



ELSEVIER  
MASSON



Disponible en ligne sur

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com

Annales de  
cardiologie  
et d'angéiologie

Annales de Cardiologie et d'Angéiologie 63 (2014) 128–134

Article original

## Effets cardiovasculaires des auto-anticorps anti-récepteurs béta1 et béta3-adrénergiques chez le rat Lewis

*Cardiovascular effects of beta1 and beta3-adrenergic receptor autoantibodies in Lewis rat*

E. Montaudon\*, M.A. Abdelkrim, J.-C. Desfontis, M.Y. Mallem

LUNAM université, Oniris, « UPSP 5304 de physiopathologie animale et pharmacologie fonctionnelle », Atlanpole La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France

Reçu le 7 avril 2014 ; accepté le 8 avril 2014

Disponible sur Internet le 28 avril 2014

### Résumé

**But de l'étude.** – Analyser les modifications de la réactivité vasculaire en réponse à des protocoles d'immunisation par des antigènes correspondants à la seconde boucle extracellulaire des récepteurs adrénérgiques (RA)  $-\beta_3$  ou  $-\beta_1$  et  $3$ .

**Méthodes.** – Des rats Lewis ont été immunisés pendant 3 mois avec un peptide correspondant à la seconde boucle extracellulaire des RA- $\beta_3$  ou  $-\beta_1$  et  $3$ . Les anticorps anti-RA- $\beta$  (AC-RA- $\beta$ ) produits ont été titrés par Elisa et purifiés en utilisant le kit « Proteus Protein G ». Leur fonctionnalité a ensuite été testée dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés chez le lapin. Des anneaux d'aorte et d'artère mésentérique isolés ont été montés dans des cuves à organes isolés et précontractés à la phényléphrine. Puis, des courbes de relaxation ont été réalisées.

**Résultats.** – Le SR58611A (agoniste des RA- $\beta_3$ ) (10 nM) et les AC-RA- $\beta_3$  purifiés (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) induisent une diminution du pourcentage de raccourcissement cellulaire (respectivement  $-39,6 \pm 4,4\%$  [ $n = 11$ ] et  $-18,5 \pm 3,9\%$  [ $n = 10$ ]) des cardiomyocytes isolés. Cette diminution est inhibée lorsque les cardiomyocytes sont préincubés avec le L-748337 (1  $\mu\text{M}$ ), un antagoniste sélectif des RA- $\beta_3$  ( $p < 0,05$ ). Dans l'aorte et les artères mésentériques, contrairement à ce qui a été observé chez les rats immunisés contre les RA- $\beta_1$ , les relaxations induites par l'acétylcholine et le SR58611A ne sont pas modifiées chez ceux immunisés contre les RA- $\beta_3$  et  $-\beta_1$  et  $3$ .

**Conclusion.** – Ces résultats montrent pour la première fois que les AC-RA- $\beta_3$  exercent un effet agoniste  $\beta_3$ -adrénergique. Ils n'auraient pas d'action pathogène vasculaire mais compenseraient la dysfonction endothéliale provoquée par les AC-RA- $\beta_1$ .

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Auto-anticorps ; Récepteur adrénérgique  $\beta$  ; Réactivité vasculaire ; Endothélium ; Rat

### Abstract

**Purpose.** – To analyze vascular reactivity changes in response to immunization protocols with antigens corresponding to the second extracellular loop of  $-\beta_3$  and  $-\beta_1$  and  $3$  adrenergic receptors (AR).

**Methods.** – Lewis rats were immunized for 3 months with peptidic sequences corresponding to the second extracellular loop of  $\beta_3$ -AR or  $\beta_1$  and  $3$ -AR. Specific  $\beta_3$ -AR antibodies were characterized by Elisa and purified using "Proteus Protein G" kit. Their functionality were tested in rabbit isolated ventricular cardiomyocytes. Aortic and mesenteric artery rings isolated from control or immunized rats were mounted in organ baths and precontracted with phenylephrine. Then, relaxant curves were established.

