

Bulletin et Mémoires de l'Académie royale de Médecine de Belgique

Séance publique du 29 mai 2010

I. Colin, et coll.

**The Thyroid Angiofollicular Units, a Biological Model
of Functional and Morphological Integration**

J.E. Dumont, et coll.

**H2O2, signal, substrate, mutagen and chemorepellent.
From physiology to biochemistry and disease**

*
* *

Séance publique du 19 juin 2010

J. Frühling

Eloge académique du Professeur Alb. de Scoville

O. Devuyst

**Water transport across biological membranes :
Overton, water channels, and peritoneal dialysis**

C. A. Wagner

**New insights into urinary acidification and regulation
of acid-base balance**

*
* *

Prix académiques 2007-2009 (échéance le 11 janvier 2010)
résumés des travaux couronnés par l'Académie

Ch. Pierreux

**Lauréat du Prix du Concours ordinaire
de la première Section (2008-2009)**

A. Florins

**Médaille de l'Académie dans le cadre du Prix du Concours ordinaire
de la première Section (2008-2009)**

M^{me} A.-C. Servais

**Lauréate du Prix du Concours ordinaire
de la cinquième Section (2008-2009)**

J.-F. Collet

Lauréat du Prix Alvarenga de Piauhy 2009

M^{me} N. Vigneron

**Médaille de l'Académie dans le cadre du Prix Alvarenga
de Piauhy 2009**

J.-B. Demoulin, et coll.

**Lauréat du Prix Docteur Maurice Godin –
Maria Savelkoul (2007-2009)**



VOLUME 165/ANNÉE 2010

N^{os} 5-6

PÉRIODIQUE MENSUEL
NE PARAISSANT PAS EN AOÛT

PALAIS DES ACADEMIES
1000 BRUXELLES

Bulletin et Mémoires de l'Académie royale de Médecine de Belgique

Séance publique du 29 mai 2010

I. Colin, et coll.

**The Thyroid Angiofollicular Units, a Biological Model
of Functional and Morphological Integration**

J.E. Dumont, et coll.

**H₂O₂, signal, substrate, mutagen and chemorepellent.
From physiology to biochemistry and disease**

*
* *

Séance publique du 19 juin 2010

J. Frühling

Eloge académique du Professeur Alb. de Scoville

O. Devuyst

**Water transport across biological
membranes : Overton, water channels, and peritoneal dialysis**

C. A. Wagner

**New insights into urinary acidifi-
cation and regulation of acid-base
balance**

*
* *

Prix académiques 2007-2009 (échéance le 11 janvier 2010)
résumés des travaux couronnés par l'Académie

Ch. Pierreux

**Lauréat du Prix du Concours ordinaire de la première Section
(2008-2009)**

A. Florins

**Médaille de l'Académie dans le cadre du Prix du Concours
ordinaire de la première Section (2008-2009)**

M^{me} A.-C. Servais

**Lauréate du Prix du Concours ordinaire
de la cinquième Section (2008-2009)**

J.-F. Collet

Lauréat du Prix Alvarenga de Piauhy 2009

M^{me} N. Vigneron

**Médaille de l'Académie dans le cadre du Prix
Alvarenga de Piauhy 2009**

J.-B. Demoulin, et coll.

**Lauréat du Prix Docteur Maurice Godin –
Maria Savelkoul (2007-2009)**

VOLUME 165/ANNÉE 2010

N^{os} 5-6

PÉRIODIQUE MENSUEL
NE PARAISSANT PAS EN AOÛT

PALAIS DES ACADEMIES
1000 BRUXELLES

Séance publique du 29 mai 2010



SÉANCE PUBLIQUE DU 29 MAI 2010

Au Bureau : M. L. Hue, Président ; MM. J. Frühling, Secrétaire perpétuel, P.-P. Pastoret et W.J. Malaisse, premier et second vice-présidents.

Sont présents :

MM. G. Primo, Th. Godfraind, P.-J. Kestens, J. van der Stricht, P. Vanderhoeft, M. Abramow, J.E. Dumont, A. Vincent, Ch. van Ypersele de Strihou, A. Burny, G. Franck, J.-J. Vanderhaeghen, membres honoraires ;

MM. M. Lamy, J. Brotchi, J.-B. Otte, G. Fillet, M. Wéry, L. Angenot, R. Lauwerys, P.J. Van Houtte, G. Rousseau, M^{me} J.-A. Stiennon-Heuson, MM. G. Rorive, J. Boniver, J.-C. Schoevaerds, G. Meulemans, J.-M. Boeynaems, J.-F. Beckers, B. Van den Eynde, Y. Pirson, R. Kramp, M^{me} D. Balériaux, MM. A. Ferrant, J.-C. Henquin, A. Scheen, J.-L. Balligand, M^{me} Fr. Meunier, membres titulaires ;

MM. E. Van Schaftingen, J. Crommen, R. Vanwijck, F. Houssiau, J.-P. Dehaye, S. Louryan, M^{me} J. Fontaine, MM. P. Lekeux, O. Devuyst, C. Delloye, G. Casimir, P. Coulie, E. Constant, M. Hamoir, J.-C. Renauld, membres ordinaires.

MM. R. Görtz, E.H. Betz, J. Bonnal, A. Kaeckenbeeck, L. Molle, P. Dumont, A. Govaerts, M. Lechat, L. Jeanmart, P. Lefebvre, membres honoraires ; U. Gaspard, Th. de Barsy, M. Goldman, M^{me} F. Portaels, MM. L. Delattre, J.-F. Beckers, J. Melin, P. Van Cangh, J.-M. Foidart, J.D. Born, J. Nève, membres titulaires ; E. Sokal, J.-C. Pector, Y. Carlier, J. Klastersky, A. Albert, P. Gustin, B. Lengelé, J. Donnez, D. Giet, M^{me} A. Noël, MM. P. Vanderhaeghen, R. Reding, L. Willems, membres ordinaires, ont exprimé leurs regrets de ne pouvoir assister à la séance.

*
* *

Lectures

I

THE THYROID ANGIOFOLLICULAR UNITS, A BIOLOGICAL MODEL OF FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL INTEGRATION

par

I. COLIN (U.C.L.) (*), et coll. (**)

Although goiter is known since the antiquity as an enlargement of the thyroid gland, the importance of iodine as crucially required for thyroid hormone (TH) synthesis has been recognized only in the 19th century (1). Iodide must be first transported from adjacent capillaries into the thyrocyte via an active transport mediated by the sodium-iodide symporter, NIS, localized at the baso-lateral pole of the cell. Then, iodide diffuses throughout the cytoplasm and crosses the apical membrane, probably via pendrin, a 780 amino acid transmembrane protein that acts as a Cl⁻/I⁻ exchanger. Iodide is then oxidized into iodine and incorporated into thyroglobulin (Tg) by a thyroperoxidase (TPO) that catalyses also the coupling reactions of mono and diiodotyrosines into T3 and T4. This reaction relies on H₂O₂, a hazardous chemical that is produced by the thyroid NADPH oxidases, Duox1 and Duox2 (Fig.1). Thus, the dependence of an important physiological process, *i.e.* TH synthesis from a trace element, iodide, with often limited availability makes the thyroid unique as it must continuously adapt itself to fulfill its duties.

The shortcoming of adaptive autoregulatory mechanisms (*i.e.* the stimulation of iodide trapping, the preferential synthesis of T3 over T4, the recycling of intracellular iodide, the peripheral conversion of T4 into T3 (2)) may lead to the development of euthyroid goiter that should therefore be considered more as a process of adaptation than really pathological, as long as the thyroid function is preserved. The growth of goiter, first simple and thereafter multinodular, implies, in opposition with neoplastic growth, a coordinated and controlled adaptation of the three main tissue compartments, *i.e.* epithelial, endothelial and interstitial. The goal of this review is to present novel data about how iodine deficiency (ID) triggers goiter formation and the way the epithelial compartment dialogs with adjacent endothelial cells to keep thyrocytes able to safeguard TH synthesis. New mechanisms of adaptation will also be presented to illustrate the ingenuity of thyroid cells to keep intact limited stocks of iodine, while using them for a risky biochemical reaction, *i.e.* TH synthesis.

(*) Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

(**) A-C. Gérard (U.C.L.).

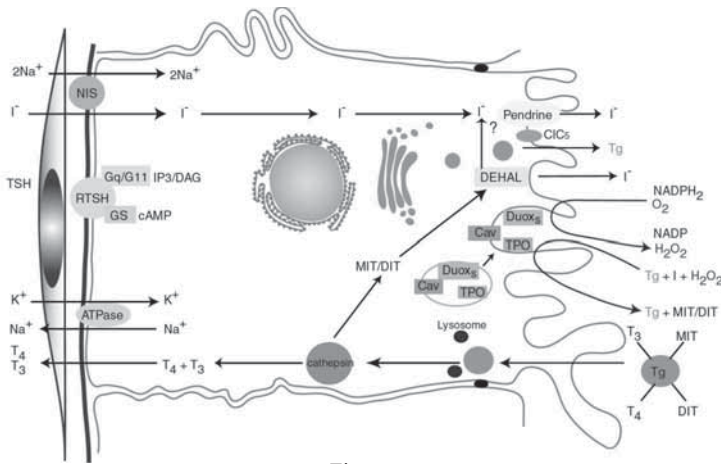


Fig. 1

Schematic representation of the thyroid follicular cell. NIS: Na^+/I^- symporter, TSHR: thyroid stimulating hormone receptor, TPO: thyroperoxidase, Duox: dual oxidases, DEHAL: dehalogenase, Tg: thyroglobulin, MIT: monoiodotyrosine, DIT: diiodotyrosine.

1. The obligatory dialog between epithelial and endothelial cells to optimize the iodide supply

When TH production is jeopardized in case of ID, morphological changes occur rapidly in the thyroid gland. One of the most striking concerns the vasculature. In experimental models of goiter, there is, at very short term (less than a week), a sharp increase in the thyroid blood flow. Likewise, endothelial cells start proliferating always before epithelial cells, while TSH levels remain unchanged. We recently discovered part of the molecular mechanism that links together ID and the expansion of the microvasculature (3).

1.1. The early TSH-independent phase

In the early times of ID-induced thyroid growth, there are no gross morphological or functional changes. Nevertheless, an angiogenic response driven by the vascular endothelial growth factor (VEGF) is triggered from adjacent iodine-depleted thyrocytes.

The molecular events linking ID and VEGF expression were dissected out in *in vitro* models of iodide-depleted and/or goitrogen-stimulated thyrocytes (3). A quick increase in HIF-1 α and VEGF expression occurs associated with a surge in intracytoplasmic reactive oxygen species (ROS). When ROS are inhibited by N-acetyl cysteine (NAC), a potent antioxidant, the early induction of VEGF and HIF-1 α is completely abolished, indicating that these events are closely related. Thus, when iodide supply is hindered or when its transport is blocked, its intracellular stocks drop rapidly, thereby increasing ROS, which leads to the stabilization of HIF-1 α . HIF-1 α heterodimerizes with HIF-1 that is constitutively present in the cell. The HIF-1 α /HIF-1b heterodimer, after binding to the promoter region of the VEGF gene, turns on its transcription. As a result, VEGF mRNA

and protein expression increases. VEGF is then secreted and activates adjacent pericytes and endothelial cells, thereby leading to increased blood flow and angiogenesis (Fig.2).

According to previous papers, expanding capillaries, by increasing the clearance of iodide may therefore be considered as an additional autoregulatory mechanism that protects the gland against iodine scarcity.

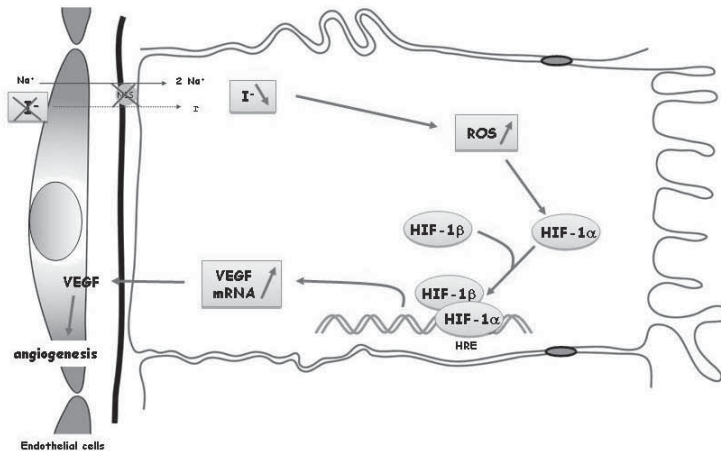


Fig. 2

Proposed mechanism of iodide deprivation-induced angiogenesis in thyrocytes. See the text for details. Adapted from Gérard *et al.* (3).

1.2. The delayed TSH-dependent phase

A week of goitrogen treatment is needed for TSH plasma levels starting to rise. TSH stimulates thyrocytes, as shown by cell hypertrophy and hyperplasia, and increases NIS, TPO, pendrin, Tg, and Duox expression. A second larger increase in vascular capacity then occurs mediated also by several growth regulatory and angiogenic factors (4).

Thus, in ID-induced goiter development, angiogenesis takes place in two phases. The first is TSH independent and implies the involvement of the ROS-HIF-VEGF axis, which results in increased local clearance of iodide. The second phase is TSH dependent and comes along with hypertrophy and hyperplasia of follicular cells.

2. Morphological and functional heterogeneity: the best way to preserve the thyroid homeostasis

2.1. Thyroid heterogeneity and angiofollicular units

The thyroid gland is characterized by an intrinsic propensity to form nodules with different morphological and functional properties, which ultimately leads to multinodular goiter (MNG). MNG heterogeneity is illustrated by scintigraphic scans showing areas of hot nodules scattered around cold nodules. This heterogeneous iodine

metabolism is correlated with specific morphological features. Hot follicles (also called ‘active’) display a cuboidal epithelium surrounding fluid colloid containing iodinated Tg, while cold follicles (or ‘hypofunctioning’) harbour a flat epithelium centered on a dense colloid with non iodinated Tg because of the lack in TPO, Duoxs, and pendrin expression (5).

Another striking difference between both types of follicles concerns again their microcirculation. The relative volume of microvessels surrounding active follicles is significantly greater than those around hypofunctioning follicles. NOSIII and endothelin-1 are detected in active follicles, but not in hypofunctioning. Thus, a relationship exists between thyroid cell function, the extend of the microcirculation, and the expression of vasoactive factors. In addition, during goiter development, capillaries around active follicles react quicker to TSH than those around hypofunctioning follicles (5, 6).

In another model of thyroid heterogeneity in mice transgenic for the adenosine receptor (Tg-A2aR), as well as in Graves’ disease, a strong relationship can also be established between follicular cell division, expression of growth and vasoactive factors and inflated microvessels (7).

Altogether, these data indicate that the dialog between epithelial and endothelial cells is continuously active in the thyroid, which contributes to ongoing functional and/or morphological adaptation to changing environment.

These results led us to propose the concept of “angiofollicular units” (AFU), a structure we believe to be the true functional unit of the thyroid, as it includes not only epithelial, but also endothelial cells in a coherent functional and morphological tridimensional structure.

2.2. Hypofunctioning follicles, a functional reserve

The iodine content of the colloid is heterogeneous between and within each follicle and changes in the thyroid function induce shifts in iodine stores from one compartment to another.

In thyroids of old mice, as well as in normal human thyroids, many hypofunctioning follicles contain compact poorly iodinated Tg globules. They correspond to condensed Tg, not immediately available for TH synthesis, but eventually usable upon follicle stimulation. Tg globules could therefore be viewed as a smart way to stock high amounts of Tg for long periods of time, while avoiding follicle alterations. When TH needs increase, hypofunctioning follicles serve as a functional reserve that can be reactivated. Hence, an expansion of adjacent microvessels is observed along with a progressive “dilution” of Tg globules into soluble Tg ready for new TH synthesis catalyzed by the enzymatic machinery including TPO, Duoxs and pendrin that also re-emerges (Fig.3).

This intrinsic autoregulatory mechanism that results from the exceptional phenotypic wealth of thyroid cells also contributes to preserve the thyroid economy (8).

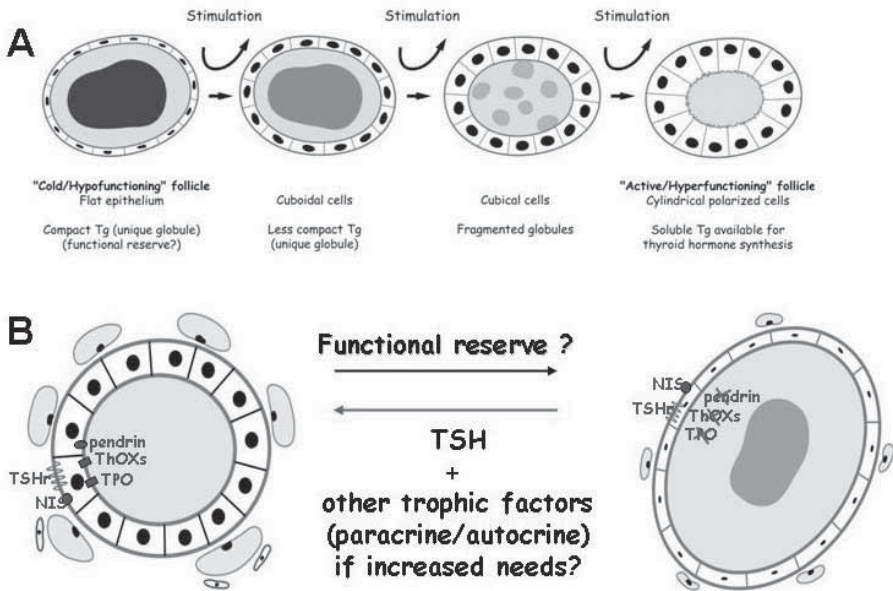


Fig. 3

A. Processing of insoluble Tg globules upon TSH stimulation. B. Proposed mechanism of hypofunctioning follicles reactivation upon TSH stimulation. These hypofunctioning follicles could serve as functional reserve mobilisable when TH needs are increasing. Adapted from Gérard *et al.* (5-8).

2.3. Cell and tissue heterogeneity-nodule formation-multinodular goiter

As aforementioned, ID leads to diffuse goiter that tends to become heterogeneous over time. ID induces quick changes in the thyroid microvasculature that optimize the local iodide clearance. If ID persists or becomes risky for TH synthesis, then TSH, along with growth and vasoactive factors, makes epithelial and endothelial cells growing and/or dividing. In order to maintain the thyroid growth under control, TSH- and EGF-stimulated thyrocytes release TGF- β that bridles thyroid cell function and proliferation. But one "side-effect" of TGF- β is to stimulate the production of connective tissue by fibroblasts associated with fibrosis, increase in capsule thickness, and tissue partition. This TGF- β -induced fibrosis may partly explain how the cellular heterogeneity leads to tissue heterogeneity and ultimately to MNG.

The great phenotypic diversity of thyroid cells contributes also to the tendency of the thyroid to form nodules. This refers to the clonality theory that postulates that even a weak stimulation to grow may affect cells in different ways, because of different intrinsic properties due to their polyclonal origin (9). Thus, a rising nodule may result from the coordinated replication of a cluster of follicles owing their own growth potentials that is different from their neighbours. When this trait is amplified, the process ends up with the formation of nodules morphologically and functionally different from each others.

Thus, in accordance with others, we propose that the clustering of environmental events, the everlasting cycle ID/hyperactivity-iodine repletion/hypoactivity, associated with the genetic heterogeneity of the thyroid cells and later on TGF- β -associated fibrosis, may lead the development of MNG.

3. ROS, the best and the worst for the thyroid gland

3.1. ROS, the best

H₂O₂ and other free radicals (OH, O₂⁻) that belong to ROS are required for TH synthesis. Of note, this physiological ROS production, which we assimilated to a minimal oxidative load (OL), is under the control of potent antioxidant defences that protect the thyroid from cell injury. More than just by-products of the aerobic respiration, ROS are key players in the conservation of the thyroid economy. Without them, thyrocytes cannot simply work. This was recently demonstrated by incubating thyrocytes with NAC. We observed that TPO, Duoxxs, and Tg expression was impaired, which led to conclude that the maintenance of OL at a minimal level is essential for thyroid cell functional integrity (10).

In addition, ROS appear to play a role in ID/goitrigen-induced goiter. In this condition, OL increases up to the level of oxidative stress (OS), as signs of lipidoperoxidation show up in hypertrophic thyrocytes. But, OS is here harmless likely because cell antioxidant defences are strong enough to buffer it. Likewise, this harmless OS is likely required for thyroid cell proliferation, as cell division is hindered after NAC administration (11).

3.2. ROS, the worst

ROS are toxic in iodine-induced goiter involution. OS, located this time both in thyrocytes and neighbouring tissues (inflammatory cells), is accompanied by a strong inflammatory reaction, as well as cell injuries. The acuteness of cellular damage is likely due to a more aggressive attack due to very toxic free radicals (OH, O₂⁻, ONOO⁻, iodocompounds) (12). Fortunately, the thyroid can cope with this aggression and always retrieves a normal function. Nevertheless, when such inflammatory reaction occurs in genetically susceptible individuals, it may trigger permanent destructive (Hashimoto's like) thyroiditis. Using a model of non obese diabetic (NOD) mice that develop long-term destructive thyroiditis, we observed that the inflammatory reaction, occurring with cell destruction, was accompanied by heavy OS localized both in thyrocytes and in the surrounding tissue. Here, the inflammatory reaction was significantly reduced by NAC, its protective effect being though oriented on infiltrating inflammatory cells rather than thyrocytes (13). In an *in vitro* model of human thyrocytes incubated with proinflammatory Th1 cytokines, OS was high and the thyroid cell function was strongly altered. Unfortunately, the impact of OS as mediator of Th1 cytokine-induced cell alterations was not proved as NAC, although blocking ROS production, rather aggravated Th1-induced downregulation of thyroid cell function (Poncin *et al.*, in preparation).

Thus, ROS are likely not the sole intracellular mediators of Th1 cytokine-induced effects. Alternatively, ROS reach so low levels in NAC incubated-cells that even basal thyroid cell function cannot sustain.

Apart from quantitative and qualitative aspects, where ROS are produced in the cell is also of crucial importance. Accumulated evidence indicates that, for thyroid cells working properly, all TH synthesis-associated enzymatic reactions must occur outside the cell, at the interface with colloid, in a spatial and functional entity recently called “thyroxisome” (14). Two recent studies (model of KO caveolin-1 mice (15) and Pendred syndrome (16)) indicated that when this system is altered, iodine organification and coupling reactions occur wrongly in the cytoplasm with devastating consequences for the cell. The thyroxisome may therefore be defined as a biochemical unit that tightly controls the production of H₂O₂, while preventing any intracellular leakage and accumulation of iodide, a potential source of toxic free radicals (Fig.4). As long as the iodination machinery is correctly confined, it may work, even intensively, as recently shown in Graves’ disease. Here, as the thyroxisome structure is preserved, high OS, resulting from intense TH synthesis, can be efficiently buffered by adapted antioxidants without any cell damage (Senou *et al.*, in preparation).

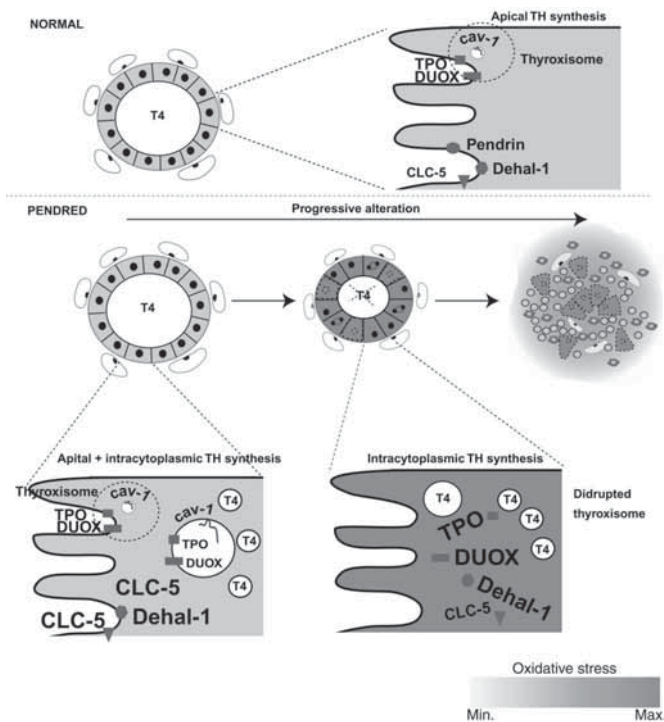


Fig. 4

Schematic representation of the hypothetical pathophysiological mechanisms in the Pendred thyroid, highlighting the role of thyroxisome as biochemical unit required for correct TH synthesis. See the text for details. Adapted from Senou *et al.* (16).

4. Conclusions and perspectives

TH have such an impact on cell development and metabolism, from the earliest stages of embryonic development and throughout the adult life, that, to always adapt to everlasting fluctuations in iodide intake, emerged from the evolutionary maturation of the thyroid gland, a fully integrated morphological and functional apparatus, perfectly adapted to TH synthesis that we called AFU. As soon as iodine supply is jeopardized and without TSH stimulation, an angiogenic signal is generated inside thyrocytes from the ROS-HIF-VEGF axis and targeted toward closely related capillaries. Then, angiogenesis promptly starts aiming to increase the local clearance of iodide. When this and other protective measures become insufficient, then TSH emerges along with many other locally generated growth and vascular regulatory factors included in very dense paracrine networks.

Although goiter growth is controlled in time and space, it is highly heterogeneous from the beginning because of the polyclonal origin of the cells. When widened from cell to tissue level, the concept of polyclonality accounts for organ heterogeneity and the emergence of nodules distributed among morphologically and functionally quiescent areas. These zones, composed of large AFU lined with flat epithelium and filled with dense colloid containing globules of compact Tg, are the feature of an additional rescue mechanism related to the concept of functional reserve. Upon TSH stimulation, the progressive dilution of these dense Tg globules into fluid Tg, then usable for TH synthesis, comes along expression of differentiation proteins, and proliferation of endothelial cells. This morphological and functional “awakening” is necessarily followed by a stabilization phase thanks to locally generated regulatory factors such as TGF- β that, on one hand limits cell growth and function, but on the other hand facilitates the depot of connective tissue, which may ultimately lead to MNG.

Beyond the tridimensional structure of AFU, the polyhedral structure of thyrocyte, especially the polarity of the cell, and the presence of the thyroxisome at the apical pole is of crucial importance. The strict confinement of all key players involved in TH synthesis allows risky biochemical processes to occur just at the interface with the colloid where Tg is the most fluid, without hazard as any potentially toxic ROS are being efficiently detoxified by potent antioxidant systems. As long as the thyroxisome is preserved, enzymatic reactions may run safely, even at high rate. On the contrary, as soon as the thyroxisome is disrupted, the enzymatic machinery is leaking into the cytoplasm, *i.e.* an area that is not at all suited to face high OS. Heavily toxic ROS are then produced that rapidly overwhelm cell defences against OS, which ultimately leads to cell destruction. Excessive ROS production has also been advocated to be involved in transient cell alteration in iodine-induced goiter involution, as well as in permanent destructive thyroiditis. From our most recent data, came out the idea that ROS toxicity should therefore be addressed following three aspects: *how much*, *what kind* and *where* in the cell they are produced. Further experiments should demonstrate what roles ROS are playing as etiopathogenic factors in thyroid disorders, especially in cancers.

From these data accumulated over the last few years, we can conclude that the thyroid gland has somehow succeeded to square the circle by developing a system, the AFU that enables it to face the challenge of TH synthesis, a risky biochemical reaction, while optimizing as much as it may, the uptake of an essential trace element, by definition valuable, iodine. For these reasons, the thyroid gland could be considered as an efficient model of integration of morphological and functional requirements.

RÉSUMÉ

Le rôle fondamental de la glande thyroïde est d'assurer la biosynthèse des hormones thyroïdiennes dont le rôle primordial au cours du développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie après la naissance est bien connu. Le défi est ici double puisque la synthèse hormonale dépend à la fois de processus biochimiques potentiellement toxiques, dès lors qu'ils ne seraient pas parfaitement confinés, et de la disponibilité d'un élément trace, l'iode, dont l'apport peut être extrêmement variable en fonction de la situation géographique ou physiologique des individus. Cette quadrature du cercle, la glande thyroïde l'a résolue au cours de sa maturation phylogénétique, par la mise en place des unités angiofolliculaires, entités morphologiques dont la parfaite cohérence fonctionnelle des différents compartiments qui les composent (épithélial, endothélial et interstitiel) résulte d'un assemblage tridimensionnel hautement élaboré. Cette intégration morphologique et fonctionnelle est le garant du maintien de stocks suffisants d'hormones thyroïdiennes dont la mobilisation peut être déclenchée à tout moment en cas de besoin. Cette exigence fonctionnelle s'exprime sous la forme d'une hétérogénéité morphologique dont l'aboutissement est la formation des nodules. Chaque unité angiofolliculaire est une entité individualisée avec un patrimoine génotypique et phénotypique qui lui est propre et qui fonctionne sous le contrôle extrinsèque de la TSH et d'une multitude de facteurs autocrins et paracrins. Plus subtilement, des mécanismes d'autorégulation intrinsèques, fonctionnant en dehors de toutes influences extérieures, ajustent en permanence la disponibilité des acteurs de la synthèse hormonale (l'iode, la thyroglobuline) au sein d'une entité biochimique (le thyroxisome), parfaitement adaptée afin que cette synthèse ait lieu sans préjudice pour le thyrocyte. Le processus de synthèse génère des substances dérivées de l'oxygène sous la forme d'une charge ou d'un stress oxydatif, cependant parfaitement contrôlés dans les thyrocytes sains. Toute attente quant à la nature, la quantité et l'endroit dans la cellule où ces substances dérivées de l'oxygène sont produites, peut conduire à une déstructuration morphologique et fonctionnelle, génératrice de processus pathologiques, incluant ceux de nature auto-immune, voire néoplasique.

SUMMARY

The fundamental role of the thyroid gland is to ensure the biosynthesis of thyroid hormones whose primary role during embryonic development and the maintenance of homeostasis after birth is well known. The challenge here is double, as the hormone synthesis depends on both potentially toxic biochemical processes, as long as they are not fully contained, and the availability of a trace element, iodine, whose uptake may be extremely variable depending on the geographical location and the physiological status of individuals. The squaring of the circle has been resolved by the thyroid gland during its phylogenetic maturation by setting up angiofollicular units, morphological entities whose the perfect functional coherence between the different compartments within them (epithelial, endothelial and interstitial) results from a high level three-dimensional assemblage. This morphological and functional integration warrants adequate supplies of thyroid hormones whose mobilization must be triggered at any time when necessary. This functional requirement finds its expression in the morphological heterogeneity that ultimately culminates in the formation of nodules. Each angiofollicular unit is an individualized entity with its own genotypic and phenotypic asset that runs on the extrinsic control of TSH and a host of autocrine and paracrine factors. But subtle intrinsic mechanisms of self-regulation, operating out of any outside influences, constantly adjust the availability of players involved in the hormonal synthesis (iodine, thyroglobulin) within a biochemical entity (the thyroxisome) that is perfectly suited for this synthesis taking place without prejudice to

the thyrocyte. The hormonal synthesis generates oxygen-derived substances as oxidative load or stress, though perfectly controlled in healthy thyrocytes. Any injury related to the nature, the amount, or where in the cell oxygen-derived substances are produced, may lead to morphological and functional breakdowns responsible for various disease processes, including those of autoimmune or even neoplastic nature.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the “Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS-FRSM)” and by the special research fund (FSR) from UCL. Authors acknowledge Sylvie Poncin, Maximin Senou, Marie-Christine Many, Jean-François Deneff and Benoit Lengelé for their technical support and/or helpful comments in the preparation of this manuscript. Anne-Catherine Gérard is postdoctoral researcher (Fonds National de la Recherche Scientifique).

