



HAL
open science

Habilitation à diriger des recherches

Véronique Bozon

► **To cite this version:**

Véronique Bozon. Habilitation à diriger des recherches. Endocrinologie et métabolisme. Université de Tours / Région Centre, 2005. tel-03139130

HAL Id: tel-03139130

<https://hal.inrae.fr/tel-03139130>

Submitted on 6 Dec 2021

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

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



**Université François-Rabelais
TOURS**

Année Universitaire 2004-2005

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Discipline : Sciences de la Vie

présentée et soutenue publiquement par :

Véronique BOZON

Le 14 décembre 2005

JURY

Jorge Argibay	Pr	UMR CNRS 6542, Tours	Président
Yves Combarous	DR	UMR 6175 INRA CNRS, Tours	Rapporteur
Rodolphe Fischmeister	DR	INSERM U446, Châtenay-Malabry	Rapporteur
Johan Hoebeke	DR	CNRS UPR 9021, Strasbourg	Examineur
Daniel Potreau	DR	UMR CNRS 6187, Poitiers	Rapporteur

SOMMAIRE

	Pages
Curriculum Vitæ	1-4
Dossier Scientifique	5-17
Publications	5
Activité d'encadrement	10
Responsabilités scientifiques et administratives.....	13
Contrats de recherche.....	15
Collaborations	17
Rapport d'Activité Scientifique.....	18-61
 <i>A) Surexpression du récepteur de LH et réassociation fonctionnelle de ses deux domaines</i>	 20-35
Introduction.....	18
I) Contexte scientifique.....	20
II) Objectifs.....	21
III) Projets de recherche.....	22
 Chapitre I : Production de l'ectodomaine du récepteur de LH porcin.....	 22
 I) Stratégie de production de l'ectodomaine du récepteur de LH.....	 23
1) Modification des paramètres biologiques : multiplicité d'infection ou hôte du virus (chenille)	
2) Modification de paramètres moléculaires : promoteur ou séquence signal	
3) Co-expression de l'ecto- et de l'endodomaine	
II) Etude des chaînes polysaccharidiques des ectodomains du récepteur de LH	26
III) Conclusion du chapitre I.....	27
Bibliographie	
 Chapitre II : Cartographie immunopeptidique du récepteur de LH porcin.....	 30
Bibliographie	

Chapitre III : Endocytose du récepteur de LH porcin.....	32
Bibliographie	
Chapitre IV : Immunocontraception.....	34
Bibliographie	
<i>B) Etude fonctionnelle, pharmacologique et immunologique du récepteur 5-HT₄ cardiaque recombinant et natif. Implication de ce récepteur dans les arythmies auriculaires, plus particulièrement la fibrillation atriale</i>	36-61
I) Contexte scientifique.....	36
1) Effets cardiaques de la 5-HT <i>via</i> le récepteur 5-HT ₄	
2) La fibrillation auriculaire	
3) Le récepteur 5-HT ₄ et la fibrillation auriculaire	
4) Origine auto-immune des fibrillations auriculaires idiopathiques	
5) Modèle d'activation des RCPG	
II) Objectifs	40
III) Projets de recherche.....	40
Chapitre I : Etude fonctionnelle du récepteur h5-HT₄ exprimé dans les cellules atriales d'adulte	40
Bibliographie	
Chapitre II : Effets fonctionnels de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant et natif.....	46
I) Le récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant.....	46
II) Récepteur h5-HT₄ natif.....	48
Bibliographie	
Chapitre III : Identification et caractérisation fonctionnelle d'auto-anticorps anti-récepteur h5-HT₄.....	52
Bibliographie	
Chapitre IV : Nouveau modèle d'étude, les cellules atriales de porc.....	54

Bibliographie

Chapitre V : Participation à différents projets au sein de l'unité..... 59

Conclusion générale 62

Curriculum Vitae

Véronique BOZON

Née le 25 Novembre 1968 à Versailles (Yvelines, France)

Nationalité Française

ADRESSE PERSONNELLE

**127 rue de la mairie
37520 La Riche
Tél Dom : 02.47.38.37.25**

ADRESSES PROFESSIONNELLES (ENSEIGNEMENT ET RECHERCHE)

**Université François Rabelais
Faculté des Sciences et Techniques
UMR CNRS 6542; "Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires"
Parc de Grandmont
37200 TOURS
Tél : 02.47.36.71.14
Fax : 02.47.36.71.12
e-mail : bozon@univ-tours.fr**

FONCTION ACTUELLE

Maître de Conférences classe normale

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

- 1997-....** : **MAITRE DE CONFERENCES**
Sept
**UMR CNRS 6542 "Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires",
Faculté des Sciences et Techniques, Tours (37)**
Directeurs : Pr J. Argibay (1997-2003) et Pr.P. Cosnay (depuis 2004)
Projet de recherche et activité d'enseignement : voir annexes détaillées
- 1997** : **STAGE POST-DOCTORAL**
Janv à Juillet
Bourse de l'Association de Recherche contre le Cancer
**CNRS URA 583, "Calcium et tissu osseux dans l'organisme en développement",
Hôpital des enfants malades, Paris (75)**
Responsable : Dr M. Lieberherr
Projet de Recherche : Clonage par expression des récepteurs membranaires aux stéroïdes
- 1991-1996** : **CHERCHEUR**
Dans le cadre de la préparation d'un Doctorat (1991-1995), puis d'un Stage d'AFR (1996).
Allocataire de Recherche MENRT de 1992 à 1995
"Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire", à l'INRA de Jouy-en-Josas (78)
Responsables : Dr J.J Remy et Dr R Salesse
Projet de recherche : Production du récepteur de LH et de ses 2 domaines par voie recombinante (système baculovirus-cellules d'insecte).
Applications : Etudes fonctionnelles du RLH sous ses différentes formes.
Vaccination d'animaux avec ces protéines recombinantes afin de moduler leur fertilité.
- STAGES**
- 2003** : **FORMATION EN CYTOMETRIE DE FLUX**
Mai
Faculté de médecine de Tours (37)
- 2002** : **STAGE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**
Janv
« Interférence ARN : outil pour l'étude de la fonction génique chez les mammifères »,
Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris (13^{ème})
- Juin** : **STAGE DE FORMATION A L'EXPERIMENTATION ANIMALE**
Niveau 1, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (44). N° : 37-078
- 2001** : **STAGE DE FORMATION DE PERSONNE RADIOCOMPETENTE**
Nov
Société SGS Qualitest Industrie, Faculté François Rabelais, Tours (37)
- 2000** : **STAGE DE MODELISATION MOLECULAIRE**
Faculté de médecine de Limoges (87)
- 1990-1991** : **STAGES EN PHARMACOLOGIE CARDIO-VASCULAIRE *in vitro***
- Sept 90-Fév 1991** : **Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Faculté d'Orsay (91)**
Responsable : Pr D Feuvray
"Récupération cardiaque et métabolique après ischémie".

Fév1990 **Laboratoire de Physiologie Cardiaque, Unité INSERM à la Faculté d'Orsay (91)**
Responsable : Dr R Fischmeister
"Etude électrophysiologique du canal Ca²⁺ lent dans des cellules cardiaques".

ACQUISITION DE TECHNIQUES

*** Pharmacologie des récepteurs**

*** Biologie moléculaire** : Clonage, Séquençage, PCR, construction de baculovirus recombinants

*** Culture Cellulaire** : Cellules de mammifères (COS-7, CHO, HEK 293), d'insecte (Sf9) et humaines (ostéoblastes, mammaires)

*** Isolement Cellulaire** : Cardiomyocytes de rat, de porc et d'humain (adulte et enfant)
Perfusion de Coeur isolé

*** Ingénierie de protéines** : Système Baculovirus/cellules d'insecte, lignées cellulaires (COS-7, CHO, HEK293)

*** Etude biochimique et immunochimique** : Liaison Spécifique du ligand, Dosage de second messenger (AMPc, Ca²⁺), Cytométrie de flux Marquage métabolique, Immunoprécipitation, Western blot, Dot blot, ELISA, IRMA

*** Purification de protéines** : Electro-élution, Chromatographie d'Affinité.

*** Immunologie** : Vaccination (lapin, souris, rat), Titrage de sera, Purification d'immunoglobulines

*** Etude fluorométrique** : Dosage du calcium intracellulaire grâce à une sonde fluorescente, le Fura-2

ENSEIGNEMENT

Oct 1996 : **MAITRE AUXILIAIRE**, en Science de la vie
Collège St François d'Assise, Montigny-le-Bretonneux (78)

1994-1995 : **VACATAIRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**
Maîtrise de Biologie cellulaire et Physiologie, (option Neurophysiologie).
Université Versailles/Saint Quentin en Yvelines (78)

FORMATION

1992-1995 : **DOCTORAT DE L'UNIVERSITE, SPECIALITE BIOCHIMIE**
Université d'Orsay, Paris XI. Mention : *Très Honorable avec les Félicitations du Jury*

1991-1992 : **DEA, "Structure et Fonctionnement des Systèmes Biologiques Intégrés",**
Université d'Orsay, Paris XI. *Mention : Bien*
Responsable : Pr B Rossignol

1989-1991 : **MAITRISES DE PHYSIOLOGIE ANIMALE ET DE BIOCHIMIE,**
Université d'Orsay, Paris XI. *Mention : Bien*
Comportant notamment les modules de :
- Neurophysiologie

- Immunologie
- Biochimie
avec respectivement les Professeurs, Pr F.Crépel, Pr G.Lemaire et Pr E.Shechter.

1988-1990 : **LICENCE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE**
Université d'Orsay, Paris XI. *Mention : Assez Bien*
Comportant notamment les modules de :
- Physiologie animale
- Physiologie comparée
avec les Professeurs, Pr E.Coraboeuf, Pr D.Feuvray.

Langues : **Anglais : lu, écrit, parlé**

SOCIETE SAVANTE

Membre de la **Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire** depuis 1999

Dossier Scientifique

- 1) Publications*
- 2) Activité d'encadrement*
- 3) Responsabilités*
- 4) Contrats de recherche*
- 5) Collaborations*

PUBLICATIONS

I) Articles publiés dans des revues scientifiques à comité de lecture

- 1 Di Scala E, Findlay I, Rose S, Aupart M, Argibay J, Cosnay P and **Bozon V** (2004a) High efficiency activation of L-type Ca²⁺ current by 5-HT in human atrial myocytes. *Receptors and Channels* 10 (5-6), 159-165. (IF= 2.25)
- 2 Di Scala E, Rose S, Héroult O, Argibay J, Cosnay P and **Bozon V** (2004b) Polyclonal antibody effects on the human cardiac 5-HT_{4(e)} receptors depend upon the expression system. *Receptors and Channels* 10 (3-4), 125-129. (IF=2.25)
- 3 **Bozon V**, Di Scala E, Eftekhari P, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Hoebeke J and Argibay J (2002a) Agoniste-like activity of antibodies directed against the second extracellular loop of the human cardiac serotonin 5-HT_{4(e)} receptor in transfected COS-7 cells. *Receptors and Channels* 8 (2), 113-121. (IF= 1.3)
- 4 **Bozon V**, Couture L, Pajot-Augy E, Richard F, Remy J.J and Salesse R (2002b) Rescue of the intracellularly trapped lutropin receptor exodomain by endodomain and reconstitution of a functional membrane receptor : interaction between exo- and endodomains. *Protein Express Purif* 25, 114-123. (IF=1.49)
- 5 Pajot-Augy E, **Bozon V**, Remy J.J, Couture L and Salesse R (1999) Critical relationship between glycosylation of recombinant lutropin receptor ectodomain and its secretion from baculovirus-infected insect cells. *Eur J Biochem* 260, 635-648. (IF=3.30)
- 6 **Bozon V**, Pajot-Augy E, Vignon X and Salesse R (1998) Endocytosis of lutropin by Leydig cells through a pathway distinct from the high-affinity receptor. *Mol Cell Endocrinol* 143, 33-42. (IF=2.34)
- 7 Remy J.J, Couture L, Pantel J, Haertlé T, Rabesona H, **Bozon V**, Pajot-Augy E, Robert P, Troalen F, Salesse R and Bidard J.M (1996) Mapping of hCG-receptor complexes. *Mol Cell Endocrinol* 125, 79-91. (IF=2.6)
- 8 Couture L, Remy J.J, Rabesona H, Troalen F, Pajot-Augy E, **Bozon V**, Haertlé T, Bidard J.M and Salesse R (1996a) A defined epitope on the human choriogonadotropin α -subunit interacts with the second extracellular loop of the transmembrane domain of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Eur J Biochem* 241, 627-632. (IF=3.27)
- 9 Couture L, Naharisoa H, Grebert D, Remy J.J, Pajot-Augy E, **Bozon V**, Haertlé T and Salesse R (1996b) Peptide and immunochemical mapping of the ectodomain of porcine LH receptor. *J Mol Endocrinol* 16, 15-25. (IF=2.72)
- 10 Remy J.J, Lahbib-Mansais Y, Yerle M, **Bozon V**, Couture L, Pajot-Augy E, Grebert D and Salesse R (1995) The porcine follitropin receptor : cDNA cloning, functional expression and chromosomal localization of the gene. *Gene* 163, 257-261. (IF=2.16)
- 11 Pajot-Augy E, Couture L, **Bozon V**, Remy J.J, Biache G, Severini M, Huet J.C, Pernollet J.C and Salesse R (1995) High-level expression of recombinant porcine lutropin receptor in baculovirus-infected insect cells or caterpillars. *J Mol Endocrinol* 14, 51-66. (IF=2.72)
- 12 **Bozon V**, Remy J.J, Pajot-Augy E, Couture L, Biache G, Salesse R and Garnier J (1995) Influence of promoter and signal peptide on the expression and secretion of recombinant porcine LH extracellular domain in the baculovirus-lepidopteran cells and caterpillars system. *J Mol Endocrinol* 14, 277-284. (IF=2.72)

- 13 Remy J.J, **Bozon V**, Couture L, Goxe B, Salesse R and Garnier J (1993a) Suppression of fertility in male mice by immunization against LH receptor. *J Reprod Immunol* 25(1):63-79. (**IF=1.49**)
- 14 Remy J.J, **Bozon V**, Couture L, Goxe B, Salesse R, Garnier J (1993b) Reconstitution of a high-affinity functional lutropin receptor by coexpression of its extracellular and membrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 193(3), 1023-30. (**IF=3.31**)

II) Articles soumis

Di Scala E, Rose S, Héroult O, Argibay J, Cosnay P and **Bozon V** (2005) Conformational state of human cardiac 5-HT_{4(e)} receptors influences the functional effects of polyclonal anti-5-HT₄ receptor antibodies. *Eur J Pharmacol* (soumis)

ACTIVITE D'ENCADREMENT

1) Co-directions :

- 1) d'un Stage Post-doctoral
- 2) de 2 Thèses Science de la Vie
- 3) de 4 stages de DEA
- 4) de 5 stages de Maîtrise/Master 1 et 1 stage MSBM

Diplôme	Année	Etudiant	Co-responsable	Sujet du stage
Post-doctorat	Oct à Déc 2002	Nigmatullina Razina MCU en Russie	Pr. J. Argibay UMR-CNRS 6542 Faculté des Sciences, (Tours)	Etude du récepteur 5-HT ₄ au cours du développement chez le rat nouveau-né
Doctorat	2004/2007	Fitou Amandine	Pr. J. Argibay	Comparaison des propriétés fonctionnelles, immunologiques et pharmacologiques du récepteur 5-HT ₄ cardiaque chez l'enfant et l'adulte
	2001/2004	Di Scala Emmanuella Bourse MENRT	Pr. P. Cosnay Service de Cardiologie B Hôpital Trousseau (Tours)	Implication du récepteur 5-HT ₄ cardiaque humain dans la fibrillation auriculaire : rôle d'auto-anticorps dirigés contre ce récepteur
DEA	2000/2001	Di Scala Emmanuella 2 ^{ème} du DEA	Pr. J. Argibay	Etude fonctionnelle du récepteur à la sérotonine humain cardiaque de type 4 (5-HT ₄). Effets des sérums de patients atteints de troubles du rythme auriculaire sur l'activité fonctionnelle du récepteur
	2001/2002	Kara Elodie	Dr. E. Reiter CNRS/INRA/UMR 6073, PRC, INRA deTours	Caractérisation immunologique du récepteur 5-HT ₄ porcin
	2002/2003	Bergoënd Eric Chirurgien Cardiaque	Pr. J. Argibay	Etude du récepteur cardiaque humain à la sérotonine 5-HT ₄ chez l'enfant
	2003/2004	Fitou Amandine 6 ^{ème} du DEA	Pr. P. Cosnay	Effets fonctionnels d'anticorps dirigés contre les récepteurs atriaux à la sérotonine de type 4
Maîtrise/ Master 1	1998/2005	5 étudiants	Dr. V. Bozon	////
MSBM Pharmacie	2005	Descrop Maylis	Dr. V. Bozon	////

2) Aide à l'encadrement : Participation partielle à l'encadrement

1) *d'une Thèse Science de la Vie*

2) *de 4 stages de DEA*

Diplôme	Année	Etudiant	Responsable
Doctorat	1997/2000	Fauchier Laurent	Pr. J. Argibay
DEA	1998/1999	Bito Virginie	Dr. J. Lignon UMR-CNRS 6542 Faculté des Sciences, (Tours)
	1999/2000	Constantin Stéphanie	Pr. J. Argibay
	2003/2004	1) Thireau Jérôme > 10 ^{ème} du DEA 2) Dérangeon Mickaël 7 ^{ème} du DEA	Pr. D. Babuty Service de Cardiologie B Hôpital Trousseau (Tours) Pr. J. Argibay

Détails complémentaires des co-directions :

1) Stage Post-doctoral

Le Dr. R. Nigmatullina est Maître de Conférences à l'Institut de Physiologie de l'Université de Kazan, en Russie et a effectué ses travaux de recherche pendant 3 mois sous ma direction.

2) Thèse de Science de la Vie

* J'ai co-encadré M^{elle} E. Di Scala lors de la réalisation de sa Thèse de 3^{ème} cycle. Elle était classée **2^{ème} au DEA** "Signalisation et Interactions Cellulaires et Moléculaires" de Tours en Juillet 2001 et a été allocataire de recherche **MENRT**. Cette étudiante a soutenu son Doctorat en Sciences de la Vie, à la Faculté des Sciences et Techniques, Université François Rabelais, le 2 Juillet 2004.

* Je co-encadre actuellement M^{elle} A. Fitou, étudiante en 1^{ère} année de Thèse de 3^{ème} cycle. Elle avait préalablement effectué deux stages au sein du laboratoire : 1) un stage de Maîtrise, au cours de sa Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, mention Physiologie, de l'Université de

Poitiers (Mai 2003) et 2) le stage de DEA "Signalisation et Interactions Cellulaires et Moléculaires" de l'Université François Rabelais de Tours (2003-2004). Elle a été classée 6^{ème}/21.

3) DEA

* *Les quatre étudiants que j'ai co-encadrés*, ont suivi le DEA "Signalisation et Interactions Cellulaires et Moléculaires" de l'Université François Rabelais de Tours.

* M^{elle} E. Kara effectue actuellement une Thèse de 3^{ème} cycle, avec une bourse région/INRA et Mr E. Bergoënd poursuit son internat en médecine.

4) Stage de Maîtrise/Master 1

* *Parmi les cinq étudiants que j'ai encadrés, trois* (S. Bonnet, E. Di Scala et N. Cousin) effectuaient la Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, option Physiologie animale (BCPA) de la Faculté des Sciences et Techniques de Tours, **une** (A. Fitou) suivait une Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, mention Physiologie, à l'Université de Poitiers et **un** (L. Martin) effectuait le Master 1 Sciences de la Vie, mention Physiologie, Technologie pour la santé et Neurosciences à la Faculté des Sciences et Techniques de Tours.

* Durée du stage : minimum 1 mois (75 heures). Cependant, les stages ont généralement perduré sur l'ensemble de l'année.

RESPONSABILITES SCIENTIFIQUES ET ADMINISTRATIVES

1) Responsabilité au sein du laboratoire

Responsabilités	Fonctions
Développement d'un nouveau pôle de recherche	Mise en place d'un laboratoire de Biologie moléculaire, de Biochimie et d'Immunologie <i>Unité travaillant auparavant uniquement dans le domaine de l'électrophysiologie</i>
Responsable des laboratoires	* Laboratoires de Biochimie, de Biologie moléculaire et d'Immunologie * La salle de culture
Personne Radiocompétente	Développement et gestion du secteur utilisant des éléments radioactifs
Correspondant "OGM" (Organismes génétiquement modifiés)	* Etablissement des demandes d'autorisation d'utilisation d'OGM * Mise en place et suivi des mesures de sécurité lors de l'utilisation d'OGM
Personnel technique	* Formation de deux techniciennes en Biologie Moléculaire, Biochimie, Immunologie et Culture Cellulaire * Gestion de ce personnel : 3 personnes [depuis 2000 à 2005]
Matériel et équipement	Gestion du matériel et de l'équipement des différentes salles citées précédemment
Co-direction de stagiaires	Stagiaires de Maîtrise, de DEA, de Thèse et de Post-doctorat (Voir le Chapitre "Encadrement")

2) Responsabilité au sein de l'Université

Responsabilités	Fonctions
Commission de spécialistes	Membre élu suppléant de la commission de spécialistes section 66/69 ^{ème} , Université François Rabelais (Tours) [depuis 1999]
Maîtrise de Biologie cellulaire et Physiologie (BCP), option physiologie animale	Responsable de l'unité d'enseignement (UE5) "Physiologie des grandes fonctions animales", Université François Rabelais (Tours) [1999-2003; Réforme LMD]
Master 2 Domaine Science de la Vie et de la Santé Physiologie, Biomolécules, Thérapeutiques (Recherche)	Suppléante au sein du Comité Pédagogique
Master 1 Sciences de la Vie et de la Santé, mention Physiologie, Technologie pour la santé et Neurosciences	Responsable de l'unité d'enseignement "Bases moléculaires des grandes fonctions", Université François Rabelais (Tours) [depuis 2004, Réforme LMD]
Master 1 Sciences de la Vie et de la Santé, mention Biologie intégrative, spécialité Biologie de la Reproduction	Co-Responsable de l'unité d'enseignement "Endocrinologie et signalisation", Université François Rabelais (Tours) [depuis 2004, Réforme LMD]
Licence L3 Sciences du Vivant	Co-Responsable de l'unité d'enseignement "Physiologie et génomique", Université François Rabelais (Tours) [depuis 2005, Réforme LMD]
Stages de Maîtrise BCP (TER)	Responsable des stages TER pendant une année (2000), Université François Rabelais (Tours)
ERASMUS/SOCRATES	* Co-responsable ERASMUS/SOCRATES de l'Université de Tours * Etablissement de relations avec le correspondant SOCRATES de Liège (Belgique), et suivi des étudiants.
Comité de thèse	Membre d'un comité de thèse au sein de l'INRA/Nouzilly de Tours (de 2000 à 2003)
Projet "Protéome" de la Région Centre	Représentante de l'UMR CNRS 6542
Plateau Pluriformation "Transcriptome" de l'Université de Tours	Représentante de l'UMR CNRS 6542

LISTE DES CONTRATS OBTENUS

Depuis mon recrutement au sein de l'UMR CNRS 6542, plusieurs demandes de financements auprès de différents groupes et associations ont été établies.

Contrats obtenus avec appels d'offre.

Association	Année	Montant (Keuros)	Responsable	Projets
Fondation pour la Recherche Médicale * Nationale * Locale	Avril 98 à Avril 99 1999	17 11	Dr. V. Bozon Dr. V. Bozon Pr. J. Argibay	"Etude fonctionnelle du récepteur 5-HT ₄ humain dans un système d'expression eucaryote. Effets des sérum de patients atteints de cardiomyopathies sur l'activité fonctionnelle du récepteur 5HT ₄ " "Aide à l'implantation du laboratoire de Biologie moléculaire"
Conseil régional de la Région centre	Mai à Déc 1999 2005	19,6 10	Dr. V. Bozon Pr. J. Argibay Dr. V. Bozon	"Etude fonctionnelle du récepteur 5-HT ₄ humain dans un système d'expression eucaryote. Effets des sérum de patients atteints de cardiomyopathies sur l'activité fonctionnelle du récepteur 5-HT ₄ " "Achat d'un PSMF de type II. Mise aux normes du laboratoire pour l'utilisation d'OGM"
Fondation de France*	Juin 2000 à juin 2001	6,1	Dr. V. Bozon Pr. J. Argibay	"Récepteurs sérotoninergiques 5-HT ₄ humains : marqueurs des arythmies auriculaires et du lupus congénital"
Biotechnocentre * et Conseil Général d'Indre et Loire	Fév à Juin 2002	12,2	Dr. V. Bozon Pr. J. Argibay	"Développement d'une lignée cellulaire cardiaque de porc exprimant le récepteur 5-HT ₄ "

Remarque : (*) Ce symbole renvoie aux informations complémentaires présentées sur cette page

3 - Fondation de France

* La Fondation de France a attribué un contrat entre trois partenaires.

* *Les partenaires sont :*

a) L'unité INSERM U446, Faculté de Pharmacie, Châtenay- Malabry (92), France

Responsable : Dr. R. Fischmeister

b) L'unité CNRS UPR 9021, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg (67), France

Responsable : Dr. J. Hoebeke

c) L'unité UMR-CNRS 6542, Faculté des Sciences et Techniques, Tours (37), France

Responsable : Pr. J. Argibay et **Dr. V. Bozon**

4 - Biotechnocentre et le Conseil Général d'Indre et Loire

* *Ce contrat est le reflet d'une collaboration entre 3 partenaires :*

a) le groupe pharmaceutique *PFIZER Global Research & Development*, Département de Toxicologie et de Ressources Biologiques, Amboise (37), France

Responsable : Dr. K. Nahas

b) L'unité CNRS/INRA/UMR 6073, PRC, INRA de Nouzilly, Tours (37), France

Responsable : Dr. E. Reiter

c) L'unité UMR-CNRS 6542, Faculté des Sciences et Techniques, Tours (37), France

Responsable : **Dr. V. Bozon** et Pr. J. Argibay

COLLABORATIONS

Collaborations	Unités	Projets
Locales	1) CNRS/INRA/UMR 6073, PRC, INRA de Nouzilly, (Tours)	Caractérisation immunologique du récepteur 5-HT ₄ porcin
	2) Groupe pharmaceutique <i>PFIZER Global Research & Development</i> , Département de Toxicologie et de Ressources Biologiques, (Amboise)	Etablissement d'une lignée cellulaire cardiaque porcine
	3) Service de Cardiologie B de l'hôpital Trousseau (Tours) 4) Service d'Hématologie de l'hôpital Bretonneau (Tours) et l'unité INSERM ESPRI / UPRES-EA3249 Faculté de Médecine (Tours)	Etude fonctionnelle du récepteur à la sérotonine humain cardiaque de type 4 (5-HT ₄). Effets des sérums de patients atteints de troubles du rythme auriculaire sur l'activité fonctionnelle du récepteur
	5) Service de Chirurgie Cardiaque de l'hôpital Trousseau (Tours)	Etude du récepteur cardiaque humain à la sérotonine 5-HT ₄ chez l'enfant et l'adulte
Nationales	1) INSERM U446, Faculté de Pharmacie. Châtenay- Malabry (92)	Pharmacologie des récepteurs cardiaques 5-HT ₄
	2) CNRS UPR 9021, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg (67)	Anticorps poly- et monoclonaux anti-récepteurs couplés aux protéines G
Internationales	Institut de Physiologie, Université de Kazan, Russie	Etude du récepteur 5-HT ₄ au cours du développement chez le rat nouveau-né. Rôle de la sérotonine au cours du développement cardiaque.

Rapport d'Activité Scientifique

A) Surexpression du récepteur de LH et réassociation fonctionnelle de ses deux domaines

B) Etude fonctionnelle, pharmacologique et immunologique du récepteur 5-HT₄ cardiaque recombinant et natif. Implication de ce récepteur dans les arythmies auriculaires, plus particulièrement la fibrillation atriale

A) Surexpression du récepteur de LH et réassociation fonctionnelle de ses deux domaines

A) SUREXPRESSION DU RECEPTEUR DE LH ET REASSOCIATION FONCTIONNELLE DE SES DEUX DOMAINES

I) CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La reproduction sexuée est une fonction majeure du vivant, qui permet le renouvellement et la conservation des espèces. Les principaux médiateurs de la physiologie de la reproduction sont les hormones gonadotropes et leurs récepteurs membranaires spécifiques. Les hormones hypophysaires, dont la lutropine (ou hormone lutéinisante, LH) et la follitropine (ou hormone folliculo-stimulante, FSH) sont les principaux stimulants des activités endocrines et gamétogénétiques des gonades par le système nerveux central (Figure 1). Les deux hormones sont sécrétées de façon pulsatile par les mêmes cellules gonadotropes de l'adénohypophyse, dans le système veineux porte hypothalamique sous le contrôle du GnRH (gonadolibérine ou gonadotropin-releasing hormone). Au niveau des ovaires et des testicules, les gonadotropines transmettent leur message en interagissant avec un récepteur glycoprotéique spécifique présent à la surface des cellules cibles. Chez la femelle, les cellules de la thèque des follicules ovariens expriment le récepteur de LH et les cellules de la granulosa les récepteurs de LH et de FSH. Chez le mâle, les cellules de Leydig portent le récepteur de LH et les cellules de Sertoli le récepteur de FSH. La fixation de ces hormones induit la synthèse et la sécrétion de stéroïdes sexuels (androgènes et oestrogènes) et des facteurs protéiques gonadiques (inhibine, activine...). A leur tour, ceux-ci régulent la synthèse et la sécrétion des gonadotropines par une rétroaction positive ou négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Les hormones gonadotropes appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques, composées également de deux autres hormones la thyrotropine (hormone thyro-stimulante, TSH) et la chorio-gonadotropine (CG). Elles sont formées de deux sous-unités α et β (Figure 2). La sous-unité α est commune à toutes les hormones, alors que la sous-unité β , présentant 40 % d'homologie, apporte la spécificité à ces hormones. La CG ou LH placentaire est sécrétée en quantité importante lors de la gestation par les cellules placentaires trophoblastiques chez les primates et les équidés. Elle maintient l'intégrité morphologique et fonctionnelle du corps jaune et favorise vraisemblablement le développement précoce de l'embryon. L'hCG présente des propriétés biologiques, fonctionnelles et immunologiques similaires à celles de l'hormone LH. Leur principale différence réside au niveau de leurs demi-vies dans la circulation. La longévité de l'hormone hCG est de plusieurs heures et peut atteindre quelques jours, alors que celle de l'hormone LH est très courte, environ 20 min (Combarnous, 1996). Les hormones LH et CG se fixent sur le même récepteur.

