

La seconde boucle extracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G : une cible préférentielle pour des autoanticorps fonctionnels

Johan Hoebeke

Les récepteurs couplés aux protéines G appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept régions transmembranaires α -hélicoïdales dont le modèle structural est la bactériorhodopsine. Ses propriétés structurales font de la seconde boucle extracellulaire de ces récepteurs, reliant la quatrième hélice transmembranaire à la cinquième, un domaine antigénique de choix. Utilisant comme cibles des peptides synthétiques reproduisant la séquence de cette boucle, nous avons pu montrer l'existence d'autoanticorps fonctionnels dans différentes maladies pour lesquelles une composante auto-immune était postulée. Les anticorps polyclonaux induits par les mêmes peptides partagent les propriétés fonctionnelles des autoanticorps. Cette seconde boucle extracellulaire serait donc la région immunodominante des récepteurs couplés aux protéines G. Ces résultats permettent d'envisager des approches diagnostiques et thérapeutiques nouvelles pour les maladies concernées.

ADRESSE

J. Hoebeke : directeur de recherche au Cnrs, responsable de l'équipe immunologie des récepteurs au CJF93/09. Immunologie des maladies infectieuses, UFR de pharmacie, université François-Rabelais, 31, avenue Monge, 37200 Tours Cedex, France.

m/s n° 12, vol. 11, décembre 95

Les maladies auto-immunes pour lesquelles des récepteurs membranaires sont directement impliqués dans la physiopathologie de la maladie sont assez rares. Les plus connues sont la myasthénie, dans laquelle le récepteur cible est le récepteur cholinergique nicotinique des muscles striés, et la maladie de Basedow, dans laquelle le récepteur

cible est le récepteur de la TSH (hormone stimulant la thyroïde). Ce dernier appartient à la sous-famille des récepteurs couplés aux protéines G possédant une région N-terminale étendue. Cette région pourrait contenir les épitopes reconnus par les anticorps stimulateurs ou inhibiteurs.

Bien que la majorité des récepteurs impliqués dans la régulation fonctionnelle du cœur et des vaisseaux

RÉFÉRENCES

1. Borda ES, Pascual J, Cossio PM, Vega M, Araña RM, Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenoceptor of myocardium and modulates its activity. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 679-85.
2. Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic β -adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta* 1987; 46: 634-9.
3. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1994; 331: 1564-75.
4. Dixon RAF, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 1986; 321: 75-9.
5. Strosberg AD. Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur J Biochem* 1991; 196: 1-10.
6. Hoebeke J, Guillet JG, Strosberg AD. Use of receptors expressed in *Escherichia coli* to study autoimmunity against G protein-coupled membrane proteins. *Methods Neurosci* 1994; 25: 345-65.
7. Guillet JG, Hoebeke J, Lengagne R, Tate K, Borrás-Herrera F, Strosberg AD, Borrás-Cuesta F. Haplotype specific homology scanning algorithm to predict T cell epitopes from protein sequences. *J Mol Recognition* 1991; 4: 17-25.
8. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against cardiac β -adrenoceptors in human dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1989; 64: 97-103.
9. Magnusson Y, Marullo S, Höyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahlne A, Guillet JG, Strosberg AD, Hjalmarson A, Hoebeke J. Mapping of a functional autoimmune epitope on the β_1 -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1990; 86: 1658-63.
10. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy - characterization of antibodies against the β_1 -adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89: 2760-7.
11. Wallukat G, Morwinski R, Magnusson Y, Hoebeke J, Wollenberger A. Autoantikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor bei Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie: Lokalisation von zwei Epitopen. *Z Kardologie* 1992; 81 (suppl 4): 79-83.

appartiennent également à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, peu d'études ont été faites sur la présence d'autoanticorps interagissant avec ces récepteurs dans des maladies cardiovasculaires à étiologie non définie, mais dont certaines caractéristiques suggèrent la présence d'une composante auto-immune. Ainsi, l'existence d'anticorps stimulant les récepteurs β -adrénergiques avait été rapportée dans les sérums de patients atteints de la cardiomyopathie de Chagas [1], qui est considérée comme le paradigme d'une maladie auto-immune puisqu'elle se déclare de longues années après la primo-infection par l'agent pathogène, le parasite intracellulaire *Trypanosoma cruzi*. Ainsi, des anticorps stimulant les récepteurs β_1 -adrénergiques ont été identifiés dans des sérums de patients atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique [2]. L'origine de cette maladie est encore inconnue mais pourrait être une séquelle auto-immune d'une myocardiite virale [3].