BIBLIOGRAPHIE

1. DERWAHL M., STUDER H., *Hyperplasia versus adenoma in endocrine tissues: are they different?*, Trends Endocrinol. Metab., 13, 23-28 (2002).
2. GÉRARD AC., DENEFF JF., COLIN IM., VAN DEN HOVE MF., *Evidence for processing of compact insoluble thyroglobulin globules in relation with follicular cell functional activity in the human and the mouse thyroid*, Eur. J. Endocrinol., 150, 73-80 (2004).
3. GÉRARD AC., MANY MC., DAUMERIE C., COSTAGLIOLA S., MIOT F., DEVIJLDER JJ., COLIN IM., DENEFF JF., *Structural changes in the angiofollicular units between active and hypofunctioning follicles align with differences in the epithelial expression of newly discovered proteins involved in iodine transport and organification*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 87, 1291-1299 (2002).
4. GÉRARD AC., DENEFF JF., MANY MC., GATHY P., DE BURBURE C., VAN DEN HOVE MF., COPPÉE F., LEDENT C., COLIN IM., *Relationships between cell division, expression of growth factors and microcirculation in the thyroids of Tg-A2aR transgenic mice and patients with Graves' disease*, J. Endocrinol., 177, 269-277 (2003).
5. GÉRARD AC., PONCIN S., AUDINOT JN., DENEFF JF., COLIN IM., *Iodide deficiency-induced angiogenic stimulus in the thyroid occurs via HIF- and ROS-dependent VEGF-A secretion from thyrocytes*, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 296, E1414-1422 (2009).
6. GÉRARD AC., PONCIN S., CAETANO B., SONVEAUX P., AUDINOT JN., FERON O., COLIN IM., SONCIN F., *Iodine deficiency induces a thyroid stimulating hormone-independent early phase of microvascular reshaping in the thyroid*, Am. J. Pathol., 172, 748-760 (2008).
7. GÉRARD AC., XHENSEVAL V., COLIN IM., MANY MC., DENEFF JF., *Evidence for co-ordinated changes between vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase III immunoreactivity, the functional status of the thyroid follicles, and the microvascular bed during chronic stimulation by low iodine and propylthiouracyl in old mice*, Eur. J. Endocrinol., 142, 651-660 (2000).
8. MEDVEI VC., *The history of clinical endocrinology. A comprehensive account of endocrinology from earliest times to the present day*. New York, The Parthenon Publishing Group, (1993), 551p
9. PONCIN S., COLIN IM., DECALLONNE B., CLINCKSPOOR I., MANY M-C., DENEFF J-F., GÉRARD AC., *N-acetylcysteine and 15 deoxy-^{Δ12,14}-prostaglandin J2 exert a protective effect against autoimmune thyroid destruction in vivo, but not against IL-1α/IFNγ-induced inhibitory effects in thyrocytes in vitro*, Am. J. Pathol., in press, (2010).
10. PONCIN S., COLIN IM., GÉRARD AC., *Minimal oxidative load: a prerequisite for thyroid cell function*, J. Endocrinol., 201, 161-167 (2009).
11. PONCIN S., GÉRARD AC., BOUCQUEY M., SENOU M., CALDERON PB., KNOOPS B., LENGÉLÉ B., MANY MC., COLIN IM., *Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content*, Endocrinology., 149, 424-433 (2008).

12. PONCIN S., VAN ECKOUDT S., HUMBLET K., COLIN IM., GÉRARD AC., *Oxidative stress: a required condition for thyroid cell proliferation*, Am. J. Pathol., 176, 1355-1363 (2010).
13. SENOU M., COSTA MJ., MASSART C., THIMMESCH M., KHALIFA C., PONCIN S., BOUCQUEY M., GÉRARD AC., AUDINOT JN., DESSY C., RUF J., FERON O., DEVUYST O., GUIOT Y., DUMONT JE., VAN SANDE J., MANY MC., *Role of caveolin-1 in thyroid phenotype, cell homeostasis, and hormone synthesis: in vivo study of caveolin-1 knockout mice*, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 297, E438-51 (2009).
14. SENOU M., KHALIFA C., THIMMESCH M., JOURET F., DEVUYST O., COL V., AUDINOT JN., LIPNIK P., MORENO JC., VAN SANDE J., DUMONT JE., MANY MC., COLIN IM., GÉRARD AC., *A coherent organization of differentiation proteins is required to maintain an appropriate thyroid function in the Pendred thyroid*, J. Clin. Endocrinol. Metab., in press (2010).
15. SONG Y., RUF J., LOTHAIRE P., DEQUANTER D., ANDRY G., WILLEMSE E., DUMONT JE., VAN SANDE J., DE DEKEN X., *Association of Duoxes with Thyroid Peroxidase and Its Regulation in Thyrocytes*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 95, 375-82 (2010).
16. VISSER TJ., *The elemental importance of sufficient iodine intake: a trace is not enough*, Endocrinology, 147, 2095-2097 (2006).
(Laboratoire de Morphologie Expérimentale, UCL Faculté de Médecine, Université catholique de Louvain.)

*
* *

Discussion

M. O. Devuyt. – Que sait-on des mécanismes moléculaires et du rôle de l'endocytose dans le fonctionnement de la glande thyroïde ?

La souris est caractérisée par une activité métabolique très élevée par rapport à l'homme et sa fonction thyroïdienne reflète sans doute cette différence. Les modèles murins sont-ils de bons motifs pour la thyroïde humaine ? Le niveau d'activité métabolique de la glande va-t-il influencer l'expression des systèmes de transport au niveau du thyrocyte ?

M. I.M. Colin. – L'étude des mécanismes d'endocytose dans le thyrocyte est assez ancienne. Elle est certainement moins active que celle relative à l'endocytose dans les cellules du tube proximal du rein. Les derniers papiers sur le sujet (ils datent de 2003) concernent la découverte de la mégaline qui est impliquée dans la transcytose de la thyroglobuline faiblement iodée. La thyroglobuline est résorbée dans le thyrocyte au niveau apical, essentiellement par micropinocytose. Lorsque la glande est stimulée par la TSH ou des anticorps stimulant son récepteur, comme dans la maladie de Basedow, la thyroglobuline est endocytée par macropinocytose, médiée par la formation de pseudopodes. C'est un phénomène qui a été étudié surtout dans des modèles murins et il est fort probable que la situation soit sensiblement différente chez l'homme dont l'activité métabolique est moins marquée.

Dans cet exposé, j'ai essayé d'attirer l'attention sur un concept nouveau, celui du thyroxisome qui serait l'unité biochimique de synthèse des hormones thyroïdiennes. Dans ce cadre, ce sont les cavéolines (en particulier la cavéoline 1) qui seraient ici déterminantes dans la construction moléculaire de ce complexe.

Dans nos expériences, nous avons toujours confronté à l'homme (avec la relative difficulté d'obtenir des fragments de thyroïdes humaines) nos résultats obtenus à partir de lignées cellulaires ou de modèles murins, afin d'éliminer le biais d'une extrapolation à l'homme de résultats issus de modèles qui en seraient éloignés. Il s'agit d'une préoccupation permanente.

M. L. Hue. – Pourriez-vous commenter l'origine des ROS? Est-elle mitochondriale, membranaire, ou autre ?

M. I.M. Colin. – Il s'agit là d'une question intéressante à laquelle nous tentons de répondre actuellement. Il est clair que les sources cellulaires des ROS sont multiples. En particulier, les NADPH oxydases transmembranaires de type NOX sont par définition actives dans le thyrocyte puisque le système DUOX1, 2/NOX intervient dans la génération du peroxyde d'hydrogène, indispensable à la synthèse des hormones thyroïdiennes. On vient de montrer (un papier publié par Weyemi et al. cette année) que NOX-4 est présente dans les thyrocytes en intracytoplasmique, où elle pourrait influencer la prolifération des cellules via les ROS qu'elle génère. D'autres origines sont possibles comme les mitochondries, les peroxisomes, le réticulum endoplasmique (qui est particulièrement développé dans le thyrocyte), et même le noyau. La situation est particulièrement complexe dans le thyrocyte, puisqu'il faut inclure dans les ROS, l'oxyde nitrique (le NO) qui est synthétisé par plusieurs isoformes de NO synthase (en particulier NOS 1 et 3), en fonction de la situation physiopathologique en question. Nos résultats préliminaires indiquent que les mitochondries ne seraient pas une source importante de ROS (en tout cas dans les modèles de thyroïdite induite par les cytokines Th1), au contraire du RER. Mais il s'agit là de résultats très préliminaires qui doivent être confirmés.

M. M. Lamy. – Ma question est proche de celle de notre Président. Vous avez bien montré le rôle métabolique des ROS ("Reactive oxygen species) au sein des cellules thyroïdiennes normales. Vous avez aussi démontré leur importance pour la croissance de la glande thyroïde. Connaît-on la nature chimique des ROS impliqués dans ces deux fonctions? La résonance paramagnétique électronique, par exemple, est-elle utilisée?

Je confirme, comme l'a souligné le Président, le rôle important des ROS au sein des cellules de notre organisme, notamment dans la signalisation.

M. I.M. Colin. – Cette question est pertinente et elle retient aussi notre attention. Des expériences par « Electron Spin Resonance » sont actuellement en cours, en collaboration avec le professeur B. Gallez de l'unité de pharmacologie expérimentale de l'UCL.

Outre le peroxyde d'hydrogène, il est vraisemblable que des ROS de nature diverse soient produites (anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxydites, iodocompounds, etc...). Leur nature doit certainement varier en fonction, de nouveau, de la situation physiopathologique en question. Certaines ROS sont indispensables au bon fonctionnement du thyrocyte et à sa prolifération. Nos expériences le démontrent ; le potentiel redox des thyrocytes intervient de façon déterminante dans le fonctionnement

de ces cellules. Cependant, comme indiqué dans le texte qui accompagne cet exposé, les ROS dans la glande thyroïde, ce peut être « the best », mais aussi « the worst ». Tout dépend de la quantité, mais plus encore de la nature et de la localisation (intra ou extracellulaire) de production. La capacité des thyrocytes à détoxifier les ROS produites en excès est très importante, presque dans le même ordre de grandeur que les cellules inflammatoires. A la différence que la durée de vie des thyrocytes est particulièrement longue (on parle de plus de huit ans). C'est ce qui différencie aussi le thyrocyte de la cellule bêta du pancréas qui résiste nettement moins bien aux attaques radicalaires, en particulier à l'oxyde nitrique dont on sait qu'il est un des éléments physiopathologiques déterminants pour ce qui est du diabète de type 1. Cette capacité anti-oxydante n'est pas très étonnante quand on se rend compte que le fonctionnement du thyrocyte repose sur la synthèse d'une substance particulièrement toxique, le peroxyde d'hydrogène auquel il serait impossible de résister sans un système de détoxification efficace et un confinement au niveau du pôle apical, dans cette enceinte hermétique que représente le thyroxisome.

Les capacités de résistance du thyrocytes sont dépassées au moins dans deux situations que nous avons beaucoup étudiées : la toxicité induite par l'iode administré à des animaux goitreux et les thyroïdites induites par les cytokines pro-inflammatoires de type Th1. Dans ce cas, les ROS proviennent de l'extérieur, des cellules inflammatoires, mais les capacités de réparation des thyrocytes sont remarquables puisque la thyroïde parvient toujours à cicatriser, sauf dans des modèles auto-immuns où le processus inflammatoire se perpétue à cause de l'induction des lymphocytes T, un phénomène pathologique qui se termine, le cas échéant, pas la destruction de l'organe, avec comme corollaire, une hypothyroïdie biologique.

*
* *

II

H2O2, SIGNAL, SUBSTRATE, MUTAGEN AND CHEMOREPELLENT FROM PHYSIOLOGY TO BIOCHEMISTRY AND DISEASE

par

J.E. DUMONT (U.L.B.) membre honoraire, et coll. (*)

H2O2 is mainly produced in cells by two mechanisms: specific enzymes, the NADPH oxidases, NOXES and by dismutation of O₂⁻ mitochondrial by product by superoxide dismutase. Depending on its concentration and location it plays the role of an intracellular signal, of an oxidizing metabolite (eg. as cosubstrate of iodide in the oxidation of iodide by the thyroperoxidase of the thyrocyte) or as an extracellular signal, eg. for bacteria. It is also a damaging metabolite oxidizing proteins, DNA etc. The cells are protected against H2O2 by reducing glutathione peroxidase using GSH as a cosubstrate, peroxiredoxin, which then oxidizes thioredoxin and catalase. Oxidized glutathione and thioredoxin are reduced respectively by glutathione and thioredoxin reductase, which themselves use NADPH₂, generated from NADP by the pentose phosphate pathway. At high level H2O2 causes oxidative DNA damage and cell necrosis. As a consequence of these properties H2O2 has been related to several pathologies, for the thyroid: congenital metabolic hypothyroidism myxedematous endemic cretinism and thyroid carcinomas.

Our story with H2O2 and thyroid starts with the discovery in the 1960s of a stimulation by TSH of the hexose monophosphate pathway in thyroid cell (J.E. Dumont, & T. Tondeur-Montenez, *Biochim. Biophys. Acta* 111, 258-272, 1965). A similar effect was obtained by others at the same time in leukocytes after the phagocytosis of bacteria and in oocytes after fertilization. To explain this activation we related it to the NADPH₂ oxidation accompanying the oxidation of iodide for thyroid hormone synthesis at the apex of the thyrocyte. This oxidation required the generation of H2O2 by an unknown H2O2 generating systems using NADPH₂ as coenzyme. We also postulated that the toxic H2O2 spilling over in the cell could be reduced by the known enzyme glutathione peroxidase; the resulting oxidized glutathione being reduced by glutathione reductase and NADPH₂. This proposed scheme was fully validated 30 years later. It suggested the requirement for a strong H2O2 detoxification system in the thyrocyte.

The recent demonstration of a remarkably high expression of the mRNAs of all the H2O2 detoxifying enzymes in the thyroid confirms this. Later work in thyroid cells showed that their production of H2O2 under TSH stimulation was equal to the production by activated polynuclear leukocytes. The latter lives a few hours while the human thyroid cell lives an average of seven years. Similarly we have shown that human lymphocytes are 100 times more sensitive to oncogenous H2O2 than thyrocytes.

(*) MM. X. De Deken, F. Miot, V. Corvilain, B. Contempré, R. Goyens, C. Massart, J. Van Sande, A. Allaoui et A. Botteaux.

On the clinical point of view this led us to an hypothesis about the physiopathology of myxedematous endemic cretinism. As it is well known since De Quervain work in Switzerland, endemic iodine deficiency leads to both goiter and cretinism. Cretinism is defined as the mental deficiency of the hypothyroid, or severely iodine deficient individual. The two types endemic cretinism have been defined : myxoedematous endemic cretinism, characterized by hypothyroidism mental deficiency, and nanism and nervous endemic cretinism in which only mental deficiency is observed. We showed that the first type was due to foetal and postnatal hypothyroidism with thyroid aplasia. Others showed that the second form is due to maternal thyroid hormone deficiency early in pregnancy. Both forms may coexist. Examination of the only myxedematous cretins thyroid obtained at autopsy revealed a very fibrotic tissue with scarce dispersed follicles which confirms the scintigraphies realized by F. Delange and our data on radioiodine kinetics. This suggested an inflammatory process but these patients had no serum antithyroid antibodies.

In 1970 a geographical map of the prevalence of goiter and endemic cretinism in the island of Idjwi was published. I was surprized by the similarity of this map with a geological map that I had seen previously. This suggested the possibility of a role of an oligoelement present in the soil and food.

These were rough times in the Congo, but a young postgraduate MD accepted to investigate oligoelements levels in the serum of Idjwi inhabitants. While Ca^{++} and Zn^{++} were normal, Se was decreased in the goiter cretinism region of the North but not in the almost normal population in the South. Also the serum concentration of Se dependent enzyme GSH peroxidase was also decreased in Northern inhabitants. This clearly suggested a lower capacity of H_2O_2 degradation in the thyroid. A plausible scenario was therefore proposed: submitted to severe iodine deficiency and to increased thiocyanate exposure (a competitor of iodide uptake) exposure (due to manioc ingestion), the thyroid was intensively stimulated, which caused high H_2O_2 generation that could not be mitigated by sufficient H_2O_2 degradation. As these were correlations but not proofs of the hypothesis, this was difficult to publish. Ten years thereafter in collaboration with M.C. Many and J.C. Denef at the University of Louvain, we reproduced experimentally the thyroid failure in rats exposed to the combination of iodine and selenium deficiencies and thiocyanate excess. Incidentally this study led to the discovery of a wide zone of selenium deficiency in Africa. The concept of a pathogenic role of H_2O_2 in the thyroid is now being pursued as a mechanism of thyrocyte destruction in thyroiditis.

Besides its cell toxicity role, H_2O_2 is also a strong oxidant of nucleic acids and therefore a mutagenic agent and a potential carcinogen. Chronic exposure to physiological H_2O_2 of the thyrocyte could therefore explain the high incidence of "nodules" i.e. mostly benign tumours, but also of carcinoma of the thyroid. Over the age of 60, one woman out of two has thyroid nodules. Besides its mutagenic role H_2O_2 also might enhance cell proliferation by inhibiting protein tyrosine phosphates dephosphorylation. This H_2O_2 hypothesis was followed in two directions: 1) the demonstration of DNA damaging

effect of H₂O₂ in thyrocytes; 2) the demonstration of an “H₂O₂ syndrome” in thyroid cancers. The first approach pursued essentially using the Comet assay demonstrated the ability of H₂O₂ to induce DNA single strand breaks and their very rapid repair in thyrocytes. Others demonstrated a pattern of oxidative DNA damage in normal thyroid and an overrepresentation of oxidative mutations in the activating mutations of the TSH receptor. It therefore makes sense to search for an “oxidative” gene expression signature in Western thyroid cancers vs an “radiation” signature in Chernobyl induced cancers (V. Detours). Preliminary results in this direction are now investigated on large cohort of Chernobyl cancers developed after I¹³¹ irradiation and in patients born after the nuclear accident.

In the late nineties, our group, which had cloned most of the thyroid specific genes decided to try to identify the H₂O₂ generating system. The main biological characteristics of the system, its dependence on Ca⁺⁺, its membrane localization etc.. were known. Two groups tackled the problem, the group of C. Dupuy in Villejuif purified the enzyme and used the part of the aminoacid sequence that they determined as a starting point. They succeeded in cloning part of one enzyme (later called DUOX2). We cloned by analogy with the already known NOX2 (the H₂O₂ generating system of leukocytes) using for our screening RNA from pure human thyrocytes in primary cultures. We succeeded to clone 2 mRNA of 2 enzymes (called DUOX1 and DUOX2).

The structure of the proposed DUOXes indeed included the hallmarks of the NOXes with their NADPH₂, flavin and heme sites, two EF hands accounting for the sensitivity of the system to Ca⁺⁺ and a N terminal with a surprising homology with thyroperoxidase, i.e. the enzyme using the H₂O₂ produced by DUOX.

To demonstrate their role the DUOXes then were expressed in COS cells, but did not generate H₂O₂. For this we had to wait for the discovery by Grassberger of the DUOX A1 and A2 genes coding for proteins involved in the correct folding of the protein and its transport of the proteins to the apical membrane of the cell. When coexpressed DUOX1 and DUOX A1 and DUOX A2 and DUOX2 respectively generated H₂O₂. This allowed the comparison of the system regulation in pig thyroid slices PCC13 a rat thyroid cell line, and CHO expressing the DUOXes, CHOD1 and CHOD2 to ascertain which controls are inherent to the enzyme and which depend on the whole system. Interestingly DUOXes like the other NOXes operate as vectorial systems using cytoplasmic NADPH₂ to generate H₂O₂ outside the cells. This cloning allowed to identify congenital defects in iodination due to inactivation of DUOX2 but strangely enough not DUOX1. The role of DUOX1 in the human thyroid cell therefore remains a mystery.

Biochemical experiments showed that DUOXes and TPO coimmunoprecipitate, suggesting the existence of a supramolecular apical membrane complex, that we called the thyroxysome. Such a complex certainly optimizes the efficiency of thyroid hormone synthesis. The biochemistry of DUOX function and regulation have been defined. Interestingly while TPO is mostly controlled at the transcription level, DUOXes are mostly controlled at the enzyme level by Ca⁺⁺ binding and phosphorylation.

The vectorial nature of H₂O₂ generation is indicated by DUOX structure and also by the fact that thyroid cells do not oxidize iodide in the cell unless provided with exogenous H₂O₂. This is also in keeping with the fact that another NOX (NOX) is present in these cells and that the cell is the best protected by reducing enzymes in the tumour organism. Other NOXes are oriented similarly to the DUOXes with cytoplasmic access to NADPH₂, flavin and Ca⁺⁺. A role of H₂O₂ in intracellular signalling has been proposed. In particular the inactivation by H₂O₂ oxidation of tyrosine phosphatase would be the complementary amplifying mechanism of the activation by growth factors of their receptor tyrosine kinase. This raises the question of how does this fit in with a vectorial generation of H₂O₂ outside the cell.

One of the surprises arising from the cloning of the DUOXes was the discovery of the high expression of DUOXes in mucosae, in particular of DUOX1 in the aerial mucosae and of DUOX1 in the intestinal mucosae. Reasoning on the basis of the leukocyte model, researchers in the field, assumed a bacterial killing role of this H₂O₂.

This seemed to us improbable considering the dilution and reduction of this H₂O₂ in the open lumina. We therefore postulated another role: chemorepulsion of bacteria. This was indeed observed. Moreover bacterial invasion of cells producing H₂O₂ was reduced. This opens a new view in our symbiosis with the bacterial world. It needs to be extended to other bacterial species.

In conclusion, the study of H₂O₂ generation by thyroid cells has opened interesting fields on thyroid cell biology and diseases and in unforeseen areas such as our interaction with the bacterial world.

RÉSUMÉ

L'histoire de l'étude de la génération du rôle et des effets de l'H₂O₂ dans la thyroïde, du point de vue de notre groupe de recherche, est résumée. Les relations avec des pathologies thyroïdiennes, tels le crétinisme myxoedémateux, la thyroïdite, le cancer de la thyroïde et l'hypothyroïdie congénitale, sont discutées. Un rôle nouveau de l'H₂O₂ dans la chimiorépulsion des bactéries est proposé.

SUMMARY

The history of the study by our group of the generation, the role and the effects of H₂O₂ in the thyroid, is summarized. The relations with thyroid diseases are discussed: myxedematous cretinism, thyroiditis, thyroid cancer, congenital hypothyroidism, are discussed. A new role of H₂O₂ in the chemorepulsion of bacteria is proposed.

*(IRIBHM and Laboratory of Microbiology,
School of Medicine, University of Brussels.)*

*
* * *

Discussion

M. Th. Godfraind. – Merci pour ce fascinant exposé sur l'évolution de la mise en évidence de la production tissulaire de H₂O₂ et de l'action physiologique et pathologique de ce dernier. Vous proposez que son action protectrice de l'hôte vis-à-vis de l'infection microbienne résulte d'un effet chimiorépulsif bactérien mis en évidence in vitro. Par quel mécanisme pourrait opérer cette répulsion ?

M. J.E. Dumont. – A ma connaissance, il est inconnu. Toutefois on sait que les bactéries disposent de toute une série de senseurs, par exemple des bactéries marines ont des « senseurs » de O₂ qui permettent de se localiser à la pO₂ optimale. Il faut noter que ce travail est une « proof of concept » mais qu'il doit être étendu à d'autres bactéries et d'autres composés notamment des molécules oxydées par l'H₂O₂.

M. E. Van Schaftingen. – Est-ce que le modèle de souris knockout de Duox1 est viable ?

M. J.E. Dumont. – Oui et il n'a pas de phénotype « marqué ».

M. J.-L. Balligand. – Est-ce que les membranes sont totalement imperméables à l'H₂O₂ ?

S'il y a une perméabilité, est-ce que ceci ne doit pas mettre l'accent sur la co-localisation des NOX et de la catalase comme paramètre important de la compartimentalisation de la signalisation par H₂O₂ ?

M. J.E. Dumont. – C'est une question importante. Il est accepté que les membranes sont perméables à l'eau et par extension à l'eau oxygénée. Toutefois l'existence et l'importance des aquaporines montrent que cette perméabilité supposée est très insuffisante pour répondre aux contraintes de la physiologie, dans le rein par exemple. Par ailleurs la composition en acides gras des phospholipides membranaires module cette perméabilité ; les acides gras saturés réduisant cette perméabilité. D'autre part les cellules disposent d'importants systèmes de réduction de l'H₂O₂ dans le cytosol (glutathionperoxydase, peroxyredoxine) et les peroxysomes (catalase). Il est donc probable que le rôle de l'H₂O₂ comme inhibiteur des tyrosines phosphatase et amplificateur de l'action des récepteurs de facteurs de croissance et leurs activités tyrosine kinase requiert un dispositif compartimentalisé. L'exemple qui vient à l'esprit est celui des complexes AKAP qui figurent dans un ensemble supramoléculaire, adénylate cyclase, protéine kinase cAMP dépendante et phosphodiesterase.

*

* *

Prolongation du mandat du Secrétaire perpétuel

Le Président annonce ensuite les résultats du vote qui ramène une majorité de 97,5 % en faveur de la prolongation du mandat du Secrétaire perpétuel pour une durée d'un an. De ce fait, le Prof. J. Frühling, actuel Secrétaire perpétuel de notre Compagnie, assurera cette fonction jusqu'au 30 septembre 2011. De vifs applaudissements lui sont faits par l'Assemblée.

*
* *

Communications du Bureau et correspondance

Aux communications du Bureau, le Secrétaire perpétuel annonce, de la part du Prof. Danielle Swinne, Secrétaire perpétuelle de l'Académie royale des Sciences d'Outre-Mer, qu'une journée d'études intitulée : « Fonds Médical Tropical : un demi-siècle d'Assistance Médicale. Passé et Avenir de la Coopération Médicale Belge en Afrique Centrale » se tiendra le vendredi 11 juin 2010 à l'A.R.S.O.M.

Il tient à remercier ensuite vivement la Compagnie pour la reconduction de douze mois de son mandat de Secrétaire perpétuel.

*
* *

Présentation d'ouvrage

La parole est ensuite donnée à M. le Prof. S. Louryan pour la présentation d'un ouvrage intitulé : « Neuro-imagerie de l'enfant », sous la direction de Stéphane Louryan et Marc Lemort (Montpellier, 2009, Sauramps Médical). Il s'exprime en ces termes : « La neuro-imagerie pédiatrique passe pour une discipline complexe et difficile. Cependant, il est nécessaire qu'elle soit enseignée, ne fût-ce que pour assurer la continuité de l'expertise. Et aussi pour permettre aux praticiens plus généraux de faire face à des situations qui peuvent survenir dans n'importe quel service d'imagerie, pourvu qu'il soit équipé à cet effet.

C'est là la justification du présent ouvrage, qui se présente comme la transcription fidèle du 21^e cours du Pont d'Oye, organisé à Habay-la-Neuve (Belgique) sous l'égide du Collège d'Enseignement post-universitaire de Radiologie, fondé jadis par notre confrère le Prof. L. Jeanmart. Tous les textes sont issus de membres de l'école d'imagerie de l'Université Libre de Bruxelles.

L'ouvrage aborde le développement normal, les malformations, les maladies métaboliques, l'épilepsie, les tumeurs, et aussi la problématique des enfants battus et l'infirmité motrice cérébrale. Il est richement illustré et contient quelques planches en couleurs.

Comme à l'accoutumée, l'abord est pluridisciplinaire. Imageurs et prescripteurs ont dialogué pour aboutir à une synthèse certes forcément incomplète, mais qui constituera pour certains une introduction que nous espérons constituer pour les lecteurs une incitation à approfondir cette discipline ».

*
* *

La discussion de l'avis de la Commission *ad hoc* au sujet des compétences des Sages-femmes en échographie a été retirée de l'ordre du jour. En dernière minute, les avis de plusieurs membres des deux Académies étaient à ce sujet trop divergents pour être déjà soumis à l'approbation de la Compagnie.

*
* *

Dépôt de rapport

Le Président donne ensuite la parole au Prof. Ch. van Ypersele, Président de la Commission de l'« Art de guérir - Article 49bis » qui expose le dossier d'un médecin étranger.

Rapport de la commission de l'Académie, dite 49 bis, concernant Madame le Docteur Kianda Nendaka Mireille.

La Commission de l'Académie, dite 49bis, s'est réunie le 11 février 2009 pour entendre Madame le Docteur Kianda Nendaka Mireille qui sollicite l'autorisation d'exercer l'art de guérir en Belgique de façon permanente.

Etaient présents MM. les Professeurs J.-M. Boeynaems, T. Godfraind, S. Louryan, G. Rorive, A. Scheen et Ch. van Ypersele, Président.

Le Dr Kianda Mireille est née à Kinshasa (RDC) le 31 octobre 1963. Elle réside en Belgique depuis le 1 octobre 2001 de même que ses quatre enfants âgés de 18, 15, 13 et 11 ans en février 2009. Le plus jeune est atteint de troubles du développement pour lesquels il est suivi aux Cliniques Universitaires St- Luc et en milieu scolaire spécial.

Elle est Docteur en médecine (Kinshasa, RDC) depuis 1987. Depuis son arrivée en Belgique, elle se forme en médecine interne à l'hôpital Bracops et le CH César De Paepe (2001-2002 et 2004-2005), à l'Université de Lille (2002-2004) puis en néphrologie à l'Hôpital Erasme (2005-2007). Elle obtient à l'U.L.B. un DES en médecine interne.

En 2008, elle obtient l'équivalence de son diplôme congolais de médecin après avoir fait des stages complémentaires et passé les examens requis par la commission d'équivalence.

Elle est le premier auteur d'une étude acceptée pour publication par Clinical Transplantation le 5 mai 2010, intitulée « Inegibility for renal transplantation: prevalence, causes and survival in a consecutive cohort of 445 patients ».

Tout au long de sa formation, le Docteur Kianda a fait la preuve de qualités cliniques, scientifiques et humaines attestées par ses différents maîtres de stage. La Commission de l'Académie partage cette impression très favorable.

La candidate n'est ni réfugiée politique ni une scientifique d'exception retenue pour faire partie du Corps académique de la Faculté de Médecine d'une Université belge. Elle ne demande pas une autorisation temporaire de pratiquer l'art de guérir. Néanmoins son souci de permettre à son fils Ciriaque Tshimanga Budimu, né le 6 mai 1997, de bénéficier d'un suivi et d'un encadrement scolaire spécial qui porte déjà du fruit, a impressionné la Commission. Ce fait, joint à ses qualités humaines et médicales évidentes, amène la Commission à proposer à l'Académie, à l'unanimité de ses membres et à titre exceptionnel, l'autorisation pour le Docteur Kianda de pratiquer en Belgique l'art de guérir, sans limite de temps.

*

* *

Séance publique du 19 juin 2010

SÉANCE PUBLIQUE DU 19 JUIN 2010

Au Bureau : M. L. Hue, Président ; MM. J. Frühling, Secrétaire perpétuel, P.-P. Pastoret et W.J. Malaisse, premier et second vice-présidents.

Sont présents :

MM. H. Firket, C. Heusghem, A. André, T. Godfraind, P.-J. Kestens, J.-C. Demanet, J. van der Stricht, M. Abramow, J.E. Dumont, Ch. van Ypersele de Strihou, P. Lefèbvre, A. Dresse, membres honoraires ;

MM. J. Brotchi, J.-B. Otte, M. Wéry, R. Lauwerys, G. Rousseau, Th. de Barys, J. Fissette, M^{me} J.-A. Stiennon-Heuson, MM. G. Rorive, E. Pays, L. Delattre, B. Van den Eynde, Y. Pirson, P. Van Canghai, R. Kramp, J.D. Born, A. Ferrant, J. Nève, M^{me} F. Meunier, membres titulaires ;

MM. E. Van Schaftingen, J.-P. Dehaye, D. Lison, Y. Carlier, A. Albert, O. Devuyst, B. Lengelé, F. Lemaigre, J.-C. Renauld, membres ordinaires.

MM. R. Görtz, E.H. Betz, J. Bonnal, L. Molle, C. Heusghem, P. Dumont, M. Lechat, membres honoraires ; L. Angenot, G. Moonen, U. Gaspard, J. Boniver, M^{me} F. Portaels, M. J. Melin, membres titulaires ; J. Crommen, F. Houssiau, S. Louryan, E. Sokal, J.-C. Pector, J. Klustersky, Ch. Delloye, J. Donnez, G. Casimir, M. Hamoir, L. Willems, ont exprimé leurs regrets de ne pouvoir assister à la séance.

*

* *

ÉLOGE ACADÉMIQUE DU PROFESSEUR A. de SCOVILLE

par

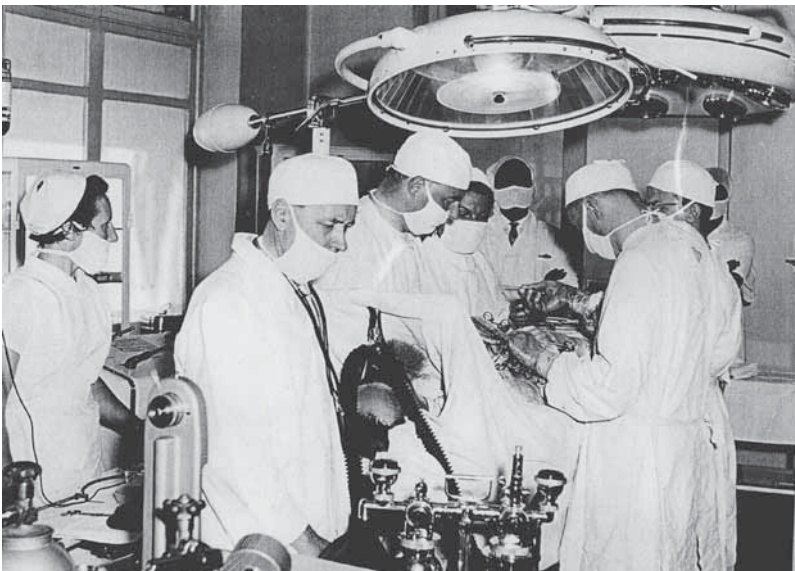
J. FRÜHLING, Secrétaire perpétuel et membre titulaire

Chère Madame de Scoville, chères Anne, Claude, Laetitia et autres membres de la famille, chers Collègues, Monsieur le Secrétaire perpétuel, Mesdames, Mesdemoiselles, Messieurs,

Nous sommes réunis pour rendre hommage au Baron Professeur Albert de Scoville, qui vient de nous quitter après un long parcours professionnel de près de soixante ans comme Docteur en Médecine et qui fut, pendant trente ans (1974-2004), Secrétaire perpétuel de l'Académie royale de Médecine de Belgique, fondée en 1841 et à laquelle il s'est identifié pendant ses longues années de titulariat de cette fonction.