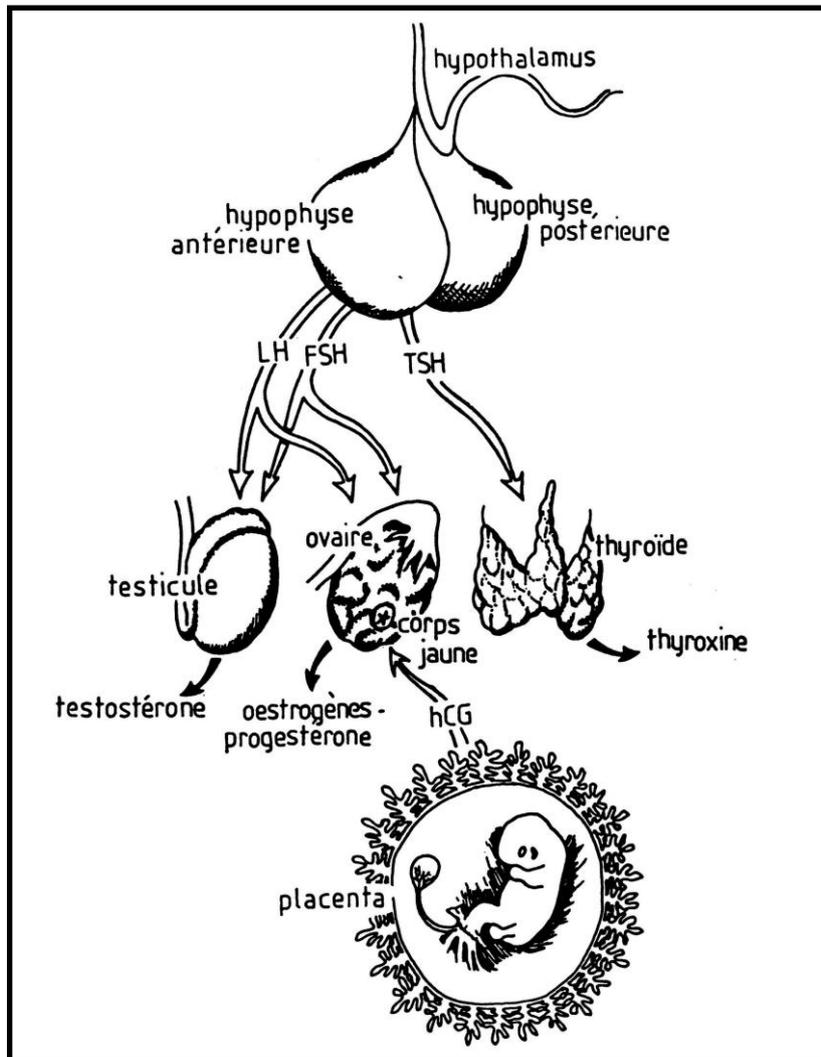


Figure 1 : Effets physiologiques des hormones glycoprotéiques
Adapté d'après Dufy-Barbe, 1984

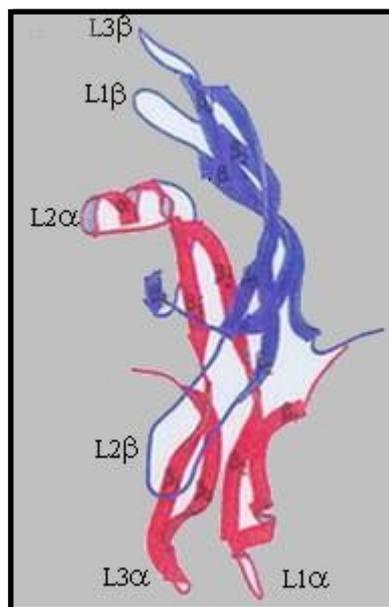


Figure 2 : Structure cristalline de l'hormone placentaire hCG : Diagramme en ruban de l'hCG. La sous-unité α est indiquée en rouge et la sous-unité β en bleu. Eléments de structure secondaire : hélices α et feuillets β .
(D'après Wu et al., 1994; Laphorn et al., 1994)

Le laboratoire "Récepteurs et Communication Cellulaire" avait choisi d'étudier plus particulièrement le récepteur porcin de la lutropine au niveau structural et fonctionnel. Le récepteur de LH a été cloné en 1989 chez le porc (Loosfelt et al., 1989), le rat (McFarland et al., 1989), et l'homme (Minegish et al., 1990). Il est constitué d'une seule chaîne polypeptidique de 696 acides aminés et présente un poids moléculaire apparent de 85 kDa (Vu Hai et al., 1990). Il peut être divisé en deux domaines de taille équivalente, le domaine N-terminal extracellulaire (ectodomaine) de 360 acides aminés et le domaine C-terminal membranaire-cytoplasmique (endodomaine) de 336 acides aminés (Figure 3). Ce récepteur appartient à deux familles de protéines, d'une part, la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par son endodomaine, et d'autre part la famille des protéines riche en leucines par son domaine N-terminal extracellulaire (Figure 4) (McFarland et al., 1989; Braun et al., 1991). Pour stimuler les cellules cibles, l'hormone LH se lie à son récepteur avec une haute affinité de l'ordre de 10^9 à 10^{10} M^{-1} . Suite à cette fixation, le récepteur couplé positivement à l'adénylate cyclase, *via* la protéine Gs, induit une augmentation du taux basal d'AMP cyclique, ainsi qu'une cascade de phosphorylations de protéines intracellulaires (Segaloff et al., 1993). La transduction du message provoque une stimulation de la stéroïdogénèse. Deux autres voies de signalisation mineures sont également impliquées dans cette synthèse, les voies de la phospholipase C (Davis et al., 1986; Lee et al., 2002) et de la phospholipase A2 (Abayasekara et al., 1990).

II) OBJECTIFS

Les relations structure-fonction qui régissent l'activité du récepteur de LH étaient mal connues en raison de sa faible abondance naturelle. Pour répondre aux besoins de la biologie structurale, le laboratoire s'était engagé dans la production du récepteur de LH porcin sous différentes formes par voie recombinante, *via* le système eucaryote baculovirus-cellules d'insecte. L'objectif principal de mon travail de thèse était donc d'établir les conditions optimales de production de ce récepteur et de ses deux domaines (ecto- et endodomaine), afin d'obtenir des protéines sécrétées ou membranaires, stables, actives et en quantité abondante en vue d'études physico-chimiques et de cristallisation. La composition glucidique de ces protéines recombinantes a également été étudiée. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre I.

Parallèlement à cette analyse, le laboratoire avait entrepris une cartographie immunopeptidique du récepteur de LH. Les interactions établies entre l'hormone et les deux domaines de ce récepteur ont été étudiées. Les données sont résumées dans le chapitre II.

Nous avons également analysé les mécanismes impliqués spécifiquement dans l'internalisation de l'hormone LH. Les résultats sont présentés dans le chapitre III.

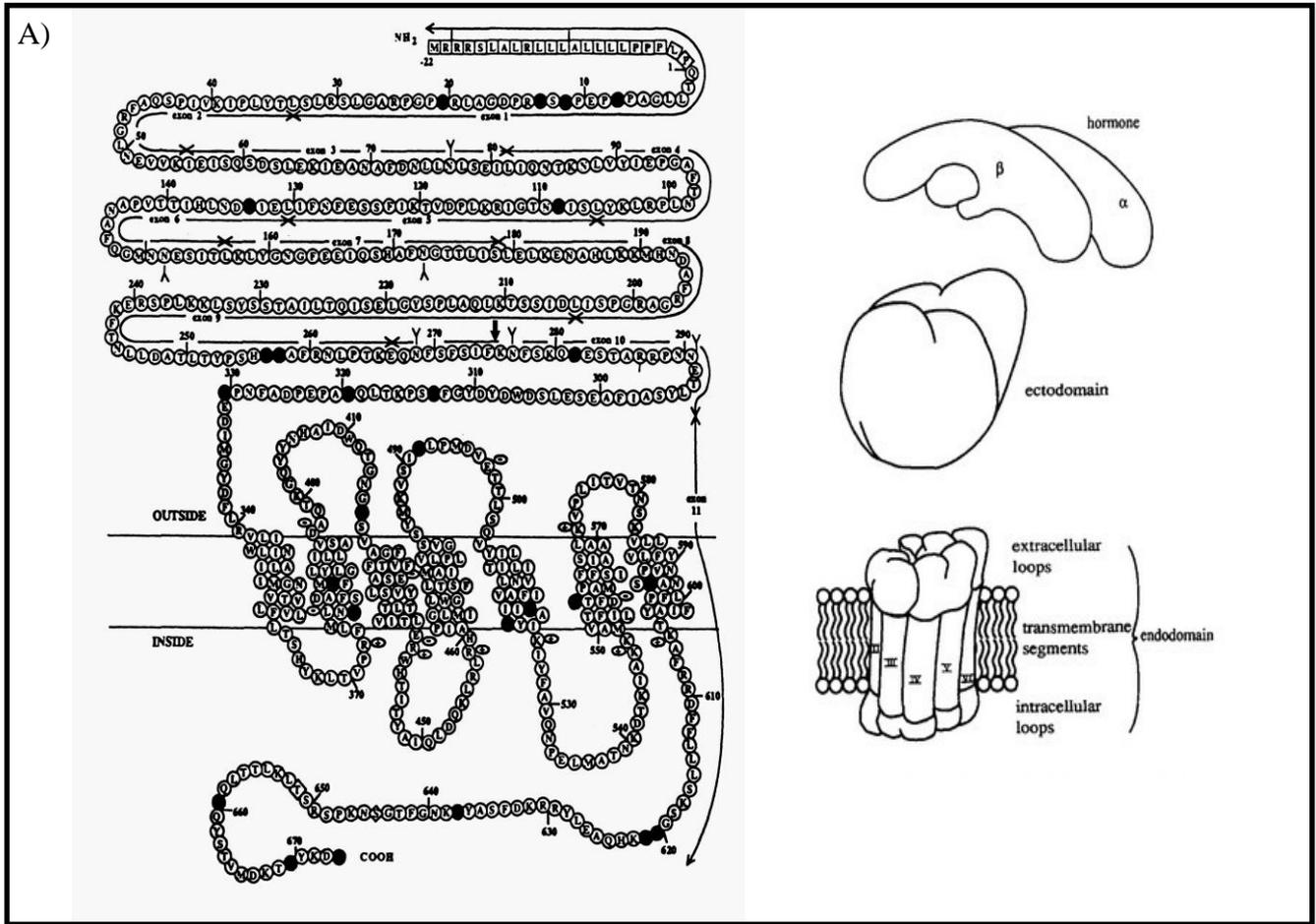


Figure 3 : Le récepteur de LH porcine

A) Séquence peptidique du récepteur de LH porcine. Carrés : acides aminés du peptide signal; cercles noirs : cystéines; Y : sites potentiels de N-glycosylation; ↓ : site de coupure entre l'ecto- et l'endodomaine (Salesse et coll., 1991); × : limite des exons indiqués sur la base du gène du récepteur de LH de rat (Koo et al., 1991); B) Représentation schématique du complexe hormone-récepteur (Remy et al., 1996).

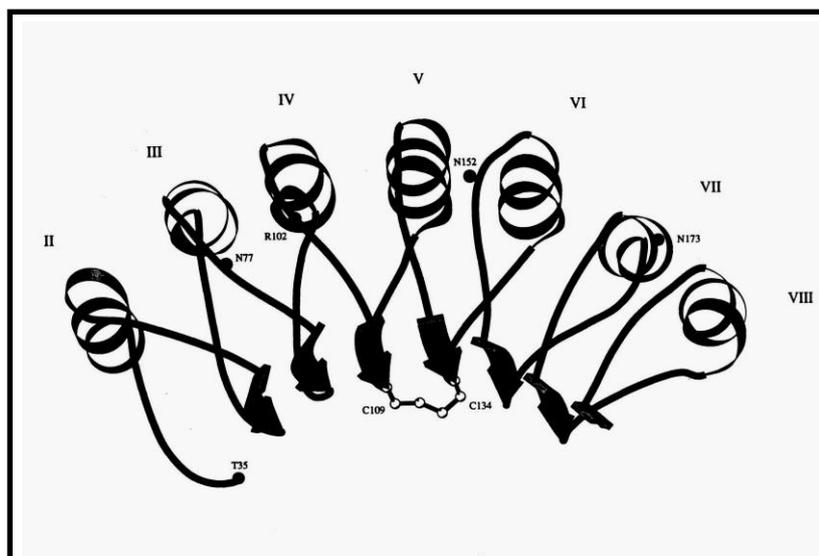


Figure 4 : Modélisation du domaine extracellulaire du récepteur de LH porcine.

Domaine formé de 14 motifs riches en leucine se superposant aux exons (2 à 8). Composition apparentant le R-LH à la famille des protéines riches en leucine, tel que l'inhibiteur porcine de la ribonucléase (pRI). Modélisation la région extracellulaire de ce récepteur grâce aux données structurales du pRI (Kobe et al., 1993) et aux prédictions de structure secondaire de l'ectodomaine de R-LH (Biou et al., 1988). Partie externe du fer à cheval formée par les hélices α , et partie interne constituée par les brins β . Asparagines glycosylées (N77 et N173) et cystéines 109 et 134 potentiellement impliquées dans un pont disulfure sont indiquées. Région 102-107 accessible aux anticorps exposée sur une boucle externe du fer à cheval (voir chapitre II)

Enfin, l'importance de ce récepteur dans de la reproduction et la présence de protéines reconnues spécifiquement dans le liquide folliculaire ovarien par des anticorps dirigés contre l'ectodomaine de ce récepteur, nous ont incités à observer les effets d'une vaccination anti-récepteur de LH. Les effets physiologiques ont été suivis en analysant le taux de fertilité des animaux immunisés. Les résultats sont décrits dans le chapitre IV.

III) PROJETS DE RECHERCHE

CHAPITRE I : PRODUCTION DE L'ECTODOMAINE DU RECEPTEUR DE LH PORCIN

(Article 4 : Bozon et al., 2002b; Article 5 : Pajot-Augy et al., 1999; Article 11 : Pajot-Augy et al., 1995; Article 12 : Bozon et al., 1995; Article 14 : Remy et al., 1993b)

L'expression naturelle du récepteur de LH dans les tissus gonadiques est très faible, de $3,5 \times 10^4$ récepteurs/cellule (11 ng récepteur/mg protéines totales) dans les testicules (Peyrat et al., 1981) et $1,5 \times 10^3$ récepteurs/cellule (0,4 ng récepteur/mg protéines totales) dans les ovaires (Bortolussi et al., 1981). Or les études physico-chimiques nécessitaient des taux élevés de protéines de l'ordre de centaine de milligrammes.

Le clonage du récepteur de LH a permis la production de cette protéine par voie recombinante. Ce récepteur et ses domaines ont été exprimés dans différentes cellules procaryotes (Chen et al., 1993) et eucaryotes (Tsai Morris et al., 1990 ; Xie et al., 1990. Braun et al., 1991 ; Vu Hai et al., 1992 ; **Article 14**). Quel que soit le système d'expression utilisé, le taux de récepteurs actifs produits était similaire à celui observé dans les tissus naturels. De plus, le domaine extracellulaire était rarement sécrété. Dans les années 90, le système eucaryote baculovirus-cellules d'insecte avait permis la production abondante de nombreuses glycoprotéines, tels que le domaine extracellulaire du récepteur humain de TSH (Huang et al. 1993), le récepteur humain de FSH (Christophe et al., 1993) ou encore le récepteur de lapin de la prolactine et ses domaines (Cahoreau et al., 1992). L'avantage de ce système était de produire des taux élevés de protéines recombinantes, membranaires et solubles. De plus, ces dernières conservaient les propriétés fonctionnelles et antigéniques de la protéine naturelle. A mon arrivée au laboratoire, Salesse et collaborateurs avaient produit la partie extracellulaire du récepteur de LH (pLHR-297) à l'aide de ce système (Salesse et al., 1991). Ils avaient obtenu une surexpression de cette protéine, à un taux de 2×10^9 récepteurs/cellule (0,6 mg récepteur/mg protéines totales). Cependant, cet ectodomaine n'était pas sécrété et seulement 0,5 % des protéines produites étaient capables de lier l'hormone. Quelles étaient les causes de cette absence de sécrétion ? Quelles stratégies de production pouvaient être envisagées ?

I) Stratégie de production de l'ectodomaine du récepteur de LH

Toutes les protéines de sécrétion néosynthétisées cheminent du réticulum endoplasmique rugueux (RER), aux vésicules de l'appareil de Golgi, puis aux vésicules sécrétoires. Au cours de ce processus, l'étape limitante est le transfert des protéines du RER vers le Golgi. Pour effectuer ce passage, les protéines subissent différentes modifications co- et post-traductionnelles tels que l'excision du peptide signal, une déglycosylation partielle et un repliement intramoléculaire. Il existe un "contrôle de qualité" à la sortie du RER, afin de livrer uniquement des molécules bien repliées aux vésicules de Golgi. Seules les protéines correctement repleyées peuvent atteindre la surface de la cellule.

L'analyse par microséquençage du N-terminal des ectodomains surexprimés pLHR-297 a montré que 60% de ces protéines avaient conservé leur peptide signal (*Article 11*). Cette absence d'excision pouvait être liée à une mauvaise reconnaissance de la séquence d'origine porcine par des signal peptidases d'insecte et/ou une saturation de la machinerie intracellulaire de la synthèse protéique lors de hauts niveaux d'expression. Les protéines produites ne pouvaient donc pas acquérir leur conformation correcte et formaient par conséquent des agrégats intermoléculaires. Les ectodomains pLHR-297 restaient bloqués à l'intérieur des cellules d'insecte *Spodoptera frugiperda* (Sf9) sous forme agrégée et non mature.

Afin de permettre la sécrétion de l'ectodomaine du récepteur de LH porcine, nous avons modifié des paramètres biologiques (*Article 11*), moléculaires (*Article 12*) et avons développé une nouvelle stratégie de production (*Articles 4, 14*).

1) Modification des paramètres biologiques : multiplicité d'infection ou hôte du virus (chenille)

(Article 11)

Les cellules Sf9 surexprimant l'ectodomaine pLHR-297 avaient été infectées avec un baculovirus recombinant à une MOI de 10 pfu/cellule (Salesse et al., 1991). Afin de favoriser la sécrétion de ce domaine, nous avons réalisé des infections avec différentes multiplicités d'infection (MOI) allant de 0.01 à 200 pfu/cellule.

Parallèlement, nous avons produit *in vivo* l'ectodomaine chez l'hôte naturel de baculovirus, la chenille. Deux espèces ont été utilisées : *Spodoptera frugiperda* et *Mamestra brassicae*. Ces chenilles présentaient des sensibilités différentes aux baculovirus recombinants. Nous espérons améliorer la maturation co- et post-traductionnelle des protéines exprimées par rapport aux cellules en culture, et retrouver les protéines sécrétées dans l'hémolymphe.

Malgré le changement de ces paramètres biologiques, aucune sécrétion de l'ectodomaine pLHR-297 n'a pu être détectée dans le milieu de culture ni dans l'hémolymphe (Figure 5).

Toutefois, ces travaux ont permis de montrer que les cellules Sf9 étaient quand même capables d'exprimer cet ectodomaine sous forme active. La quantité produite semblait dépendre des conditions d'infection utilisées, plus particulièrement de la MOI et du degré de dilution des échantillons (Figure 6). La production maximale d'ectodomaine pLHR-297 actif a donc été de 4×10^5 récepteurs/cellule (Tableau 1). Elle a été obtenue avec une MOI de 1 pfu/cellule et une dilution d'un facteur 10 à 50. La dilution a induit la dissociation partielle des pools de récepteurs agrégés et permis la libération des récepteurs actifs piégés dans les agrégats. Elle constitue également un facteur essentiel dans les processus de dénaturation/renaturation, car elle favorise le repliement intramoléculaire des protéines.

La solubilisation de l'ectodomaine pLHR-297 était réalisée à l'aide de détergents. Or ces molécules sont souvent difficiles à éliminer lors des étapes de purification des protéines. De plus, leur présence perturbe les analyses physico-chimiques. L'étude structurale de l'ectodomaine non sécrété pLHR-297 semblait donc difficilement envisageable.

2) Modification de paramètres moléculaires : promoteur ou séquence signal (Article 12)

Dans le virus initial pLHR-297, l'ADNc était placé sous le contrôle du promoteur fort de la polyédrine (Salesse et al., 1991). De plus, cet insert codait pour un ectodomaine contenant la séquence signal d'origine porcine (Figure 7).

Afin de permettre une maturation correcte des protéines exprimées, deux paramètres moléculaires ont été modifiés : la puissance du promoteur et la nature de la séquence signal. J'ai donc construit deux nouveaux baculovirus recombinants, pLHR-P10-297 et pLHR-mel-319. Un seul paramètre a été changé par construction virale. Avec le virus pLHR-P10-297, l'ADNc était alors placé sous le contrôle du promoteur de la protéine P10, promoteur moins puissant que celui de la polyédrine. Pour la construction virale pLHR-mel-319, la séquence signal du R-LH porcin a été remplacée par celle d'une protéine d'insecte abondamment sécrétée, la mélittine (mel).

Pour la première fois, l'ectodomaine du récepteur de LH a pu être sécrété sous forme active dans le milieu de culture, à un taux au moins 10 fois plus élevé que le récepteur entier exprimé dans les tissus naturels (Figure 8).

Les modifications moléculaires ont induit une diminution du taux de protéines produites (6×10^5 récepteurs/cellule *versus* 2×10^9 récepteurs/cellule avec pLHR-297), ce qui

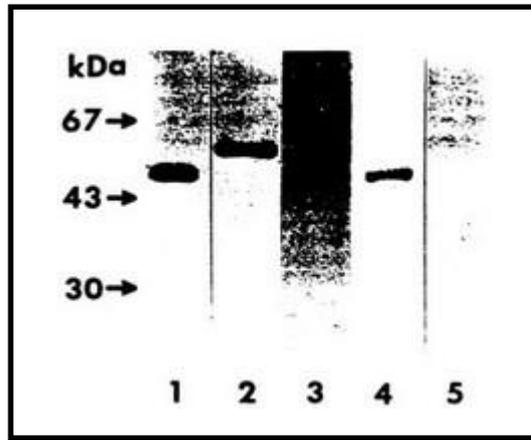


Figure 5 : Immunodétection de l'ectodomaine du récepteur de LH porcin, pLHR-297

Western blot réalisé avec l'anticorps monoclonal LHR775 dirigé contre l'ectodomaine de R-LH dans des conditions dénaturantes. Ectodomaine pLHR-297 dans (ligne 1) cellules Sf9, chenilles (ligne 3) *Spodoptera frugiperda*, (ligne 4) chenilles *Mamestra brassicae*, et (ligne 5) hémolymphe de *Mamestra brassicae*. Ectodomaine long pLHR-370 dans les cellules Sf9 (ligne 2).

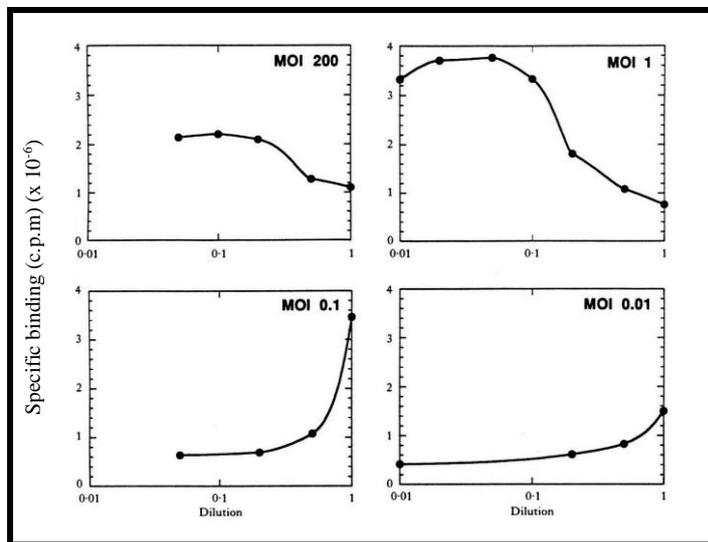


Figure 6 : Expression de l'ectodomaine pLHR-297 sous forme active dans les cellules Sf9

Quantité d'ectodomains actifs estimée grâce à des tests de liaison spécifique. Elle dépend de la MOI utilisée et du facteur de dilution des échantillons. Maximum de production obtenu avec une MOI de 1 pfu/cellule et une dilution d'un facteur 10 à 50. Expériences représentatives.

	pLHR-297	pLHR-P10-297	pLHR-mel-319
Séquence (aa)	1-297	1-297	1-319
Cellules Sf9			
Localisation			
Surnageant	ND	+	+
Intracellulaire	++	+	+
Constante de dissociation (Kd)			
Surnageant		0.3 nM	0.6 nM
Intracellulaire	0.3 nM	0.3 nM	0.6 nM
Nombre de sites par cellule			
Surnageant	ND	1×10^5 - 3×10^5	1×10^5 - 3×10^5
Intracellulaire	4×10^5	1×10^5 - 3×10^5	1×10^5 - 3×10^5
Chenilles			
Localisation			
Homogénat	+	+	+
Hémolymphe	ND	ND	ND
Constante de dissociation (Kd)	1 nM	1 nM	1 nM
Nombre de sites par chenille	2-5 μ g	0.6 μ g	0.3 μ g

ND : non détectable; + quantité exprimée élevée; ++ quantité exprimée plus élevée que +

Tableau 1 : Caractéristiques des ectodomains recombinants exprimés dans les cellules Sf9 et les chenilles

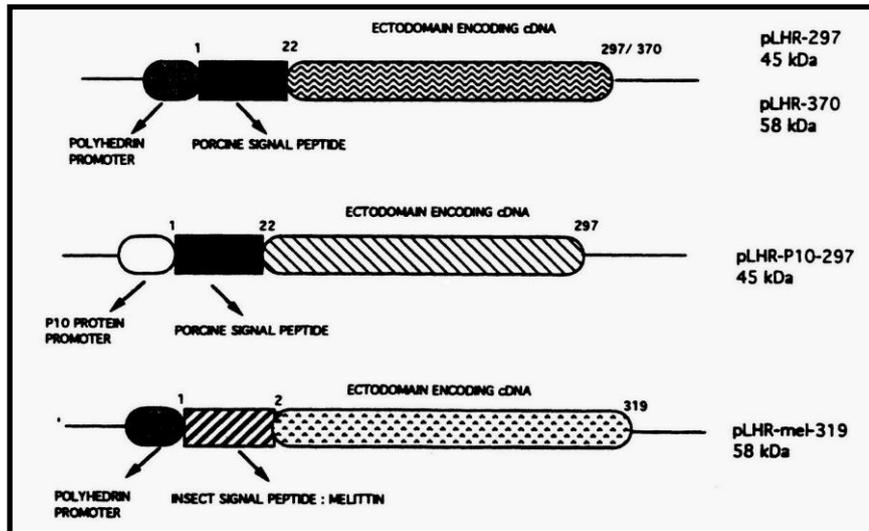


Figure 7 : Constructions d'ADNes codant pour les ectodomains recombinants du récepteur de LH porcin
 Ectodomains pLHR-297, pLHR-370, pLHR-P10-297 et pLHR-mel-319. Poids moléculaires apparents attendus mentionnés sous le nom des protéines. Nombre d'acides aminés les composant indiqué par les chiffres (1 à 370).

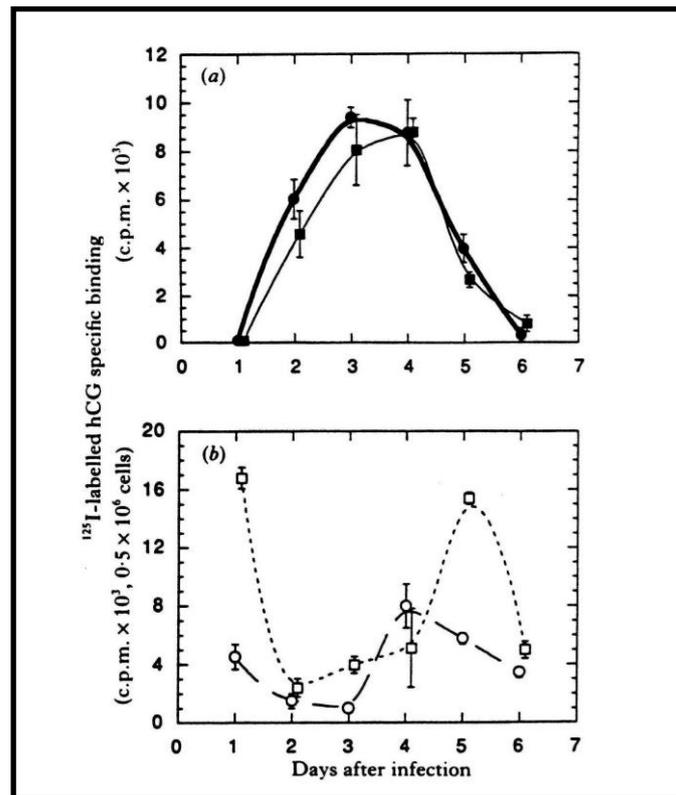


Figure 8 : Cinétique d'expression des ectodomains pLHR-P10-297 et pLHR-mel-319 dans les cellules Sf9
 Cellules d'insecte infectées à une MOI de 25 pfu/cellule. Production de protéines recombinantes suivie par des tests de liaison spécifique de l'hormone hCG dans les surnageants de culture (a) et les cellules (b). (●, ○) ectodomaine pLHR-P10-297 et (■, □) ectodomaine pLHR-mel-319. Les valeurs sont des moyennes ± sem d'expériences indépendantes.

a favorisé l'expression de protéines recombinantes de qualité et permis leur sécrétion (Tableau 1).

Les ectodomains sécrétés étaient très instables malgré la présence d'anti-protéases. Leur association avec l'hormone hCG additionnée dans le milieu de culture en début d'infection, a permis la formation de domaines extracellulaires complexés résistants à la dégradation protéolytique.

Les données présentées dans ces deux sous-chapitres indiquent que la production de l'ectodomaine du récepteur de LH sous forme sécrétée et active était possible avec les cellules d'insecte, à condition que le taux d'expression soit modéré. Cependant, la quantité de protéines immunopurifiées était toujours insuffisante pour la réalisation d'études physico-chimiques, à moins d'envisager une production à grande échelle.

3) Co-expression de l'ecto- et de l'endodomaine

(Articles 4 et 14)

Afin d'augmenter le taux de protéines secrétées, une nouvelle stratégie de production de l'ectodomaine du récepteur de LH a été envisagée. La méthode était basée sur la co-expression de l'ectodomaine avec un autre partenaire, l'endodomaine. Les résultats obtenus sont présentés dans **l'article 4**.

Dans **l'article 14**, nous avons mis en évidence l'existence d'interactions entre l'ecto- et l'endodomaine du récepteur de LH porcin. En effet, l'ectodomaine produit seul dans les cellules COS-7 restait bloqué à l'intérieur des cellules. Alors qu'en présence de l'endodomaine, cette protéine était exportée (Tableau 2).

J'ai donc suivi la même stratégie dans les cellules d'insecte. Pour cela, j'ai construit et sélectionné un virus double recombinant qui contenait les ADNcs codant respectivement pour l'ectodomaine pLHR-297 sous le contrôle du promoteur de la polyédrine et l'endodomaine sous le contrôle du promoteur de la protéine P10 (**Article 4**).

Les cellules Sf9 infectées avec le virus double recombinant sécrétaient l'ectodomaine pLHR-297 dans les surnageants de culture, à un taux proche de 1×10^5 récepteurs/cellule (Figure 9). De plus, elles exprimaient à leur surface un récepteur de LH reconstitué actif, telles que les cellules COS-7 co-transfectées (**Article 14**).

Pour la première fois, l'ectodomaine de ce récepteur était exporté à la surface des cellules à un taux élevé de 8×10^5 récepteurs/cellule. L'endodomaine semblait donc aider l'ectodomaine surexprimé pLHR-297 à se replier correctement et à adopter une conformation favorable à la sécrétion, telle une protéine "chaperon".

Plasmides recombinants	Liaison spécifique de [¹²⁵ I]hCG (cpm/puits)	
Antisense pLHR	400 ± 150	(n = 12)
Récepteur entier pLHR	10500 ± 2500	(n = 12)
Ectodomaine (1-297)	350 ± 130	(n = 9)
Endodomaine (298-696)	1200 ± 320	(n = 9)
Ectodomaine (1-297) + Endodomaine (298-696)	3250 ± 1250	(n = 12)

Tableau 2 : Expression d'un récepteur de LH reconstitué à la surface des cellules COS-7
 Test de liaison spécifique de l'hormone hCG. Les valeurs sont des moyennes ± sem. n=nombre de puits expérimentaux

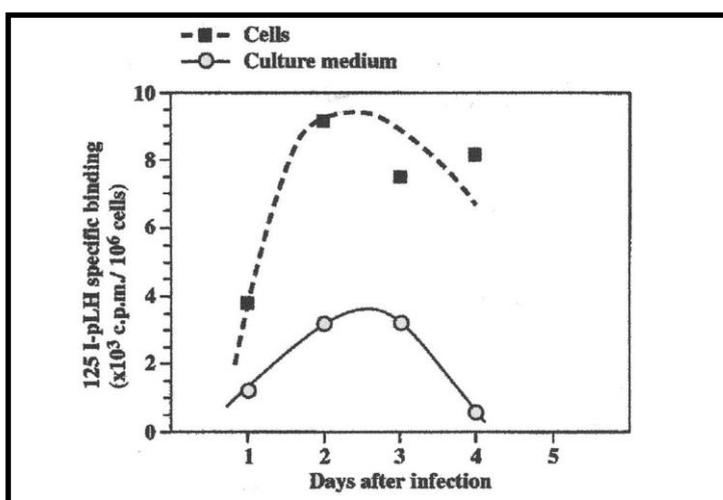


Figure 9 : Cinétique de liaison de [¹²⁵I]pLH à la surface des cellules Sf9 et dans les surnageants de culture. Les cellules ont été infectées par un virus double recombinant codant pour l'ectodomaine pLHR-297 et l'endodomaine (298-696), à une MOI de 25 pfu/cellule. Milieu de culture (○) et surface cellulaire (■). Expériences représentatives.

