

Article original

# Les anticorps dirigés contre la deuxième boucle extracellulaire des récepteurs adrénergiques $\beta_1$ induisent une dysfonction endothéliale dans l'aorte de rat Wistar

## *Antibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptor induce aortic endothelial dysfunction in Wistar rat*

M.A. Abdelkrim<sup>a</sup>, J. Noireaud<sup>b</sup>, G. Chatagnon<sup>c</sup>, M. Gogny<sup>a</sup>, J.-C. Desfontis<sup>a</sup>, M.Y. Mallem<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UPSP 5304 de physiopathologie animale et pharmacologie fonctionnelle, LUNAM université, Oniris, Atlanpole La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France

<sup>b</sup> Inserm UMR1063, IBS-IRIS, LUNAM université, rue des Capucins, 49100 Angers, France

<sup>c</sup> Unité de sécurité sanitaire des biotechnologies de la reproduction, LUNAM université, Oniris, Atlanpole La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France

Reçu le 12 avril 2012 ; accepté le 15 avril 2012

Disponible sur Internet le 9 mai 2012

### Résumé

**Objectif.** – Évaluer l'effet de l'immunisation active, à l'aide d'un peptide correspondant à la deuxième boucle extracellulaire des récepteurs adrénergiques (RA)  $\beta_1$ , sur la réactivité de l'aorte isolée de rat Wistar.

**Méthodes.** – Des rats Wistar âgés de neuf semaines ont été activement immunisés pendant trois mois avec un peptide correspondant à la deuxième boucle extracellulaire des RA  $\beta_1$  humains. Les immunoglobulines G (IgG) spécifiques ont été caractérisées par Elisa et quantifiées par la méthode BCA. Leur fonctionnalité a ensuite été testée dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés (CVI). Des anneaux d'aorte de rats témoins ou immunisés ont été montés dans des cuves à organes isolés. Ensuite, des courbes de contraction à la phényléphrine (1 nM à 300  $\mu$ M) ou de relaxation à l'acétylcholine (1 nM à 100  $\mu$ M) et l'isoprénaline (1 nM à 30  $\mu$ M) ont été établies.

**Résultats.** – Dans les CVI, les IgG anti-RA  $\beta_1$  (10 ou 25  $\mu$ g/mL) induisent une augmentation du raccourcissement cellulaire dépendante de la concentration. L'effet inotrope positif induit par l'isoprénaline (10 nM et 1  $\mu$ M) est fortement réduit dans les CVI incubés en présence de 25  $\mu$ g/mL d'IgG pendant trois heures. Dans l'aorte de rats immunisés, la contraction à la phényléphrine et la relaxation à l'acétylcholine sont significativement altérées. En revanche, la relaxation induite par l'isoprénaline est conservée.

**Conclusions.** – Cette étude confirme que les anticorps dirigés contre la deuxième boucle extracellulaire des RA  $\beta_1$  induisent un effet inotrope positif dans les cardiomyocytes isolés de rat adulte. Elle montre aussi, pour la première fois, que les rats immunisés présentent une altération de la fonction endothéliale, mais une conservation de la relaxation adrénergique  $\beta$ .

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Auto-anticorps ; Récepteur adrénergique  $\beta_1$  ; Réactivité vasculaire ; Endothélium ; Rat

### Abstract

**Purpose.** – To evaluate the effect of active immunization with a peptide corresponding to the second extracellular loop of the human beta1-adrenoceptors ( $\beta_1$ -AR) on the reactivity of Wistar rat isolated aorta.

**Methods.** – Nine-week-old Wistar rats were actively immunized for 3 months with a peptide corresponding to the second extracellular loop of the human  $\beta_1$ -AR. Specific immunoglobulins G (IgG) were characterized by Elisa and the bicinchoninic acid protein assay and their functionality were tested in isolated ventricular cardiomyocytes (IVC) from control rats. Aortic rings isolated from control or immunized rats were mounted in organ baths. Then, contractile curves to phenylephrine (1 nM to 300  $\mu$ M) and relaxant curves to acetylcholine (1 nM to 100  $\mu$ M) and isoprenaline (1 nM to 30  $\mu$ M) were established.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : yassine.mallem@oniris-nantes.fr (M.Y. Mallem).

**Results.** – Cell shortening increased dose-dependently in rat IVC superfused with IgG containing  $\beta_1$ -AR antibodies (10 or 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Isoprenaline-induced positive inotropy was strongly reduced in IgG containing  $\beta_1$ -AR antibodies preincubated (3 h) IVC. Phenylephrine- and acetylcholine-induced aortic responses were greatly inhibited in immunized rats compared to control ones. However, active immunization did not influence the isoprenaline-mediated relaxation.