Vu sa maladie chronique de longue date, son passage le 18 mars 2010 vers la sphère de l'existence éternelle ne fut pas surprenant, mais, même dans ces conditions psychologiques d'une longue attente, lorsque l'Hadès est franchi, on se rend compte que c'est le pas définitif et qu'il n'y a pas de retour. Nous commençons dès lors à nous rendre compte que nous avons perdu définitivement une personnalité exceptionnelle qui servira pendant des générations d'exemple pour ceux et celles qui veulent, dans l'avenir, épouser une carrière académique dans le sens le plus noble de ce mot.

Depuis sa prestation de serment d'Hippocrate, il est resté fidèle à sa vocation choisie, que ce soit dans le monde universitaire belge ou dans des conditions beaucoup plus primaires, dans l'ancien Congo belge.



Salle d'opération à Elisabethville – Albert de Scoville à l'avant-plan à droite

Il fut pendant toute sa carrière l'expression de la belgitude traditionnelle avec toutes ses caractéristiques positives. Il est resté loyal à la Belgique unitaire, à la Famille royale et à la culture française, tout en étant au service de ses étudiants et, plus tard, pendant trois décennies, au service de l'Académie royale de Médecine de Belgique.

C'était un homme fidèle à ses principes, loyal, dévoué et fondamentalement gentil dans le contexte humain, aussi bien avec ses aînés qu'avec ses cadets. Il a saisi dans ses communications toujours la bonne parole pour être à la fois agréable et efficace, mais si c'était nécessaire, dans l'intérêt de sa profession ou de son Académie, il pouvait être décidé et combatif pour la « bonne cause ». Malgré sa position sociale élevée, comme les vraies grandes figures, il a toujours su rester modeste.

Pendant sa vie et sa fonction académique, la médecine a fait des progrès inimaginables auparavant. Ainsi lorsqu'il est né en 1922, Best et Banting venaient de recevoir leur prix Nobel pour la découverte de l'insuline, première *landmark* de la future *evidence-based medicine*. Par ailleurs, trois ans auparavant, le même prix Nobel est revenu au Professeur J. Bordet, déjà un membre titulaire de notre Académie royale de Médecine de Belgique et dont la distinction était la reconnaissance implicite de la Belgique d'Albert 1^{er}, deuxième puissance économique au monde jusqu'en 1914 et pays résistant héroïque pendant la guerre 14-18.

C'est en 1934 que le jeune Albert de Scoville entame ses études secondaires, quasiment au moment de la disparition d'Albert 1^{er}, et du début hélas d'un lent déclin du rôle primordial de la Belgique sur l'échiquier européen et mondial.

La troisième date charnière est celle des débuts des études de Médecine du futur Docteur Albert de Scoville en 1939, coïncidant avec le déclenchement de la seconde guerre mondiale. Pour illustrer cette période tragique et mouvementée dans la vie de chacun, retenons, parmi les nombreuses distinctions honorifiques que recevra plus tard Monsieur de Scoville, la « Médaille de résistant » comme témoignage de son comportement civique et le fait qu'en 1945, il fit partie de la délégation des



Camp des médecins belges à Bergen-Belsen – 1945
Albert de Scoville à gauche.

étudiants belges pour examiner les crimes commis par le régime nazi dans le camp de concentration de Bergen-Belsen.

Albert de Scoville a reçu ensuite son diplôme de Docteur en Médecine le 24 juillet 1946 à l'Université de l'Etat à Liège, complété par un diplôme de Médecine hygiéniste en 1951 à l'Université de Liège, et par un diplôme de Médecine tropicale délivré en 1959 à l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers.

Pendant sa formation, il fut attaché succesivement – toujours à Liège – au Service d'Anatomie pathologique du Professeur J. Firket et à la Clinique chirurgicale des Professeurs Christophe et Orban. Enfin, il fut Chef de travaux de pathologie chirurgicale de 1955 à 1959. Toujours dans le cadre de sa formation, il a passé en 1957/58 huit mois comme « Research Fellow in Surgery » et assistant à la Harvard Medical School et au Peter Bent Bingham Hospital (Boston – USA).

Entre 1959 et 1969, il a rempli les fonctions suivantes à l'Université d'Elisabethville, plus tard Université de Lubumbashi (Congo belge puis République démocratique du Congo) :

- Chargé de cours de clinique chirurgicale et de pathologie chirurgicale générale à l'Université officielle du Congo belge et du Rwanda-Burundi ;

- Professeur ordinaire de clinique et de pathologie chirurgicales à l'Université d'Elisabethville ;

- extension d'attributions avec l'enseignement de la « Pathologie et thérapeutique chirurgicales spéciales » en 1960 ;

- extension d'attributions avec l'enseignement de « Théorie et pratique des opérations chirurgicales » en novembre 1964.

Après la reprise de ses fonctions de Chef de travaux à la Clinique chirurgicale en août 1968 à l'Université de Liège, il a été chargé successivement des enseignements suivants à la Faculté de Médecine de son Université :

- « Pathologie des affections chirurgicales tropicales » ;

- « Questions approfondies de pathologie tropicale spéciale » ;

- « Anatomie humaine topographique » et « Anatomie humaine systématique », comme Professeur ordinaire titulaire de la chaire d'Anatomie humaine topographique et de Splanchnologie.

En même temps, il fut responsable du service de Pathologie tropicale et des enseignements y afférents, tant au Centre d'études des pays en développement (CEDEV) qu'à la Faculté des Sciences appliquées de l'Université de Liège.

Comme dernière date symbolique, relevons l'année 1974. Après avoir été élu membre correspondant de notre Compagnie en 1969 et élevé au titulariat en 1972, le relativement

jeune Albert de Scoville est désigné, à l'âge de cinquante-deux ans, onzième Secrétaire perpétuel de l'Académie royale de Médecine de Belgique, comme successeur du Professeur A. Dalcq, qui a tenu les rennes de l'Institution de 1957 à 1973. L'année



Réception de S. M. la Reine Fabiola en tant que Membre d'Honneur – 1976

1974 est également celle où le prix Nobel de Médecine est partagé par deux Belges, Albert Claude et Christian de Duve, et l'Américain G. Palade, respectivement membre honoraire, membre titulaire et membre correspondant étranger de notre Compagnie à ce moment. Sa fonction de Secrétaire perpétuel a donc commencé avec la plus haute reconnaissance du niveau exceptionnel de la recherche biomédicale fondamentale belge et Albert de Scoville a su insuffler cet esprit et cette impulsion à son Institution pendant les trois décennies à venir, maintenant aussi bien du point de vue de la recherche scientifique que de celui de la médecine clinique, ce niveau d'excellence, ce qui est en soi le rôle des académies en général et d'une Académie des Sciences médicales en particulier.

A propos de son élection en 1974 comme Secrétaire perpétuel, permettez-moi de rappeler quelques phrases du Professeur Alb. de Scoville, qu'il a prononcées dans le cadre de son discours de prises de fonctions, comme son *credo* et *ars poetica*. Je le cite textuellement :

« Il me suffira, je le crois, de suivre la voie tracée par mon regretté prédécesseur. Comme lui, je m'efforcerai, notamment, d'entretenir les meilleurs rapports avec les six autres Académies royales, mais plus particulièrement, je mettrai tout en œuvre pour bien développer encore nos excellentes relations avec la "Koninklijke Academie voor Geneeskunde" ».



Albert de Scoville et Albert Lacquet, Secrétaire perpétuel de l'Académie-sœur néerlandophone, la « Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België » – 1978

« Je veillerai également à ce que notre Compagnie puisse continuer à entretenir les rapports les plus fructueux, non seulement avec nos Facultés de Médecine, mais aussi avec les grandes Fondations de la rue d'Egmont. »

« Je voudrais aussi développer, sous l'angle de la confraternité médicale, des contacts de plus en plus étroits avec d'autres organismes très importants, tels par exemple le Conseil de l'Ordre des Médecins. »

Puis Monsieur de Scoville a prononcé, dans le cadre du même discours, la phrase prophétique suivante qui a trouvé finalement sa réalisation trente-cinq ans plus tard lors du changement récent des Statuts de notre Compagnie : « Chacun sait que le qualificatif perpétuel ajouté à l'énoncé du titre lui-même de la charge veut bien préciser, sans aucune équivoque, une sorte de garantie absolue d'indépendance dont jouit le titulaire, garantie dont le législateur, dans sa sagesse, a voulu marquer la fonction, pour la préserver de toute pression ou ingérence extérieure, d'où qu'elle puisse venir. »

Au début de sa fonction, Alb. de Scoville a réinstallé l'Académie en 1976-1978 dans les locaux rénovés du Palais des Académies. Il a rétabli et continué le rituel immuable des séances de l'Académie, entrecoupé de séminaires et symposia de haut niveau, avec ses concours et ses prix permettant l'éclosion de plusieurs générations de futurs chercheurs. En 1991, en collaboration avec le Professeur Th. Godfraind, Président, et avec le Bureau de l'époque, il a organisé des festivités scientifiquement « somptueuses » pour les 150 ans d'existence de l'Académie royale de Médecine de Belgique.



Cérémonies du 150^e anniversaire de l'Académie royale de Médecine.

On reconnaît, entourant le Secrétaire perpétuel Albert de Scoville, à gauche André Govaerts, et à droite, Théophile Godfraind, Président de l'Académie de Médecine pour 1991, et Georges Sion, Secrétaire perpétuel de l'Académie royale de Langue et de Littérature françaises.

A cette occasion, il a reçu les grandes Personnalités de Belgique ainsi que les représentants académiques de plusieurs dizaines de pays du monde entier. D'une certaine manière, ce fut le sommet de son secrétariat perpétuel. Il a montré à cette occasion qu'il n'était pas seulement Secrétaire perpétuel, mais il a perpétué l'existence et l'œuvre de l'Académie royale de Médecine de Belgique.

Remarquons qu'entre-temps, suivant la longue série de réformes constitutionnelles, la Belgique a changé de structures et l'Académie royale de Médecine de Belgique, dépendait, depuis 1989, comme pouvoir organisateur, de la Communauté française. En 1991-1992, dans le contexte international, européen en particulier, il est cofondateur de la Fédération européenne des Académies de Médecine, dont la première langue officielle fut, pas par hasard, avec le Professeur de Scoville comme Secrétaire général, le français.

Sous son sceptre, l'Académie a continué son rôle d'organisme de conseil des différents gouvernements ou d'autres instances nombreuses qui se sont adressées à elle, et a rédigé et publié, bon an, mal an, plusieurs avis sur les questions fondamentales de la pratique médicale, de la santé publique ou de l'enseignement de notre Profession.

Toute cette activité fut orchestrée inlassablement par le Secrétaire perpétuel, grâce à son expérience et à sa culture médicale à très large spectre.

Figure connue et digne représentant des sciences biomédicales belges, il fut reçu partout par ses pairs internationaux avec amitié et respect. Relevons ainsi parmi les différentes distinctions sa qualité de :

- Membre associé de l'Académie royale des Sciences d'Outre-Mer ;
- Associé étranger de l'Académie nationale de Médecine de France ;
- Membre associé étranger de l'Académie de Chirurgie de Paris ;
- Membre honoraire de l'Académie royale de Médecine de Valence,
- Correspondant de l'Académie royale de Médecine de Barcelone,
- Correspondant de l'Académie des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Cordoba ;
- Correspondant de l'Académie nationale de Médecine de Buenos-Aires et

Membre de la Royal Society of Medicine (London) ainsi que de la New York Academy of Sciences.

*
* *

Le Bureau et les membres de l'Académie royale de Médecine de Belgique, ainsi que ses collaborateurs administratifs, certains depuis longue date, prennent congé aujourd'hui une dernière fois de cette figure exceptionnelle et en même temps tellement typique des qualités les plus positives d'une certaine Belgique, qui va survivre – je l'espère ardemment – aux résultats des dernières élections législatives.

A titre personnel, en tant que son successeur, je lui devais cet hommage qui n'est qu'un pâle reflet de la personnalité humaine et vivante d'Albert de Scoville, que j'ai connu dès le début de ma carrière de jeune Académicien, où je n'ai reçu de sa part que des gentilleses, des paroles aimables et des encouragements, sans savoir qu'un jour, par la volonté de mes pairs, j'aurais l'immense honneur de lui succéder.

Cet homme dévoué aux sciences, à la médecine et à son Académie possédait un havre où il pouvait toujours se retirer pour se ressourcer par l'amour et par le sens de la famille auprès de son épouse (fidèle compagne de route depuis 1948) puis de ses trois enfants et enfin de sa petite-fille Laetitia.



En cercle de famille
76^e anniversaire – 8 février 1998

Tous ceux qui, comme lui, ont fait une carrière semblable dans notre monde médical, savent qu'une famille solide comme un rocher est la base sur laquelle l'homme d'une vocation déterminée bâtera sa carrière avec toutes ses réalisations.

Chère Madame de Scoville, chers membres de la famille, permettez-moi encore une fois, au nom de toute la communauté constituée par les Académiciens et en mon nom personnel, d'exprimer toute notre sympathie et nos condoléances les plus sincères.

Mesdames, Mesdemoiselles, Messieurs, Chers Collègues,

Nous avons pris définitivement congé du Professeur Alb. de Scoville, Secrétaire perpétuel de notre Compagnie pendant trente ans. Si l'on veut résumer sa personnalité et ses mérites, je dois citer l'Autrichien F. Grillparzer, le plus grand, avec Goethe et Schiller, des auteurs dramatiques de la langue allemande du XIX^e siècle : « Er war ein treuer Diener seines Herren », en traduction libre adoptée : « Il a servi son Institution de la façon la plus dévouée, y consacrant toute son existence pendant trois décennies ». Pour conclure cet hommage, citons encore une fois Grillparzer : « Rentrons chez nous en gardant son souvenir : nous ne l'avons pas perdu, nous l'avons gagné pour l'éternité dans l'histoire de notre Académie ».

Merci Professeur Albert de Scoville – et merci pour votre attention.

*
* *

Lectures

I

WATER TRANSPORT ACROSS BIOLOGICAL MEMBRANES: OVERTON, WATER CHANNELS, AND PERITONEAL DIALYSIS

par

O. DEVUYST (U.C.L.), membre ordinaire

Overton and the concept of the lipid membrane

Between 1895 and 1899, Ernest Overton, who was then Dozent at the University of Zürich, presented the concept of the lipid membrane enclosing plant and animal cells that would set the landscape for a century of general cell physiology (2,5). The core of his concept was that the cell membrane is mostly constituted of lipidic material and that the permeation coefficient of a molecule across the membrane is directly proportional to its lipophilicity. The Overton's rule states that the permeability (P) of a molecule across the cell membrane can be expressed as follows:

$$P = \frac{KD}{Dx}$$

DX

where K is the partition coefficient between the oily and aqueous phases (i.e. the lipophilicity), D is the diffusion coefficient, and Dx is the thickness of the membrane.

Overton also noted that lipids prevent the salvation of charged particles, predicting that ions and non-lipophilic substances must use specific pathways across the membrane. The concept of the lipid membrane has evolved into the fluid-mosaic model including lipid domains and pore regions made up of proteins (9), whereas the notion that substances cross the cell membrane in proportion of their lipid solubility stood the test of time.

Studies of water transport and discovery of aquaporin-1

The understanding of water movement across biological membranes has been a particular aspect of the Overton's legacy. Specific studies of the mechanisms of water transport only started in the 1950's, with the observation by Ussing and colleagues that amphibian tissues such as the abdominal skin or urinary bladder were particularly permeable to water (5). The fact that vasopressin stimulated water transport in the amphibian bladder, paralleled by the apparition of protein aggregates, suggested the

existence (or induction) of specific pores (2). The high water permeability of red blood cells, characterized by a low Arrhenius activation energy and potentially inhibited by HgCl_2 (and reversed by a reducing agent), was also compatible with the presence of a specific pore for water in the membrane (1).

The quest for the molecular identity of the water pore ended with the discovery of aquaporin-1 in red blood cells (1, for review). While searching for the identity of the Rhesus antigens, P. Agre and colleagues from Johns Hopkins Medical School in Baltimore discovered a 28-kD protein (CHIP28) showing physical properties similar to a membrane channel. Of interest, antibodies against this protein stained the proximal tubules and the descending thin limbs of the loop of Henle in the kidney, i.e. the very tubular segments characterized by a high intrinsic water permeability. In 1992, Agre and colleagues were able to demonstrate that CHIP28 was a water channel using the *Xenopus laevis* oocyte expression system, characterized by its very low intrinsic water permeability. When oocytes expressing CHIP28 were placed into a hypotonic buffer, they rapidly swelled and exploded, in comparison with water-injected control oocytes, which showed a negligible swelling. The fact that the osmotic water permeability of the CHIP28-expressing oocytes could be (reversibly) inhibited by HgCl_2 , as well as the fact that a specific permeability for water (and not for protons or urea) could be reconstituted in proteoliposomes completed the demonstration. Based on these studies, it has been estimated that a single CHIP28 pore facilitates the transport of three billions of water molecules per second. Several isoforms of CHIP28 were readily identified, and CHIP28 was renamed Aquaporin-1 (AQP1), the archetypal water channel. Structural studies have demonstrated that AQP1 exists in the membrane as homotetramers (1).

To date, 13 members of the AQP family (AQP0 to AQP12) have been identified in mammals, with specific expression patterns and distinct roles in given tissues and cells. Most AQPs are exclusively permeable to water, whereas some isoforms (AQP3, AQP7, AQP9, and AQP10, the «aquaglyceroporins») transport water, glycerol, and urea (1). With the exception of AQP2, whose membrane expression is regulated by the antidiuretic hormone vasopressin, most AQPs are constitutively expressed in the plasma membrane. In addition to its expression in renal epithelial cells, AQP1 is located in the apical and basolateral membranes of endothelial cells lining non-fenestrated capillaries in a variety of tissues including the vasa recta and the capillaries lining the peritoneal membrane (3). The physiological importance of AQP1 in the kidney is demonstrated by the nephrogenic diabetes insipidus observed in mice knock-out (KO) for AQP1 and in Colton-null patients who lack functional AQP1 due to homozygous nonsense mutations in the *AQP1* gene (6).

Peritoneal dialysis and the peritoneal membrane

Renal replacement therapy represents a major health issue. In 2001, more than 1 million patients with end-stage renal disease (ESRD) were on dialysis worldwide, a number that is increasing by ~10 % annually. Peritoneal dialysis (PD), which allows a continuous dialysis through a biological membrane, is an established treatment for

ESRD that accounts for ~15 % of the total number of patients on dialysis. Peritoneal dialysis is the most popular modality of home dialysis, due to its relative simplicity, which has been enhanced by continuous technical improvements, and a lower cost than hemodialysis (8).

Like any dialysis technique, the aim of PD is to remove the excess of water and uremic toxins from the blood of patients with ESRD. To perform PD, a catheter is implanted in the peritoneal cavity, and a dialysate that contains physiologic concentrations of sodium, chloride, calcium, magnesium, and a buffer (lactate or bicarbonate) is infused through it. The dialysate remains in the peritoneal cavity for several hours and is then drained out. Dialysis occurs during the stagnation time, when solutes and water move between the blood and the dialysate through the peritoneal membrane. The peritoneal membrane consists of three main anatomical components: the capillary wall, the interstitium (primarily composed by a mucopolysaccharide matrix and bundles of collagen fibers), and the mesothelium. Solute diffuse between blood and dialysate by diffusive and convective transports, according to their concentration gradient. Ultrafiltration (UF), i.e. the amount of water removed from the patient, depends on the presence of an osmotic agent (most often glucose) in the dialysate. Low-molecular weight solutes, such as urea and creatinine, accompany water movements. The capacity to remove the excess of water by osmosis across the peritoneal membrane is a major predictor of outcome and mortality in PD patients. Ultrafiltration failure is the most frequent abnormality in long-term PD patients, and the main reason for technical failure (8).

Role of aquaporin-1 in peritoneal dialysis

The exchange of fluid across the peritoneal membrane during PD is best explained by a “three-pore” model based upon computer simulations. According to this model, the major transport barrier of the peritoneum is the capillary endothelium, which contains “ultrasmall pores” that facilitate the transport of water while being impermeable to osmotic agents such as glucose and glycerol, hence have a minimal radius $< 3\text{\AA}$. Understanding the molecular counterpart and the role of the ultrasmall pores has a major clinical importance, as these pores were predicted to mediate up to half of UF during PD (8).

The identification of AQP1 had a major relevance for understanding the mechanisms of transport and the regulation of UF in PD. As mentioned above, AQP1 is distributed in the endothelium lining peritoneal capillaries and post-capillary venules that are the most important barrier for solute transport during PD (3). Studies based on electron cryomicroscopy have shown that the pore formed by AQP1, with a narrow constriction of 2.8\AA which allows to accommodate a single water molecule (1), perfectly fits the postulated size of the ultrasmall pore. Of interest is the location of the side chain of a cysteine residue (Cys189) in the pore, explaining why the water permeability mediated by AQP1 can be inhibited by HgCl_2 . Initial studies conducted in the AQP1 KO mice demonstrated that the osmotically-driven water transport across the peritoneal

membrane was significantly decreased in AQP1^{-/-} mice, as compared with wild-type littermates. Further studies using a standard peritoneal exchange test validated in the mouse demonstrated that AQP1^{-/-} mice had a ~50% decrease in cumulative UF during PD with a hypertonic dialysate, as predicted by the three-pore model (7). Of note, the deletion of AQP1 had no effect on the structure of the peritoneal membrane, the transport of small solutes and the magnitude of the osmotic gradient. Furthermore, heterozygous AQP1^{+/-} mice showed an intermediate phenotype, showing that haplo-insufficiency in AQP1 results in significant attenuation of water flux and intraperitoneal volume (7).

Regulation of aquaporin-1 expression to increase ultrafiltration

The identification of AQP1 as the ultras-small pore mediating up to half of the UF volume implied that an upregulation of the expression of AQP1 in the peritoneal membrane could be used to treat UF failure. The proof-of-principle for that concept was provided using a rat model of PD (10). Knowing that the promoter of the AQP1 gene contains glucocorticoid response elements (GREs) and that the expression of AQP1 in the perinatal rat lung is induced by corticosteroids (6), we showed that the treatment of rats with high doses of corticosteroids was associated with an increased expression of AQP1 in the capillary endothelium, reflected by a significant increase in the water transport and net UF across the membrane (10). These modifications were observed in absence of any effect on the osmotic gradient or small solute transport, emphasizing the specific role of AQP1 in water transport during PD. Alternative mechanisms involved in the regulation of AQP1 in different cell types are actively investigated (4).

Pharmacological agonists of aquaporin-1

The search for pharmacological agonists of AQP channels, which would act by binding reversibly to a site on the protein to increase water channel activity, provides an exciting opportunity for enhancing fluid transport across barrier membranes. Consideration of the possibility of an AQP agonist presumes that AQP water channels are not constitutively locked into a rigid open state. The binding of a pharmacological agonist at a peculiar site would enable an allosteric modulation enhancing the probability of channel opening without physically interfering with water flux. This concept is supported by growing evidence that some if not all classes of AQPs are gated. For instance, the lens water channel AQP0 and plant aquaporins show changes in water permeability as a function of intracellular pH (4). A capacity for rapid gating of water permeability implies that the relevant classes of AQPs have both open and closed state conformations, thus overall water permeability at a given time could depend on the relative proportion of channels in the open state. Stabilization of the open state conformation by ligand binding would be a logical basis for a pharmacological agonist activity.

Several sites for ligand binding on AQP channels have been proposed based on simulations of molecular docking of membrane-permeable bumetanide derivatives. The existence of a cytoplasmic binding pocket that modulates water permeability in

AQP channels prompts the speculation that AQPs might also be regulated natively by cytoplasmic ligands yet to be identified. Intracellular domains have been proposed to serve in gating the mammalian AQP1 (12) and a detailed mechanism of gating in a plant aquaporin has recently been outlined (11). Current work has suggested that compounds in the chemical AqB.n library of arylsulfonamide-related derivatives can serve as AQP agonists (Devuyt and Yool, unpublished data). Thus, advances in aquaporin pharmacology may yield new insights into the physiological relevance and clinical roles for these channels as drug targets.

Perspectives

As detailed above, studies in the AQP1 knock-out mice demonstrated the strict correlation between AQP1 abundance and water transport across the peritoneal membrane. Assessing water transport across the peritoneum may thus be useful for *in vivo* investigations of drugs or molecular pathways targeting AQP1. In addition to the pharmacological approach, further studies should investigate whether biochemical modifications of AQP1 (e.g. S-nitrosylation or abnormal glycation) may alter the integrity of the water pore and contribute to UF failure in disease. Future investigations should also help to substantiate the potential relationship between variants in the AQP1 gene and the individual variability in free-water transport. Finally, the peritoneal membrane could represent a useful model to investigate the role of AQP1 during inflammation, and the complex relationships between AQP1 and functionally relevant molecules in the endothelium.

Acknowledgements

Our studies are supported in part by the belgian agencies FNRS and FRSM, the Communauté Française de Belgique, the DIANE network, the Société de Néphrologie (Paris), and grants from Baxter Healthcare and the Sumitomo Life Social Welfare Services Foundation. The author thanks P. Agre, J-L. Balligand, S. Combet, P. Deen, C. Delporte, G. Gillerot, E. Goffin, H. Debaix, R. Krediet, N. Lameire, B. Lindholm, P. Moulin, S. Nielsen, T. Nishino, A. Rippe, B. Rippe, S. Sasaki, M. Stoenoiu, N. Topley, S. Uchida, J-M. Verbavatz, A.S. Verkman and A.J. Yool for fruitful collaborations and discussions, and Y. Cnops, H. Debaix, and S. Druart for superb technical assistance in developing mouse models of dialysis.

RÉSUMÉ

La dialyse péritonéale implique des phénomènes de transport par diffusion et convection ainsi que l'osmose à travers la membrane péritonéale richement vascularisée. Diverses approches expérimentales ont démontré que le canal à eau aquaporine-1 (AQP1) correspond au pore endothélial ultra-fin prédit par la modélisation du transport péritonéal. Nous avons démontré qu'une augmentation de l'expression de l'AQP1 au niveau de l'endothélium capillaire se traduit par une augmentation spécifique du transport d'eau et de l'ultrafiltration en dialyse péritonéale. A l'inverse, la délétion de l'AQP1 chez la souris se traduit par une diminution importante du transport d'eau. Des travaux récents ont identifié plusieurs composés pouvant agir comme agonistes des aquaporines, via des sites de liaison intracellulaires et un mécanisme précis d'ouverture du canal. La modulation du transport d'eau par de tels agonistes pourrait avoir des effets utiles en clinique, pour une série d'états morbides impliquant différents organes. La recherche sur

la membrane péritonéale représente l'opportunité d'étudier le rôle des canaux à eau dans l'endothélium et divers types cellulaires.

SUMMARY

Peritoneal dialysis involves diffusive and convective transports and osmosis through the highly vascularized peritoneal membrane. Several lines of evidence have demonstrated that the water channel aquaporin-1 (AQP1) corresponds to the ultrasmall pore predicted by the modelization of peritoneal transport. Proof-of-principle studies have shown that upregulation of the expression of AQP1 in peritoneal capillaries is reflected by increased water permeability and ultrafiltration, without affecting the osmotic gradient and the permeability for small solutes. Inversely, studies in *Aqp1* mice have shown that haplo-insufficiency in AQP1 is reflected by significant attenuation of water transport. Recent studies have identified lead compounds that could act as agonists of aquaporins, as well as putative binding sites and potential mechanisms of gating the water channel. By modulating water transport, these pharmacological agents could have clinically relevant effects in targeting specific tissues or disease states. These studies on the peritoneal membrane also provide an experimental framework to investigate the role of water channels in the endothelium and various cell types.

BIBLIOGRAPHIE

1. AGRE P., *Aquaporin water channels (Nobel Lecture)*, Angew Chem. Int. Ed. Engl., 43 , 4278-4290 (2004).
2. AL-AWQATI Q., *One hundred year of membrane permeability: does Overton still rule?*, Nat. Cell Biol., 1, E201-E202 (1999).
3. DEVUYST O., NIELSEN S., COSYNS J.P., SMITH B.L., AGRE P., SQUIFFLET J.P., POUTHIER D., GOFFIN E., *Aquaporin-1 and endothelial nitric oxide synthase expression in capillary endothelia of human peritoneum*, Am. J. Physiol., 275, H234-H242 (1998).
4. DEVUYST O., YOOL A.J., *Aquaporin-1: new developments and perspectives for peritoneal dialysis*, Perit. Dial. Int., 30 , 135-141 (2010).
5. DE WEER P., *A century of thinking about cell membranes*, Annu. Rev. Physiol., 62, 919-926 (2000).
6. KING L.S., KOZONO D., AGRE P., *From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 5 , 687-698 (2004).
7. NI J., VERBAVATZ J.M., RIPPE A., BOISDÉ I., MOULIN P., RIPPE B., VERKMAN A.S., DEVUYST O., *Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis*, Kidney Int., 69, 1518-1525 (2006).
8. NISHINO T., DEVUYST O., *Clinical application of aquaporin research: aquaporin-1 in the peritoneal membrane*. Pflugers Arch., 456, 721-727 (2008).
9. SINGER S.J., NICHOLSON G.L., *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*, Science, 175, 720-731 (1972).
10. STOENIU M.S., NI J., VERKAEREN C., DEBAIX H., JONAS J.C., LAMEIRE N., VERBAVATZ J.M., DEVUYST O., *Corticosteroids induce expression of aquaporin-1 and increase transcellular water transport in rat peritoneum*, J. Am. Soc. Nephrol., 14, 555-565 (2003).
11. TORNROTH-HORSEFIELD S., WANG Y., HEDFALK K., JOHANSON U., KARLSSON M., TAJKHORSHID E., *et al.*, *Structural mechanism of plant aquaporin gating*, Nature, 439, 688-694 (2006).
12. YU J., YOOL A.J., SCHULTEN K., TAJKHORSHID E., *Mechanism of gating and ion conductivity of a possible tetrameric pore in aquaporin-1*, Structure, 14, 1411-1423 (2006).

(Service et laboratoire de Néphrologie, Faculté de Médecine, U.C.L., 1200 Bruxelles.)

Discussion

M. J.E. Dumont. – Je vous félicite pour cette superbe leçon de physiologie humaine.

Pourriez-vous nous dire ce que l'on sait de régulations aiguës des aquaporines, soit par modulation allostérique, modifications post-traductionnelles ou régulation d'exo- et endocytose?

M. O. Devuyst. – En dehors de la possibilité de bloquer le pore des aquaporines par les dérivés mercuriels qui agissent sur une cystéine bien conservée, des travaux récents suggèrent la possibilité d'un gating spécifique par le pH cytosolique, le calcium intracellulaire, et la protéine kinase C. La plupart des aquaporines sont constitutivement exprimées dans les membranes plasmiques. La situation est différente pour l'aquaporine-2, sélectivement exprimée dans le canal collecteur du rein et régulée par l'hormone antidiurétique (vasopressine). En absence d'hormone antidiurétique, l'aquaporine-2 est localisée dans des vésicules intracellulaires sous la membrane apicale des cellules du canal collecteur. Ce segment est donc imperméable à l'eau (situation de diurèse aqueuse). Lorsque l'hormone antidiurétique est libérée, les vésicules contenant l'aquaporine-2 fusionnent avec la membrane apicale des cellules, augmentant la perméabilité à l'eau et provoquant la réponse antidiurétique. Cette action de l'hormone antidiurétique est médiée par les récepteurs V2 exprimés au pôle basolatéral des cellules du canal collecteur. L'interaction de la vasopressine avec ces récepteurs va augmenter, par l'intermédiaire d'une protéine G, le taux d'AMP cyclique et induire (via la protéine kinase A) la phosphorylation des AQP2 et leur exocytose à la membrane apicale.

M. E. Van Schaftingen. – Etant donné que la réabsorption progressive du glucose limite l'efficacité de la dialyse péritonéale, pourquoi ne pas remplacer le glucose dans le liquide de dialyse péritonéale par un sucre non absorbable comme le saccharose ou le tréhalose ?

M. O. Devuyst. – La réabsorption progressive du glucose contenu dans le dialysat se fait par diffusion passive à travers les capillaires et lymphatiques de la membrane, sans impliquer de transporteurs spécifiques. Le sucrose a été utilisé comme agent osmotique dans un petit nombre d'études *in vitro* et sur modèles animaux. Il est bien entendu réabsorbé par diffusion simple également. On peut remplacer le glucose par d'autres agents osmotiques cristalloïdes comme le glycérol ou les acides aminés, par exemple. Récemment, de nouveaux agents osmotiques colloïdes, basés sur des polymères de glucose de haut poids moléculaire, ont été utilisés pour limiter la réabsorption progressive et maintenir la capacité d'ultrafiltration au long cours.

M. W.J. Malaisse. – Je vous félicite aussi pour cet excellent exposé. Vous connaissez sans doute notre intérêt pour le rôle de l'aquaglycéroporine 7 dans le processus de sécrétion d'insuline. Dans une perspective d'expérimentation, savez-vous si les aquaporines manifestent une discrimination isotopique entre H₂O et D₂O (eau lourde) ?