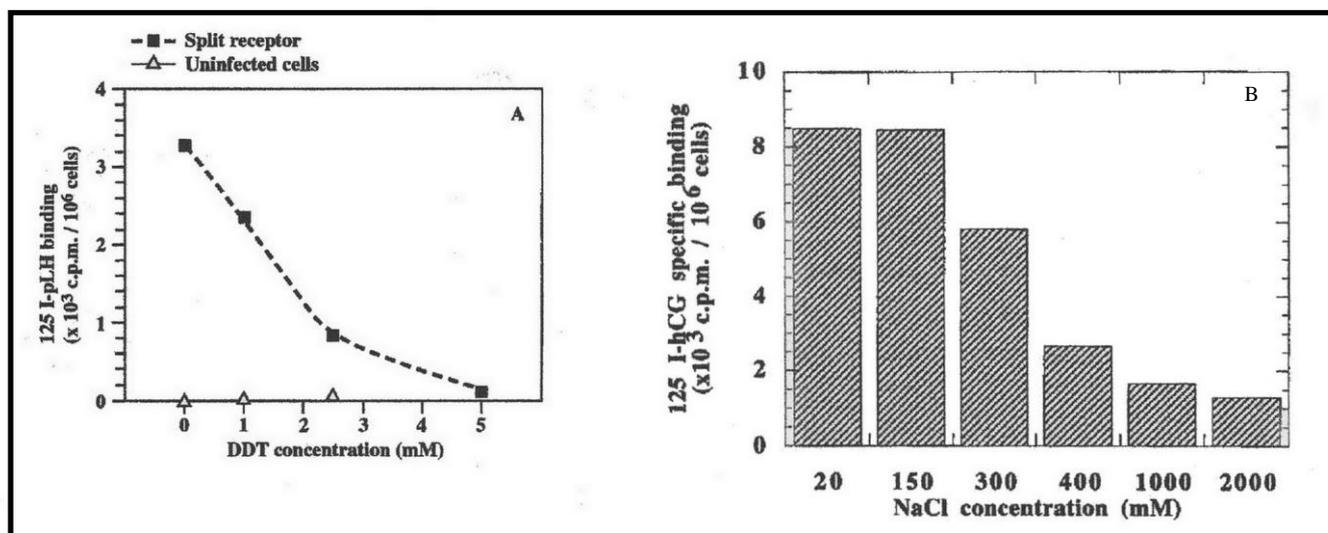


Figure 10 : Effets du DTT et de la force ionique sur les capacités de liaison du récepteur de LH reconstitué
 Les cellules exprimant le récepteur reconstitué ont été incubées avec [¹²⁵I]pLH ou [¹²⁵I]hCG pendant 2 h, puis ont été traitées avec des concentrations croissantes de DTT (A) ou de NaCl (B). La liaison spécifique des hormones à la surface des cellules a été déterminée pour chaque condition expérimentale. Expériences représentatives.

Les interactions établies entre l'ecto- et l'endodomaine semblaient être de deux types, covalentes et salines (Figure 10). Les résidus cystéines impliqués restaient cependant à déterminer.

De nombreuses perspectives se sont dégagées de cette étude dont : 1) la réduction des ponts disulfures établis entre ces deux domaines afin de libérer l'ectodomaine; 2) la réalisation d'études fonctionnelles et structurales sur le récepteur reconstitué étant donné sa résistance à la protéolyse contrairement au récepteur entier natif. Des travaux similaires étaient également envisagés avec l'endodomaine.

II) Etude des chaînes polysaccharidiques des ectodomains du récepteur de LH

(Article 5)

La plupart des protéines sécrétées sont glycosylées. Les sucres sont greffés sur l'asparagine pour les N-glycannes et la sérine ou la thréonine pour les O-glycannes. Les oligosaccharides liés à N jouent un rôle majeur dans le repliement des protéines, la formation des ponts disulfures intramoléculaires et empêchent l'agrégation des protéines. Ces chaînes semblent indispensables à l'expression de protéines fonctionnelles à la surface des cellules et à la sécrétion des protéines (Liu et al., 1993, Clouser et al., 2005). Les glucides liés en O ont un rôle crucial dans l'acquisition de l'activité biologique des protéines *in vivo*.

Parmi les 6 sites potentiels de N-glycosylation présents sur le domaine extracellulaire du récepteur de LH natif (McFarland et al., 1989; Loosfelt et al., 1989; Zhang et al., 1991; Liu et al., 1993), 3 sont particulièrement glycosylés (Asn 77, 173, 289) (Figure 3) (Vu Hai et al., 2000). Bien que plusieurs sites de O-glycosylations existent, aucun sucre lié en O n'a été observé (Keinänen et al., 1988; Petäjä-Repo et al., 1993). Dans *l'Article 5*, nous avons analysé et comparé la composition glucidique des ectodomains pLHR-297 et pLHR-P10-297 produits dans les cellules Sf9.

Malgré une séquence polypeptidique identique, les ectodomains présentaient une structure glycanne différente. Le domaine cellulaire pLHR-297 était composé uniquement de N-glycosylations, alors que l'ectodomaine pLHR-P10-297 portait des chaînes N-glycannes de type complexe et/ou hybride et des O-glycannes (Tableau 4). Les acides aminés Asn-77 et Ser-79 seraient porteurs respectivement de N- et O-glycosylations.

Les chaînes glycannes identifiées sont résumées dans les tableaux 3 et 4. Leur composition explique parfaitement le comportement des ectodomains (Figure 11). En effet,

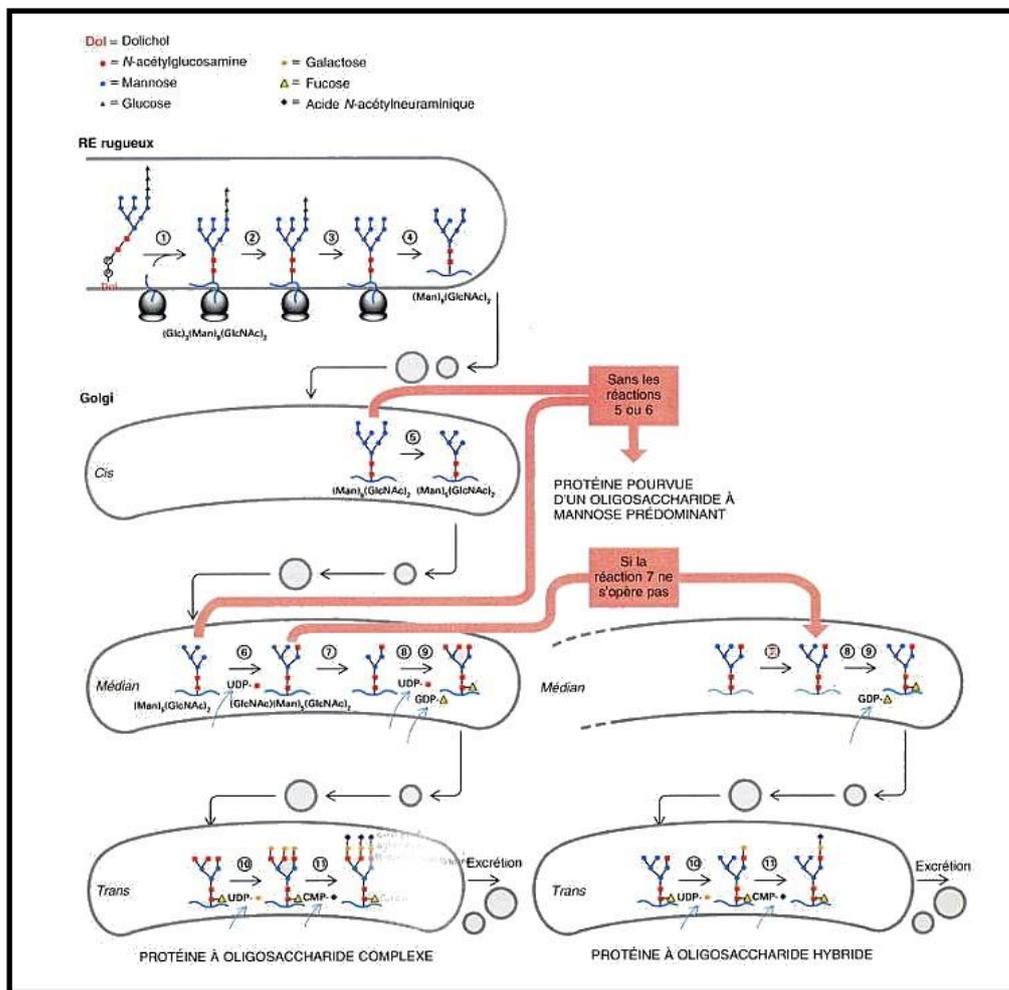


Figure 11 : Remaniement des oligosaccharides liés sur les asparagines.

A gauche du dessin, formation des chaînes glycanes complexes et à droite des chaînes à mannose prédominant et des chaînes hybrides. (D'après Lodish et al., 1997)

ctodomaines recombinants	β -galactose	Acide Sialique	α et β -GalNAc	α -mannose	β -GlcNAc	α -glucose	α -fucose
pLHR-297 cellulaire	-	-	++	++++	-	++++	+
pLHR-P10-297 sécrété	++++	+	+++	++	+	++	-

Tableau 3 : Composition glucidique des ectodomaines recombinants sécrétés et cellulaires exprimés dans les cellules Sf9. Révélation par la technique ELISA avec des lectines biotinylées.

	PM ajouté	Forme majoritaire			Forme minoritaire = contaminants		
		Type de Glycannes	Composition glucidique	Protéine exprimée	Type de Glycannes	Composition glucidique	Protéine exprimée
pLHR-297 cellulaire	18 kDa	N-	Riche en mannose et en glucose	Précurseur immature	N- O-	Fucose, GlcNAc GalNAc	* Protéines passées dans le Golgi (cis, médian) * Protéines des cellules et/ou pLHR-297 actif
pLHR-P10-297 sécrété	10 kDa 19 à 26 kDa	N- O-	Type complexe ou hybride GalNAc et galactose	Glycoprotéine sécrétée	N-	Riche en mannose	* Précurseur immature * Débris cellulaires

Tableau 4 : Nature des ectodomaines synthétisés par les cellules Sf9

GalNAc : galactosamine, GlcNAc : glucosamine

une glycoprotéine sécrétée de mammifère comporte des galactoses et des acides sialiques terminaux au niveau des N- et O-glycosylations (~pLHR-P10-297). Alors que des protéines précurseurs immatures retenues dans le RER sont riches en mannose (~pLHR-297). Les cellules d'insecte Sf9 sont reconnues actuellement pour être incapables de produire des sialoglycoprotéines. L'identification d'acides sialiques indiquent donc l'existence de protéines contaminantes dans les échantillons analysés. Le même phénomène explique la détection des formes protéiques minoritaires.

L'excès et la variabilité du poids moléculaire apparent de l'ectodomaine pLHR-P10-297, 58-68 kDa au lieu de 45 kDa (Loosfelt et al., 1989), seraient liés aux chaînes O-glycosylées. Ces oligosaccharides sont très hétérogènes et entraînent une surestimation de la masse protéique.

Contrairement au domaine pLHR-P10-297, l'ectodomaine sécrété pLHR-mel-319 présente un poids moléculaire apparent correct (58 kDa). Cette différence serait liée à l'activité temporelle des promoteurs sous lesquels les ADNc_s sont placés. Le promoteur de la polyédrine est tardif, alors que celui de la protéine P10 est précoce. En phase tardive de l'infection, les cellules d'insecte affaiblies greffent généralement des chaînes glycannes courtes voir incomplètes sur les protéines.

Le type et l'extension des N-glycosylations sont connus pour dépendre de la glycoprotéine exprimée, de la lignée cellulaire utilisée, de l'environnement et de la période post-infection virale. Depuis la publication de cet article, les propriétés du système baculovirus-cellules d'insecte sont mieux connues. Les cellules Sf9 s'avèrent être peu favorables à la synthèse de protéines greffées de chaînes glycannes complexes et porteuses d'acides sialiques terminaux. Elles synthétisent généralement des protéines riches en mannose. Pour faire face à cette incapacité de synthèse, des modifications génétiques sont actuellement apportées aux cellules d'insecte et/ou aux baculovirus, afin de permettre l'expression des glycosyltransférases impliquées dans la sialylation des glycoprotéines (Legardinier et al., 2005).

III) Conclusion du chapitre I

Au cours de ces travaux, nous avons montré que le blocage de l'ectodomaine pLHR-297 à l'intérieur des cellules Sf9 était lié à la surexpression de cette protéine. Les enzymes impliquées dans les modifications co- et post-traductionnelles semblaient donc être submergées et inefficaces.

Nous avons également établi et optimisé les conditions de production permettant la sécrétion de cet ectodomaine sous forme active. Cependant, la quantité de protéines produites était encore insuffisante pour réaliser des études physico-chimiques.

Par ailleurs, la composition glucidique différente entre les protéines recombinantes et natives suggère des caractéristiques structurales divergentes entre ces protéines.

L'ensemble de ces données indiquait donc que les cellules d'insecte Sf9 ne constituaient pas le système d'expression le plus adapté pour la production de la partie extracellulaire du récepteur de LH porcine. Le laboratoire a donc choisi par la suite de se réorienter vers une production à grande échelle du complexe hormone-ectodomaine à l'aide de cellules de mammifères (Remy et al., 2001).

Bibliographie

- Abayasekara D.R.E**, Band A.M & Cooke B.A (1990) Evidence for the involvement of phospholipase A2 in the regulation of luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis in rat testis Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 70, 147-153.
- Biou V**, Gibrat J.F, Levin J.M, Robson B & Garnier J (1988) Secondary structure prediction : combination of three different methods. *Protein Engineering* 2, 185-191.
- Bortolussi M**, Marini G, Rolandi M.T & Colombo L (1981) In vitro binding of ¹²⁵I-hCG to the rat ovary from birth to puberty. *Cell. Tissue. Res* 214, 633-640
- Braun T**, Schofield P.R & Sprenger R (1991) Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J* 10, 1885-1890
- Cahoreau C**, Petridou B, Cerutti M, Djane J & Devauchelle G (1992) Expression of the full-length rabbit prolactin receptor and its specific domains in baculovirus infected insect cells. *Biochimie* 74, 1053-1065
- Chen W** & Bahl O.P (1993) High expression of the hormone binding active extracellular domain (1-294) of rat lutropin receptor in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Endocrinol*, 91, 35-41
- Christophe S**, Robert P, Maugain S, Bellet D, Koman A & Bidart J.M (1993) Expression of the human follicle-stimulating hormone receptor in the baculovirus system. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 402-408
- Clouser C.L** & Mcnon K.M.J (2005) N-linked glycosylation facilitates processing and cell surface expression of rat luteinizing hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol* 235, 11-19
- Combarnous Y** (1996) Relation structure-activité des gonadotropines, dans "Biochimie des communications cellulaires" p45, Editions TEC & TOC, Lavoisier, France
- Combarnous Y** (2004) Les hormones glycoprotéiques, dans "Communications et signalisations cellulaires".p35, Editions TEC & TOC, Lavoisier, France
- Davis J.S**, Weakland L.L, West L.A & Farese R.V (1986) Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol triphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. Evidence of phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J* 239, 597-604
- Dufy-Barbe** (1984) Les hormones de l'hypothalamus. *La Recherche* 15, 1352-1360
- Huang G.C**, Page M.J, Nicholson L.B, Collison K.S, McGregor A.M & Banga J.P (1993) The thyrotropin hormone receptor of Grave's disease : baculovirus, immunoaffinity, purification and analysis of autoantibody binding. *J. Mol. Endocrinol* 10, 127-142
- Lodish**, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira & Darnell (1997) Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Université. 3^{ème} Edition.
- Kobe B** & Deisenhofer J (1993) Crystallization and preliminary X-ray analysis of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *J Mol Biol* 231, 137-140.
- Koo Y.B**, Ji I, Slaughter R.G & Ji T.H (1991) Structure of the luteinizing hormone receptor gene and multiple exons of the coding sequence. *Endocrinology* 128, 2297-2308.
- Laphorn A.J**, Harris D.C, Littlejohn A, Lustbader J.W, Canfield R.E, Machin K.J, Morgan F.J & Isaacs N.W (1994) Crystal structure of the human chorionic gonadotropin. *Nature* 369, 455-461.

- Lee P.S**, Buchan A.M, Hsueh A.J, Ho Yuen B & Leung P.C (2002) Intracellular calcium mobilization in response to the activation of human wild-type and chimeric gonadotropin receptors. *Endocrinology* 143 (5) 1732-1740
- Legardinier S**, Klett D, Poirier JC, Combarnous Y & Cahoreau C (2005) Mammalian-like nonsialyl complex-type N-glycosylation of equine gonadotropins in MimicTM insect cells. *Glycobiology* 45 (3), 255-259.
- Liu X**, Davis D & Segaloff D.L (1993) Disruption of potential sites for N-linked glycosylation does not impair hormone binding to the lutropin/choriogonadotropin receptor if Asn-173 is left intact. *J. Biol. Chem* 268 (3) 1513-1516.
- Loosfelt H**, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai-Luu T.M, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallal B, Garnier J & Milgrom E (1989) Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA : variants lacking transmembrane domain. *Science* 245, 525-528
- Keinänen K.P** (1988) Effect of deglycosylation on the structure and hormone-binding activity of the lutropin receptor. *Biochem. J* 256, 719-724
- McFarland K.C**, Sprengel R, Phillips H.S, Köhler M, Rosemblyt N, Nokolics K, Segaloff D.L & Seeburg P.H (1989) Lutropin-choriogonadotropin receptor : an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245, 494-499
- Minegishi T**, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y & Igarashi M (1990) Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 1049-1054
- Petäjä-Repo U.E**, Merz W.E & Rajaniemi H.J (1993) Significance of the carbohydrate moiety of the rat ovarian luteinizing-hormone/chorionic-gonadotropin receptor for ligand-binding specificity and signal transduction. *Biochem. J*, 292, 839-844
- Peyrat J.P**, Meusy-Dessolle N & Garnier J (1981) Changes in Leydig cells and luteinizing hormone receptors in porcine testis during postnatal development. *Endocrinology* 108, 625-631
- Remy J.J**, Nespoulous C, Grosclaude J, Grébert D, Couture L, Pajot E & Salesse R (2001) Purification and structural analysis of a soluble human choriogonadotropin hormone-receptor complex. *J. Biol. Chem* 276 (3) 1681-1687
- Salesse R**, Remy J.J, Levin J.M, Jallal B & Garnier J (1991) Towards understanding the glycoprotein hormone receptors. *Biochimie* 73, 109-120
- Segaloff D.L** & Ascoli M (1993) The lutropin/choriogonadotropin receptor, 4 years later. *Endocr Rev* 14, 324-344
- Thibault C** & Levasseur M.C (1991) La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses, Edition marketing.
- Tsai Morris C-H**, Buczko E, Wang W & Dufau M.L (1990) Intronic nature of the rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity. *J. Biol. Chem* 265, 19385-19388
- Vu Hai-Luuthi M.T**, Houllier A, Jallal B, Salesse R, Bidart J.M, Houllier A, Guiochon-Mantel A, Garnier J & Milgrom E (1990). Monoclonal antibodies against luteinizing hormone receptor. Immunochemical characterization of the receptor. *Endocrinology* 127, 2090-2098
- Vu Hai-Luuthi M.T**, Misrahi M, Houllier A, Houllier A & Milgrom E (1992) Variant forms of the pig lutropin/choriogonadotropin receptor. *Biochemistry* 31, 8377-8383
- Vu Hai M.T**, Huet J.C, Echasserieau K, Bidart J.M, Floiras C, Pernoller J.C & Milgrom E (2000) Posttranslational modifications of the lutropin receptor : mass spectrometric analysis. *Biochemistry* 39 (18), 5509-5517.
- Wu H**, Lustbader J.W, Liu Y, Canfield R.E & Hendrickson W.A (1994) Structure of the human chorionic gonadotropin at 2.6Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure* 2, 545-558
- Xie Y.B**, Wang H & Segaloff D.L (1990) Extracellular domain of lutropin/choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity. *J. Biol. Chem* 265, 21411-21414
- Zhang R**, Tsai Morris C-H, Kitamura M, Buczko E & Dufau M.L (1991) Changes in binding activity of luteinizing hormone receptors by site-directed mutagenesis of potential glycosylation sites. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 804-808

CHAPITRE II
CARTOGRAPHIE IMMUNOPEPTIDIQUE DU RECEPTEUR
DE LH PORCIN

(Article 7 : Remy et al., 1996; Article 8 : Couture et al., 1996a;
Article 9 : Couture et al., 1996b)

Parallèlement à l'étude structurale du récepteur de LH, le laboratoire avait entrepris une cartographie immuno-peptidique de ce récepteur et du complexe hormone-ectodomaine. Au cours de ma thèse, je me suis également intégrée dans cette thématique. Les études réalisées ont permis la publication de trois articles, dont une revue (*Article 7*). L'objectif de ces travaux était d'identifier les interactions établies entre l'hormone et les deux domaines du récepteur de LH.

Les expériences ont été réalisées avec le récepteur de LH exprimé dans les cellules CHO, des peptides répliques des deux domaines du récepteur (ectodomaine et boucles extracellulaires de l'endodomaine), et des anticorps dirigés contre ces peptides et les sous-unités de l'hormone LH/CG. Les effets de ces outils moléculaires ont été observés sur les capacités du récepteur de LH à lier l'hormone et à transduire le signal.

L'Article 9 montre que l'ectodomaine participe à la liaison de l'hormone et à la transduction du signal (Tableau 5 et Figure 12). Les régions minimales impliquées dans la liaison hormonale semblaient être les séquences 21-24 et 102-107. Les segments peptidiques voisins de ces dernières joueraient plutôt un rôle dans la transduction du signal.

L'Article 8 montre que la boucle extracellulaire EL2 de l'endodomaine interagit avec la région N-terminale de la sous-unité α de LH/hCG. Ces interactions seraient indispensables à la production de second messager, mais n'influenceraient pas la liaison à haute affinité de l'hormone avec l'ectodomaine.

La cartographie immuno-peptidique a permis de déterminer des régions importantes pour la liaison et/ou la transduction hormonale sur l'ecto- et l'endodomaine du récepteur de LH. L'interaction entre l'ectodomaine et l'hormone se produit par des régions multiples et discontinues. Enfin, l'endodomaine, via ses boucles extracellulaires, interviendrait de manière directe dans la liaison du ligand et la transduction du signal (Roche et al., 1992; Ji et al., 1995). Les boucles EL1 et EL2 lieraient la sous-unité α de l'hormone (Ji et al., 1991,

Peptides	Liaison IC50 ± SE (M x 10 ⁻⁶)	Production d'AMPC IC50 ± SE (M x 10 ⁻⁶)	Rôle de ces régions
25-40	225 ± 75	6.5 ± 3.5	Transduction
7-24	130 ± 70	125 ± 25	Liaison et Transduction
21-36	88 ± 11	300 ± 50	Liaison
102-111	240 ± 70	500 ± 50	Liaison
107-121	>1 Mm	70 ± 30	Transduction
102-121	207 ± 103	650 ± 50	Liaison

La liaison : IC50 pour pLH = 10⁻⁹ M; La transduction : IC50 pour pLH = 2 x 10⁻¹² M

Tableau 5 : Capacité des peptides répliques de l'ectodomaine du récepteur de LH porcine à inhiber la liaison de l'hormone [¹²⁵I]pLH et la transduction du signal dans les cellules CHO

Les valeurs sont des moyennes ± sem d'expériences indépendantes.

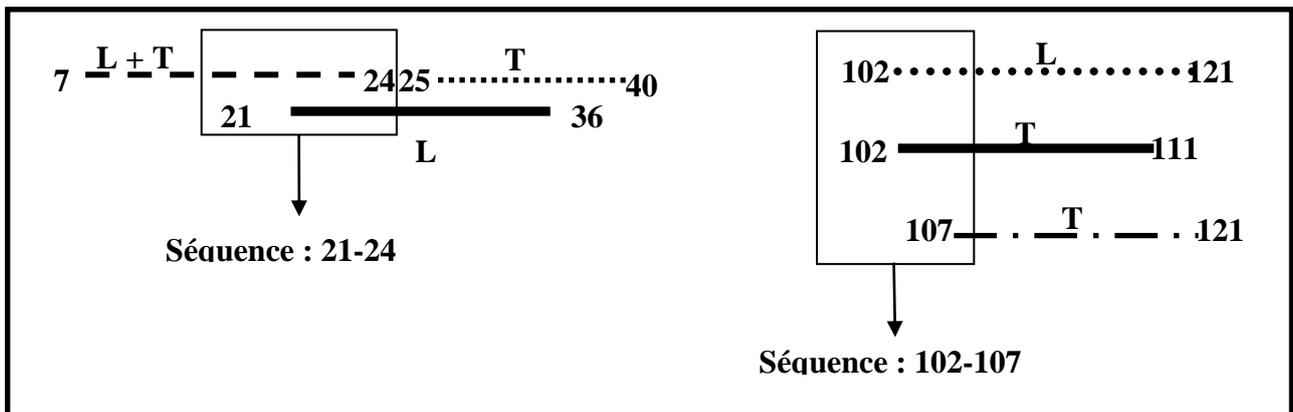
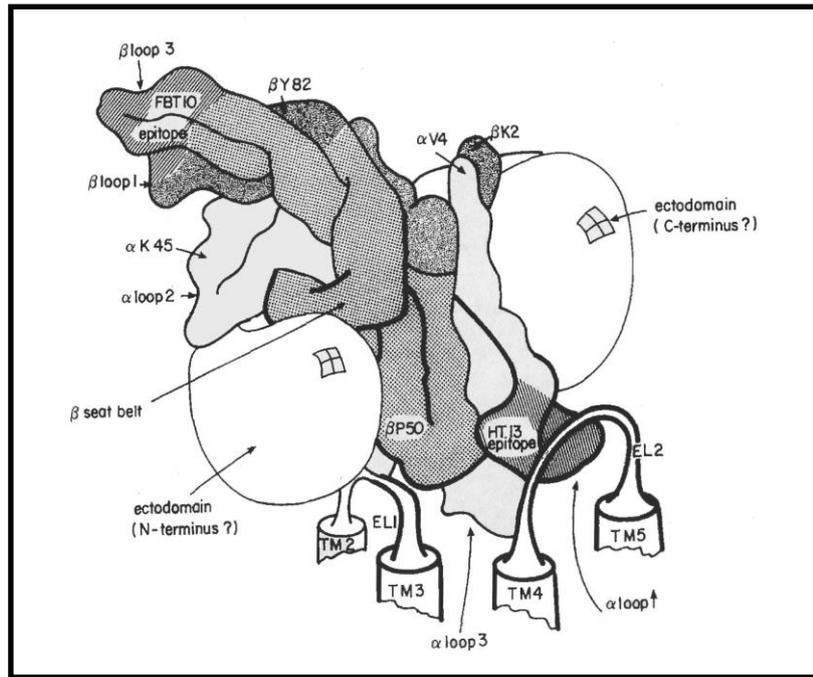


Figure 12 : Séquences peptidiques minimales impliquées dans la liaison de l'hormone

L : Liaison, T : Transduction, L+T : Liaison et Transduction

A)



B)

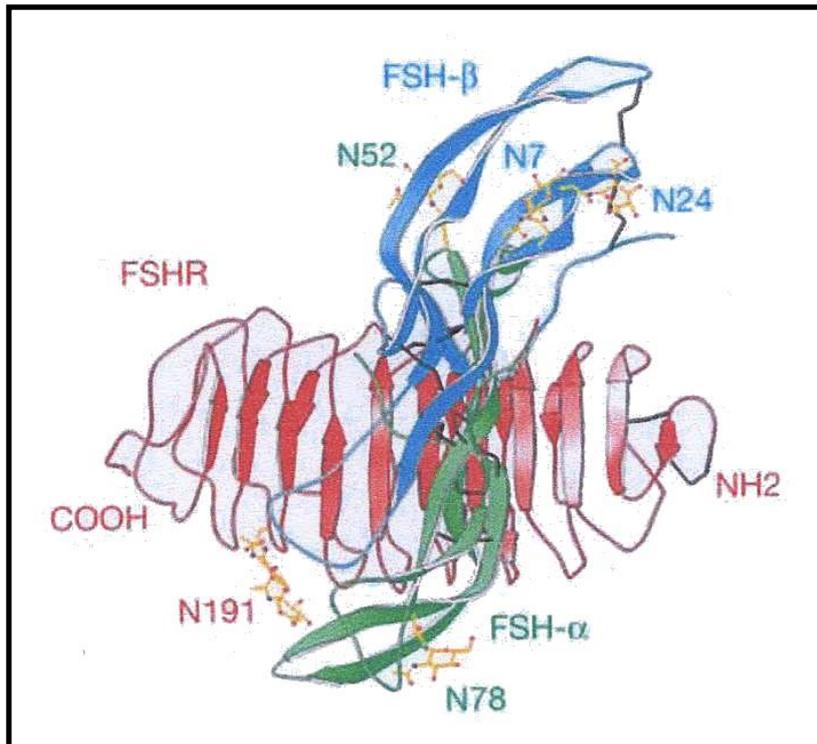


Figure 13 : Conformation des complexes hormone-ectodomaine des récepteurs de LH et de FSH

A) Modélisation du complexe LH-ectodomaine (Remy et al., 1996)

B) Structure tridimensionnelle du complexe FSH-ectodomaine (Fan et al., 2005)

1993; Couture et al., 1996a) avec une faible affinité ($K_d \sim 10^{-6}$ M), alors que EL3 interagissait avec la sous-unité β de LH/hCG. Dans l'article 7, une modélisation du complexe LH-ectodomaine avait été réalisée (Figure 13a). Cependant, ce modèle est erroné. Actuellement, pour définir une localisation spatiale des zones d'interaction entre l'hormone LH et l'ectodomaine, nous devons nous référer à la structure tridimensionnelle du complexe FSH-ectodomaine établie par Fan et collaborateurs en 2005 (Figure 13b). L'orientation de l'ectodomaine du récepteur de FSH serait inversée par rapport à celle proposée dans le modèle du complexe LH-ectodomaine. En positionnant l'hormone LH comme dans notre modèle, la partie N-terminale du récepteur de LH deviendrait alors la partie C-terminale. Toutefois, seule la résolution tridimensionnelle du complexe LH-ectodomaine permettra de définir exactement les régions et les acides aminés impliqués dans ces interactions (Remy et al., 2001).

