "Action of nicotine on the heart." Ann N Y Acad Sci **90**: 70-73.

Cabot, J. B. et N. Bogan (1987). "Light microscopic observations on the morphology of sympathetic preganglionic neurons in the pigeon, *Columba livia*." Neuroscience **20**(2): 467-486.

Canada, A. d. l. s. p. d. (2009). "Suivi des maladies du coeur et accidents vasculaires cerebraux au Canada." (HP32-3/2009F).

Canada, S. (2011c). "Mortality, Summary List of Causes." Statistics Canada(84F0209X): 1-125.

Cardinal, R., J. L. Ardell, et coll. (2004). "Spinal cord activation differentially modulates ischaemic electrical responses to different stressors in canine ventricles." Auton Neurosci **111**(1): 37-47.

Cardinal, R., R. Nadeau, et coll. (1996). "Reduced capacity of cardiac efferent sympathetic neurons to release noradrenaline and modify cardiac function in tachycardia-induced canine heart failure." Can J Physiol Pharmacol **74**(9): 1070-1078.

Cardinal, R., P. Pagé, et coll. (2009). "Spatially divergent cardiac responses to nicotinic stimulation of ganglionated plexus neurons in the canine heart." Auton Neurosci **145**(1-2): 55-62.

Cardinal, R., P. Pagé, et coll. (2006). "Spinal cord stimulation suppresses bradycardias and atrial tachyarrhythmias induced by mediastinal nerve stimulation in dogs." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **291**(5): R1369-1375.

Changeux, J. P. (1990). "The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels." Trends Pharmacol Sci **11**(12): 485-492.

Changeux, J. P., J. L. Galzi, et coll. (1992). "The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis." Q Rev Biophys **25**(4): 395-432.

Cheng, Z., T. L. Powley, et coll. (1999). "Projections of the dorsal motor nucleus of the vagus to cardiac ganglia of rat atria: an anterograde tracing study." J Comp Neurol **410**(2): 320-341.

Cheung, C. C., J. G. Hohmann, et coll. (2001). "Distribution of galanin messenger RNA-expressing cells in murine brain and their regulation by leptin in regions of the hypothalamus." Neuroscience **103**(2): 423-432.

Cheymol, J. (1972). "[In 1921, 50 years ago, Otto Loewi proved the existence of chemical mediators of the nervous system]." Therapie **27**(1): 57-65.

Chiou, C. W. et D. P. Zipes (1998). "Selective vagal denervation of the atria eliminates heart rate variability and baroreflex sensitivity while preserving ventricular innervation." Circulation **98**(4): 360-368.

Chu, M., R. Mierzwa, I. Truumees, A. King, E. Sapidou, E. Barrabee, J. Terracciano, M. G. Patel, V. P. Gullo, R. Burrier, P. R. Das, S. Mittelman and M. S. Puar. (1997). "A new fungal metabolite, Sch 202596, with inhibitory activity in the galanin receptor GALR1 assay." Tetrahedron Letters **38**: 6111-6114.

Claudio, T., M. Ballivet, et coll. (1983). "Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor gamma subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(4): 1111-1115.

Cooke, H. J. (1989). "Role of the "little brain" in the gut in water and electrolyte homeostasis." FASEB J **3**(2): 127-138.

Cryer, P. E., M. W. Haymond, et coll. (1976). "Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic events." N Engl J Med **295**(11): 573-577.

Curtis, L., B. Buisson, et coll. (2002). "Potentiation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol." Mol Pharmacol **61**(1): 127-135.

Devillers-Thiery, A., J. Giraudat, et coll. (1983). "Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(7): 2067-2071.

Ding, X., D. MacTavish, et coll. (2006). "Galanin attenuates beta-amyloid (Abeta) toxicity in rat cholinergic basal forebrain neurons." Neurobiol Dis **21**(2): 413-420.

Duclert, A.etJ. P. Changeux (1995). "Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction." Physiol Rev **75**(2): 339-368.

Dutar, P., Y. Lamour, et coll. (1989). "Galanin blocks the slow cholinergic EPSP in CA1 pyramidal neurons from ventral hippocampus." Eur J Pharmacol **164**(2): 355-360.

European Heart Rhythm, A.,S. European Association for Cardio-Thoracic, et coll. (2010). "Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)." Eur Heart J **31**(19): 2369-2429.

Evans, H. F.etJ. Shine (1991). "Human galanin: molecular cloning reveals a unique structure." Endocrinology **129**(3): 1682-1684.