Le clonage et le séquençage de l'ADNc codant pour le récepteur β_2 -adrénergique de poumon de hamster [4] a permis de définir une superfamille de récepteurs dont la structure s'apparente à celle de la bactériorhodopsine [5]. A partir de cette structure présomptive et de considérations immunologiques (accessibilité des anticorps, caractère hydrophile de la boucle) et pharmacologiques (existence d'au moins deux cystéines importantes dans la fonction de liaison et de désensibilisation du récepteur), nous avons prédit que la seconde boucle extracellulaire de ce récepteur aurait les propriétés requises pour une reconnaissance fonctionnelle par des autoanticorps [6].

La démarche utilisée pour déterminer les propriétés antigéniques des boucles extracellulaires peut être suivie à partir du récepteur β_1 -adrénergique, représenté sur la *figure 1*. La première boucle extracellulaire est probablement limitée par les deux acides aminés glycine (G) et acide glutamique (E) et comporte donc onze acides aminés pour la plupart hydrophobes. Bien que la boucle entre les deux glycines puisse être un épitope B (six acides aminés dont deux chargés), la faible longueur de

la boucle pourrait rendre cet épitope trop proche de la membrane pour être susceptible d'interagir avec un anticorps. La troisième boucle extracellulaire est probablement limitée par la lysine (K) et l'arginine (R), les deux résidus ayant une charge positive. Bien que cette boucle soit plus hydrophile que la première, sa faible longueur entraîne les mêmes remarques que pour la première. La seconde boucle extracellulaire, commençant probablement au résidu histidine (H) et se terminant au résidu arginine (R), a une longueur plus de 2 fois supérieure à celle des deux autres boucles extracellulaires, et contient 11 acides aminés chargés, et donc hydrophiles, sur 26. L'existence d'un pont disulfure fait naître une boucle qui pourrait constituer un épitope B au sommet de la boucle, bien accessible à l'interaction avec des anticorps. En outre, la seconde boucle extracellulaire contient un épitope T, prédit par analogie de séquence avec des épitopes T connus [7]. Bien que cet épitope ne soit pas essentiel pour la reconnaissance par les anticorps, il a l'avantage expérimental de pouvoir induire des anticorps antipeptide sans qu'il soit nécessaire de coupler ces derniers pour les rendre immunogéniques.

Nous avons extrapolé ces propriétés à d'autres récepteurs de la même famille. Dans les paragraphes qui suivent nous allons passer en revue les résultats obtenus à partir de cette prédiction afin d'étayer l'hypothèse d'une région immunodominante majeure dans les récepteurs à sept régions transmembranaires couplés aux protéines G. Nous étudierons également les autres régions impliquées dans une réponse auto-immune.

La cardiomyopathie dilatée idiopathique

La cardiomyopathie dilatée idiopathique est une maladie du myocarde primaire d'origine inconnue, caractérisée par une dilatation du ventricule gauche ou des deux ventricules et une contractilité myocardique diminuée. La maladie a une prévalence d'à peu près 36 cas sur une population de 100 000. Outre une composante génétique, la maladie pourrait être due à une réponse auto-immune, conséquence d'une