Bibliographie

- Fan Q.R** & Hendrickson W.A (2005) Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 433 (7023), 269-277.
- Ji I** & Ji T.H (1991) Asp 383 in the second transmembranaire domain of the lutropin receptor is important for high affinity hormone binding and cAMP production. *J. Biol. Chem* 266, 14953-14957
- Ji I**, Zeng H & Ji T.H (1993) Receptor activation and signal generation by the lutropin/choriogonadotropin receptor. Cooperation of Asp397 of the receptor and α Lys91 of the hormone. *J. Biol. Chem* 268, 22971-22974
- Ji I** & Ji T.H (1995) Differential role of the exoloop 1 of the human follicle-stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. *J. Biol. Chem* 270, 15970-15973
- Remy J.J**, Nespoulos C, Grosclaude J, Grébert D, Couture L, Pajot E & Salesse R (2001) Purification and structural analysis of a soluble human choriogonadotropin hormone-receptor complex. *J. Biol. Chem* 276 (3) 1681-1687
- Roche P.C**, Ryan R.J & McCormick D.J (1992) Identification of hormone-binding regions of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor using synthetic peptides. *Endocrinology* 131, 268-274

CHAPITRE III : ENDOCYTOSE DU RECEPTEUR DE LH PORCIN

(Article 6 : Bozon et al., 1998)

Afin de réguler la transduction du signal hormonal, les cellules de Leydig porcines en culture primaire internalisent les deux hormones pLH et hCG. Cependant, l'internalisation de LH est au moins 10 fois supérieure à celle de l'hCG, (Salesse et al., 1983). De plus, lorsque le récepteur de LH est "down régulé", le processus d'endocytose de l'hCG est fortement inhibé, contrairement à celui de la LH qui n'est pas affecté (Salesse et al., 1987, 1989). La différence de comportement entre ces hormones pourrait être liée aux polysaccharides terminaux présents sur leurs chaînes N-glycannes. En effet, l'hormone LH présente des sucres sulfatés, alors que l'hCG porte des acides sialiques (Figure 14). Deux voies différentes d'internalisation seraient alors mises en jeu : 1) via le récepteur de LH : l'hormone hCG ainsi qu'une petite proportion de l'hormone pLH seraient endocytosées *via* ce récepteur; 2) via une autre protéine membranaire probablement de type lectine : la majorité de LH serait internalisée par cette protéine. Dans *l'article 6*, nous avons caractérisé la voie d'internalisation de l'hormone LH par cette lectine membranaire.

La fixation des hormones à la surface des cellules de Leydig, leur endocytose, ainsi que leur devenir à l'intérieur des cellules ont été mesurés en présence de polysaccharides sulfatés (fucoïdine, chondroïtine 4- ou 6- sulfate) ou non (hyaluronate). Ces analyses ont été complétées par des observations réalisées en microscopie électronique.

L'endocytose des hormones pLH et hCG implique le rassemblement des complexes hormone-récepteur dans des puits recouverts, puis une internalisation dans des vésicules recouvertes et un passage dans les endosomes.

Seule l'endocytose de pLH est inhibée par les différents composés cités dans le tableau 6. L'internalisation de cette hormone nécessiterait de l'énergie et serait sensible aux polysaccharides sulfatés, au froid, à la force ionique, aux chélateurs de cations divalents et aux agents réducteurs des ponts disulfures. L'endocytose de LH par les cellules de Leydig en culture primaire impliquerait les sucres sulfatés terminaux des chaînes N-glycannes de cette hormone et une lectine membranaire de type C (Drickamer et al., 1988; Fiete et al., 1991). Ce processus d'internalisation est spécifique de LH, malgré la mesure d'une faible affinité de liaison.

Ce mécanisme est absent des cellules eucaryotes CHO et Sf9 exprimant le récepteur de LH porcine et est plus faiblement représenté dans les cellules de la granulosa porcine en culture primaire.

Les cellules porcines de Leydig et de la granulosa utiliseraient deux mécanismes d'internalisation pour pouvoir répondre aux stimulations pulsatiles de la LH : le récepteur

de LH et une lectine membranaire. Le récepteur de LH est un système à haute affinité, de faible capacité et peut être dégradé par "down regulation". Alors que la lectine présente une faible affinité et est probablement exprimée abondamment à la surface des cellules. Cette lectine permettrait d'éliminer la majorité de l'hormone LH présente localement autour du récepteur. Les cellules pourraient ainsi répondre rapidement à de nouvelles stimulations hormonales.

Bibliographie

Drickamer K, (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem* 263, 9557-9560

Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O & Baenziger J.U (1991) A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc β 1, 4GlcNAc β 1, 2Man α that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 67, 1103-1110

Genty N, Salesse R & Garnier J (1987) Internalization and recycling of lutropin receptors upon stimulation of porcine lutropin and human choriogonadotropin in porcine Leydig cells. *Biol. Cell* 59, 129-136

Salesse R, Genty N & Garnier J (1983) Lutropin is processed much more rapidly than human choriogonadotropin by porcine Leydig cells in primary culture. *Biol. Cell* 49, 185-190

Salesse R, Genty N, Dacheux F, Jallal B & Garnier J (1987) Régulation à court terme des récepteurs gonadotropes par la LH et l'hCG. *Coll. Soc. Fr. Fertil* 25, pp 27-50

Salesse R, Dacheux F, Genty N & Garnier J (1989) Dual internalization pathways for lutropin and choriogonadotropin in porcine Leydig cells in primary culture. *Biol. Cell* 66, 297-306

CHAPITRE IV : IMMUNOCONTRACEPTION

(Article 13 : Remy et al., 1993a)

Une valorisation industrielle de la production de l'ectodomaine recombinant avait été envisagée dans le domaine de l'immunocastration des animaux mâles d'élevages et de compagnie. Cette technique vaccinale avait pour but de remplacer la castration chirurgicale. Une vaccination contraceptive serait moins traumatisante, préserverait un certain taux circulant de stéroïdes endogènes et limiterait les rejets de nitrates, du moins pour les porcs.

Dans de nombreuses espèces, la LH est la principale hormone responsable de l'initiation de la spermatogenèse et de l'acquisition des caractères sexuels secondaires. Pour empêcher (ou retarder) la maturité sexuelle et induire une stérilité (ou un retard de fertilité), il suffirait de bloquer l'action de cette hormone chez des mâles prépubères. En l'absence d'antagonistes spécifiques du récepteur de LH, nous avons proposé de moduler la fertilité par vaccination. Des souris mâles prépubères ont donc été immunisées à l'aide de l'ectodomaine purifié pLHR-297 ou d'une forme plus longue pLHR-370 (Figure 7). La fertilité a été estimée en dénombrant les descendance. Les résultats sont présentés dans *l'Article 13*.

L'immunisation a induit une baisse de fertilité chez les mâles traités. Cette diminution dépendait de la souche de souris utilisée, de la forme de l'ectodomaine injectée et du nombre de jours laissés entre l'immunisation et l'accouplement. La baisse maximale de fertilité était de 75% et était observée deux mois après l'immunisation des souris Jhp traitées avec l'ectodomaine long pLHR-370 (Figure 15). Le taux d'anticorps anti-récepteur restait constant dans le sérum des animaux durant ces 2 mois.

Chez les animaux immunisés, la concentration sanguine de testostérone diminuait alors que la quantité d'anticorps anti-récepteur de LH augmentait (Tableau 7 et Figure 16). La testostérone reflète l'activité stéroïdogénique des cellules de Leydig *via* la stimulation du récepteur de LH (Figure 17). La baisse de ce stéroïde sexuel suggère que les anticorps anti-ectodomaine agissent comme des "antagonistes-like" sur le récepteur de LH.

Le traitement induit chez ces animaux un retard de la maturité sexuelle plutôt qu'une perte de fécondité.

Ces résultats prometteurs ont incité les chercheurs du laboratoire à poursuivre ces expériences en recherchant un antigène capable de provoquer une stérilité réversible et totale. Des séries d'immunisation ont été réalisées avec des séquences peptidiques spécifiques de l'ectodomaine du récepteur de LH (Remy et al., 1995, 1996) et de FSH. Seules les études réalisées avec l'ectodomaine du récepteur de FSH ont permis l'obtention d'une stérilité totale des mâles immunisés. Rao et collaborateurs (2004) ont montré

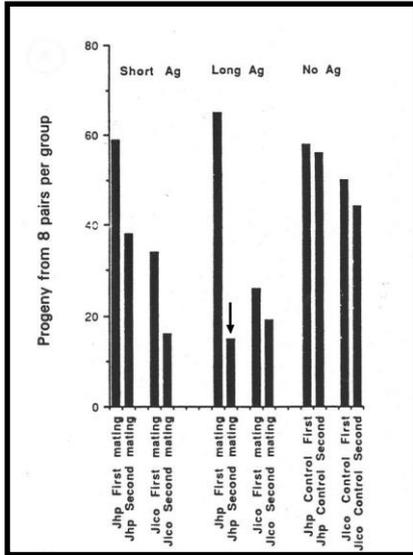


Figure 15 : Taux de fertilité de souris mâles traitées contre R-LH.

2 souches de souris Balb/c, Jhp et Jico, immunisées Contrôles : avec pLHR-297 (short Ag), pLHR-370 (long Ag). Accouplement des mâles traités 10 jours (first mating) et 2 mois (second mating) après immunisation. Nombre de petits issus de 8 couples. ↓ baisse maximale de fertilité.

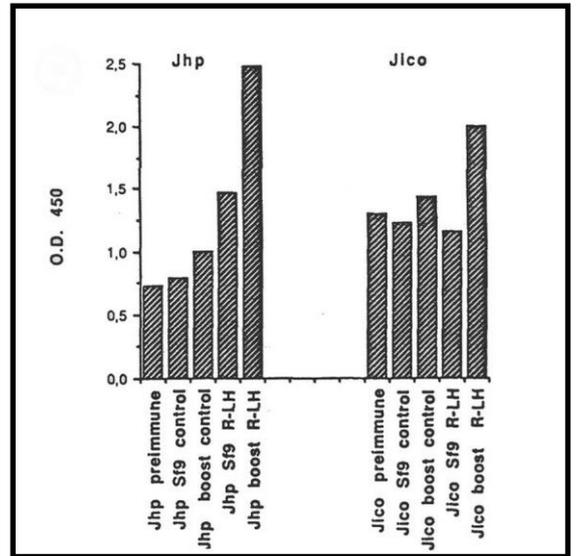


Figure 16 : Taux d'anticorps anti-R-LH

Prélèvement de sang chez les souris avant immunisation (preimmune), 3 semaines (Sf9 R-LH) ou 10 jours après l'injection de pLHR-370 (boost). Cellules non infectées (Sf9 control) et tampon (boost control).

Mouse sera	Testosterone ng/ml
Jico control	14.85 ± 3.3
Jico first mating	6.2 ± 1.9 (<i>P</i> < 0.05)
Jico second mating	7.3 ± 2.3 (<i>P</i> < 0.05)
Jhp control	2.1 ± 0.8
Jhp first mating	0.47 ± 0.23 (<i>P</i> < 0.01)
Jhp second mating	1.1 ± 0.6 (<i>P</i> < 0.05)

Tableau 7 : Concentration de Testostérone circulante
Les valeurs sont des moyennes ± sem d'expériences indépendantes

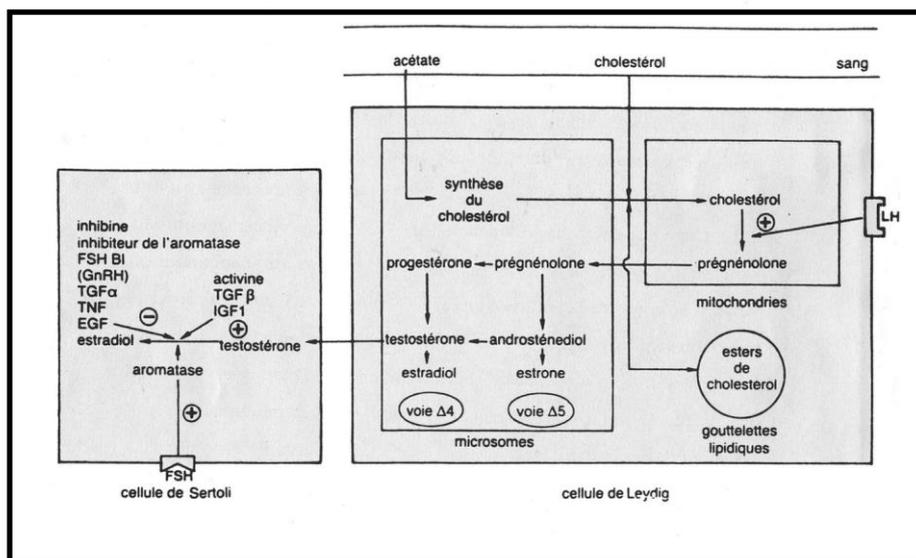


Figure 17: Synthèse de la Testostérone dans les cellules de Leydig (d'après Thibault & Levasseur, 1991)

L'apparition d'une azoospermie réversible chez tous les macaques immunisés contre des régions du domaine extracellulaire du récepteur de FSH.

Bibliographie

Rao A.J, Ramachandra S.G, Ramesh V, Couture L, Abdennebi L, Salesse R & Remy J.J (2004) Induction of infertility in adult male bonnet monkeys by immunization with phage-expressed peptides of the extracellular domain of FSH receptor. *Reprod Biomed* 8(4), 385-391.

Remy J.J, Couture L & Salesse R (1995) Immunomodulation of male fertility by vaccination against luteinizing hormone. *Livestock Prod Sciences*, 42, 207-211

Remy J.J, Couture L Rabesona A, Haertle T & Salesse R (1996) Immunization against exon 1 decapeptides from lutropin/choriogonadotropin receptor or the follitropin receptor as potential male contraceptive. *J. Reprod. Immunol* 31, 37-54

B) Etude fonctionnelle, pharmacologique et immunologique du récepteur 5-HT₄ cardiaque recombinant et natif. Implication de ce récepteur dans les arythmies auriculaires, plus particulièrement la fibrillation atriale

**B) ETUDE FONCTIONNELLE, PHARMACOLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE
DU RECEPTEUR 5-HT₄ CARDIAQUE RECOMBINANT ET NATIF**

**IMPLICATION DE CE RECEPTEUR DANS LES ARYTHMIES
AURICULAIRES, PLUS PARTICULIEREMENT LA FIBRILLATION ATRIALE**

I) CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est une indolamine qui exerce de nombreuses fonctions au niveau du système nerveux central et des organes périphériques tel que le cœur (Figure 18). La 5-HT est synthétisée par les neurones sérotoninergiques et les cellules chromaffines intestinales et cardiaques. La fraction neurohormonale circulant dans le sang est stockée dans les plaquettes et est libérée durant le processus de coagulation. Une libération inattendue peut également survenir lors de situations pathologiques qui entraînent l'agrégation plaquettaire, comme une circulation sanguine stagnante, une altération des facteurs hémodynamiques et des lésions auriculaires liées au vieillissement cellulaire (Kaumann, 1994).

La sérotonine induit ses effets par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques appartenant à la superfamille des RCPG, classés de 5-HT₁ à 5-HT₇ (Saxena et Villalon, 1990; Bockaert et Pin, 1998). Ces récepteurs seraient impliqués dans des situations physiologiques et physiopathologiques.

1) Effets cardiaques de la 5-HT *via* le récepteur 5-HT₄

La sérotonine induit des effets inotrope, chronotrope et lusitrope positifs au niveau du cœur (Lemessurier et al., 1959; Kaumann et al., 1990). Elle exerce ses actions *via* le récepteur cardiaque 5-HT₄ cloné en 1997 (Blondel et al., 1997). Ce récepteur est composé de 359 à 428 acides aminés et présente un poids moléculaire apparent de 40-42 kDa. Six variants d'épissage, notés h5-HT_{4(a),(b),(c),(e/g),(i),(n)}, ont été identifiés dans les tissus atriaux humains (Claeyssen et al., 1997; Blondel et al., 1997, 1998a; Van den Wyngaert et al., 1997; Mialet et al., 2000b; Bender et al., 2000; Bach et al., 2001; Vilaro et al., 2002; Brattelid et al., 2004a), et deux dans les ventricules, h5-HT_{4(a),(b)} (Bach et al., 2001). Ces variants diffèrent par leur extrémité C-terminale après la leucine 358 (Figure 19). Le récepteur 5-HT₄ cardiaque est

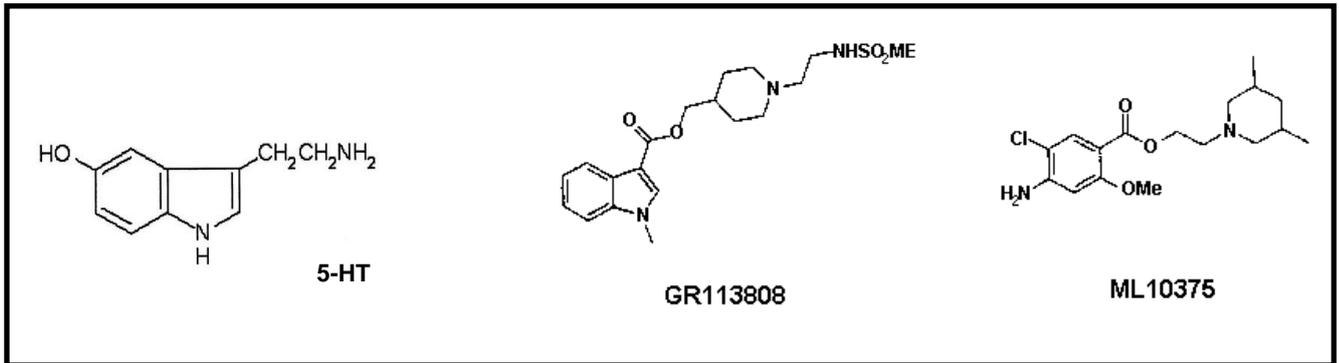


Figure 18 : Formule chimique des substances agonistes (5-HT) et antagonistes (ML13075 et GR113808) du récepteur h5-HT₄ cardiaque
Reproduit et modifié d'après Mialet et al., 2000a

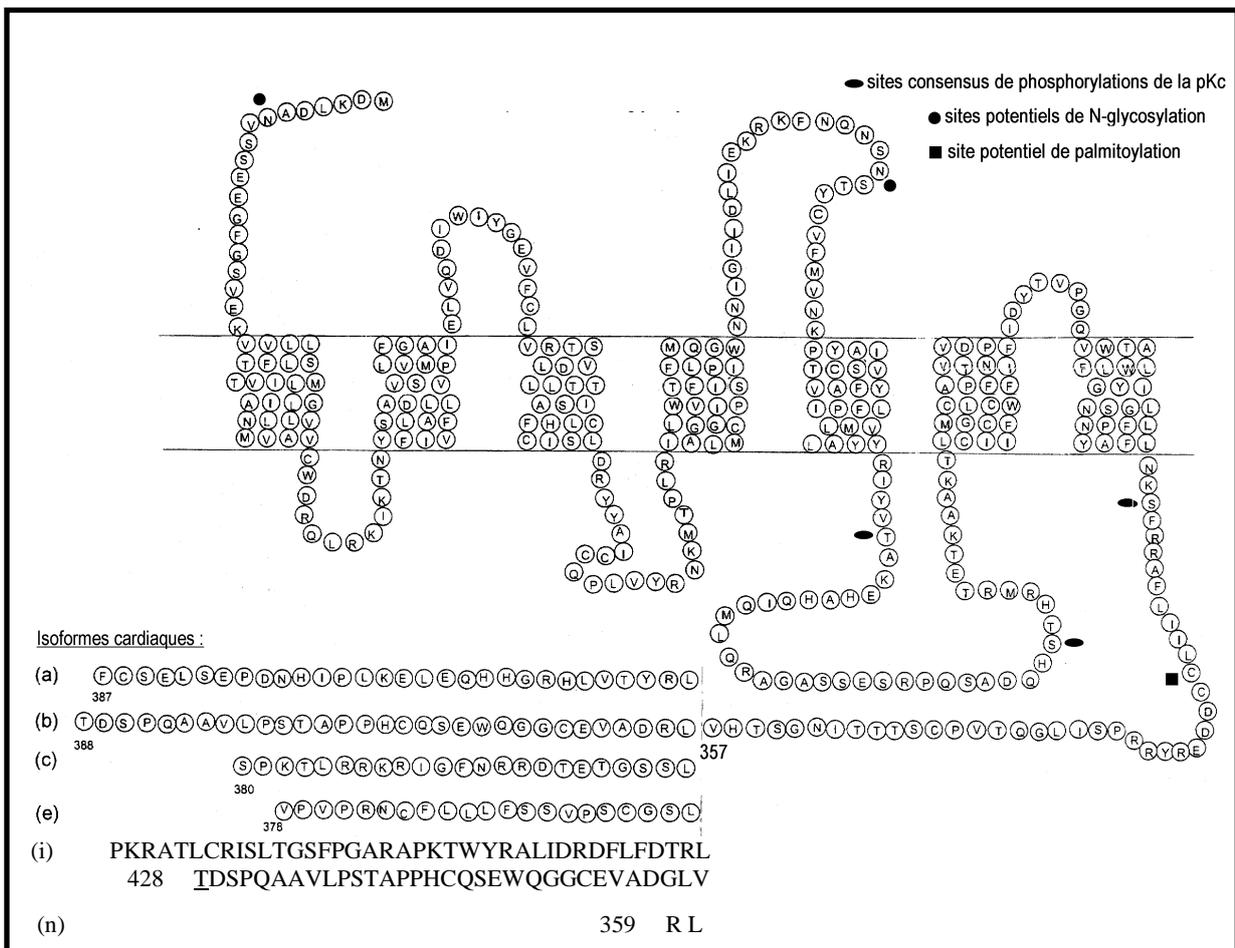


Figure 19 : Isoformes cardiaques du récepteur 5-HT₄ et sites de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation et palmitoylation). L'isoforme (e) correspond à l'isoforme (g) maintenant.
Reproduit et modifié d'après Mialet et al., 2000a

présent uniquement chez deux espèces, l'homme et le porc (Ouadid et al., 1992; Lorrain et al., 1992; Schoemaker et al., 1992, 1993; Hegde et Eglén, 1996) et est fonctionnel au niveau des oreillettes. Une activité sérotoninergique ventriculaire peut être observée dans des conditions particulières comme des pathologies cardiaques (Brattelid et al., 2004b) ou durant l'utilisation d'inhibiteurs de phosphodiesterases (Qvigstad et al., 2005).

Suite à la fixation de la sérotonine, le récepteur 5-HT_4 active l'adénylate cyclase *via* une protéine Gs, et induit la formation d'AMPc (Figure 20). Ce second messager active à son tour la PKA (Kaumann et al., 1990) qui phosphoryle des protéines clés impliquées dans le mécanisme de couplage excitation-contraction, tels que les canaux calciques de type L (ICa^{2+}_L). L'AMPc peut également interagir directement avec les canaux "funny" I_f , impliqués dans l'automatisme cardiaque (Di Francesco & Tortora., 1991). L'ensemble de ces événements conduit à une augmentation des courants ICa^{2+}_L (Ouadid et al., 1992, Jahnel et al., 1992; Pau et al., 2003) et pacemaker I_f (Pino et al., 1998) dans les myocytes atriaux humains. Une autre classe de canaux pourrait également être phosphorylée par la PKA, les canaux potassiques de type ultra-rapide (I_{kur}). En effet, il a été montré dans la littérature qu'une stimulation adrénergique des cellules atriales humaines entraînait une phosphorylation de ces canaux *via* une PKA, ainsi qu'une augmentation de l'intensité de ce courant (Li et al., 1996).

2) La fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire (FA) est le trouble du rythme cardiaque le plus fréquent, particulièrement chez les sujets porteurs de cardiopathies et les personnes âgées. La prévalence de la FA dans la population adulte est estimée à 0.5 % à l'âge de 50-59 ans et atteint 10 % au-delà de 80 ans (Benjamin et al., 1998).

La FA correspond à une désorganisation de l'activité électrique et mécanique des oreillettes et est associée à une irrégularité du rythme ventriculaire (Nattel, 2002). Lors de cette pathologie, de multiples foyers de dépolarisation (ectopiques et de ré-entrées) s'activent à tout instant dans l'oreillette et/ou les veines pulmonaires, et induisent une activité électrique atriale anarchique, irrégulière et extrêmement rapide. La transmission de cette activité vers les ventricules, *via* le nœud auriculo-ventriculaire, devient alors irrégulière et favorise l'apparition d'arythmies ventriculaires. L'activation non coordonnée des cellules atriales provoque également une altération de la fonction mécanique auriculaire. Les oreillettes ne se contractent donc plus efficacement et entraînent la disparition des systoles auriculaires.

La FA est à l'origine de deux types de complications sévères : 1) *des risques thrombo-emboliques*, suite au ralentissement du sang dans la cavité atriale. Ils entraînent dans 90% des

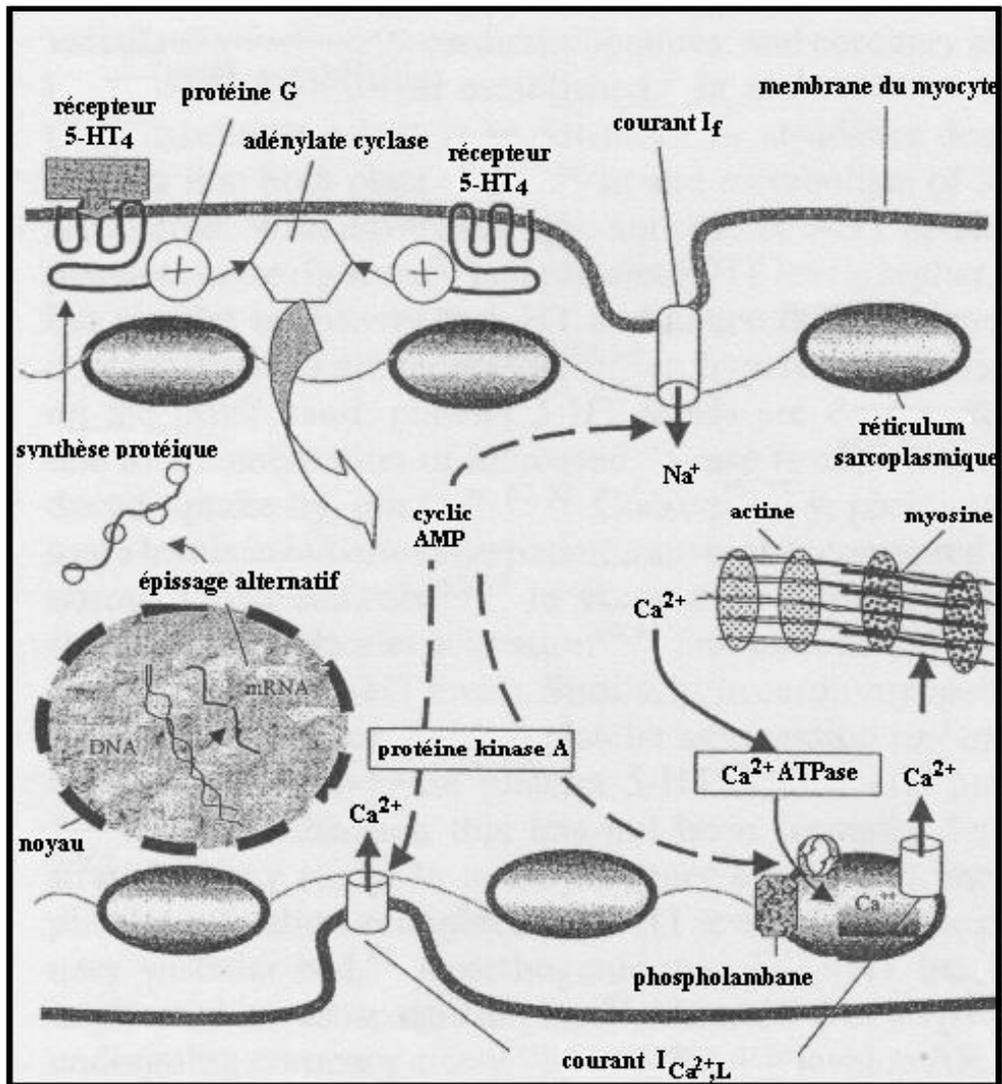


Figure 20 : Transduction du signal lié à l'activation du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains. Reproduit et modifié d'après Yusuf et al., 2003

cas un accident vasculaire cérébral; et 2) *des altérations hémodynamiques*, favorisant le développement d'une insuffisance cardiaque.

Deux formes de fibrillation auriculaire existent : 1) *la FA paroxystique* et 2) *la FA chronique persistante et permanente* (Tableau 8) (Lévy et al., 1998). Un quart des FA paroxystiques évolueront vers la forme chronique.

3) Le récepteur 5-HT₄ et la fibrillation auriculaire

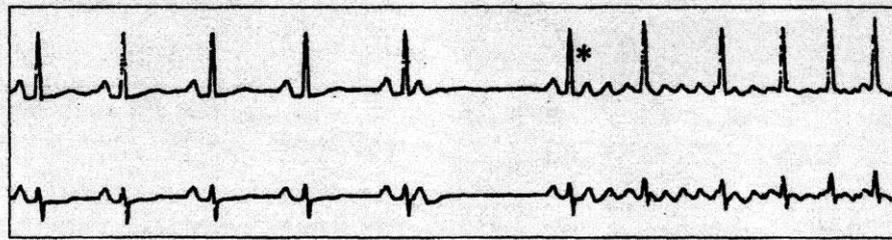
De nombreuses études confortent l'idée de l'implication de la sérotonine et du récepteur h5-HT₄ dans la fibrillation auriculaire (Kaumann, 1994; Yusuf et al., 2003). Kaumann et Sanders (1994) ont montré que l'application de sérotonine sur des lambeaux de tissus atriaux humains était capable d'induire des arythmies auriculaires, dont la fréquence était augmentée sur des tissus provenant de patients traités avec des β -bloqueurs. Ces effets étaient abolis en présence d'antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT₄. Rahme et collaborateurs (1999) ont également démontré que la FA induite expérimentalement chez des porcs était dans la majorité des cas arrêtée en présence d'un antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT₄. Enfin, l'activité arythmogène de la sérotonine pourrait être corrélée avec l'activation des canaux ioniques tels que le canal calcique ICa^{2+}_L , le canal If et le canal potassique I_{Kur} . L'augmentation des courants entrants induirait d'une part, une surcharge calcique des cardiomyocytes et des "after depolarisations" *via* les canaux ICa^{2+}_L (Thandroyen et al., 1991), et d'autre part, des dépolarisations diastoliques spontanées *via* les canaux If. L'augmentation des courants sortants *via* les canaux I_{Kur} diminuerait la durée du potentiel d'action et favoriserait le développement d'"after depolarisations". Ces modifications électrophysiologiques pourraient être à l'origine d'arythmies auriculaires (Workman et Rankin, 1998; Nattel, 2002).

4) Origine auto-immune des fibrillations auriculaires idiopathiques

Dans la majorité des cas, la survenue de FA est associée à des pathologies cardiaques (cardiomyopathie dilatée idiopathique (CMD), hypertension artérielle), et non-cardiaques (hyperthyroïdie). Plusieurs facteurs sembleraient être impliqués dans la genèse et/ou le maintien de la FA : les extrasystoles auriculaires, le système nerveux autonome et le vieillissement cellulaire (Allessie et al., 2002; Nattel, 2002).

Cependant pour 30 % des patients, plus particulièrement des sujets jeunes atteints de FA paroxystique, aucune cause n'est retrouvée (Zipes, 1997; Bounhoure, 2000). Par analogie avec la maladie de Chagas et la CMD, une composante auto-immune serait proposée.

A)



B)

Forme de Fibrillation	Nature de l'arythmie	Suppression
Paroxystique	Ponctuelle et de courte durée	Spontanée
Chronique persistante et permanente	Episode de longue durée	Par des traitements pharmacologiques (anti arythmiques) ou non pharmacologiques (ablations, implantation de défibrillateur)

Tableau 8 : La fibrillation atriale

A) Electrocardiogramme avec épisode de FA (*); B) Les différentes formes de FA

L'hypothèse formulée est que suite à une myocardite primaire, l'organisme des patients développerait une réponse auto-immune. L'inflammation cardiaque serait liée à une infection de type virale, bactérienne ou parasitaire. Les travaux de Frustaci et collaborateurs (1997) sont en accord avec cette hypothèse. Ils ont montré que 66% des biopsies auriculaires issues de patients atteints de FA idiopathiques indiquaient l'existence d'une myocardite, d'une infiltration lymphocytaire et d'une réponse auto-immune de type cellulaire.