M. O. Devuyst. – Les aquaglycéroporines représentent en effet une sous-classe de canaux, exprimés dans des cellules bien spécifiques comme les adipocytes ou les

hépatocytes, et pouvant jouer un rôle métabolique important. Les travaux récents suggérant l'implication de l'AQP7 dans la sécrétion d'insuline sont particulièrement intéressants. Ils montrent que le rôle de cette famille de canaux est bien plus large que la facilitation du transport d'eau. Je n'ai pas connaissance d'études *in vitro* ayant évalué le transport d'eau lourde à travers les aquaglycéroporines. Il faut savoir que les études structurales ont bien montré que le pore des aquaglycéroporines était un peu plus large que celui des aquaporines classiques.

M. J.-B. Otte. – Est-ce que les mécanismes de production d'ascites non néoplasiques sont similaires à ceux décrits pour la dialyse péritonéale ?

M. O. Devuyt. – La production d'ascite dans la cavité péritonéale est expliquée par la loi de Starling, basée sur l'équilibre des pressions oncotiques et hydrostatiques au niveau des capillaires de la membrane péritonéale et de la cavité péritonéale. Un exemple classique est l'œdème de famine, où la diminution du taux d'albumine plasmatique entraîne une chute de la pression oncotique et l'accumulation progressive d'ascite au niveau de la cavité péritonéale. Par ailleurs, toute augmentation du gradient osmotique entre la circulation capillaire et la cavité péritonéale va entraîner un passage d'eau entre le sang et la cavité (normalement virtuelle).

M. G. Rorive. – Avant tout, je souhaite m'associer aux félicitations exprimées par les intervenants précédents pour ce brillant exposé. Manifestement, depuis l'époque où étudiant, j'étudiais la perméabilité de la peau de grenouille avec le Pr.E.Scoffeniels, des progrès considérables ont été accomplis.

Une question et un commentaire.

La perte de perméabilité chez le patient traité par dialyse péritonéale n'est pas seulement due à une diminution de la perméabilité de l'endothélium vasculaire, mais à une fibrose associée à une raréfaction des vaisseaux sanguins. Dans ce cas, peut-on espérer un bénéfice chez le patient des effets que vous avez décrit pour le Bumétanide ?

En commentaire à la question précédente, les cristalloïdes utilisés pour créer le gradient osmotique doivent, outre leurs caractéristiques de perméabilité et de poids moléculaire, être biocompatibles, c'est-à-dire ne pas provoquer de réaction inflammatoire au niveau du péritoine.

M. O. Devuyt. – Il est en effet important de souligner que la perte de perméabilité chez les patients traités par dialyse péritonéale reflète souvent des modifications de structure de la membrane, incluant fibrose, vasculopathie et prolifération vasculaire (néo-angiogenèse ou recrutement de capillaires). Ces modifications sont invariablement observées après quelques années de dialyse péritonéale et donc d'exposition quotidienne aux solutions. L'augmentation de la surface vasculaire d'échange entraîne une réabsorption plus rapide de l'agent osmotique (glucose), causant une dissipation du gradient osmotique et une diminution de l'ultrafiltration – avec danger de surcharge volémique pour ces patients. De nombreuses études (chez l'homme et dans divers modèles animaux) ont démontré le rôle délétère joué par l'exposition chronique aux solutions de dialyse qui contiennent des quantités importantes de glucose ainsi que

des produits de dégradation générés par la stérilisation. L'industrie essaye donc de développer des dialysats d'avantage bio-compatibles, qui devraient avoir un effet moins délétère sur la membrane. La question pratique du coût de ces nouvelles solutions se pose bien entendu, étant donné qu'il s'agit d'une dialyse continue impliquant de larges volumes.

M. M. Abramow. – L'effet de gating du bumétanide sur l'AQP1 me paraît très intéressant s'il concernait également l'AQP2 vasopressine-dépendant. J'avais étudié sur le tubule collecteur isolé et perfusé l'effet de certains diurétiques sur la réponse hydro-osmotique du tubule à la vasopressine du bumétanide, que je m'attendais n'avoir aucun effet, s'est révélé, à ma surprise, potentialiser l'effet de la vasopressine. Y a-t-il selon vous une possibilité que le mécanisme de gating de l'AQP2 soit impliqué ? Dans ce cas, il y aurait en vue la possibilité d'améliorer certains syndromes cliniques liés à une insuffisance d'effet de l'hormone antidiurétique.

M. O. Devuyt. – La découverte de sites potentiellement impliqués dans le gating des aquaporines est en effet de toute première importance. Nous savons que le routage de l'aquaporine-2 au niveau des cellules du canal collecteur est régulé par la vasopressine, via le récepteur basolatéral V2 qui appartient à la famille des récepteurs GPCR. Sur base des résultats du screening pharmacologique, il est donc possible que le bumétanide puisse participer à une potentiation des aquaporines insérées dans la membrane apicale, favorisant ainsi l'action antidiurétique. À côté des agonistes dérivés du bumétanide, il a été montré récemment que certaines molécules de la classe des aryl sulfonamides pouvaient avoir un effet antagoniste sur certaines aquaporines, en agissant sur un site intracellulaire (Migliati E et al. *Mol Pharmacol* 2009 ; 76 : 105-112).

M. B. Lengelé. – Dans votre remarquable exposé, vous avez bien montré l'analogie existant entre le péritoine pariétal et le péritoine viscéral, qui tous deux présentent une grande densité vasculaire et une riche distribution d'aquaporines. Quel rôle joue, dans la dialyse péritonéale, la large surface de l'épiploon dont anatomiquement, la densité vasculaire et lymphatique est la plus élevée ? En d'autres termes, lorsqu'en chirurgie nous réséquons ou transplantons l'omentum hors de la cavité péritonéale, pouvons-nous causer un dommage fonctionnel à nos patients en les déplétant d'une longue surface d'échange riche en aquaporines ?

M. O. Devuyt. – Merci de souligner ce point important. La cavité péritonéale est en effet constituée par un feuillet pariétal et un feuillet viscéral, complété par l'épiploon. La circulation dans les capillaires splanchniques est régulée à de multiples niveaux, et des études sur modèles animaux ont démontré que c'était le péritoine pariétal qui contribuait le plus aux phénomènes de transport lors de la dialyse péritonéale. On sait que les transports d'eau et de solutés sont relativement peu affectés par une omentectomie. En revanche, le volume de la cavité intrapéritonéale est un facteur important, puisqu'il influence la surface d'échange pour les transports.

*
* *

II

NEW INSIGHTS INTO URINARY ACIDIFICATION AND REGULATION OF ACID-BASE BALANCE

par

C. WAGNER (Zurich - Suisse) (*)

Introduction

Systemic acid-base balance is the sum of acids and bases circulating in extracellular fluids such as protons, organic acids, bicarbonate and CO_2 , phosphate, and protein buffers. In a normal and healthy organism, the sum of these acids and bases results in a pH of approx 7.40, 25 mM bicarbonate, and approx. 38-40 mm Hg pCO_2 in arterial blood. This acid-base equilibrium is critical for normal organ and cellular functions, and deranged acid-base status presents an important risk factor for higher morbidity and mortality in the setting of many diseases as well as when occurring alone.

Acid-base homeostasis is constantly challenged by dietary intake, cellular metabolism, physical activity, and during disease. Consequently, many organs contribute to the maintenance and regulation of systemic acid-base balance including skeletal muscle, liver, the gastro-intestinal tract, and particularly kidneys and lungs/ventilation. Lung ventilation regulates CO_2 levels in arterial blood whereas the kidneys control proton, bicarbonate, and phosphate concentrations in extracellular fluids.

Renal acid excretion

The kidneys excrete about 70 mmoles of acids/ day. Only a small portion is excreted as free protons but most acid is in the form of ammonium (about 2/3) and titratable acids (about 1/3) such as phosphate. Type A intercalated cells along the collecting duct mediate the removal of acids (i.e. protons and ammonium) as well as the generation of bicarbonate [1]. H^+ -ATPases localized at the luminal membrane of type A intercalated cells excrete protons [2] thereby acidifying urine. However, H^+ -ATPases can generate only a maximal pH gradient of about 2-2.5 units pH between the intracellular compartment (approx. pH 7.2) and urine limiting removal of protons. The excretion of protons in unbuffered urine would thus require approx 200 liters of urine. Titratable acids (mainly phosphate) buffer protons and urine. A major fraction of protons, however, is excreted bound by ammonia after parallel secretion into urine (approx. 2/3 of the daily acid load). Ammonia secretion occurs along the entire length of the collecting duct system [3].

Ammonia is generated from metabolism of glutamine in the proximal tubule regenerating bicarbonate lost during metabolism [4-5]. Ammonium is secreted into

(*) Invité par le Bureau en vertu de l'article 15 §3 du Règlement.

urine, reabsorbed in the thick ascending limb, and accumulated in the interstitium [3]. The high interstitial concentration and the tissue-urine pH gradient drive ammonia excretion by intercalated cells. Intercalated and principal cells both contribute to ammonia secretion into urine [1].

According to Overton's rule [6], gases as CO_2 or NH_3 are thought to move easily across biological membranes via diffusion. In 1945, the great renal physiologist Robert Pitts had described the role of ammonium in renal acid secretion and postulated that ammonium secretion is a passive process driven solely by the ammonia concentration gradient, via non-ionic diffusion of ammonia across the luminal membrane, and the following trapping of ammonium in urine after protonation [7]. This hypothesis had remained textbook knowledge until recently.

Gas transport by Rhesus proteins

Ammonia and ammonium are transported by a family of proteins in plants, bacteria, and yeast. In 2000 it was noticed that the mammalian homologues were also able to mediate transport and that these proteins belonged to the family of Rhesus proteins [8]. The mammalian Rhesus proteins RhAG, RhBG and RhCG induce NH_3 or NH_4^+ transport in various heterologous cell models even though the exact transport mode and substrate (i.e. NH_3 or NH_4^+) as well as the coupling to other ions (i.e. counter- or cotransport of protons) and stoichiometry have remained controversial [3]. The algae Rh1 protein might even be involved in CO_2 permeability. In mammals, RhAG is detected in erythrocytes, RhBG in liver, kidney, and ovary, and RhCG in kidney, liver, brain, skeletal muscle, prostate, and pancreas [3].

In kidney, RhBG and RhCG have been found exclusively in the distal tubule, connecting tubule, and cortical and medullary collecting duct [3]. RhBG was detected in rodent kidney on the basolateral side of intercalated and principal cells. It has not been detected in human kidney to date. In contrast, RhCG is localized to the apical and basolateral membrane of intercalated and principal cells [3, 9]. During acidosis the cortical collecting duct becomes a major site of ammonia secretion [10] paralleled by the strongest staining for RhCG.

RhCG is a novel NH_3 gas channel in kidney

Different mouse models have been generated to examine the role of Rhesus proteins *in vivo* and to clarify a role in ammonia or ammonium transport. RhAG KO show greatly diminished ammonia fluxes in erythrocytes resembling patients with inherited disorders of the red blood cells Rhesus complex. RhBG deficient mice had normal urinary ammonium excretion and unaltered basolateral $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ permeabilities as well as transepithelial ammonia fluxes in the collecting duct [11]. In contrast, genetic deletion of RhCG in at least three different mouse models demonstrates a critical role for this protein in urinary ammonium excretion [12-13]. RhCG KO show only mildly reduced ammonium excretion under basal conditions and normal blood acid-base parameters.

However, acid-loading mice with HCl or NH₄Cl induces more severe metabolic acidosis and KO mice have a strongly reduced maximal capacity to increase urinary ammonium excretion. After prolonged acid-loading (7 days) also heterozygous RhCG mice develop a more pronounced acidosis with lower urinary ammonium excretion suggesting haploinsufficiency. Ammoniogenesis in the proximal tubule is preserved in RhCG KO mice. We proceeded to the cellular level and performed microperfusion experiments in the cortical and outer medullary collecting ducts from acid-loaded mice. Ammonia but not ammonium permeability of the apical membrane is reduced by about 60 - 80 %. Similarly, when we measured total transepithelial NH₃ permeability, we found an 80 % reduction [12]. Since RhCG is expressed on the basolateral membrane, we also tested the possibility that RhCG may play a role in the uptake of ammonium from the interstitium and found also there a reduction of NH₃ permeability by about 30-50 %. In heterozygous mice an intermediate phenotype was found. Thus, RhCG is critical for urinary ammonium excretion and is required for collecting duct NH₃ secretion.

Functional and structural data suggest that RhCG and related Rhesus proteins function as gas channels. Heterologously expressed RhCG interacts with both NH₃ and NH₄⁺. Our in vitro microperfusion experiments are consistent with a role in NH₃ fluxes but cannot rule out other transport modes. RhAG in human and mouse red blood cells mediates NH₃ fluxes. Reconstituted human RhCG in liposomes induces NH₃ but not NH₄⁺ fluxes [14-15]. Finally, crystal structures from the *E. coli* homologue AmtB as well as from human RhCG show a vestibule gated by phenylalanines and a pore region lined by histidine residues which would exclude charged molecules such as NH₄⁺ and allow only the passage of a neutral NH₃ [14]. Collectively these data demonstrate that RhCG and other family members are not only subunits of the permeation pathway but form the pore of the transporter/channel and mediate the passage of the gas NH₃.

In summary, RhCG forms a gas channel required for normal ammonium excretion by mediating NH₃ fluxes. Non-ionic diffusion, as postulated by Pitts, does not account for the majority of NH₃ excretion. Thus, rhesus proteins like RhCG represent a novel class of membrane proteins allowing the passage of a gas contradicting the rule of Overton.

Proton-activated receptors

Coordinated adaptation of ventilation during metabolic acidosis is a major compensatory mechanism to regulate systemic acid-base homeostasis. The initial trigger for this adaptive increase in ventilation is a rise in arterial CO₂ partial pressure (pCO₂) and/or a fall in arterial blood pH. These changes are sensed at two distinct sites, the carotid body and different regions of the ventral medulla oblongata. Upon stimulation of chemosensitive cells in these regions, ventilation (primarily tidal volume and secondary also respiratory frequency) are increased [16-18]. Accumulating evidence suggests that not changes in pCO₂ but in local pH are sensed but it remains controversially discussed if changes in intra- or extracellular pH are primarily sensed. The molecules mediating the sensing of pCO₂ or pH, however, have not been identified to date. The candidate proteins include several ion channels (TASK, ASIC), the sodium/proton exchanger NHE3,

and intracellular signalling molecules that are sensitive to changes in pH. However, studies in gene ablated mice or in pharmacologically treated animal models did not yield convincing evidence for the role of any of these candidates to date.

G protein-coupled receptors (GPCR) recognize a variety of ligands including hormones, biogenic amines, amino acids, lipids, metabolites, and also small molecules such as calcium. Evidence also suggests that mechanisms exist by which cells can sense changes in extracellular pH but it has remained controversial if receptors or other types of membrane proteins such as pH-sensitive ion channels act as primary sensors.

The GPCRs OGR1 (Ovarian Cancer G protein-coupled receptor 1), GPR4, and TDAG8 (T-cell death associated gene 8) were initially described as receptors for lipids [19]. Subsequently, Ludwig et al found that not lipids were acting on these receptors but that small changes in extracellular pH were eliciting the production of cAMP in the case of GPR4 and TDAG8 and caused a rise in intracellular calcium and IP3 concentrations in OGR1 expressing cells [19-20]. Activation of all three receptors occurs in the physiologic pH range with almost no activity around pH 7.8 and full activation around pH 6.8 with half-maximal activation between pH 7.5 and 7.3. Expression of OGR1 and GPR4 is found in most organs, whereas TDAG8 appears to be more restricted to immune cells. More recently, these receptors have been implicated in a variety of functions such as osteoclast activation during acidosis, modulation of immune cells during inflammation, regulation of endothelial cell function, tumour growth, and pain perception or transduction. Since all these functions were mostly deduced from *in vitro* experiments, it remains to be established in *in vivo* or *ex vivo* experiments if these receptors indeed contribute to these processes.

GPR4 is critical for CO₂ and acidosis stimulated ventilation

We used mice lacking GPR4 and examined their systemic acid-base parameters under basal conditions. Mice had lower blood pH and mild acidosis with slightly reduced urinary ammonium excretion. However, the most striking finding was that arterial partial pressure of CO₂ was elevated suggesting that at least part of the acidosis was due to impaired ventilation. Since lung volume and histology was unremarkable, awake mice were examined for their ability to adapt breathing to two types of challenges, changes in ambient CO₂ (acute hypercapnia) and metabolic acidosis (induced by 24 hrs of NH₄Cl loading). Basal tidal volume was lower in GPR4 KO mice. Acute exposure to CO₂ increased tidal volume and respiratory frequency in wildtype mice whereas GPR4 increased also both parameters but tidal volume did not reach the same level as in wildtype mice. In contrast, adaptation to altered ambient oxygen is fully preserved in GPR4 KO mice.

We tried to dissect where GPR4 acts on the control of ventilation by denervating the carotid body in mice. In denervated wildtype mice, acute hypercapnia increased tidal volume and respiratory frequency whereas in denervated GPR4 KO mice no increase in tidal volume could be observed. Taken together, it appears that GPR4 contributes partially

to ventilatory control in carotid bodies but is critical for normal adaptation of ventilation in the medulla oblongata. The exact role of GPR4, its regulation and down-stream targets, however, remain to be identified.

Summary

Systemic acid-base homeostasis is influenced by many variables and controlled by different organs. The molecular control mechanisms, however, have only begun to emerge recently. Here, we described two membrane proteins with unusual properties. RhCG is a member of the first mammalian gas channel family mediating the transfer of NH_3 . GPR4 together with two other G protein-coupled receptors forms a small subfamily of receptors that appear to be involved in sensing extracellular proton concentrations and regulating systemic (and local) pH homeostasis.

Acknowledgements

This work would not have been possible without the contribution of many co-workers and collaborators. I would like to thank particularly, Soline Bourgeois (Zurich), Pascal Houillier (Paris), Erik Christensen (Aarhus), Olivier Devuyst (Brussels), Ana Velic (Zurich, now Tubingen), Klaus Seuwen (Basel, Novartis), and Jorge Soliz (Zurich). The generous support from the 6th and 7th EU Frame work projects EuReGene and EUNEFRON as well as by the Swiss National Science Foundation is gratefully acknowledged.

RÉSUMÉ

L'équilibre acide-base de l'organisme est principalement contrôlé par l'excrétion rénale d'acides et l'élimination du CO_2 par l'expiration. Ces deux processus sont étroitement régulés et liés. L'excrétion d'acide dans les urines nécessite la formation d'ammonium (NH_4^+) et son transport dans les urines sous sa forme gazeuse, l'ammoniac (NH_3). Jusqu'à récemment, on estimait que NH_3 se déplaçait à travers les membranes par diffusion libre selon la règle d'Overton. Des données récentes, structurales, fonctionnelles et *in vivo* montrent maintenant que les protéines Rhésus agissent comme des canaux à gaz pour le NH_3 et permettent l'excrétion rénale d'acide. L'absence de l'isoforme rénale RhCG chez la souris entraîne la diminution de l'excrétion rénale d'ammonium et l'installation d'une acidose métabolique.

La respiration et l'expiration du CO_2 est stimulée et régulée par le CO_2 lui-même et les capteurs d'acide dans le corps carotidien et le tronc cérébral. GPR4 appartient à une petite sous-famille des récepteurs couplés aux protéines G et est activé par les protons extracellulaires. Les souris invalidées pour GPR4 développent une acidose respiratoire et ne sont pas en mesure d'augmenter leur ventilation de manière appropriée en réponse à des niveaux élevés en CO_2 ou lors d'une acidose systémique.

Ainsi, RhCG et GPR4 représentent de nouveaux paradigmes des protéines membranaires impliqués dans la régulation de l'équilibre acide-base systémique dans les principaux organes voués à cette tâche.

SUMMARY

Systemic acid-base balance is primarily controlled by the renal excretion of acids and the exhalation of CO₂ and both processes are tightly regulated and coordinated. Acid excretion into urine requires the formation of ammonium and its transport into urine as gaseous ammonia. Until recently it has been believed that NH₃ would move across membranes by free diffusion according to Overton's rule. Recent structural, functional, and in vivo data show now that Rhesus proteins act as gas channels for NH₃ and mediate renal acid excretion. Lack of the renal isoform RhCG in mice causes reduced ammonium excretion and metabolic acidosis.

Breathing and exhalation of CO₂ is stimulated and regulated by CO₂ and acid sensors in the carotid bodies and the brain stem. GPR4 belongs to a small subfamily of G protein-coupled receptors and is activated by extracellular protons. Mice lacking GPR4 develop respiratory acidosis and are not able to increase ventilation appropriately in response to high CO₂ levels or systemic acidosis. Thus, RhCG and GPR4 present novel paradigms of membrane proteins involved in controlling and regulating systemic acid-base balance in the major organs involved in this task.

BIBLIOGRAPHIE

1. BIVER S., H. BELGE, S. BOURGEOIS, P. VAN VOOREN, M. NOWIK, S. SCOHY, *et al.*, *A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility*. Nature, 456, 339-43 (2008).
2. BROWN A. C., HALLOUANE D., MAWBY W. J., KARET F. E., SALEEM M. A., HOWIE A. J., *et al.*, *RhCG is the major putative ammonia transporter expressed in the human kidney, and RhBG is not expressed at detectable levels*, Am. J. Physiol. Renal Physiol., 296, F1279-90 (2009).
3. BUSQUE S. M. and WAGNER C. A., *Potassium restriction, high protein intake, and metabolic acidosis increase expression of the glutamine transporter SNAT3 (Slc38a3) in mouse kidney*, Am. J. Physiol. Renal Physiol., 297, F440-50 (2009).
4. CHAMBREY R., GOOSSENS D., BOURGEOIS S., PICARD N., BLOCH-FAURE M., LEVIEL F., *et al.*, *Genetic ablation of Rhbg in the mouse does not impair renal ammonium excretion*, Am. J. Physiol. Renal Physiol., 289, F1281-90 (2005).
5. CURTHOYS N. P., *Renal ammonium ion production and excretion*, in *Seldin and Giebisch's The Kidney. Physiology and Pathophysiology*, R.J. Alpern and S.C. Hebert, Editors., Elsevier, 1601-1619 (2008).
6. FELDMAN J. L., G. S. MITCHELL, and E. E. NATTIE, *Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity*, Annu. Rev. Neurosci., 26, 239-66 (2003).
7. GRUSWITZ F., CHAUDHARY S., HO J. D., SCHLESSINGER A., PEZESHKI B., HO C. M., *et al.*, *Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 107, 9638-4 (2010).
8. LAHIRI S., FORSTER R E 2ND, *CO₂/H⁺ sensing: peripheral and central chemoreception*, Int. J. Biochem. Cell Biol., 35, 1413-35 (2003).
9. LEE H. W., VERLANDER J. W., BISHOP J. M., IGARASHI P., HANDLOGTEN M. E. and WEINER I. D., *Collecting duct-specific Rh C glycoprotein deletion alters basal and acidosis-stimulated renal ammonia excretion*, Am. J. Physiol. Renal Physiol., 296, F1364-75 (2009).
10. LUDWIG M. G., VANEK M., GUERINI D., GASSER J. A., JONES C. E., JUNKER U., HOFSTETTER H., WOLF R. M., SEUWEN K., *Proton-sensing G-protein-coupled receptors*, Nature, 425, 93-8 (2003).
11. MARINI A. M., MATASSI G., RAYNAL V., ANDRE B., CARTRON J. P., CHERIF-ZAHAR B., *The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast*, Nat.Genet., 26, 341-4 (2000).
12. MISSNER A. and POHL P., *110 years of the Meyer-Overton rule: predicting membrane permeability of gases and other small compounds*, Chemphyschem., 10, 1405-14 (2009).

13. MOURO-CHANTELOUP I., COCHET S., CHAMI M., GENETET S., ZIDI-YAHIAOUI N., ENGEL A., *et al.*, *Functional reconstitution into liposomes of purified human RhCG ammonia channel*. PLoS One, 5, e8921 (2010).
14. MULKEY D. K., STORNETTA R. L., WESTON M. C., SIMMONS J. R., PARKER A., BAYLISS D. A., *et al.*, *Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats*. Nat. Neurosci., 7, 1360-9 (2004).
15. PITTS R. F., *The Renal Regulation of Acid Base Balance with Special Reference to the Mechanism for Acidifying the Urine. II*. Science, 102, 81-85 (1945).
16. SAJO I. M., GOLDSTEIN M. B., SONNENBERG H., J. STINEBAUGH B., WILSON D. R., and HALPERIN M. L., *Sites of ammonia addition to tubular fluid in rats with chronic metabolic acidosis*. Kidney Int., 20, 353-8 (1981).
17. SEUWEN K., LUDWIG M. G. and WOLF R. M., *Receptors for protons or lipid messengers or both?*. J. Recept. Signal Transduct. Res., 26, 599-610 (2006).
18. WAGNER C. A., DEVUYST O., BOURGEOIS S. and MOHEBBI N., *Regulated acid-base transport in the collecting duct*. Pflugers Arch., 458, 137-56 (2009).
19. WAGNER C. A., FINBERG K. E., BRETON S., MARSHANSKY V., BROWN D., GEIBEL J. P., *Renal vacuolar H⁺-ATPase*. Physiol. Rev., 84, 1263-314 (2004).
20. WEINER I. D. and HAMM L. L., *Molecular mechanisms of renal ammonia transport*. Annu. Rev. Physiol., 69, 317-40 (2007).

(Institute of Physiology, University of Zurich, Switzerland.)

*
* *

Discussion

M. O. Devuyt. – The results of the denervation experiments are particularly interesting, as they suggest that there are compensatory mechanisms operating in the knock-out mice. Do you have any idea about these mechanisms? Thank you very much for your beautiful lecture.

M. C. Wagner. – This is an important question. Indeed, several candidate proteins have been suggested that could mediate chemosensing in the carotid body and brain stem, including several potassium channels from the TASK family, the proton-activated sodium channels from the ASIC family, or the sodium/proton exchanger NHE3. However, evidence for an important role of any of these proteins in pH-sensing is missing to date. Our results with the denervated animals suggest that GPR4 plays a critical role in pH-sensing in the brain stem, whereas in the carotid body other mechanisms may be operating. In patients with rare bilateral tumours of the carotid body, paragangliomas, removal of both carotid bodies leads to a loss of a rapid component of adaptation to hypercapnia whereas a slower component is fully preserved. Again, this indicates that possibly different mechanisms underlie peripheral and central chemosensitivity also in humans. At present it is very difficult to dissect these mechanisms on a cellular and molecular level since we do not know which cells exactly mediate chemosensitivity and how the signal(s) is (are) perceived and transduced.

M. J.E. Dumont. – The GPR4 regulation puzzles me. The receptors we work with are on/off receptors on when the ligand is bound.

Where you have an optimum – how do you visualize this (these) structure (s)?

M. C. Wagner. – This is very open and interesting question. The structure of the receptor has been modelled based on the known structure of rhodopsin [19-20]. This model structure predicts the presence of a cluster of histidine residues located where normally the “binding pocket” of the ligand would be. These histidines are most likely protonated and lead to the activation of the receptor. Mutations of these shift the activation of the receptor to higher proton concentrations. As for the regulation of these receptors: many classic G protein coupled receptors undergo some kind of desensitivation upon binding of their ligand. The classic example is the adrenergic receptor that is internalized after binding of adrenaline or similar agonists in a b-arrestin dependent manner and recycles back to the membrane to some extent. There are other relevant examples that lack this internalization upon activation by agonists. The calcium-sensing receptor of the parathyroid gland does not undergo such an internalization. One might speculate that this makes sense teleologically, since calcium is not an on/off signal but is always present in the extracellular fluids – like protons. Indeed some preliminary evidence suggests that OGR1 or GPR4 do not desensitize and internalize upon activation, but this field requires certainly more work and hard data.

*
* *

Communications du Bureau et correspondance

Aux communications du Bureau, le Secrétaire perpétuel remercie l'ensemble des Académiciens qui nous ont communiqué les mots clés de leurs compétences. Ces compétences, avec l'adresse électronique des Collègues qui ont donné leur autorisation, ont été transmises aux différents journalistes scientifiques. Cette liste se retrouve par ailleurs sur le site de l'A.R.M.B.

Il signale que l'approbation du rapport des « Sages-femmes » qui devait avoir lieu le 29 mai dernier a dû être reportée pour des raisons techniques. Il s'agissait d'un avis de la Commission conjointe de la l'Académie royale de Médecine de Belgique et de la « Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België ». Cet avis sera présenté vraisemblablement en octobre 2010.

Il annonce, de la part de M^{me} Ch. Mairesse (F.N.R.S.), le Prix annuel 2011 « Inbev-Baillet-Latour Health », d'une valeur de 250.000 euros, dont le thème s'intitule : « Infectious Diseases and Immunology ». Date limite des candidatures : 30 septembre 2010.

Il rappelle que tout le monde a reçu les formulaires d'inscription pour le programme du Collège de Belgique pour la saison 2011, et il demande aux membres d'encourager leurs collaborateurs de s'inscrire comme conférenciers.

Annnonce également, de la part de M. Alain Prochiantz, Vice-Président du Conseil Scientifique de la Fondation Fyssen, d'un prix scientifique 2010 de cette Fondation. Appel est fait aux candidatures sur le thème considéré pour 2010 : « Evolution de la communication sociale ». Il s'agit d'un Prix international d'une valeur de 60.000 euros. Les candidatures doivent parvenir au secrétariat de la Fondation Fyssen pour le 29 octobre 2010.

Il rappelle que pour les modalités d'élections de membres étrangers correspondants, chaque membre de l'Académie peut recommander un collègue, futur membre correspondant étranger, et transmettre cette candidature au Secrétaire perpétuel ou au secrétariat.

Enfin, il annonce que désormais la séance du mois de juin se tiendra le troisième samedi du mois et non plus le quatrième, à cause des remises des diplômes des trois Facultés francophones du pays aux médecins fraîchement promus, qui aura lieu de façon coordonnée le quatrième samedi du mois de juin au sein des trois Universités.

*
* *

Le Président donne ensuite la parole à M. le Prof. A. Albert au sujet d'un avis de l'Académie relatif à l'interrogation émise par la Commission de la Protection de la Vie Privée concernant l'échange électronique de données relatives à la santé.

COMMISSION DE LA PROTECTION DE LA VIE PRIVÉE (CPVP)

Réponses de l'Académie royale de Médecine de Belgique au questionnaire envoyé par la Commission de la Protection de la Vie Privée concernant l'échange électronique de données relatives à la santé

Question 1. Quels sont, selon vous, les plus grands avantages liés à l'échange électronique de données et quels sont les plus grands risques concernant la sécurité de l'information et la protection de la vie privée lors d'un tel échange de données ?

Avantages

- Le projet télématique belge eHealth s'inscrit dans la logique inéluctable de l'évolution technologique et sociétale du 21^e siècle. Il ouvre le domaine de la médecine et des soins de santé aux technologies de l'information et de la communication.
- Il devrait permettre de simplifier et d'accélérer les opérations administratives résultant de l'activité des soins de santé, d'améliorer le travail du médecin, de faciliter l'échange d'informations pertinentes entre les professionnels de la santé, d'assurer la continuité et la qualité des soins, d'éviter la répétition inutile d'actes et d'exams, en fin de compte de bénéficier au patient. Seul ce dernier objectif peut justifier la mise en œuvre du projet.

- Il a pour but de donner une vue en temps réel de l'activité globale et de la qualité des soins de santé aux autorités de santé publique mais aussi d'assurer un meilleur contrôle et suivi budgétaires.

Risques

- Les bénéfices apportés au patient et à la collectivité par l'informatisation des services, même si la preuve de ces bénéfices n'a pas encore été réellement apportée à ce jour, risquent de mettre en péril le respect de la vie privée et davantage encore le caractère intime et unique du colloque singulier médecin-patient.
- Le projet eHealth ouvre une brèche dans ce qu'il y a de plus profond et de plus précieux dans la relation médecin-patient : le secret professionnel et la liberté de chacun. Les conséquences à long terme de cette situation peuvent être imprévisibles et incontrôlables.
- L'étanchéité parfaite entre, d'une part, les données personnelles des patients recueillies par les professionnels de la santé dans le cadre des activités de soins, et d'autre part, les données collectives codifiées rendues anonymes et impersonnelles par regroupement de données individuelles collectées à des fins de gestion, d'études ou d'évaluation pour divers organismes et institutions, n'est pas garantie. Cette étanchéité doit être telle qu'il soit impossible, sauf circonstances exceptionnelles et dûment approuvées par l'autorité compétente, de remonter des données collectives aux dossiers des patients, et de stigmatiser ainsi un individu ou un groupe de sujets particuliers.
- La loi du 22 août 2002 sur les droits du patient n'ayant pas pu tenir compte des implications multiples du dossier électronique du patient et de ses accès par des réseaux, la mise en place d'un «traçage de tout accès» à des données médicales personnalisées ne revêt pas encore de caractère obligatoire en Belgique. Dans l'avenir, tout patient devrait avoir le droit de consulter la liste garantie complète de tous les accès à ses données de santé personnelles, aussi bien par l'intermédiaire du gestionnaire de son dossier médical que de celui du réseau qui en a autorisé l'accès.