**Results.** – SR58611A (10 nM), a preferential  $\beta_3$ -AR agonist and purified  $\beta_3$ -AR antibodies (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) induced a decrease of cell shortening ( $-39.56 \pm 4.4\%$  [ $n = 11$ ] and  $-18.45 \pm 3.9\%$  [ $n = 10$ ] respectively) in isolated cardiomyocytes. This decrease was significantly inhibited when the cardiomyocytes were pre-incubated with the L-748337 (1  $\mu\text{M}$ ), a selective  $\beta_3$ -AR antagonist ( $P < 0.05$ ). In contrast with what was observed in rats immunized against the  $\beta_1$ -AR, vasorelaxations induced by acetylcholine and SR58611A in both aorta and mesenteric arteries were unaltered in rats immunized against the  $\beta_3$ -AR and  $\beta_1$  and  $3$ -AR.

\* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : [elodie.montaudon@oniris-nantes.fr](mailto:elodie.montaudon@oniris-nantes.fr) (E. Montaudon), [yassine.mallem@oniris-nantes.fr](mailto:yassine.mallem@oniris-nantes.fr) (M.Y. Mallem).

**Conclusion.** – These results show, for the first time, that  $\beta_3$ -AR antibodies induced a  $\beta_3$ -AR agonist-like activity. They would not have a vascular pathogenic action but would offset the endothelial dysfunction caused by  $\beta_1$ -AR antibodies.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Autoantibodies;  $\beta$  adrenoceptor; Vascular reactivity; Endothelium; Rat

## 1. Introduction

Des auto-anticorps anti-récepteurs adrénergiques (RA)  $-\beta_1$  (AC-RA- $\beta_1$ ) et  $-\beta_3$  (AC-RA- $\beta_3$ ) ont été détectés par Elisa (*enzyme-linked immunosorbent*) chez respectivement plus de 30 % [1,2] et 27 % [3,4] des patients atteints de cardiomyopathie dilatée (CMD). De nombreuses études cliniques [5–8] et expérimentales [9–11] ont révélé que les AC-RA- $\beta_1$  jouaient un rôle majeur dans la pathogénie de cette affection. Ces auto-anticorps reconnaissent spécifiquement les épitopes localisés sur la première et la deuxième boucle extracellulaire de ce récepteur adrénergique et induisent au niveau cardiaque des effets chronotrope et inotrope positifs [12–14]. Au niveau vasculaire, une étude menée récemment [15] a montré que l'immunisation de rats pendant trois mois par la deuxième boucle extracellulaire des RA- $\beta_1$  induit une dysfonction endothéliale dans l'aorte thoracique et dans les artères mésentériques. Ces résultats laissent supposer que les AC-RA- $\beta_1$ , qui sont également retrouvés dans des modèles animaux d'hypertension artérielle [16], pourraient avoir une action pathogène vasculaire qui pourrait jouer un rôle dans la progression de la maladie. Contrairement aux AC-RA- $\beta_1$ , le rôle pathogène au niveau cardiovasculaire des AC-RA- $\beta_3$  présents dans le sérum des patients malades n'a jamais été étudié jusqu'à présent. Les RA- $\beta_1$  et  $-\beta_3$  sont retrouvés dans le cœur et les vaisseaux. Au niveau cardiaque, l'activation des RA- $\beta_3$  induit, à l'inverse des RA- $\beta_1$ , un effet inotrope négatif. Au contraire, dans les vaisseaux, les RA- $\beta_1$  et les RA- $\beta_3$  ont un effet similaire et leur activation conduit à une vasodilatation [17]. Ces deux récepteurs partagent des épitopes communs localisés sur leur seconde boucle extracellulaire [18] ce qui laisse suggérer que les AC-RA- $\beta_3$  pourraient également exercer des effets sur les RA- $\beta_1$ . La stimulation chronique et simultanée des deux RA pourrait avoir des répercussions majeures au niveau cardiovasculaire. À l'heure actuelle, aucune étude n'a exploré l'effet des AC-RA- $\beta_3$  seuls ou associés aux AC-RA- $\beta_1$  sur la fonction vasculaire.