L'implication d'auto-anticorps fonctionnels dans des pathologies cardiaques est de plus en plus mentionnée dans la littérature (Schultheiss et al., 1988; Eftekhari et al. 2000; Felix et al., 2001; Staudt et al., 2004). Les immunoglobulines identifiées sont principalement dirigées contre les récepteurs RCPG cardiaques de type β -adrénergiques et M2 muscariniques (Tableau 9). Le récepteur 5-HT₄, autre membre à la superfamille des RCPG, pourrait également constituer une cible pour des auto-anticorps. Ces immunoglobulines pourraient moduler l'activité fonctionnelle du récepteur h5-HT₄ cardiaque et être impliquées dans la FA idiopathique.

5) Modèle d'activation des RCPG

Suivant le modèle général d'activation des RCPG (Figure 21), les récepteurs existent dans la membrane sous deux formes R (inactives) et R* (actives) selon un état d'équilibre donné (Fong et al., 1996, Colquhoun, 1998). Dans une cellule au repos, les récepteurs sont présents majoritairement sous la forme R. Les agonistes ont une forte affinité pour R* et induisent un déplacement de l'équilibre des récepteurs vers la forme R* (Figure 22). Les agonistes inverses se fixent préférentiellement sur R et déplacent l'équilibre vers les formes R. Enfin, les antagonistes possèdent la même affinité pour les deux formes et ne modifient pas l'équilibre.

Les agonistes augmentent l'activité basale des récepteurs, alors que les agonistes inverses la diminuent. Quant aux antagonistes, ils ne changent pas l'état de repos de la cellule.

La proportion des formes R/R* des RCPG dans la membrane est régie par la constante d'équilibre allostérique J : $J = [R]/[R^*]$. Cette constante dépend de l'isoforme du récepteur ainsi que de la nature du tissu, et est indépendante au sein d'un même système cellulaire de la densité des récepteurs exprimés (Claeysen et al., 1997; Pindon et al., 2002).

De nombreux paramètres sont omis dans ce modèle comme les divers états conformationnels des formes R et R*. Les récepteurs R* existeraient dans la membrane sous différentes conformations suivant l'agoniste lié (Kenakin, 2001; Claeysen et al., 2001; Joubert et al., 2002), ce qui permettrait la stimulation de différentes voies de transduction (Kenakin,

Pathologies cardiaques	Anticorps	Origine	Références
Cardiopathies associées à la maladie de Chagas	anti-récepteurs cardiaques : β 1, β 2–adrénergiques et M2muscariniques	Réaction croisée : Anticorps anti-protéine parasitaire reconnaissent des épitopes sur des protéines du <i>soi</i> , les RCPG cardiaques	Borda et al., 1984; Ferrari et al., 1995; Elies et al., 1996, Mijares et al., 1996a Goin et al., 1994
CMD	anti-récepteurs cardiaques : β 1–adrénergiques et M2 muscariniques	Réaction croisée proposée Agent pathogène inconnu	Limas et al., 1989; Magnusson et al., 1991, 1994 Fu et al., 1993; Matsui et al., 1997
Fibrillation Atriale • Post-opératoire • chez patients CMD	anti-protéine HSP65 anti-récepteurs cardiaques M2 muscariniques	Taux élevé de protéine HSP65 chez les patients Anticorps impliqués dans la CMD. Leur présence augmente la prévalence de la FA chez les patients CMD	Mandal et al., 2004 Dobrev et al., 2004; Baba et al., 2004

Tableau 9 : Auto-anticorps fonctionnels impliqués dans des pathologies cardiaques.

CMD : CarDiomyopathie Dilatée, FA : Fibrillation Atriale, HSP : Heat Shock Protein

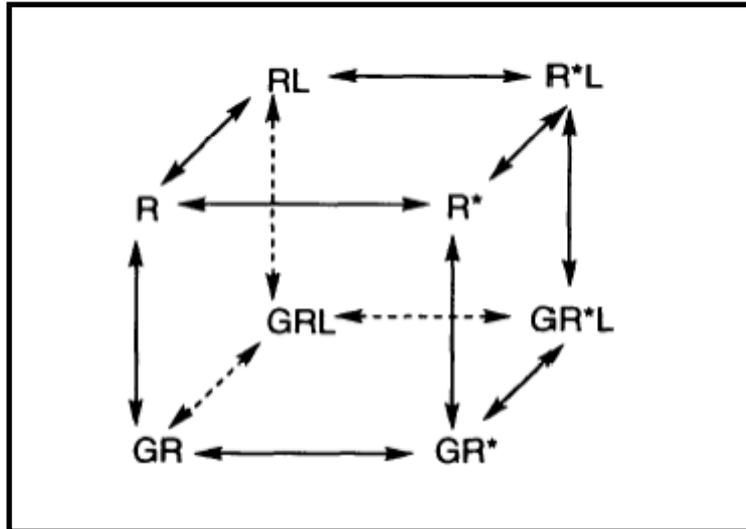


Figure 21 : Modèle cubique allostérique général
D'après Fong (1996)

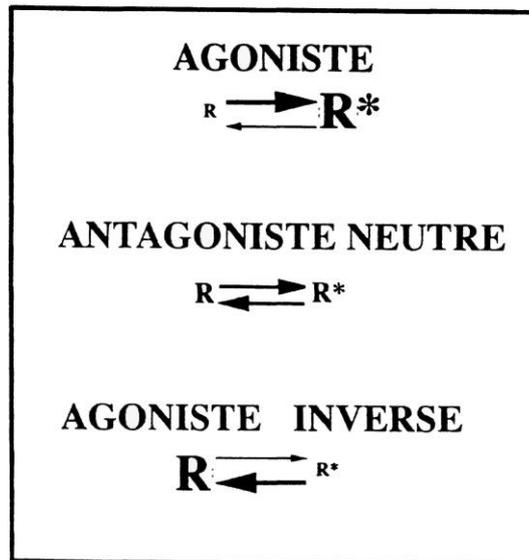


Figure 22 : Equilibre des formes R et R* en fonction des substances fixées (agoniste, antagoniste ou agoniste inverse)

2001). Plusieurs états inactifs R ont également été retrouvés en présence d'agonistes inverses (Claeyssen et al., 2001). Suivant leur état conformationnel, les récepteurs présenteraient différentes caractéristiques fonctionnelles.

II) OBJECTIFS

Une connaissance précise des propriétés fonctionnelles du récepteur h5-HT₄ cardiaque permettrait de bloquer la participation de ce récepteur dans la FA. J'ai donc caractérisé ce récepteur au sein des cardiomyocytes atriaux d'adulte. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre I.

L'activité du récepteur h5-HT₄ cardiaque peut être modulée par l'anticorps anti-peptidique anti-G21V, dirigé contre la boucle EL2 de ce récepteur. Ses effets fonctionnels ont été analysés sur le récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant et natif. Les résultats sont présentés dans le chapitre II.

L'implication d'une composante auto-immune dans la FA a été confortée par l'identification d'auto-anticorps anti-récepteur 5-HT₄ dans les séras de patients présentant une FA idiopathique. La fonctionnalité de ces auto-anticorps a également été étudiée. Les résultats sont présentés dans le chapitre III.

L'obtention de tissus cardiaques humains dépourvus de pathologies est extrêmement rare. J'ai donc recherché et validé un nouveau modèle d'étude, afin de travailler sur des cellules atriales extraites de tissus exempts de maladies cardiaques. Le chapitre IV présente les résultats obtenus sur les cardiomyocytes atriaux de porc.

Dans le chapitre V, j'ai résumé ma participation à différents projets développés au sein de l'unité.

III) PROJETS DE RECHERCHE

CHAPITRE I : ETUDE FONCTIONNELLE DU RECEPTEUR h5-HT₄ EXPRIME DANS LES CELLULES ATRIALES HUMAINES D'ADULTE

(Article 1 : Di Scala et al., 2004a)

Dans les cellules atriales humaines, la sérotonine et les catécholamines, *via* les récepteurs β -adrénergiques, partagent la même voie de transduction : AMPc, PKA et courant calcique ICa²⁺_L (Bers, 2002; Yusuf et al., 2003). Cependant, seule la sérotonine est associée à

la fibrillation auriculaire. Il est particulièrement surprenant de constater que la 5-HT provoque des arythmies auriculaires, alors que ses effets cardiaques et le taux d'expression de son récepteur sont inférieurs à ceux des catécholamines (4 fmol/mg pour les récepteurs 5-HT₄ *versus* 40 et 20 fmol/mg pour les récepteurs β₁- et β₂-adrénergiques respectivement) (Kaumann et al., 1995, 1996)

Au cours de cette étude, nous avons comparé les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs 5-HT₄ et β-adrénergiques exprimés dans les cellules atriales humaines. La fonctionnalité de ces récepteurs a été déterminée en mesurant deux paramètres : le taux d'AMPC intracellulaire et l'amplitude du courant calcique I_{Ca²⁺_L}. Les résultats sont présentés dans *l'Article 1*. J'ai complété cette étude par une identification immunochimique du récepteur 5-HT₄ dans les cellules atriales humaines avec l'anticorps anti-G21V.

Bien que la sérotonine induise une production d'AMPC intracellulaire plus faible que les catécholamines (Figure 23), elle est capable d'activer de façon maximale le courant I_{Ca²⁺_L} avec des concentrations identiques à celles de l'isoprotérénol (1μM; Figure 24). Une augmentation similaire du courant calcique I_{Ca²⁺_L} est également observée en présence de forskoline (10 μM). L'ensemble de ces données suggèrent que l'activation maximale du canal calcique sollicite uniquement une fraction de l'AMPC total produit par l'isoprotérénol et la forskoline, et éventuellement par la sérotonine.

La 5-HT ou l'isoprotérénol appliqués à une concentration de 20 nM sur les cellules atriales induisent peu ou pas d'augmentation du courant calcique I_{Ca²⁺_L} (Figure 24). Cependant, lors d'une co-incubation, ce courant est activé de façon maximale (Figure 25). L'addition de forskoline ne modifie pas les réponses observées avec les deux ligands. Ces résultats suggèrent que les effets de la sérotonine dans des conditions normales puissent être amplifiés par le tonus sympathique (Côté et al., 2004). L'activité arythmogène de cette substance pourrait dépendre du contexte cellulaire et physiologique.

Notre étude montre que le traitement des patients avec des β-bloqueurs n'induit pas une hyper stimulation de la réponse sérotoninergique, contrairement aux travaux de Pau et collaborateurs (2003). La production d'AMPC et l'intensité du courant I_{Ca²⁺_L} sont identiques chez des patients traités ou non (Figure 26). Actuellement, l'influence de ces bloqueurs est particulièrement controversée dans la littérature (Sanders et Kaumann, 1992, Pau et al., 2003).

La caractérisation pharmacologique du récepteur 5-HT₄ dans les cellules atriales indique que la substance ML10375 (Figure 18) agit comme un antagoniste spécifique de ce

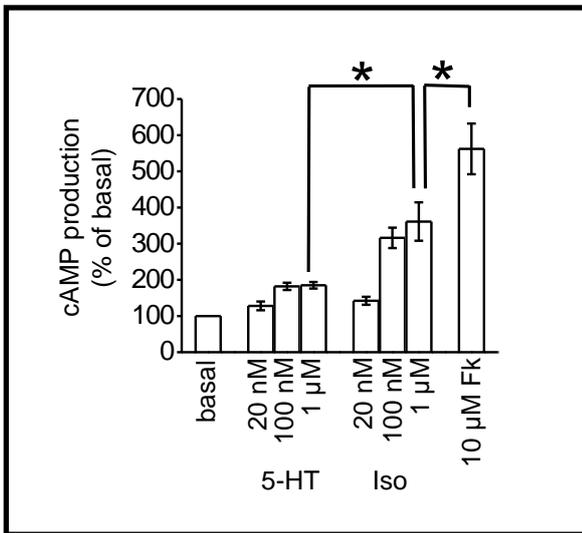


Figure 23 : Production d'AMPc en présence de 5-HT, isoprotérénol et Forskoline dans des myocytes atriaux humains. Production d'AMPc normalisée par rapport au taux basal en absence d'agonistes (basal). Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal. Isoprotérénol (Iso) et forskoline (Fk).

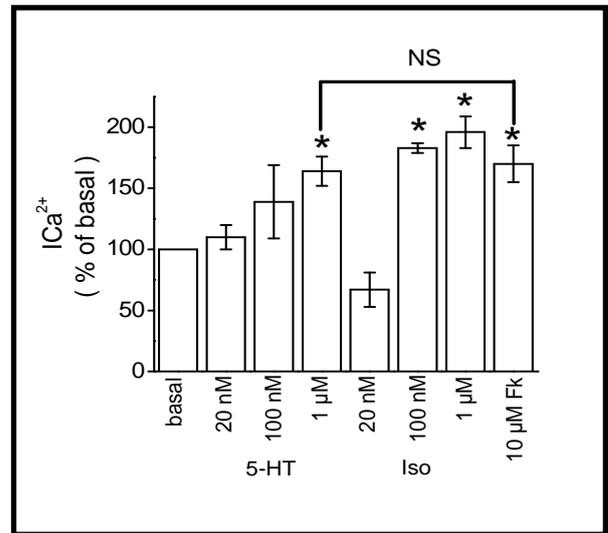


Figure 24 : Stimulation du courant calcique de type L par 5-HT, isoprotérénol et Forskoline dans des myocytes atriaux humains. Intensité du courant normalisée/au courant basal (basal) en absence d'agonistes. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le courant basal.

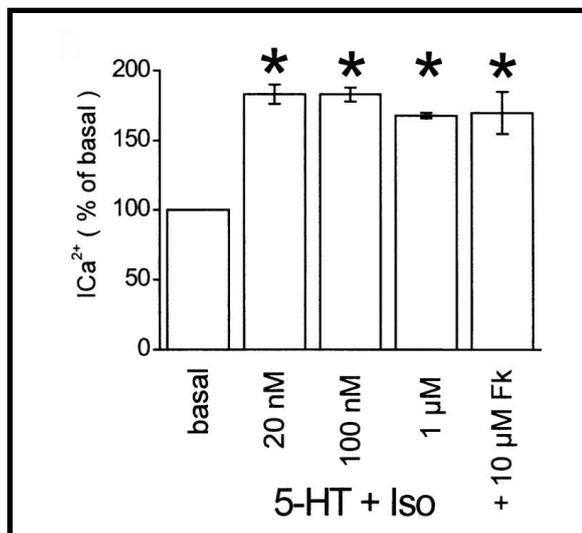


Figure 25 : Stimulation du courant calcique de type L en co-incubant la 5-HT, l'isoprotérénol et la Forskoline sur les myocytes atriaux humains. Intensité du courant normalisée/au courant basal (basal). Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le courant basal. Isoprotérénol (Iso) et forskoline (Fk).

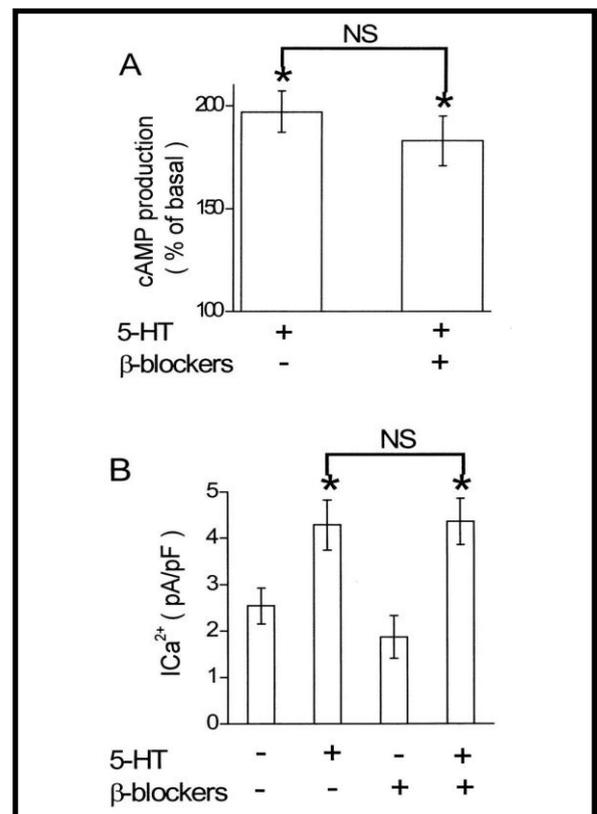


Figure 26 : Action des β-bloqueurs sur l'effet de la 5-HT sur les myocytes atriaux humains.

A) Production d'AMPc induite par 1 μM 5-HT; B) Intensité du courant calcique avec ou sans 5-HT. Expériences réalisées sur des cellules issues de patients traités ou non avec des β-bloqueurs. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant sans agonistes. NS : aucune différence significative entre la réponse 5-HT des patients traités ou non

récepteur (Figure 27). Plusieurs études ont montré que cette drogue était un antagoniste pour les isoformes (a) et (b) du récepteur 5-HT₄ (Bach et al., 2001; Claeysen et al., 2001) et un agoniste inverse pour les isoformes (c) et (e) (Blondel et al., 1998b; Mialet et al., 2000b). Nos résultats suggèrent que l'activité fonctionnelle du récepteur h5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains serait liée principalement aux isoformes (a) et (b) (Bach et al., 2001; Castro et al., 2005).

L'analyse immunochimique du récepteur h5-HT₄ indique que ce récepteur est présent sous différentes formes oligomériques dans la membrane plasmique des cellules atriales : monomères (40 kDa), dimères (77 kDa) et tétramères (170 kDa) (Figure 28). Ces caractéristiques ont également été mentionnées pour d'autres récepteurs RCPG (Lee et al., 2003)

L'ensemble de ces données nous ont permis de proposer une localisation des récepteurs 5-HT₄ au sein de microdomaines de régulation de la même manière que les récepteurs β -adrénergiques cardiaques (Bers et Ziolo, 2001; Steinberg et Brunton, 2001, Zaccolo et al., 2002). Dans ces compartiments, les récepteurs seraient regroupés autour de différents effecteurs et diverses enzymes comme le canal calcique et les phosphodiésterases (Georget et al., 2003). La sérotonine pourrait alors induire des réponses cellulaires locales. Quels seraient les processus impliqués dans la formation d'arythmies auriculaires en présence de sérotonine? Nous avons montré que la stimulation des récepteurs 5-HT₄ provoque une activation maximale des canaux ICa^{2+}_L , laquelle pourrait induire une entrée massive de calcium dans les microdomaines. Si la re-capture du calcium par les ATPases du réticulum sarcoplasmique est insuffisante, une surcharge calcique sous membranaire pourrait se former et induire des extrasystoles à l'origine de FA. Pour conforter l'ensemble de ces propositions, des études supplémentaires sont nécessaires.

L'interaction entre le système sympathique et la sérotonine est un phénomène particulièrement intéressant, étant donné que le système nerveux autonome serait impliqué dans la genèse de la FA (Bettoni M et Zimmermann M, 2002). Par conséquent, les relations existant entre ces récepteurs doivent être précisées.

Enfin, il serait également important de comprendre le rôle fonctionnel des oligomères du récepteur h5-HT₄ présents dans la membrane plasmique des cellules atriales.

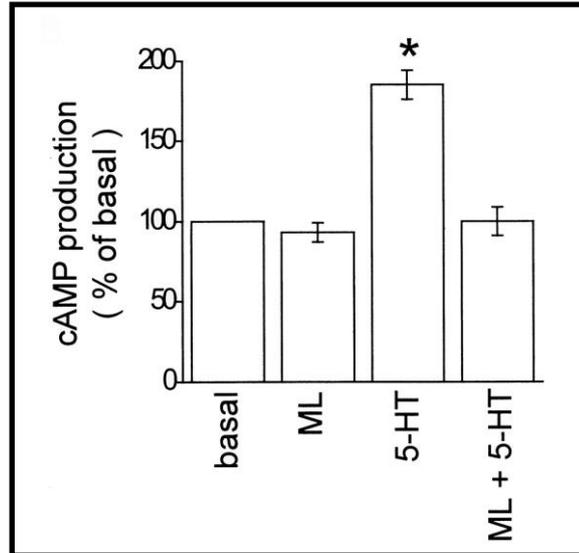


Figure 27 : Inhibition des effets de la 5-HT par le ML10375. Effets de 1 μ M ML10375 sur la production d'AMPC en présence [ML+5-HT] ou non [ML] de 1 μ M 5-HT. Moyenne \pm s.e.m d'expériences indépendantes. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal.

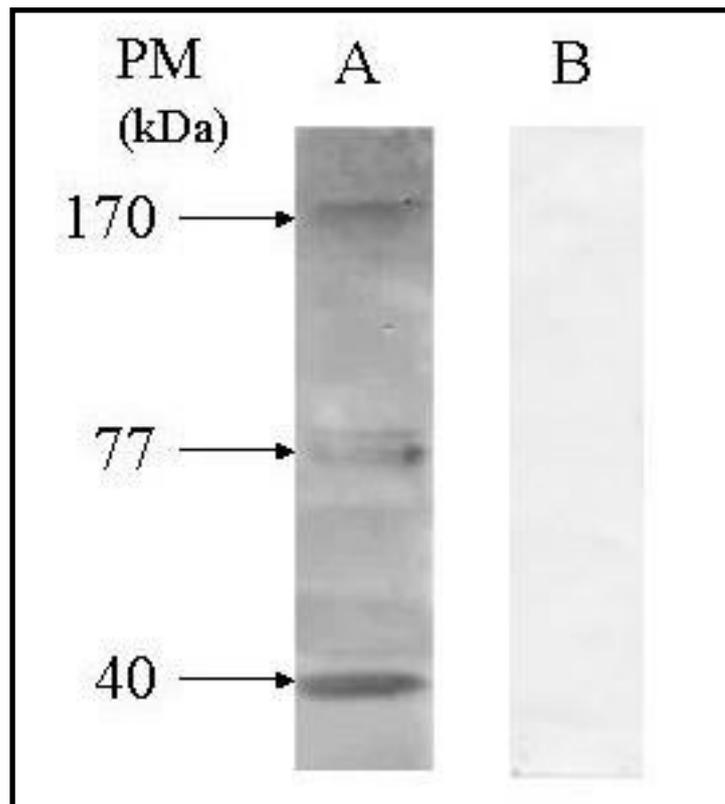


Figure 28 : Identification du récepteur 5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains réalisée en condition dénaturante. Western-Blot réalisé avec 30 μ g de protéines par piste. Membrane de nitrocellulose incubée avec 10 μ g/ml d'anticorps anti-G21V (A) et d'IgG purifiées contrôle (B). PM : poids moléculaire.

Bibliographie

- Allessie M.A**, Ausma J & Schotten U (2002) Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54, 230-246.
- Bach T**, Syversveen T, Kvingedal A.M, Krobert K.A, Brattelid T, Kaumann A.J & Levy F.O (2001) 5-HT_{4(a)} and 5-HT_{4(b)} receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363, 146-160.
- Bender E**, Pindon A, Van Oers I, Zhang YB, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J & Luyten W (2000) Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J Neurochem* 74(2), 478-89.
- Benjamin E.J** Wolf P.A, D'Agostino R.B, Silbershatz H, Kannel W.B & Levy D (1998) Impact of atrial fibrillation on the risk of death. The Framingham heart study. *Circulation* 98, 946-952.
- Bers D.M** & Ziolo MT (2001) When is cAMP not cAMP? Effects of compartmentalization. *Circ Res* 89(5), 445-452.
- Bers D.M** (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-204.
- Bers D.M** & Ziolo M.T (2001) When is cAMP not cAMP ? Effects of compartmentalization. *Circ Res* 89, 445-452.
- Bettoni M** & Zimmermann M (2002) Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 105(23), 2753-2759.
- Blondel O**, Vandecasteele G, Gastineau M, Leclerc S, Dahmoune Y, Langlois M & Fischmeister R (1997) Molecular and functional characterisation of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium. *FEBS Lett* 412, 465-474.
- Blondel O**, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M & Fischmeister R (1998a) Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine₄ receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem* 70(6), 2252-2261.
- Blondel O**, Gastineau M, Langlois M & Fischmeister R (1998b) The 5-HT₄ receptor antagonist ML10375 inhibits the constitutive activity of human 5-HT_{4(c)} receptor. *Br J Pharmacol* 125(4), 595-597.
- Bockaert J** & Pin J.P (1998) Use of a G protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success. *CR Acad Sci III* 321, 529-551.
- Bounhoure J.P** (2000) La fibrillation auriculaire *Supplément A.I.M* 38-41.
- Brattelid T**, Kvingedal A.M, Krobert K.A, Andressen K.W, Bach T, Hystad M.E, Kaumann A.J & Levy F.O (2004a) Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT₄ receptor splice variant, 5-HT_{4(i)}. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369(6), 616-28.
- Brattelid T**, Qvigstad E, Lynham J.A, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes J.B, Levy F.O & Kaumann J.A (2004b) Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370(3), 157-166.
- Castro L**, Mialet-Perez J, Guillemeau A, Stillitano F, Zolk O, Eschenhagen T, Lezoualc'h F, Bochet P & Fischmeister R (2005) Differential functional effects of two 5-HT₄ receptor isoforms in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 39(2), 335-344.
- Claeyssen S**, Faye P, Sebben M, Lemaire S, Bockaert J & Dumuis A (1997) Cloning and expression of human 5-HT_{4s} receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenylyl cyclase. *Neuroreport* 8, 3189-3196.
- Claeyssen S**, Sebben M, Becamel C, Parmentier M.L, Dumuis A & Bockaert J (2001) Constitutively active mutants of 5-HT₄ receptors are they in unique active states ? *EMBO Rep* 2, 61-67.
- Colquhoun D** (1998) Binding, gating, affinity and efficacy. *Br J Pharmacol* 12, 923-947.
- Côté F**, Fligny C, Fromes Y, Mallet J & Vodjdani G (2004) Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med* 10(5), 232-238.
- Di Francesco D** & Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145-147.

- Di Scala E**, Findlay I, Rose S, Aupart M, Argibay J, Cosnay P and Bozon V (2004a). High efficiency activation of L-type Ca^{2+} current by 5-HT in human atrial myocytes *Receptors and Channels* 10 (5-6) 159-165.
- Eftekhari P**, Sallé L, Lezoualc'h F, Mialet J, Gastineau M, Briand J.P, Isenberg D.A, Fournie G.J, Argibay J, Fischmeister R, Muller S & Hoebeke J (2000) Anti-SSA/Ro52 autoantibodies blocking the cardiac 5-HT₄ serotonergic lupus congenital heart block. *Eur J Immunol* 30, 2782-2790.
- Felix S.B**, Staudt A & Friedrich G.B (2001) Improvement of cardiac function after immunoadsorption in patients with dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 34(3), 211-215.
- Fong T.M** (1996) Mechanistic hypotheses for the activation of G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 8, 217-224.
- Frustaci A**, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo A.M & Maseri (1997) A histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 96, 1180-1184.
- Georget M**, Mateo P, Vandecasteele G, Lipskaia L, Defer N, Hanoune J, Hoerter J, Lugnier C & Fischmeister R (2003) Cyclic AMP compartmentation due to increased cAMP-phosphodiesterase activity in transgenic mice with a cardiac-directed expression of the human adenylyl cyclase type 8 (AC8). *FASEB J* 17(11), 1380-1391.
- Hegde S.S** & Eglén R.M (1996) Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB J* 10, 1398-1407.
- Jahnel U**, Rupp J, Ertl R & Nawrath H (1992) Positive inotropic response to 5-HT in human atrial but not in ventricular heart muscle *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 346, 482-485.
- Joubert L**, Claeysen S, Sebben M, Bessis A.S, Clark R.D, Martin R.S, Bockaert J & Dumuis A (2002) A 5-HT₄ receptor transmembrane network implicated in the activity of inverse agonists but not agonists. *J Biol Chem* 277 (28), 25502-25511.
- Kaumann A.J**, Sanders L, Brown A.M, Murray K.J & Brown M.J (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100, 879-885.
- Kaumann A.J** (1994) Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? *Trends Pharmacol SCI* 15, 451-455.
- Kaumann A.J** & Sanders L (1994) 5-hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium : facilitation by chronic β -adrenoceptor blockade. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349, 331-337.
- Kaumann A.J**, Lynham J.A & Brown A.M (1995) Comparison of the densities of the 5-HT₄ receptors, β 1- and β 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353, 592-595.
- Kaumann A.J**, Lynham J.A & Brown A.M (1996) Comparison of the densities of 5-HT₄ receptors, beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353(5), 592-595.
- Kenakin T** (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism : matters of receptor conformation. *FASEB J* 15, 598-611.
- Lee S.P**, O'Dowd B.F & George S.R (2003) Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors. *Life Sci* 74, 173-180.
- Lemessurier D.H**, Sartz C.J & Whelan R.F (1959) Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *Br J Pharmacol* 14, 246-250.
- Lévy S**, Breithardt G, Campbell R.W, Camm A.J, Daubert J.C, Allessie M, Aliot E, Capucci A, Casio F, Crijns H, Jordaens L, Hauer R.N, Lombardi F & Luderitz B (1998) Atrial fibrillation : current knowledge and recommendations for management. Working group on arrhythmias of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 19, 1294-1320.
- Li G.R**, Feng J, Wang Z, Fermini B & Nattel S (1996) Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K^+ current in human atrial myocytes. *Circ Res* 78, 903-915.
- Lorrain J**, Grosset A & O'Connor S.E (1992) 5-HT₄ receptors present in piglet atria and sensitive to SDZ 205-557, are absent in papillary muscle. *Eur J Pharmacol* 229(1), 105-108.
- Mialet J**, Dahmoune Y, Lezoualc'h F, Berque-Bestel I, Eftekhari P, Hoebeke J, Siscic S, Langlois M & Fischmeister R (2000a) Exploration of the ligand binding site of the human 5-HT₄ receptor by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Br J Pharmacol* 130, 527-538.

- Mialet J**, Berque-Bestel I, Eftekhari P, Gastineau M, Giner M, Dahmoune Y, Donzeau-Gouge P, Hoebeke J, Langlois M, Siscic S, Fischmeister R & Lezoualc'h F (2000b) Isolation of the serotonergic 5-HT_{4(e)} receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Br J Pharmacol* 129, 771-781.
- Nattel S** (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415(6868), 219-226.
- Ouadid H**, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J & Nargeot J (1992) Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol* 41, 346-351.
- Pau D**, Workman A.J, Kane K.A & Rankin A.C (2003) Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic β -adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol* 140, 1434-1441.
- Pindon A**, Van Hecke G, Van Gompel P, Lesage A.S, Leysen J.E & Jurzak M (2002) Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants : compound specificity and dual coupling with G α s- and G α i/o-proteins *Mol Pharmacol* 61, 85-96.
- Pino R**, Cerbai E, Calamai G, Alajmo F, Borgioli A, Braconi L, Cassai M, Montesi G.F & Mugelli A (1998) Effect of 5-HT₄ receptor stimulation on the pacemaker current I_f in human isolated atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 40, 516-522.
- Qvigstad E**, Brattelid T, Sjaastad I, Andressen K.W, Krobert K.A, Birkeland J.A, Sejersted O.M, Kaumann A.J, Skomedal T, Osnes J.B & Levy F.O (2005) Appearance of a ventricular 5-HT₄ receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc Res* 65(4), 869-878.
- Rahme M.M**, Cotter B, Leistad E, Wadhwa M.K, Mohabir R, Ford A.P, Eglen R.M & Feld G.K (1999) Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the atrial selective 5-HT₄ receptor antagonist RS-100302 in experimental atrial flutter and fibrillation. *Circulation* 100(19) 2010-2017.
- Sanders L** & Kaumann A.J (1992) A 5-HT₄-like receptor in human left atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345, 382-386.
- Saxena P.R** & Villalon C.M (1990) Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists. *J Cardiovasc Pharm* 15, s17-s34.
- Schoemaker R.G**, Du X.Y, Bax W.A & Saxena P.R (1992) 5-Hydroxytryptamine increases contractile force in porcine right atrium but not in left ventricle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346(5), 486-489.
- Schoemaker R.G**, Du X.Y, Bax W.A, Bos E & Saxena P.R (1993) 5-Hydroxytryptamine stimulates human isolated atrium but not ventricle. *Eur J Pharmacol* 230(1), 103-105.
- Schultheiss HP** (1988) Viral myocarditis-new aspects of pathomechanisms, diagnosis and therapy. *Wien Klin Wochenschr* 100(24), 779-786.
- Staudt A**, Staudt Y, Dorr M, Bohm M, Knebel F, Hummel A, Wunderle L, Tiburcy M, Wernecke K.D, Baumann G & Felix S.B (2004) Potential role of humoral immunity in cardiac dysfunction of patients suffering from dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 44(4), 829-836.
- Steinberg S.F** & Brunton L.L (2001) Compartmentation of G protein-coupled signaling pathway in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol*, 41, 751-773.
- Thandroyen F.T**, Morris A.C, Hagler H.K, Ziman B, Pai L, Willerson J.T & Buja L.M (1991) Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. *Circ Res* 69(3), 810-819.
- Van den Wyngaert I**, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J, Walter Luyten W & Bender E (1997) Cloning and expression of a human serotonin 5-HT₄ receptor cDNA. *J Neurochem* 69 (5), 1810-1819.
- Vilario M.T**, Domenech T, Palacios J.M & Mengod G (2002) Cloning and characterization of a novel human 5-HT₄ receptor variant that lacks the alternatively spliced carboxy terminal exon. RT-PCR distribution in human brain and periphery of multiple 5-HT₄ receptor variants. *Neuropharmacology*, 42(1), 60-73.
- Workman A.J** & Rankin A.C (1998) Serotonin, I(f) and human atrial arrhythmia. *Cardiovasc Res* 40, 436-437.
- Yusuf S**, Al-Saady N & Camm J (2003) 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation : how significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electr* 14, 209-214.
- Zaccolo M**, Malgalhaes P & Pozzan T (2002) Compartmentalization of cAMP and Ca²⁺ signals. *Curr Opin Cell Biol* 14, 160-166.
- Zipes D.P** (1997) Atrial fibrillation : from cell to bedside *J Cardiovasc Electr* 8, 927-938.