Question 2. Comment les risques susmentionnés sont-ils couverts ? Outre les services déjà mis à disposition, la plate-forme eHealth (et la loi relative à l'institution de cette plate-forme) peut-elle, selon vous, y contribuer et si oui, de quelle façon ?

- Le projet eHealth se veut avant tout une plate-forme d'échanges de données respectant les critères de sécurité et de confidentialité les plus modernes, notamment par des procédures d'authentification strictes et des techniques d'encryptage des données transférées entre partenaires.
- En principe, les informations personnelles échangées ne sont pas enregistrées dans des bases de données. Si tel devait être le cas, les données seraient rendues anonymes et dépersonnalisées. Par ailleurs, leur traitement nécessiterait des autorisations dûment approuvées par les autorités compétentes.

- Un comité sectoriel comportant une chambre médicale a été créé afin de veiller au respect des règles en matière de sécurité et de confidentialité des données.
- Quelles que soient les mesures mises en place par la plate-forme eHealth, il faut garder à l'esprit que la sécurité absolue n'existe pas ! Certes, la fiabilité des dossiers médicaux « papiers » n'est pas absolue non plus mais il n'en existe qu'un exemplaire à un endroit précis ; avec les réseaux informatiques, le dossier peut être consulté de façon ubiquitaire.

Question 3. Avez-vous connaissance d'incidents ou de dysfonctionnements – au niveau du prestataire de soins/de l'institution de soins et/ou au niveau de la plate-forme eHealth – faisant apparaître un risque sur le plan de la sécurité de l'information et de la protection de la vie privée ? Si oui, précisez votre réponse.

Il convient de souligner qu'à ce jour les applications médicales « sensibles », comme l'accès aux dossiers médicaux, semblent avoir été évitées au profit d'applications plus administratives. L'expérience du suivi des vaccinations contre l'influenza AH1N1 montre les difficultés de dialogue en fonction d'intentions prêtées d'applications possibles allant au-delà de l'épidémiologie dans le futur.

Les responsables du Réseau Santé Wallon (RSW) estiment que toutes les mesures et dispositions en matière de transfert d'informations médicales sensibles et personnelles au travers de la plate-forme eHealth ne sont pas prises. C'est la raison pour laquelle ils ont décidé de développer leur propre réseau d'échanges d'informations de soins de santé. Ce réseau vise à relier tous les prestataires de soins, hospitaliers et non hospitaliers, en Wallonie et à Bruxelles. Aucune donnée ne pourrait être échangée sans l'accord préalable du patient ou de son mandataire désigné.

Question 4. Du point de vue spécifique de la protection de la vie privée et de la sécurité de l'information, que pensez-vous de :

a. de la politique élaborée par la plate-forme eHealth en matière de preuve d'une « relation thérapeutique » (1) ?

On peut regretter que la « Note relative à la relation thérapeutique » établie par le Groupe de travail G19 de la plate-forme eHealth n'ait pas fait l'objet d'un plus large débat et consensus au sein du monde médical et en particulier de la Commission fédérale droits du patient. Si cette note a le mérite d'aborder la difficile définition de la « relation thérapeutique », dans le souci du respect des législations relatives à la protection de la vie privée, au secret professionnel et aux droits du patient, on constate qu'elle n'offre pas la garantie d'une protection suffisante des droits des patients. En particulier, l'existence d'une relation thérapeutique entre un praticien et un patient n'implique pas automatiquement que le patient donne, par le fait de cette relation, son consentement pour conférer au praticien l'accès à toutes ses données de santé. L'Académie rejette en tous points l'avis émis le 18 septembre 2009 par la Commission fédérale droits du patient.

(1) <https://www.ehealth.fgov.be/fr/website/home/platform/standards.html>

La plate-forme eHealth peut donner accès aux bases de données de santé, en ce compris le dossier médical du patient, les registres de malades et les données brutes de recherche clinique. Toutefois, ces bases de données doivent être placées sous la responsabilité d'un médecin, maître du fichier, dûment désigné et enregistré, qui seul peut attribuer ou obtenir des autorisations, comme l'enregistrement d'un accord écrit du patient pour certifier une relation thérapeutique.

b. des critères d'homologation définis par la Commission nationale médico-mutualiste pour le logiciel des médecins ? (2)

Les critères d'homologation des logiciels de gestion de dossiers patients en médecine générale (et prochainement en milieu hospitalier) ont fait l'objet d'un long processus de réflexion auquel ont participé les fournisseurs de logiciels, les médecins utilisateurs, les scientifiques et les autorités de Santé publique elles-mêmes. On peut considérer que les aspects spécifiques de protection de la vie privée et de la sécurité des informations, qui constituent un préalable indispensable avant la mise en service de ces logiciels, ont été correctement pris en compte. C'est à l'usage que les logiciels devront être jugés.

Question 5. Concernant la plate-forme eHealth, avez-vous d'autres remarques ou suggestions liées à la sécurité de l'information et à la protection de la vie privée ?

- L'utilisation du numéro d'identification du registre national comme seul identifiant des patients dans le réseau eHealth augmente le risque d'accès à des données médicales personnalisées en dehors de toute relation de soins et ce, en dépit de toutes les mesures de sécurisation qui pourraient être prises.
- Confier la gestion et la gouvernance de la plate-forme eHealth à la Banque Carrefour de la Sécurité Sociale (BCSS) concomitamment à la réalisation de ses activités propres confère à la BCSS à la fois le rôle de juge et partie. Même si la plate-forme eHealth ne sert que de structure d'échanges de données et s'interdit de construire des banques de données, cette façon de procéder n'est acceptable que s'il existe une tierce personnalité juridique (tiers de confiance), indépendante à la fois des professionnels de la santé et des gestionnaires de la Santé publique et de la sécurité sociale, capable de garantir les droits des uns et des autres, d'assurer une imperméabilité parfaite entre les données individuelles et collectives évoquées ci-dessus et d'éviter toute dérive malveillante ou non.
- Le citoyen belge est en droit d'obtenir d'un organisme indépendant une statistique annuelle des résultats d'évaluation d'accès non autorisés à des dossiers médicaux, des sanctions appliquées à ces cas, du nombre de fraudes à l'identité en matière de sécurité sociale et de données médicales, de copies illégales de fichiers médicaux identifiables, de liens illicites obtenus entre banques de données, de l'existence (niée) de fichiers gérés par eHealth, comme l'enregistrement centralisé de relations thérapeutiques et dans ce cas, de la diffusion de l'identité du médecin maître du fichier à qui s'adresser.
- Directement concernés, les professionnels de la santé et les patients eux-mêmes ne sont pas suffisamment représentés au sein des instances de gestion et de contrôle

(2) https://www.ehealth.fgov.be/binaries/website/en/GP_criteria_20091130_final_version_all_criteria.pdf

des activités de la plate-forme eHealth. En effet, l'échange et la collecte de données médicales, dans le but d'une simplification administrative et d'une promotion de la qualité de la pratique médicale, ne devraient pas se faire au détriment de la protection de la vie privée et de la qualité des soins individuels, risques que les utilisateurs sont le mieux à même d'apprécier. L'Académie estime que le choix entre une éthique fonctionnelle (l'efficacité administrative prime sur la protection de la vie privée) et une éthique rigoureuse (la protection de la vie privée prime sur les objectifs) posé par la mise en place de la plate-forme eHealth relève d'un consensus au sein de la société et devrait dès lors faire l'objet d'un vaste débat public.

- L'évaluation des lacunes en matière de sécurité de la plateforme eHealth, prévue par le Parlement deux ans après la parution du texte de sa création, devrait permettre de constater jusqu'où la Commission de la Protection de la Vie Privée aura pu mettre en place des critères objectifs de surveillance des anomalies et des dysfonctionnements possibles évoqués ci-avant. Cette évaluation pourrait considérer la nécessité ou non de légiférer en complément aux textes légaux antérieurs, afin de donner le droit aux patients d'accéder à la liste des personnes ayant consulté leurs données médicales et afin d'assurer aux citoyens un dépistage efficace d'éventuels abus ou accès illicites par un organisme indépendant.

Question 6. De quelle façon les prestataires de soins/les institutions de soins font-ils la promotion de la sécurité de l'information et de la protection de la vie privée en général (politiques standard, normes minimales, formations...)?

En général, les normes minimales de sécurité de l'information sont appliquées : accès aux dossiers strictement contrôlé et réglementé, code d'accès, contrôle de la fréquence des consultations, hiérarchisation des accès (par type de patient, par type de personnel soignant, par localisation, etc.), hiérarchisation des données ; commission de contrôle, comité d'éthique.

Les dossiers médicaux sont sous la responsabilité d'un médecin maître du fichier. En milieu hospitalier, ils sont sous la responsabilité du médecin-chef. Le maître du fichier est chargé de contrôler les accès au dossier médical, de collecter les autorisations écrites des patients, et de prendre position en cas de question inhabituelle. Les dossiers concernant plusieurs personnes comme les dossiers de génétique et de psychiatrie, impliquant des familles et l'entourage, font généralement l'objet d'un contrôle supplémentaire par le maître du fichier de chacune de ces deux spécialités. La consultation d'un médecin ayant une relation thérapeutique est le plus souvent autorisée pour les données de toutes les autres spécialités, dans le respect de la vie privée et du secret médical. Le rôle du maître du fichier est essentiel aussi pour l'utilisation secondaire (recherches, statistiques, etc.) de données primaires (du dossier du patient).

La formation relative à la sécurité des données médicales (confidentialité, intégrité et disponibilité des informations) est obligatoire dans le cadre de la reconnaissance de la spécialité (compétence particulière) de médecin gestionnaire de données de santé par le Ministre de la Santé publique.

Après un échange de vues, le rapport est adopté à l'unanimité des membres présents.

*
* *

Dépôt de rapport

La parole est donnée à M^{me} le Prof. Fr. Meunier pour un rapport concernant les travaux de la Commission « Présidence Européenne ».

Rapport au sujet de la directive sur les essais cliniques et commentaire sur le texte « feam clinical trial directive statement »

Introduction

Quel avenir pour la recherche clinique européenne ?

La recherche clinique est le moteur des progrès thérapeutiques et de la mise en application rapide des découvertes récentes effectuées en recherche fondamentale.

Ces études cliniques portent non seulement sur l'évaluation d'agents innovants prometteurs (le plus souvent réalisés par l'industrie pharmaceutique) mais aussi l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques, c'est-à-dire, les traitements de référence incluant la réalisation d'études cliniques indépendantes et recourant le plus souvent à des combinaisons de traitements, tels que chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie, thérapie cellulaire, etc. selon le principe de multidisciplinarité.

Des questions cliniquement adéquates portent souvent sur l'utilisation optimale et la séquence thérapeutique appropriée de médicaments déjà commercialement disponibles, testés en combinaison avec d'autres modalités thérapeutiques.

Ces études ont un rôle important pour les malades, pour les médecins chercheurs et pour la société, y compris pour les autorités de la santé qui financent les soins. En effet, ces études fournissent les bases scientifiques pour établir des recommandations sur le traitement optimal et ainsi, contribuent à garantir la meilleure utilisation des ressources disponibles pour les soins de santé.

Ces recommandations jouent donc un rôle important et contribuent à accélérer le transfert des résultats de la recherche fondamentale dans la pratique quotidienne.

Cependant, en Europe, moins de 5 % des médecins participent à des études cliniques et moins de 5 % des malades atteints de maladies sévères sont inclus dans des essais cliniques.

Malheureusement, encore trop peu de malades comprennent le bénéfice lié aux essais cliniques et de nombreux obstacles découragent les médecins notamment l'insuffisance

de temps, l'absence ou la rareté des assistants de recherche clinique chargés du recueil des données, la lourdeur et la complexité administrative de la recherche clinique et enfin la difficulté à trouver le financement pour ces recherches indépendantes.

La communauté scientifique européenne avait espéré que l'implémentation par les Etats membres de la nouvelle directive européenne sur les essais cliniques (*directive 2001/20/CE du Parlement européen et du Conseil du 4 avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à l'application de bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain*) prenne en compte les besoins d'harmoniser en Europe le cadre légal pour effectuer les recherches à l'échelle internationale.

Le but initial de cette directive (développée par DG Enterprise) était de faciliter et de promouvoir la recherche clinique en Europe tout en améliorant la sécurité des patients.

Force est de constater que cette directive mise en application le 1^{er} mai 2004, ne semble pas avoir amélioré ni la protection du malade, ni la qualité de la recherche effectuée en Europe.

Au contraire, le manque d'harmonisation des dispositions légales nationales entraîne une surcharge administrative et donc des coûts inhérents à la réalisation de ces recherches cliniques internationales.

L'industrie pharmaceutique dispose de moyens suffisants pour faire face à ces obligations grâce à du personnel employé dans chaque pays européen, ce qui permet de satisfaire les demandes diverses et variées en provenance de chacun de ces pays européens.

Par contre, la réalisation d'études cliniques académiques, c'est-à-dire indépendantes de l'industrie pharmaceutique à l'échelle internationale, relève du parcours du combattant. La viabilité des réseaux de chercheurs et de cliniciens, indépendants de l'industrie pharmaceutique, est cruciale pour la compétitivité de l'Europe.

Il s'agit d'un véritable défi pour la recherche clinique européenne compte tenu du manque de coordination et d'harmonisation des différentes législations nationales tant en ce qui concerne la revue des protocoles par les comités d'éthique, que pour les conditions d'assurance indispensables pour le promoteur responsable des études cliniques et pour la prise en charge du coût et du surcoût pour l'hôpital, des traitements administrés aux malades inclus dans les études cliniques.

Une réelle collaboration au niveau européen est déterminante pour apporter le plus rapidement possible à tous les patients des médicaments plus efficaces et des meilleures stratégies thérapeutiques.

L'alourdissement des procédures de mise en œuvre et de conduite d'études cliniques, l'absence d'harmonisation, comportent un risque majeur d'anéantissement des efforts accomplis depuis des décades dans ce domaine.

Plusieurs estimations ont été faites par des promoteurs académiques de l'impact financier de la directive européenne. L'augmentation du coût de cette recherche clinique académique indépendante s'élève de 30 % à 50 % en fonction de la complexité de l'étude sans compter les délais considérables pour mettre en place une étude.

Il ne faut pas méconnaître cette menace réelle qui plane sur la recherche académique pourtant très efficace et reconnue à l'échelle internationale.

Situation actuelle

La Commission européenne envisage d'évaluer et éventuellement d'aménager la directive.

Une consultation a été initiée et de nombreux organismes ont répondu à cette consultation, actuellement disponible sur le site de la Commission européenne : http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/pharmaceuticals/files/clinicaltrials/docs/2009_10_09_public-consultation-paper.pdf

Lien pour les réponses envoyées à la Commission: http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/pharmaceuticals/human-use/clinical-trials/developments/responses_2010-02_en.htm

Lien pour le résumé des réponses préparées par la Commission: http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/pharmaceuticals/files/clinicaltrials/2010_03_30_summary_responses.pdf

Par ailleurs, la FEAM (Federation of the European Academies of Medicine) a organisé un « FEAM Statement » et a sollicité l'avis des académies, dont l'avis de notre académie.

Propositions

Nous approuvons les recommandations proposées par la FEAM. Toutefois, il faut noter que ce texte est la résultante de compromis entre divers points de vue, notamment en ce qui concerne le « sponsorship » et la possibilité de recourir à un seul sponsor (promoteur de l'étude qui assume la responsabilité légale) versus plusieurs sponsors.

Cette demande est une demande venant essentiellement de l'Angleterre étant donné que la notion de « sponsorship » peut être ambiguë et référer à un financement c'est-à-dire, un soutien donné par des organismes comme des ligues nationales qui octroient un soutien financier sans assumer la responsabilité légale de la conduite des études approuvées.

Nous pensons qu'il y a une distinction à faire entre le promoteur/sponsor légal qui effectue l'étude et ceux qui donnent le soutien financier et en permettent dès lors alors la réalisation.

Les Anglais suggèrent la possibilité de « Multisponsors » et nous ne pensons pas que cette approche soit opportune compte tenu de la complexité des études internationales pour lesquelles, il est essentiel de savoir qui fait quoi et qui en assume toutes les responsabilités y compris en cas de délégation.

D'une manière générale, la conduite d'études réalisées à l'échelle nationale est beaucoup plus simple que la réalisation d'études internationales qui doivent se soumettre à l'ensemble des législations en vigueur dans chaque pays concerné.

Nous souhaitons la prise en considération des difficultés d'études internationales pour un promoteur académique et il est essentiel de préserver en Europe la capacité d'effectuer de grandes études académiques, indépendantes de l'industrie pharmaceutique, et de ne pas se limiter à la réalisation d'études nationales.

Conclusion

En conclusion, notre académie soutient la proposition de la FEAM mais insiste sur la reconnaissance des spécificités liées à la réalisation d'études internationales.

Nous insistons également sur la nécessité d'une approche basée sur le risque et donc sur le type d'études cliniques. Enfin, nous souhaitons la création d'un fonds européen visant à financer les études cliniques académiques menées à l'échelle européenne et de manière indépendante de l'industrie pharmaceutique.

Le rapport est accepté.

*
* *

Prix académiques 2009
(échéance le 11 janvier 2010)
Résumé des travaux couronnés par l'Académie

CONTRIBUTION PERSONNELLE À L'ÉTUDE DE LA FORMATION DES ÉPITHÉLIA DE STRUCTURES TUBULAIRES

par

Ch. PIERREUX

Lauréat du Prix du Concours ordinaire de la 1^{re} Section (2008-2009)

Introduction

Polarité des épithélia. Le fonctionnement d'organes tels que le pancréas, les glandes salivaires ou le rein, dépend de l'architecture particulière de leurs épithélia organisés en tubes simples ou ramifiés. Ces tubes ou tubules sont délimités par des cellules épithéliales différenciées et peu prolifératives organisées en monocouche polarisée entourant la lumière. La polarité structurale et fonctionnelle des cellules se traduit par l'individualisation de trois domaines membranaires distincts, chacun spécialisé dans un type de signalisation. Le domaine apical fait face à la lumière et porte un cil mécanosensoriel ; celui-ci renseigne sur les flux et pressions qui règnent dans la lumière. Le domaine latéral permet l'interaction physique avec les cellules voisines de la monocouche par les complexes jonctionnels ; ceux-ci ont également une fonction de signalisation, en séquestrant ou relarguant des régulateurs transcriptionnels tels que la β -caténine (jonctions adhérentes) ou ZONAB (jonctions serrées). Enfin, le domaine basal est impliqué dans l'adhérence à la matrice extracellulaire ; ce domaine participe à une double signalisation, à la fois par la matrice extracellulaire et les intégrines via le complexe de la focal adhesion kinase, et par les récepteurs des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines (1, 2).

Biogenèse des épithélia. La biogenèse des monocouches épithéliales des différents organes tubulaires de notre corps est complexe et s'opère selon de multiples modalités. Nous pouvons y distinguer deux groupes : a) les organes dont les cellules épithéliales ont une polarité apico-basale dès le stade de cellules précurseurs et qui la conservent tout au long de l'organogenèse (ex.: le poumon), et b) ceux dont les cellules ne se polarisent qu'au cours de l'organogenèse en réponse à des signaux extracellulaires (ex.: glandes sous-maxillaires) (3). Dans tous les cas, deux processus cellulaires, le plus souvent séquentiels, doivent également intervenir : la prolifération et la différenciation. La prolifération permet d'obtenir, à partir de quelques cellules progénitrices, le nombre de cellules nécessaires pour constituer l'organe. Lorsque les cellules d'un tubule se divisent, elles peuvent, en fonction de l'orientation de leur fuseau mitotique, soit allonger le tube (division planaire), soit augmenter le diamètre du tube. Durant la phase de différenciation, un programme génique, permettant à la cellule d'exprimer les protéines requises pour assurer sa fonction au sein de l'organe, est initié par l'activation de facteurs de transcription. Prolifération et différenciation sont contrôlées par des voies de signalisation enclenchées par contact cellule-cellule

ou cellule-matrice extracellulaire; cette dernière contenant des ligands (facteurs de croissance, chémokines...) pour des récepteurs membranaires. Par exemple, au cours du développement du pancréas, la combinaison des voies de signalisation Notch et FGF10, qui assurent respectivement le maintien des cellules dans un état indifférencié et la prolifération, permet l'augmentation du nombre de cellules précurseurs. Par la suite, la différenciation exocrine ou endocrine du pancréas fait appel aux voies de signalisation Wnt et TGF- β , entre autres (4). Enfin, au niveau tissulaire, des *interactions* coordonnées et dynamiques des cellules épithéliales avec leurs voisines, mais aussi avec leur environnement (matrice extracellulaire, mésenchyme, vaisseaux sanguins) participent également à la formation des monocouches polarisées. De nombreuses molécules d'adhésion cellulaire (CAM), agissant de manière homotypique ou hétérotypique, ainsi que des molécules de guidance (sémaphorines, éphrines...) sont impliquées dans ces mouvements cellulaires.

Pathologie des épithélia. Lorsque la polarité est perdue et que la prolifération devient anarchique, des pathologies comme le cancer ou des polykystoses peuvent se développer. Dans les polykystoses, l'élargissement parfois spectaculaire de la lumière résulte le plus souvent d'un défaut dans l'assemblage ou la fonction du cil mécanosensoriel. Ceci entraîne la stimulation aberrante de voies de signalisation (Shh, Wnt, PDGF) normalement actives durant l'embryogenèse, ou réoriente les voies de signalisation vers d'autres cibles. Ainsi, l'absence de cil réoriente la signalisation Wnt, normalement destinée à promouvoir l'allongement des tubes (voie «non canonique»-division planaire), vers des cibles entraînant une augmentation du diamètre du tubule et donc le développement d'une polykystose (voie «canonique»; 5).

Dans les premières étapes de la carcinogenèse des épithélia en monocouche, les cellules transformées perdent leur polarité et prolifèrent de manière incontrôlée, sans respect de l'architecture tubulaire, pour finalement former une masse de cellules épithéliales non polarisées obturant la lumière du tubule (1). L'organisation des cellules en masse tumorale est suivie d'une transition épithélio-mésenchymateuse conduisant à l'invasion tissulaire (6). Dans ce cas également, les voies de signalisation fonctionnelles durant l'embryogenèse sont souvent réactivées de manière aberrante. A titre d'exemple, le facteur de transcription PDX-1, est exprimé dans les précurseurs pancréatiques en prolifération, mais est restreint aux seules cellules productrices d'insuline dans le pancréas mature. Par contre, dans la moitié des adénocarcinomes du pancréas, l'expression de PDX-1 est réinitiée dans les cellules canalaire, ce qui témoigne en outre d'un mauvais pronostic. Par ailleurs, plusieurs composants de la voie de signalisation Notch, réprimés durant le développement embryonnaire pour permettre la différenciation cellulaire, sont abondamment exprimés dans des adénocarcinomes pancréatiques (7). Au total, la perte de l'homéostasie tubulaire, associée au développement de polykystoses ou de tumeurs, est associée à la réactivation de voies de signalisation opérant de manière finement contrôlée durant l'embryogenèse.

Contribution personnelle

L'identification des molécules et voies de signalisation qui régulent la prolifération, la polarisation et la différenciation cellulaire, et donc l'architecture tissulaire, sont importantes, non seulement pour la compréhension du développement embryonnaire, mais également pour l'identification de nouveaux outils moléculaires utiles au diagnostic, au pronostic, et à la thérapie des maladies résultant de dysfonctions épithéliales. Dans ce contexte, l'étude du développement embryonnaire est une excellente approche pour mettre au jour ces outils moléculaires. Ces dernières années, mes travaux se sont focalisés sur la formation des épithélia durant le développement embryonnaire, et sur le contrôle de ce processus par des facteurs de transcription, des voies de signalisation, et des interactions cellulaires.

Initialement, j'ai démontré que le facteur de transcription HNF-6, identifié dans le groupe des Professeurs F. Lemaigre et G. Rousseau, est impliqué dans la morphogenèse du réseau canalaire pancréatique (8). Nous avons démontré que l'expression de HNF-6, très large au début du développement du pancréas, se restreint au cours de l'organogenèse aux seules cellules canalaire. L'inactivation du gène codant HNF-6 montre qu'en absence de ce facteur, le développement des canaux est affecté et que des kystes apparaissent durant la vie embryonnaire (Fig. 1). Ce phénotype est associé à une absence du cil primaire au pôle apical des cellules épithéliales bordant les kystes, et à une réduction de l'expression des gènes requis pour la fonction et/ou la formation du cil. Au cours du développement du pancréas, la présence d'HNF-6 dans les canaux pancréatiques est donc requise pour l'expression d'un réseau de gènes impliqués dans la formation du cil primaire, un organelle important dans la formation et le maintien de l'homéostasie des épithélies tubulaires.

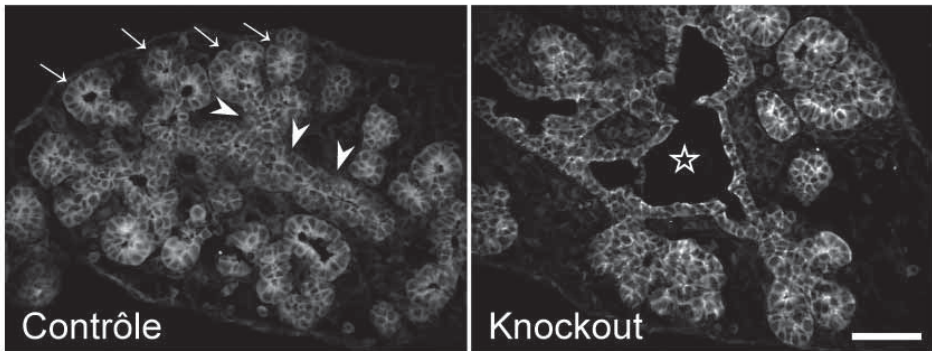


Fig. 1

HNF-6 est requis pour la morphogenèse des canaux du pancréas et le maintien de leur diamètre. Le pancréas embryonnaire (contrôle à e15.5 ; panneau de gauche), visualisé par immuno-marquage de la cadhérine épithéliale, est constitué de canaux (▶) débouchant sur des acini (→). En absence de HNF-6 (knockout, panneau de droite), le diamètre des canaux augmente pour former des kystes (☆). Barre de taille: 50 µm.

Ce travail a également apporté les premiers arguments pour réfuter le modèle prévalant de formation des canaux pancréatiques, communément considéré comme similaire à celui opérant durant la formation de l'arbre bronchique et basé sur le branchement bifide itératif des structures tubulaires. Notre travail propose un modèle différent, inspiré de la morphogenèse des glandes sous-maxillaires. En effet, nos observations en microscopie confocale (multiphotons) démontrent que le développement du pancréas est initié par la formation d'un amas globulaire de cellules non polarisées qui dérivent du feuillet endodermique. Ce dernier étant constitué d'une monocouche de cellule épithéliales polarisées, le pancréas entame son développement par une transition monocouche polarisée à amas de cellules non polarisées. Cet amas épithélial donne ensuite naissance aux structures tubulaires ramifiées par polarisation et réorganisation des cellules épithéliales qui le composent (Fig. 2). La succession de ces deux transitions épithéliales (monocouche polarisée à amas épithélial non polarisé à monocouche polarisée) assure la mise en place du réseau canalaire branché (9).

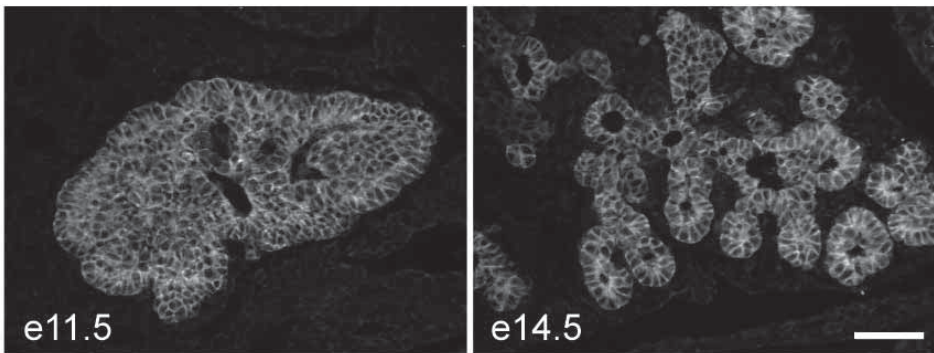


Fig. 2

Les monocouches épithéliales du pancréas proviennent de la réorganisation d'un amas épithélial. Les cellules de l'amas pancréatique (e11.5, panneau de gauche), visualisées par immunomarquage de la cadhérine épithéliale, se réorganisent en canaux et acini à e14.5 (panneau de droite). Barre de taille: 50 μ m.

Dans un deuxième temps, nous avons identifié la chémokine Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1) comme facteur extracellulaire, produit par le mésenchyme pancréatique, qui contrôle la réorganisation d'amas épithéliaux en monocouche polarisée. L'inhibition de la voie de signalisation de SDF1, au moyen d'un inhibiteur pharmacologique ou par inactivation de gènes par transgénèse, bloque la réorganisation de l'amas en monocouche. Nous avons obtenu des résultats comparables sur les glandes sous-maxillaires (9).

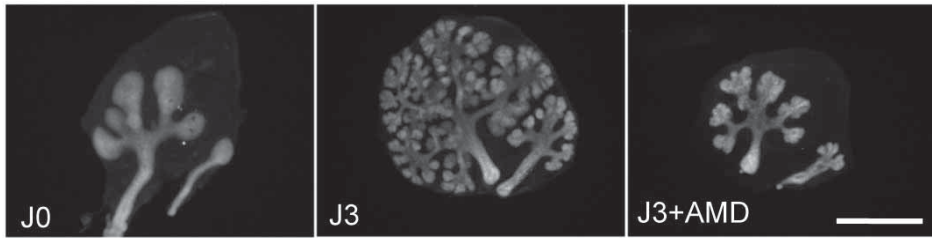


Fig. 3

La formation des canaux et acini des glandes salivaires en culture est bloquée en absence de SDF-1. Visualisation de la cadhérine épithéliale sur des ébauches de glandes salivaires au jour 0 (J0 = e13.5 ; panneau de gauche), après 3 jours de culture avec (J3 ; panneau du milieu), et sans signalisation SDF-1 (J3+AMD ; panneau de droite). En bloquant la signalisation SDF-1, les canaux et acini ne se développent pas. Barre de taille: 500 μm .

Plus récemment, je me suis intéressé aux vaisseaux sanguins qui irriguent le pancréas. Mes données montrent que l'association intime des cellules endothéliales avec l'épithélium pancréatique au cours du développement dépend de la production de VEGF-A par l'épithélium, et contrôle la différenciation exocrine du pancréas (non publié).

Enfin, en collaboration avec le Professeur P. Courtoy, nous nous sommes intéressés à la polarisation des cellules épithéliales du tubule proximal du rein. Nous avons postulé que les facteurs de transcription impliqués dans la prolifération de l'épithélium empêchent simultanément sa différenciation et sa polarisation. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le facteur de transcription ZONAB, et avons montré que l'expression de ZONAB diminue en parallèle à l'acquisition de la polarité apico-basale durant l'ontogenèse du rein et la différenciation de cellules tubulaires proximales *in vitro*. A l'inverse, ZONAB est réexprimé dans les carcinomes à cellules claires du rein. La surexpression de ce facteur dans des cellules en culture stimule la prolifération et réprime la différenciation apico-basale en inhibant (1) l'expression de récepteurs impliqués dans l'endocytose, (2) la maturation de la bordure en brosse, et (3) l'extension du cil primaire. De manière comparable, la stabilisation artificielle de ZONAB dans des cellules différenciées et polarisées entraîne une dédifférenciation des cellules et un retour à l'état prolifératif (10).

En conclusion, nous avons montré dans des cellules du tubule proximal de rein que ZONAB est initialement exprimé et promeut la prolifération tout en réprimant la différenciation, et qu'il disparaît ensuite durant la polarisation et la différenciation épithéliale. La stabilisation de ZONAB dans des cellules différenciées ou sa réexpression dans des carcinomes induit la dédifférenciation et la prolifération. ZONAB est donc un composant essentiel du contrôle de la transition entre prolifération et différenciation.

Conclusions

Nos travaux, originellement focalisés sur l'épithélium pancréatique, montrent que le réseau de canaux ramifiés se terminant par des acini exocrines se forme par la

succession de deux transitions épithéliales opposées. Durant la première transition, les précurseurs pancréatiques au sein de l'endoderme se multiplient rapidement pour générer un amas globulaire, constitué de cellules épithéliales non polarisées, qui bourgeonne dans le mésenchyme environnant. Durant la deuxième transition, les cellules épithéliales de l'amas globulaire se réorganisent et acquièrent une polarité apico-basale. Ceci conduit à la formation d'un réseau primitif de tubules ramifiés et délimités par un épithélium monostratifié.

La formation de ces monocouches épithéliales polarisées dans le pancréas est contrôlée par des facteurs de transcription et par des signaux provenant de l'environnement épithélial, à savoir les cellules mésenchymateuses et les cellules endothéliales. Le facteur de transcription HNF-6 est requis pour le développement des canaux pancréatiques; en son absence des kystes canaux se forment. Dans le rein, nous avons observé que le facteur de transcription ZONAB possède un patron d'expression temporel dynamique requis pour la transition entre prolifération et différenciation. La réexpression de ZONAB dans les carcinomes à cellules claires du rein témoigne de l'importance de ce facteur dans cet équilibre. Nous avons également identifié une chémokine, SDF-1, produite par les cellules mésenchymateuses entourant l'amas pancréatique, qui régule la morphogenèse tubulaire du pancréas et des glandes sous-maxillaires. Enfin, autour de l'épithélium pancréatique, nous avons localisé un réseau de cellules endothéliales dont la position est dictée par l'épithélium et dont une des fonctions est de contrôler la différenciation exocrine.