Farrell, D. M., C. C. Wei, et coll. (2001). "Angiotensin II modulates catecholamine release into interstitial fluid of canine myocardium in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(2): H813-822.

Fathi, Z.,A. M. Cunningham, et coll. (1997). "Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor." Brain Res Mol Brain Res **51**(1-2): 49-59.

FE., B. (1996). "Neurotransmission and the central nervous system." In: Hardman, JG, Goodman Gilman A, Limbird LE, editors. The pharmacological basis of therapeutics. New York : McGraw-Hill: 267-293.

Fee, J. D., W. C. Randall, et coll. (1987). "Selective ganglionic blockade of vagal inputs to sinoatrial and/or atrioventricular regions." J Pharmacol Exp Ther **242**(3): 1006-1012.

Feigl, E. O. (1998). "Neural control of coronary blood flow." J Vasc Res **35**(2): 85-92.

Fitzgerald, L. W., J. P. Patterson, et coll. (1998). "Pharmacological and biochemical characterization of a recombinant human galanin GALR1 receptor: agonist character of chimeric galanin peptides." J Pharmacol Exp Ther **287**(2): 448-456.

Forehand, C. J. (1990). "Morphology of sympathetic preganglionic neurons in the neonatal rat spinal cord: an intracellular horseradish peroxidase study." J Comp Neurol **298**(3): 334-342.

Foreman RD, D. M. L. B. (2004). "Integrative control of cardiac function by cervical and thoracic spinal neurons." In Basic and Clinical Neurocardiology, ed. Armour JA & Ardell JL, (Oxford University Press, New York.): 153–186.

Foreman, R. D., B. Linderoth, et coll. (2000). "Modulation of intrinsic cardiac neurons by spinal cord stimulation: implications for its therapeutic use in angina pectoris." Cardiovasc Res **47**(2): 367-375.

Fox, E. A. et L. Powley (1992). "Morphology of identified preganglionic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus." J Comp Neurol **322**(1): 79-98.

Fox, K. F., M. R. Cowie, et coll. (2001). "Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population." Eur Heart J **22**(3): 228-236.

Franco-Cereceda, A., L. Bengtsson, et coll. (1987). "Inotropic effects of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin on the human right atrium in vitro." Eur J Pharmacol **134**(1): 69-76.

Fu, Q., S. Kim, et coll. (2014). "A Long Lasting beta1 Adrenergic Receptor Stimulation of cAMP/Protein Kinase A (PKA) Signal in Cardiac Myocytes." J Biol Chem **289**(21): 14771-14781.

Gabrielsson, J. et L. A. Peletier (2014). "Dose-response-time data analysis involving nonlinear dynamics, feedback and delay." Eur J Pharm Sci **59**: 36-48.

Gagliardi, M., W. C. Randall, et coll. (1988). "Activity of in vivo canine cardiac plexus neurons." Am J Physiol **255**(4 Pt 2): H789-800.

Gardner, K. et E. T. Liu (2001). "BRCA1 function in T lymphocytes: a cellular specificity of a different kind." Breast Cancer Res **3**(1): 11-13.

Gatti, P. J., T. A. Johnson, et coll. (1995). "The physiological and anatomical demonstration of functionally selective parasympathetic ganglia located in discrete fat pads on the feline myocardium." J Auton Nerv Syst **51**(3): 255-259.

Gentleman, S. M., P. Falkai, et coll. (1989). "Distribution of galanin-like immunoreactivity in the human brain." Brain Res **505**(2): 311-315.

Gibbons, D. D., E. M. Southerland, et coll. (2012). "Neuromodulation targets intrinsic cardiac neurons to attenuate neuronally mediated atrial arrhythmias." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **302**(3): R357-364.

Gray, A. L., T. A. Johnson, et coll. (2004). "Parasympathetic control of the heart. II. A novel interganglionic intrinsic cardiac circuit mediates neural control of heart rate." J Appl Physiol **96**(6): 2273-2278.

Gu, J., J. M. Polak, et coll. (1984). "High concentrations of a novel peptide, neuropeptide Y, in the innervation of mouse and rat heart." J Histochem Cytochem **32**(5): 467-472.

Habert-Ortoli, E., B. Amiranoff, et coll. (1994). "Molecular cloning of a functional human galanin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9780-9783.

Hamos, J. E., S. C. Van Horn, et coll. (1985). "Synaptic connectivity of a local circuit neurone in lateral geniculate nucleus of the cat." Nature **317**(6038): 618-621.