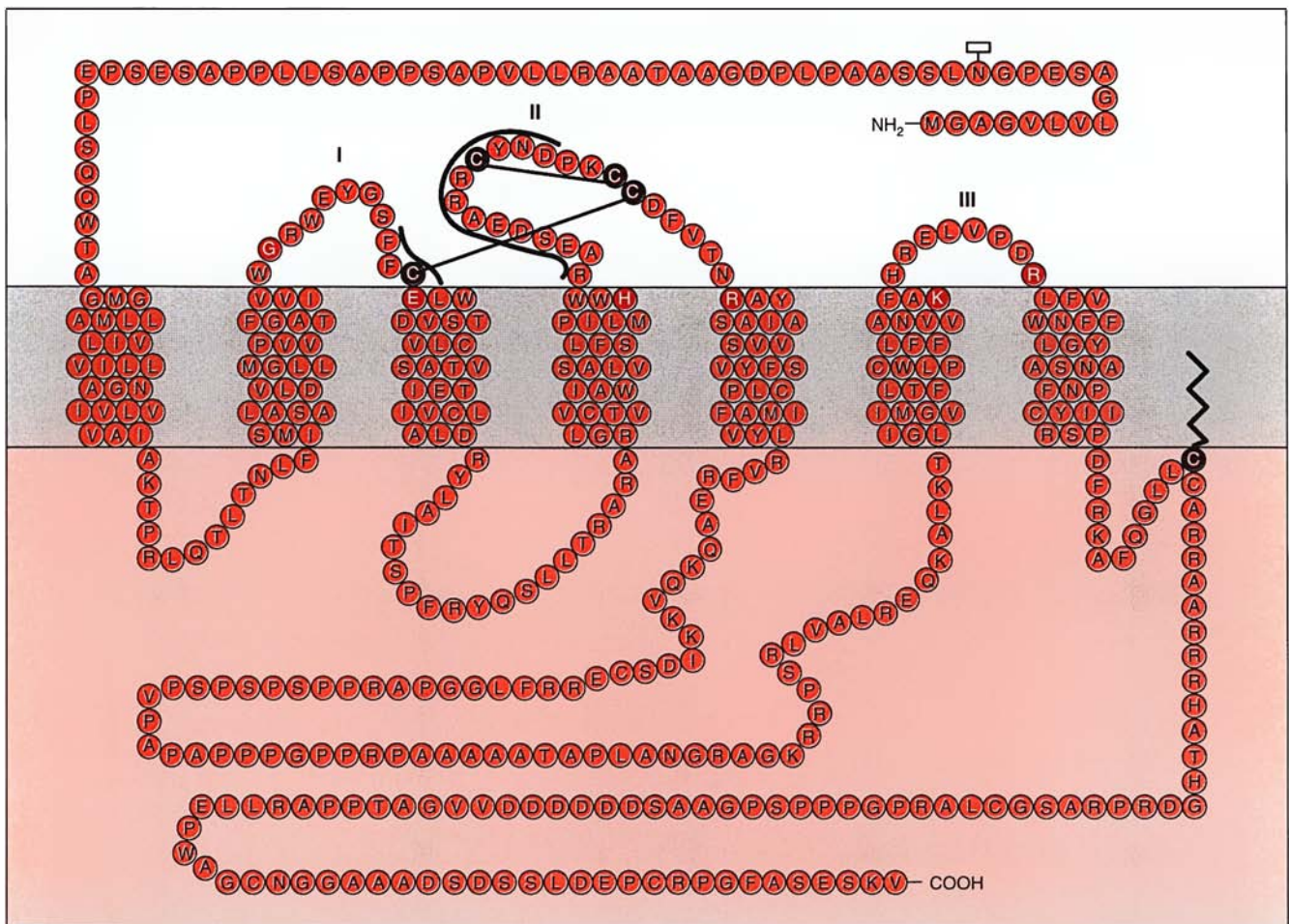


Figure 1. **Schéma de la structure supposée du récepteur β_1 -adrénergique humain.** Chaque cercle correspond à un acide aminé. Les sept régions transmembranaires ont une structure en hélice α . Les boucles extracellulaires sont numérotées de I à III. Les ponts disulfures extracellulaires sont schématisés selon [33]. Les acides aminés commençant et terminant les boucles sont indiqués en rouge. Dans le domaine C-terminal, la cystéine ancre ce domaine à la membrane par un acide palmitique. Les acides aminés des deux épitopes B définis sur la seconde boucle extracellulaire et de l'épitope défini sur la première boucle extracellulaire sont soulignés. Un site possible de glycosylation est indiqué en position 15.

myocardite virale primaire. Cette hypothèse est confortée par les anomalies de la réponse immunitaire humorale et cellulaire observées au cours de la maladie [3]. Dans le sérum de patients atteints de la maladie, des autoanticorps dirigés contre divers antigènes cardiaques ont été identifiés, notamment contre le récepteur β_1 -adrénergique [2, 8]. Nous avons testé notre prédiction structurale sur ces derniers.

