

Caractérisation et implication du canal cationique TRPV1 dans la physiopathologie du muscle strié squelettique. Rôle dans l'hyperthermie maligne des anesthésies.

Pr. Fabien Van Coppenolle
Laboratoire CarMeN; INSERM U1060

Université Claude Bernard Lyon 1 France

Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.

Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne

Etude 3: TRPV1 et autres....

Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.

Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne

Etude 3: TRPV1 et autres....

2021 Nobel Prize in Physiology or Medicine

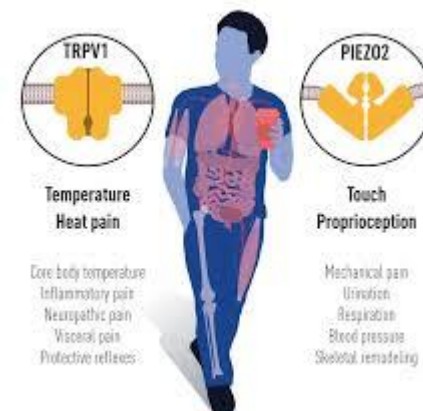
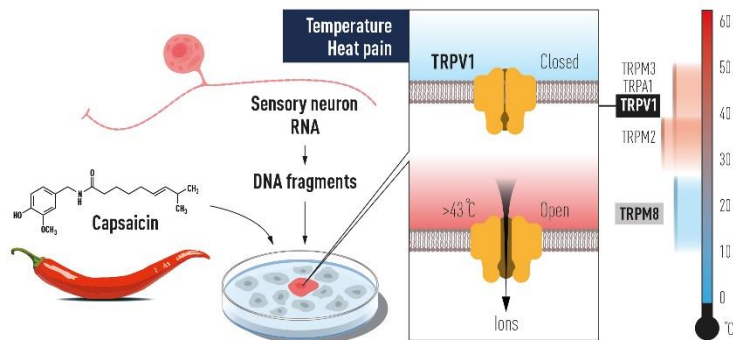
David Julius (University of California, San Francisco) :

TRPV1 (Heat receptor).



Ardem Patapoutian (UCLA, Los Angeles):

TRPM8 (Cold receptor)
and PIEZO 1 (Mechano-sensitive receptor).



Hyperthermie maligne

- Maladie génétique transmissible sur un mode autosomique dominant
- Complication rare de l'anesthésie générale
 - Déclenchée par les agents halogénés
 - Provoquant un état d'hypermétabolisme musculaire
- Urgence vitale
 - Traitement : Dantrolène

Historique

- Denborough M, Lovell R. Anesthetic deaths in a family. Lancet 1960 ; 2 : 45
 - affection génétiquement transmissible
- 1970 origine musculaire de l'hyperthermie
 - Mise en place des tests de contracture à l'halothane et à la caféïne
- 1982 découverte de l'efficacité surprenante du Dantrolène dans la crise HM
- Progrès liés à la génétique moléculaire

Fréquence

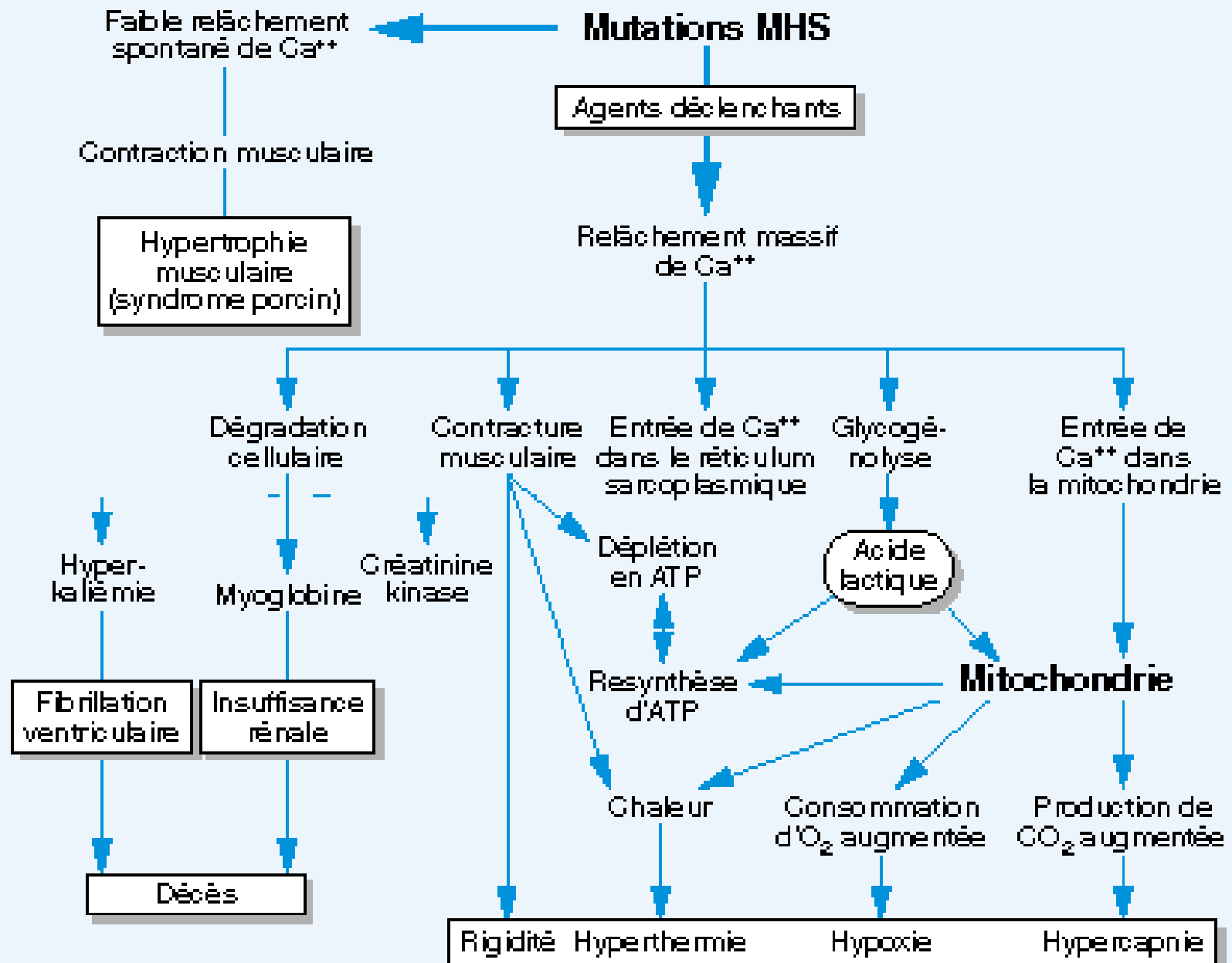
- Forme fulminante : 1/250 000 anesthésies
- 1/ 62000 AG halogénés/succinylcholine
- 1/ 85000 AG sans succinylcholine
- Nombre de nouveaux cas / an en France : 20 à 40
- Événement Rare : 4 fois dans la vie professionnelle d'un anesthésiste

Gravité

- Rhabdomyolyse aiguë
- Défaillance multiviscérale
 - Forme fulminante : mortalité de 80 à 90 % avant l'usage du Dantrolène
 - Depuis l'utilisation du Dantrolène : mortalité 5 %

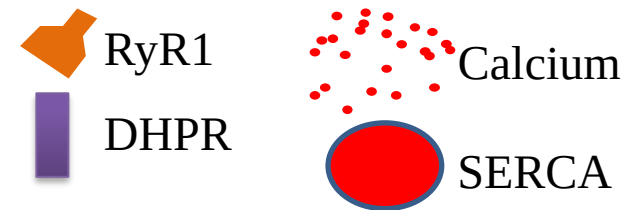
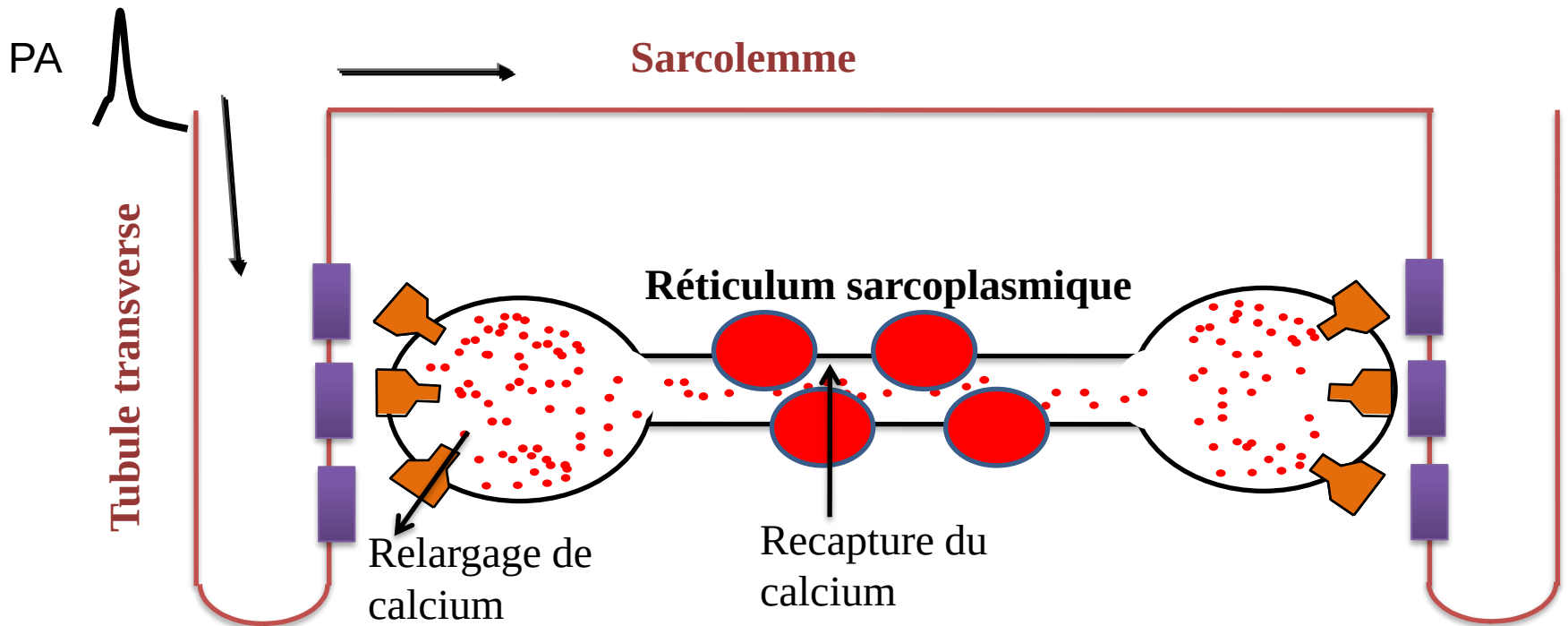
Physiopathologie

- Trouble de l'homéostasie calcique dans la cellule musculaire
- Dysfonctionnement des canaux calciques :
 - Récepteurs à la Ryanodine RYR1
 - Récepteurs aux Dihydropyridines
- Élément initial : élévation du calcium libre myoplasmique
 - Cascade de destruction de la cellule musculaire



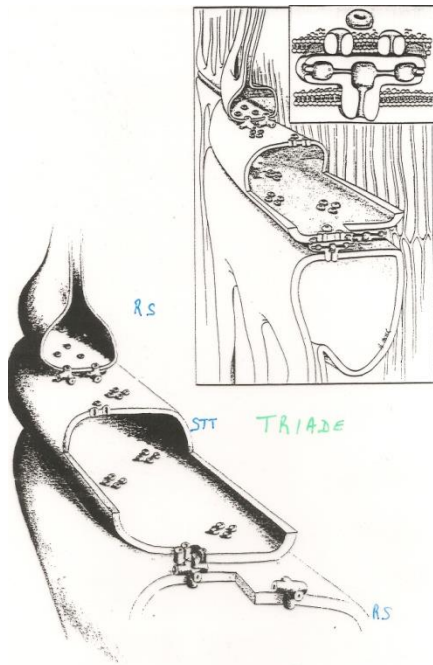
Génétique

- Modèle porcin d'HM
 - « Porcine stress syndrom » pathologie proche du syndrome humain
 - Crise déclenchée par les halogénés ou par un stress intense
 - Mode de transmission autosomique récessif
 - Origine génétique unique : mutation Ryr 1?



1 RyR1 / 4 DHPR

Cycle du calcium



Génétique

- Gène RYR1
- Localisé sur le chromosome 19q13.2
- Mutation R614C
- Plus de 400 mutations décrites
- Les mutations HMS vont affecter des domaines de la protéine qui seront impliqués principalement dans la régulation de l'activité d'ouverture du canal calcique
- Pb: tous les cas d'HM ne sont pas associés à des variants RYR1.

I. Contexte

Agents déclenchants



- Tous les agents Halogénés
 - Mais vitesse d'apparition plus lente avec le Desflurane et le Sévoflurane / Halothane

Traitement de la crise

- Urgence thérapeutique
- Arrêt des agents halogénés
- Hyper ventilation en oxygène pur
- Administration de Dantrolène
- Appeler de l'aide

Diagnostic de la sensibilité HM

- Test de contracture halothane caféine
- Analyse génétique
- Qui dépister ? (test de contracture musculaire)
 - Sujets aux antécédents personnels ou familiaux d'HM
 - Sujets avec élévation chronique des CPK
 - Coup de chaleur d'effort
 - Myopathie à central core
 - Après une crise HM

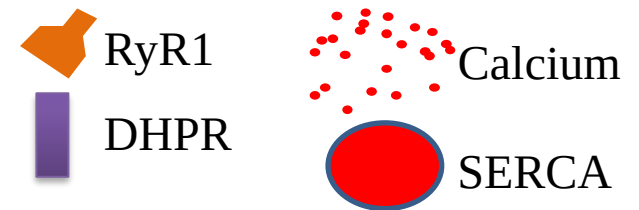
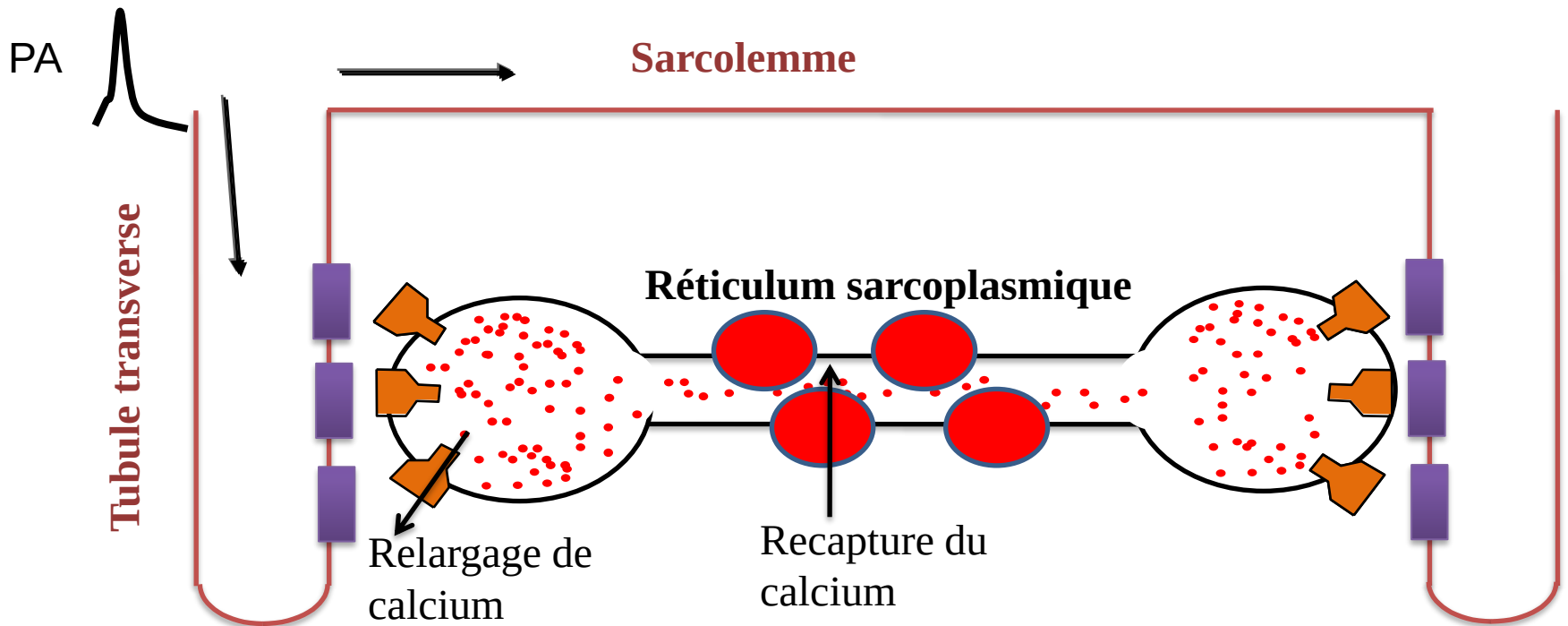
Test de contracture



- Standardisation en Europe et en Amérique du Nord
- Test de contracture à l'**halothane**
- Test de contracture à la **caféine**
(activateur des récepteurs à la ryanodine).

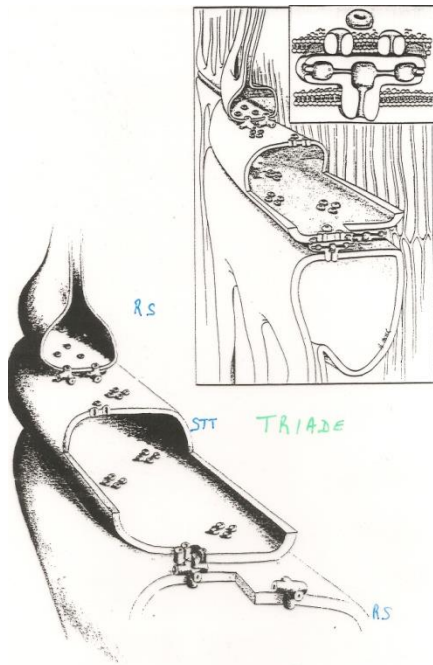


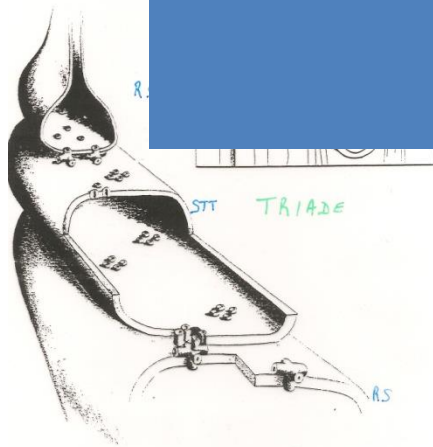
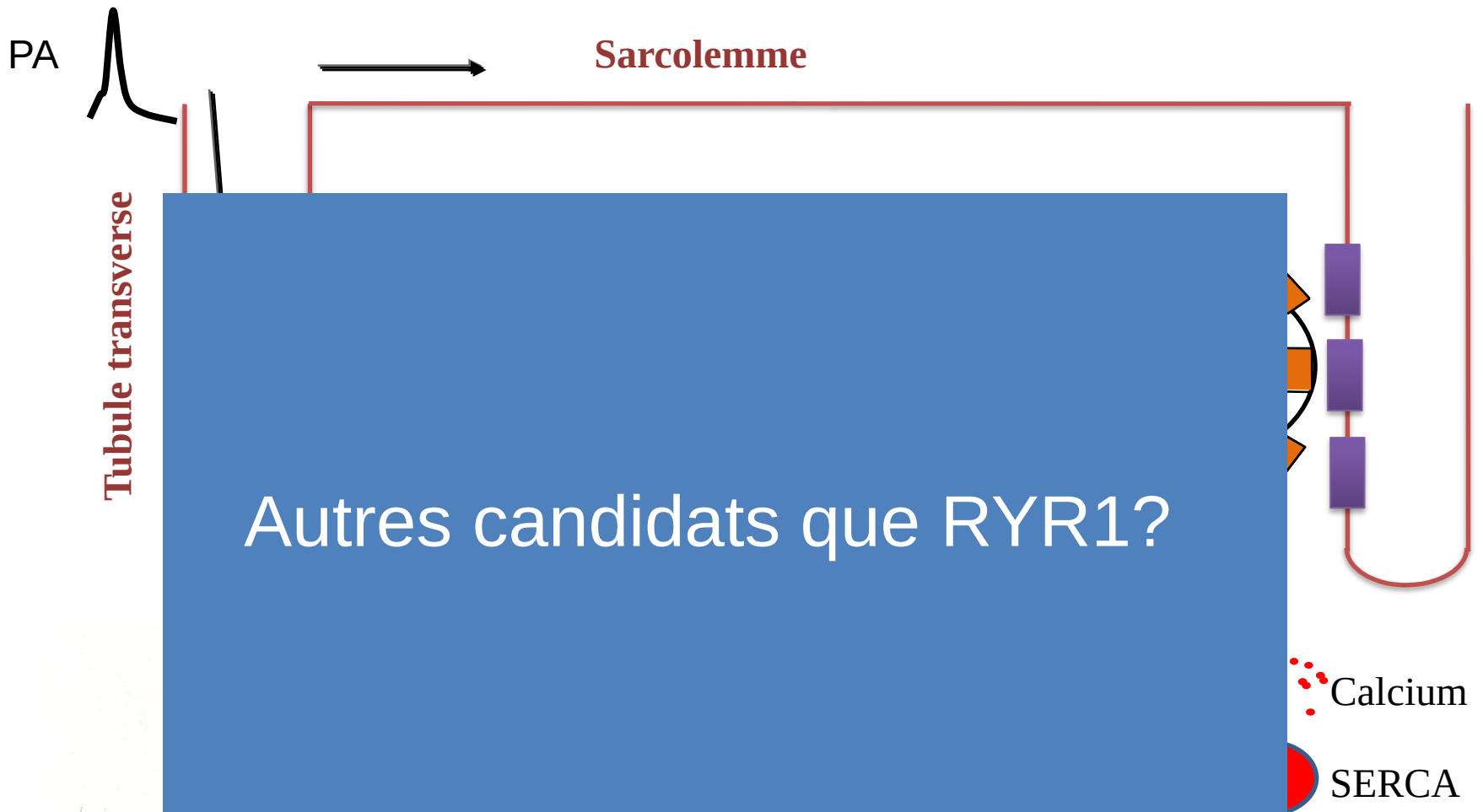
- **HMS** quand au moins un test à l'**halothane** et un test à la **caféine** sont positifs
- **HME** : HMEh quand seul le test à l'**halothane** est positif
HMEc quand seul le test à la caféine est positif
- **HMN** aucun test positif



1 RyR1 / 4 DHPR

Cycle du calcium





Cycle du calcium

Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.

Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

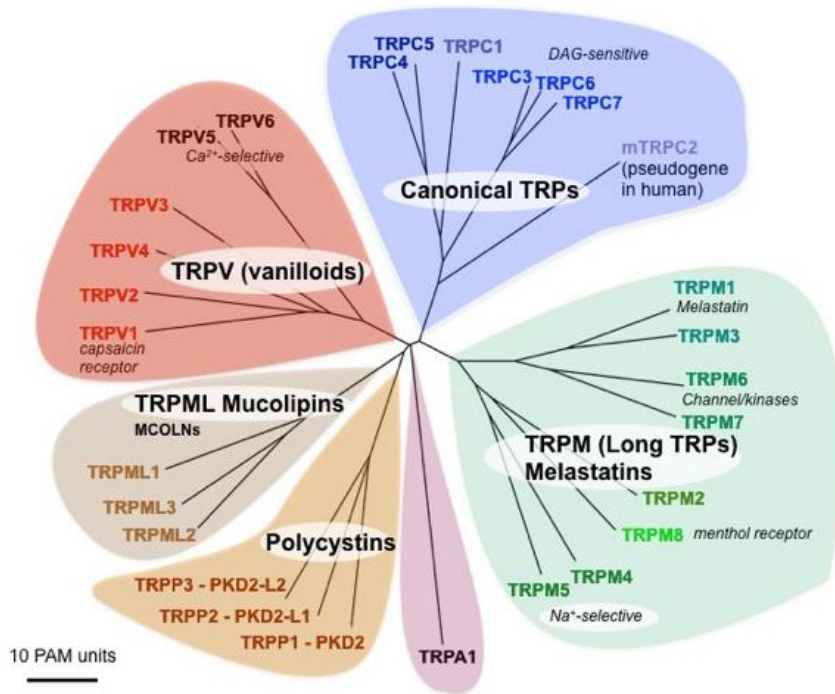
Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne

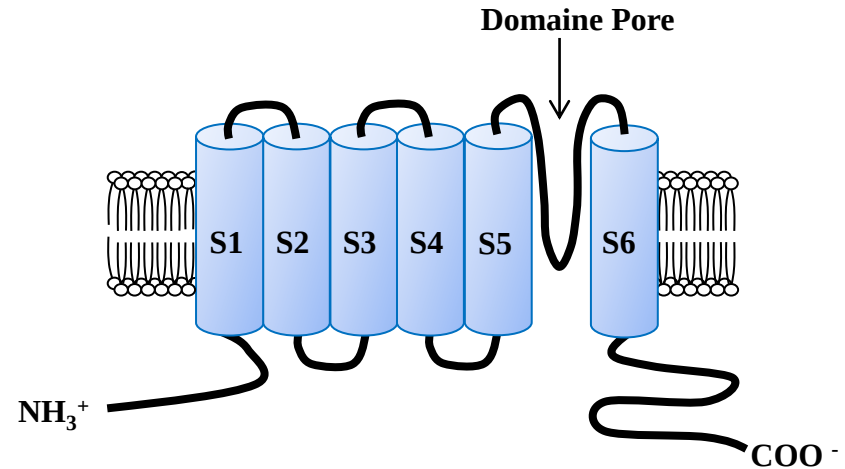
Etude 3: TRPV1 et autres....

I. Contexte

La superfamille des canaux Transient Receptor Potential (TRP)



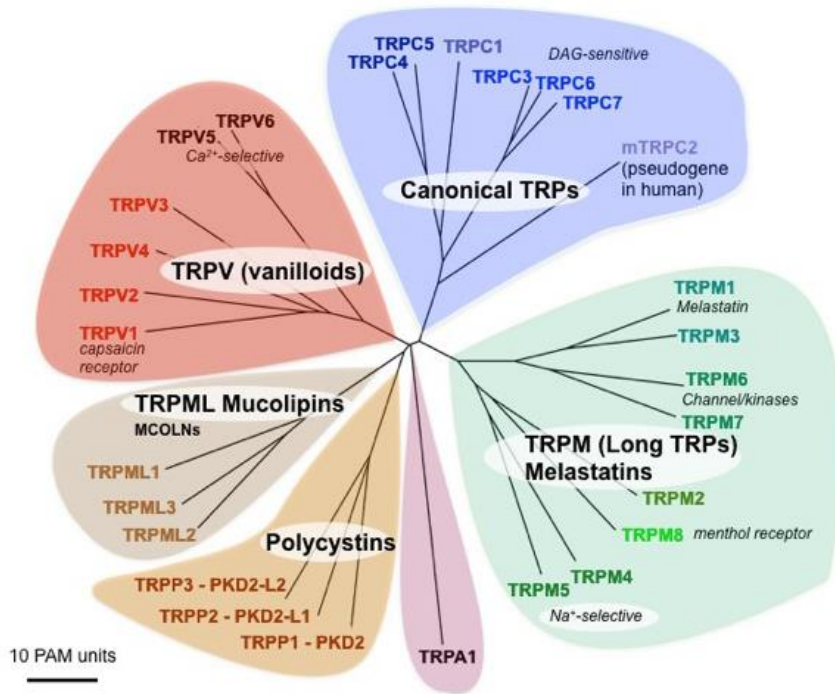
Clapham et al., 2001



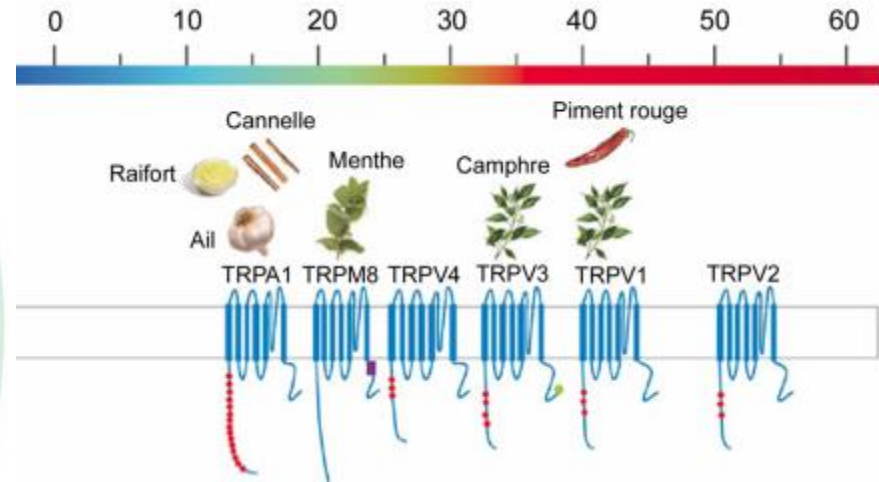
- Superfamille séparée en 7 sous-familles: TRPC (1-7); TRPM (1-8); TRPA1; TRPN; TRPP (1-5); TRPML (1-3); TRPV1 (1-6)
- Canal composé de 6 segments transmembranaires
- 2 boucles terminales cytosoliques
- Domaine pore entre les segments 5 et 6

I. Contexte

La superfamille des canaux Transient Receptor Potential (TRP)



Clapham et al., 2001

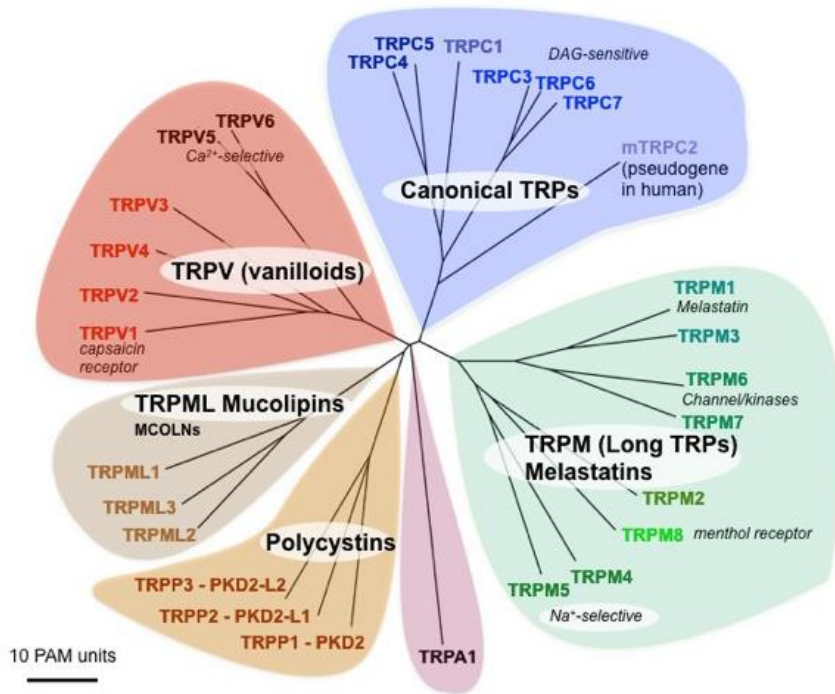


Dhaka A et al., 2006

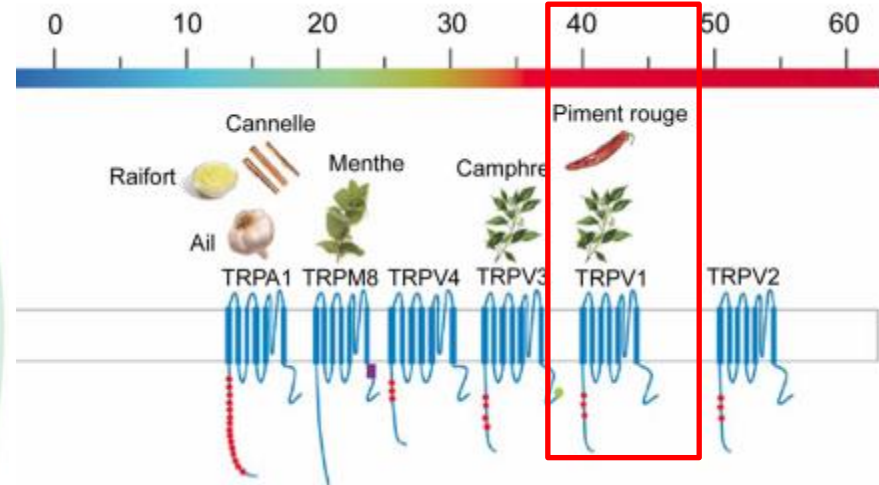
- Superfamille séparée en 7 sous-familles: TRPC (1-7); TRPM (1-8); TRPA1; TRPN; TRPP (1-5); TRPML (1-3); TRPV1 (1-6)
- Canal composé de 6 segments transmembranaires
- 2 boucles terminales cytosoliques
- Domaine pore entre les segments 5 et 6

I. Contexte

La superfamille des canaux Transient Receptor Potential (TRP)



Clapham et al., 2001



Dhaka A et al., 2006

- Superfamille séparée en 7 sous-familles: TRPC (1-7); TRPM (1-8); TRPML (1-3); TRPP (1-5); TRPN; TRPA1; **TRPV1 (1-6)**
- Canal composé de 6 segments transmembranaires
- 2 boucles terminales cytosoliques
- Domaine pore entre les segments 5 et 6

I. Contexte

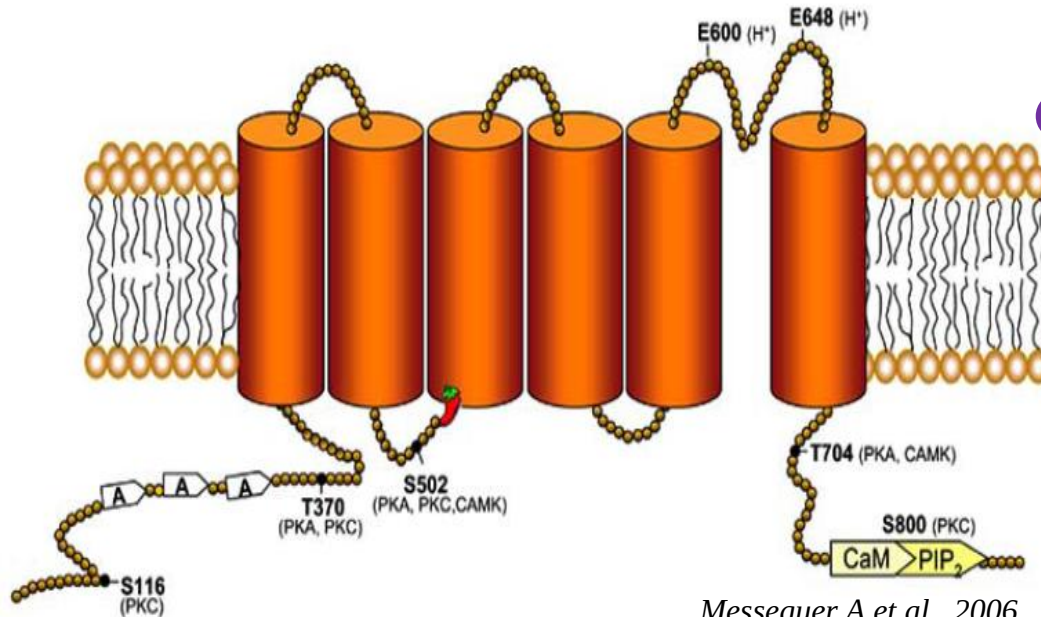
Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)

Sensibilité à la
Capsaïcine



Sensibilité
aux protons

Sensibilité aux
fortes
températures



Messeguer A. et al., 2006

Sensibilité à la
capsazépine

I. Contexte

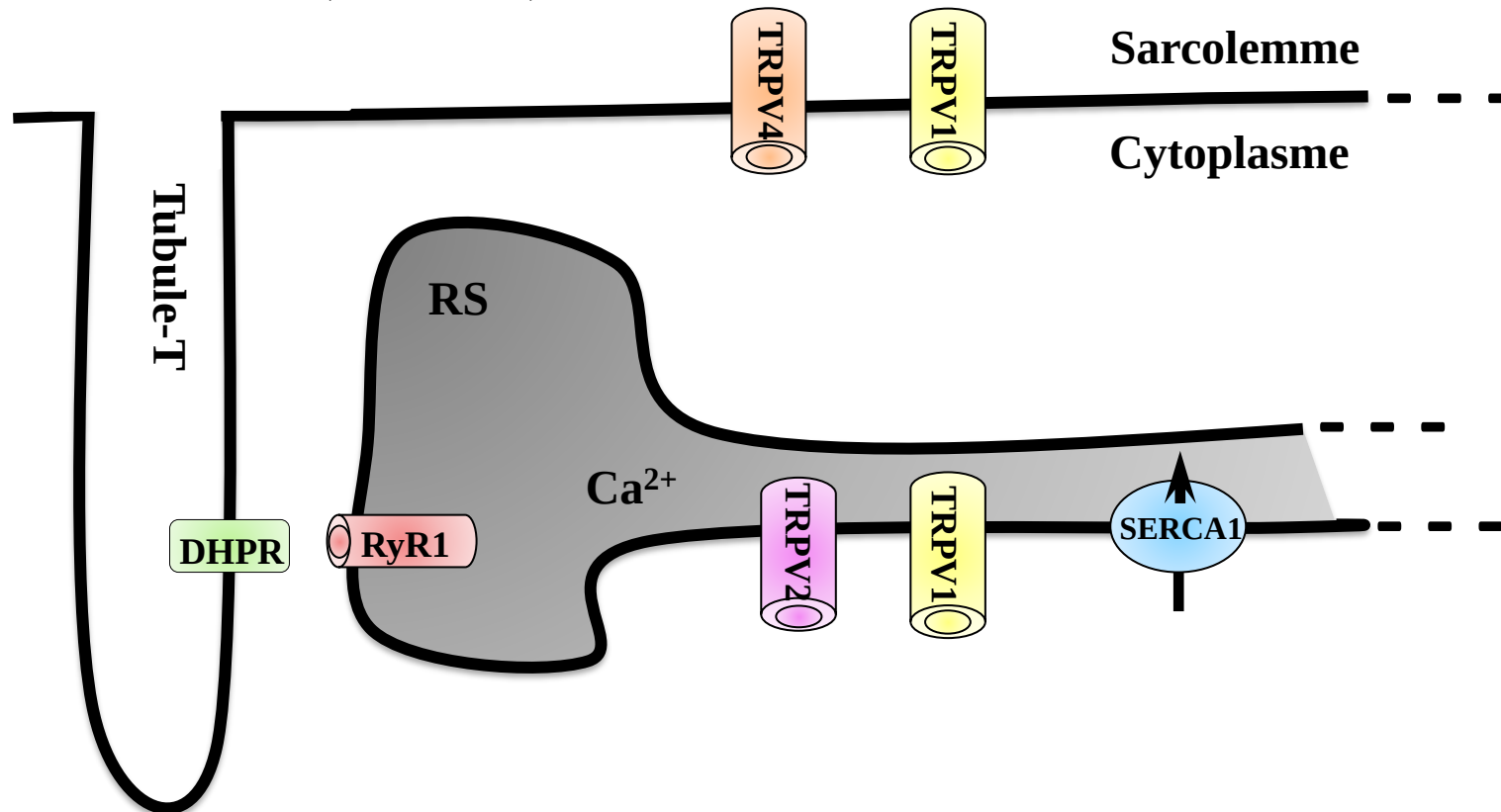
TRPV et muscle squelettique

Expression de la sous-famille TRPV dans le muscle strié squelettique:

TRPV2 est localisé au niveau du RS dans les fibres musculaires striées squelettiques de souris (*Zanou et al., 2009*)

TRPV4 est localisé au niveau du sarcolemme dans les fibres musculaires striées squelettiques de souris (*Kruger et al., 2008*)

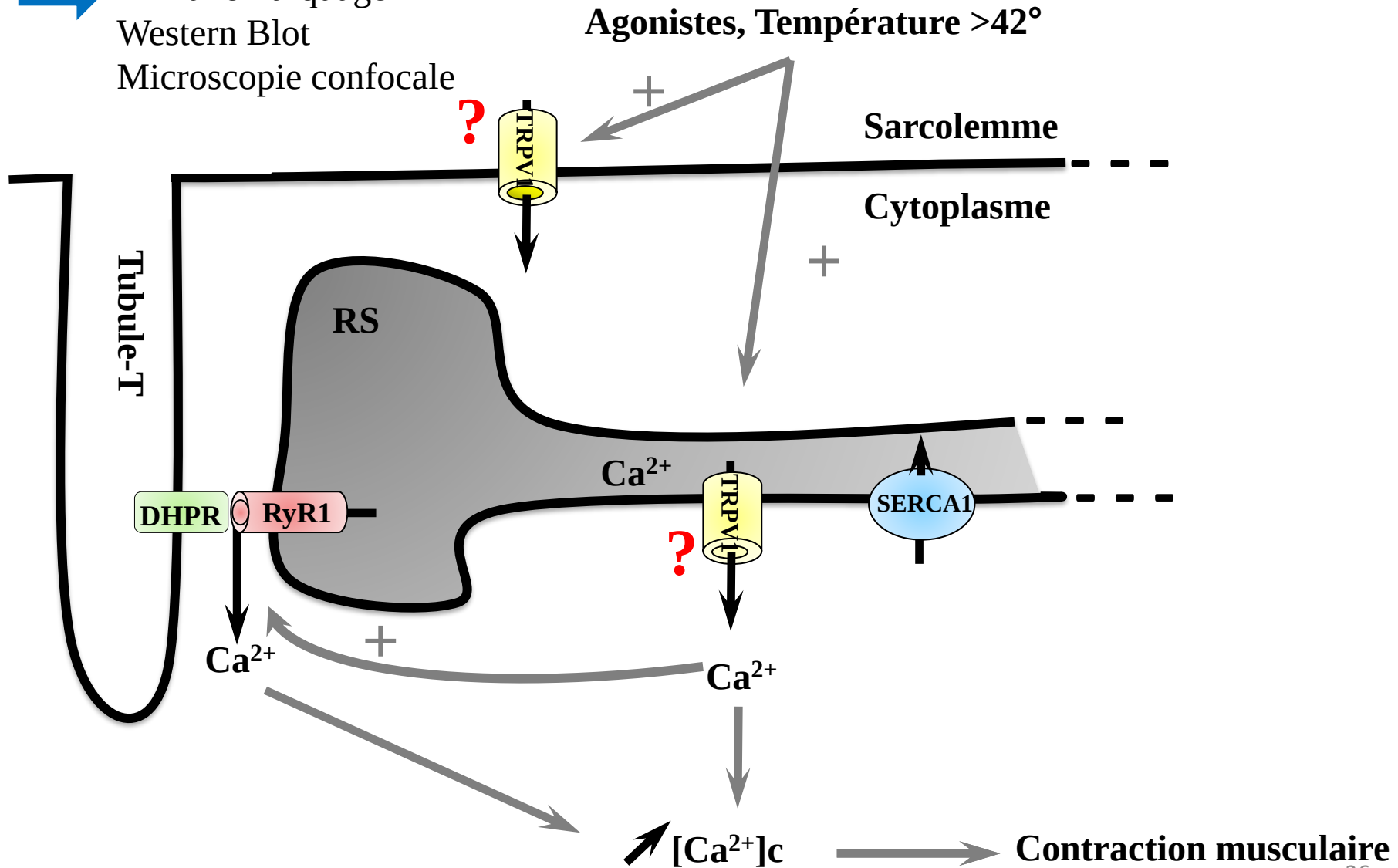
TRPV1 est localisé à la fois au niveau du RS et du sarcolemme dans les lignées cellulaires de rat (*Xin et al., 2005*)