Heidmann, T. et J. P. Changeux (1984). "Time-resolved photolabeling by the noncompetitive blocker chlorpromazine of the acetylcholine receptor in its transiently open and closed ion channel conformations." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(6): 1897-1901.

- Hohmann, J. G., A. Jureus, et coll. (2003). "Distribution and regulation of galanin receptor 1 messenger RNA in the forebrain of wild type and galanin-transgenic mice." Neuroscience **117**(1): 105-117.
- Hokfelt, T., L. G. Elfvin, et coll. (1977). "On the occurrence of substance P-containing fibers in sympathetic ganglia: immunohistochemical evidence." Brain Res **132**(1): 29-41.
- Hoover, D. B., E. R. Isaacs, et coll. (2009). "Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia." Neuroscience **164**(3): 1170-1179.
- Hopkins, D. A. et J. A. Armour (1984). "Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart." J Comp Neurol **229**(2): 186-198.
- Hopkins, D. A., S. E. Macdonald, et coll. (2000). "Pathology of intrinsic cardiac neurons from ischemic human hearts." Anat Rec **259**(4): 424-436.
- Horackova, M. et J. A. Armour (1997). "ANG II modifies cardiomyocyte function via extracardiac and intracardiac neurons: in situ and in vitro studies." Am J Physiol **272**(3 Pt 2): R766-775.
- Horackova, M., J. A. Armour, et coll. (1999). "Distribution of intrinsic cardiac neurons in whole-mount guinea pig atria identified by multiple neurochemical coding. A confocal microscope study." Cell Tissue Res **297**(3): 409-421.
- Horackova, M., R. P. Croll, et coll. (1996). "Morphological and immunohistochemical properties of primary long-term cultures of adult guinea-pig ventricular cardiomyocytes with peripheral cardiac neurons." Tissue Cell **28**(4): 411-425.
- Hou, Y., B. J. Scherlag, et coll. (2007). "Interactive atrial neural network: Determining the connections between ganglionated plexi." Heart Rhythm **4**(1): 56-63.
- Howard, A. D., Tan, C., Shiao, L. L., Palyha, O. C., McKee, K. K., Weinberg, D.H. (1997). "Molecular cloning and characterization of a new receptor for galanin." FEBS Lett **405**: 285-290.
- HR., B. O. a. Z. (1994). "Neural control of cardiac myocyte function." In: Neurocardiology, edited by Armour JA and Ardell JL. New York: Oxford University Press, : 193-218.
- Hsiao, B., K. B. Mihalak, et coll. (2008). "Zinc potentiates neuronal nicotinic receptors by increasing burst duration." J Neurophysiol **99**(2): 999-1007.
- Hsiao, B., K. B. Mihalak, et coll. (2006). "Determinants of zinc potentiation on the alpha4 subunit of neuronal nicotinic receptors." Mol Pharmacol **69**(1): 27-36.
- Huang, M. H., S. G. Wolf, et coll. (1994). "Ventricular arrhythmias induced by chemically modified intrinsic cardiac neurones." Cardiovasc Res **28**(5): 636-642.
- Igusa, Y. (1988). "Adenosine 5'-triphosphate activates acetylcholine receptor channels in cultured *Xenopus* myotomal muscle cells." J Physiol **405**: 169-185.
- IH, Z. (1991). "Baro and cardiac reflex abnormalities in chronic heart failure." In: Reflex Control of the Circulation, edited by Zucker IH and Gilmore JP. Boca Raton, FL: CRC: 849-873.
- JA, A. (1991). "Anatomy and function of the intrathoracic neurons regulating the mammalian heart." In Reflex Control of the Circulation, ed. Zucker IH & Gilmore JP. (CRC Press, Boca Raton, FL, USA.): 1-37.
- JA., A. (1991). "Anatomy and function of the intrathoracic neurons regulating the mammalian heart." In: Reflex Control of the Circulation, edited by Zucker IH and Gilmore JP. Boca Raton, FL: CRC.: 1-37.