CHAPITRE II : EFFETS FONCTIONNELS DE L'ANTICORPS ANTI-G21V SUR L'ACTIVITE DU RECEPTEUR h5-HT_{4(e)} RECOMBINANT ET NATIF

(Articles 2 : Di Scala et al., 2004b ; Article 3 : Bozon et al., 2002a,

Article soumis : Di Scala et al., 2005

Article en préparation 1)

La seconde boucle extracellulaire des récepteurs RCPG cardiaques tels que les récepteurs β -adrénergiques et M2 muscariniques, constitue la principale cible des auto-anticorps fonctionnels chez des patients atteints de cardiopathies (Fu et al., 1993; Magnusson et al., 1994; Hoebeke, 1995, Mijares et al., 1996a; Eftekhari et al., 2000; Iwata et al., 2001). Ces immunoglobulines agissent comme des "agonistes like" et n'induisent pas de désensibilisation contrairement aux agonistes naturels (Magnusson et al., 1994; Elies et al., 1998; Wallukat et al., 1999). Ces effets ont été reproduits avec des anticorps anti-peptidiques poly- et monoclonaux dirigés contre la boucle EL2 de ces récepteurs (Magnusson et al., 1991, 1994; Fu et al., 1994; Mijares et al., 1996b, 2000; Elies et al., 1998, Lebesgue et al., 1998; Matsui et al., 1998). Cette caractéristique nous a permis d'étudier l'activité fonctionnelle du récepteur h5-HT₄ cardiaque en présence d'un anticorps anti-peptidique, l'anti-G21V. Cet anticorps polyclonal est dirigé contre un peptide mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur 5-HT₄ humain (Sallé et al., 2001) (Figure 29). L'action de l'anti-G21V sera ensuite comparée avec celle des auto-anticorps anti-récepteur h5-HT₄ identifiés dans le sérum de patients atteints de FA (cf chapitre III).

La fragilité des cellules atriales humaines isolées, ainsi que la faible disponibilité des tissus humains rendent l'étude du récepteur h5-HT₄ natif complexe. Pour pallier ces difficultés, nous avons choisi d'étudier parallèlement l'isoforme (e) de ce récepteur exprimée par voie recombinante (Figure 19). Cette stratégie nous a permis de caractériser la fonctionnalité du récepteur 5-HT₄ dans différents contextes cellulaires.

I) Le récepteur h5-HT_{4(e)} recombinant

(Articles 2, 3 et soumis)

L'isoforme (e) du récepteur h5-HT₄ cardiaque a été exprimée dans deux lignées cellulaires, les cellules COS-7 et CHO. Deux clones de cellules CHO, clones 1 et 2, ont été distingués par leur capacité à produire de l'AMPC suite à l'application de sérotonine. L'anticorps anti-G21V a été appliqué à la surface des cellules exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)}

G-I-I-D-L-I-E-K-R-K-F-N-Q-N-S-N-T-Y-C-V

Figure 29 : Séquence du peptide G21V. Peptide mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur h5-HT₄ cardiaque. Immunisation de lapins avec ce peptide : synthèse de l'anticorps polyclonal anti-G21V. (Sallé et al., 2001)

Type cellulaire	Activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V
Cellules COS-7	Agoniste like
Cellules CHO Clone 1 Clone 2	Sans effets Agoniste inverse like
Cellules atriales humaines	Antagoniste like

Tableau 10 : Différentes activités fonctionnelles de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT₄ cardiaque

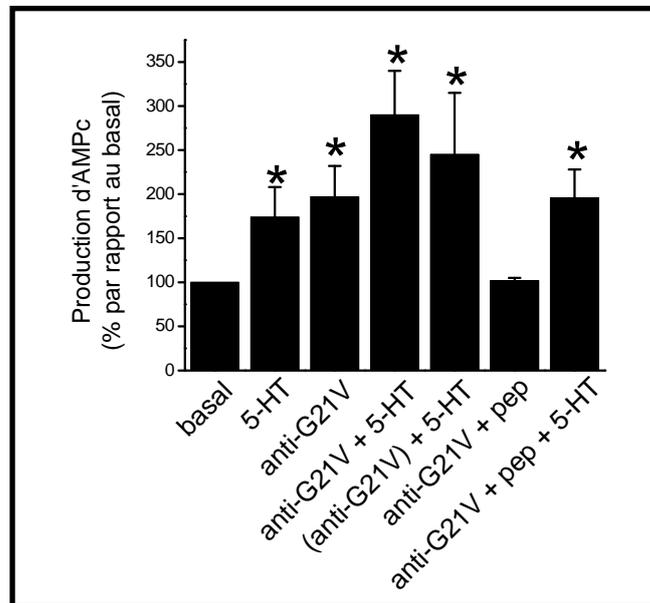


Figure 30 : Effets de l'anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7. Production d'AMPc normalisée/au taux basal. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal. 5-HT (1 μ M), anti-G21V (10 μ g/ml), peptide G21V (pep, 67 nM), 10 μ g/ml anti-G21V puis 1 μ M 5-HT [(anti-G21V)+5-HT], 10 μ g/ml anti-G21V plus 67 nM peptide G21V [anti-G21V+pep], 10 μ g/ml anti-G21V plus 67 nM peptide G21V plus 1 μ M 5-HT [anti-G21V+pep+5-HT]

en présence et en absence de l'agoniste naturel, la 5-HT. Les effets fonctionnels de cet anticorps ont été étudiés en mesurant les capacités de ce récepteur à transduire un signal à l'intérieur des cellules.

Les Articles 2, 3 et l'article soumis montrent que l'anticorps anti-G21V induit des effets fonctionnels sur le récepteur h5-HT_{4(e)} cardiaque recombinant.

Pour la première fois, nous avons trouvé un anticorps anti-récepteur RCPG cardiaque présentant des comportements différents (Tableau 10). En effet, l'anticorps anti-G21V agit comme un "agoniste-like" sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules COS-7 (*Article 3*, Figure 30), un "agoniste inverse like" sur les cellules CHO clone 2 (*Article soumis*, Figure 31) et semble être dépourvu d'effets visibles sur les cellules CHO clone 1 (*Article 2*, Figure 32).

Le défaut d'activité fonctionnelle de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 1 n'est pas due à une concentration d'anticorps insuffisante, ni à une absence de fixation de l'anticorps (*Article 2*). L'estimation de la constante J (J= 3 dans les cellules CHO clone 1 et J = 1 dans les cellules COS-7) a permis de proposer que le comportement de l'anticorps anti-G21V soit dépendant de l'équilibre R/R* des récepteurs h5-HT_{4(e)} présents dans la membrane. Cet équilibre semble être spécifique de la lignée cellulaire étudiée.

Au sein d'un même environnement membranaire, l'anticorps anti-G21V induit également différents effets sur le récepteur h5-HT_{4(e)} : effet "agoniste inverse like" sur les cellules CHO clone 2 (*Article soumis*) et aucun effet sur les cellules CHO clone 1 (*Article 2*). La densité et l'efficacité de couplage du récepteur h5-HT_{4(e)}, ainsi que l'activation des phosphodiésterases (*via* la voie du GMPc) et des protéines Gi ne seraient pas à l'origine de ces différences (*Article soumis*, Figure 33). L'équilibre R/R* du récepteur h5-HT_{4(e)} pourrait de nouveau expliquer le comportement de l'anticorps. L'étude menée avec l'antagoniste spécifique du récepteur 5-HT₄, le ML10375, ainsi que l'effet "agoniste-inverse like" de l'anti-G21V, suggèrent que cet équilibre soit différent entre les deux clones. Le récepteur serait présent majoritairement sous une forme inactive R dans la membrane des cellules CHO clone 2, contrairement aux cellules CHO clone 1. Les différents états conformationnels proposés pour le récepteur 5-HT₄ nous ont permis de suggérer que ces formes inactives (Claeyssen et al., 2001) seraient soit des formes R* transformées en formes R, soit des formes R* ayant des propriétés similaires aux formes inactives R.

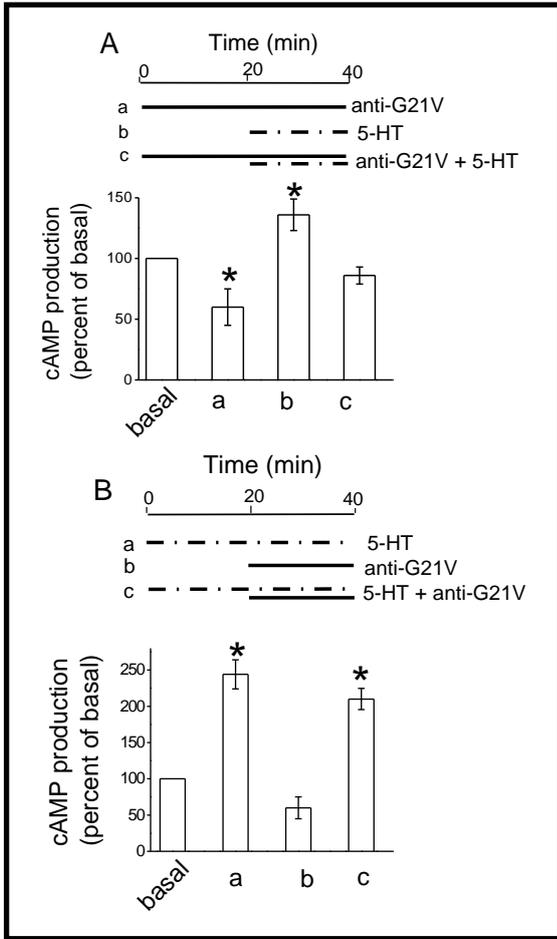


Figure 31 : Effets de l'anticorps anti-G21V sur l'action de la 5-HT sur les cellules CHO clone 2 exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)}.

Production d'AMPc normalisée/au taux basal. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal. 5-HT (1 μ M) (Ab, Ba), anti-G21V (10 μ g/ml) (Aa, Bb), 1 μ M 5-HT puis 10 μ g/ml anti-G21V [5-HT+anti-G21V] (Bc), 10 μ g/ml anti-G21V puis 1 μ M 5-HT [anti-G21V+5-HT] (Ac).

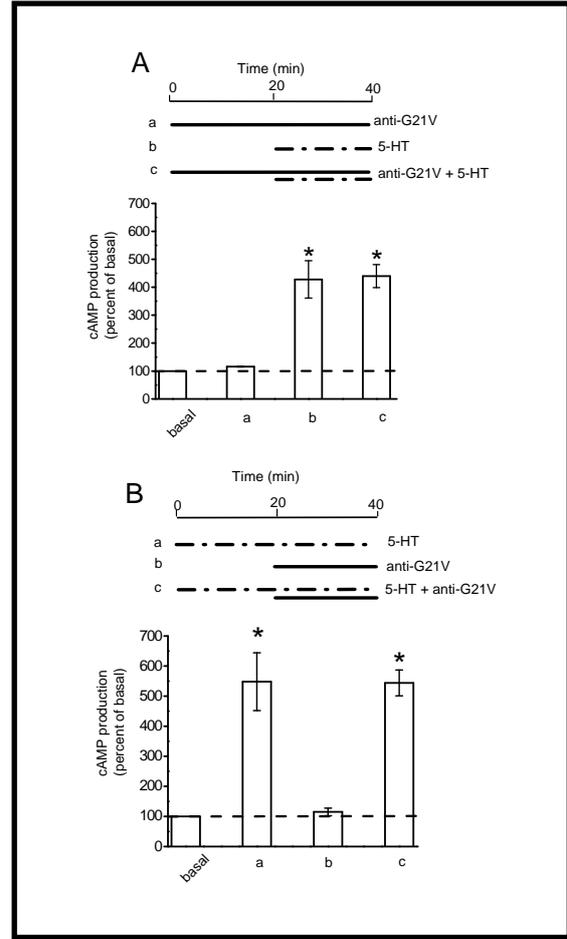


Figure 32 : Effets de l'anticorps anti-G21V sur l'action de la 5-HT sur les cellules CHO clone 1 exprimant le récepteur h5-HT_{4(e)}.

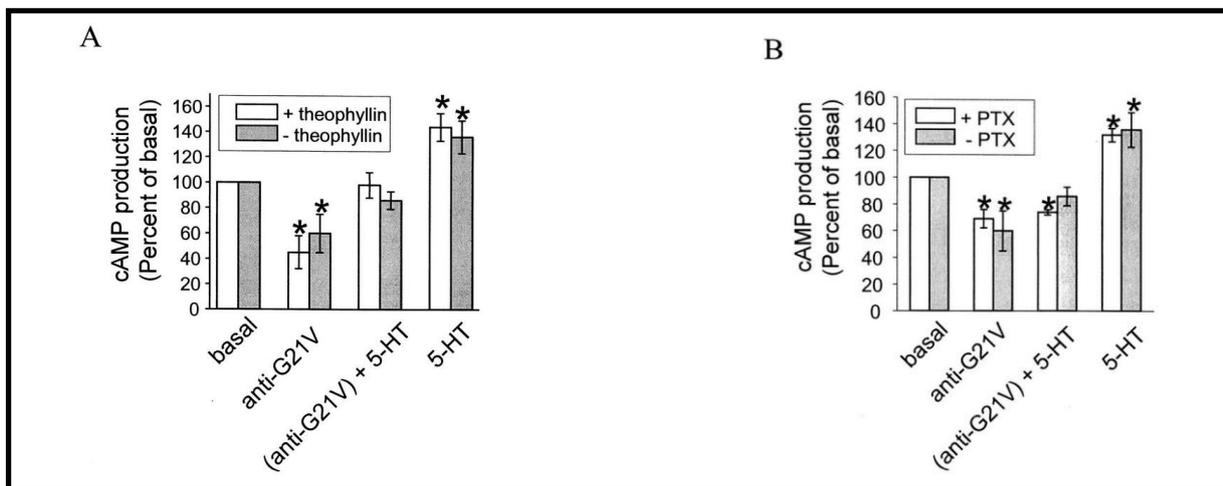


Figure 33 : Effets de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 2 en présence d'inhibiteurs de phosphodiésterases (PDE) ou de protéine Gi.

Production d'AMPc normalisée rapport au taux basal. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal. 5-HT (1 μ M), anti-G21V (10 μ g/ml), anti-G21V puis 1 μ M 5-HT [anti-G21V+5-HT], theophyllin (inhibiteur de PDE, 5 mM), Pertussis toxine (PTX, inhibiteur de protéine Gi, 2 μ g/ml).

L'action de l'anticorps anti-G21V dépend de son sens d'application sur le récepteur par rapport à la 5-HT (*Article soumis*, Figure 31). Cet anticorps inhibe l'effet de la sérotonine uniquement lorsqu'il est appliqué en premier. Dans la situation inverse, la fixation de la 5-HT semble induire une modification structurale du récepteur qui n'altère pas l'épitope de l'anti-G21V (*Article soumis*, Figure 34), mais qui inhibe l'action de cet anticorps.

Les expériences de cytométrie de flux réalisées sur les cellules CHO clones 1 et 2 (*Articles 2 et soumis*, Figure 34) suggèrent que l'anticorps anti-G21V ne favorise pas la désensibilisation du récepteur h5-HT_{4(e)}, comme mentionné avec les anticorps anti-RCPG cardiaques.

Les résultats similaires obtenus avec les anticorps mono- (fragments Fab) et bicaténaires indiquent que l'action de l'anticorps anti-G21V ne nécessite pas la dimérisation du récepteur h5-HT_{4(e)} (*Article soumis*, Figure 35), contrairement aux anticorps anti-récepteurs β2-adrénergiques (Mijares et al., 1996b, 2000).

L'ensemble de ces données conforte l'idée que l'activité fonctionnelle du récepteur h5-HT₄ cardiaque pourrait être modulée par la présence d'auto-anticorps fonctionnels. L'action de ces anticorps serait dépendante de l'environnement membranaire et/ou cellulaire et de l'équilibre R/R du récepteur h5-HT₄ cardiaque.*

2) Récepteur h5-HT₄ natif

(Article en préparation 1)

Au laboratoire, Sallé et collaborateurs (2001) ont proposé un effet "antagoniste like", voire "agoniste inverse like", de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT₄ cardiaque natif (Figure 36). Le comportement de cet anticorps a été déterminé en mesurant l'amplitude du courant calcique de type L. Cet effecteur n'était probablement pas le plus adapté pour visualiser un effet de type agoniste inverse de l'anticorps seul, étant donné que l'activité basale de ce courant varie beaucoup d'une cellule atriale humaine à une autre et est souvent faible (Di Scala et al., 2004a). Afin de préciser l'action de cet anticorps, nous avons choisi de réitérer ces expériences en mesurant l'activité d'un autre effecteur, l'adénylate cyclase. L'anticorps anti-G21V a été appliqué sur les cellules atriales seul ou en présence de différentes substances telles que la 5-HT, l'isoprotérénol et la forskoline. Les conditions expérimentales sont identiques à celles présentées dans les articles (Bozon et al., 2002a; Di Scala et al., 2004a, 2004b). Les résultats obtenus font l'objet d'un *l'article en cours de préparation*.

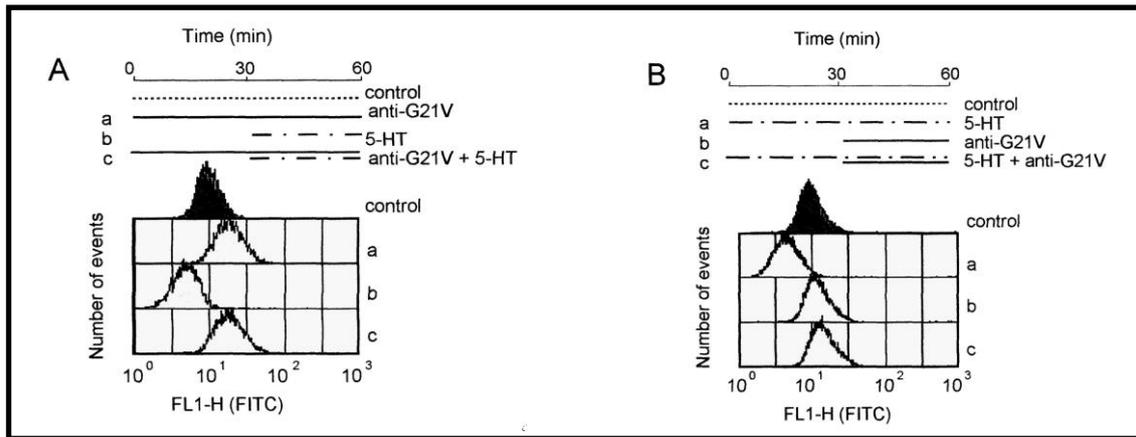


Figure 34 : Analyse de la liaison spécifique de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO clone 2 par cytométrie de flux. Intensité de fluorescence obtenue avec l'anticorps comparée à celle observée en condition contrôle (control), en présence de 1 μ M 5-HT seule (Ab, Ba), avec 10 μ g/ml anticorps puis 1 μ M 5-HT [anti-G21V+5-HT] (Ac) ou 1 μ M 5-HT puis 10 μ g/ml anticorps [5-HT+ anti-G21V] (Bc). Tracé représentatif.

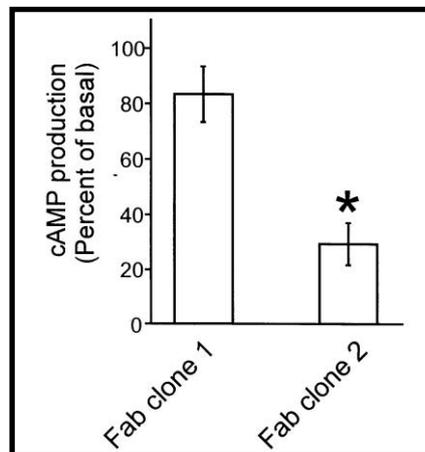


Figure 35 : Effets du fragment monovalent Fab de l'anticorps anti-G21V sur l'activité du récepteur h5-HT_{4(e)} exprimé dans les cellules CHO. Production d'AMPC normalisée rapport au taux basal. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal. Fab (30 μ g/ml).

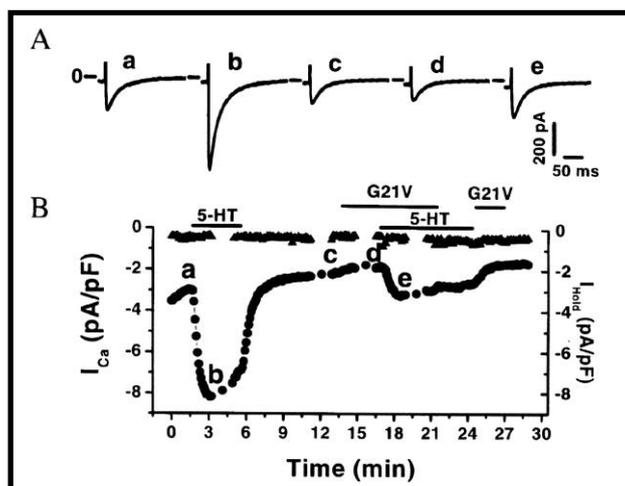


Figure 36 : Effets de l'anticorps anti-G21V sur le courant calcique induit par la 5-HT sur des cellules atriales humaines. Le graphe (B) représente la cinétique du courant calcique en réponse à 1 μ M 5-HT et 10 μ g/ml anticorps anti-G21V (G21V). Les applications sont mentionnées par les barres au dessus du tracé. Les courants calciques individuels (A) enregistrés aux points (a-e) sont représentés au dessus du graphe.

L'anticorps anti-G21V ne modifie pas significativement le taux basal d'AMPC et n'inhibe pas l'action de la 5-HT, quel que soit son sens d'application sur les cellules atriales (Tableau 11). Cette absence d'activité n'est pas liée à un manque de fixation de l'anticorps sur le récepteur (Figure 37). Par ailleurs, cet anticorps n'interagit pas avec les récepteurs β -adrénergiques et l'adénylate cyclase (Tableau 11).

Suivant l'effecteur étudié, les effets de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur natif sont différents : effet de type "antagoniste like" en mesurant le courant ICa^{2+}_L (Sallé et al., 2001) et aucun effet visible en mesurant le taux d'AMPC, comme observé avec le récepteur 5-HT_{4(e)} recombinant exprimé dans les cellules CHO clone 1 (**Article 2**). Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le comportement de l'anti-G21V sur ce récepteur :

A) hypothèse 1 : La fixation de cet anticorps induirait l'activation d'une ou de plusieurs cascade(s) de transduction différentes de la voie AMPC. Trois voies seraient envisageables : 1) la voie GMPc/PKG (Nascimento et al., 2002); 2) la voie IP3/PKC (McHugh et al., 2000) et 3) un couplage direct entre le récepteur et le canal calcique *via* une protéine Gi (Kilts et al., 2000; Pindon et al., 2002).

B) hypothèse 2 : les récepteurs 5-HT₄ natifs seraient localisés au sein de microdomaines de régulation. L'anticorps anti-G21V pourrait favoriser la voie AMPC/PKA. Toutefois, l'AMPC produit localement dans ces compartiments ne pourra pas être mesuré avec le dosage radioimmunologique utilisé. En effet, il permet une quantification globale du taux d'AMPC intracellulaire produit dans les cellules. L'activation des autres voies de transduction proposées dans l'hypothèse 1 sont également envisageables au sein de ces microdomaines.

Afin de comprendre le comportement de l'anticorps anti-G21V sur le récepteur h5-HT₄ natif, nous devons analyser plus précisément les processus cellulaires mis en jeu suite à la fixation de cet anticorps. Les réponses cellulaires seront étudiées en présence d'inhibiteurs des voies de transduction énoncées dans l'hypothèse 1. L'action similaire de l'anticorps sur le récepteur natif et recombinant exprimé dans les cellules CHO clone 1 suggère que le récepteur 5-HT_{4(e)} en présence de l'anti-G21V puisse également activer une ou des voies de transduction différentes de la voie AMPC.

Ligands	Récepteur 5-HT ₄				Récepteur β-adrénergiques		Adénylate cyclase	
	(anti-G21V) + 5-HT	()+5HT	(5-HT) + antiG21	(5-HT)	(anti-G21) + Iso	Iso	(anti-G21) + Fk	Fk
Taux d'AMPC (%)	183± 19	185± 9	198± 19	248± 30	458± 58	361± 63	487± 87	562± 70

Tableau 11: Effets de l'anticorps anti-G21V sur l'action de la 5-HT, de l'isoprotérénol et de la forskoline sur les myocytes atriaux humains. Production d'AMPC normalisée/au taux basal. Analyses suivant le sens d'application de l'anticorps : 10 µg/ml d'anti-G21V puis 1 µM 5-HT [(anti-G21V)+5-HT] et 1 µM 5-HT puis 10 µg/ml d'anti-G21V [(5-HT)+ anti-G21V]. Chaque condition a son point contrôle : ()+5-HT pour [(anti-G21V)+5-HT] et (5-HT) pour [(5-HT)+anti-G21V]. Ecriture valable pour tous les ligands. Les valeurs sont des moyennes ± s.e.m.



Figure 37 : Identification immuno-chimique du récepteur h5-HT₄ dans les myocytes atriaux humains en condition native. Dot-blot réalisé avec 30 µg de protéines par puits. Membrane de nitrocellulose incubée avec 10 µg/ml d'anticorps anti-G21V (A) et d'IgG contrôle (B).

Bibliographie

- Baba A**, Yoshikawa T, Fukuda Y, Sugiyama T, Shimada M, Akaishi M, Tsuchimoto K, Ogawa S & Fu M (2004) Autoantibodies against M2-muscarinic acetylcholine receptors : new upstream targets in atrial fibrillation in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 25, 1108-1115.
- Borda E**, Pascual J, Cossio P, De La Vega M, Arana R & Sterin-Borda L (1984) A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol* 57, 679-686.
- Bozon V**, Di Scala E, Eftekhari P, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Hoebeke J and Argibay J (2002a). Agoniste-like activity of antibodies directed against the second extracellular loop of the human cardiac serotonin 5-HT_{4(e)} receptor in transfected COS-7 cells. *Receptors and Channels*, 8 (2) 113-121.
- Claeyssen S**, Sebben M, Becamel C, Parmentier M.L, Dumuis A & Bockaert J (2001) Constitutively active mutants of 5-HT₄ receptors are they in unique active states ? *EMBO Rep* 2, 61-67.
- Di Scala E**, Rose S, Hérault O, Argibay J, Cosnay P and Bozon V (2005). Conformational state of human cardiac 5-HT_{4(e)} receptors influences the functional effects of polyclonal anti-5-HT₄ receptor antibodies. *Eur J Pharmacol* (soumis)
- Di Scala E**, Findlay I, Rose S, Aupart M, Argibay J, Cosnay P & Bozon V (2004a) High efficiency activation of L-type Ca²⁺ current by 5-HT in human atrial myocytes. *Receptors and Channels* 10 (5-6) 159-165.
- Di Scala E**, Rose S, Hérault O, Argibay J, Cosnay P and Bozon V (2004b). Polyclonal antibody effects on the human cardiac 5-HT_{4(e)} receptors depend upon the expression system. *Receptors and Channels* 10 (3-4) 125-129.
- Dobrev D**, Christ T & Ravens U (2004) Muscarinic subtype-2 receptor autoantibodies actors or bystanders in human atrial fibrillation? *Eur Heart J* 25, 1091-1092.
- Eftekhari P**, Sallé L, Lezoualc'h F, Mialet J, Gastineau M, Briand J.P, Isenberg D.A, Fournie G.J, Argibay J, Fischmeister R, Muller S & Hoebeke J (2000) Anti-SSA/Ro52 autoantibodies blocking the cardiac 5-HT₄ serotonergic lupus congenital heart block. *Eur J Immunol* 30, 2782-2790.
- Elies R**, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J & Levin M.J (1996) Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 157, 4203-4211.
- Elies R**, Fu L.X, Eftekhari P, Wallukat G, Schulze W, Granier C, Hjalmarson A & Hoebeke J (1998) Immunochemical and functional characterization of an agonist-like monoclonal antibody against the M2 acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 251, 659-666.
- Ferrari I**, Levin M.J, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M & Hoebeke J (1995) Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of trypanosoma cruzi and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J Exp Med* 182, 59-65.
- Fu L.X**, Magnusson Y, Bergh C.H, Liljeqvist J.A, Waagstein F, Hjalmarson A & Hoebeke J (1993) Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 91, 1964-1968.
- Fu M.L**, Herlitz H, Wallukat G, Hilme E, Hedner T, Hoebeke J & Hjalmarson A (1994) Functional autoimmune epitope on alpha 1-adrenergic receptors in patients with malignant hypertension. *Lancet* 17; 344(8938), 1660-1663.
- Goin J.C**, Borda E, Leiros C.P, Storino R & Sterin-Borda L (1994) Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease : pathological implications. *J Auton Nerv Syst* 47, 45-52.
- Hoebeke J** (1995) La seconde boucle extracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G : une cible préférentielle pour des auto-anticorps fonctionnels *M&S* 11, 1661-1667.
- Iwata M**, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H & Ogawa S (2001) Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 37(2), 418-424.
- Kilts J.D**, Gerhardt M.A, Richardson M.D, Sreeram G, Mackensen B, Grocott H.P White W.D, Davis R.D, Newman M.F, Reves J.G, Schwinn D.A & Kwatra M.M (2000) β_2 -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i. *Circ Res* 87, 705-709.