**Conclusions.** – The present work confirms that  $\beta_1$ -AR antibodies directed against the second extracellular loop of  $\beta_1$ -AR induce a positive inotropic effect in adult rat IVC. Moreover, we demonstrated, for the first time, that 3-month immunization with  $\beta_1$ -AR peptide was associated with altered aortic endothelial function without change in the  $\beta$ -AR-mediated vasorelaxation.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Autoantibodies;  $\beta_1$ -adrenoceptor; Vascular reactivity; Endothelium; Rat

## 1. Introduction

Plusieurs études cliniques [1–4] et expérimentales [5–7] ont montré que les auto-anticorps dirigés contre les récepteurs adrénergiques (RA)  $\beta_1$  jouent un rôle pathogène majeur dans la myocardite et la cardiomyopathie dilatée. Ces auto-anticorps reconnaissent des épitopes localisés sur la première ou la deuxième boucle extracellulaire des RA  $\beta_1$  cardiaques et induisent des effets chronotrope et inotrope positifs [8,9]. L'activation prolongée des RA  $\beta_1$  ventriculaires intervient dans l'initiation et l'aggravation de la dysfonction contractile du myocarde [5,6,10], mais ne suffit probablement pas, à elle seule, à expliquer la progression de cette affection vers un état d'insuffisance cardiaque. En effet, la performance myocardique globale est dépendante de l'interaction entre le ventricule et le réseau artériel [11], et toute augmentation de la post-charge pourrait participer à la défaillance du myocarde. Une étude effectuée chez des patients atteints de cardiomyopathie a suggéré que la baisse des résistances vasculaires systémiques, consécutive à l'élimination des auto-anticorps  $\beta_1$  circulants, contribue à l'amélioration de la contractilité myocardique [12]. Cela laisse supposer qu'une action pathogène vasculaire des auto-anticorps  $\beta_1$  pourrait jouer un rôle dans la progression de cette affection. Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a été consacrée à l'évaluation des effets des auto-anticorps  $\beta_1$  sur la réactivité vasculaire. L'objectif de cette étude a donc été de déterminer l'effet de l'immunisation des rats Wistar par la deuxième boucle extracellulaire des RA  $\beta_1$  sur la réactivité de l'aorte thoracique isolée.

## 2. Méthodes

### 2.1. Animaux

Des rats Wistar mâles (élevage Janvier, Laval, France) âgés de neuf semaines sont utilisés. Tous les animaux sont hébergés pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions de l'animalerie du laboratoire (température  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , humidité relative 50 %). L'aliment et l'eau potable sont fournis ad libitum. Les protocoles ont été réalisés en accord avec « The guide for the care and use of laboratory animals » publié par le National Institute of Health (dernière révision en 2010).

### 2.2. Immunisation des rats et tests séro-immunologiques

L'immunisation des rats est effectuée par des injections sous-cutanées tous les mois pendant une période de trois mois. Deux groupes de rats ont été utilisés. Ceux du premier groupe reçoivent l'antigène (1 mg/mL) contenant une séquence peptidique (197–222) synthétique correspondant à la deuxième boucle extracellulaire des RA  $\beta_1$  avec l'adjuvant complet de Freund. Les rats du second groupe (témoins) reçoivent seulement l'adjuvant complet de Freund (1 mL). Afin de vérifier l'efficacité de l'immunisation, un contrôle sérologique (spécifique et non spécifique) par Elisa est réalisé avant chaque nouvelle injection d'immunisation. Les anticorps anti-RA  $\beta_1$  sont purifiés à l'aide d'un kit « Proteus Protein G », puis quantifiés par la technique de l'acide bicinchonique.

### 2.3. Étude dans les cardiomyocytes isolés

Afin de tester la fonctionnalité des anticorps anti-RA  $\beta_1$ , des expériences ont été effectuées dans des cardiomyocytes isolés. Brièvement, les rats sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50 mg/kg/i.p.), puis les cardiomyocytes sont obtenus par digestion enzymatique du cœur isolé, monté en Langendorff. Ils sont ensuite déposés dans des boîtes de Pétri dont les fonds ont été prétraités avec de la poly-L-lysine, puis perfusés à un débit de 2,5–3 mL/min, avec une solution oxygénée de tyrode ( $\text{CaCl}_2$ , 2 mM). L'analyse fonctionnelle de la contractilité des cardiomyocytes, suite à une stimulation électrique de champ (1 Hz) à environ deux fois le seuil de contraction (typiquement 4 à 9 V), est réalisée par vidéo-imaging. L'effet inotrope positif est étudié par l'application de deux concentrations (10 et 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) d'immunoglobulines (IgG), purifiées à partir du sérum de rats du groupe immunisé. Compte tenu de leurs propriétés antagonistes sur l'inotropie induite par les catécholamines [9], l'effet inotrope positif induit par l'isoprénaline a aussi été étudié sur des cardiomyocytes de rats témoins prétraités avec 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'IgG pendant trois heures. Le raccourcissement cellulaire est mesuré par un système de détection des mouvements des bords libres des cardiomyocytes et traité par le logiciel Matrox Inspector 2.2 (Coyote Bay Instruments, États-Unis).

### 2.4. Étude dans l'aorte thoracique isolée

L'aorte thoracique des deux groupes de rat est isolée, nettoyée des tissus conjonctifs et graisseux environnants et coupée

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2869105>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2869105>

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