- Jacobowitz, D. M., A. Kresse, et coll. (2004). "Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography--a historical review." Peptides **25**(3): 433-464.
- Ji, S., T. Tosaka, et coll. (2002). "Differential rate responses to nicotine in rat heart: evidence for two classes of nicotinic receptors." J Pharmacol Exp Ther **301**(3): 893-899.
- JL, A. (2004). "Intrathoracic neuronal regulation of cardiac function." In Basic and Clinical Neurocardiology, ed. Armour JA & Ardell JL, : 118–152.
- Kanazawa, T., T. Iwashita, et coll. (2007). "Galanin and galanin receptor type 1 suppress proliferation in squamous carcinoma cells: activation of the extracellular signal regulated kinase pathway and induction of cyclin-dependent kinase inhibitors." Oncogene **26**(39): 5762-5771.
- Karlin, A. (1993). "Structure of nicotinic acetylcholine receptors." Curr Opin Neurobiol **3**(3): 299-309.
- Ke, L.etR. J. Lukas (1996). "Effects of steroid exposure on ligand binding and functional activities of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes." J Neurochem **67**(3): 1100-1112.
- Kennedy, A. L., S. A. Harakall, et coll. (1998). "Expression and physiological actions of neuropeptide Y in guinea pig parasympathetic cardiac ganglia." J Auton Nerv Syst **71**(2-3): 190-195.
- Kita, Y., Y. Ago, et coll. (2014). "Galantamine promotes adult hippocampal neurogenesis via M1 muscarinic and alpha7 nicotinic receptors in mice." Int J Neuropsychopharmacol: 1-12.
- Kobayashi, M., Y. Furukawa, et coll. (1978). "Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart." Eur J Pharmacol **50**(1): 17-25.
- Kolakowski, L. F., Jr.,G. P. O'Neill, et coll. (1998). "Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3." J Neurochem **71**(6): 2239-2251.
- Kollai, M.etK. Koizumi (1979). "Reciprocal and non-reciprocal action of the vagal and sympathetic nerves innervating the heart." J Auton Nerv Syst **1**(1): 33-52.
- Konopka, L. M., T. W. McKeon, et coll. (1989). "Galanin-induced hyperpolarization and decreased membrane excitability of neurones in mudpuppy cardiac ganglia." J Physiol **410**: 107-122.
- Konopka, L. M.etR. L. Parsons (1989). "Characteristics of the galanin-induced depolarization of mudpuppy parasympathetic postganglionic neurons." Neurosci Lett **99**(1-2): 142-146.
- Kuhlmann, J., K. O. Okonjo, et coll. (1991). "Desensitization is a property of the cholinergic binding region of the nicotinic acetylcholine receptor, not of the receptor-integral ion channel." FEBS Lett **279**(2): 216-218.
- Lambert, C. (1995). "Mechanisms of angiotensin II chronotropic effect in anaesthetized dogs." Br J Pharmacol **115**(5): 795-800.
- Lambert, C., D. Godin, et coll. (1991). "Direct effects in vivo of angiotensins I and II on the canine sinus node." Can J Physiol Pharmacol **69**(3): 389-392.
- Lang, R., A. L. Gundlach, et coll. (2007). "The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease." Pharmacol Ther **115**(2): 177-207.
- Langel, U., T. Land, et coll. (1992). "Design of chimeric peptide ligands to galanin receptors and substance P receptors." Int J Pept Protein Res **39**(6): 516-522.
- Langley, J. N. (1907). "On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I." J Physiol **36**(4-5): 347-384.
- Langley, J. N. (1921). The Autonomic nervous system, W. Heffer.

Laurent, C. E., R. Cardinal, et coll. (2001). "Functional desensitization to isoproterenol without reducing cAMP production in canine failing cardiocytes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(2): R355-364.

Leaders, F. E. (1963). "Local Cholinergic-Adrenergic Interaction: Mechanism for the Biphasic Chronotropic Response to Nerve Stimulation." J Pharmacol Exp Ther **142**: 31-38.

Linderoth, B.etR. D. Foreman (1999). "Physiology of spinal cord stimulation: review and update." Neuromodulation **2**(3): 150-164.

Lindstrom, J., R. Anand, et coll. (1996). "Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors." Prog Brain Res **109**: 125-137.

Linz, D., C. Ukena, et coll. (2014). "Atrial autonomic innervation: a target for interventional antiarrhythmic therapy?" J Am Coll Cardiol **63**(3): 215-224.

Liu, D. M., J. Cuevas, et coll. (2000). "VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation." Eur J Neurosci **12**(7): 2243-2251.

Loffelholz, K.etA. J. Pappano (1985). "The parasympathetic neuroeffector junction of the heart." Pharmacol Rev **37**(1): 1-24.

Lopshire, J. C., X. Zhou, et coll. (2009). "Spinal cord stimulation improves ventricular function and reduces ventricular arrhythmias in a canine postinfarction heart failure model." Circulation **120**(4): 286-294.