Nous avons purifié des autoanticorps de ces sérums par chromatographie d'affinité à l'aide d'un peptide syn-

thétique correspondant à la seconde boucle extracellulaire du récepteur β_1 -adrénergique. Ces autoanticorps inhibent la liaison d'un antagoniste spécifique et, comme les agonistes partiels de ce récepteur, ils induisent une chronotropie positive sur des cellules cardiaques de rats nouveau-nés en culture. Après adsorption des sérums sur la colonne d'affinité, les éluats n'ont plus d'effets pharmacologiques ou physiologiques. Nous avons donc conclu que tous les autoanticorps fonctionnels sont diri-

gés contre le domaine du récepteur dont nous avons prédit l'importance immunologique et fonctionnelle [9, 10].

En utilisant des peptides synthétiques correspondant aux différentes boucles du récepteur β_1 -adrénergique, il a été démontré que dans environ 25 % à 50 % des cas de cardiomyopathie dilatée idiopathique, les autoanticorps fonctionnels sont bloqués par le peptide correspondant à la première boucle extracellulaire du récepteur [11, 12]. Dans ces cas-là, on ne trouvait pas d'autoanti-

RÉFÉRENCES

12. Wallukat G, Wollenberger A, Morwinski R, Pitschner HF. Anti- β_1 -adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 397-406.
13. Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebcke J. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1993; 91: 1964-8.
14. Goin JC, Borda E, Perez-Leiros C, Storino C, Sterin-Borda L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease. *J Auton Nerv Syst* 1994; 47: 45-52.
15. Rosenbaum MB, Chiale PA, Schejtman D, Levin M, Elizari M. Antibodies to beta-adrenergic receptors disclosing agonist-like properties in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; 5: 367-75.
16. Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Levin MJ, Fu LX, Magnusson Y, Angvald E, Sjögren KG, Hoebcke J. Sera of chagasic patients recognize functional autoimmune epitopes on G protein coupled cardiovascular receptors. Caxambu, Brazil: 20th annual meeting on basic research in Chagas' disease. 1993: 188.
17. Ferrari I, Levin MJ, Wallukat G, Elies R, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebcke J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human β_1 -adrenergic receptor. *J Exp Med* 1995; 182: 59-65.
18. Oldstone MBA. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1991; 50: 819-21.
19. Capron A. Le langage moléculaire des parasites. *médecine/sciences* 1995; 11: 431-9.
20. Bach J. Physiopathologie des maladies auto-immunes. *médecine/sciences* 1990; 6 (suppl): 47-51.
21. Eng H, Magnusson Y, Matell G, Lefvert AK, Saponja R, Hoebcke J. β_2 -adrenergic receptor antibodies in Myasthenia Gravis. *J Autoimmun* 1992; 5: 213-27.
22. Gudbranson T, Hansson L, Herlitz H, Lindholm L, Nilsson LA. Immunological changes in patients with previous malignant essential hypertension. *Lancet* 1981; i: 406-8.

corps contre la seconde boucle extracellulaire. L'épitope B que nous avons estimé difficilement accessible sur cette première boucle pourrait donc quand même interagir avec des autoanticorps fonctionnels.

Ces premiers résultats nous ont conduits à étudier la présence d'autoanticorps fonctionnels contre le récepteur muscarinique M2 de l'acétylcholine au cours de la même maladie. Nous avons pu isoler des autoanticorps par immunoadsorption sur un peptide synthétique correspondant à la seconde boucle extracellulaire de ce récepteur. Ces anticorps inhibent la fixation d'un radioligand antagoniste spécifique sur le récepteur [13] et induisent une chronotropie négative dans des cardiomyocytes en culture (résultats non publiés). Ces résultats nous permettent de postuler l'existence d'épitope(s) fonctionnel(s) sur la seconde boucle extracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G et de la définir comme une région immunodominante majeure par analogie avec le domaine reconnu par les autoanticorps antirécepteur cholinergique nicotinique dans la myasthénie.