II. Objectifs de travail

1. Caractérisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique de souris

➔ Immunomarquage
Western Blot
Microscopie confocale



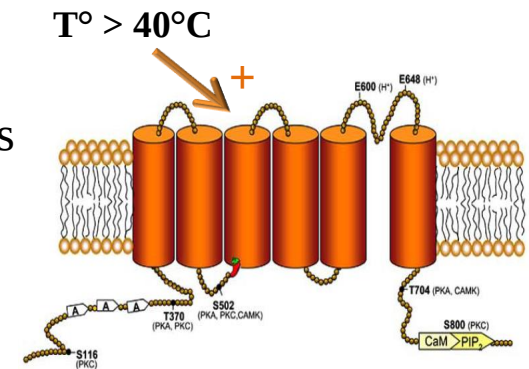
II. Objectifs de travail

2. Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

➔ Microscopie confocale

Neurones: activation du canal TRPV1 par les anesthésiques volatils (Cornett et al., 2008)

Hyperthermie Maligne:



Crise du métabolisme exacerbée du muscle strié squelettique menant à une brusque montée de température chez le patient ($> 42^{\circ}\text{C}$). (Rosenberg H. et al., 2007)

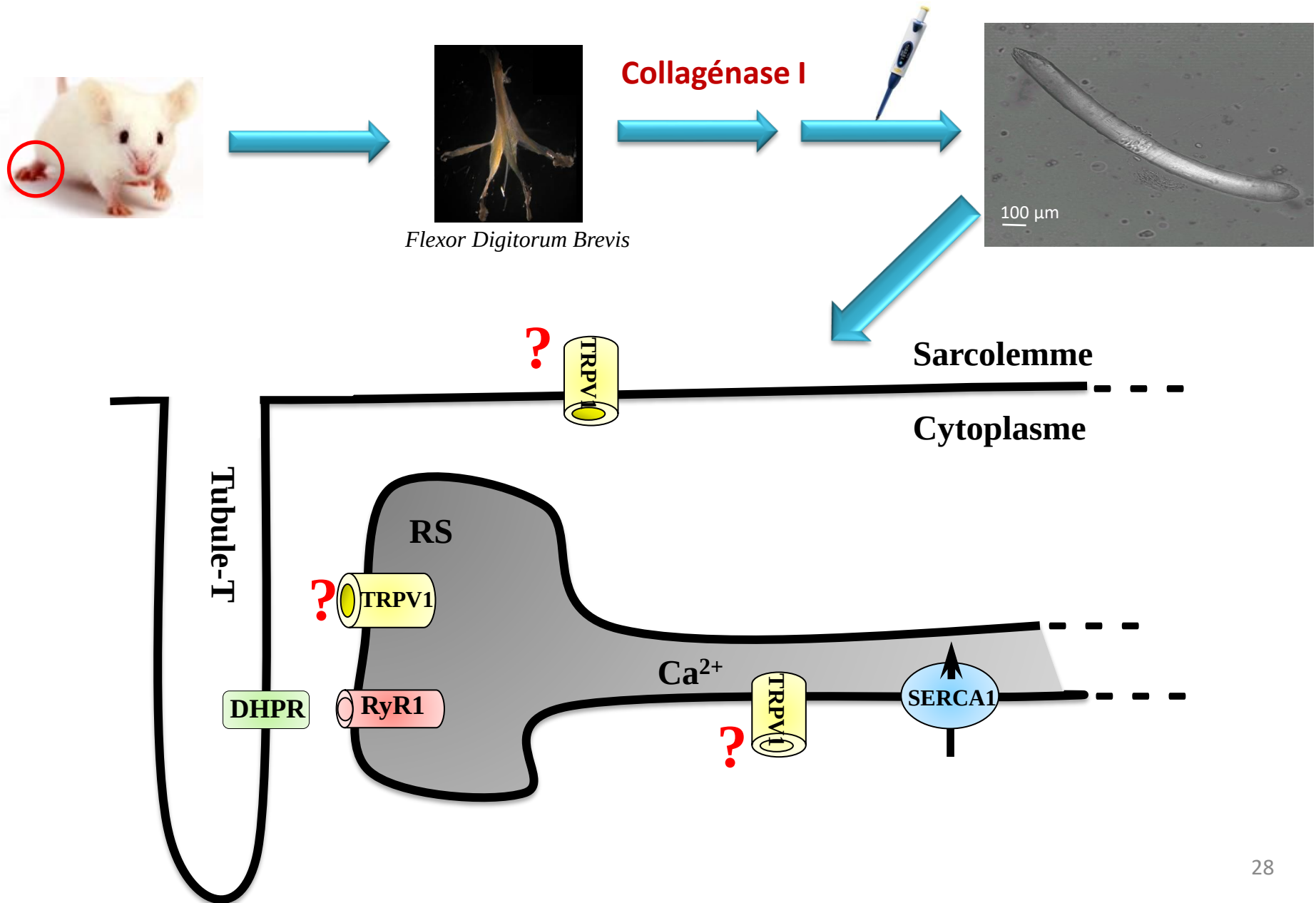
Pathologie déclenchée par une exposition à différents agents pharmacologiques ➔ anesthésiques volatils ➔ **halothane, isoflurane, desflurane**.

➔ Si les éléments déclencheurs de l'hyperthermie maligne sont connus, leurs **cibles sont inconnues**.

TRPV1, canal cationique à l'origine d'une libération exacerbée de calcium du réticulum sarcoplasmique suite à l'application d'anesthésiques volatils?

Etude 1

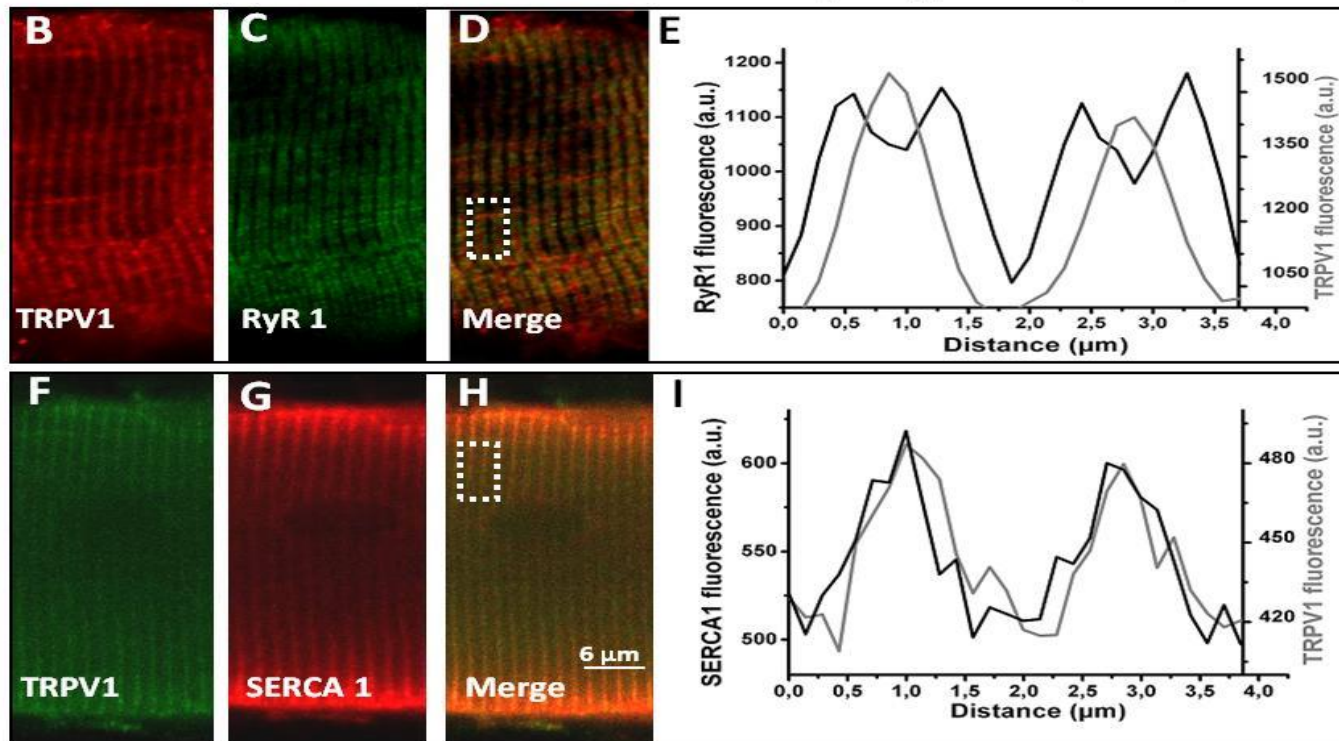
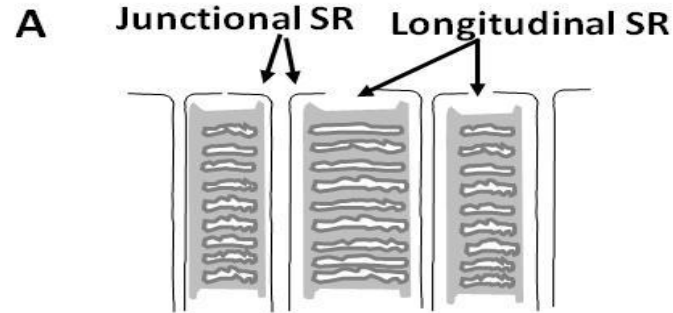
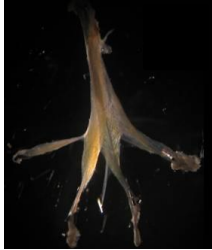
Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique



Etude 1

Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Technique de localisation : immunomarquage



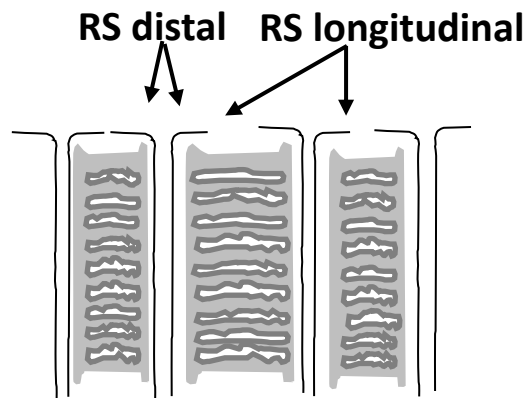
➡ TRPV1 est exprimé au niveau de la partie longitudinale du RS.

Etude 1

Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Technique de localisation: Western Blot

Observation des différents niveaux d'expression de TRPV1 et SERCA1 dans les muscles striés squelettiques

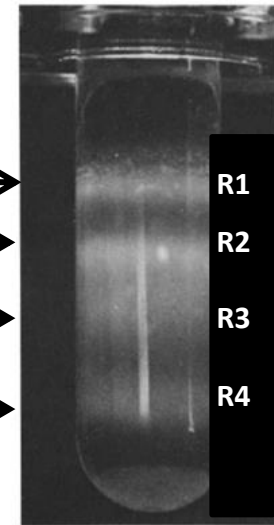


RS longitudinal + tubule T+ mb plasmique →

RS longitudinal →

RS longitudinal +distal →

RS distal →



% Sucrose

27%

32%

38%

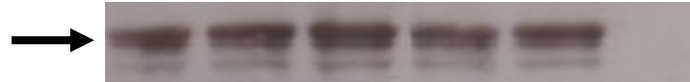
45%

Saito et al., 1984

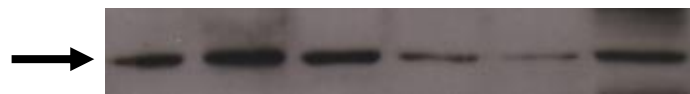
Total

FDB/IO
Soleus
EDL
Gastroc R
Gastroc B
Cerveau

SERCA 1
110 kDa



TRPV1
100kDa

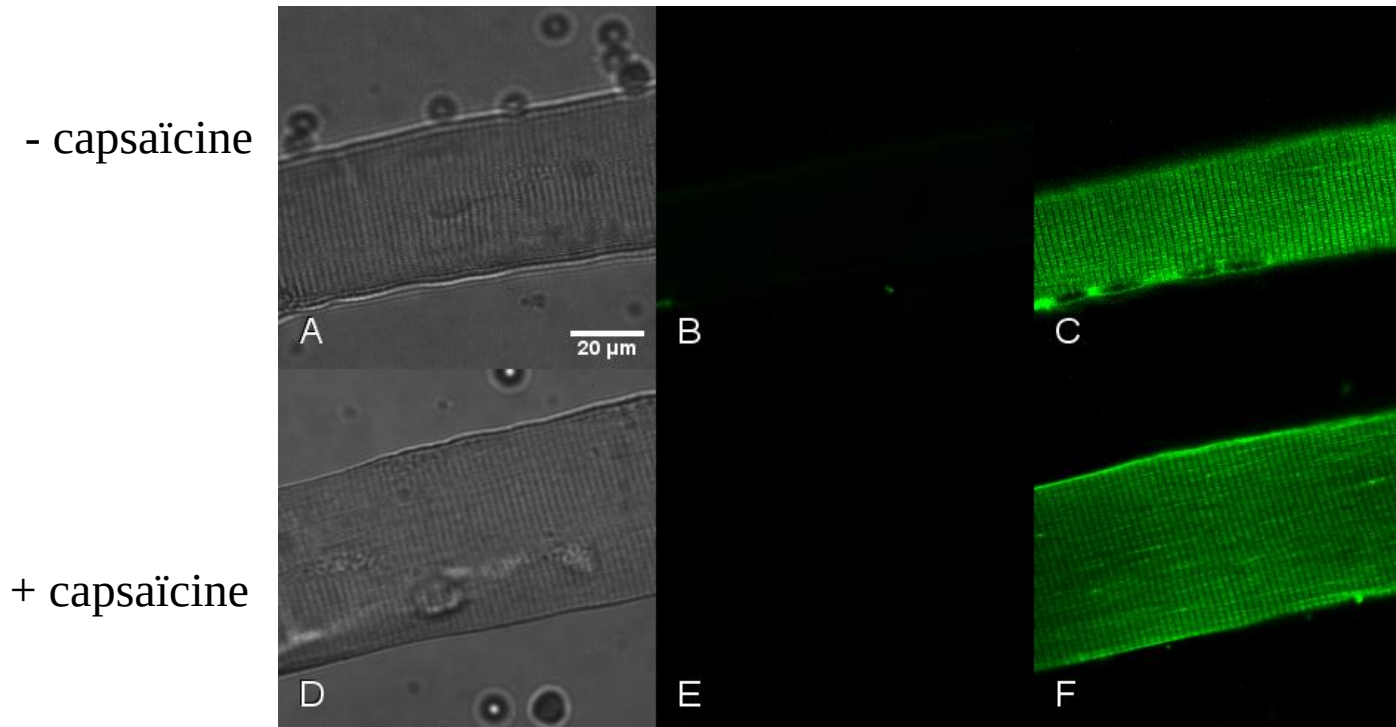


**Protéine TRPV1: présente dans les différents muscles testés.
préférentiellement exprimée au niveau de la partie
longitudinale du RS.**

Etude 1

Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Technique de localisation: utilisation de la sonde FM1-43 et microscopie confocale



Sonde FM1-43:
traverse la
membrane via
TRPV1 en
présence de
capsaïcine.
(Meyers et al., 2003)

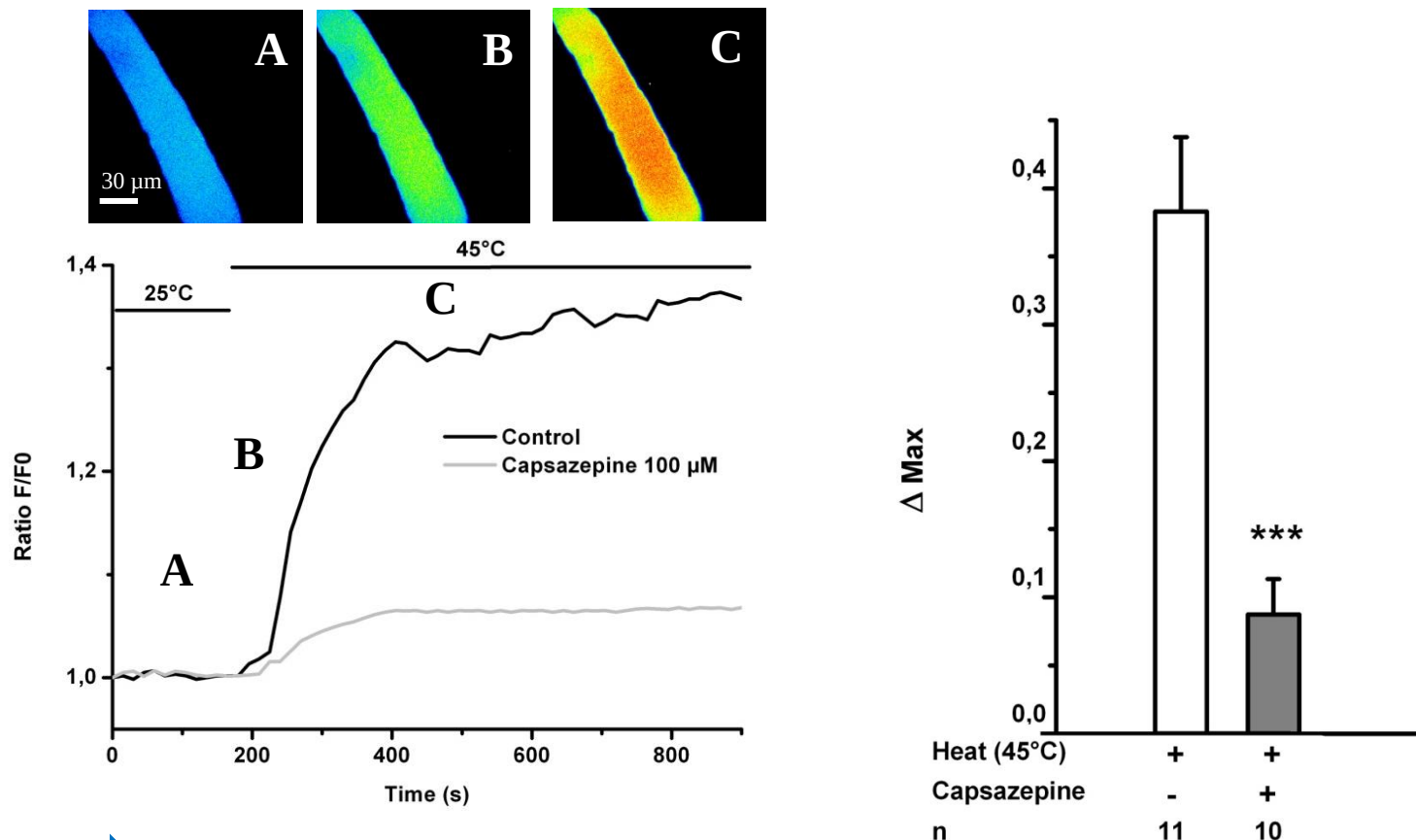
➡ **La sonde FM1-43 n'entre pas dans les fibres isolées de FDB.
TRPV1 est localisé uniquement au niveau de la partie longitudinale du
réticulum sarcoplasmique.**

Etude 1

Fonctionnalité de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.