Lu, X., L. Lundstrom, et coll. (2005). "Galanin (2-11) binds to GalR3 in transfected cell lines: limitations for pharmacological definition of receptor subtypes." Neuropeptides **39**(3): 165-167.

Lukas, R. J.,J. P. Changeux, et coll. (1999). "International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits." Pharmacol Rev **51**(2): 397-401.

Lundström, L. (2006). "Subtype selective activation and molecular characterization of galanin receptors." Stockholm University Distributor: Stockholm University Library.

Lundstrom, L., Sollenberg, U., Brewer, A., Kouya, P. F., Zheng, K., Xu, Z., et al. (2005). "A galanin receptor subtype 1 specific agonist." Int J Pept Res Ther **11**: 17-27.

Marano, G., A. Ramirez, et coll. (1999). "Sympathectomy inhibits the vasoactive effects of nicotine in conscious rats." Cardiovasc Res **42**(1): 201-205.

Margiotta, J. F.etD. Pardi (1995). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptors mediate cyclic AMP-dependent enhancement of neuronal acetylcholine sensitivity." Mol Pharmacol **48**(1): 63-71.

McAllen, R. M.etK. M. Spyer (1976). "The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat." J Physiol **258**(1): 187-204.

Melander, T., T. Hokfelt, et coll. (1986). "Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system." J Comp Neurol **248**(4): 475-517.

Mennicken, F., C. Hoffert, et coll. (2002). "Restricted distribution of galanin receptor 3 (GalR3) mRNA in the adult rat central nervous system." J Chem Neuroanat **24**(4): 257-268.

Min, C. K.etG. A. Weiland (1993). "Effects of substance P on the binding of agonists to the nicotinic acetylcholine receptor of Torpedo electroplaque." J Neurochem **60**(6): 2238-2246.

Minisi, A. J.etM. D. Thames (1991). "Activation of cardiac sympathetic afferents during coronary occlusion. Evidence for reflex activation of sympathetic nervous system during transmural myocardial ischemia in the dog." Circulation **84**(1): 357-367.

- Minisi, A. J.etM. D. Thames (1993). "Distribution of left ventricular sympathetic afferents demonstrated by reflex responses to transmural myocardial ischemia and to intracoronary and epicardial bradykinin." Circulation **87**(1): 240-246.
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, et coll. (1999). "Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall." J Mol Biol **288**(4): 765-786.
- Moravec, J.etM. Moravec (1987). "Intrinsic nerve plexus of mammalian heart: morphological basis of cardiac rhythmical activity?" Int Rev Cytol **106**: 89-148.
- Mozrzymas, J. W.etF. Ruzzier (1992). "ATP activates junctional and extrajunctional acetylcholine receptor channels in isolated adult rat muscle fibres." Neurosci Lett **139**(2): 217-220.
- Mulle, C., D. Choquet, et coll. (1992). "Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation." Neuron **8**(1): 135-143.
- Mulle, C., C. Lena, et coll. (1992). "Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons." Neuron **8**(5): 937-945.
- Murphy, D. A.,G. W. Thompson, et coll. (2000). "The heart reinnervates after transplantation." Ann Thorac Surg **69**(6): 1769-1781.
- Neely, B. H.etG. R. Hageman (1990). "Differential cardiac sympathetic activity during acute myocardial ischemia." Am J Physiol **258**(5 Pt 2): H1534-1541.
- Neubig, R. R.etJ. B. Cohen (1980). "Permeability control by cholinergic receptors in Torpedo postsynaptic membranes: agonist dose-response relations measured at second and millisecond times." Biochemistry **19**(12): 2770-2779.
- Neumann, E.etH. W. Chang (1976). "Dynamic properties of isolated acetylcholine receptor protein: kinetics of the binding of acetylcholine and Ca ions." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(11): 3994-3998.
- Noda, M., H. Takahashi, et coll. (1982). "Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence." Nature **299**(5886): 793-797.
- Norris, J. E., D. Lippincott, et coll. (1977). "Responses of canine endocardium to stimulation of the upper thoracic roots." Am J Physiol **233**(6): H655-659.
- Nutter, T. J.etD. J. Adams (1995). "Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia." J Gen Physiol **105**(6): 701-723.
- O'Donnell, D., S. Ahmad, et coll. (1999). "Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1." J Comp Neurol **409**(3): 469-481.
- Okonjo, K. O., J. Kuhlmann, et coll. (1991). "A second pathway of activation of the Torpedo acetylcholine receptor channel." Eur J Biochem **200**(3): 671-677.
- Ortells, M. O.etG. G. Lunt (1995). "Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors." Trends Neurosci **18**(3): 121-127.
- Page, P. L., N. Dandan, et coll. (1995). "Regional distribution of atrial electrical changes induced by stimulation of extracardiac and intracardiac neural elements." J Thorac Cardiovasc Surg **109**(2): 377-388.
- Paradiso, K., K. Sabey, et coll. (2000). "Steroid inhibition of rat neuronal nicotinic alpha4beta2 receptors expressed in HEK 293 cells." Mol Pharmacol **58**(2): 341-351.