La maladie de Chagas

Ces résultats nous ont incités à étudier la présence d'autoanticorps dirigés contre des récepteurs couplés aux protéines G dans une cardiomyopathie de type auto-immun induite par le parasite intracellulaire *Trypanosoma cruzi*. Cette cardiomyopathie se déclare chez 20 % à 30 % de patients ayant été infectés par le parasite cinq à vingt ans avant l'apparition des premiers symptômes cardiaques. La présence d'autoanticorps agonistes contre les récepteurs β -adrénergiques et muscariniques avait été démontrée sur des préparations cardiaques *in vitro* [1, 14]. Nous avons pu confirmer que ces autoanticorps étaient bien dirigés contre la seconde boucle extracellulaire des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques et contre le récepteur M2 muscarinique du cœur [15, 16]. Le fait que dans deux cardiomyopathies différentes d'origine auto-immune, des autoanticorps fonctionnels soient trouvés contre les mêmes récepteurs, suggère que ces autoanticorps pourraient avoir une

importance dans la pathogénie et la symptomatologie de ces maladies.

Puisque, dans le cas de la maladie de Chagas, l'agent pathogène est connu (le parasite *T. cruzi*), nous avons étudié si l'origine des autoanticorps ne pouvait pas être cherchée dans une réaction croisée entre un des récepteurs cibles et une protéine antigénique du parasite. Par études comparatives des séquences, nous avons trouvé une séquence très analogue dans la protéine ribosomique P0 du parasite (-Ala-Glu-Ser-Glu-Glu-) et la seconde boucle du récepteur β_1 -adrénergique humain (-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-). Nous avons vérifié que le peptide correspondant à la seconde boucle extracellulaire du récepteur β_1 -adrénergique était capable de bloquer la reconnaissance de la protéine ribosomique parasitaire en immunoeempreinte et qu'un peptide correspondant à la séquence de la protéine ribosomique décrite ci-dessus était capable de bloquer la chronotropie positive induite par les autoanticorps antirécepteurs [17]. Nous avons donc conclu que les autoanticorps antirécepteur β_1 -adrénergique avaient été induits par réaction croisée avec une protéine parasitaire selon l'hypothèse du mimétisme moléculaire [18, 19].

La présence d'autoanticorps contre les récepteurs β_2 -adrénergique et muscarinique M2, décelée dans la maladie de Chagas, pourrait s'expliquer par un mimétisme moléculaire entre d'autres protéines antigéniques du parasite et les récepteurs cibles ou par des phénomènes inflammatoires au niveau du muscle cardiaque pouvant mener à la production d'autoanticorps contre les fragments immunodominants de ces récepteurs après lésion immunologique des cellules cardiaques.

La myasthénie

La confirmation que la seconde boucle extracellulaire des récepteurs β_1 -adrénergique et muscarinique M2 est bien la cible d'autoanticorps fonctionnels dans deux types de cardiomyopathie nous a fait poser la question de la production d'autoanticorps antirécepteurs couplés aux protéines G dans d'autres maladies dont l'origine auto-immune est bien établie. Nous avons étudié la présence

d'autoanticorps antirécepteurs β -adrénergiques dans la myasthénie, maladie dans laquelle les autoanticorps antirécepteur nicotinique ont un rôle pathologique certain [20]. Dans 18 % des cas, les autoanticorps dirigés contre la seconde boucle du récepteur β_2 -adrénergique ont été décelés. Ces anticorps reconnaissent le récepteur en immunoempreinte et inhibent la liaison d'un radioligand antagoniste [21]. Il est connu que le récepteur β_2 -adrénergique est beaucoup plus ubiquitaire que le récepteur β_1 -adrénergique et se retrouve, entre autres, sur les cellules du muscle strié. Il se pourrait donc que l'attaque auto-immune de ces cellules dans la myasthénie conduise à la libération du récepteur membranaire comme immunogène et donc à la production d'autoanticorps dirigés contre le domaine antigénique immunodominant du récepteur β_2 -adrénergique.