- Lebesgue D**, Wallukat G, Mijares A, Granier C, Argibay J & Hoebeke J (1998) An agonist-like monoclonal antibody against the human β 2-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol* 348, 123-133.
- Limas C.J**, Goldenberg I.F & Limas C (1989) Autoantibodies against β -adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 64, 97-103.
- Magnusson Y**, Wallukat G, Guillet J.G, Hjalmarson A & Hoebeke J (1991) Functional analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 4(6), 893-905.
- Magnusson Y**, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A & Hoebeke J (1994) Characterisation of antibodies against the β 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect *Circ Res* 89, 2760-2767.
- Mandal K**, Jahangiri M, Mukhin M, Poloniecki J, Camm A.J & Xu Q (2004) Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 110, 2588-2590
- Matsui S**, Fu M.L, Katsuda S, Hayase M, Yamaguchi N, Teraoka K, Kurihara T, Takekoshi N, Murakami E, Hoebeke J & Hjalmarson A (1997) Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits *J Mol Cell Cardiol* 29(2), 641-655.
- Matsui S** & Fu M.L (1998) Myocardial injury due to G-protein coupled receptor-autoimmunity. *Jpn Heart J* 39(3), 261-274.
- Mc Hugh D**, Sharp E.M, Scheuer T & Catterall W.A (2000) Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (22), 12334-12338.
- Mijares A**, Verdout L, Peineau N, Vray B, Hoebeke J & Argibay J (1996a) Antibodies from *Trypanosoma cruzi* infected mice recognize the second extracellular loop of the alpha1-adrenergic and M2-muscarinic receptors and regulate calcium channels in isolated cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 163/164, 107-112.
- Mijares A**, Lebesgue D, Argibay J & Hoebeke J (1996b) Anti-peptide antibodies sensitive to the 'active' state of the β 2-adrenergic receptor. *FEBS Lett* 399, 188-191.
- Mijares A**, Lebesgue D, Wallukat G & Hoebeke J (2000) From agonist to antagonist: Fab fragments of an agonist-Like monoclonal anti- β 2-adrenoceptor antibody behave as antagonists. *Mol Pharmacol* 58, 373-379.
- Nascimento J.H**, Sallé L, Hoebeke J, Argibay J & Peineau N (2001) cGMP-mediated inhibition of cardiac L-type Ca^{2+} current by a monoclonal antibody against the M₂ Ach receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1251-C1258.
- Pindon A**, Van Hecke G, Van Gompel P, Lesage A.S, Leysen J.E & Jurzak M (2002) Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants : compound specificity and dual coupling with G α s- and G α i/o-proteins. *Mol Pharmacol* 61, 85-96.
- Sallé L**, Eftekhari P, Aupart M, Cosnay P, Hoebeke J & Argibay (2001) J Inhibitory activity of antibodies against the human atrial 5-HT₄ receptor. *J Mol Cell Cardiol* 33, 405-417.
- Wallukat G**, Fu H.M, Matsui S, Hjalmarson A & Fu M.L (1999) Autoantibodies against M2 muscarinic receptors in patients with cardiomyopathy display non-desensitized agonist-like effects. *Life Sci* 64(6-7), 465-469.

CHAPITRE III : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION FONCTIONNELLE D'AUTO-ANTICORPS ANTI-RECEPTEUR h5-HT₄

(Poster 4 : Di Scala et al., 2004)

Au cours de cette étude, nous avons recherché la présence d'auto-anticorps anti-récepteur h5-HT₄ dans le sérum de patients atteints de FA idiopathique et avons étudié leur fonctionnalité. 10 patients malades ainsi que 8 patients indemnes de pathologies cardiaques ("témoins") ont été sélectionnés. L'identification de ces auto-anticorps a été réalisée à l'aide de deux techniques immunochimiques : la technique ELISA et la cytométrie de flux (Bozon et al., 2002a; Di Scala et al., 2004b). Leur activité fonctionnelle a été étudiée en mesurant le taux d'AMPc intracellulaire et l'intensité du courant ICa²⁺_L (Di Scala et al., 2004a).

Pour la première fois, nous avons pu montrer que 2 patients sur 10 atteints de FA idiopathique présentaient des auto-anticorps anti-récepteur 5-HT₄ dans leur sérum (Figure 38). Cette proportion est proche des 30% proposés par Frustaci et collaborateurs (1997) lors de l'analyse immunohistochimique des biopsies auriculaires de patients présentant une FA.

Les IgG précipitées au sulfate d'ammonium n'induisent aucun effet visible sur le taux d'AMPc basal dans les myocytes atriaux humains (Figure 39). Les auto-anticorps ainsi que l'anticorps anti-peptidique anti-G21V (*Articles 2 et en préparation 1* Chapitre II 2) agissent de façon similaire sur le récepteur 5-HT₄. Cette similitude de comportement des anticorps a également été observée avec les anticorps anti-récepteurs β-adrénérgiques et muscariniques cardiaques (Magnusson et al., 1991).

Aucune information n'a pu être déduite de l'étude électrophysiologique réalisée sur les cardiomyocytes atriaux humains en présence de ces immunoglobulines pré-purifiées. Un effet inhibiteur non spécifique sur le courant ICa²⁺_L a été décelé avec les anticorps issus de tous les sera de patients malades et témoins. Des immunoglobulines ou des sphingolipides (Banach et al., 1993; Liliom et al., 2001) pourraient être à l'origine de cette inhibition. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. I. Findlay (DR2, CNRS) du laboratoire.

Ces résultats valident notre hypothèse de départ. Une composante auto-immune pourrait être impliquée dans la FA idiopathique. Cette étude doit être poursuivie et affinée en augmentant le nombre de patients et en purifiant les anticorps anti-récepteurs 5-HT₄ par

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

* : contrôle positif

Fig 38: Identification d'auto-anticorps anti-récepteur h5-HT₄ dans le sérum de patients atteints de fibrillation atriale paroxystique idiopathique. Test ELISA sur les fractions d'IgG précipitées au sulfate d'ammonium (33%) contre le peptide G21V. S/N = DO IgG patients/ DO IgG témoins. Reconnaissance spécifique quand S/N ≥ 2. Les valeurs sont des moyennes ± s.e.m.

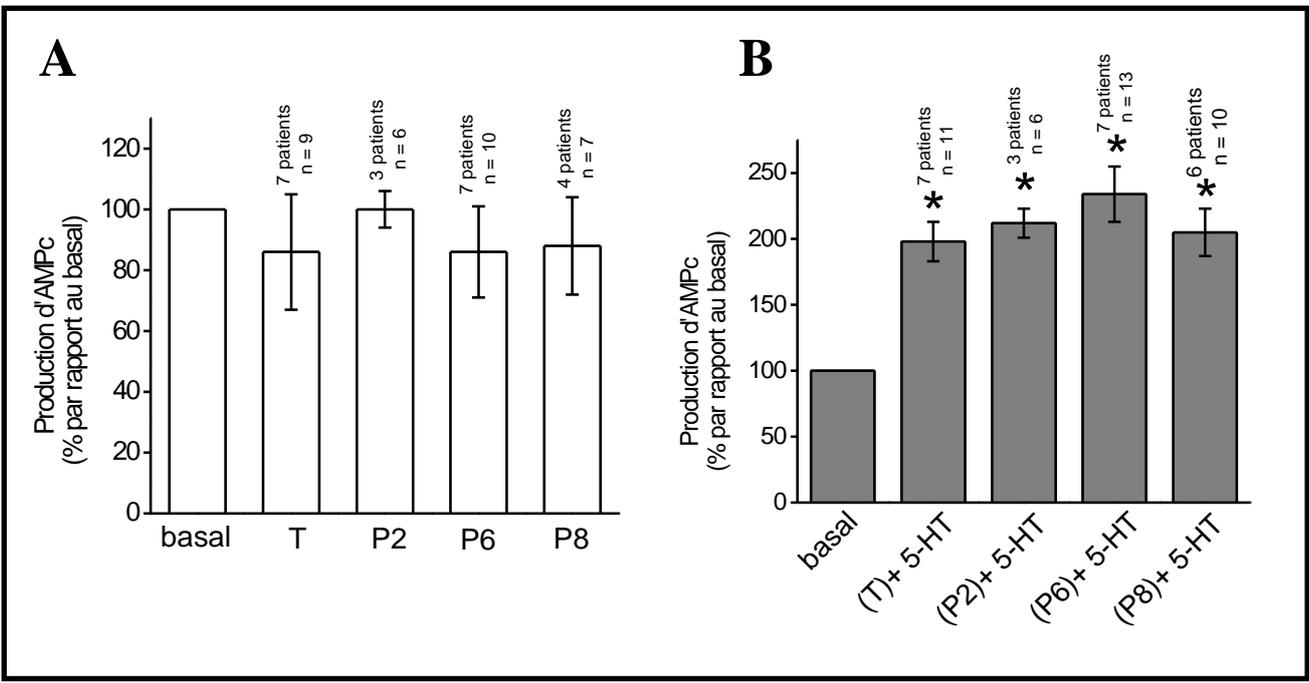


Figure 39 : Activité fonctionnelle des fractions IgG sur le récepteur exprimé dans les cellules atriales humaines. Production d'AMPc normalisée/au taux basal. Application des anticorps seuls (A) et avant la 5-HT (B). 0.6 mg d'anticorps avant 1 μM 5-HT [(anticorps)+5-HT]. T, anticorps de témoins sans fibrillation atriale; P2, P6 et P8 anticorps de patients atteints de FA.

chromatographie d'affinité. Une sélection longue et rigoureuse des patients doit être de nouveau réalisée.

Bibliographie

Banach K, Hüser J, Lipp P, Wellner M.C & Pott L (1993) Activation of muscarinic K⁺ current in guinea-pig atrial myocytes by a serum factor. *J Physiol (London)* 461, 263-281.

Bozon V, Di Scala E, Eftekhari P, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Hoebcke J and Argibay J (2002a). Agonist-like activity of antibodies directed against the second extracellular loop of the human cardiac serotonin 5-HT_{4(e)} receptor in transfected COS-7 cells. *Receptors and Channels*, 8 (2) 113-121.

Di Scala E, Findlay I, Rose S, Aupart M, Argibay J, Cosnay P & Bozon V (2004a) High efficiency activation of L-type Ca²⁺ current by 5-HT in human atrial myocytes. *Receptors and Channels* 10 (5-6) 159-165.

Di Scala E, Rose S, Hérault O, Argibay J, Cosnay P and Bozon V (2004b). Polyclonal antibody effects on the human cardiac 5-HT_{4(e)} receptors depend upon the expression system. *Receptors and Channels* 10 (3-4) 125-129.

Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo A.M & Maseri (1997) A histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 96, 1180-1184.

Liliom K, Sun G, Bünemann M, Virag T, Nusser N, Baker D.L, Wang D, Fabian M.J, Brandts B, Benders K, Eickel A, Malik K.U, Miller D.D, Desiderio D.M, Tigyi G & Pott L (2001) Sphingosylphosphocholine is a naturally occurring lipid mediator in blood plasma : a possible role in regulating cardiac function via sphingolipid receptors. *Biochem J* 355, 189-197.

CHAPITRE IV : NOUVEAU MODELE D'ETUDE, LES CELLULES ATRIALES DE PORC

(Article en préparation 2; communication orale 1 : Bozon et al., 2003)

L'étude des cellules cardiaques humaines pose de nombreux problèmes : faible nombre de prélèvements disponibles et tissus provenant de patients atteints de cardiomyopathies traités parfois depuis de nombreuses années avec des médicaments (β -bloqueurs, diurétiques.....). Afin d'établir les caractéristiques fonctionnelles du récepteur h5-HT₄ dans des conditions non pathologiques, il est nécessaire d'obtenir des tissus atriaux sains. Nous avons donc choisi d'étudier ce récepteur sur des cellules atriales isolées de porc fermier, espèce animale unique à part l'homme exprimant le récepteur 5-HT₄ au niveau cardiaque.

Les porcs étaient âgés de 1 mois et pesaient entre 2,9 et 3,7 kg. Différents organes ont été prélevés : le cœur, les poumons et le pancréas. Une identification immunochimique du récepteur 5-HT₄ cardiaque a été réalisée à l'aide de l'anticorps anti-G21V. Les propriétés fonctionnelles de ce récepteur ont également été déterminées sur les cellules atriales isolées. Plusieurs ligands ont été déposés à la surface des cellules : la 5-HT, le ML10375 et le GR113808 (Figure 18) pour l'étude du récepteur 5-HT₄; l'isoprotérénol pour les récepteurs β -adrénergiques et la forskoline pour tester la fonctionnalité de l'adénylate cyclase. Deux paramètres ont été mesurés, le taux d'AMPC intracellulaire et l'amplitude du courant calcique de type L. Les protocoles utilisés étaient similaires à ceux présentés pour les cellules atriales humaines (Di Scala et al., 2004a). Des modifications ont cependant été apportées concernant : 1) le nombre de cellules atriales utilisées lors des expériences de stimulation. Pour notre étude, 4×10^4 cellules ont été distribuées par tube; 2) la composition de la solution interne utilisée en Patch clamp (en mM) : 110 CsCl, 30 TEA-Cl, 5 MgATP, 0,1 GTP, 10 HEPES, 10 EGTA, pH = 7,1; 3) les créneaux de voltage effectués pour mesurer le courant calcique de type L : dépolarisation des cellules de -80 mV à 0 mV pendant 1s toutes les 6s.

L'ensemble des données présentées permettra l'élaboration d'un *article (en cours de préparation)*.

Résultats

1) Identification immunochimique du récepteur 5-HT₄

La Figure 40 montre les résultats obtenus par Western blot sur les cardiomyocytes atriaux et ventriculaires porcins. Deux bandes de poids moléculaire apparent 40 et 77 kDa ont été identifiées dans les préparations membranaires cardiaques (pistes de 1 à 4) de façon similaire au témoin positif, les poumons (piste 5). Elles étaient absentes au niveau du pancréas, témoin négatif (piste 6). Le récepteur 5-HT₄ cardiaque est présent principalement sous une forme de haut poids moléculaire dans les oreillettes et les ventricules porcins (pistes de 1 à 4). De plus, ce récepteur est exprimé majoritairement dans les oreillettes (pistes 1 et 2 *versus* pistes 3 et 4).

2) Caractéristiques fonctionnelles du récepteur 5-HT₄ exprimé dans les cellules atriales porcines

Le récepteur 5-HT₄ répond à des concentrations croissantes de 5-HT avec des valeurs d'EC₅₀ apparentes de $1,1 \times 10^{-7}$ M et $3,8 \times 10^{-7}$ M suivant respectivement le paramètre mesuré, taux d'AMPc et courant calcique. Ce récepteur induit une synthèse d'AMPc maximale et une activation totale du courant ICa^{2+}_L avec 1 μ M de 5-HT (Figure 41).

La Figure 42 illustre les variations du taux d'AMPc induit par l'activation des récepteurs 5-HT₄ (5-HT, ML et GR), β -adrénergiques (Iso) et des adénylates cyclases (Fk). La 5-HT, l'Iso et la Fk induisent une augmentation de la production d'AMPc, alors que le ML et le GR diminuent significativement le taux basal de ce second messager. Le ML10375 et le GR113808 sont des agonistes inverses pour le récepteur 5-HT₄ cardiaque de porc. La 5-HT induit une production d'AMPc plus faible que l'Iso et la Fk (120 ± 8 % avec la 5-HT *versus* 327 ± 21 % avec l'Iso et 256 ± 7 % avec la Fk). L'application de 10 μ M de Fk ne semble pas induire une activation maximale des adénylates cyclases dans ce type cellulaire (256 ± 7 % avec la Fk *versus* 327 ± 21 % avec l'Iso).

L'action des substances ML et GR sur l'activité de la 5-HT est représentée sur les Figures 43 et 44. La co-incubation du ML et du GR avec la 5-HT induit une diminution du taux d'AMPc (Figure 43; 73 ± 9 % [5-HT+ML] et 67 ± 12 % [5-HT+GR] *versus* 120 ± 8 % avec la 5-HT). La Figure 44 montre des tracés individuels de l'activation du courant calcique en présence de 5-HT, puis de ML (BI) ou de GR (BII). L'addition de ces drogues provoque

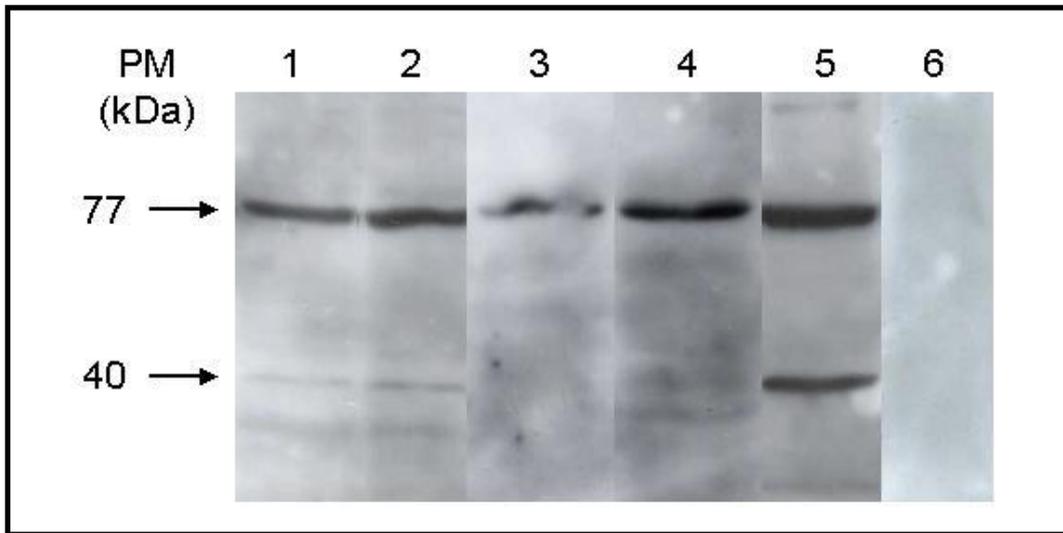


Figure 40 : Identification immuno-chimique du récepteur 5-HT₄ porcine cardiaque avec l'anticorps anti-G21V. Western blot réalisé en conditions réductrices et dénaturantes avec 200 µg de préparations membranaires par puits et 10 µg/ml d'anti-G21V. OD, oreillette droite (piste 1); OG, oreillette gauche (piste 2); VD, ventricule droit (piste 3); VG, ventricule gauche (piste 4); POU, poumons (témoin positif) (piste 5); P, pancréas (témoin négatif) (piste 6).

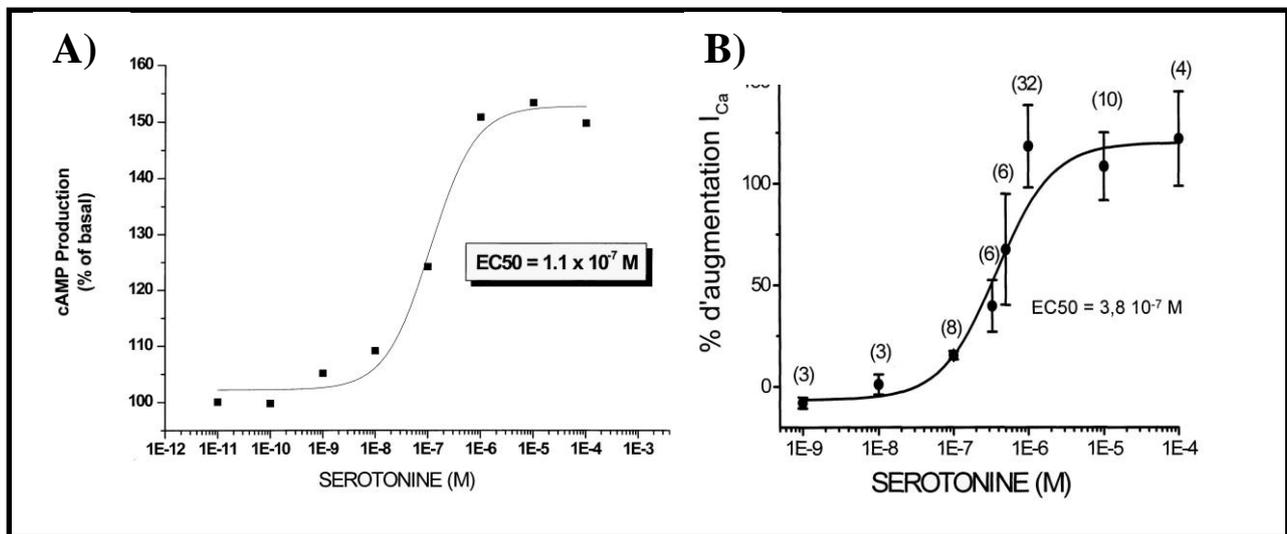


Figure 41 : Courbe dose-effet de la 5-HT sur le récepteur 5-HT₄ dans les cellules atriales porcines.

Production d'AMPc normalisée/au taux basal; A) Production d'AMPc et B) Amplitude du courant calcique. Valeurs normalisées/au taux basal d'AMPc ou le courant basal. EC₅₀, concentration de 5-HT induisant 50% de la production maximale d'AMPc ou du courant calcique total. (chiffre) : nombre de cellules étudiées par concentration de 5-HT.

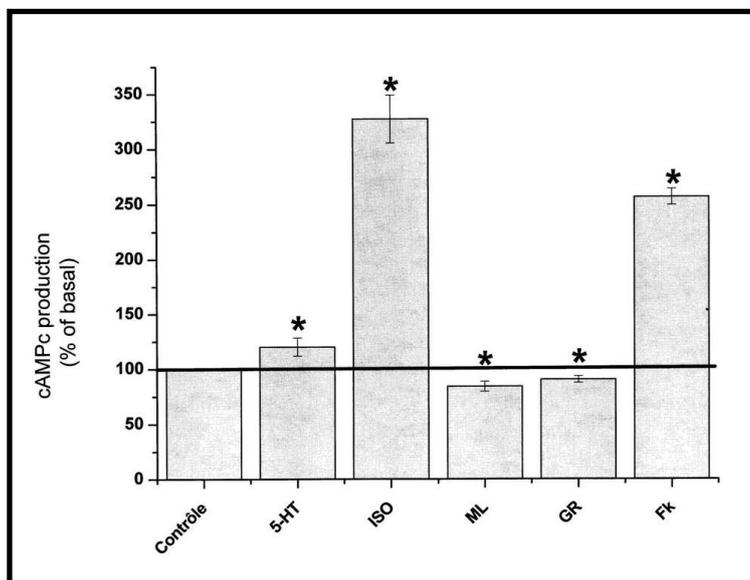


Figure 42 : Production d'AMPc en présence de 5-HT, isoprotérénol, ML10375, GR113808 et Forskoline dans des myocytes atriaux porcins.

Production d'AMPc normalisée/au taux basal. Moyenne ± s.e.m. * : p < 0.05 en comparant avec le taux basal. 1 µM 5-HT (5-HT), isoprotérénol (Iso), ML10375 (ML), GR113808 (GR) et 10 µM forskoline (Fk).

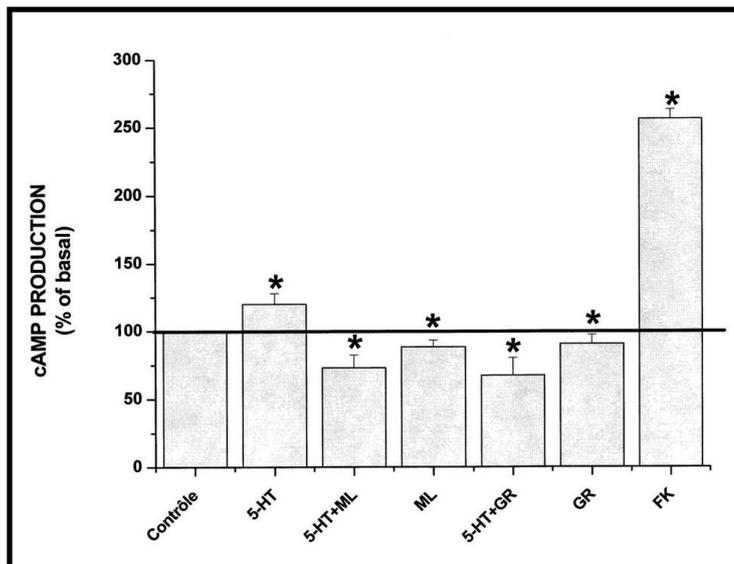


Figure 43 : Inhibition des effets de la 5-HT par le ML10375 et le GR113808. Effets de 1 μ M ML10375 (ou GR113808) sur la production d'AMPC en présence [ML+5-HT] ([GR+5-HT]) ou non [ML] (ou [GR]) de 1 μ M 5-HT. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant sans agonistes.

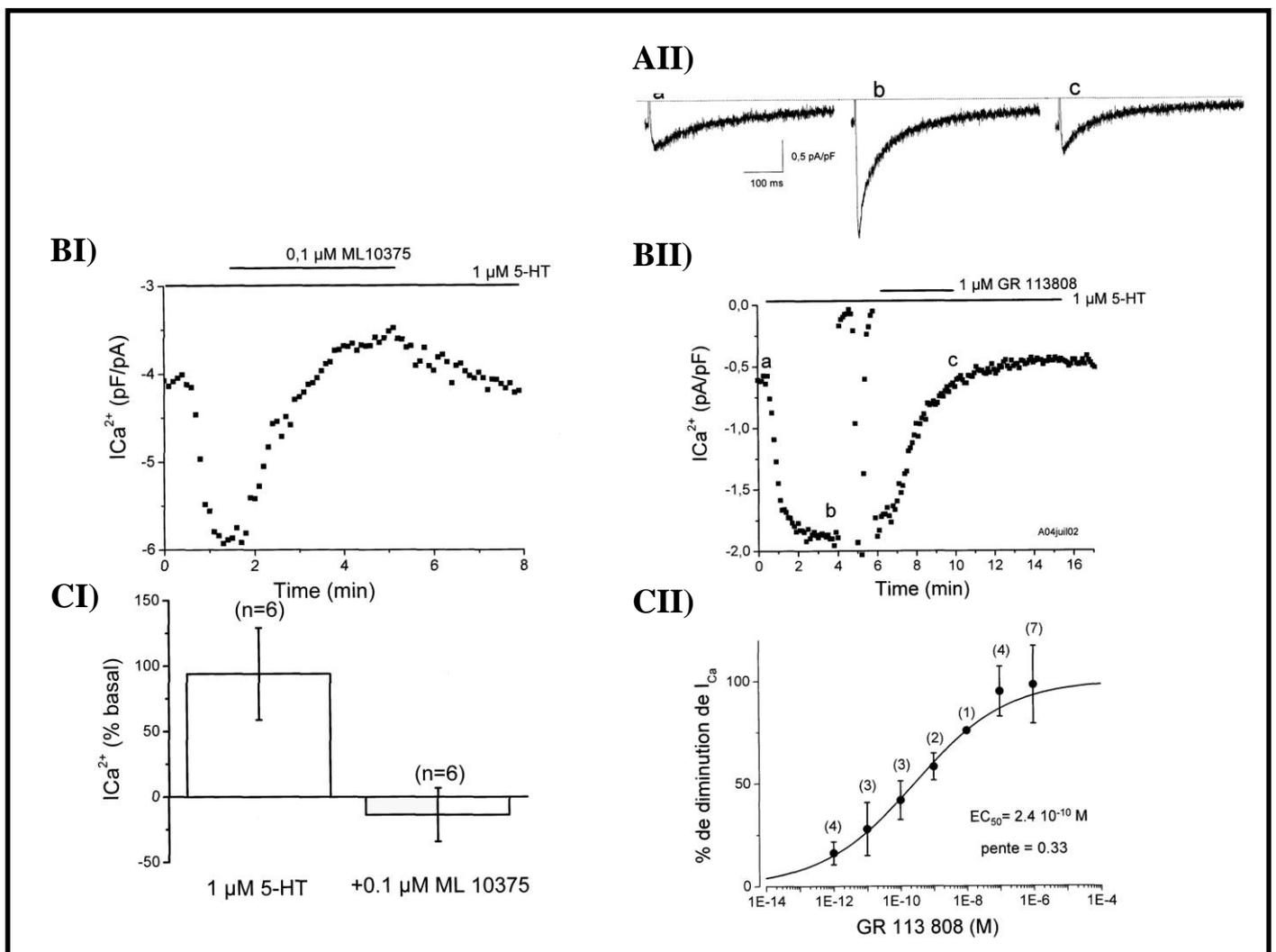


Figure 44 : Effets du ML10375 et du GR113808 sur le courant calcique induit par la 5-HT sur des cellules atriales porcines. Les graphes (B) représentent la cinétique du courant calcique en réponse à 1 μ M 5-HT puis en présence de 0,1 μ M ML (BI) ou 1 μ M GR (BII). Les applications sont mentionnées par les barres au dessus du tracé. Les courants calciques individuels (AII) enregistrés aux points (a-b) sont représentés au dessus du graphe BII. (CI et CII) courant calcique exprimé en pourcentage du courant basal. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant par rapport au basal.

une inhibition de ICa^{2+}_L (CI et CII). L'ensemble de ces données indique que les substances ML et GR inhibent les effets de la sérotonine sur les cellules atriales de porc.

Afin de déterminer la spécificité d'action du ML et du GR sur le récepteur 5-HT₄, des expériences de co-incubation ont été réalisées en présence d'Iso (Figure 45). La co-application de ces substances sur les cellules atriales induit une diminution significative du taux d'AMPc (209 ± 24 % [Iso+ML] et 232 ± 15 % [Iso+GR] *versus* 327 ± 21 % avec l'Iso). Le ML et le GR ne semblent pas être spécifiques du récepteur 5-HT₄ cardiaque de porc.

La Figure 46 illustre les variations du taux d'AMPc induit par l'activation simultanée des récepteurs 5-HT₄ (5-HT) et β -adrénergiques (Iso). La co-incubation de la 5-HT avec l'Iso induit une production d'AMPc de 210 ± 21 % [5-HT+Iso] *versus* 120 ± 8 % avec la 5-HT et 327 ± 21 % avec l'Iso seul. Ces données indiquent que la co-application de ces ligands à la surface des cellules amplifie la réponse sérotoninergique et diminue celle liée à l'Iso. Des processus de régulation sembleraient exister entre ces deux types de récepteurs cardiaques.

Discussion

Pour la première fois, nos travaux ont permis de définir les propriétés fonctionnelles et immunochimiques du récepteur 5-HT₄ cardiaque porcin. En effet dans la littérature, la majorité des études s'est intéressée à la pharmacologie de ce récepteur (Villalon et al., 1990; Kaumann, 1990; Lorrain et al., 1992; Medhurst & Kaumann, 1993; Parker et al., 1995; Kaumann et al., 1995b; Van den Wyngaert et al., 1997). Or l'implication du récepteur 5-HT₄ dans les arythmies auriculaires nécessite une bonne connaissance de sa fonctionnalité afin de synthétiser des inhibiteurs ciblés.

La masse du récepteur h5-HT₄ définie à partir de sa séquence primaire en acides aminés est de 40-42 kDa. Les poids moléculaires déterminés en Western blot suggèrent que le récepteur existe sous différentes formes : soit monomériques (40 kDa) et dimériques (70 kDa), comme mentionné dans le chapitre I pour les cellules atriales humaines; soit non sucrées (40 kDa) et glycosylées (70 kDa).

Chez le porcelet, l'efficacité de couplage du récepteur 5-HT₄ avec les différents effecteurs de la cascade de transduction intracellulaire est similaire à celle mesurée chez l'enfant (Etude en cours) et est moindre par rapport à l'homme adulte (~ 50 -100 nM; Di Scala et al., 2004a). Ce changement d'efficacité chez l'adulte peut être liée : 1) à la pathologie cardiaque des patients qui modifierait les propriétés du récepteur 5-HT₄; 2) aux médicaments

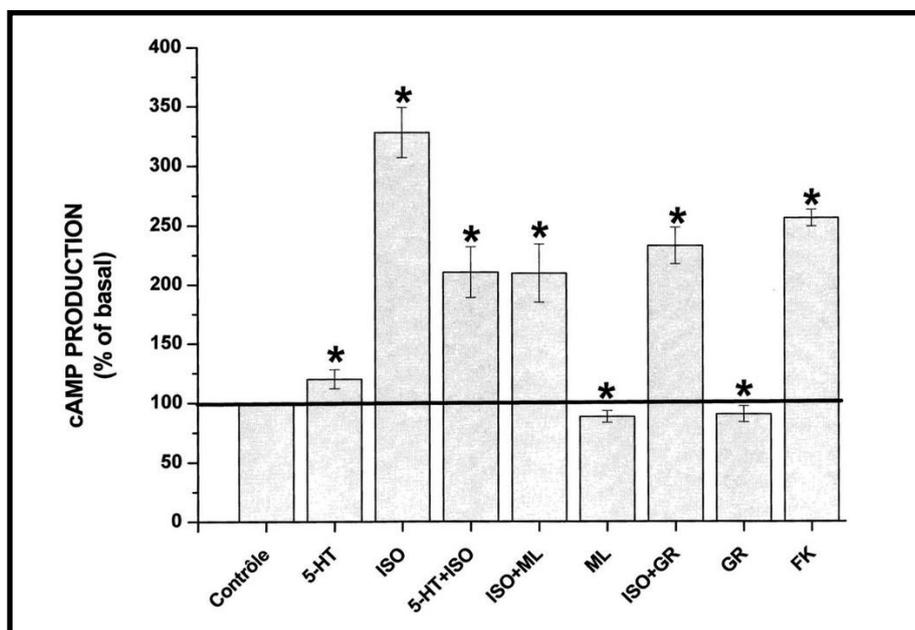


Figure 45 : Absence de spécificité d'action des antagonistes ML10375 et GR113808. Production d'AMPc en présence de 5-HT, isoprotérénol, ML10375, GR113808 et Forskoline dans des myocytes atriaux porcins. Production normalisée/au taux basal. 1 μ M 5-HT (5-HT), isoprotérénol (Iso), ML10375 (ML), GR113808 (GR) et 10 μ M forskoline (Fk). Co-incubations : 5-HT et Iso [5-HT+Iso], Iso et ML [Iso+ML], Iso et GR [Iso+GR]. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal.