- Pardini, B. J., K. P. Patel, et coll. (1987). "Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat." J Auton Nerv Syst **20**(2): 91-101.
- Parsons, R. L. et L. M. Konopka (1990). "Galanin-induced hyperpolarization of mudpuppy neurons is calcium dependent." Neurosci Lett **115**(2-3): 207-212.
- Parsons, R. L., J. M. Mulvaney, et coll. (1998). "Galanin activates an inwardly rectifying potassium conductance and inhibits a voltage-dependent calcium conductance in mudpuppy parasympathetic neurons." Ann N Y Acad Sci **863**: 156-169.
- Pascuzzo, G. J., A. Akaike, et coll. (1984). "The nature of the interactions of pyridostigmine with the nicotinic acetylcholine receptor-ionic channel complex. I. Agonist, desensitizing, and binding properties." Mol Pharmacol **25**(1): 92-101.
- Pauza, D. H., V. Skripka, et coll. (1999). "Anatomical study of the neural ganglionated plexus in the canine right atrium: implications for selective denervation and electrophysiology of the sinoatrial node in dog." Anat Rec **255**(3): 271-294.
- PJ, L. M. M. (1979). "Neural control of the heart." In Handbook of Physiology, section 2, The Cardiovascular System vol. I(The Heart, ed. Berne RM): 581-620.
- Plecha, D. M., W. C. Randall, et coll. (1988). "Localization of vagal preganglionic somata controlling sinoatrial and atrioventricular nodes." Am J Physiol **255**(5 Pt 2): R703-708.
- Popot, J. L. et J. P. Changeux (1984). "Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein." Physiol Rev **64**(4): 1162-1239.
- Poth, K., T. J. Nutter, et coll. (1997). "Heterogeneity of nicotinic receptor class and subunit mRNA expression among individual parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia." J Neurosci **17**(2): 586-596.
- Potter, E. K. et M. A. Smith-White (2005). "Galanin modulates cholinergic neurotransmission in the heart." Neuropeptides **39**(3): 345-348.
- Randall, D. C., D. R. Brown, et coll. (2003). "Interactions within the intrinsic cardiac nervous system contribute to chronotropic regulation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(5): R1066-1075.
- Randall, W. C., J. L. Ardell, et coll. (1986). "Parasympathetic ganglia innervating the canine atrioventricular nodal region." J Auton Nerv Syst **16**(4): 311-323.
- Randall, W. C., J. L. Ardell, et coll. (1987). "Vagal postganglionic innervation of the canine sinoatrial node." J Auton Nerv Syst **20**(1): 13-23.
- Randall, W. C. et J. A. Armour (1974). "Regional vagosympathetic control of the heart." Am J Physiol **227**(2): 444-452.
- Recordati, G., P. J. Schwartz, et coll. (1971). "Activation of cardiac vagal receptors during myocardial ischemia." Experientia **27**(12): 1423-1424.
- Ren, L. M., Y. Furukawa, et coll. (1991). "Effects of tetrodotoxin and imipramine on the cardiac responses to nicotine in isolated, blood-perfused canine heart preparations." J Cardiovasc Pharmacol **18**(1): 77-84.
- René, C. (1994). "Autonomic modulation of myocardial electrical properties and cardiac rhythm." In: Neurocardiology, edited by Armour JA and Ardell JL. New York: Oxford University Press.: 165-191.
- Richardson, R. J., I. Grkovic, et coll. (2003). "Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart." Cell Tissue Res **314**(3): 337-350.

Rigel, D. F. et D. A. Lathrop (1990). "Vasoactive intestinal polypeptide facilitates atrioventricular nodal conduction and shortens atrial and ventricular refractory periods in conscious and anesthetized dogs." Circ Res **67**(6): 1323-1333.