L'hypertension maligne secondaire

L'élévation des concentrations sériques d'immunoglobulines, la présence d'autoanticorps antimembrane nucléaire et une augmentation de lymphocytes T activés dans l'hypertension maligne essentielle ou secondaire [22, 23] suggèrent l'intervention d'une composante auto-immune dans certaines hypertensions. Nous avons donc voulu vérifier la présence

d'autoanticorps contre un récepteur couplé aux protéines G, important dans la régulation de la tension artérielle. Notre premier choix a porté sur le récepteur α_1 -adrénergique. En utilisant un peptide correspondant à la seconde boucle extracellulaire de ce récepteur, nous avons trouvé des anticorps réagissant contre ce peptide dans 64 % de cas d'hypertension maligne d'origine rénovasculaire, en dehors de toute glomérulonéphrite. Dans l'hypertension essentielle maligne ou chez des témoins sains, la prévalence de ces anticorps était de 12 % à 20 %. Comme l'agoniste synthétique du récepteur α_1 -adrénergique, la phényléphrine, les autoanticorps purifiés étaient capables de stimuler les cardiomyocytes en culture. Cette stimulation était inhibée par un antagoniste spécifique, le prazosine, et par le peptide antigénique [24]. Ces résultats ont montré pour la première fois que la prédiction faite sur l'antigénicité des domaines des récepteurs couplés aux protéines G permettait la découverte d'autoanticorps fonctionnels dans des maladies où ils n'étaient pas soupçonnés.

Conclusions et perspectives

Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle la seconde boucle extracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G est une cible préférentielle pour des autoanticorps fonctionnels.

Elle n'est cependant pas le domaine antigénique unique puisque des anticorps de type agoniste ont été trouvés contre la première boucle extracellulaire du récepteur β_1 -adrénergique [11, 12]. Dans les deux types de reconnaissance, le rôle des cystéines impliquées dans un pont disulfure interboucle semble être essentiel. Par ailleurs, des autoanticorps antagonistes trouvés chez des malades allergiques semblent reconnaître la troisième boucle extracellulaire [25]. Cette observation n'a pas encore été confirmée pour le même récepteur ou pour des anticorps dirigés contre la même boucle dans d'autres récepteurs. Il serait pourtant intéressant de vérifier l'hypothèse d'anticorps pouvant bloquer les récepteurs au lieu de les stimuler.

Par la suite, nous avons également été capables d'induire des anticorps partageant les propriétés fonctionnelles de ces autoanticorps par immunisation de lapins contre des peptides synthétiques correspondant à la séquence de la seconde boucle extracellulaire des récepteurs pouvant être impliqués dans la reconnaissance auto-immune. D'autres groupes ont utilisé la même région pour induire des anticorps anti-peptide pouvant reconnaître d'autres récepteurs de la même famille et ont également obtenu des anticorps à effets pharmacologiques ou physiologiques. Nous avons résumé dans le *Tableau I* les propriétés connues des

Tableau I
EFFETS DES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LES BOUCLES EXTRACELLULAIRES
DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

Récepteurs	Activité étudiée	Boucle I	Boucle II	Boucle III	Références
β_1 -adrénergique	Effet pharmacologique	Agoniste	Non compétitif		[8]
	Effet physiologique		Agoniste		[10-12, 26]
β_2 -adrénergique	Effet pharmacologique		Non compétitif	Antagoniste	[27]
	Effet physiologique				[25]
M2-muscarinique	Effet pharmacologique		Mixte		[13, 28]
	Effet physiologique		Agoniste		[28]
α_1 -adrénergique	Effet pharmacologique		Non compétitif		[24, 29]
	Effet physiologique		Agoniste		[24, 29]
Sérotoninergique (5HT _{1A})	Effet pharmacologique	Non compétitif	Augmente les sites agonistes de forte affinité		[30]
Olfactif	Effet physiologique		Antagoniste		[31]
PAF-acéther	Effet physiologique		Agoniste		[32]

L'activité pharmacologique est mesurée par le déplacement d'un radioligand spécifique des récepteurs, l'activité physiologique par un effet chronotrope sur une cellule ayant ces récepteurs ou par l'activation des effecteurs biochimiques des récepteurs. Tous les essais ont été réalisés in vitro. De nombreux rapports mentionnent l'existence d'anticorps anti-peptide dirigés contre les différents domaines des récepteurs. La plupart de ces anticorps n'ont pas été testés pour leur activité fonctionnelle et ne sont donc pas mentionnés dans le tableau.