L'objectif de cette étude a donc été d'analyser les modifications de la réactivité vasculaire en réponse à des protocoles d'immunisation par des antigènes correspondants à la seconde boucle extracellulaire des RA- $\beta_3$  ou  $-\beta_1$  et 3.

## 2. Méthodes

### 2.1. Animaux

Les protocoles expérimentaux ont été validés par le comité éthique en expérimentation animale des Pays de la Loire (N° CEEA.2012.76) et réalisés en accord avec « The guide for the care and use of laboratory animals » publié par le National

Institute of Health (dernière version en 2010). Des rats Lewis (Élevage Janvier Labs, Laval, France) âgés de neuf semaines et des lapins Néozélandais de 2 kg (Hypharm, Roussay, France) sont utilisés dans cette étude. Dès leur réception, les animaux ont été placés dans l'animalerie du laboratoire pour une période d'acclimatation d'une semaine. Ils ont été maintenus à température constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et ont été soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12 h/12 h, avec une alimentation standard et de l'eau fournie ad libitum.

Les rats sont immunisés par injection sous-cutanée d'un antigène associé à l'adjuvant de Freund une fois par mois pendant 3 mois. Pour cela, trois groupes de rats sont formés. Le premier groupe reçoit l'antigène contenant une séquence peptidique (176–200) synthétique correspondant à la seconde boucle extracellulaire des RA- $\beta_3$  humains (2 mg/mL) (GeneCust, Dudelange, Luxembourg). Le second groupe est immunisé avec l'antigène contenant la même séquence peptidique du RA- $\beta_3$  (2 mg/mL) associée à la séquence peptidique (197–222) correspondant à la seconde boucle extracellulaire des RA- $\beta_1$  humains (1 mg/mL) (GeneCust, Dudelange, Luxembourg). Enfin, le dernier groupe (témoin) reçoit seulement l'adjuvant de Freund (600  $\mu\text{L}$ ) utilisé pour la préparation des vaccins. Lors d'une étude antérieure, un quatrième groupe de rat avait reçu l'antigène contenant la séquence peptidique (197–222) synthétique correspondant à la seconde boucle extracellulaire des RA- $\beta_1$  humains (1 mg/mL) (GeneCust, Dudelange, Luxembourg).

### 2.2. Tests séro-immunologiques

Afin de vérifier l'efficacité du protocole d'immunisation et de suivre l'évolution du titre des AC-RA- $\beta_1$  et AC-RA- $\beta_3$  produits, un test sérologique par Elisa spécifique et non spécifique est réalisé avant chaque nouvelle injection. À la fin des trois mois d'immunisation, les AC-RA- $\beta_3$  sont purifiés à l'aide du kit « Proteus Protein G » (AbD Serotec, Colmar, France) puis quantifiés par la technique de l'acide bicinchonique (Uptima, Interchim, Montluçon France).

### 2.3. Étude fonctionnelle sur cardiomyocytes isolés de lapin

La fonctionnalité des AC-RA- $\beta_3$  purifiés chez les rats (25  $\mu\text{g/mL}$ ) est testée sur des cardiomyocytes ventriculaires isolés de lapin. Brièvement, les lapins sont anesthésiés par injection de pentobarbital sodique (50 mg/kg) dans la veine marginale de l'oreille. Les cardiomyocytes sont isolés par digestion enzymatique du cœur monté en Langendorff. Puis, ils sont déposés dans des boîtes de pétri prétraitées avec de la poly-L-lysine et perfusés avec une solution de Tyrode oxygénée (en mM, NaCl : 118,3 ; KCl : 4,7 ;  $\text{MgSO}_4$  : 1,2 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,2 ;  $\text{NaHCO}_3$  : 20 ;

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2868809>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2868809>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)