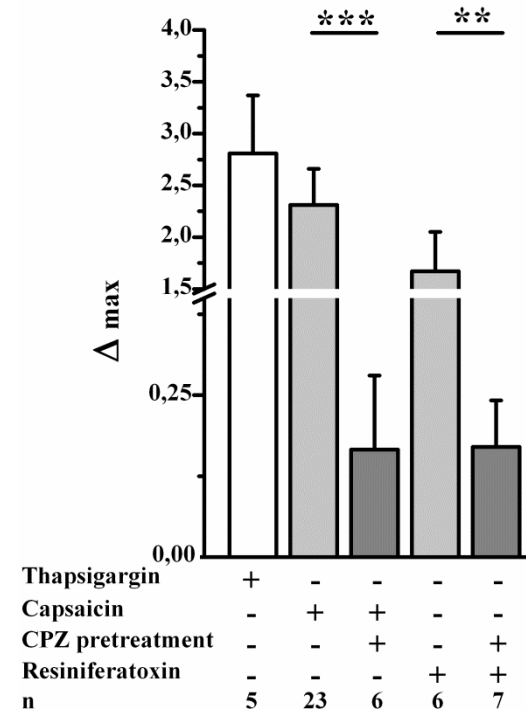
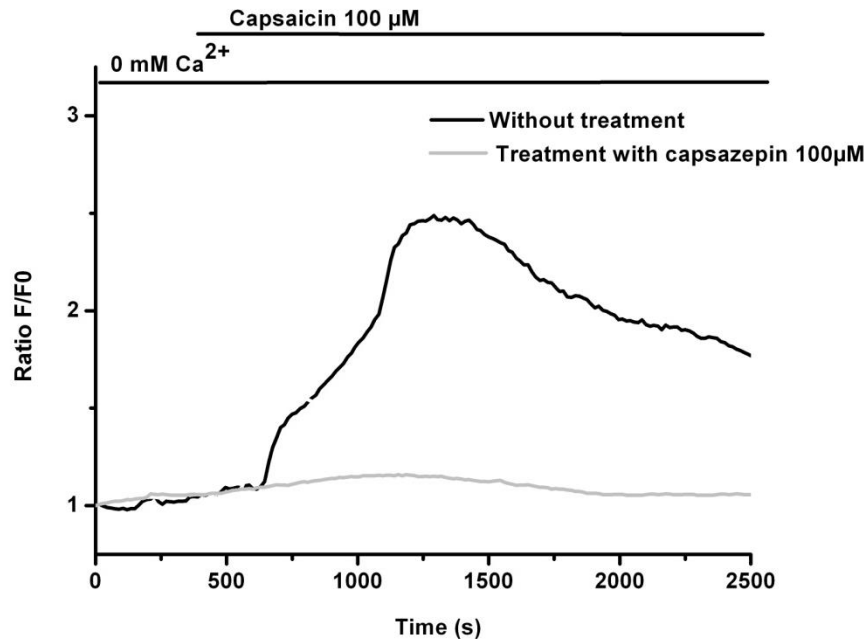
Observation de la libération de calcium par TRPV1 suite à l'application de fortes températures sur les fibres isolées. Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.



➡ Libération de calcium *via* TRPV1 suite à l'application de fortes températures. TRPV1 est activé physiologiquement par la température. ³²

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.

Observation de la libération de calcium par TRPV1 suite à l'application de différents agents pharmacologiques sur les fibres isolées. Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.

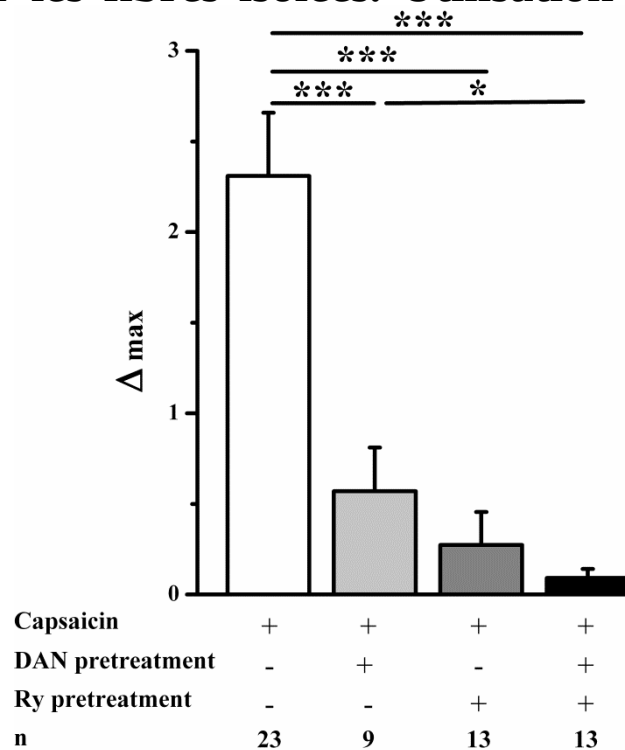
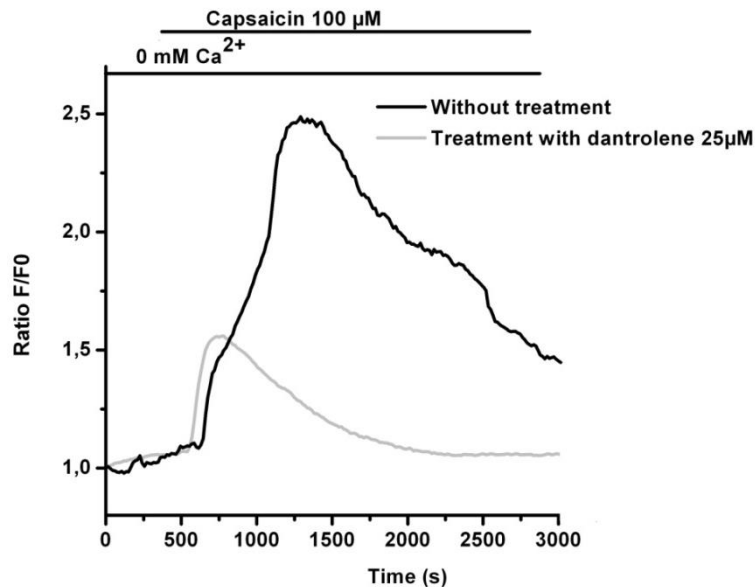


➡ TRPV1 est fonctionnel dans notre modèle d'étude:

- Activé par la capsaïcine 100 µM et la résinifératoxine 10 µM
- Inhibé par la capsazépine 100 µM

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.

Observation de la libération de calcium par TRPV1 suite à l'application de différents agents pharmacologiques sur les fibres isolées. Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.

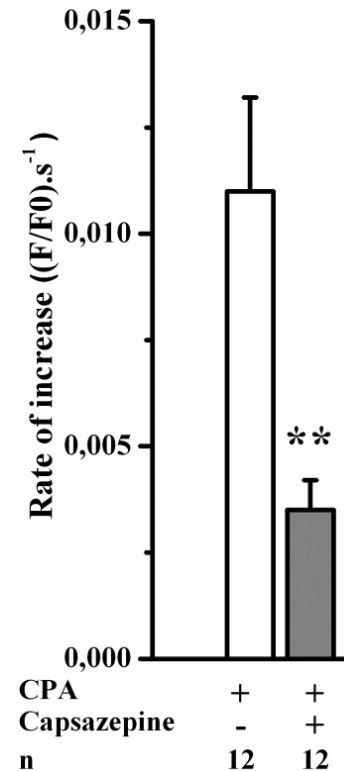
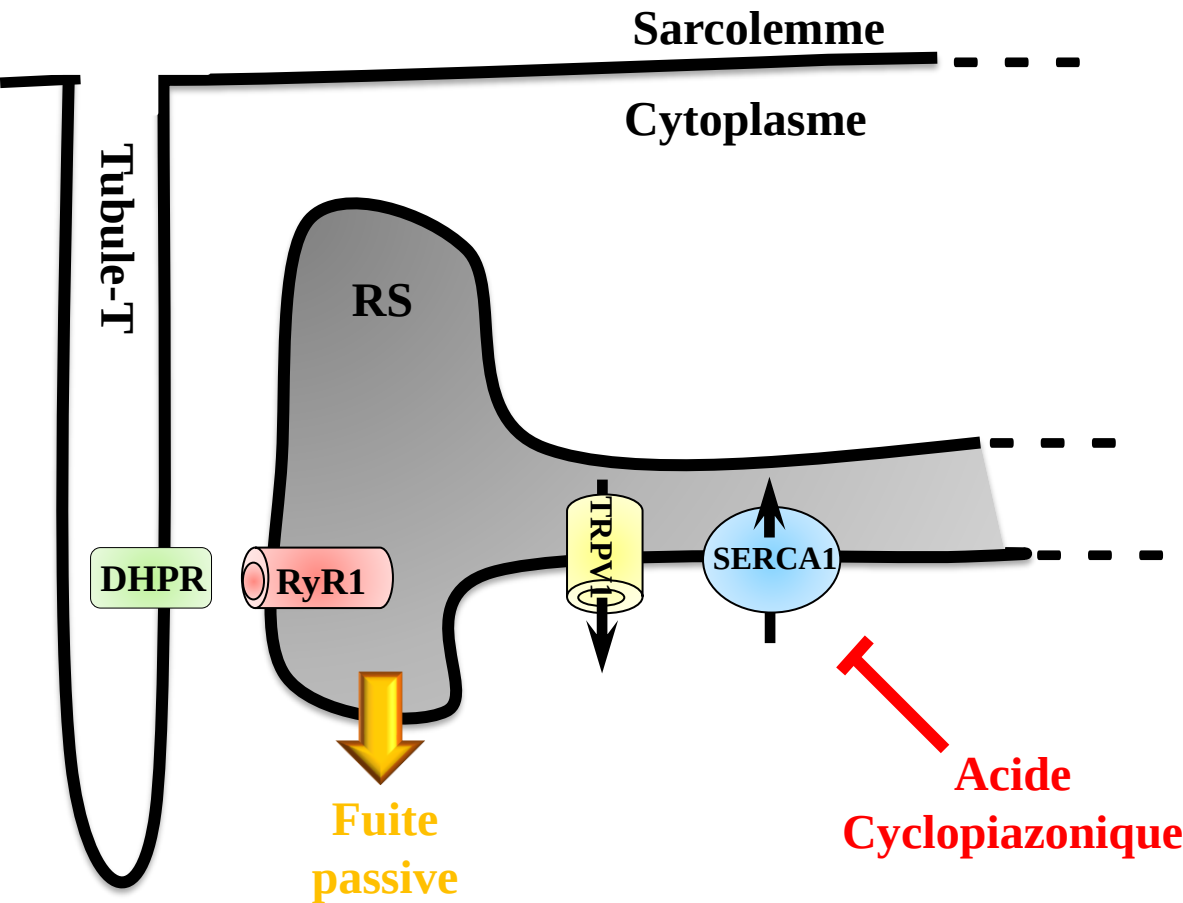


➡ L'inhibition du RyR1 entraîne une diminution de l'élévation de calcium induite par la capsaïcine. Le calcium libéré par TRPV1 pourrait potentialiser la réponse du RyR1.

Etude 1

Fonctionnalité de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

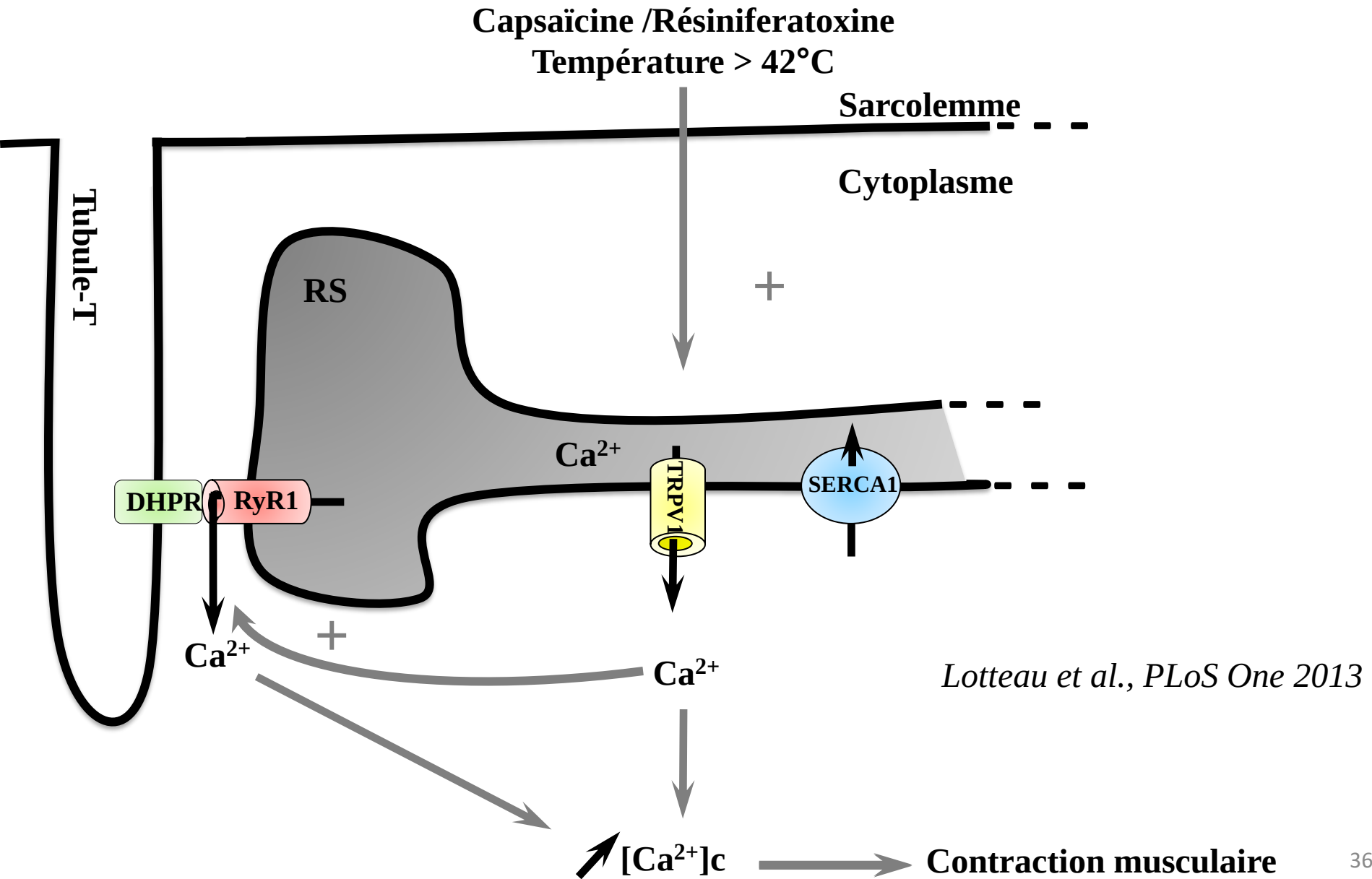
Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1. Observation d'une fuite de calcium du RS *via* TRPV1 en condition de repos.



➡ TRPV1 contribuerait à la fuite calcique passive au repos du réticulum sarcoplasmique.

Etude 1

Conclusion



Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.

Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne

Etude 3: TRPV1 et autres....

Hyperthermie Maligne:

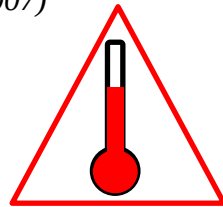
Définition:

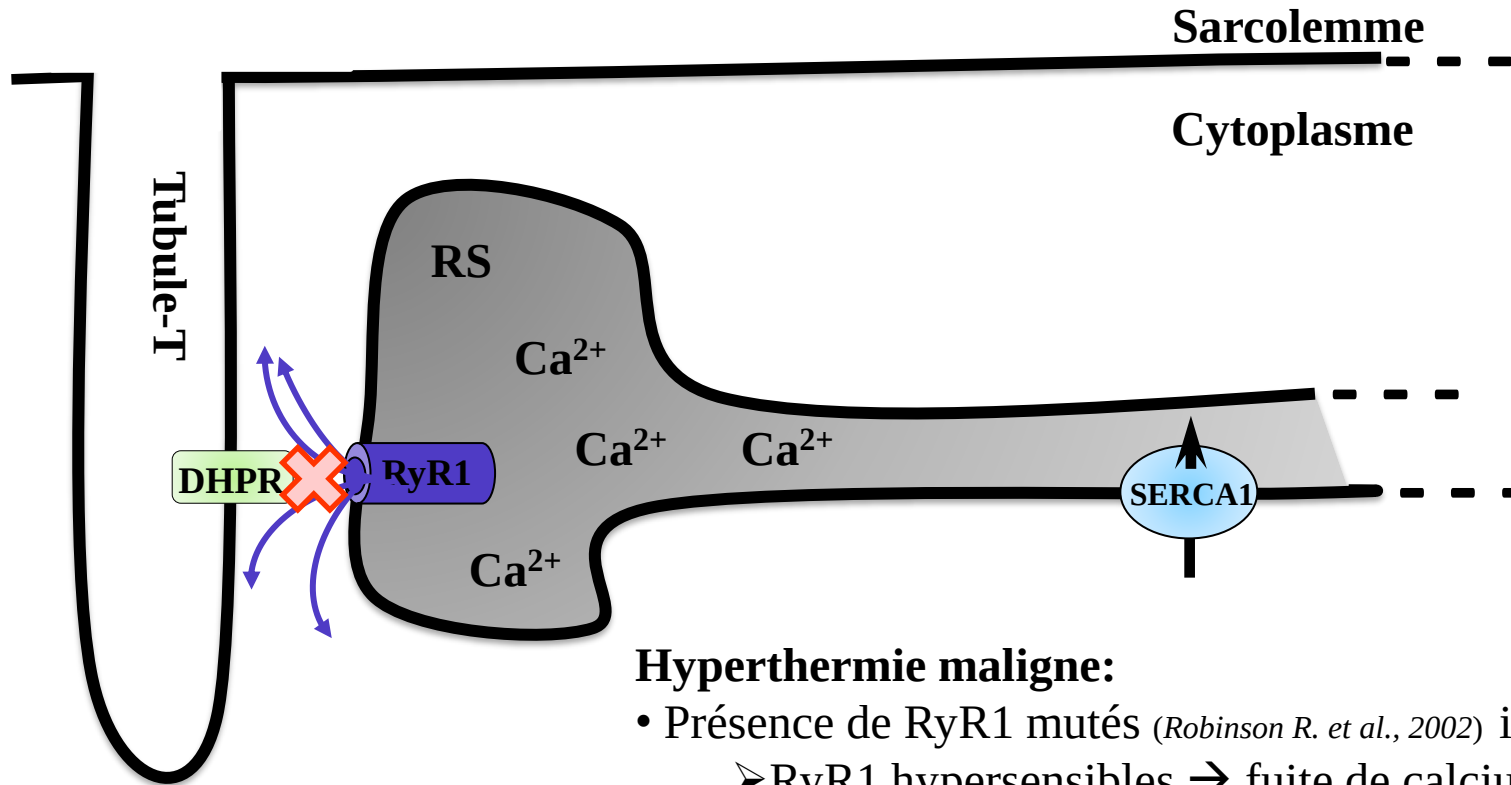
Crise du métabolisme exacerbée du muscle strié squelettique menant à une brusque montée de température chez le patient ($> 42^{\circ}\text{C}$). (Rosenberg H. et al., 2007)

Causes:

Pathologie déclenchée par une exposition à différents agents pharmacologiques → anesthésiques volatils → **halothane**, **isoflurane**, **desflurane**.

→ Si les éléments déclencheurs de l'hyperthermie maligne sont connus, leurs **cibles sont inconnues**.





Hyperthermie maligne:

- Présence de RyR1 mutés (*Robinson R. et al., 2002*) induisant:
 - RyR1 hypersensibles → fuite de calcium au repos
 - Découplage RyR1-DHPR → pas de libération de Ca^{2+}
- Pas d'effet directs des anesthésiques volatils sur les RyR1 mutés

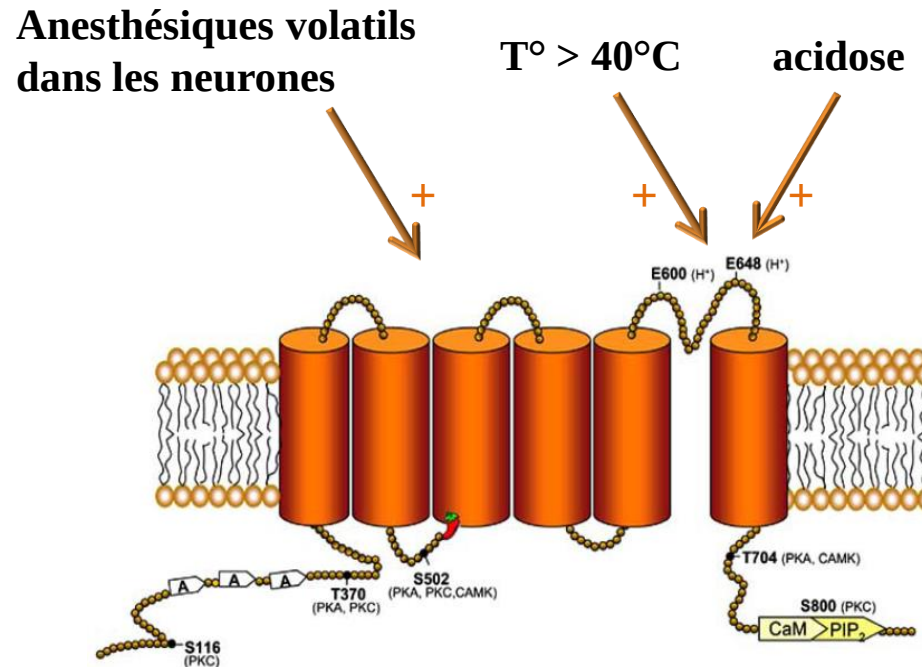


Quelles sont les cibles potentielles des anesthésiques volatils?