RÉFÉRENCES

23. Hilme E, Herlitz H, Söderström T, Hansson L. Increased secretion of immunoglobulins in malignant hypertension. *J Hypertens* 1989; 7: 91-5.
24. Fu LXM, Herlitz H, Wallukat G, Hilme E, Hedner T, Hoebeke J, Hjalmarson A. A functional autoimmune epitope on α_1 -adrenoceptors in patients with malignant hypertension. *Lancet* 1994; 344: 1660-3.
25. Wallukat G, Wollenberger A. Autoantibodies to β_2 -adrenergic receptor with anti-adrenergic activity from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 581-7.
26. Magnusson Y, Wallukat G, Guillet JG, Hjalmarson A, Hoebeke J. Functional analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the β_1 -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 1991; 4: 893-905.
27. Guillet JG, Lengagne R, Magnusson Y, Tate K, Strosberg AD, Hoebeke J. Induction of a pharmacologically active clonotypic B cell response directed to an immunogenic region of the human β_2 -adrenergic receptor. *Clin Exp Immunol* 1992; 89: 461-7.
28. Fu LX, Wallukat G, Hjalmarson Å, Hoebeke J. Agonist-like activity of anti-peptide antibodies directed against an autoimmune epitope on the heart muscarinic acetylcholine receptor. *Recept Chann* 1994; 2: 121-30.
29. Fu LX, Wallukat G, Hjalmarson Å, Hoebeke J. Characterization of anti-peptide antibodies directed against an autoimmunogenic epitope on the human α_1 -adrenergic receptor. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 146-51.
30. Verdot L, Bertin B, Guilloteau D, Strosberg AD, Hoebeke J. Characterization of pharmacologically active anti-peptide antibodies directed against the first and second extracellular loops of the serotonin 5-HT_{1A} receptor. *J Neurochemistry* 1995; 65: 319-28.
31. Krieger J, Schleicher S, Strotmann J, Wanner I, Boekhoff I, Raming K, De Geus P, Breer H. Probing olfactory receptors with sequence-specific antibodies. *Eur J Biochem* 1994; 219: 829-35.
32. Müller E, Degenais P, Alami N, Rola-Pleszcynski M. Identification and functional characterization of platelet-activating factor receptors in human leukocyte populations using polyclonal anti-peptide antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5818-22.
33. Noda K, Saad Y, Graham RM, Karnik SS. The high affinity state of the β_2 -adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J Biol Chem* 1994; 269: 6743-52.

autoanticorps et des anticorps anti-peptide étudiés jusqu'à présent. La recherche d'autoanticorps dirigés contre la seconde boucle extracellulaire d'autres récepteurs de la même famille dans des maladies à étiologie inconnue, mais pour lesquelles une composante auto-immune est suspectée, peut donc être envisagée.

L'observation de l'existence d'autoanticorps antirécepteurs de type agoniste, dirigés contre la seconde boucle extracellulaire, est confirmée par plusieurs groupes utilisant des approches différentes. L'importance physiopathologique de ces autoanticorps reste à démontrer. Comme nous l'avons suggéré dans le cas de la myasthénie, ces autoanticorps pourraient être la conséquence d'une attaque auto-immune de type cellulaire, permettant la libération et la présentation des récepteurs comme autoantigènes. Ils seraient donc plus des marqueurs de l'auto-immunité que les agents auto-immuns responsables de la maladie.