RÉSUMÉ

La fonction d'organes glandulaires (seins, pancréas exocrine, glandes salivaires) dépend de leur architecture épithéliale tubulaire branchée. Durant le développement du pancréas et des glandes salivaires, nous avons montré la succession de deux transitions épithéliales opposées (monocouche endodermique → amas → monocouches tubulo-glandulaires). Ces transitions sont contrôlées par interactions paracrines via les cellules mésenchymateuses (SDF-1) et les cellules endothéliales (VEGF), et coordonnées par des réseaux transcriptionnels. Le facteur de transcription HNF-6 est indispensable pour la formation des tubes; ZONAB est un acteur du switch prolifération/différenciation des cellules épithéliales, fortement exprimé dans l'amas en prolifération. La compréhension des mécanismes contrôlant la différenciation glandulaire branchée est importante pour la biologie du développement et pourrait éclairer les maladies kystiques et les carcinomes *in situ*.

SUMMARY

The function of glandular organs (mammary and salivary glands, exocrine pancreas) depends on their branched tubular epithelial architecture. During pancreas and salivary glands development, we have shown the succession of two opposite epithelial transitions (monolayer → mass → tubulo-glandular monolayers). These transitions are controlled by paracrine interactions via mesenchymal cells (SDF-1) and endothelial cells (VEGF), and coordinated by transcriptional networks. The transcription factor HNF-6 is indispensable for tube formation; ZONAB is an actor of the proliferation/differentiation switch, highly expressed in the proliferating epithelial mass. Understanding the mechanisms that control branched glandular differentiation is important for developmental biology and could shed light on polykystic diseases and *in situ* carcinomas.

BIBLIOGRAPHIE

1. BRYANT DM., MOSTOV KE., *From cells to organs: building polarized tissue*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 9, 887-901 (2008).
2. DAVIS EE., BRUECKNER M., KATSANIS N., *The emerging complexity of the vertebrate cilium: new functional roles for an ancient organelle*, Dev. Cell., 11, 9-19 (2006).
3. GITTES GK., *Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review*, Dev. Biol., 326, 4-35 (2009).
4. GUPTA GP., MASSAGUE J., *Cancer metastasis: building a framework*, Cell. 127, 679-95 (2006).
5. HEZEL AF., KIMMELMAN AC., STANGER BZ., BARDEESY N., DEPINHO RA., *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*, Genes Dev., 20, 1218-49 (2006).
6. HICK A-C., VAN EYLL JM., CORDI S., FOREZ C., PASSANTE L., NAGASAWA T., VANDERHAEGHEN P., COURTOY PJ., ROUSSEAU GG., LEMAIGRE FP., PIERREUX CE., *Mechanism of primitive duct formation in the pancreas and submandibular glands : a role for SDF-1*, BMC Dev. Biol., 9, 66 (2009).
7. HOGAN BL., KOLODZIEJ PA., *Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis*, Nat. Rev. Genet., 3, 513-23 (2002).
8. LIMA WR., PARREIRA KS., DEVUYST O., CAPLANUSI A., N'KULI F., MARIEN B., VAN DER SMISSEN P., ALVES PM., VERROUST P., CHRISTENSEN EI., TERZI F., MATTER K., BALDAMS., PIERREUX CE*, COURTOY PJ*, *Opposite control by ZONAB of proximal tubules proliferation and differentiation*, J. Am. Soc. Nephrol. 21, 478-488 (2010).
9. NELSON CM., BISSELL MJ., *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis and cancer*, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 22, 287-309 (2006).
10. PIERREUX CE., POLL AV., KEMP CR., CLOTMAN F., MAESTRO MA., CORDI S., FERRER J., LEYNS L., ROUSSEAU GG. and LEMAIGRE FP., *The Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-6 Controls the Development of Pancreatic Ducts in the Mouse*, Gastroenterology, 130, 532-541 (2006).

(UCL/ICP-HORM/CELL.)

*

* *

HOMÉOSTASIE DU COMPARTIMENT LYMPHOCYTAIRE PÉRIPHÉRIQUE AU COURS DE LA LEUCÉMOGÈNESE INDUITE PAR LE VIRUS DE LA LEUCÉMIE BOVINE

par

A. FLORINS

Médaille de l'Académie dans le cadre
du Prix du Concours ordinaire de la 1^{re} Section (2008-2009)

1. Introduction

1.1. Le virus de la leucémie bovine

Le virus de la leucémie bovine (*Bovine leukemia Virus*, BLV) fait partie de la famille des rétrovirus et du genre deltarétrovirus. L'infection de bovins par le BLV peut provoquer l'apparition de la leucose bovine enzootique. Bien que cette maladie soit pratiquement éradiquée en Europe, elle subsiste encore dans certains pays d'Amérique et d'Asie, où elle induit des pertes économiques importantes.

Les lymphocytes B constituent la cible essentielle de ce virus. Étant donné le tropisme lymphocytaire du BLV, le sang constitue une source importante de contaminations, principalement lors de pratiques vétérinaires comme l'écornage, le tatouage et l'utilisation de seringues infectées. Toutefois, la transmission peut également se produire *in utero* lors de l'accouchement (passage de sang maternel vers le fœtus), ainsi que par la prise de colostrum et de lait.

Les bovins infectés par le BLV peuvent présenter trois stades distincts : la phase asymptomatique, la lymphocytose persistante et la phase tumorale, au cours de laquelle les bovins développent des leucémies, des lymphomes ou encore des lymphosarcomes.

1.2. L'infection expérimentale du mouton par le BLV

La découverte des virus humains HTLV-1 et HTLV-2 au début des années '80 a marqué le début de l'intérêt pour le virus BLV comme modèle *in vivo* de rétrovirus responsable de leucémies. Le fait que le virus HTLV soit apparenté au BLV et qu'il présente de nombreuses homologies avec celui-ci a conduit à étudier le virus BLV chez les bovins. Cependant, ce modèle animal présentait deux inconvénients majeurs : la faible fréquence de leucémies chez les bovins infectés (environ 5 %) et le délai de latence relativement long (4 à 10 ans). Ces difficultés ont conduit à l'utilisation d'un hôte non naturel du BLV : le mouton. Ce choix repose sur deux faits principaux : la période de latence est beaucoup plus réduite chez l'ovin (de 1 à 4 ans) et la fréquence de pathologies induites par le virus est nettement plus élevée (presque 100 %). En outre, le système BLV/mouton présente un avantage supplémentaire : le virus ne

semble pas se transmettre naturellement entre individus. Les ovins infectés peuvent donc être maintenus en troupeau sans crainte de contaminations horizontales.

2. Résultats

La leucémie se caractérise par la présence d'un nombre excessif de cellules dans le sang périphérique, éventuellement associée à des modifications phénotypiques de celles-ci. Cette quantité accrue de cellules résulte d'un déséquilibre dans le maintien de ce nombre constant chez un individu : l'homéostasie. Différents paramètres interviennent dans cet équilibre : la production, la prolifération et la mort cellulaire, ainsi que la migration des cellules hors du (ou vers le) compartiment sanguin périphérique (accumulation dans un organe, recirculation des cellules via le système lymphatique...). Dans ce contexte, nous avons étudié différents paramètres intervenant dans l'homéostasie lymphocytaire, dans le cadre de l'infection du mouton par le virus de la leucémie bovine.

Le début de notre travail était basé sur des données obtenues en culture. Dans ces expériences, les lymphocytes B d'animaux infectés présentent des niveaux d'apoptose réduits (Dequiedt *et al.*, 1997). En outre, la prolifération de ces cellules est identique à celle des lymphocytes B de moutons non infectés. La première interprétation de ce résultat serait que le virus protège les cellules infectées de la mort cellulaire programmée et que la leucémie qu'il induit résulte de ce phénomène.

Cependant, grâce à une technique permettant d'évaluer la prolifération cellulaire directement *in vivo* (méthode basée sur l'injection intraveineuse de bromodéoxyuridine), notre groupe a montré que la prolifération cellulaire est accrue chez les moutons infectés par le BLV (Debaq *et al.*, 2002). Cette expérience a démontré que les résultats obtenus en culture (*ex vivo*) ne reflètent pas toujours les phénomènes se déroulant *in vivo*. En outre, en considérant simultanément les taux de prolifération et de disparition des cellules marquées obtenus, la population de lymphocytes B aurait dû croître de 7 % au premier jour de l'expérience. Or, le nombre absolu de cellules circulantes était relativement constant au cours de la période étudiée. Dès lors, il s'est avéré que d'autres paramètres devaient compenser cette augmentation de la prolifération chez les moutons infectés par le BLV.

2.1. Quantification des paramètres cinétiques des populations lymphocytaires à l'aide du CFSE

Un des paramètres qui pourrait intervenir pour compenser la prolifération excessive observée chez les moutons infectés par le BLV est la limitation de la migration des cellules B des organes lymphoïdes vers le compartiment sanguin. Nous avons dès lors utilisé une méthode basée sur l'injection intraveineuse de carboxy-fluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFSE), permettant de marquer les lymphocytes présents dans le sang périphérique. Combinée à la mise en place de cathéters au niveau des vaisseaux lymphatiques, cette technique a permis de tracer les cellules présentes dans le sang ainsi que leur recirculation via le système lymphatique.

L'administration *in vivo* de CFSE conduit au marquage de plus de 98 % des lymphocytes présents dans le sang périphérique. Ce pourcentage de cellules marquées peut alors être suivi au cours du temps grâce à la cytométrie flux. La diminution de ce pourcentage au cours du temps résulte de l'action de différents paramètres : la mort cellulaire¹, la diminution du marquage sous le seuil de détection suite à la prolifération cellulaire², la production *de novo* de lymphocytes par différentes sources (moelle osseuse, plaques de Peyer) ou encore la recirculation de cellules entre le compartiment lymphatique et le sang périphérique.

Etant donné le nombre important de facteurs dont dépend la dynamique des cellules marquées au CFSE, il s'est avéré indispensable de recourir à la modélisation mathématique. Nous avons dès lors établi un modèle mathématique permettant d'estimer les valeurs des différents paramètres intervenant dans la cinétique CFSE grâce à une collaboration avec le docteur Becca Asquith (*Department of Immunology, Imperial College School of Medicine, London*) (Asquith *et al.*, 2006).

Cette méthode a ensuite été appliquée dans le cadre de l'infection du mouton par le BLV. L'expérience a consisté en la mise en place de cathéters au niveau des canaux lymphatiques efférents de ganglions préscapulaires ou mésentériques chez des moutons infectés et chez des animaux contrôles. Après injection intraveineuse de CFSE, le sang et la lymphe ont été collectés à intervalles réguliers.

L'étape suivante a eu pour but d'établir la dynamique (l'évolution du pourcentage de cellules marquées au cours du temps) de différentes sous-populations lymphocytaires au niveau des compartiments sanguin et lymphatique. Pour ce faire, les cellules ont été incubées en présence de différents anticorps et analysées par cytométrie en flux

¹ Il serait plus exact de parler de la disparition des cellules du compartiment sanguin périphérique. En effet, une cellule marquée pourrait sortir de ce compartiment (et donc faire diminuer le pourcentage de cellules positives) sans pour autant mourir. Pour simplifier, nous parlerons de mort cellulaire dans la suite de ce travail.

² Le CFSE se fixe de manière covalente aux extrémités NH₂ des protéines. A chaque division cellulaire, la fluorescence est répartie entre les deux cellules filles.

afin d'estimer la proportion de cellules marquées par le CFSE au sein des différentes populations de lymphocytes.

Ce travail a tout d'abord permis de montrer que les moutons infectés présentent des cinétiques de marquage CFSE similaires à celle des animaux contrôles au niveau des canaux efférents des ganglions étudiés (Debacq *et al.*, 2006).

Il en va cependant tout autrement en ce qui concerne le sang périphérique. En effet, ces expériences ont montré que les moutons infectés présentent des dynamiques radicalement différentes de celles des animaux contrôles : le pourcentage de lymphocytes B marqués au CFSE diminue plus rapidement chez les moutons infectés. En outre, la discrimination des lymphocytes B en différentes sous-populations (B/L-sélectine, B/CD21, B/CD5 et B/CD11b) a mis en évidence le fait que la différence observée au niveau des lymphocytes B était due principalement aux cellules porteuses de l'intégrine CD11b.

Nous avons ensuite appliqué notre modèle mathématique aux données expérimentales et démontré que les taux de disparition des lymphocytes B d'animaux infectés sont supérieurs à ceux d'animaux contrôles. Cependant, aucune différence n'a été détectée en ce qui concerne les taux de prolifération cellulaire. Ce résultat est fondamental : en effet, il suggère que l'excès de prolifération qui avait été mis en évidence au niveau du compartiment lymphatique de moutons infectés (Debacq *et al.*, 2002) peut être compensé par un taux de mort plus élevé des cellules du sang périphérique.

2.2. Rôle de la rate dans le taux de renouvellement des lymphocytes B/CD11b présents dans le sang périphérique de moutons infectés par le BLV

La conclusion essentielle des expériences réalisées au §2.1. est que l'infection par le BLV provoque une augmentation du taux de mort des lymphocytes B du sang périphérique. En outre, cette modification de dynamique a lieu principalement dans la population de lymphocytes B porteurs de l'intégrine CD11b. La suite de ce travail a donc naturellement consisté en l'étude plus approfondie de cette sous-population lymphocytaire.

Chez le mouton, les lymphocytes B/CD11b sont absents de la lymphe, des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer. On les retrouve par contre au niveau du sang périphérique et de la zone marginale de la rate. Il faut également noter que les lymphocytes B recirculant du sang vers la lymphe et les ganglions lymphatiques présentent un phénotype CD11b négatif.

Etant donné la localisation préférentielle des lymphocytes B-CD11b au niveau de la rate, nous avons émis l'hypothèse que cet organe jouait un rôle dans l'augmentation des taux de mort chez les moutons infectés par le BLV.

Afin d'évaluer ce rôle potentiel de la rate, différentes expériences ont été menées. La première a consisté en des prélèvements d'échantillons sanguins à l'entrée (artère splénique) et à la sortie (veine splénique) de la rate d'animaux infectés et contrôles.

Différents paramètres ont ensuite été analysés sur ces cellules (proportions de lymphocytes B et B/CD11b, capacité des cellules infectées à produire des protéines virales en culture et charge provirale). Nous avons ensuite procédé à l'ablation de la rate chez des animaux infectés et contrôles. Du CFSE a été injecté par voie intraveineuse et le sang a été prélevé à intervalles réguliers. Après marquage immunochimique, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Enfin, le modèle mathématique décrit au §2.1. a été appliqué aux données obtenues afin d'évaluer les paramètres intervenant dans la dynamique cellulaire.

Ces expériences ont démontré qu'il n'y avait aucune différence au niveau du phénotype cellulaire à l'entrée et à la sortie de la rate, aussi bien chez les moutons infectés que chez les contrôles (Florins *et al.*, 2006). Cette observation pourrait suggérer que la rate ne joue aucun rôle dans l'augmentation de la mort des lymphocytes chez les animaux infectés. Cependant, un inconvénient majeur de cette expérience est qu'elle ne présente qu'une vue instantanée du phénotype cellulaire dans l'artère et la veine splénique. Or, le débit sanguin au niveau de la rate est très élevé (5% du volume sanguin total transite par la rate chaque minute). Etant donné que 11.9% des cellules meurent en moyenne en 24 heures chez un mouton infecté (Debacq *et al.*, 2006), il n'est finalement pas surprenant qu'aucune différence majeure ne soit détectable via cette approche.

L'étude à plus long terme (*i.e.* sur une période de trois mois) de la dynamique cellulaire a révélé un résultat très intéressant : suite à la splénectomie, les lymphocytes B de moutons infectés disparaissent du sang à la même vitesse que chez les moutons contrôles. En outre, une observation similaire a été réalisée en ce qui concerne la population de lymphocytes B/CD11b. Après modélisation mathématique des données, il s'est avéré que la splénectomie provoque une diminution du taux de mort chez les moutons infectés pour atteindre des valeurs similaires à celles des animaux contrôles.

Nous avons donc mis en évidence le rôle essentiel joué par la rate dans l'augmentation du taux de mort des lymphocytes B/CD11b chez les moutons infectés par le BLV.

2.3. Effets du valproate sur l'expression du virus de la leucémie bovine, l'apoptose et la leucémie induite

Au cours des paragraphes précédents, nous avons démontré que l'infection du mouton par le BLV provoque une augmentation de la prolifération dans le système lymphoïde associée à un accroissement de la mortalité des cellules du sang périphérique. Par ailleurs, la rate exerce un rôle essentiel dans cette dynamique. Il apparaît donc que le système lymphoïde module étroitement la cinétique des cellules infectées par le BLV. Or, la plupart des cellules infectées n'expriment pas de protéines virales dans le sang périphérique. Cependant, les titres élevés en anticorps et la présence de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques suggèrent qu'il existe une forte réponse immune dirigée contre le BLV. La condition nécessaire pour qu'une cellule survive est donc de ne pas exprimer d'antigène viral.

Suite à ces observations, une stratégie thérapeutique visant à induire l'expression virale a été menée. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur d'histones désacétylases, le valproate (VPA). De manière simplifiée, ce type de molécule permet, via l'inhibition d'histones désacétylases, de décondenser la chromatine et donc d'augmenter la transcription de gènes viraux et cellulaires.

La première partie de cette étude a consisté à étudier l'effet du VPA sur l'expression virale *in vitro*. Pour ce faire, deux types de lignées cellulaires ont été transfectées avec des plasmides contenant le promoteur LTR du BLV cloné en amont d'un gène rapporteur (le gène de la luciférase). Nous avons montré que le valproate augmentait l'expression de ce gène rapporteur (Achachi *et al.*, 2005).

Par la suite, nous avons évalué l'impact du VPA sur l'apoptose et l'expression virale *ex vivo*. Pour réaliser cette étude, des lymphocytes primaires ont été isolés à partir du sang périphérique de moutons infectés et ont été mis en culture en présence de VPA. Nous avons ainsi montré que le valproate augmentait la proportion de cellules apoptotiques, ainsi que la quantité de protéines virales produites.

Enfin, les effets du VPA ont été évalués directement *in vivo* chez le mouton. La méthode a consisté en l'injection répétée de la molécule chez des animaux au stade leucémique de la maladie. Ce traitement a provoqué, chez les trois moutons étudiés, une diminution radicale du nombre absolu de lymphocytes B dans le sang. Il est également important de noter l'innocuité d'un traitement équivalent chez un animal non infecté.

En conclusion, nous avons montré qu'une stratégie basée sur l'activation des gènes présentait des effets curatifs chez des moutons au stade néoplasique de la maladie.

2.4. La dynamique cellulaire et la réponse immune à l'infection par le BLV : un modèle global

Un point crucial qui a été mis en avant dans ce travail est que l'infection du mouton par le BLV conduit à une accélération du taux de renouvellement cellulaire (*turnover*). En effet, nous avons montré que l'augmentation du taux de prolifération des lymphocytes B induite par le BLV pouvait être compensée par la mort plus importante des cellules du compartiment sanguin. En outre, la rate joue un rôle primordial dans ce processus.

Une hypothèse vraisemblable pour expliquer ces taux de mort élevés est qu'une réponse immune dirigée contre les protéines virales permet l'élimination des cellules infectées. Cependant, aucune technique n'a jamais permis de détecter directement des protéines virales à partir de cellules issues du sang périphérique d'un animal infecté. Par contre, la mise en culture de ces cellules déclenche l'expression du virus. L'absence d'expression du virus *in vivo* et la stimulation permanente de la réponse immune dirigée contre les protéines virales sont deux observations paradoxales. Une explication qui pourrait concilier ces deux phénomènes est que les lymphocytes infectés expriment réellement des protéines virales *in vivo*, mais que ces cellules se font immédiatement éliminer par la réponse immune spécifique au BLV. Dans ce cas,

l'induction de l'expression virale conduirait à une élimination plus importante du nombre de cellules infectées, ce qui est par ailleurs une explication séduisante des effets thérapeutiques du VPA observés chez des animaux leucémiques (§2.3.).

Ces considérations nous ont amené à établir un modèle englobant les différentes connaissances sur le sujet (Florins *et al.*, 2007).

La propagation du BLV au sein de l'hôte peut s'effectuer par deux mécanismes différents. D'une part, l'expression de protéines virales peut conduire à la formation de virions capables d'infecter une nouvelle cellule : on parle alors de « néo-infection ». D'autre part, étant donné que le virus est intégré dans l'ADN de la cellule hôte, la mitose de cette dernière contribuera également à l'augmentation du nombre de cellules infectées : il s'agit de « l'expansion clonale » du virus. Or, des études par PCR inverses semi-quantitatives ont démontré que, lors des phases asymptomatique et néoplasique de l'infection, la propagation du virus était due principalement au processus d'expansion clonale. Après une phase de fluctuations dans l'abondance des différents clones, ce processus conduit irrémédiablement au développement de la leucémie ou de lymphomes/lymphosarcomes. En outre, cette phase est caractérisée par l'émergence d'un clone cellulaire qui était déjà présent peu de temps après l'infection virale. La question qui s'est alors posée a été de savoir quels étaient les facteurs provoquant l'expansion clonale des cellules infectées. En d'autres mots, comment le virus pourrait-il favoriser la survie de sa cellule hôte? Le mécanisme proposé ici est une prolifération cellulaire induite par l'expression de l'oncogène viral Tax. Par ailleurs, l'expression de Tax conduit à une réponse immune dirigée contre l'antigène viral, provoquant ainsi la destruction de la cellule hôte. Ceci explique que les cellules produisant des protéines virales ne sont pas détectables. Cependant, étant donné que la présence du transcrit *tax/rex* précède l'apparition des autres ARNm viraux, une hypothèse probable est que l'expression du virus s'interrompt, permettant à la cellule d'échapper à la sélection immune. L'expression de Tax présenterait donc deux effets contradictoires : elle confère un avantage sélectif à la cellule hôte via l'induction de la prolifération, mais d'autre part, cette production de la protéine virale provoque la destruction des cellules par le système immunitaire. Dans ce contexte, les effets thérapeutiques d'une molécule comme le VPA s'expliquent par une augmentation de l'expression virale et donc par un accroissement du nombre de cibles potentiellement détruites par le système immunitaire. En outre, ce modèle implique que le *turnover* des cellules doit être plus rapide chez les animaux infectés, ce qui a également été observé dans nos études de dynamique cellulaire.

3. Conclusion

En conclusion, nous avons montré dans ce travail que l'infection expérimentale du mouton par le virus de la leucémie bovine conduit à une augmentation du taux de renouvellement des cellules. En outre, ces modifications des paramètres dynamiques semblent être étroitement liées à la réponse immune dirigée contre le BLV. Ceci nous a amené à établir un modèle dans lequel l'expression de protéines virales par les cellules

infectées conduit à un équilibre entre l'induction de la prolifération et leur élimination par le système immunitaire.

RÉSUMÉ

La leucémie se caractérise notamment par une augmentation du nombre de cellules dans le sang périphérique. Ce processus pathologique constitue une dérégulation de l'homéostasie résultant potentiellement d'une altération de différents paramètres intervenant dans la dynamique cellulaire. Dans ce contexte, nous avons étudié les processus d'homéostasie dans le cadre de l'infection du mouton par le virus de la leucémie bovine (BLV). Dans ce modèle expérimental, nous avons démontré l'accroissement des taux de mort cellulaire suite à l'infection par le BLV et souligné le rôle primordial exercé par la rate dans ce processus. Sur base de ces observations, nous avons proposé, élaboré et testé une nouvelle approche thérapeutique reposant sur le principe d'activation de l'expression virale. Enfin, nous compilons l'ensemble de nos résultats dans un modèle récapitulatif.

SUMMARY

One of the parameters characterizing leukemia is an increase in the peripheral blood cell numbers. As a deregulation of homeostasis, this pathological process might result from an alteration of different parameters modulating cell dynamics. In this context, we studied homeostasis during infection of sheep infected by bovine leukemia virus (BLV). In this experimental model, we demonstrated that the cell death rates are increased after BLV infection and that the spleen exerts a key role in this process. We next proposed, elaborated and tested a novel therapeutic approach based on activation of viral expression. Finally, we summarized our observations in a recapitulative model.

BIBLIOGRAPHIE

1. ACHACHI A., FLORINS A., GILLET N., DEBACQ C., URBAIN P., FOUTSOP G. M., VANDERMEERS F., JASIK A., REICHERT M., KERKHOFS P., LAGNEAUX L., BURNY A., KETTMANN R. AND WILLEMS L., *Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102,10309-10314 (2005).
2. ASQUITH, B., C. DEBACQ, A. FLORINS, N. GILLET, T. SANCHEZ-ALCARAZ, A. MOSLEY, AND L. WILLEMS, *Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)*, Proc. Biol. Sci., 273,1165-1171, (2006).
3. DEBACQ C., ASQUITH B., KERKHOFS P., PORTETELLE D., BURNY A., KETTMANN R., WILLEMS L., *Increased cell proliferation, but not reduced cell death, induces lymphocytosis in bovine leukemia virus-infected sheep*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (15), 10048-10053 (2002).
4. DEBACQ C., GILLET N., ASQUITH B., SANCHEZ-ALCARAZ M. T., FLORINS A., BOXUS M., SCHWARTZ-CORNIL I., BONNEAU M., JEAN G., KERKHOFS P., HAY J., THEWIS A., KETTMANN R. AND WILLEMS L., *Peripheral blood B-cell death compensates for excessive proliferation in lymphoid tissues and maintains homeostasis in bovine leukemia virus-infected sheep*, J. Virol., 80,9710-9719 (2006).
5. DEQUIEDT F., HANON E., KERKHOFS P., PASTORET P.P., PORTETELLE D., BURNY A., KETTMANN R., WILLEMS L., *Both wild-type and strongly attenuated bovine leukemia viruses protect peripheral blood mononuclear cells from apoptosis*, J.Virol., 71(1), 630-639 (1997).
6. FLORINS A., GILLET N., ASQUITH B., BOXUS M., BURTEAU C., TWIZERE J. C., URBAIN P., VANDERMEERS F., DEBACQ C., SANCHEZ-ALCARAZ M. T., SCHWARTZ-CORNIL I., KERKHOFS P., JEAN G., THEWIS A., HAY J., MORTREUX F., WATTEL E., REICHERT M., BURNY A., KETTMANN R., BANGHAM C. AND WILLEMS L., *Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model*, Front Biosci., 12, 1520-1531 (2007).

7. FLORINS, A., N. GILLET, B. ASQUITH, C. DEBACQ, G. JEAN, I. SCHWARTZ-CORNIL, M. BONNEAU, A. BURNY, M. REICHERT, R. KETTMANN, AND L. WILLEMS, *Spleen-dependent turnover of CD11b peripheral blood B lymphocytes in bovine leukemia virus-infected sheep*, *J. Virol.*, 80,11998-12008 (2006).

(*Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire*).

*
* *

APPLICATIONS DE L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE EN MILIEU NON AQUEUX EN ANALYSE CHIRALE PHARMACEUTIQUE ET BIOMÉDICALE

par

M^{me} A.-C. SERVAIS

Lauréate du Prix du Concours ordinaire de la 5^e Section (2008-2009)

I. INTRODUCTION

Le dosage de molécules médicamenteuses dans les préparations pharmaceutiques et dans les fluides biologiques, la détermination du profil d'impuretés d'une substance active, les séparations chirales nécessitent la mise en œuvre de techniques d'analyse performantes, fiables et robustes. C'est dans ce contexte que l'électrophorèse capillaire s'est considérablement développée. Conçue au départ pour l'analyse de macromolécules biologiques, elle s'est révélée être extrêmement utile dans de nombreux autres domaines et a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives.

L'électrophorèse capillaire repose sur le déplacement d'espèces chargées dans un champ électrique au sein d'un tube capillaire rempli d'un milieu conducteur. La séparation des analytes résulte de différences entre leurs vitesses de migration, comme en électrophorèse sur gel.

I.1. PRINCIPES DE STÉRÉOCHIMIE

Les molécules caractérisées par la présence d'un centre d'asymétrie peuvent exister sous deux formes, images l'une de l'autre dans un miroir, appelées énantiomères. Elles sont qualifiées de molécules chirales (du grec, *keir*, main) parce que, comme les mains, ces molécules ne sont pas superposables à leurs images dans un miroir. L'asymétrie est généralement bâtie autour d'un atome de carbone substitué par quatre groupements différents mais d'autres atomes comme le soufre, le silicium ou le phosphore peuvent également donner naissance à des composés chiraux.

Les propriétés physico-chimiques des énantiomères sont identiques dans un environnement non asymétrique mais leurs comportements peuvent être différents si le milieu est asymétrique. Un mélange formé de quantités égales (ou pratiquement égales) de deux énantiomères est qualifié de racémique.

I.2. CHIRALITÉ ET PHARMACOLOGIE

La chiralité est une des caractéristiques fondamentales de la biologie. En effet, les récepteurs ainsi que les enzymes, formés essentiellement d'acides aminés lévogyres, constituent un environnement asymétrique. L'interaction entre un médicament et son récepteur est un phénomène tridimensionnel et si la molécule possède un caractère chiral, cette interaction est généralement stéréosélective. Des différences significatives peuvent dès lors apparaître en ce qui concerne les propriétés pharmacocinétiques ou l'activité pharmacodynamique des deux énantiomères qui possèdent leur propre affinité ou activité intrinsèque au niveau des sites récepteurs.

Nonobstant ces connaissances du problème, la majorité des substances médicamenteuses chirales ont été développées et utilisées sous la forme de mélanges racémiques tout au long du XX^e siècle. La raison principale en est que les méthodes de synthèse conduisaient aux mélanges racémiques et que la production à grande échelle des énantiomères purs était techniquement et économiquement jugée irréaliste.

Bien que les différences d'activité entre énantiomères soient connues depuis plusieurs décennies, ce n'est qu'au milieu des années 1980 que l'importance de la stéréosélectivité dans le devenir *in vivo* d'un médicament a été prise en compte et les possibles conséquences thérapeutiques appréciées. Ce regain d'intérêt pour la pharmacologie tridimensionnelle est étroitement lié aux progrès rapides de la chimie analytique au cours de ces deux dernières décennies, progrès qui ont permis non seulement un développement significatif des méthodes de synthèse stéréosélective mais également la détermination des énantiomères de nombreuses substances médicamenteuses chirales au sein des fluides biologiques.

I.3. CHIRALITÉ ET ANALYSE

Le développement rapide, au cours des dernières décennies, de méthodes permettant de séparer les énantiomères de composés chiraux découle indubitablement de la nécessité de réaliser rapidement et efficacement des analyses stéréosélectives dans des domaines aussi variés que la recherche et la production de médicaments, les sciences de la vie, la toxicologie et la chimie organique.

Plus particulièrement, la synthèse ou la production des énantiomères purs de substances médicamenteuses chirales constitue un défi majeur de l'industrie pharmaceutique. Dès lors, il appartient aux analystes de développer des méthodes de séparation énantiomérique particulièrement efficaces afin de contrôler la synthèse

ou de vérifier la pureté énantiomérique mais également dans le but de permettre la réalisation d'études pharmacologiques comparatives sur chacun des énantiomères.

Ces vingt dernières années, la majorité des séparations énantiomériques ont été réalisées au moyen de techniques chromatographiques, et plus particulièrement en chromatographie liquide. Pourtant, la chromatographie liquide peut souffrir d'inconvénients non négligeables tels qu'une faible efficacité de séparation, le coût élevé des phases stationnaires chirales ou la nécessité de quantités relativement importantes de sélecteurs chiraux à introduire dans la phase mobile.

Ainsi, l'électrophorèse capillaire s'est révélée être une alternative particulièrement intéressante à la chromatographie liquide en regard de l'efficacité extrêmement élevée qui peut être atteinte en électrophorèse capillaire (EC) de zone, du large éventail de sélecteurs chiraux qui peuvent être simplement ajoutés au tampon de séparation sans devoir disposer d'une armada de phases stationnaires chirales ainsi que de la possibilité de tester aisément de nouveaux sélecteurs chiraux, parfois de coût très élevé, étant donné que de très faibles quantités de réactifs sont généralement nécessaires.

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'électrophorèse capillaire a suscité, ces dernières années, un regain d'intérêt en raison de l'apparition d'une nouvelle approche, à savoir l'application d'un électrolyte non aqueux en tant que milieu de séparation. Cet engouement découle de la possibilité d'analyser les substances insolubles dans l'eau, de générer des sélectivités de séparation différentes par rapport aux tampons aqueux ou encore de faciliter le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse. De plus, les solvants organiques caractérisés par une faible constante diélectrique favorisent les interactions intermoléculaires telles que les liaisons hydrogène, les interactions ion-ion et ion-dipôle et peuvent dès lors ouvrir de nouvelles perspectives, à l'instar de la formation de paires d'ions.