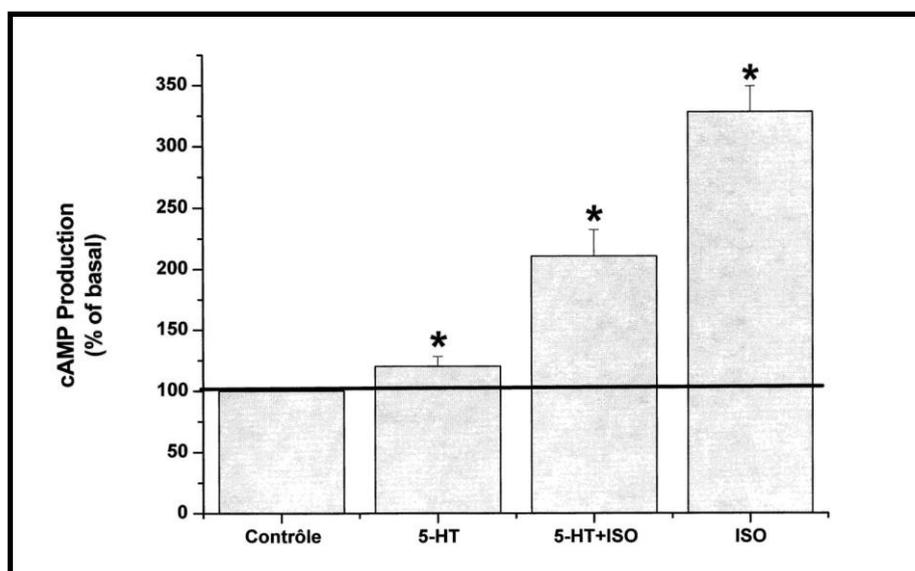


Figure 46 : Interaction entre les voies sérotoninergiques et β -adrénergiques. Production d'AMPc en présence de 5-HT et d'isoprotérénol dans les myocytes atriaux porcins. Production d'AMPc normalisée/au taux basal. 1 μ M 5-HT (5-HT) et 1 μ M isoprotérénol (Iso). Co-incubation 5-HT et Iso [5-HT+Iso]. Moyenne \pm s.e.m. * : $p < 0.05$ en comparant avec le taux basal.

prescrits aux malades; et 3) à l'âge des patients. Il a été démontré que la prévalence des fibrillations atriales augmentait avec l'âge des individus.

L'effet agoniste inverse des substances ML10375 et GR113808 sur l'activité du récepteur 5-HT₄ suggère que les isoformes (a) et (b) de ce récepteur ne seraient pas exprimées majoritairement dans les cellules atriales de porcelets, et que les isoformes (c) et (e) auraient un rôle important (Bach et al., 2001, Di Scala et al., 2004a; Blondel et al., 1998b; Mialet et al., 2000b). Le profils d'expression des isoformes semblerait varier avec l'âge des animaux et des individus. Les pathologies cardiaques constitueraient également un paramètre pouvant moduler ces expressions (Brattelid et al., 2004b).

Les expériences de co-incubation de la 5-HT avec l'Iso ont permis de montrer l'existence d'interactions entre les voies sérotoninergiques et β -adrénergiques. Nos résultats suggèrent que la voie β -adrénergique (Figure 47) amplifie les réponses liées à la 5-HT, alors que la 5-HT inhiberait la voie β -adrénergique. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats: 1) L'activation des récepteurs 5-HT₄ provoquerait la désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques et atténuerait l'action des catécholamines. 2) Les récepteurs sérotoninergiques et β -adrénergiques ne présenteraient pas la même localisation membranaire dans la cellule. Les récepteurs 5-HT₄ pourraient être plus proches des protéines impliquées dans la transduction des signaux que les récepteurs β -adrénergiques. L'activation simultanée de ces récepteurs rendrait moins accessible ces protéines aux récepteurs β -adrénergiques entraînant ainsi une diminution de la réponse à l'Iso. 3) La fixation de la 5-HT peut induire l'activation des protéines activatrices G_s et inhibitrices G_i (Kilts et al., 2000; Pindon et al., 2002). La stimulation de G_i *via* le récepteur 5-HT₄ pourrait être à l'origine d'une diminution de la réponse β -adrénergique. 4) La 5-HT pourrait être un antagoniste des récepteurs β -adrénergiques. Di Scala et collaborateurs (2004a) ont également montré une interaction entre ces deux voies sur des cellules atriales humaines d'adultes. Les effets observés sont différents. En effet, les voies sérotoninergiques et β -adrénergiques s'amplifient mutuellement.

Les substances ML10375 et GR113808 sont des agonistes inverses des récepteurs 5-HT₄ cardiaques porcins et agissent comme des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques. Ce comportement pourrait être lié, soit à un manque de spécificité des récepteurs aux catécholamines. Ces récepteurs seraient capables de lier l'isoprotérénol et des ligands sérotoninergiques (5-HT, ML et GR); soit à l'activation de protéines G_i suite à la fixation de ML ou GR sur les récepteurs 5-HT₄.

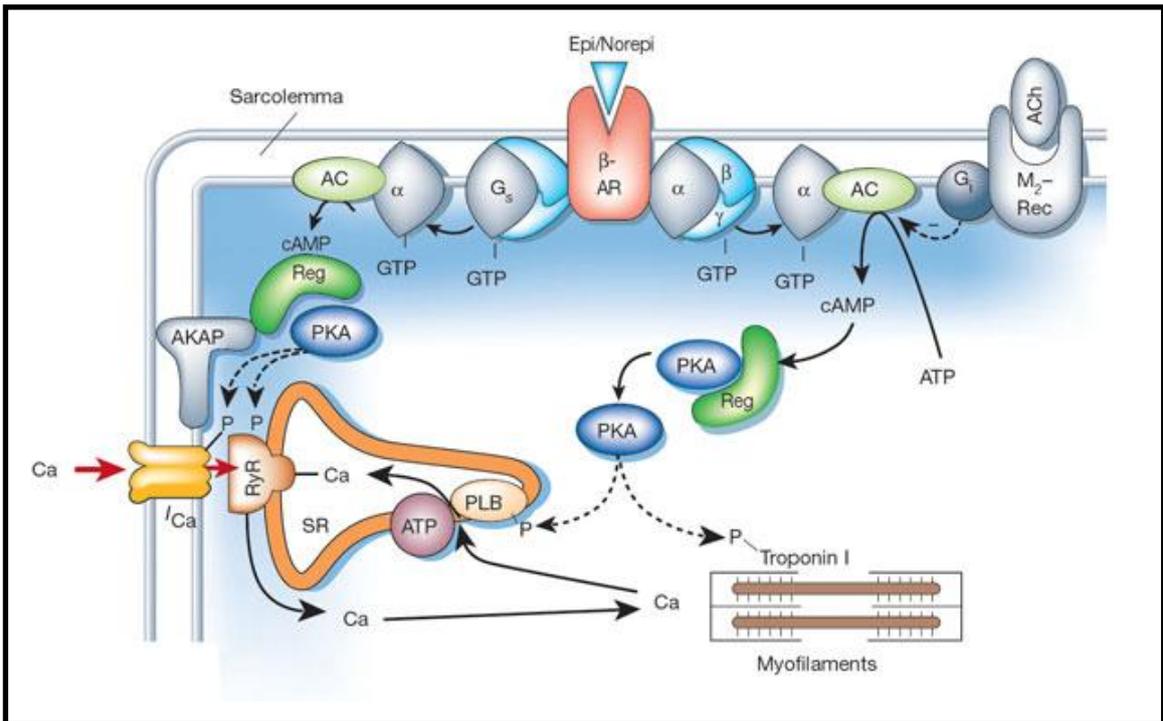


Figure 47 : Voies de transduction des récepteurs β -adrénergiques et M_2 muscariniques cardiaques. Existence d'interactions régulatrices entre ces deux voies. (d'après Bers, 2002)

L'ensemble de ces travaux suggère que les caractéristiques fonctionnelles du récepteur 5-HT₄ cardiaque diffèrent entre un animal sain et un individu atteint de cardiomyopathies, et entre un animal jeune et des patients plus âgés. Le modèle porcin est donc un modèle expérimental particulièrement intéressant et utile d'une part, pour comprendre le rôle du récepteur 5-HT₄ dans la physiologie du cœur normal, et d'autre part pour identifier les processus cellulaires et moléculaires mis en jeu lors de la survenue de pathologies.

Bibliographie

- Bach T**, Syversveen T, Kvingedal A.M, Krobert K.A, Brattelid T, Kaumann A.J & Levy F.O (2001) 5-HT_{4(a)} and 5-HT_{4(b)} receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363, 146-160.
- Blondel O**, Gastineau M, Langlois M & Fischmeister R (1998b) The 5-HT₄ receptor antagonist ML10375 inhibits the constitutive activity of human 5-HT_{4(c)} receptor. *Br J Pharmacol* 125(4), 595-597.
- Brattelid T**, Qvigstad E, Lynham J.A, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes J.B, Levy F.O & Kaumann J.A (2004b) Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370(3), 157-166.
- Di Scala E**, Findlay I, Rose S, Aupart M, Argibay J, Cosnay P and Bozon V (2004a) High efficiency activation of L-type Ca²⁺ current by 5-HT in human atrial myocytes. *Receptors and Channels* 10 (5-6) 159-165.
- Kaumann AJ** (1990) Piglet sinoatrial 5-HT receptors resemble human atrial 5-HT₄-like receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342, 619-622.
- Kaumann A.J**, Lynham J.A & Brown A.M (1995b) Labelling with [125I]-SB207710 of a small 5-HT₄ receptor population in piglet right atrium : functional relevance. *Br J Pharmacol* 115, 933-936.
- Kilts J.D**, Gerhardt M.A, Richardson M.D, Sreeram G, Mackensen B, Grocott H.P, White W.D, Davis R.D, Newman M.F, Reves J.G, Schwinn D.A & Kwatra M.M (2000) β_2 -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G_s and G_i. *Circ Res* 87, 705-709.
- Lorrain J**, Grosset A & O'Connor S.E (1992) 5-HT₄ receptors present in piglet atria and sensitive to SDZ 205-557, are absent in papillary muscle. *Eur J Pharmacol* 229(1), 105-108.
- Medhurst AD** & Kaumann AJ (1993) Characterization of the 5-HT₄ receptor mediating tachycardia in piglet isolated right atrium. *Br J Pharmacol* 110, 1023-1030.
- Mialet J**, Berque-Bestel I, Eftekhari P, Gastineau M, Giner M, Dahmoune Y, Donzeau-Gouge P, Hoebeke J, Langlois M, Siscic S, Fischmeister R & Lezoualc'h F (2000b) Isolation of the serotonergic 5-HT_{4(e)} receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Br J Pharmacol* 129, 771-781.
- Parker SG**, Taylor EM, Hamburger SA, Vimal M & Kaumann AJ (1995) Blockade of human and porcine myocardial 5-HT₄ receptors by 203186. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353(1), 28-35.
- Pindon A**, Van Hecke G, Van Gompel P, Lesage A.S, Leysen J.E & Jurzak M (2002) Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants : compound specificity and dual coupling with G α s- and G α i/o-proteins. *Mol Pharmacol* 61, 85-96.
- Van den Wyngaert I**, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J, Walter Luyten W & Bender E (1997) Cloning and expression of a human serotonin 5-HT₄ receptor cDNA. *J Neurochem* 69 (5), 1810-1819.
- Villalon C.M**, Den Boer M.O, Heiligers J.P.C & Saxena P.R (1990) Mediation of 5-hydroxytryptamine-induced tachycardia in the pig by the putative 5-HT₄ receptor. *Br J Pharmacol* 100, 665-667.

CHAPITRE V : PARTICIPATION A DIFFERENTS PROJETS AU SEIN DE L'UNITE

(Poster 11 :Bozon et al., 2000; Poster 2 : Thireau et al., 2005a;
Poster 3 : Thireau et al., 2005b)

En plus de mes propres travaux, je collabore à des projets de recherche développés au sein des autres axes de l'unité.

1) Effets fonctionnels d'anticorps anti-peptidiques dirigés contre la seconde boucle extracellulaire du récepteur muscarinique cardiaque de type M2

(Poster 11)

Depuis de nombreuses années, le laboratoire s'est intéressé aux effets fonctionnels d'anticorps dirigés contre la boucle EL2 des récepteurs RCPG cardiaques, tels que les récepteurs β 1-adrénergiques et M2 muscariniques (Mijarès et al., 1996 a, b). Ces anticorps agissent comme des "agonistes like" sur l'activité de ces récepteurs (Elies et al., 1998). Nascimento J.H.M, post-doctorant et Peineau N, Maître de Conférences au sein de l'unité ont étudié "la régulation du courant calcique de type L par un anticorps anti-peptidique dirigé contre le récepteur M2 muscarinique". Suite à une pré-stimulation β -adrénergique, cet anticorps inhibe le courant ICa^{2+}_L par une voie indépendante de l'AMPc impliquant le GMPc (Nascimento et al., 2001). Parallèlement à cette étude, le laboratoire souhaitait analyser *in vivo* les effets physiopathologiques induits par des anticorps anti-récepteurs M2 cardiaques. J'ai donc cherché à reproduire un modèle expérimental de cardiomyopathie en immunisant des rats Brown Norway à l'aide d'un peptide mimant la boucle EL2 de ces récepteurs humains. Ces travaux ont constitué une partie de la thèse du Dr. L. Fauchier, cardiologue à l'Hôpital Trousseau de Tours.

16 rats mâles de 8 semaines (250 g) ont été utilisés et divisés en deux groupes : 6 ont servi de contrôle et 10 ont eu des injections de peptide. J'ai immunisé les animaux pendant 4 mois (Figure 48). Parallèlement, L. Fauchier effectuait une analyse spectrale de l'ECG sur chaque animal, afin de déceler la survenue d'une cardiomyopathie.

J'ai identifié la présence d'IgG dirigées contre le peptide M2 dans le sérum des animaux immunisés. Les résultats sont présentés dans la Figure 49. De 1 à 7 semaines d'immunisation, une production significative et élevée d'IgG anti-peptide a été observée. Le

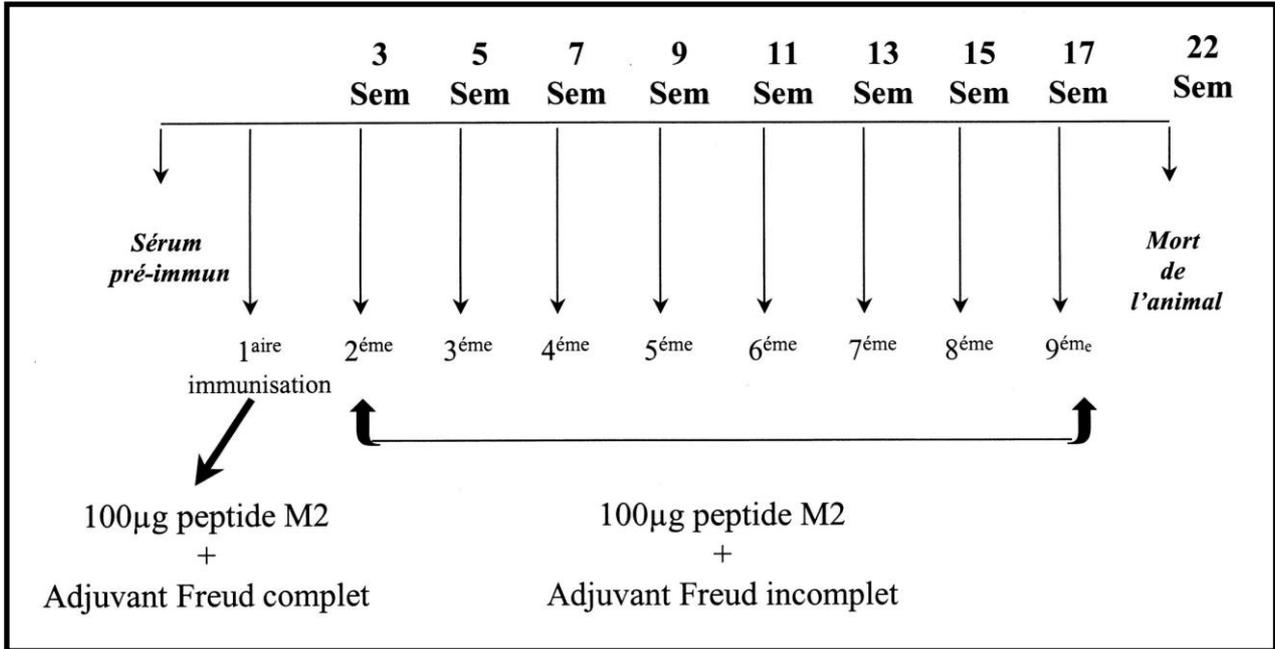


Figure 48 : Protocole d'immunisation des rats Brown Norway avec un peptide mimant la seconde boucle extracellulaire du récepteur humain M2 muscarinique cardiaque. Les immunisations ont été effectuées pendant 4 mois. Séquence peptidique des résidus 169 à 193 : V-R-T-V-E-D-G-E-C-Y-I-Q-F-F-S-N-N-A-A-V-T-F-G-T-A-I.

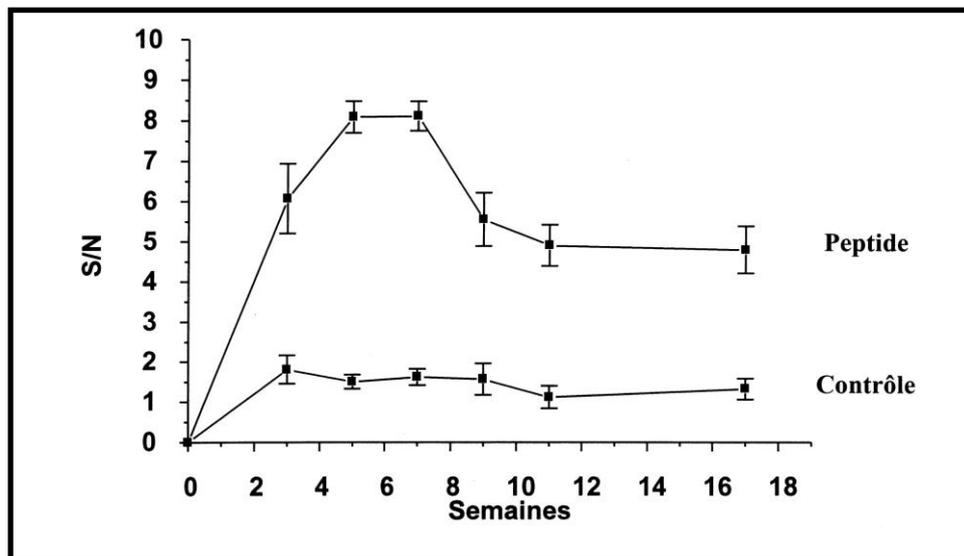


Figure 49 : Identification d'immunoglobulines spécifiques dirigées contre le peptide M2 muscarinique dans le sérum de rats immunisés. Test ELISA sur les fractions d'IgG précipitées avec 33% de sulfate d'ammonium. S/N = DO IgG rat immunisés avec le peptide/ DO IgG rats contrôle. Reconnaissance spécifique quand S/N ≥ 2. Les valeurs sont des moyennes ± s.e.m.

rapport S/N était égal à 9.5 et le titre était de 1/1000. Au-delà des 7 semaines, la production s'est stabilisée et a diminué d'environ 50% (S/N = 5). Une autorégulation idiotypique semble s'être développée.

La croissance corporelle ainsi que le poids des cœurs étaient similaires entre les deux lots de rats (Figure 50). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Matsui et collaborateurs (1997).

L'analyse spectrale de l'ECG était également comparable entre les rats contrôles et les rats immunisés (Figure 51).

Malgré la présence d'anticorps spécifiques des récepteurs M2 muscariniques, les propriétés électrophysiologiques du cœur n'ont pas été modifiées. De plus, aucune anomalie cardiaque n'a été décelée. Cette absence d'effets pourrait être liée : 1) A une plus grande affinité des anticorps produits pour le peptide par rapport au récepteur natif. 2) Au développement in vivo de mécanismes de compensation masquant les réponses cellulaires. Les effets délétères des anticorps seraient ainsi contrecarrés. 3) A la mise en place in vivo des mécanismes de tolérance. Ces processus diminueraient le taux d'anticorps anti-récepteurs et atténueraient leurs effets pathologiques.

*L'absence d'effets physiopathologiques des anticorps nous a contraint à arrêter cette étude. Ces résultats ont fait l'objet d'une partie de la thèse du Dr. L. Fauchier soutenue en décembre 2000 et d'une publication lors d'un congrès : **Bozon V, Fauchier L and Argibay JA (2000) Are autoimmune cardiopathies antigen dependant? Biol Cell 92 (8-9), 5-6.***

2) Sélection de souris transgéniques

(Posters 2 et 3)

Deux axes de recherche de l'unité utilisent comme modèle d'étude des souris transgéniques : des souris reproduisant la trisomie 21 (Dr J. Lignon, CR1, CNRS) et des souris surexprimant le récepteur cardiaque β 2-adrénergique (Pr. D. Babuty, PU-PH). Mon travail est de mettre au point le protocole de sélection des animaux transgéniques par la technique de PCR, d'effectuer l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus. J'ai également formé 2 étudiants en DEA et 2 techniciennes pour permettre la poursuite de ces études.

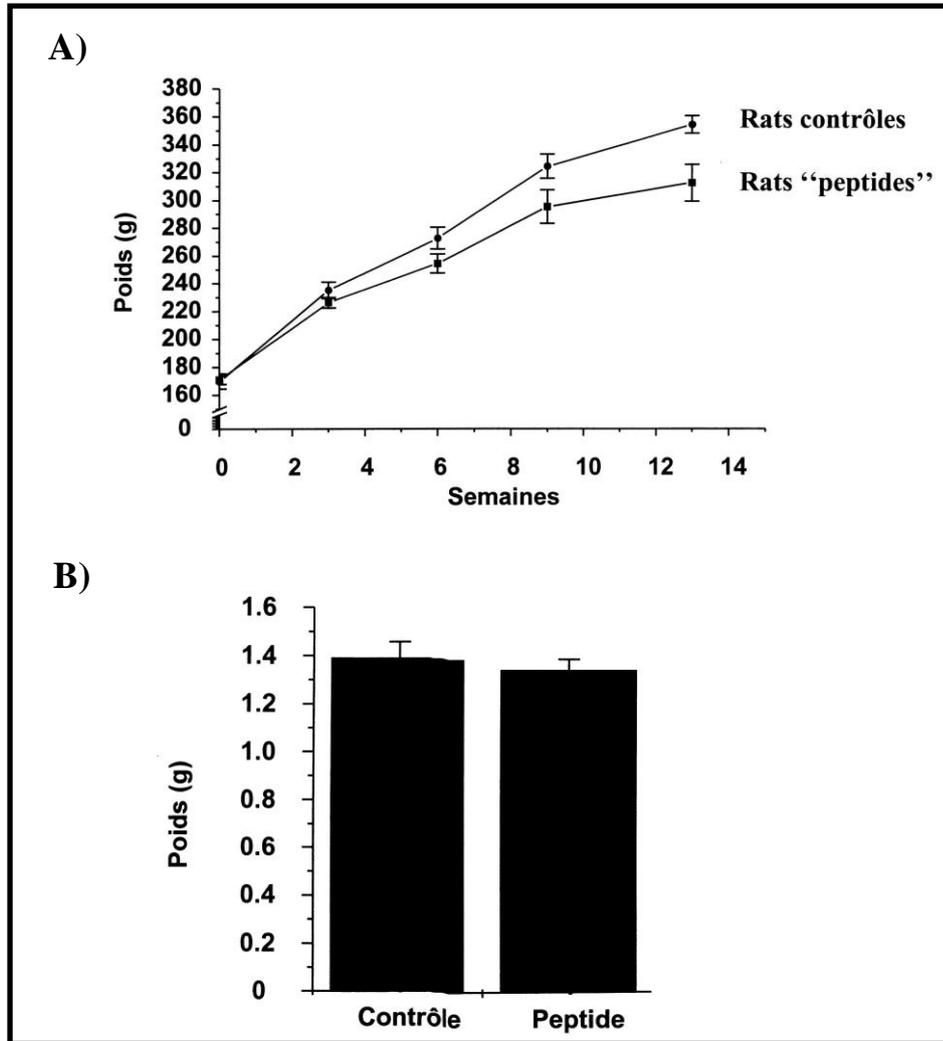


Figure 50 : Comparaison de la croissance corporelle et du poids des cœurs entre les animaux immunisés et les animaux contrôles. A) Poids des rats; B) Masse des cœurs . Les valeurs sont des moyennes \pm s.e.m.

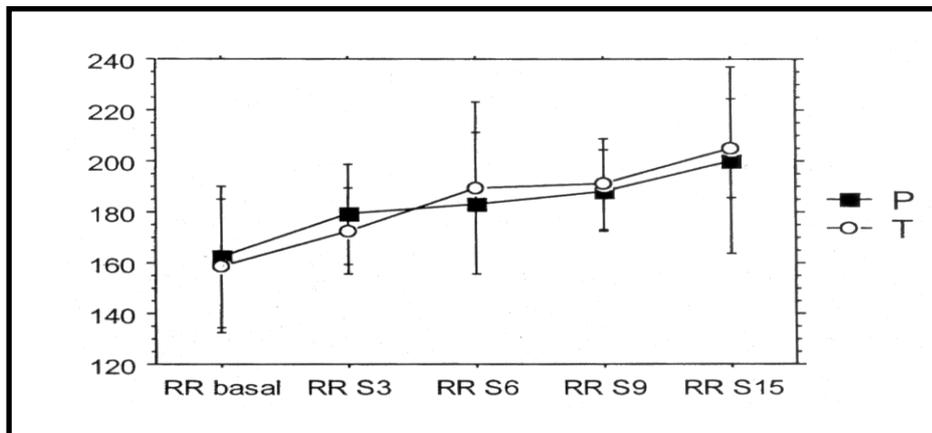


Figure 51 : Analyse spectrale de l'ECG. Evolution de la fréquence cardiaque (espace RR) sur les 15 semaines d'immunisation.

Ces résultats ont fait l'objet de plusieurs présentations à des congrès et ont été publiés :

1) Thireau J, Poisson D, Zhang B.L, Gennetay D, Mothy D, **Bozon V** and Babuty D (2005a). *Analyse des modifications du rythme cardiaque chez les souris surexprimant les récepteurs bêta-2 adrénergiques humains. Arch Mal Cœur Vaiss 98 (4)*

2) Thireau J, Poisson D, Zhang B.L, **Bozon V** and Babuty D (2005b). *Analyse de la variabilité sinusale chez la souris : limites et difficultés. Arch Mal Cœur Vaiss 98 (4)*

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Dans ce rapport, j'ai réuni toutes mes activités de recherche depuis ma thèse. Les thématiques abordées sont différentes et complémentaires à la fois. Les compétences acquises avant mon recrutement à l'Université de Tours, m'ont permis de mieux orienter ma recherche au sein de l'UMR CNRS 6542, de faire des choix plus stratégiques et d'envisager des perspectives de recherche plus judicieuses. J'ai également enrichi mes connaissances scientifiques et développé mes compétences d'encadrement et de communication. Je possède actuellement une ligne de recherche propre intégrée naturellement dans l'axe de recherche dirigé par le Pr. J. Argibay et la thématique générale de l'UMR CNRS 6542 sur la fibrillation auriculaire. Enfin, j'ai acquis progressivement des responsabilités scientifiques et administratives au sein du laboratoire et de l'Université.

J'ai encadré et co-encadré de nombreux étudiants ayant différents niveaux d'étude : 1 stagiaire post-doctoral, 2 étudiantes en thèse Science de la Vie dont une qui effectue actuellement sa thèse, 4 étudiants en DEA, des stagiaires de Maîtrise/Master 1 (4) et une étudiante en MSBM de Pharmacie. J'ai également participé partiellement à l'encadrement de 5 étudiants travaillant sur des thématiques autres que la mienne, 1 étudiant en thèse Science de la Vie et 4 en DEA (cf le chapitre "encadrement").

En cinq années, j'ai formé et dirigé 3 techniciennes dans les domaines de la Biologie moléculaire, la Biochimie, l'Immunologie et la culture cellulaire : 2 techniciennes CNRS, M^{me} D. Gennetay et M^{elle} S. Rose, et un agent de l'Université, M^{me} M. Pingaud.

Afin de mettre en place le laboratoire de Biologie moléculaire et cellulaire, j'ai effectué des demandes de financements auprès de différents groupes et associations. 6 contrats avec appels d'offres ont été obtenus en partenariat ou non avec d'autres laboratoires.

Enfin, j'ai établi et entretenu des collaborations avec différents laboratoires publics et privés présents à un niveau local, national et international.

Les perspectives de recherche envisagées pour les années à venir s'orienteront vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place et/ou le maintien de la fibrillation atriale. Cette arythmie est connue depuis longtemps. Toutefois, les causes de cette pathologie restent toujours obscures, surtout lorsqu'elle survient sur un cœur apparemment sain. Les traitements disponibles actuellement sont souvent décevants et altèrent fortement la qualité de vie des patients. Il est donc primordial de caractériser les facteurs favorisant cette arythmie. Cependant, les processus de remodelage auriculaire rendent complexe l'identification de ces paramètres (Lévy et al., 2004). Une masse critique de tissu

myocardique apparaît nécessaire pour que la fibrillation atriale se perpétue. Le faible nombre d'épisodes de FA chez les enfants a souvent été expliqué par la taille de leur cœur. En effet, plus le cœur est petit, plus la fréquence cardiaque est élevée et plus la propagation du potentiel d'action est complète, évitant ainsi l'apparition d'arythmies auriculaires. Un autre paramètre pourrait expliquer cette différence observée entre l'homme adulte et l'enfant, le récepteur 5-HT₄. Dans ce rapport, je vous ai montré que l'activité fonctionnelle de ce récepteur *via* l'anticorps anti-G21V, variait en fonction des systèmes d'expression utilisés. Ces différents comportements pouvaient être corrélés avec l'environnement membranaire et cellulaire spécifique de chaque type de cellule étudiée. Au cours de la croissance cellulaire, la composition de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire change. La fonctionnalité du récepteur 5-HT₄ cardiaque pourrait alors varier en fonction de l'âge des individus. Le profil d'expression des isoformes de ce récepteur pourrait également être différent entre l'adulte et l'enfant. Au delà des implications physiopathologiques du récepteur 5-HT₄ cardiaque, le rôle de ce récepteur dans la physiologie du cœur normal reste toujours inconnu. Pour les études à venir, nous allons donc définir et comparer les propriétés fonctionnelles de ce récepteur chez l'enfant et l'adulte. Je co-dirige actuellement une thèse de Sciences sur ce sujet (M^{elle} A. Fitou). D'autre part, étant donné que les fragments d'auricules d'enfant proviennent principalement de patients présentant des malformations cardiaques, des études seront également réalisées en parallèle sur des cellules atriales de porcs exempts de pathologies cardiaques (arythmies, malformations). Ainsi nous pourrions déterminer les caractéristiques fonctionnelles du récepteur 5-HT₄ dans des conditions physiologiques.

Articles