Quelques arguments suggèrent que les autoanticorps pourraient avoir une importance physiopathologique. La présence des mêmes anticorps dans des cardiomyopathies d'origine si différente que la cardiomyopathie dilatée idiopathique et la cardiomyopathie de la maladie de Chagas suggère que les symptômes communs à ces deux cardiomyopathies pourraient être dus à la présence de ces anticorps. Dans tous les cas où nous avons utilisé des sérums témoins dans un essai immunoenzymatique utilisant les peptides synthétiques comme antigènes, nous avons obtenu une réponse positive comprise entre 10 % et 20 %. A partir de ces sérums, nous avons purifié des anticorps anti-peptide par chromatographie d'affinité. Ces anticorps n'ont jamais montré d'activité pharmacologique ou physiologique, suggérant qu'ils sont dirigés contre des épitopes non fonctionnels des peptides ou des récepteurs. Le fait que des anticorps à effets pharmacologiques ou physiologiques ne soient trouvés que dans les sérums des malades favorise donc l'hypothèse de leur importance physiopathologique.

Des études expérimentales, actuellement en cours, d'immunisation à long terme par des peptides devraient permettre de préciser les

effets physiopathologiques des autoanticorps. L'obtention d'anticorps monoclonaux fonctionnels et leur transfert passif dans des souris transgéniques exprimant les récepteurs cibles pourraient également donner une réponse à la question de la pathogénicité des autoanticorps. Les modèles expérimentaux définis permettraient une approche immunothérapeutique spécifique au moyen de peptides bloquants.

Par ailleurs, les autoanticorps peuvent être considérés comme des agonistes spécifiques du sous-type des récepteurs cibles. En effet, la variabilité de la seconde boucle extracellulaire entre les différents sous-types est assez prononcée et, de ce fait, la plupart des anticorps sont monospécifiques pour un récepteur unique. Cette propriété pourrait être utilisée d'un point de vue pharmacologique quand les ligands synthétiques ne permettent pas cette discrimination ■

Remerciements

Le travail présenté ici est le résultat d'une collaboration très étroite entre plusieurs laboratoires de recherche fondamentale et des services cliniques. Dans le premier groupe, je tiens à remercier spécialement le laboratoire d'immunopharmacologie moléculaire à l'Institut Cochin de génétique moléculaire à Paris (les Drs A.D. Strosberg, S. Marullo et B. Bertin), l'U. 152 de l'Inserm dans le même Institut (les Drs J.G. Guillet et M. Viguier), les laboratoires Wallenberg de l'université de Göteborg (les Drs Å. Hjalmarson, M.L.X. Fu et Y. Magnusson), le laboratoire de Cardiologie cellulaire au Max Delbrück Center à Berlin (Dr G. Wallukat) et le laboratoire de biologie moléculaire de la maladie de Chagas à Buenos-Aires (Dr M.J. Levin et Mme. I. Ferrari). Dans le second groupe, je tiens à remercier l'unité de cardiologie de l'hôpital Ramos Mejia (les Drs M. Rosenbaum, P. Chiale et M. Elizari). Mes remerciements vont également à mes collaborateurs directs, le Dr L. Verdot et Mmes R. Elies et D. Lebesgue. Ce travail est subventionné par Biotechnocentre, un réseau Nord-Sud Inserm et un programme Procope.

Je tiens à remercier spécialement les professeurs P. Bougnoux et D. Bout pour leurs commentaires critiques, m'ayant permis d'améliorer ce manuscrit.

Summary

The second extracellular loop of G protein-coupled receptors: a preferential target for functional autoantibodies

Membrane receptors coupled to G proteins belong to a receptor superfamily containing seven transmembrane α -helical domains whose structural model is bacteriorhodopsin. The structural and functional properties of the second extracellular loop of these receptors, linking the fourth transmembrane domain to the fifth, point towards this region as a potential antigenic region. Using synthetic peptides corresponding to the sequence of this loop, we were able to detect, purify and characterize functional autoantibodies in different diseases, in which an autoimmune component has been postulated. Polyclonal antibodies have been raised in rabbits against the same peptides; they share the same functional properties as the autoantibodies. These results allow us to put forwards the hypothesis that the second extracellular loop is the main immunodominant region of receptors coupled to protein G. These results also permit to think about new diagnostic and therapeutic approaches for those diseases, in which the autoantibodies seem to play a role.