Nous avons étudié les potentialités de l'EC en milieu non aqueux pour séparer les énantiomères de molécules basiques. La séparation d'énantiomères constitue un défi majeur de l'industrie pharmaceutique, étant donné qu'il s'agit d'un des problèmes analytiques les plus difficiles à résoudre. Aussi l'apport d'une nouvelle approche permet d'étoffer la panoplie des méthodes dont disposent les analystes et peut se révéler être une alternative particulièrement intéressante en cas de séparation difficile.

Au cours de notre thèse de doctorat, nous avons notamment prouvé qu'il était possible de doser les énantiomères d'une molécule médicamenteuse basique en EC en milieu non aqueux au sein d'une matrice biologique, en l'occurrence de l'urine. En effet, cette option n'avait jamais été démontrée et nous l'avons appliquée avec succès à la séparation et au dosage des énantiomères du salbutamol dans l'urine au moyen de l'heptakis (2,3-di-*O*-acétyl-6-*O*-sulfo)- β -cyclodextrine (HDAS- β -CD). La première étape de l'optimisation de la méthode bioanalytique a consisté à optimiser

la composition de la solution d'électrolyte afin de permettre la résolution complète des énantiomères du salbutamol dissous dans du méthanol. Cependant, étant donné la présence dans l'urine de composés endogènes susceptibles d'interférer avec le processus électrophorétique, il n'est pas possible d'effectuer directement le dosage par électrophorèse capillaire. Nous avons donc mis au point une procédure d'extraction en phase solide afin d'effectuer le traitement des échantillons urinaires et permettre ainsi la détermination des énantiomères de composés chiraux. La méthode de dosage a été entièrement validée sur une gamme de concentrations allant de 375 à 7500 ng/ml pour chaque énantiomère. Cette méthode a pu ensuite être transférée avec succès au couplage en ligne de l'EC à la spectrométrie de masse 4. Les limites de quantification obtenues pour les deux énantiomères (20 ng/ml) témoignent d'une amélioration significative de la sensibilité par rapport à la méthode EC-UV.

Jusqu'à présent, nous nous étions focalisé sur la séparation énantiomérique de substances médicamenteuses basiques, qui constituent la majorité de l'arsenal pharmaceutique. Nous avons dès lors voulu étendre le champ d'application de l'EC en milieu non aqueux à la résolution énantiomérique de médicaments acides. Dans cette optique, nous avons évalué l'intérêt d'utiliser des isomères purs dérivés de l'amino- β -CD pour séparer les énantiomères de substances médicamenteuses acides (principalement des anti-inflammatoires non stéroïdiens) en EC en milieu non aqueux 1. Nous avons mis en évidence l'importance des interactions électrostatiques pour la formation d'un complexe entre la CD cationique et les analytes acides étant donné que seuls les composés sous leur forme anionique ont pu être résolus en utilisant les CD cationiques étudiées. Ensuite, nous avons établi les conditions expérimentales de base permettant de séparer les énantiomères des substances médicamenteuses choisies comme modèles. La méthodologie des plans d'expériences a ensuite été appliquée et, à partir de l'ensemble des résultats obtenus, des conditions génériques ont été déduites en termes de résolution et de temps d'analyse pour les différents analytes.

Au cours de notre mandat de chargé de recherches au FNRS, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'énantiomère R du flurbiprofène qui fait actuellement l'objet d'études cliniques afin d'évaluer son intérêt dans la prévention de la maladie d'Alzheimer. Nous avons développé une méthode permettant de doser les énantiomères du flurbiprofène en EC en milieu non aqueux dans le plasma. La méthode mise au point a été validée et les limites de quantification déterminées pour les deux énantiomères (0,2 μ g/ml) se sont avérées suffisamment basses en regard des concentrations attendues dans le plasma 8.

Nous nous sommes également penchés sur la détermination de la pureté énantiomérique du R-flurbiprofène en EC 6. La détermination de la pureté énantiomérique du R-flurbiprofène avec une limite de quantification appropriée (0,1%) pour l'impureté (énantiomère S) a pu être réalisée en utilisant la méthode des ajouts dosés. Finalement, la méthode développée a été entièrement validée en appliquant la stratégie faisant appel aux profils d'exactitude.

Durant notre séjour post-doctoral dans le laboratoire du Prof. G.J. de Jong (Utrecht University, Utrecht, Pays-Bas), nous nous sommes intéressés aux phénomènes de suppression d'ionisation qui peuvent survenir dans la source électrospray lors du couplage de l'EC à la spectrométrie de masse et plus particulièrement, à l'influence de l'électrolyte sur le processus d'ionisation ³. Il s'est avéré que, non seulement le choix de la CD anionique, mais également de l'électrolyte peut fortement affecter le signal de l'analyte en spectrométrie de masse.

Les premières phases du développement d'une nouvelle substance médicamenteuse mettent notamment en œuvre des systèmes *in vitro* qui miment la fonction hépatique. Dans le cas d'un médicament administré sous la forme d'un mélange racémique, un monitoring stéréospécifique est évidemment requis puisque les enzymes hépatiques sont capables de discriminer les énantiomères. Généralement, ce type d'analyse s'effectue par chromatographie liquide au moyen de phases stationnaires chirales, peu de méthodes ayant été développées jusqu'à présent en EC. Nous avons très récemment évalué le potentiel de l'EC en milieu non aqueux dans ce domaine particulier : cette nouvelle thématique a été initiée par l'étude du métabolisme *in vitro* du fenbendazole en utilisant des fractions microsomiales ⁷. Le fenbendazole fait partie de la famille des composés benzimidazolés, utilisés dans le traitement des maladies parasitaires. Il s'agit d'une molécule prochirale donnant lieu à des métabolites chiraux (oxfendazole) et non chiraux (fenbendazole sulfone). La méthode développée s'est révélée être particulièrement bien adaptée à la détermination simultanée du fenbendazole, des énantiomères de l'oxfendazole ainsi que du fenbendazole sulfone. Après incubation du fenbendazole dans des fractions microsomiales animales, nous avons pu mettre en évidence la présence des énantiomères de l'oxfendazole et du fenbendazole sulfone ⁷.

Etant donné que l'EC ne permet pas d'élucider complètement les mécanismes d'interaction entre analyte et CD, il est nécessaire de recourir à d'autres techniques afin d'obtenir des informations complémentaires. Parmi celles-ci, la RMN constitue une des techniques les plus puissantes même s'il n'est pas aisé d'élucider les mécanismes d'interaction lorsque de très faibles différences de reconnaissance chirale sont observées. Une collaboration vient d'être initiée avec le Prof. Bezhan Chankvetadze (Tbilisi State University, Tbilisi, Géorgie) afin d'élucider les mécanismes d'interaction moléculaire (géométrie du complexe) en milieu méthanolique au moyen de la RMN ⁵. Compte tenu des difficultés mentionnées précédemment, l'approche préconisée consiste à élucider les mécanismes structurels des complexes analyte/CD en présence de sélecteurs chiraux ayant une affinité opposée pour les deux énantiomères. C'est pour cette raison que nous nous sommes plus particulièrement intéressés au propranolol, dont l'ordre de migration des énantiomères est inversé en présence de l'heptakis(2,3-di-*O*-méthyl-6-*O*-sulfo)- β -CD (HDMS- β -CD) par rapport à la HDAS- β -CD. Dans le cadre de cette étude, nous avons notamment pu mettre en évidence qu'en milieu méthanolique, les énantiomères du propranolol forment des complexes externes particulièrement labiles avec la HDMS- β -CD tandis que les interactions avec la HDAS- β -CD donnent lieu à des complexes d'inclusion nettement plus stables.

Nous pouvons dès lors affirmer que l'EC en milieu non aqueux s'avère être une technique particulièrement intéressante pour le dosage des énantiomères de substances médicamenteuses dans les matrices biologiques, la détermination de la pureté énantiomérique ainsi que pour des études de métabolisme *in vitro*.

RÉSUMÉ

Les potentialités de l'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux pour l'analyse chirale ont été démontrées au travers de nombreuses applications pharmaceutiques et biomédicales, telles que le dosage stéréosélectif de médicaments acides et basiques en milieu plasmatique et urinaire ainsi que des études de métabolisme *in vitro*. Un aspect fondamental du contrôle de qualité de médicaments énantiomériquement purs, à savoir la détermination de la pureté énantiomérique, a également été envisagé. En outre, les mécanismes d'interaction moléculaire à la base des séparations chirales observées dans les systèmes non aqueux ont été élucidés à l'aide de la résonance magnétique nucléaire.

SUMMARY

The potentialities of nonaqueous capillary electrophoresis for chiral analysis were demonstrated through many pharmaceutical and biomedical applications, such as the stereoselective assay of acidic and basic drugs in plasma and urine as well as *in vitro* metabolism studies. A fundamental aspect of the quality control of chiral drugs in single-isomer forms, i.e. the enantiomeric purity determination, was also investigated. Moreover, the mechanisms of intermolecular interactions involved in the chiral separations observed in nonaqueous systems were elucidated using nuclear magnetic resonance.

BIBLIOGRAPHIQUE

1. FRADI I.*, SERVAIS A.-C.*, PEDRINI M., CHIAP P., IVANYI R., CROMMEN J., FILLET M., *equally contributed to this work, *Enantiomeric separation of acidic compounds using single-isomer amino cyclodextrin derivatives in nonaqueous capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*, 27, 3434-3442 (2006).
2. SERVAIS A.-C., CHIAP P., HUBERT Ph., CROMMEN J., FILLET M., *Determination of salbutamol enantiomers in human urine using heptakis (2,3-di-O-acetyl-6-O-sulfo)- β -cyclodextrin in nonaqueous capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*, 25, 1632-1640 (2004).
3. SERVAIS A.-C., FILLET M., MOL R., ROUSSEAU A., CROMMEN J., SOMSEN G.W., DE JONG G.J., *Influence of the BGE composition on analyte response in CD-mediated NACE-MS*, *Electrophoresis*, 31, 1157-1161 (2010).
4. SERVAIS A.-C. *, FILLET M.*, MOL R., SOMSEN G.W., CHIAP P., DE JONG G.J., CROMMEN J., *equally contributed to this work, *On-line coupling of cyclodextrin mediated nonaqueous capillary electrophoresis to mass spectrometry for the determination of salbutamol enantiomers in urine*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40, 752-757 (2006).
5. SERVAIS A.-C. *, ROUSSEAU A. *, FILLET M., LOMSADZE K., SALGADO A., CROMMEN J., CHANKVETADZE B., *equally contributed to this work, *Separation of propranolol enantiomers by CE using sulfated β -CD derivatives in aqueous and non-aqueous electrolytes: Comparative CE and NMR study*, *Electrophoresis* 31, 1467-1474 (2010).
6. ROUSSEAU A., CHIAP P., IVANYI R., CROMMEN J., FILLET M., SERVAIS A.-C., *Validation of a nonaqueous capillary electrophoretic method for the enantiomeric purity determination of R-flurbiprofen using a single-isomer amino cyclodextrin derivative*, *J. Chromatogr. A*, 1204, 219-225 (2008).

7. ROUSSEAU A., GILLOTIN F., CHIAP P., CROMMEN J., FILLET M., SERVAIS A.-C., *Association of two single-isomer anionic CDs in NACE for the chiral and achiral separation of fenbendazole, its sulphoxide and sulphone metabolites. Application to their determination after in vitro metabolism*, Electrophoresis, 31, 1482-1487 (2010).
8. ROUSSEAU A., PEDRINI M., CHIAP P., IVANYI R., CROMMEN J., FILLET M.*, SERVAIS A.-C.*, *equally contributed to this work, *Determination of flurbiprofen enantiomers in plasma using a single-isomer amino cyclodextrin derivative in nonaqueous capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 29, 3641-3648 (2008).

(Université de Liège, Laboratoire d'Analyse des Médicaments –
Professeur J. CROMMEN.)

*
* *

UN NOUVEAU SYSTÈME PROTÉIQUE PROTÈGE LES CYSTÉINES CÉLIBATAIRES CONTRE LE STRESS OXYDANT

par

J.-F. COLLET

Lauréat du Prix Alvarenga de Piauhy 2009

1. Introduction

La formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéine stabilise la structure de nombreuses protéines sécrétées. Les ponts disulfures peuvent se former spontanément en présence d'oxygène. Cependant, il s'agit d'un processus relativement lent qui peut prendre jusqu'à plusieurs heures *in vitro*. Afin d'assurer la formation rapide de ces ponts disulfures, les cellules possèdent des protéines qui catalysent l'oxydation des résidus cystéine au cours du repliement des protéines naissantes. Dans mon laboratoire, nous nous intéressons à la formation des ponts disulfures chez la bactérie *Escherichia coli*.

Chez *E. coli*, les ponts disulfures sont formés dans le périplasma par une protéine appelée DsbA [1]. DsbA est une protéine soluble de 23 kDa qui possède, comme beaucoup d'autres oxydoréductases, un fold thiorédoxine et un motif catalytique CXXC [1]. Les deux cystéines catalytiques du motif CXXC sont maintenues sous forme oxydée dans le périplasma bactérien. On a pu montrer que le pont disulfure présent dans le site catalytique de DsbA est très instable. De ce fait, il est rapidement transféré par DsbA aux protéines nouvellement synthétisées qui pénètrent dans le périplasma. Nous avons identifié de nombreux substrats de DsbA en utilisant une approche protéomique basée sur la 2D-LC MS/MS [2]. Après le transfert de son pont disulfure, le motif CXXC de DsbA se trouve à l'état réduit. Pour que la protéine puisse catalyser un nouveau cycle d'oxydation, il faut réoxyder le motif CXXC. La protéine qui réoxyde DsbA est une petite

protéine membranaire, DsbB, qui génère des ponts disulfures *de novo* à partir du pouvoir oxydant des quinones de la chaîne de transport des électrons de la membrane interne.

DsbA forme des ponts disulfures très rapidement, mais elle ne fait pas de distinction entre les ponts disulfures corrects et incorrects. Quand une protéine possède plusieurs résidus cystéines, DsbA va les oxyder, mais certains des ponts disulfures formés seront incorrects. Des erreurs dans l'appariement des résidus cystéines d'une protéine perturbent son repliement, ce qui peut conduire à l'agrégation voire à la dégradation de la protéine. Afin d'assurer le repliement correct des protéines possédant plus de deux résidus cystéine, *E. coli* possède une autre oxydoréductase soluble appelée DsbC [1]. DsbC est une protéine dimérique qui, comme DsbA, présente un fold thiorédoxine et un motif CXXC. Au contraire de DsbA, le motif CXXC de DsbC est maintenu à l'état réduit. Cela permet à DsbC de réagir avec des ponts disulfures incorrects afin de les réduire ou de catalyser leur isomérisation. La protéine qui maintient DsbC à l'état réduit est la protéine membranaire DsbD, qui tire son pouvoir réducteur du NADPH cytoplasmique via le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.

Le périplasme d'*E. coli* contient une autre protéine «Dsb» soluble appelée DsbG. Comme DsbC, DsbG est une protéine dimérique qui possède un motif catalytique CXXC maintenu sous forme réduite par DsbD. Bien que DsbG soit généralement considérée comme une seconde isomérase de ponts disulfures, sa fonction dans la cellule n'est pas clairement définie. L'objectif du travail présenté dans ce mémoire était de trouver la fonction de DsbG.

2. Résultats

2.1. Identification des substrats de DsbG

Afin de trouver la fonction de DsbG, nous avons décidé d'identifier ses substrats. Il était en effet raisonnable de penser que l'identification des substrats de DsbG devait nous permettre de mieux comprendre le rôle joué par cette protéine dans la cellule.

Comme expliqué ci-dessus, DsbG possède un motif catalytique CXXC qui est maintenu à l'état réduit par DsbD. Ceci suggère que les cystéines catalytiques de DsbG vont réagir avec des substrats qui se trouvent à l'état oxydé dans le périplasme. Dans ce cas, la première étape de la réaction entre DsbG et son substrat consistera en l'attaque du pont disulfure présent dans ce dernier par la première cystéine du motif CXXC de DsbG. En effet, dans la grande majorité des protéines possédant un motif CXXC présent dans un domaine thiorédoxine, c'est cette première cystéine qui est responsable de l'attaque nucléophile du substrat. Il s'ensuit la formation d'un intermédiaire covalent entre DsbG et le substrat. Le pont disulfure mixte de l'intermédiaire est alors réduit par l'attaque de la seconde cystéine du motif catalytique.

Afin de pouvoir piéger les complexes DsbG-substrats, nous avons produit par mutagenèse dirigée une protéine DsbG mutante (DsbG_{CXXA}) dans laquelle la seconde

cystéine du motif CXXC a été remplacée par une alanine. En effet, cette protéine conserve la capacité de réagir avec le pont disulfure présent dans le substrat, ce qui conduit à la formation de l'intermédiaire covalent. Par contre, l'absence de la seconde cystéine empêche la réduction du pont disulfure de l'intermédiaire, permettant ainsi de piéger DsbG avec ses substrats [3].

Nous avons ensuite exprimé la protéine DsbG_{CXXA} dans une souche *dsbG* au moyen du vecteur d'expression pBAD33. Un His-tag a été ajouté à l'extrémité carboxy-terminale. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que l'expression de la protéine mutante permettait de piéger DsbG avec ses substrats. Après induction de l'expression de la protéine avec du L-arabinose, un échantillon de culture (1 ml) a été précipité au moyen d'acide trichloroacétique (TCA) afin de dénaturer les protéines. L'échantillon a ensuite été neutralisé et incubé avec de l'iodoacétamide pour alkyler les cystéines réduites afin de bloquer tout échange de ponts disulfures. Les échantillons ont alors été analysés par Western Blots au moyen d'un anticorps anti-DsbG. Nous avons observé la présence de plusieurs bandes qui, bien que migrant à une taille supérieure à celle de DsbG, étaient reconnues par l'anticorps anti-DsbG. L'addition d'un agent réducteur tel que le dithiothréitol (DTT) provoquait la disparition de ces bandes, ce qui indique qu'elles correspondent à des complexes entre DsbG et d'autres protéines.

Les complexes purifiés ont ensuite été séparés au moyen d'une technique particulière de gel en deux dimensions, dite électrophorèse diagonale. Pour la première dimension, les protéines sont séparées au moyen d'un gel SDS-PAGE réalisé en conditions non réductrices. La bande contenant les protéines est ensuite découpée et incubée dans un tampon contenant un agent réducteur tel que le β -mercaptoéthanol. La bande est alors placée à l'horizontale au sommet d'un second gel SDS-PAGE et la seconde dimension est réalisée en conditions réductrices. Les protéines qui n'ont pas été affectées par l'incubation en présence de l'agent réducteur migrent selon une diagonale dans la seconde dimension. Par contre, les protéines qui se trouvent de part et d'autre de cette diagonale correspondent aux protéines qui formaient des complexes avec DsbG et qui ont été libérées suite à l'incubation en présence de β -mercaptoéthanol. On retrouve DsbG_{CXXA} qui migre selon une horizontale. Nous avons identifié les protéines susceptibles de former un complexe avec DsbG, par spectrométrie de masse, en collaboration avec Pierre Morsomme et Hervé Degand (UCL). Il s'agit de DnaK, Ef-Tu, Erfk, Fur, SlyD, Ybis et YnhG. Comme SlyD, DnaK, Ef-Tu et Fur sont des protéines cytoplasmiques et qu'elles n'interagissent donc pas, à priori, avec DsbG dans la cellule, nous avons focalisé notre attention sur les trois protéines périplasmiques identifiées, à savoir Ybis, Erfk et YnhG.

2.2. Erfk, Ybis et YnhG ne possèdent qu'un seul résidu cystéine

L'examen de la séquence de Erfk, Ybis et YnhG a révélé que ces protéines ne possèdent qu'un seul résidu cystéine. Cette observation est surprenante car on s'attendait à ce que les substrats de DsbG possèdent au moins un pont disulfure. En outre, les trois protéines identifiées sont homologues et appartiennent à la même famille. Le résidu cystéine

présent dans ces protéines est strictement conservé et est essentiel à leur activité, qui est de catalyser l'ancrage de la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane.

2.3. DsbG réduit spécifiquement YbiS *in vitro*

Afin de confirmer que ces protéines sont des substrats de DsbG, nous avons voulu étudier leur interaction avec DsbG *in vitro*. Nous avons choisi de réaliser nos expériences avec YbiS car elle est la plus abondante des trois dans la cellule.

Pour ce faire, YbiS a été clonée dans le plasmide d'expression pET15b, afin d'ajouter un His-tag à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine, ce qui facilite sa purification. La protéine exprimée a été purifiée sur colonne de Nickel-Sepharose. Comme la protéine n'était pas pure à homogénéité, l'échantillon a été chargé sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions Q-sépharose. Au terme de cette seconde étape, la protéine était pure à homogénéité (>99%). Le rendement de la purification était de 17 mg de protéine pure pour 4 litres de culture bactérienne.

Pour pouvoir étudier la réduction de YbiS par DsbG *in vitro*, la protéine purifiée a été incubée au préalable avec le réactif d'Ellman (acide dithiodinitrobenzoïque ou DTNB). Le DTNB contient deux groupements aromatiques reliés par un pont disulfure. Lors de l'incubation de YbiS avec le DTNB, la cystéine catalytique d'YbiS attaque le pont disulfure du DTNB, ce qui conduit à l'ajout d'un anion TNB sur YbiS (YbiS-TNB) et la libération d'une molécule de TNB. La protéine modifiée YbiS-TNB a ensuite été purifiée par filtration sur gel et utilisée comme substrat.

Nous avons incubé la protéine modifiée avec DsbG afin de déterminer si DsbG est capable de réagir avec YbiS et de réduire le pont disulfure unissant la cystéine catalytique à l'anion TNB. L'anion TNB libre absorbant à 412 nm, il est possible de suivre la réaction au spectrophotomètre. Nous avons observé que DsbG réagissait rapidement avec YbiS pour la réduire. Par contre, quand la même expérience était réalisée avec DsbC, nous avons observé que la réduction était beaucoup plus lente. Ce résultat montre que, par rapport à DsbC, DsbG réduit spécifiquement YbiS.

2.4. DsbG maintient YbiS réduite *in vivo*

Nous avons ensuite voulu voir si DsbG était capable de réduire YbiS *in vivo*. Pour cela, nous avons cherché à déterminer si YbiS s'accumulait sous forme oxydée dans une souche *dsbG*. Pour déterminer l'état d'oxydation d'YbiS, nous avons utilisé le maléimide-méthoxypolyéthylène glycol (mPEG). Cette molécule modifie spécifiquement les résidus cystéines réduits. Comme le mPEG a une masse de 5 kDa, l'addition de mPEG à la forme réduite de YbiS provoque un retard de migration de la protéine dans un gel SDS-PAGE. Par contre, la forme oxydée, qui n'est pas modifiée par le mPEG, migre à la masse attendue.

Nous avons préparé des échantillons provenant de bactéries sauvages et de mutants dépourvus soit de *dsbG*, soit de *dsbC*, soit de *dsbC* et de *dsbG*. Les protéines ont été précipitées au TCA, et après neutralisation, les cystéines ont été modifiées par le mPEG. Les protéines ont alors été séparées par électrophorèse SDS-PAGE et YbiS détectée au

moyen d'un anticorps spécifique que nous avons obtenu auprès de la firme Eurogentec. La fraction de Ybis oxydée a ensuite été déterminée. Cette expérience nous a permis de montrer qu'en phase stationnaire, on observe une accumulation significative de Ybis oxydée dans la souche *dsbG* par rapport à la souche sauvage. Cette accumulation est encore plus importante dans la souche *dsbC dsbG*. Par contre, Ybis ne s'accumule pas sous forme oxydée dans une souche *dsbC*. Cette expérience indique donc que DsbG est la principale enzyme responsable de la réduction d'Ybis *in vivo*. Le fait qu'il y ait plus d'Ybis oxydée qui s'accumule dans la souche *dsbC dsbG* indique qu'en l'absence de DsbG, DsbC peut partiellement la remplacer.

2.5. Ybis forme un acide sulfénique

La question suivante était de savoir quel est le type d'oxydation qui affecte la cystéine catalytique de Ybis. La première hypothèse qui nous est venue à l'esprit est que Ybis se fait modifier par le glutathion oxydé présent dans le périplasma. Afin de tester cette hypothèse, nous avons cherché à détecter le complexe formé entre DsbG et Ybis dans une souche dépourvue de glutathion. Le mutant de DsbG dépourvu de la seconde cystéine catalytique a été exprimé dans une souche dépourvue de glutathion et des échantillons ont été analysés par Western Blots en utilisant des anticorps dirigés contre DsbG et Ybis. Nous sommes parvenus à détecter le complexe Ybis-DsbG dans la souche dépourvue de glutathion, ce qui indique que le glutathion n'est pas impliqué dans l'oxydation de Ybis.

La seconde hypothèse que nous avons envisagée était que la cystéine catalytique de Ybis forme un acide sulfénique (S-OH). En présence d'espèces réactionnelles de l'oxygène, les résidus cystéines peuvent en effet être successivement oxydés en acide sulfénique (-SOH), acide sulfinique (-SO₂H) et acide sulfonique (-SO₃H). Les acides sulféniques sont très instables. Cependant, ils peuvent être stabilisés dans le microenvironnement de certaines protéines. Afin de déterminer si la cystéine de Ybis peut former un acide sulfénique, nous avons utilisé la sonde DAZ1, en collaboration avec le laboratoire de Kate Carroll (Michigan). Il s'agit d'une sonde qui réagit spécifiquement avec les acides sulféniques et les modifie de façon covalente. Cette sonde est biotinylable et donc détectable par Western Blot. Nous avons observé que la protéine Ybis purifiée réagissait avec la sonde DAZ-1, ce qui indique que Ybis peut former un acide sulfénique.

En outre, au cours de nos expériences, nous avons observé que d'autres protéines périplasmiques réagissent avec la sonde DAZ-1. Nos résultats montrent donc que la formation d'acide sulfénique est une modification post-traductionnelle majeure dans le périplasma bactérien. Les bactéries dépourvues à la fois de DsbG et de DsbC accumulent davantage d'acide sulfénique que les bactéries sauvages. Ceci indique que DsbG et DsbC contrôlent le niveau de sulfénylation dans le périplasma. Ainsi, nos résultats nous permettent de conclure qu'il existe dans le périplasma un système qui réduit les résidus cystéines des protéines de ce compartiment. Comme DsbC et DsbG sont toutes deux maintenues réduites par DsbD, on peut donc dire que les protéines du périplasma sont protégées de l'oxydation au moyen des électrons qui proviennent du NADPH cytoplasmique [4.]

3. Conclusions

Nos recherches sur les mécanismes qui assurent le repliement correct des protéines de l'enveloppe bactérienne nous ont permis de caractériser les protéines qui catalysent la formation des ponts disulfures dans les protéines sécrétées. Nous avons également identifié un nouveau mécanisme qui protège les résidus cystéine de l'oxydation et contrôle le niveau de sulfénylation dans le périplasma. Une protéine importante de ce système est la protéine DsbG, présentant un fold thiorédoxine. Comme les protéines de la famille thiorédoxine sont présentes dans la quasi-totalité des génomes, il est probable que certaines de ces protéines assurent une fonction similaire dans les cellules eucaryotes. Elles pourraient être impliquées dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant, permettant de lutter contre le vieillissement cellulaire.

RÉSUMÉ

Le périplasma de la bactérie *Escherichia coli* contient plusieurs protéines de la famille des thiorédoxines. DsbA et DsbC catalysent la formation et l'isomérisation des ponts disulfures dans les polypeptides non repliés qui pénètrent dans le périplasma. La fonction d'une troisième protéine de cette famille, DsbG, n'était pas connue. Nous avons isolé DsbG en complexe avec trois de ses substrats, ce qui nous a conduits à faire la découverte intrigante que DsbG interagit avec des protéines correctement repliées qui ne possèdent qu'un seul résidu cystéine. Nous avons montré que ce résidu cystéine est très sensible à l'oxydation et forme un acide sulfénique *in vitro*. En cherchant à déterminer si la formation d'acide sulfénique se produit également *in vivo*, nous avons observé que de nombreuses protéines présentes dans le périplasma présentent cette modification post-traductionnelle. En outre, nous avons remarqué que le niveau de sulfénylation augmentait dans des souches dépourvues de DsbG et de DsbC, ce qui indique que ces protéines contrôlent le niveau de sulfénylation dans le périplasma. En identifiant les substrats de DsbG, nous avons donc découvert un nouveau système réducteur qui protège les résidus cystéines célibataires de l'oxydation (Depuydt *et al.*, Science 326 (2009), 1109-1111). Comme les protéines de la famille des thiorédoxines sont présentes dans de nombreux génomes, on peut penser que des systèmes réducteurs comparables existent dans d'autres organismes afin de contrôler le niveau de sulfénylation cellulaire.

SUMMARY

The *Escherichia coli* periplasm contains several proteins from the thioredoxin family. DsbA and DsbC interact with unfolded proteins to catalyze disulfide bond formation or isomerisation, respectively. The function of a third protein, DsbG, had remained elusive. By trapping DsbG attached to three of its substrates, we made the intriguing discovery that DsbG interacts with folded proteins possessing only one cysteine residue in their sequence. This residue is vulnerable to oxidation and forms a sulfenic acid *in vitro*. We sought to determine whether this cysteine is also sulfenylated *in vivo*, which led us to observe extensive sulfenic acid formation in the periplasm, especially in *dsbCdsbG* strains. Thus, by chasing the substrates of DsbG, we uncovered a new reducing system that is involved in sulfenic acid reduction on a global level (Depuydt *et al.*, Science 326 (2009), 1109-1111). DsbG appears to be a key player in that system. Our work reveals one potentially widespread mechanism whereby the very reactive sulfenic acid modification can be controlled in the cellular environment.

BIBLIOGRAPHIE

1. COLLET J.F. and MESSENS J., *Antioxydant and Redox Signaling*, In press, (2010).
2. DEPUYDT M., LEONARD S.E., VERTOMMEN D., DENONCIN K., MORSOMME P., WAHNI K., MESSENS J., CARROLL K.S., COLLET J.-F., *Science*, 326, 1109-1111 (2009).
3. MESSENS J., COLLET J.-F., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38, 1050-1062 (2006).
4. VERTOMMEN D., DEPUYDT M., PAN J.L., LEVERRIER P., KNOOPS L., SZIKORA J.P., MESSENS J., BARDWELL J.C.A., COLLET J.-F., *Mol. Microbiol.*, 67, 336-349 (2008).

(Institut de Duve – U.C.L.)

*
* *

**PEPTIDES ANTIGÉNIQUES PRODUITS PAR ÉPISSAGE
PEPTIDIQUE DANS LE PROTÉASOME
(résumé)**

par

M^{me} N. VIGNERON

Médaille de l'Académie dans le cadre
du Prix Alvarenga de Piauhuy 2009

Introduction

Le système immunitaire permet une surveillance continue contre les infections virales et le cancer. Au cours de ce processus, les lymphocytes T cytolytiques (CTL) jouent un rôle clef en détectant et en éliminant les cellules qui expriment des protéines infectieuses ou anormales. Les CTL reconnaissent, à la surface cellulaire, des peptides de huit à dix acides aminés qui résultent de la dégradation de protéines cellulaires par le protéasome et qui sont présentés par des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité. Une cellule saine exprime à sa surface une variété de peptides, contre lesquels le système immunitaire reste généralement inactif grâce au phénomène de tolérance du soi. Cependant, si une cellule est infectée par un virus ou si elle exprime des protéines inhabituelles, les peptides dérivant de ces protéines atypiques pourraient stimuler des CTL effecteurs spécifiques qui tueront les cellules anormales. La vaccination immunothérapeutique contre le cancer a notamment pour but d'activer le système immunitaire de patients atteints de cancer, contre des peptides antigéniques tumoraux, en espérant induire l'élimination de la tumeur. Nous décrivons ici un nouveau mécanisme permettant la production de peptides antigéniques: l'épissage de peptides par le protéasome.

Peptides produits par épissage peptidique dans le protéasome

En 2004, Hanada et collègues ont identifié un peptide antigénique dérivant de *FGF-5* (Fibroblast growth Factor-5), un gène surexprimé dans certains cancers et reconnu par un CTL obtenu d'un patient atteint d'un carcinome rénal (1). Ce peptide est composé de deux fragments de quatre et cinq acides aminés initialement non contigus dans la protéine parentale, où ils sont séparés l'un de l'autre par un fragment de quarante acides aminés. La production du peptide antigénique reconnu par le CTL nécessite donc l'excision du fragment de quarante acides aminés et l'épissage des fragments peptidiques ainsi libérés.