TRPV1?

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

TRPV1



Localisé au niveau de la partie longitudinale du RS dans les cellules musculaires striées squelettiques.

TRPV1 est un canal de fuite fonctionnel du RS qui pourrait interagir avec le RyR1 dans les fibres musculaires striées squelettiques.

TRPV1 est activé par les anesthésiques volatils dans les neurones (Cornett P.M et al., 2008)

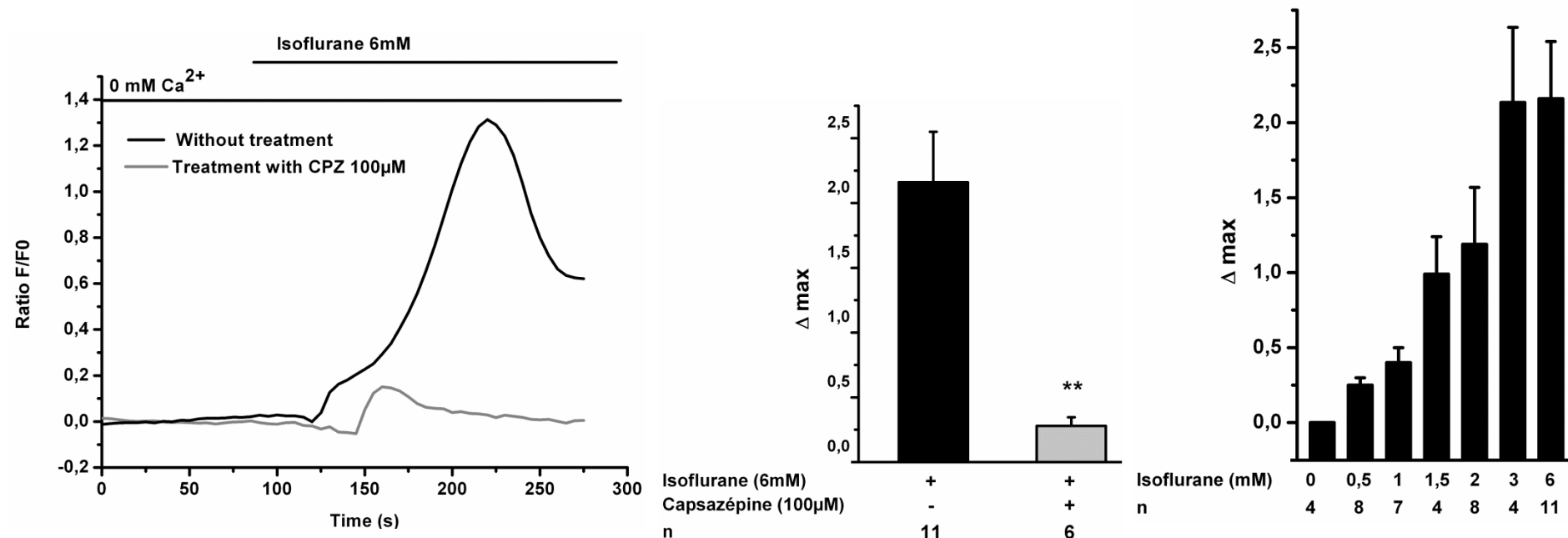
TRPV1 semble le candidat idéal à l'origine d'une libération exacerbée de calcium du RS suite à l'application d'anesthésiques volatils.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.

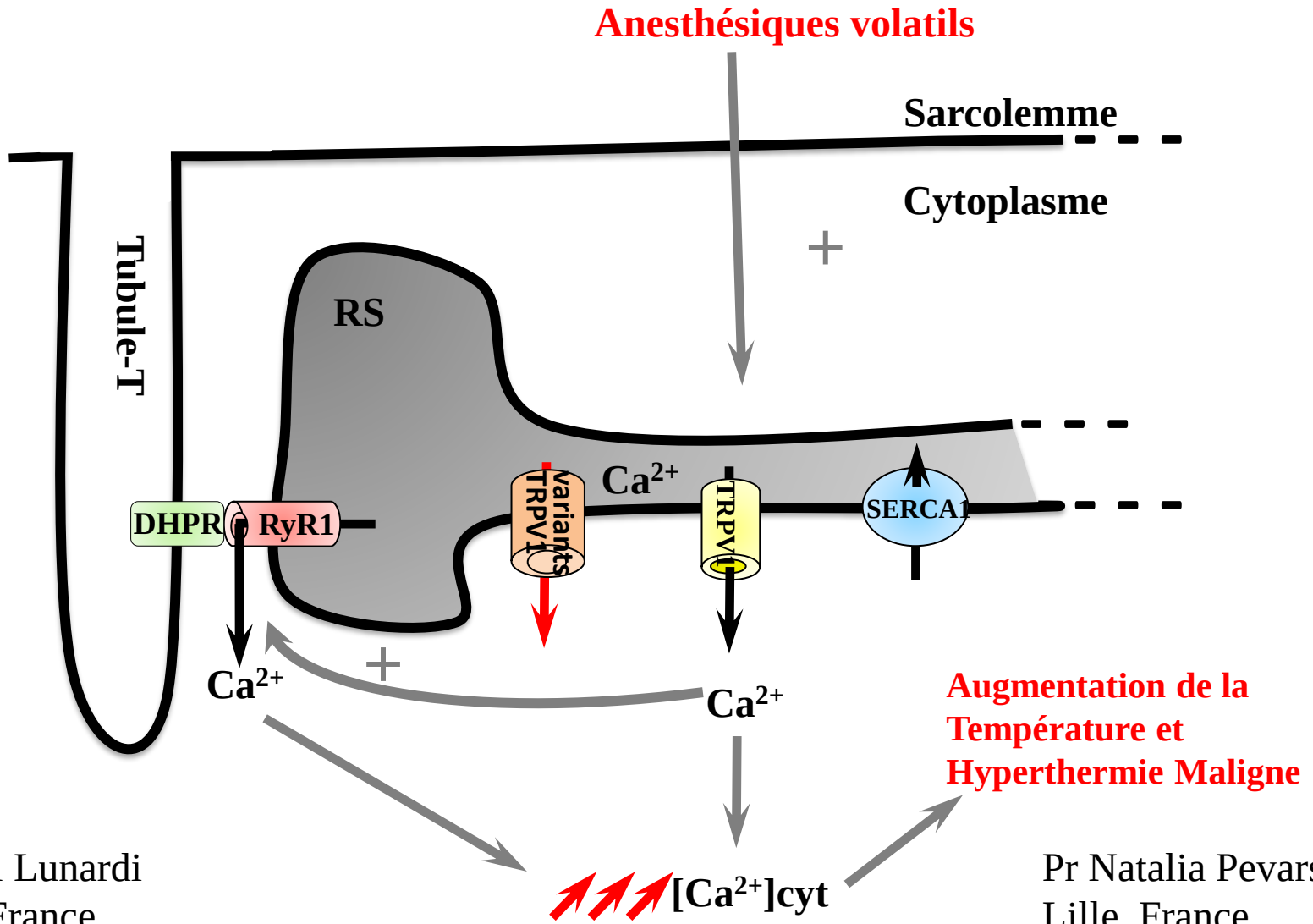
Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.



➡ TRPV1 est activé par les anesthésiques volatils dans les cellules musculaires striées squelettiques différenciées de souris OF1.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne



PU PH Joël Lunardi
Grenoble, France

Pr Natalia Pevarskaya
Lille, France

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains.

Variant TRPV1 T612M:

Diagnostic des patients susceptibles à l'HM



Biopsie musculaire

Test de contracture *in vitro*:
Halothane, Caféine

Patient sensible à l'HM
(SHM)

Réponse + à l'halothane
Réponse + à la caféine

Patient équivoque à l'HM
(EHM)

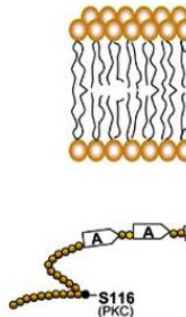
Réponse + à l'un des deux tests

Patient non sensible à l'HM
(NHM)

Réponse - à l'halothane
Réponse - à la caféine

veloppé une
ratoire après
MH équivoque
rise.

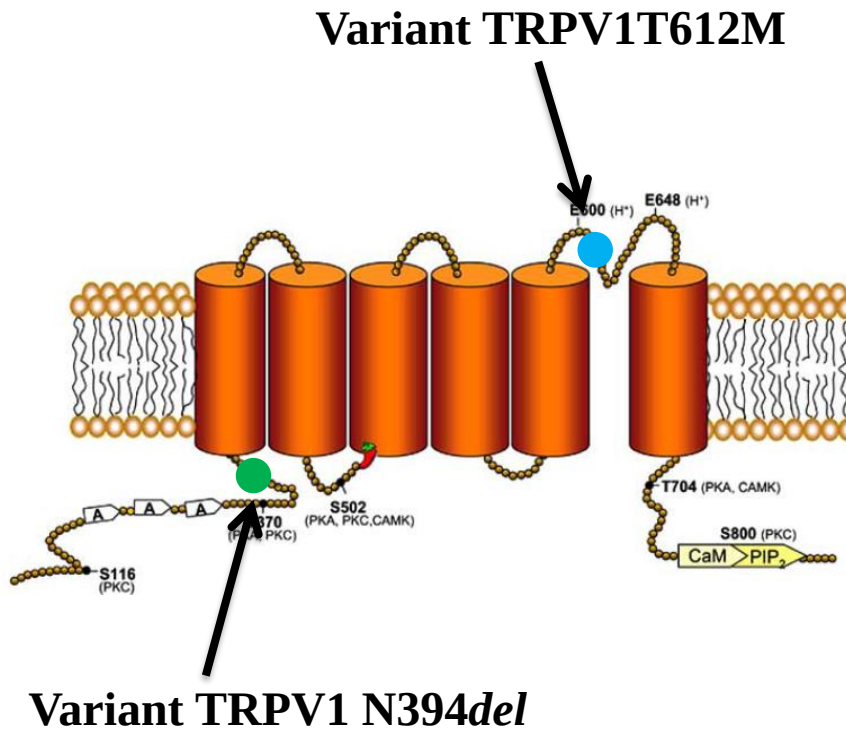
TRPV1
humain



Variant TRPV1 N394del

Etude des variants TRPV1 humains.

TRPV1
humain



Variant TRPV1 T612M:

Patient ayant développé une hyperthermie post-opératoire après anesthésie.

Testé secondairement MH équivoque plusieurs mois après la crise.

Variant TRPV1 N394del:

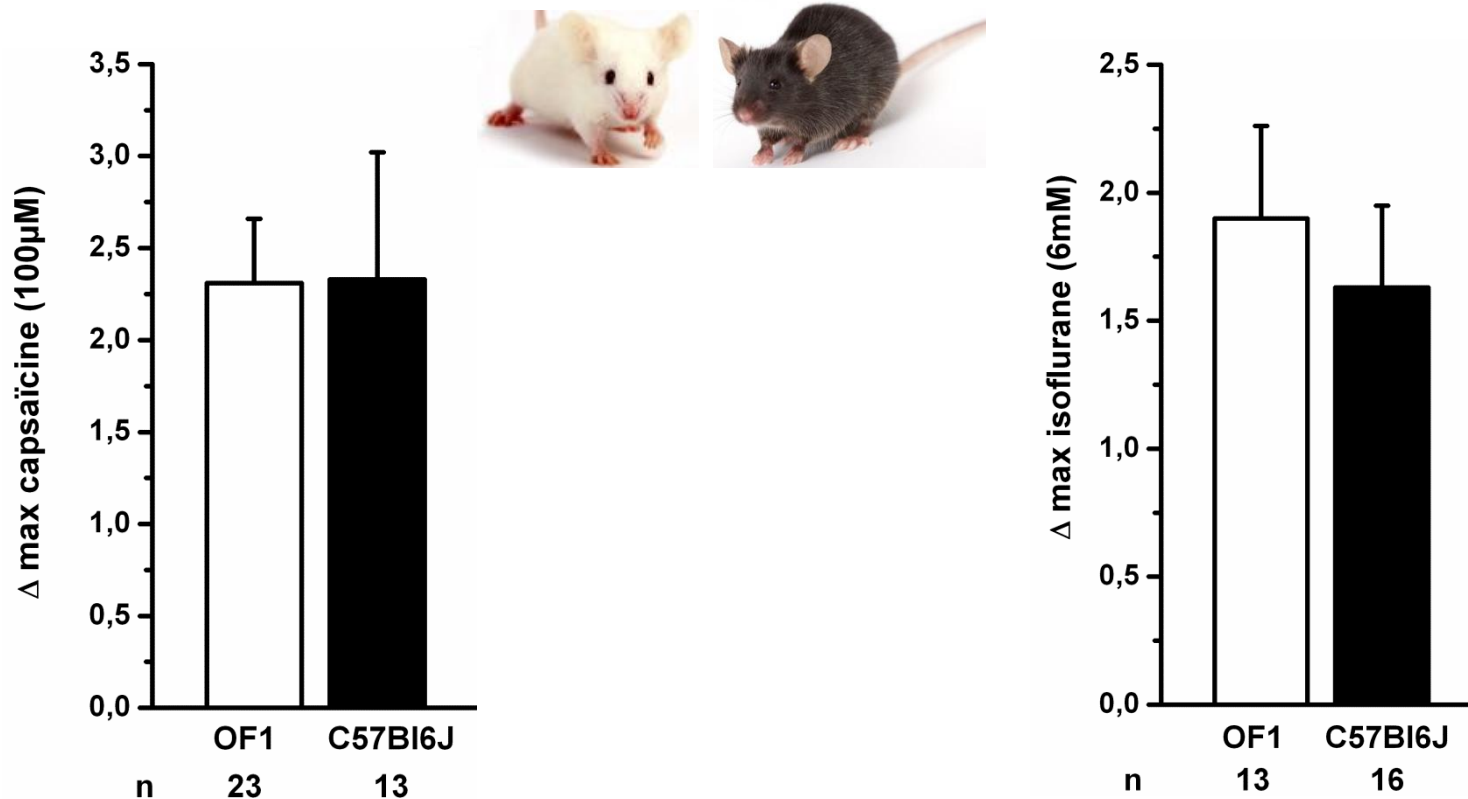
Patient asymptomatique, testé secondairement MH équivoque dans le cadre d'une étude familiale.

Porteur d'une mutation récessive du gène RyR1 à priori non responsable du caractère MH équivoque. Ses deux enfants sont atteints d'une myopathie associée au gène RyR1.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Comparaison des réponses à la capsaïcine et à l'isoflurane entre les souris OF1 et C57Bl6J



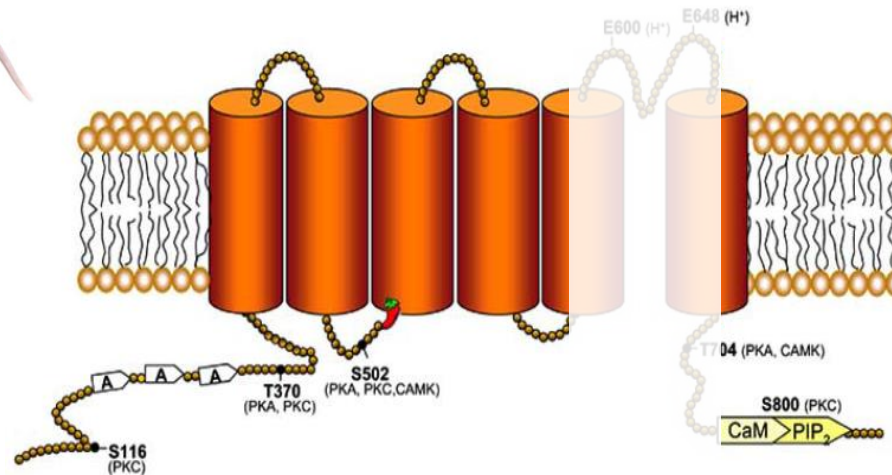
La réponse à la capsaïcine ainsi que la réponse à l'isoflurane est identique entre les souris OF1 et C57Bl6J.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Comparaison des réponses à la capsaïcine et à l'isoflurane entre les souris C57Bl6J et TRPV1^{-/-}

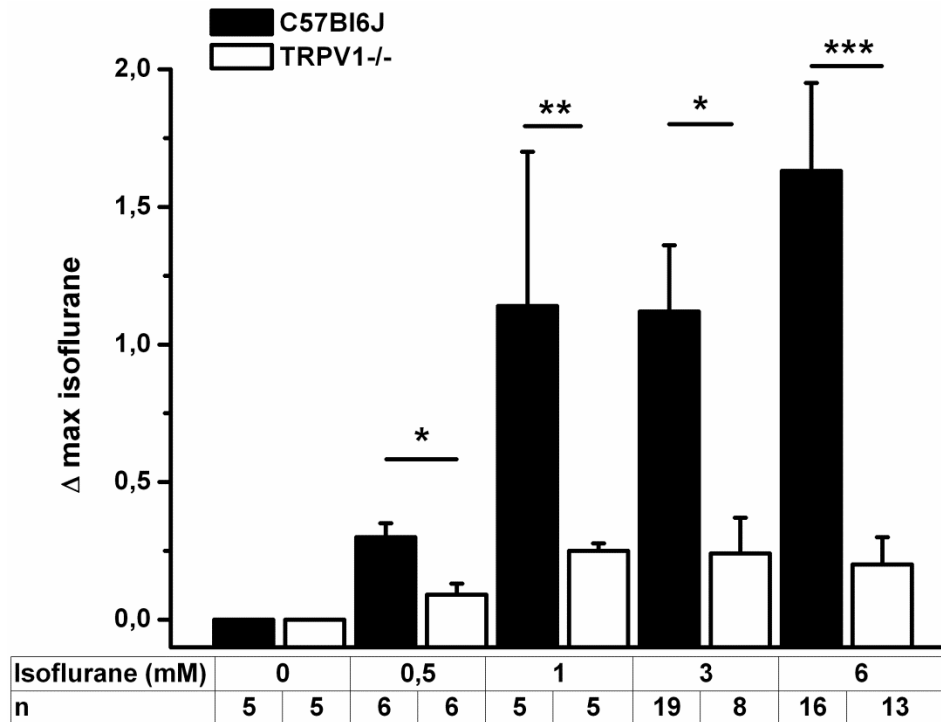
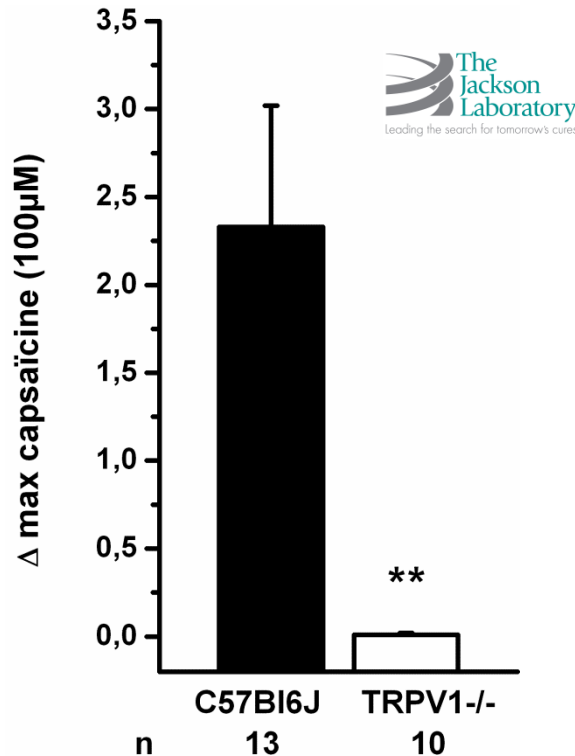
Construction des souris TRPV1^{-/-} par le Dr. D Julius Université de Californie



➡ Interruption de l'exon codant la partie 5 et une partie de la région 6 des domaines transmembranaires ainsi que la région pore du canal au niveau du chromosome 11.

Souris viables, fertiles, de taille normale ne présentant pas de troubles comportementaux majeurs.

Comparaison des réponses à la capsaïcine et à l'isoflurane entre les souris C57Bl6J et TRPV1^{-/-}



Les cellules musculaires isolées de souris déficientes en TRPV1 ne répondent plus à la capsaïcine. Leur réponse à l'isoflurane est significativement diminuée.