Roberts, L. A. (1991). "The sinoatrial ring bundle: a cardiac neural communication system?" Am J Anat **191**(3): 250-260.

Roberts, L. A., G. R. Slocum, et coll. (1989). "Morphological study of the innervation pattern of the rabbit sinoatrial node." Am J Anat **185**(1): 74-88.

Robertson, D., C. J. Tseng, et coll. (1988). "Smoking and mechanisms of cardiovascular control." Am Heart J **115**(1 Pt 2): 258-263.

Rupprecht, R. et F. Holsboer (1999). "Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives." Trends Neurosci **22**(9): 410-416.

Ryan, M. C. et A. L. Gundlach (1996). "Localization of preprogalanin messenger RNA in rat brain: identification of transcripts in a subpopulation of cerebellar Purkinje cells." Neuroscience **70**(3): 709-728.

Rysevaite, K., I. Saburkina, et coll. (2011). "Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations." Heart Rhythm **8**(5): 731-738.

Saar, K., A. M. Mazarati, et coll. (2002). "Anticonvulsant activity of a nonpeptide galanin receptor agonist." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7136-7141.

Saavedra, J. M., M. Viswanathan, et coll. (1993). "Localization of angiotensin AT1 receptors in the rat heart conduction system." Eur J Pharmacol **235**(2-3): 301-303.

Sacco, R. L., E. J. Benjamin, et coll. (1997). "American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors." Stroke **28**(7): 1507-1517.

Said, S. I. et V. Mutt (1970). "Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine." Science **169**(3951): 1217-1218.

Satoh, H. (1997). "Effects of nicotine on spontaneous activity and underlying ionic currents in rabbit sinoatrial nodal cells." Gen Pharmacol **28**(1): 39-44.

Schauerte, P., B. J. Scherlag, et coll. (2001). "Focal atrial fibrillation: experimental evidence for a pathophysiologic role of the autonomic nervous system." J Cardiovasc Electrophysiol **12**(5): 592-599.

Schrattenholz, A., J. Godovac-Zimmermann, et coll. (1993). "Photoaffinity labeling of Torpedo acetylcholine receptor by physostigmine." Eur J Biochem **216**(2): 671-677.

Schrattenholz, A., E. F. Pereira, et coll. (1996). "Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands." Mol Pharmacol **49**(1): 1-6.

Schrattenholz, A., U. Roth, et coll. (1997). "Mapping of a binding site for ATP within the extracellular region of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor beta-subunit." Biochemistry **36**(43): 13333-13340.

Scott, M. K., T. M. Ross, D. H. Lee, H. Y. Wang, R. P. Shank, K. D. Wild, C. B. Davis, J. J. Crooke, A. C. Potocki and A. B. Reitz (2000). "2,3-Dihydro-dithiin and -dithiepine-1,1,4,4-tetroxides: small molecule non-peptide antagonists of the human galanin hGAL-1 receptor." Bioorg Med Chem **8**(6): 1383-1391.

Shao, Y., B. Redfors, et coll. (2013). "Adenosine prevents isoprenaline-induced cardiac contractile and electrophysiological dysfunction." Eur J Pharmacol **718**(1-3): 475-483.

Shaw, K. P., Y. Aracava, et coll. (1985). "The reversible cholinesterase inhibitor physostigmine has channel-blocking and agonist effects on the acetylcholine receptor-ion channel complex." Mol Pharmacol **28**(6): 527-538.

Sherin, J. E., J. K. Elmquist, et coll. (1998). "Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat." J Neurosci **18**(12): 4705-4721.

Simasko, S. M., J. A. Durkin, et coll. (1987). "Effects of substance P on nicotinic acetylcholine receptor function in PC12 cells." J Neurochem **49**(1): 253-260.

Simmons, D. R., R. C. Spike, et coll. (1995). "Galanin is contained in GABAergic neurons in the rat spinal dorsal horn." Neurosci Lett **187**(2): 119-122.

Skok, V. I. (1973). Physiology of autonomic ganglia, Igaku Shoin.

Skok, V. I. (Tokyo, 1973). "The Physiology of Autonomic Ganglia, Igaku Shoin."

Smith, K. E., Forray, C., Walker, M. W., Jones, K. A., Tamm, J. A., Bard, J. (1997b). "Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover." J Biol Chem **272**: 24612-24616.

Smith, K. E., M. W. Walker, et coll. (1998). "Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels." J Biol Chem **273**(36): 23321-23326.

Steele, P. A. et J. K. Choate (1994). "Innervation of the pacemaker in guinea-pig sinoatrial node." J Auton Nerv Syst **47**(3): 177-187.