En stimulant les lymphocytes du sang d'un patient atteint de mélanome avec des cellules provenant de sa tumeur, nous avons isolé un clone CTL reconnaissant un antigène présenté par le HLA-A32, et codé par *SILV*, le gène produisant la glycoprotéine gp100^{PMEL17} (2). La transfection de cellules COS-7 avec des fragments d'ADN tronqués de gp100 nous a permis d'identifier une séquence de 16 acides aminés (gp100₃₇₋₅₂) contenant le peptide antigénique. Parce qu'aucun des peptides contenus dans ce fragment n'était capable d'activer le CTL, nous avons considéré que le peptide antigénique pourrait contenir une modification post-traductionnelle. Afin de reproduire cette modification, nous avons introduit différents peptides synthétiques par électroporation dans les cellules B autologues, ce qui nous a permis de montrer que le peptide de 13 acides aminés RTKAWNRQLYPEW (gp100₄₀₋₅₂), qui n'est pas reconnu par le CTL après chargement exogène, activait le CTL après électroporation. Afin d'identifier les résidus nécessaires à l'antigénicité, nous avons synthétisé, sur base du peptide de treize acides aminés, une série de peptides contenant une substitution-alanine à chaque position, et nous avons testé la production du peptide antigénique après électroporation de ces peptides. Alors que les résidus situés à proximité des régions N- et C-terminales du peptide étaient essentiels à la reconnaissance par le CTL, la substitution des résidus localisés au milieu du peptide ne l'affectaient que de manière marginale. En raison des récentes découvertes d'Hanada et collègues (1), nous avons considéré que la modification nécessaire à la reconnaissance du peptide de treize acides aminés pourrait impliquer l'élimination des résidus centraux non essentiels à la reconnaissance par le CTL. Nous avons donc testé une série de peptides présentant des délétions centrales localisées aux alentours des résidus 44 et 45, et nous avons montré que le peptide RTKQLYPEW, qui est produit après élimination des résidus AWNR du précurseur RTKAWNRQLYPEW, est très bien reconnu par le CTL après chargement exogène. Nous avons pu confirmer la présence du peptide à la surface des cellules de mélanome après séparation par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) des peptides associés aux molécules HLA de classe I de la tumeur (2).

L'utilisation d'inhibiteurs de protéasome nous a permis de démontrer l'implication de ce complexe catalytique dans le processus d'épissage peptidique. Nous avons également pu reproduire *in vitro* l'épissage peptidique, en incubant le peptide précurseur RTKAWNRQLYPEW en présence de protéasome purifié. La dégradation de protéines par le protéasome résulte de l'attaque nucléophile d'un lien peptidique par une des thréonines catalytiques du protéasome (3). Ceci induit la formation d'un intermédiaire

acyl-enzyme, dans lequel le fragment peptidique, par exemple RTK, est associé à la thréonine catalytique par une liaison ester (Figure 1). Généralement, cet intermédiaire est rapidement hydrolysé. Cependant, nous avons démontré qu'au cours du processus d'épissage, d'autres peptides présents dans la chambre confinée du protéasome peuvent entrer en compétition avec les molécules d'eau pour occasionnellement produire une attaque nucléophile sur le lien ester de l'intermédiaire, entraînant ainsi la création d'un nouveau lien peptidique entre les deux fragments originellement distants dans la protéine.

Afin de disséquer le mécanisme d'épissage peptidique, nous avons incubé des paires de peptides contenant des portions du peptide précurseur RTKAWNRQLYPEW avec des protéasomes purifiés. Si le peptide antigénique est produit après incubation de protéasomes avec les peptides RTKAWNR et AWRNRQLYPEW, aucun peptide antigénique n'est détecté quand les peptides RTK et QLYPEW sont utilisés. Ceci démontre que la production d'un peptide épissé nécessite le clivage d'un lien peptidique. Parce que le peptide antigénique est produit après incubation de protéasomes avec les peptides RTKAWNR et QLYPEW, mais pas des peptides RTK et AWRNRQLYPEW, nous en avons conclu que la formation du nouveau lien peptidique entre les fragments RTK et QLYPEW du peptide épissé utilise l'énergie libérée suite au clivage du lien peptidique entre K₄₂ et A₄₃. La réaction d'épissage peptidique semble donc se produire par un phénomène de transpeptidation qui implique la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme entre le fragment RTK et le protéasome. A l'intérieur de la chambre du protéasome, l'intermédiaire acyl-enzyme est entouré par de nombreux peptides, parmi lesquels le peptide QLYPEW, qui résulte d'un clivage après le résidu 46. Nous avons donc proposé que le résidu N-terminal du peptide QLYPEW pourrait entrer en compétition avec des molécules d'eau et produire une attaque nucléophile sur la liaison ester de l'intermédiaire, créant ainsi un nouveau lien peptidique et le peptide RTKQLYPEW. Le fait que l'acétylation du fragment QLYPEW empêche la production du peptide antigénique après incubation avec le peptide RTKAWNR et du protéasome confirme l'importance du groupement N-terminal du peptide QLYPEW (2). Le processus menant à la production du peptide antigénique RTKQLYPEW est décrit dans la figure 1A.

Par la suite, en collaboration avec le Dr Warren (Fred Hutchinson Research Institute, Seattle, USA), notre laboratoire a identifié un troisième peptide produit par épissage peptidique dans le protéasome. Dans ce cas, le peptide identifié est un antigène mineur d'histocompatibilité, présenté par le HLA-A3 et reconnu par les lymphocytes d'un patient atteint de myélome et traité par greffe de moelle osseuse (4). Ce peptide, qui est dérivé d'un polymorphisme nucléotidique dans la protéine SP110, est également produit par épissage peptidique dans le protéasome. Cependant, dans ce cas, les fragments non contigus de la protéine SP110 se présentent en ordre inverse par rapport à la séquence protéique originale. Le mécanisme menant à la production de ce peptide est identique à celui décrit pour le peptide gp100/A32 et est détaillé dans la figure 1B.

Récemment, d'autres recherches menées dans notre laboratoire ont également montré que le peptide dérivé de la protéine FGF-5 était également produit dans le protéasome par une réaction de transpeptidation, et ce malgré la longueur du fragment

à exciser (40 acides aminés) (5). En diminuant la longueur du fragment excisé, Dalet *et al.* ont cependant montré qu'il était possible d'améliorer l'efficacité de la réaction d'épissage (5). De plus, l'épissage de fragments originaires de protéines distinctes est également possible, mais se produit avec un rendement qui est probablement sous le seuil physiologique (5).

La réaction d'épissage peptidique semble d'une efficacité très faible, puisque pour produire *in vitro* une molécule de peptide épissé gp100, approximativement 104 molécules de peptide précurseur sont nécessaires (2). Cependant, l'extrême sensibilité des CTL qui reconnaissent des cellules cibles présentant moins de dix complexes MHC/peptide (6,7), explique sans doute comment un processus aussi peu efficace est tout même capable d'induire une réponse CTL.

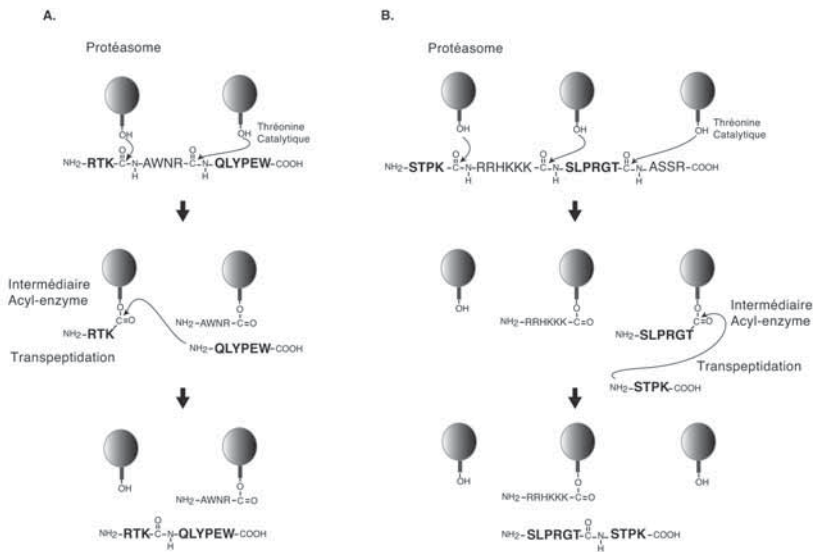


Fig. 1

Mécanisme biochimique de l'épissage par le protéasome. Les arrondis représentent les sous-unités catalytiques du protéasome, avec les groupements hydroxyles présents sur les chaînes latérales des thréonines catalytiques N-terminales.

RÉSUMÉ

Nos recherches de ces dernières années ont eu pour but l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de vaccinations antitumorales. Parmi les peptides tumoraux identifiés, deux sont composés de fragments non contigus de la protéine parentale. Le processus d'épissage peptidique permettant la production de ces antigènes a lieu dans le protéasome par transpeptidation. Ici, nous détaillons la découverte de ce nouveau mécanisme de production de peptides antigéniques.

SUMMARY

These past years, we focused our researches on the identification of novel, potential peptide targets for cancer immunotherapy. Amongst the peptides we identified, two are composed of fragments originally distant in the parental protein and are produced by a novel mechanism termed peptide splicing. The peptide splicing reaction takes place in the proteasome and occurs by transpeptidation. Here, we describe the discovery of this new mechanism of production of antigenic peptides.

BIBLIOGRAPHIE

1. DALET A., VIGNERON N., STROOBANT V., HANADA K. and VAN DEN EYNDE B.J., *Splicing of distant Peptide fragments occurs in the proteasome by transpeptidation and produces the spliced antigenic peptide derived from fibroblast growth factor-5*, J. Immunol., 184, 3016-24 (2010).
2. GROLL M. and HUBER R., *Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle*, Int. J. Biochem. Cell. Biol., 35, 606-16 (2003).
3. HANADA K., YEWDELL J.W. and YANG J.C., *Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing*, Nature, 427, 252-6 (2004).
4. KAGEYAMA S., TSOMIDES T.J., SYKULEV Y. and EISEN H.N., *Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses*, J. Immunol., 154, 567-76 (1995).
5. IRVINE D.J., PURBHOO M.A., KROGSGAARD M. and DAVIS M.M., *Direct observation of ligand recognition by T cells*, Nature, 419, 845-9 (2002).
6. VIGNERON N. *et al.*, *An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome*, Science, 304: 587-90 (2004).
7. WARREN E.H. *et al.*, *An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order*, Science, 313, 1444-7 (2006).

(Institut Ludwig pour la Recherche contre le Cancer, Branche de Bruxelles et Institut de Duve, Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.)

*
* *

RÔLE DES RÉCEPTEURS DU PDGF ET DU FGF DANS LES CANCERS

par

J.-B. DEMOULIN, et coll. (*)

Lauréat du Prix Docteur Maurice Godin – Maria Savelkoul (2007-2009)

Le PDGF (platelet-derived growth factor) est un facteur de croissance qui agit notamment sur les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules gliales. Quatre gènes (PDGF-A, -B, -C et -D) produisent différentes isoformes de cette protéine sécrétée. Ils jouent un rôle très important dans le développement embryonnaire. Ceci a été bien démontré à l'aide de différentes souris déficientes en ligands ou en récepteurs. Chez l'adulte, le PDGF participe à la cicatrisation des blessures et à la régulation de la pression interstitielle des tissus. Une activation inadéquate de ces récepteurs est liée au développement de certains cancers et de fibroses [1]. Le PDGF ne semble pas avoir de fonction absolument essentielle chez l'adulte et constitue donc une cible thérapeutique de choix pour le traitement de ces maladies.

Le PDGF se fixe sur un récepteur membranaire constitué de deux chaînes alpha et/ou bêta. Ce récepteur possède un domaine protéine tyrosine kinase intracellulaire inactif en absence de ligand. Ce domaine est activé en présence de PDGF et phosphoryle de multiples tyrosines du récepteur. Ces phospho-tyrosines servent de sites de fixation pour de nombreuses molécules de transduction du signal contenant des domaines SH2, ainsi que plusieurs adaptateurs, comme Gab1 ou NHERF [2, 3]. Un des médiateurs les plus importants de la transduction du signal par le récepteur du PDGF est la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). Cette enzyme est responsable de l'activation de plusieurs sérine/thréonine kinases cellulaires, notamment de la protéine kinase B (PKB, également appelée AKT). Le PDGF active aussi la voie des MAP kinases et la phospholipase C γ .

Les récepteurs de la famille du FGF fonctionnent de la même manière. Vingt-deux ligands différents et quatre récepteurs ont été caractérisés. Ils jouent également un rôle dans le développement embryonnaire et la cicatrisation des blessures.

Plusieurs mécanismes peuvent conduire à une activation incontrôlée des récepteurs du PDGF et du FGF dans les tumeurs et les leucémies. Une boucle autocrine a été décrite dans plusieurs types de tumeurs. Par exemple, dans les dermatofibrosarcomes protubérants, une translocation chromosomique place la partie codante du gène *PDGFB* sous le contrôle du promoteur du gène du collagène I α 1, ce qui conduit à une production massive de PDGF-BB, responsable du développement de cette tumeur cutanée. Dans d'autres cas, c'est le récepteur qui est modifié. Un certain nombre de mutations ponctuelles activent le récepteur, dans les tumeurs gastro-intestinales du stroma, par exemple. Dans certaines leucémies et syndromes myéloprolifératifs, c'est une translocation ou une délétion chromosomique qui fusionne le récepteur avec un

(*) M^{mes} et MM. Sandrine Medves, Federica Toffalini, Ahmed Essaghir, Anders Kallin, Carmen Montano, Amélie Velghe et François Duhoux.

autre gène, produisant une protéine hybride qui comporte toujours le domaine tyrosine kinase sous une forme activée. Les altérations des récepteurs du PDGF sont relativement rares, mais il est crucial d'identifier les patients qui les portent car ceux-ci peuvent bénéficier d'un traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase, dont le chef de file est l'imatinib (commercialisé par Novartis sous le nom « Glivec »). Différents inhibiteurs des récepteurs du FGF sont en cours de développement.

Nos recherches dans ce domaine se sont développées sur trois axes développés ci-dessous.

1 – Identification d'une nouvelle altération du récepteur du PDGF

En collaboration avec les professeurs Hélène Poirel et Augustin Ferrant (service d'hématologie des Cliniques Universitaires Saint-Luc), nous avons caractérisé une nouvelle altération génétique présente chez un patient atteint de thrombocytose qui présentait une translocation des chromosomes 5 et 9, indiquant un réarrangement du gène du récepteur bêta du PDGF [4]. Les altérations de ce récepteur ont été décrites dans de rares leucémies myéloïdes chroniques atypiques, associées à une forte éosinophilie, ainsi que, dans certains cas, à une thrombocytopénie et une myélodysplasie. Une altération du PDGFR β dans un cas de thrombocytose était donc très surprenante. Le patient s'est rapidement montré résistant au traitement standard de la thrombocytose, l'hydroxyurée. Les récepteurs du PDGF étant très sensibles à l'imatinib, ce traitement a été instauré à titre expérimental et le patient est actuellement en rémission complète.

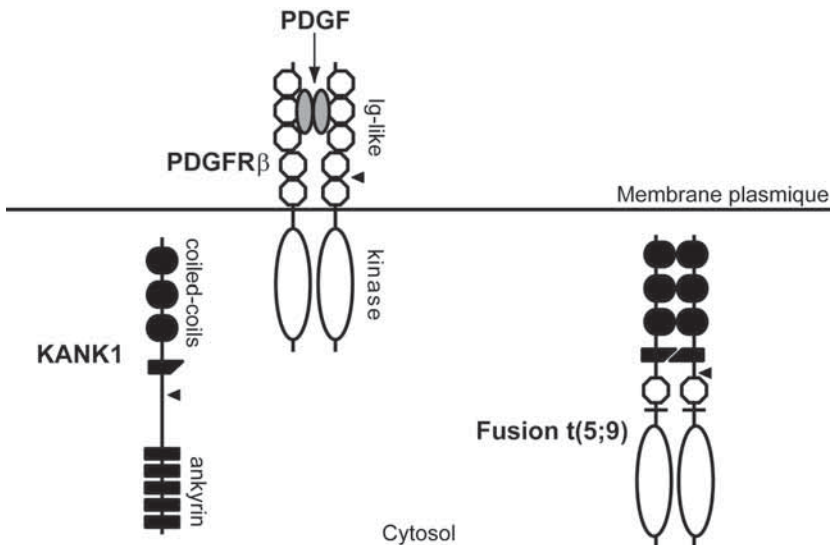


Fig. 1

Structure de l'oncoprotéine hybride KANK1-PDGFR β .

Le point de cassure est indiqué par un triangle noir. Les noms des différents domaines protéiques sont indiqués verticalement.

En analysant les cellules hématopoïétiques du patient, nous avons identifié une fusion entre les gènes KANK1 et PDGFR β [4]. Le point de cassure dans le gène PDGFR β était inhabituel : l'hybride comprend une partie du domaine extracellulaire du récepteur en plus du domaine tyrosine kinase intracellulaire (Fig. 1). Nous avons cloné l'ADN complémentaire qui encode le produit de fusion dans un vecteur d'expression rétroviral. L'introduction de la protéine de fusion dans les cellules hématopoïétiques Ba/F3 a démontré qu'il s'agissait d'un oncogène stimulant la prolifération cellulaire en absence de facteur de croissance. Ces résultats ont été confirmés dans des cellules souches hématopoïétiques humaines exprimant le CD34. Conformément à ce qui était attendu, cet oncogène hybride est très sensible à l'imatinib *in vitro*.

Des études de carcinomes rénaux ont montré que KANK1 est un suppresseur de tumeur. Il contient plusieurs domaines de type « coiled-coil », qui favorisent l'oligomérisation et qui sont présents dans l'hybride. Nous avons montré que ces domaines sont indispensables au fonctionnement de KANK1-PDGFR β . Nous allons poursuivre ce projet en étudiant de façon systématique les altérations du gène KANK1 dans différentes hémopathies malignes.

2 – Mécanisme d'action des oncogènes dérivés des récepteurs du PDGF et du FGF.

Les récepteurs de type tyrosine kinase sont normalement détruits très rapidement lorsqu'ils sont activés. Ce processus constitue un mécanisme de protection contre une activation prolongée du récepteur, qui pourrait conduire à une prolifération cellulaire inappropriée. Nous avons étudié la dégradation des hybrides des récepteurs du PDGF dans des leucémies. Les plus fréquents sont ETV6-PDGFR β , produit par la translocation t(5 ;12) dans les leucémies myéломocytaires chroniques, et FIP1L1-PDGFR α , qui caractérise les leucémies chroniques à éosinophiles. Un hybride du récepteur FGFR1 a également été analysé. Nous avons observé que ces oncogènes échappent aux mécanismes de dégradation et au processus d'ubiquitinylation qui cible normalement les récepteurs vers les voies de dégradation. Nous avons démontré que ceci conduit à une accumulation du récepteur dans les cellules leucémiques et augmente leur prolifération. Il s'agit d'un nouveau mécanisme qui contribue à la transformation des cellules hématopoïétiques [5].

Nous avons poursuivi la caractérisation des oncogènes hybrides dérivés du récepteur du PDGF par l'étude de leur domaine transmembranaire. Nous avons montré que ce domaine ne permettait pas l'insertion des hybrides dans les membranes, probablement parce qu'il n'est plus associé à une séquence signal (la partie N-terminale du récepteur étant remplacée par celle du facteur de transcription ETV6). Par contre, ce domaine garde un rôle crucial dans l'activité de la protéine hybride, car un mutant dépourvu de domaine transmembranaire est incapable de transformer des lignées de cellules hématopoïétiques [6].

3 – Transduction du signal et régulation des gènes par le PDGF et le FGF.

Les voies de transduction du signal activées par ces récepteurs conduisent à des changements majeurs au niveau de l'expression des gènes. Afin de mieux comprendre

comment ils stimulent la prolifération cellulaire, nous avons étudié de façon globale la régulation de l'expression des gènes par le PDGF et le FGF dans des fibroblastes humains et dans des cellules EOL1 dérivées d'une leucémie humaine exprimant un mutant du récepteur du PDGF [7]. Nous avons observé que ces facteurs de croissance augmentent l'expression d'un groupe d'enzymes qui participent à la biosynthèse des acides gras insaturés et du cholestérol. L'augmentation de l'expression de ces gènes est liée à une augmentation de la synthèse des lipides membranaires dans la cellule, et une activation des facteurs de transcription SREBP, qui contrôlent leur expression [8]. Nous avons montré que l'activation de SREBP1 dépend de la phosphatidylinositol-3 kinase (Fig. 2). Cette enzyme n'agit pas directement sur SREBP1 mais via une kinase qui pourrait être la protéine kinase B. Nous avons en effet observé que la PKB est capable de phosphoryler SREBP1 *in vitro* sur un résidu sérine situé dans le domaine PEST. Ces résultats suggèrent un mécanisme par lequel les facteurs de croissance stimulent la synthèse des membranes au cours de la prolifération cellulaire.

Récemment, nous avons montré que le rôle de SREBP1 ne se limite pas au métabolisme des lipides mais touche aussi la régulation du stress cellulaire [9]. Enfin, nous avons contribué à la mise en évidence d'un certain nombre de mécanismes de rétrocontrôle de l'activation de SREBP. SREBP1 augmente en effet l'expression de son propre précurseur, d'INSIG1 (un inhibiteur de l'activation de SREBP), et de p55, qui est une des sous-unités adaptatrices de la phosphatidylinositol-3 kinase [9].

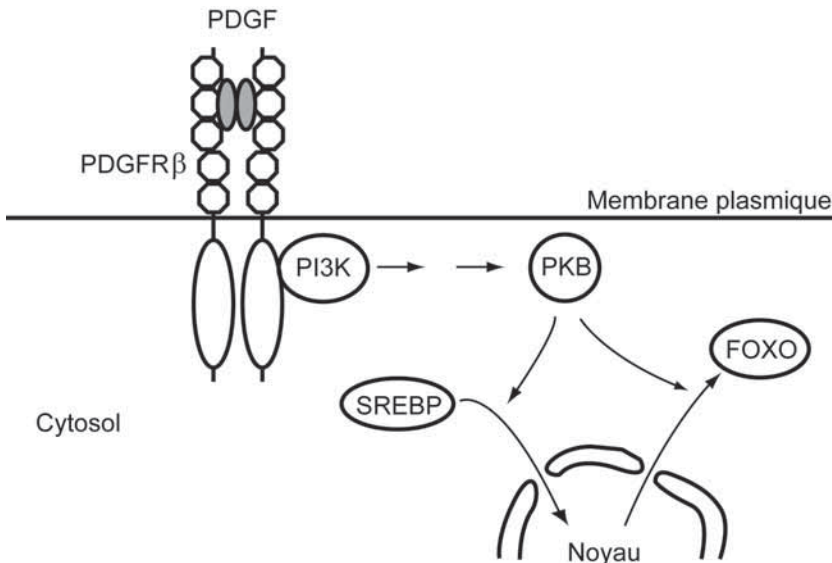


Fig. 2.

Régulation des facteurs transcription SREBP et FOXO par le PDGF.

L'utilisation de microarrays de type Affymetrix, permettant d'interroger un plus grand nombre de gènes, a révélé la régulation d'autres gènes par le PDGF. À l'aide d'un outil informatique mis au point dans le laboratoire (www.tfacts.org), l'étude de

cette nouvelle liste de gènes a permis de mettre en évidence l'activation des facteurs de transcription MYC, FOXO et E2F par le PDGF [7]. Ces gènes semblent jouer un rôle important dans la survie et la prolifération des cellules en réponse au PDGF. Comme SREBP, les facteurs de transcription FOXO (« *F-box group O* ») sont contrôlés par la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (Fig. 2). Dans ce cas, il a été bien démontré que la PKB inhibe l'action de FOXO par phosphorylation directe de trois résidus conservés.

Nous avons démontré que plusieurs facteurs de croissance inhibent l'expression de l'ARN messager des facteurs de transcription FOXO1, FOXO3 et FOXO4. Il s'agit donc d'un effet transcriptionnel, différent du mécanisme post-traductionnel bien décrit [10]. Nos résultats indiquent que le niveau d'expression de ces gènes influence beaucoup la survie et la prolifération des fibroblastes en réponse au PDGF et au FGF. Le promoteur du gène FOXO1 a ensuite été étudié à l'aide d'un gène rapporteur luciférase. Cette analyse a révélé que FOXO3 stimule l'expression de FOXO1. Lorsque FOXO3 est inactivé par phosphorylation en réponse à un facteur de croissance, la transcription de FOXO1 diminue donc, expliquant, au moins partiellement, notre observation de départ. Ce mécanisme amplifie l'inhibition des facteurs FOXO par les facteurs de croissance.

Conclusion

Nos travaux ont mené à plusieurs avancées significatives dans le domaine des récepteurs à activité tyrosine kinase – en particulier ceux du PDGF et du FGF – et leurs liens avec le cancer. Bien que ces récepteurs aient été décrits il y a presque trente ans, de nombreux aspects de leur mode de fonctionnement restent obscurs. Un autre défi est d'identifier tous les patients qui, comme celui que nous avons étudié, pourraient bénéficier d'un traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase.

Remerciements

Je tiens à remercier mes collaborateurs, en particulier Sandrine Medves, Federica Toffalini, Ahmed Essaghir, Anders Kallin, Carmen Montano, Amélie Velghe et François Duhoux qui ont réalisé les expériences décrites dans ce travail.

RÉSUMÉ

Les facteurs de croissance de la famille du FGF et du PDGF agissent via des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ces récepteurs sont activés par différentes translocations chromosomiques dans certains syndromes myéloprolifératifs associés à une hyperéosinophilie. Nous avons identifié une nouvelle fusion entre les gènes KANK1 et PDGFR β dans un cas atypique de thrombocythémie. Nous avons montré que les produits de fusion des récepteurs du PDGF et du FGF échappent aux voies habituelles de dégradation, ce qui permet leur accumulation dans les cellules. Ce processus amplifie la transduction de signaux qui conduisent à la prolifération cellulaire. En particulier, l'utilisation de microarrays associés à une analyse bioinformatique a mis en évidence l'importance des facteurs de transcription STAT, FOXO et SREBP dans ces voies de signalisation.

SUMMARY

Growth factors of the PDGF and FGF families act through receptor tyrosine kinases. These receptors can be activated by chromosomal rearrangements in myeloid neoplasms associated with hypereosinophilia. We identified a new fusion gene between KANK1 and PDGFR β in a patient with thrombocythemia. We showed that such fusion oncoproteins derived from PDGF and FGF receptors escape the normal degradation pathways, leading to their accumulation in cells. This process amplifies signalling leading to cell proliferation. Using microarrays and bioinformatics, we showed that several transcription factors contribute to the control cell growth, including STAT5, FOXO and SREBP.

BIBLIOGRAPHIE

1. CLASSEN J.F., HENROHN D., RORSMAN F., LENNARTSSON J., LAUWERYS B.R., WIKSTROM G., RORSMAN C., LENGLEZ S., FRANCK-LARSSON K., TOMASI J.P., KAMPE O., VANTHUYNE M., HOUSIAU F.A. & DEMOULIN J.B., *Lack of evidence of stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptor in patients with systemic sclerosis*, *Arthritis Rheum.*, 60, 1137-44 (2009).
2. DEMOULIN J.B., SEO J.K., EKMAN S., GRAPENGIESSER E., HELLMAN U., RONNSTRAND L. & HELDIN C.H., *Ligand-induced recruitment of Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to the PDGF (platelet-derived growth factor) receptor regulates actin cytoskeleton reorganization by PDGF*, *Biochem. J.*, 376, 505-10 (2003).
3. DEMOULIN J.B., ERICSSON J., KALLIN A., RORSMAN C., RONNSTRAND L. & HELDIN C.H., *Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins*, *J. Biol. Chem.*, 279, 35392-402 (2004).
4. ESSAGHIR A., DIF N., MARBEHANT C.Y., COFFER P.J. & DEMOULIN J.B., *The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors*, *J. Biol. Chem.*, 284, 10334-42 (2009).
5. ESSAGHIR A., TOFFALINI F., KNOOPS L., KALLIN A., VAN HELDEN J. & DEMOULIN J.B., *Transcription factor regulation can be accurately predicted from the presence of target gene signatures in microarray gene expression data*, *Nucleic Acids Res.*, In press, (2010).
6. KALLIN A., DEMOULIN J.B., NISHIDA K., HIRANO T., RONNSTRAND L. & HELDIN, C.H., *Gab1 contributes to cytoskeletal reorganization and chemotaxis in response to platelet-derived growth factor*, *J. Biol. Chem.*, 279, 17897-904 (2004).
7. KALLIN A., JOHANNESSEN L.E., CANI P.D., MARBEHANT C.Y., ESSAGHIR A., FOUFFELLE F., FERRE P., HELDIN C.H., DELZENNE N.M. & DEMOULIN J.B., *SREBP-1 regulates the expression of heme oxygenase 1 and the phosphatidylinositol-3 kinase regulatory subunit p55 gamma*, *J. Lipid Res.*, 48, 1628-36 (2007).
8. MEDVES S., DUHOUX F.P., FERRANT A., TOFFALINI F., AMEYE G., LIBOUTON J.M., POIREL H.A. & DEMOULIN J.B., *KANK1, a candidate tumor suppressor gene, is fused to PDGFR β in an imatinib-responsive myeloid neoplasm with severe thrombocythemia*, *Leukemia*, 24, 1052-5 (2010).
9. TOFFALINI F., KALLIN A., VANDENBERGHE P., PIERRE P., MICHAUX L., COOLS J. & DEMOULIN J.B., *The fusion proteins TEL-PDGFRbeta and FIP1L1-PDGFRalpha escape ubiquitination and degradation*, *Haematologica*, 94, 1085-93 (2009).
10. TOFFALINI F., HELMBERG C. & DEMOULIN J.B., *Critical role of the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-beta transmembrane domain in the TEL-PDGFRbeta cytosolic oncoprotein*, *J. Biol. Chem.*, 285, 12268-78 (2010).

(Institut de Duve, Université catholique de Louvain.)

*
* *

TABLE DES MATIÈRES

Séance publique du 29 mai 2010

Lectures

The Thyroid Angiofollicular Units, a Biological Model of Functional and Morphological Integration, par I. Colin (U.C.L.), invité, et coll	218
Discussion	228
H202, signal, substrate, mutagen and chemorepellent. From physiology to biochemistry and disease, par J.E. Dumont (U.L.B.), membre honoraire, et coll	231
Discussion	235
*	
* *	
Proclamation du résultat du vote de la prolongation d'un an du mandat du Secrétaire perpétuel	236
Communications du Bureau et correspondance	236
Présentation d'ouvrage	236
Dépôt de rapport : Rapport de la Commission 49Bis, rapporteur le Prof. Ch. van Ypersele	237

*
* *

Séance publique du 19 juin 2010

Lectures

Eloge académique du Professeur Alb. de Scoville, par le J. Frühling, Secrétaire perpétuel et membre titulaire	243
Water transport across biological membranes : Overton, water channels, and peritoneal dialysis, par O. Devuyst (U.C.L.), membre ordinaire	250
Discussion	256

New insights into urinary acidification and regulation
of acid-base balance, par C. Wagner (Zurich - Suisse), invité 259

Discussion 265

*
* *

Communications du Bureau et correspondance 266

Avis de l'Académie relatif à l'interrogation émise par la Commission
de la Protection de la Vie privée, rapporteur : Prof. A. Albert 267

Dépôt de rapport : compte rendu des travaux
de la Commission « Présidence Européenne », rapporteur :
M^{me} le Prof. Fr. Meunier, Présidente 272

*
* *

Prix académiques 2007- 2009 (échéance le 11 janvier 2010) Résumés des travaux couronnés par l'Académie

Contribution personnelle à l'étude de la formation des épithélia
de structures tubulaires, par Ch. Pierreux, Lauréat du Prix du Concours
ordinaire de la première Section (2008-2009) 277

Homéostasie du compartiment lymphocytaire périphérique
au cours de la leucémogenèse induite par le virus de la leucémie bovine,
par A. Florins, Médaille de l'Académie dans le cadre du Prix du Concours
ordinaire de la première Section (2008-2009) 285

Applications de l'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux
en analyse chirale pharmaceutique et biomédicale, par M^{me} A.-C. Servais,
Lauréate du Prix du Concours ordinaire de la cinquième Section (2008-2009) 293

Un nouveau système protéique protège les cystéines
célibataires contre le stress oxydant, par J.-F. Collet,
Lauréat du Prix Alvarenga de Piauhy 2009 299

Peptides antigéniques produits par épissage peptidique dans le protéasome,
par M^{me} N. Vigneron, médaille de l'Académie dans le cadre
du Prix Alvarenga de Piauhy 2009 305

Rôle des récepteurs du PDGF et du FGF dans les cancers,
par J.-B. Demoulin, et coll., Lauréat du Prix Docteur Maurice Godin –
Maria Savelkoul (2007-2009) 310

*
* *



I.S.S.N.

0377-8231.

*

PUBLICATIONS DE L'ACADÉMIE :

BULLETIN ET MÉMOIRES DE L'A.R.M.B.

Les demandes de publications de l'Académie doivent être adressées à son secrétariat, Palais des Académies, rue Ducale 1, 1000 Bruxelles.

Tél. : (32-2)-550.22.55/Fax : (32-2)-550.22.65 ;

Courriel : contact@armb.be;

Site web : <http://www.armb.be>

*

PRIX DE L'ABONNEMENT :

BULLETIN ET MÉMOIRES. (11 fascicules + annuaire + table).

Belgique et étranger : 76 euros.

Prix par numéro, variable suivant le nombre de pages.

*

ÉDITEUR RESPONSABLE :

Prof. J. Frühling, Secrétaire perpétuel

Palais des Académies

Rue Ducale 1

1000 Bruxelles

*

LAY-OUT ET IMPRESSION :

Imprimerie Duculot

Rue du Rond-Point, 185

B-6060 GILLY

Tél. 071/28.36.11

*