Etude 2

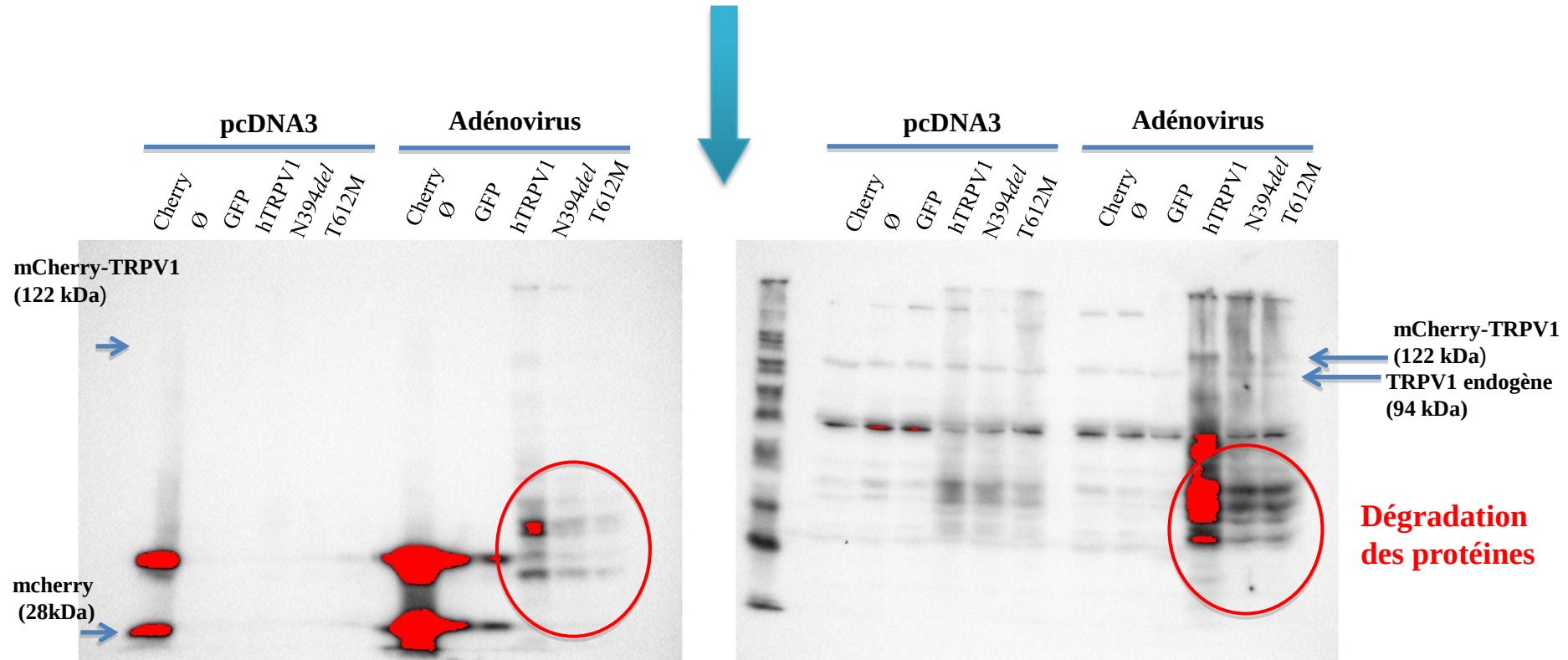
Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains.

Transfection: infection par adénovirus

Construction des adénovirus

Tests dans les cellules HEK293 et HUH7



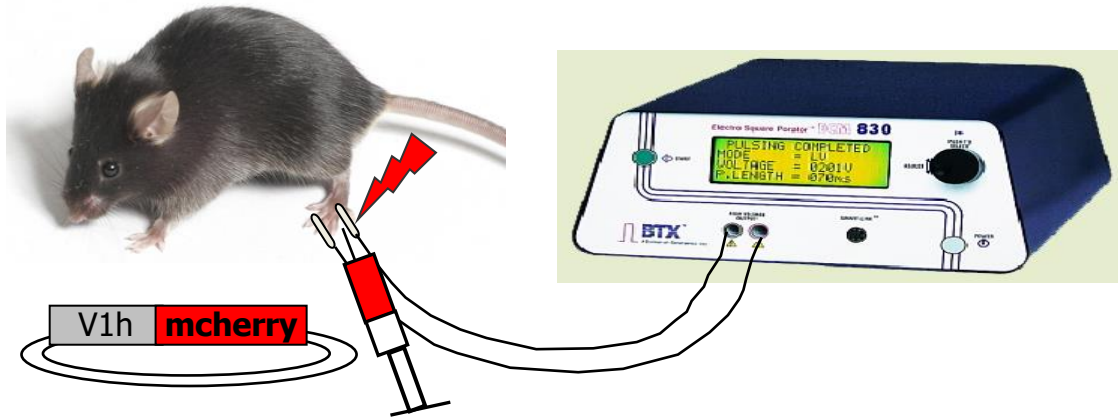
Problème de surexpression des variants TRPV1 humains et de TRPV1 humain dans les adénovirus.

Dégradation rapide des protéines TRPV1.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains:
Transfection: électroporation *in vivo*



8 jours après
électroporation

Isolement enzymatique des fibres

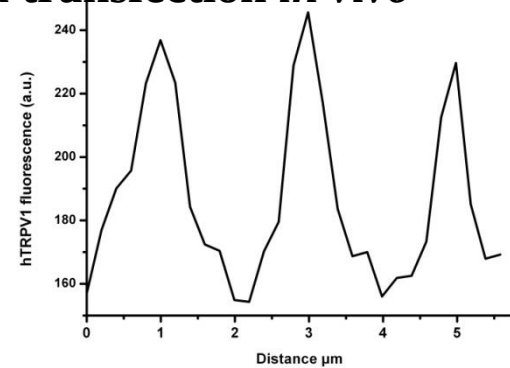
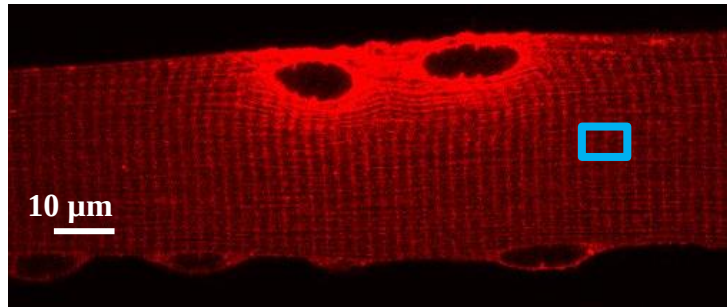
Observation microscope confocal du profil
d'expression de TRPV1.

Etude 2

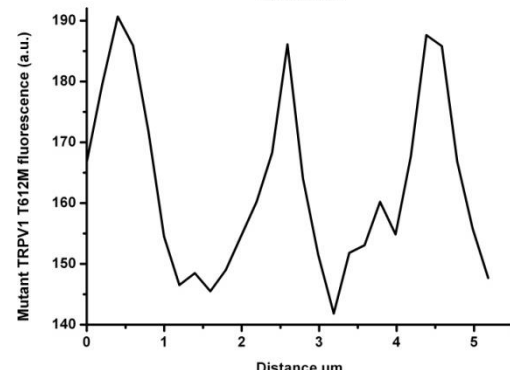
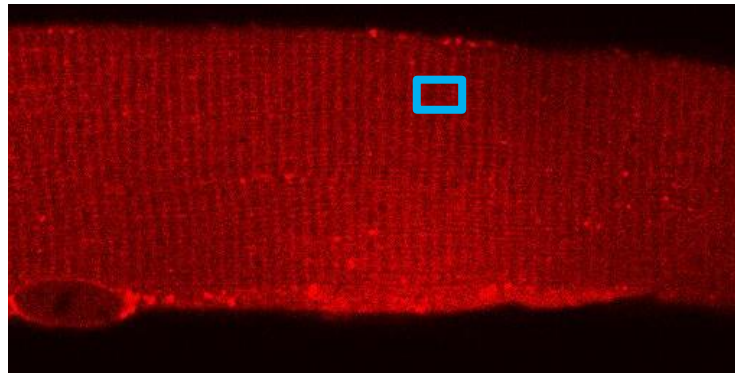
Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*

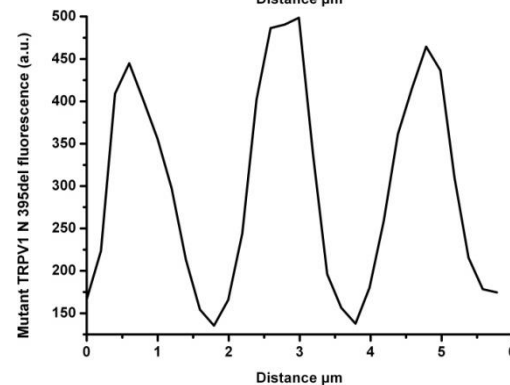
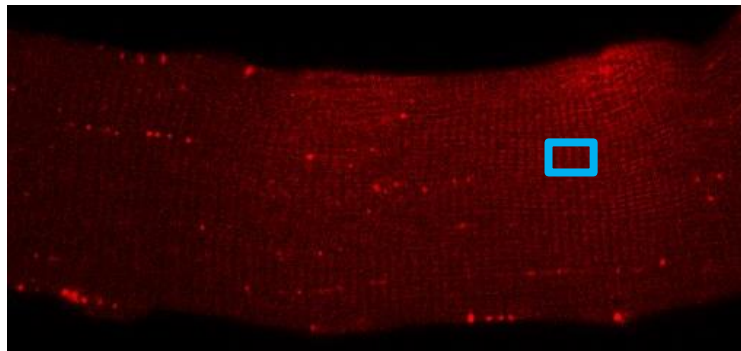
hTRPV1
transfecté dans les
souris TRPV1^{-/-}



Variant T612M
transfecté dans les
souris TRPV1^{-/-}



Variant N394del
transfecté dans les
souris TRPV1^{-/-}

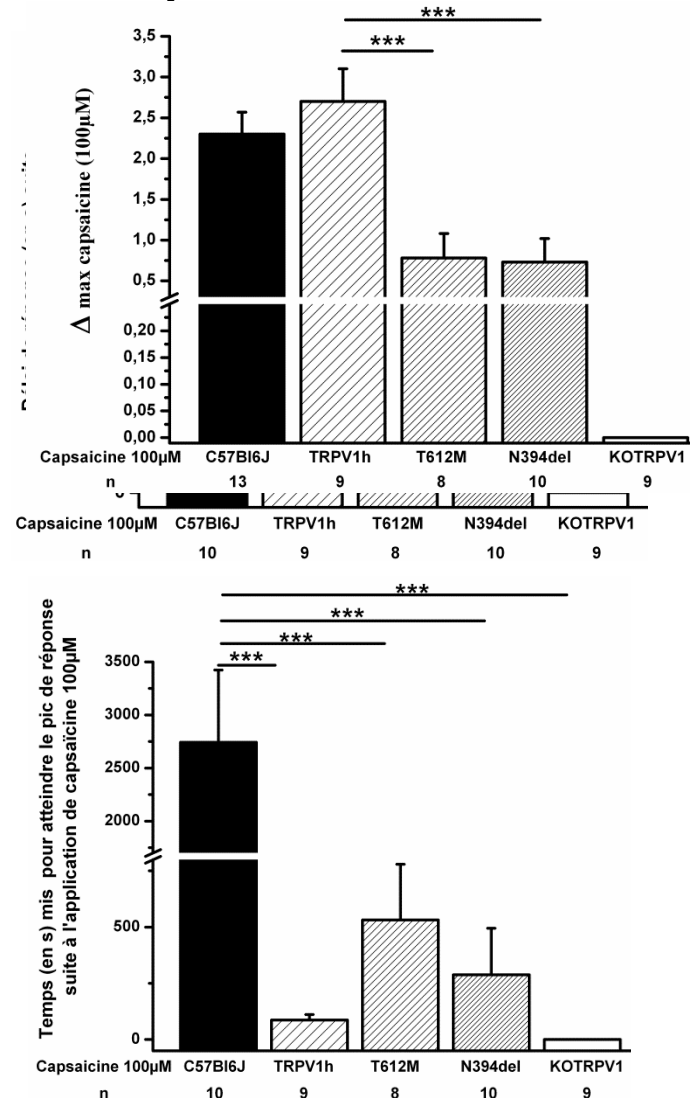


➡ Localisation similaire à celle du TRPV1 endogène.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*.
Comparaison de la réponse à la capsaïcine.



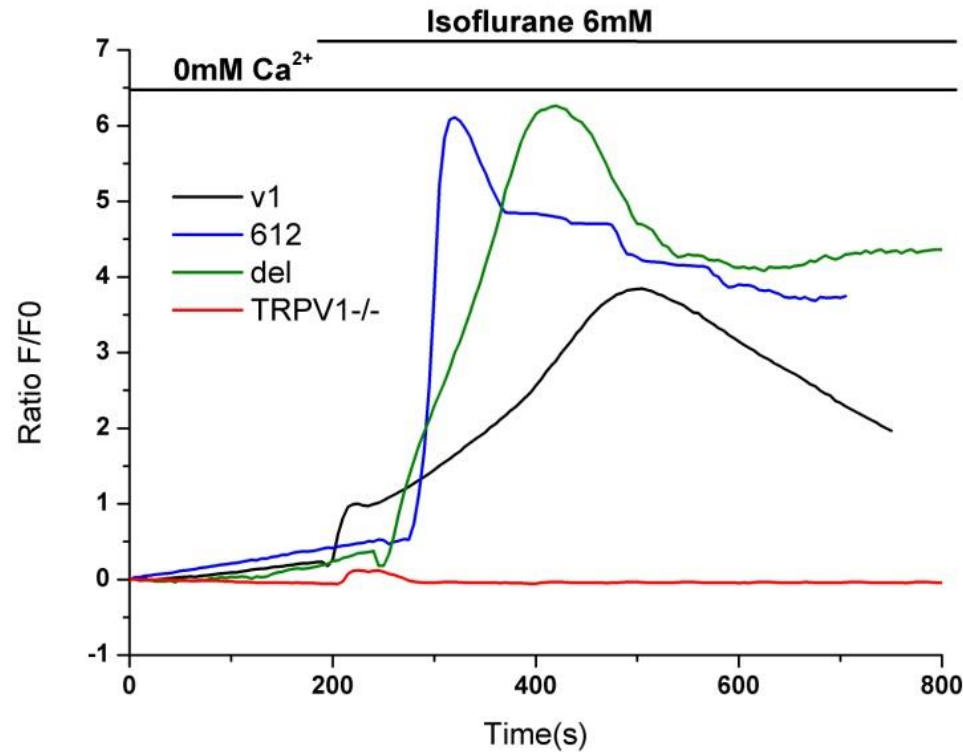
La réponse à la capsaïcine est diminuée sur les cellules TRPV1^{-/-} transfectées avec les variants TRPV1.

Le délai et le temps de réponse à la capsaïcine est diminué sur les cellules TRPV1^{-/-} transfectées avec hTRPV1 et ses variants. hTRPV1 est plus sensible à la capsaïcine que le TRPV1 endogène de souris.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*.
Comparaison de la réponse à l'isoflurane.

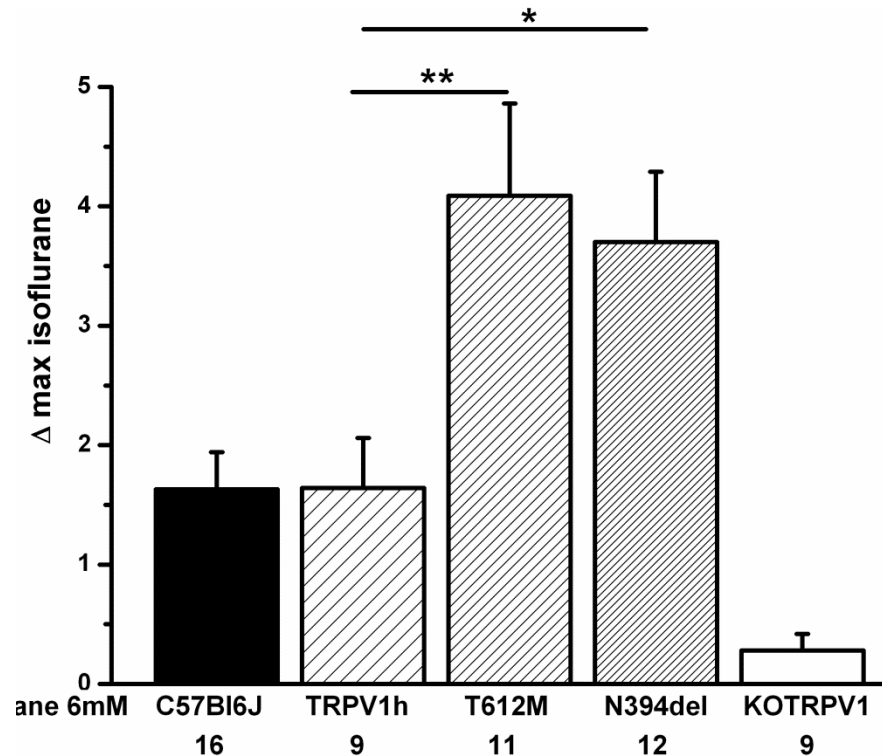


La réponse à l'isoflurane est augmentée sur les cellules transfectées avec les variants TRPV1

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*.
Comparaison de la réponse à l'isoflurane.

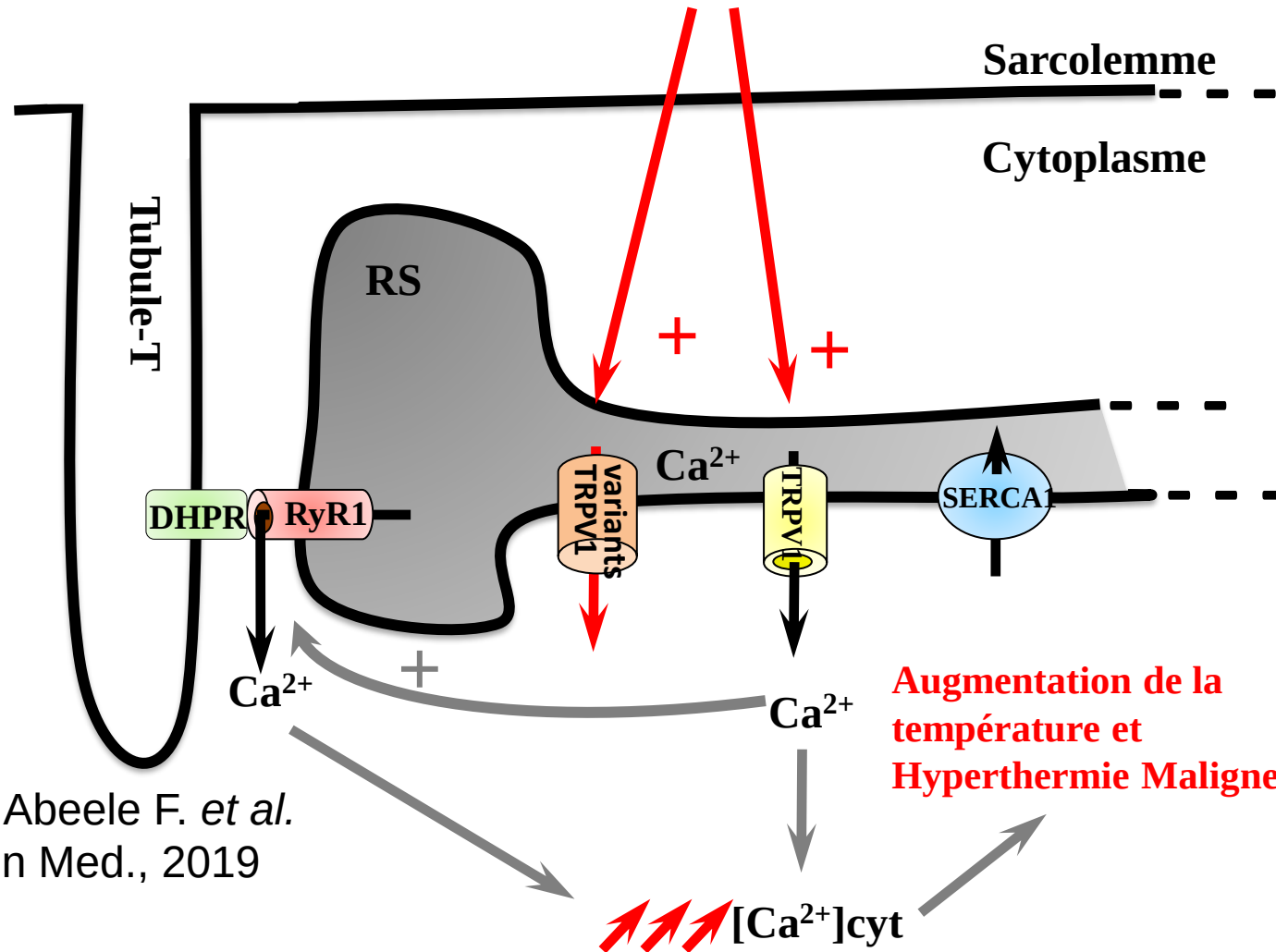


La réponse à l'isoflurane est augmentée sur les cellules transfectées avec les variants TRPV1

Etude 2

Conclusion

Anesthésiques volatils



Vanden Abeele F. *et al.*
Genet. In Med., 2019

Variants TRPV1 humains: plus sensibles à l'isoflurane; potentiels déclencheurs de la crise d'HM à l'origine d'une libération de calcium exacerbée dans le cytoplasme. Le calcium une fois libéré par les variants TRPV1 T612M et N394del pourrait dans un second temps favoriser la forte libération de calcium des RyR1 mutés chez des patients susceptibles à l'HM.

Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.

Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne

Etude 3: TRPV1 et autres....