Steele, P. A., I. L. Gibbins, et coll. (1996). "Projections of intrinsic cardiac neurons to different targets in the guinea-pig heart." J Auton Nerv Syst **56**(3): 191-200.

Storch, A., A. Schratzenholz, et coll. (1995). "Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells." Eur J Pharmacol **290**(3): 207-219.

Sullivan, K. A., L. L. Shiao, et coll. (1997). "Pharmacological characterization and tissue distribution of the human and rat GALR1 receptors." Biochem Biophys Res Commun **233**(3): 823-828.

Swanson, C. J., T. P. Blackburn, et coll. (2005). "Anxiolytic- and antidepressant-like profiles of the galanin-3 receptor (Gal3) antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(48): 17489-17494.

Sylven, C. (1989). "Angina pectoris. Clinical characteristics, neurophysiological and molecular mechanisms." Pain **36**(2): 145-167.

Tallaj, J., C. C. Wei, et coll. (2003). "Beta1-adrenergic receptor blockade attenuates angiotensin II-mediated catecholamine release into the cardiac interstitium in mitral regurgitation." Circulation **108**(2): 225-230.

Tatemoto, K. (1982). "Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(18): 5485-5489.

Tatemoto, K., A. Rokaeus, et coll. (1983). "Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine." FEBS Lett **164**(1): 124-128.

Tsien, R. W. (1974). "Effects of epinephrine on the pacemaker potassium current of cardiac Purkinje fibers." J Gen Physiol **64**(3): 293-319.

Tsien, R. W. et D. O. Carpenter (1978). "Ionic mechanisms of pacemaker activity in cardiac Purkinje fibers." Fed Proc **37**(8): 2127-2131.

Valera, S., M. Ballivet, et coll. (1992). "Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9949-9953.

Vernino, S., M. Amador, et coll. (1992). "Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors." Neuron **8**(1): 127-134.

Wang, S., T. Hashemi, et coll. (1998). "Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes." Biochemistry **37**(19): 6711-6717.

Wang, S., T. Hashemi, et coll. (1997). "Molecular cloning and pharmacological characterization of a new galanin receptor subtype." Mol Pharmacol **52**(3): 337-343.

Waters, S. M. et J. E. Krause (2000). "Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues." Neuroscience **95**(1): 265-271.

Westfall, T. C. et M. Brasted (1972). "The mechanism of action of nicotine on adrenergic neurons in the perfused guinea-pig heart." J Pharmacol Exp Ther **182**(3): 409-418.

Xi, X., W. C. Randall, et coll. (1991). "Morphology of intracellularly labeled canine intracardiac ganglion cells." J Comp Neurol **314**(2): 396-402.

Xu, X. J., T. Farkas-Szallasi, et coll. (1997). "Effects of the capsaicin analogue resiniferatoxin on spinal nociceptive mechanisms in the rat: behavioral, electrophysiological and in situ hybridization studies." Brain Res **752**(1-2): 52-60.

Xu, X. J., Z. Wiesenfeld-Hallin, et coll. (1995). "New high affinity peptide antagonists to the spinal galanin receptor." Br J Pharmacol **116**(3): 2076-2080.

Yin, Y. L., P. Pagé, et coll. (1999). "Concentration-dependent effects of angiotensin II on sinus rate in canine isolated right atrial preparations." Can J Physiol Pharmacol **77**(1): 36-41.

Yuan, B. X., J. L. Ardell, et coll. (1993). "Differential cardiac responses induced by nicotine sensitive canine atrial and ventricular neurones." Cardiovasc Res **27**(5): 760-769.

Yuan, B. X., J. L. Ardell, et coll. (1994). "Gross and microscopic anatomy of the canine intrinsic cardiac nervous system." Anat Rec **239**(1): 75-87.

Zhang, L., J. D. Tompkins, et coll. (2001). "Substance P modulates nicotinic responses of intracardiac neurons to acetylcholine in the guinea pig." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(6): R1792-1800.

Zhang, Y., K. A. Mowrey, et coll. (2002). "Optimal ventricular rate slowing during atrial fibrillation by feedback AV nodal-selective vagal stimulation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(3): H1102-1110.

Zwart, R., R. G. van Kleef, et coll. (2000). "Competitive potentiation of acetylcholine effects on neuronal nicotinic receptors by acetylcholinesterase-inhibiting drugs." J Neurochem **75**(6): 2492-2500.