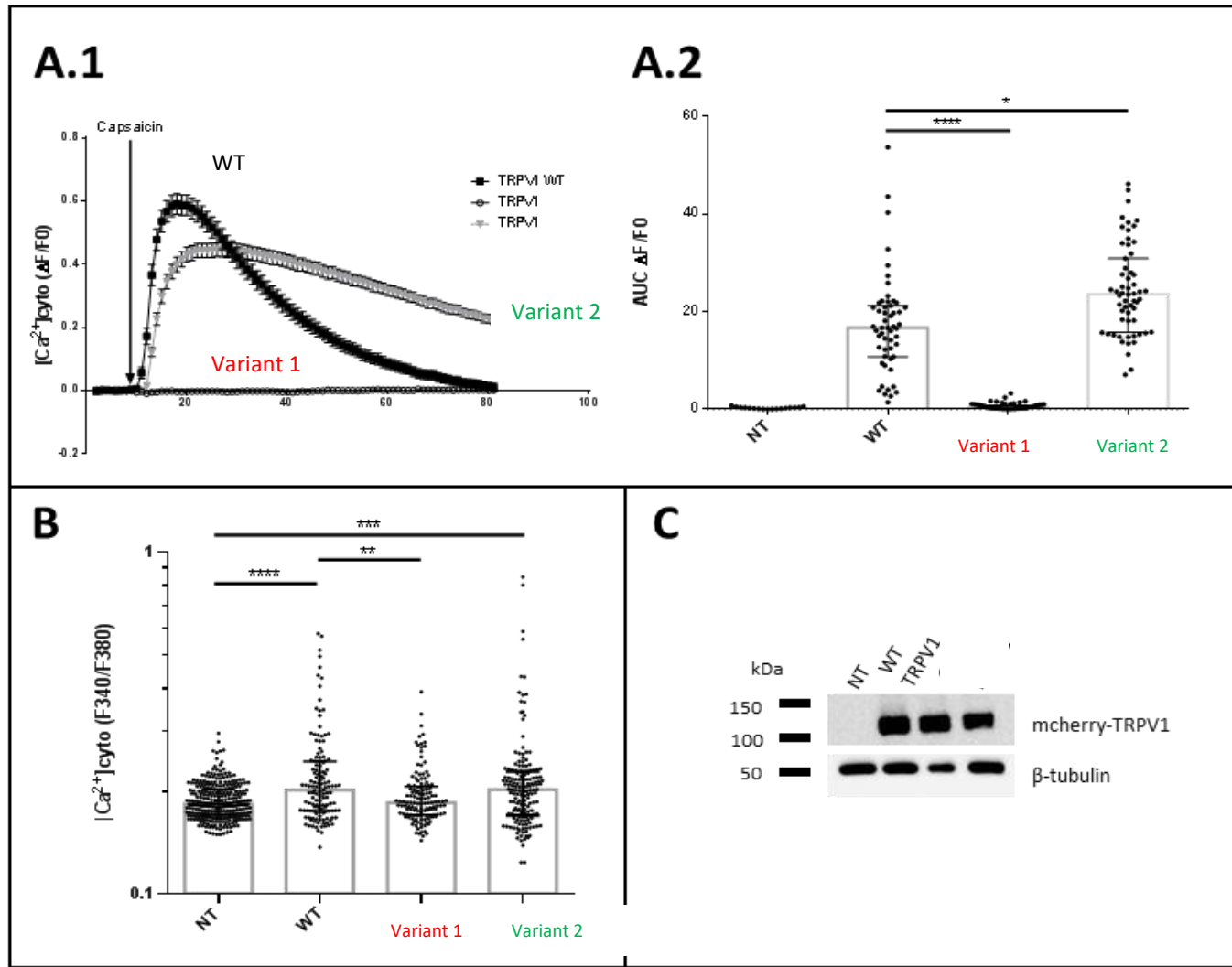
- Hyperthermie d'effort = Hyperthermie maligne due à un exercice physique intense et prolongé.
- Diagnostiquée initialement chez des militaires. Nombre croissant dû à des pratiques sportives intenses: randonnées; trails; ultra-trails,



- Hyperthermie d'effort = Hyperthermie maligne due à un exercice physique intense et prolongé.
- Diagnostiquée initialement chez des militaires. Nombre croissant dû à des pratiques sportives intenses: randonnées; trails; ultra-trails,
- Liens hyperthermie maligne des anesthésies et hyperthermie d'effort?
 - HM des anesthésies: 60% des cas dus à RYR1
 - HM d'effort: 10% des cas dus à RYR1
 - TRPV1?

- Hyperthermie d'effort = Hyperthermie maligne due à un exercice physique intense et prolongé.
- Diagnostiquée initialement chez des militaires. Nombre croissant dû à des Pratiques sportives intenses: randonnées; trails; ultra-trails,
- Liens hyperthermie maligne des anesthésies et hyperthermie d'effort?
 - HM des anesthésies: 60% des cas dus à RYR1
 - HM d'effort: 10% des cas dus à RYR1
 - TRPV1?
- Cohorte de 49 militaires ayant déclenché une HM d'effort.
 - 2 variants TRPV1 identifiés.



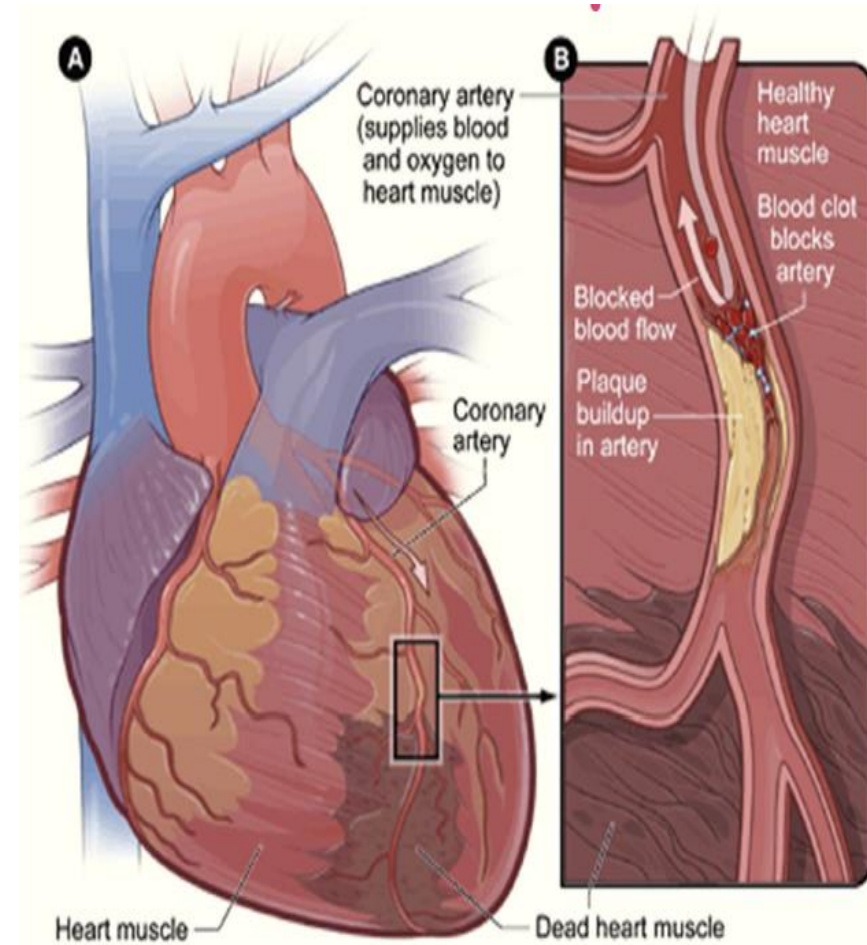


Merci pour votre attention

Etude 4

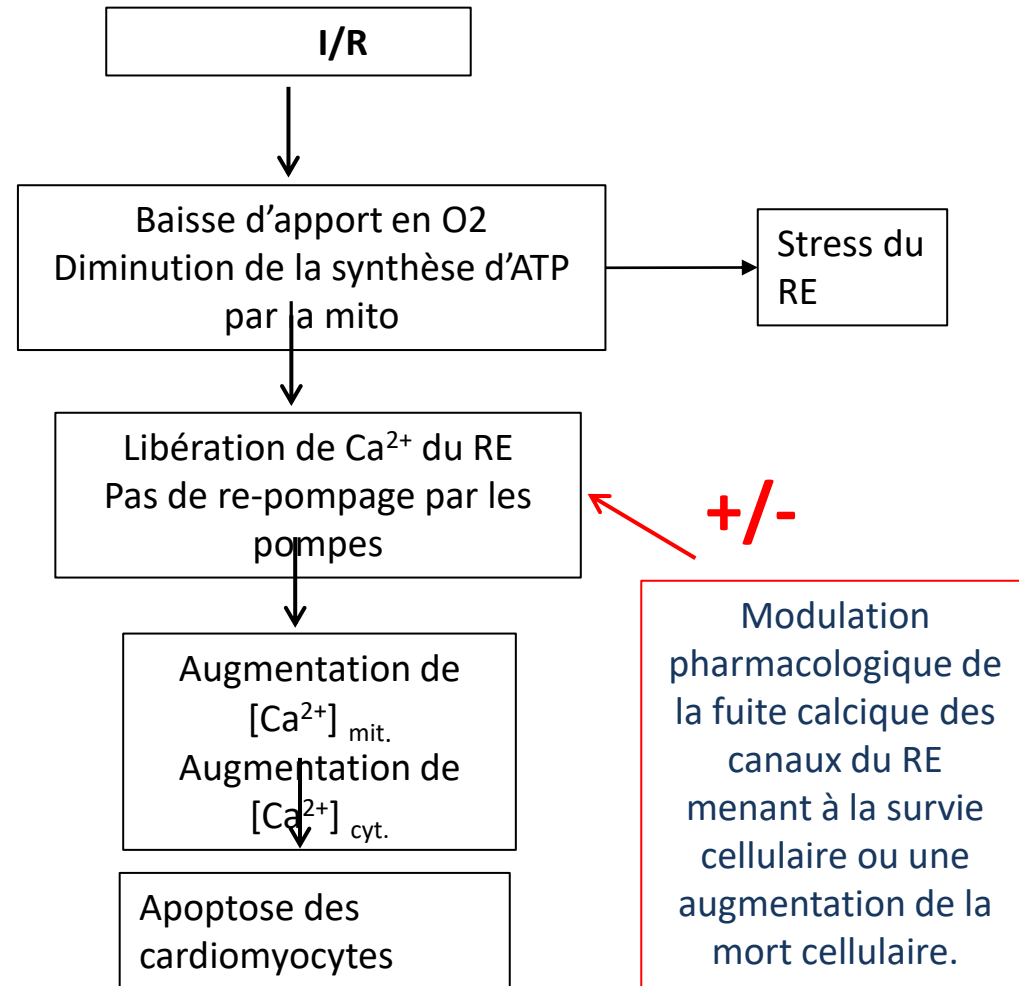
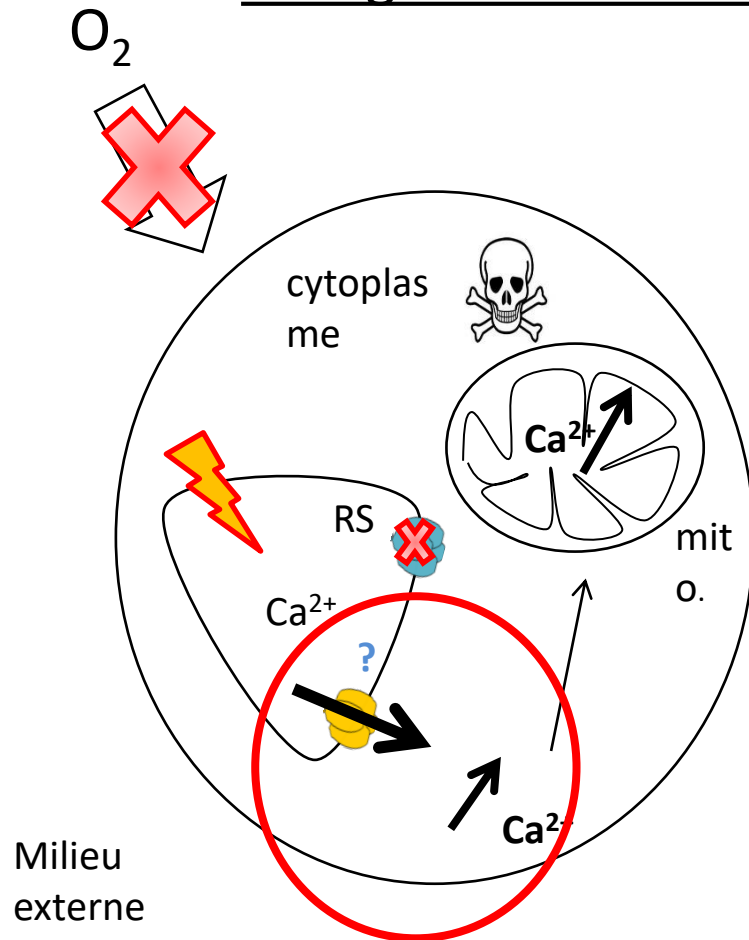
Infarctus du myocarde

- Cause majeure de mortalité
- En aval de l'obstruction → cellules en ischémie
- Zone infarctée risquant de nécroser
- Si reperfusion → ré-oxygénation des cellules + apports en nutriments



Etude 4

Dérégulation de l'homéostasie calcique au cours de l'ischémie/r

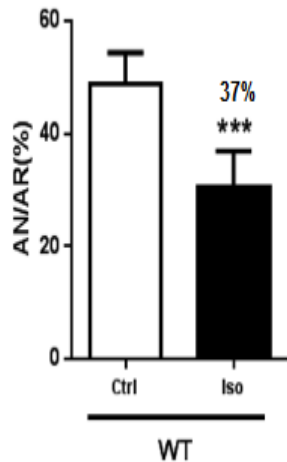
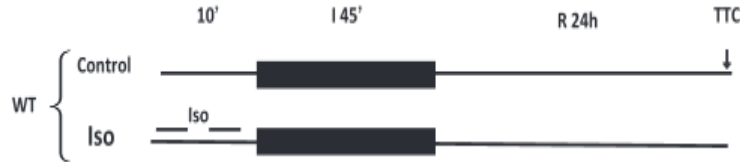


- But :
- Identifier la voie par laquelle le Ca est libéré du RE
 - Modulation pharmacologique des canaux de fuite : *in vivo* et *in vitro*

Etude 4

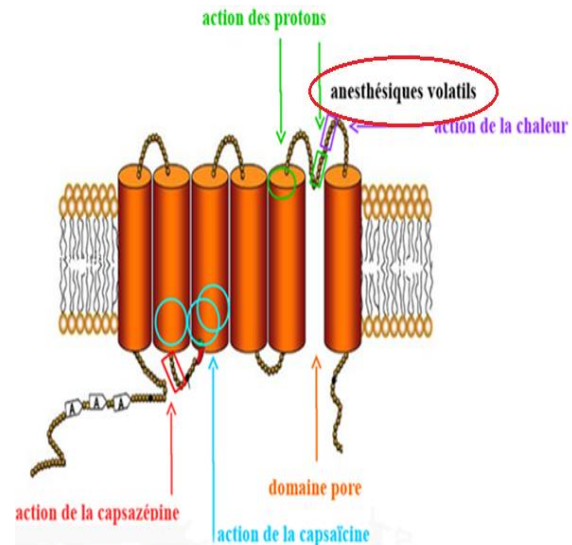
Lien entre TRPV1 et les anesthésiques volatils: cas de l'isoflurane

Teixeira et al., 2015
Anesthesiology



Kimball et al., 2015
Molecular Pharmacology

La boucle du domaine pore de TRPV1 serait nécessaire à son activation par l'isoflurane



➡ Effet cardioprotecteur de l'isoflurane par la modulation de TRPV1

Hypothèse de travail : TRPV1 serait l'un des canaux de fuite calcique du réticulum sarcoplasmique (RS) impliqué dans la cardioprotection

Etude 4

2 modèles de souris :

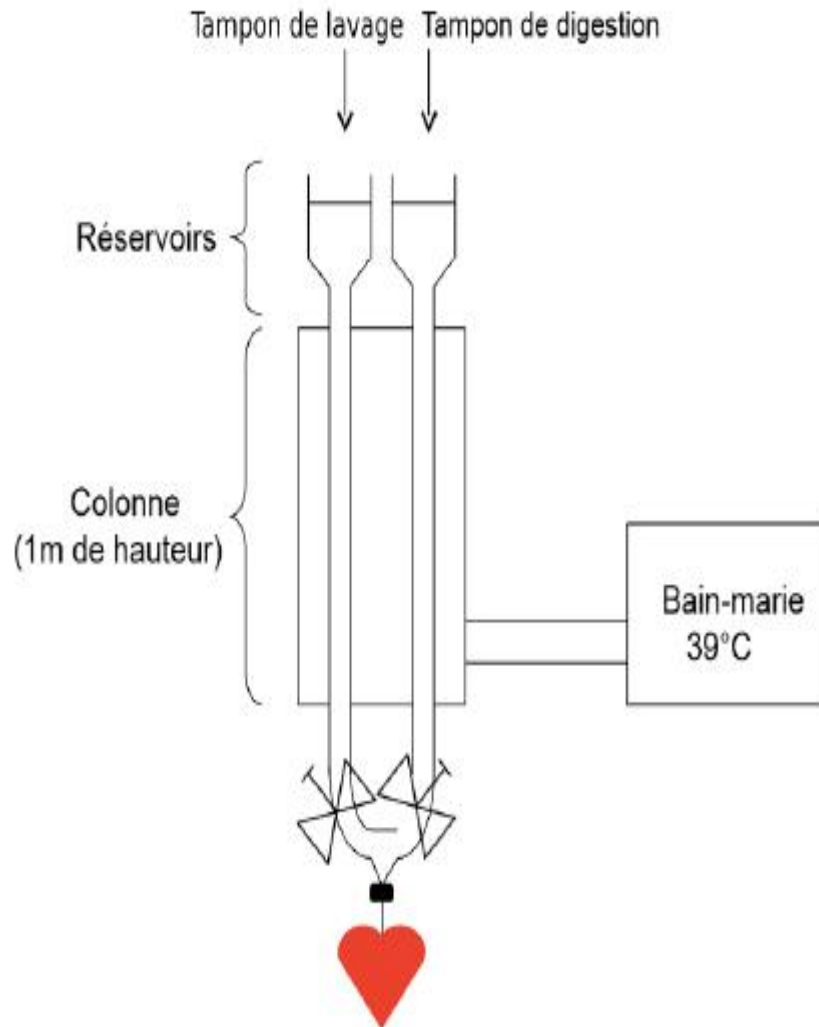
- Souris C57 black 6 (C57B6J) = souris Wild type
- Souris C57B6J avec un knock-out fonctionnel de TRPV1



Prélèvement du cœur et isolement des cardiomyocytes par la technique Langendroff (*Louch W et al, 2011*)



Etude 4



Isolement des cardiomyocytes :

- Utilisation d'enzymes de digestion
- Ensemencement des cellules
- Charge avec des sondes fluorescentes



Etude 4

Microscopie confocale:

Nikon Eclipse Ti, A1R

Imagerie calcique :

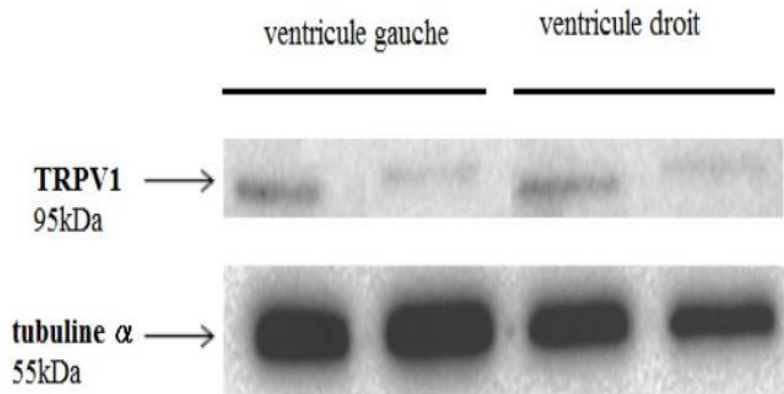
- Sonde calcique Fluo5N
- Mesure de flux calcique dans le réticulum sarcoplasmique
- En présence d'activateurs/inhibiteurs, avec ou sans prétraitement



Etude 4

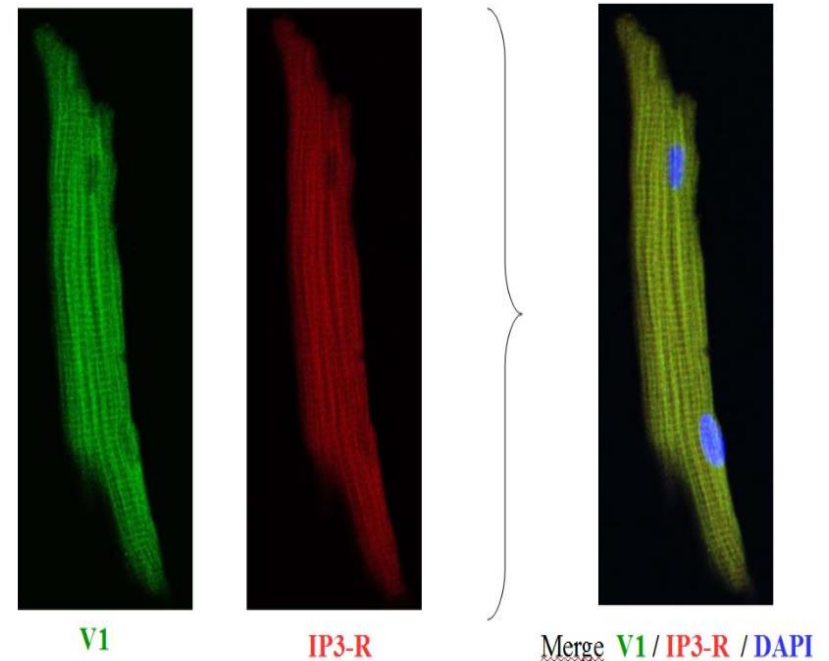
Expression et localisation de TRPV1 dans les cardiomyocytes de souris

Expression de TRPV1 et de la tubuline alpha dans les cardiomyocytes adultes



TRPV1 est exprimé dans les cardiomyocytes de souris adultes WT.

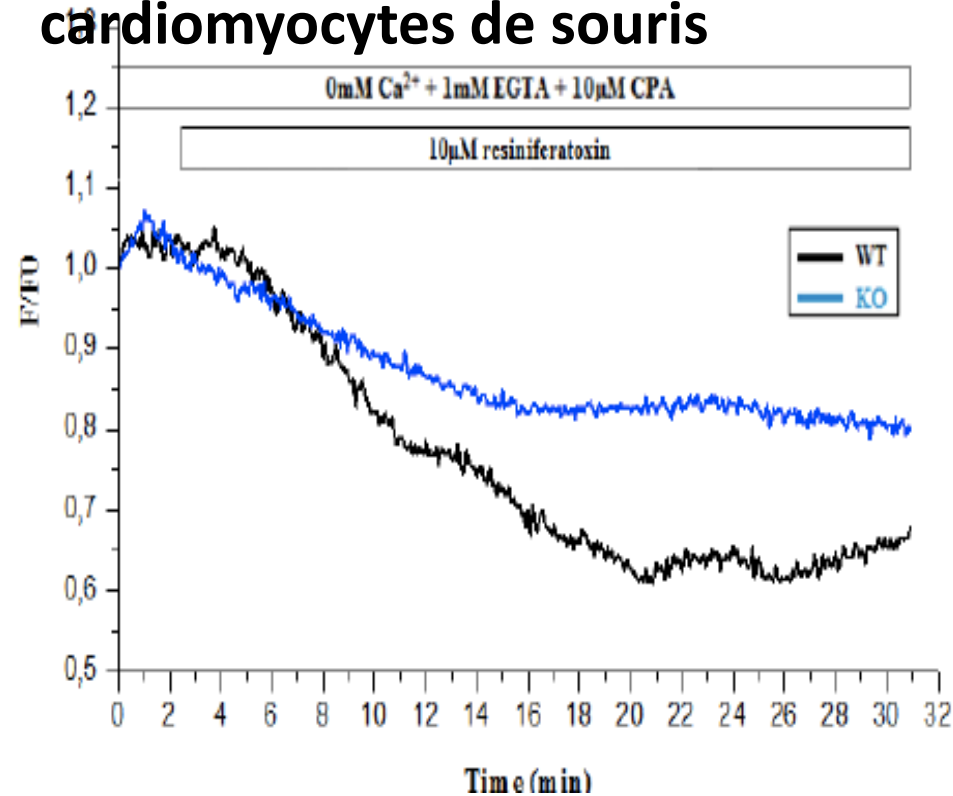
Localisation de **TRPV1** et d'**IP3-R** dans les cardiomyocytes adultes isolés de souris C57Bl6J



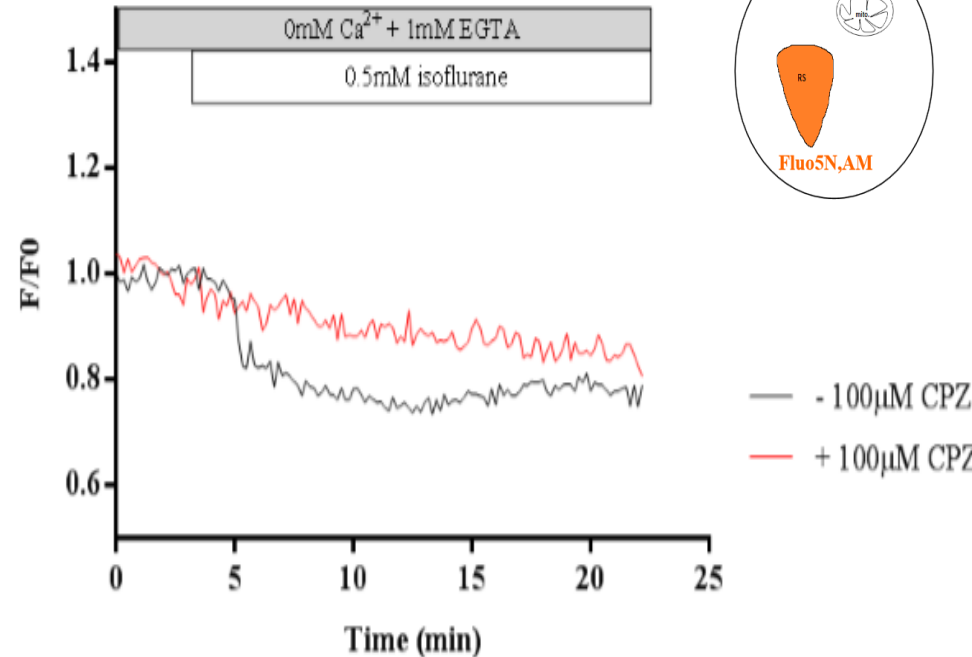
Localisation réticulaire de TRPV1 dans les cardiomyocytes de souris adultes WT.

Etude 4

Fonctionnalité de TRPV1, un canal de fuite calcique, dans les cardiomyocytes de souris



- L'activation de TRPV1 par la résinifératoxine provoque une vidange de calcium du RE.
- Absence d'effet sur les cellules issues de souris KO-TRPV1



- L'isoflurane provoque une vidange calcique du RE.
- Les effets de l'isoflurane sont réduits en présence de capsazépine, un inhibiteur de TRPV1



TRPV1 est bien un canal fonctionnel
Un des effets de l'isoflurane passe par
l'activation de TRPV1

Etude 4

Conclusion/ résultats préliminaires :

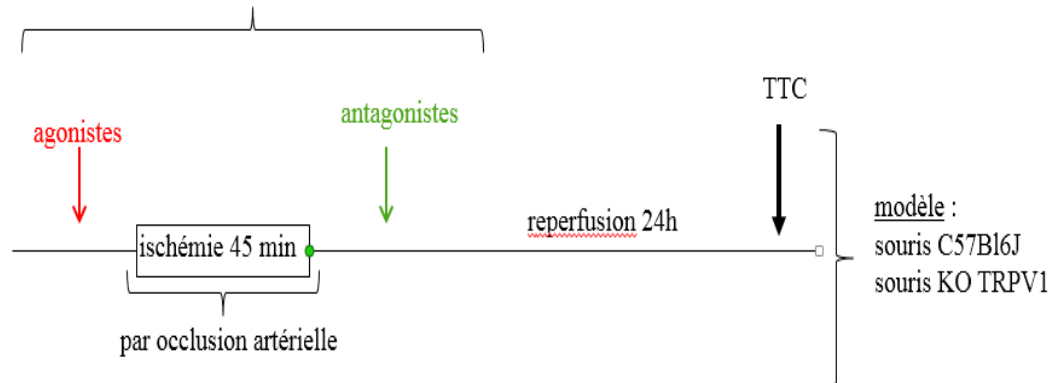
- TRPV1 est exprimé par les cardiomyocytes de souris
- TRPV1 est un canal de fuite calcique réticulaire fonctionnel.

Perspectives :

1- Poursuite des études *in vitro*:

- Affiner la localisation subcellulaire de TRPV1;
- Mesurer les flux calciques (réticulaires, cytosoliques et mitochondriaux) au cours de l'ischémie-reperfusion. Effets de la modulation de TRPV1.

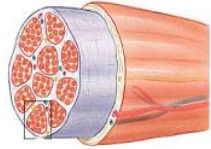
2- Modulation pharmacologique *in vivo* de TRPV1 au cours de l'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris (en collaboration interne avec L. Augeul et B. Pillot). Souris C57Bl6 et KO-TRPV1.



Etude 5

Etude fonctionnelle de TRPV1: TRPV1 et fonction motrice, TRPV1 et énergétique

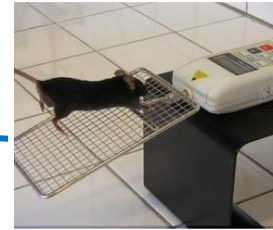
•TRPV



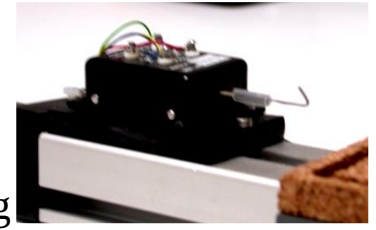
r



40°C



e fatig



•**Luo et al., 2012:** un traitement chronique à la capsaïcine améliore les capacités d'endurance chez des rats obèses. L'activation de TRPV1 par la capsaïcine pourrait être le point de départ permettant l'augmentation du métabolisme énergétique.

1

Caractérisation de la fonction motrice des souris TRPV1^{-/-} :

Etude quantitative des différents acteurs du couplage excitation-contraction par Western-Blot

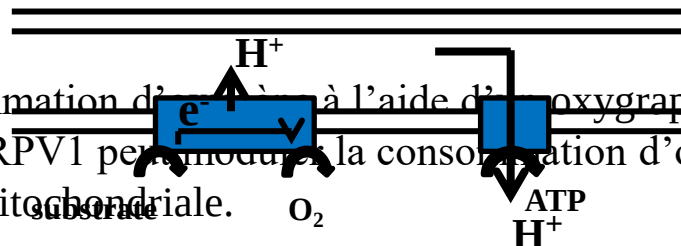
Mesures de calcium intracellulaire par microscopie confocale

Analyse de la fonction motrice et mise en évidence des atteintes potentielles de cette fonction chez des souris mâles TRPV1^{-/-} ayant subi ou non un entraînement sur tapis roulant par des tests comportementaux couplés à des test d'activité contractile.

2

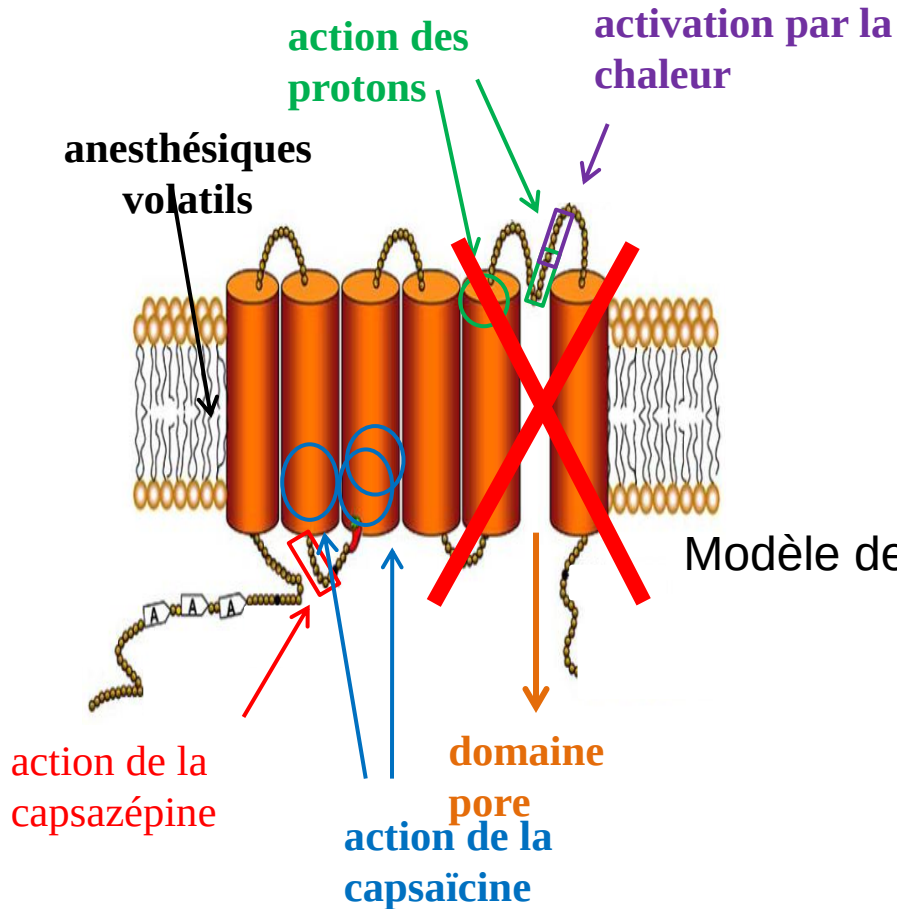
Etude énergétique:

Mesure de la consommation d'O₂ à l'aide d'un oxygraphe afin de voir si le calcium libéré par TRPV1 permet de moduler la consommation d'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.



Merci pour votre attention

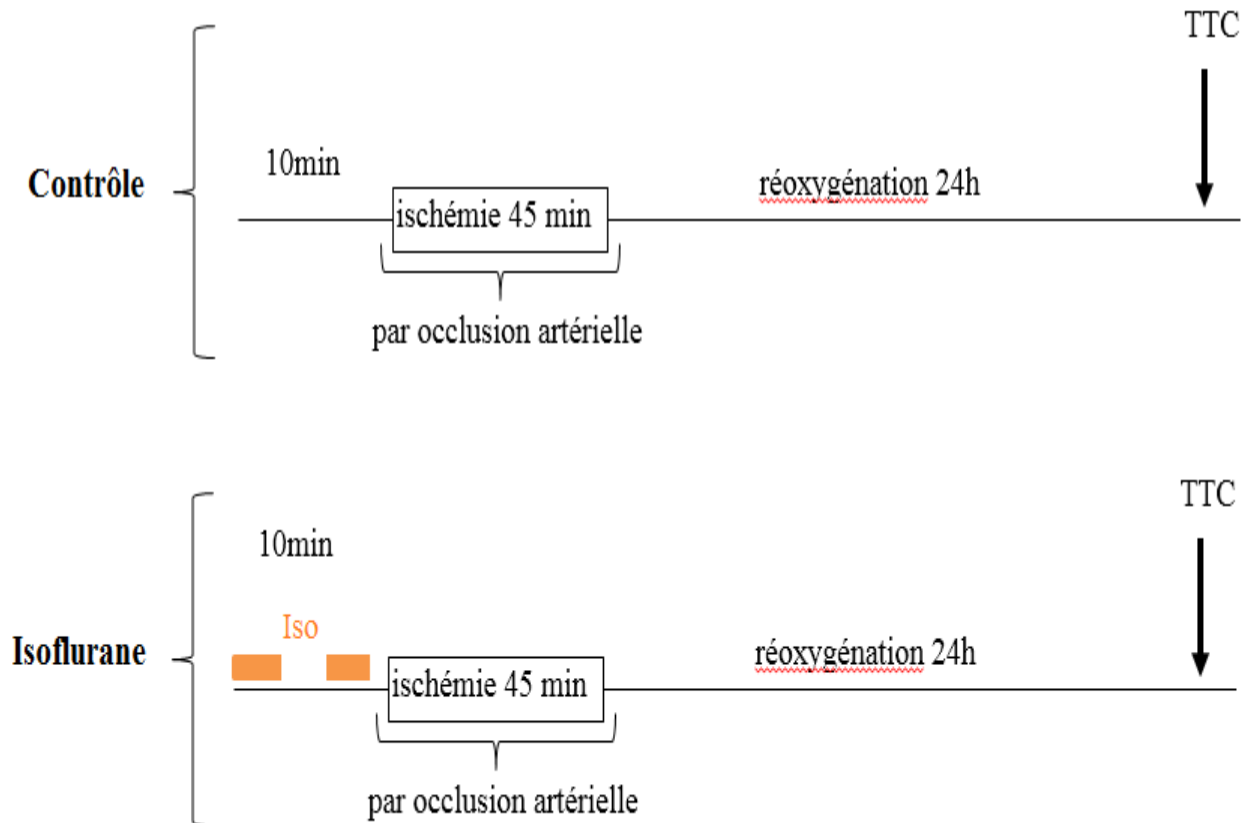
TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloïd 1)

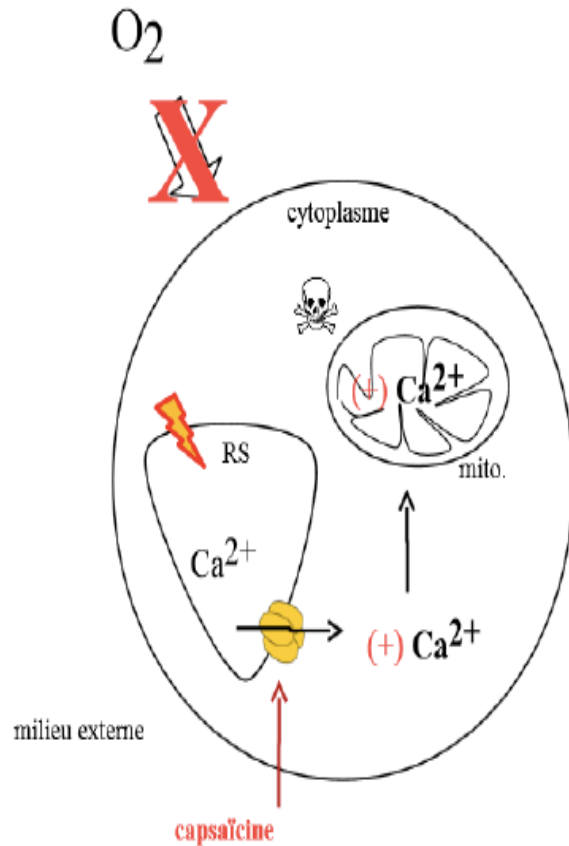
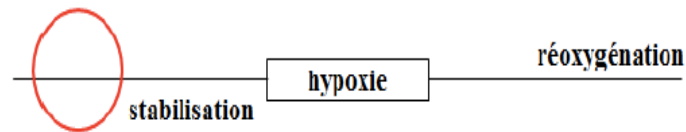


Délétion de la partie pore
du canal
Protéine tronquée non
fonctionnelle

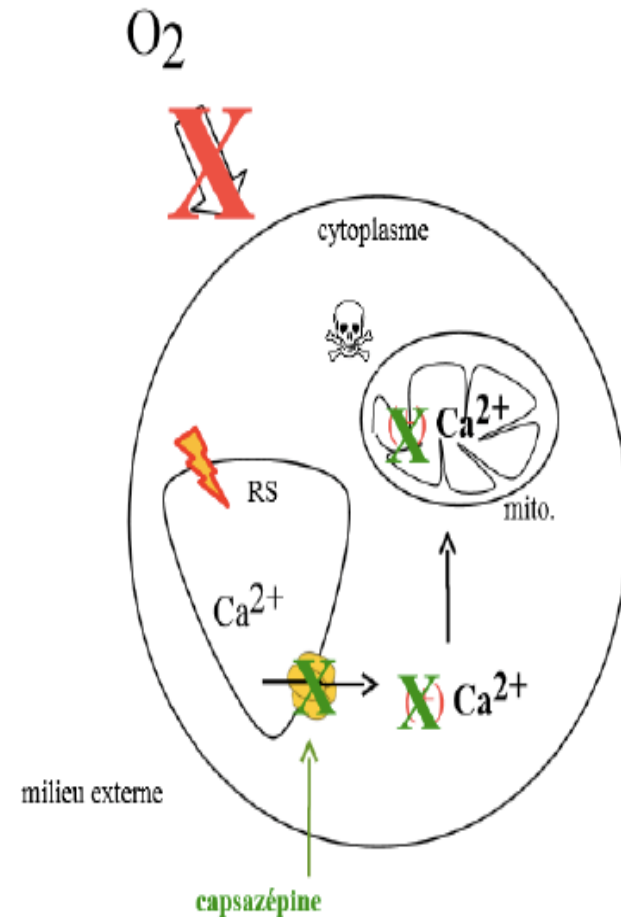
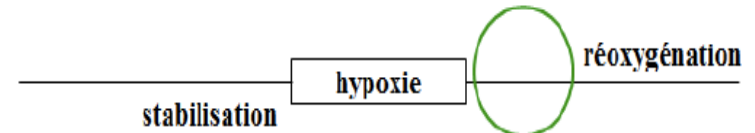
Résultats

Cas de l'isoflurane: *in vivo*



Pré-conditionnementcapsaïcine
résiniferatoxinePost-conditionnement

capsazépine



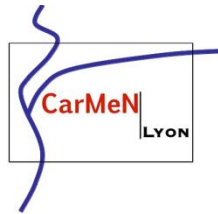
Remerciements

INSERM U 1060

Université Lyon I

Fabien VAN COPPENOLLE

Sylvie DUCREUX



*UMR CNRS 5023 Laboratoire
d'Ecologie des Hydrosystèmes
Naturels et Anthropisés*



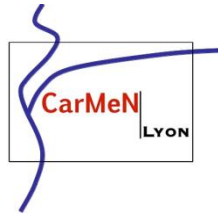
Caroline ROMESTAING

INSERM U 1060

Université Lyon I

Etienne LEFAI

Vanessa EUTHINE



*Institut des Neurosciences INSERM
U836 Grenoble*

Joël LUNARDI

Julien FAURE

Physiologie Cellulaire

INSERM U800

Université Lille I



Natalia PREVARSKAYA

Fabien VANDEN ABEELE

Dimitra GKIKI

*Plateforme Cardiex
Nantes*



Corinne HUCHET-CADIOU

Aude LAFOUX

