



## RÉFÉRENCES

1. El Far O, Seagar M. SNARE, V-ATPase and neurotransmission. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 28-31.
2. Galli T, Kuster A, Taresté D. Nobel Prize in Physiology and Medicine 2013 – an award for the discovery of the actors and fundamental molecular mechanisms of intracellular vesicle trafficking. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 1055-8.
3. Israel M, Morel N, Lesbats B, Birman S, Manaranche R. Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 9226-30.
4. Peters C, Bayer MJ, Buhler S, et al. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 2001 ; 409 : 581-8.
5. Strasser B, Iwaszkiewicz J, Michielin O, Mayer A. The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *EMBO J* 2011 ; 30 : 4126-41.
6. Hiesinger PR, Fayyazuddin A, Mehta SQ, et al. The v-ATPase V(0) subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* 2005 ; 121 : 607-20.
7. Liegeois S, Benedetto A, Garnier JM, et al. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2006 ; 173 : 949-61.
8. Tour O, Meijer RM, Zacharias DA, Adams SR, Tsien RY. Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 1505-8.
9. Poëa-Guyon S, Ammar MR, Erard M, et al. The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery. *J Cell Biol* 2013 ; 203 : 283-98.
10. Ammar MR, Kassas N, Chasserot-Golaz S, et al. Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013 ; 4 : 125.

## NOUVELLE

### Instabilité des jonctions endothéliales : biomarqueurs du remodelage vasculaire

Laurence Bouillet<sup>1,2,3,4</sup>, Adama Sidibé<sup>6</sup>, Helena Polena<sup>1,2,3</sup>, Tiphaine Mannic<sup>1</sup>, Alban Deroux<sup>4</sup>, Barry Stidder<sup>1,2,3</sup>, Olivier Vittecoq<sup>5</sup>, Isabelle Vilgrain<sup>1,2,3</sup>

Le système vasculaire chez les adultes est majoritairement quiescent mis à part dans le système reproducteur femelle et au cours des processus de cicatrisation et d'angiogenèse tumorale, où apparaissent des remodelages vasculaires. L'intérieur des vaisseaux sanguins est tapissé d'une monocouche de cellules endothéliales – ou endothélium vasculaire – dont l'intégrité est assurée par une forte cohésion entre les cellules *via* des structures adhésives situées au niveau des contacts intercellulaires : les jonctions endothéliales. L'organisation de ces dernières est essentielle à l'homéostasie vasculaire. La protéine majeure des jonctions interendothéliales est la VE-cadhérine (VE pour *vascular endothelial*), protéine transmembranaire qui comporte un large domaine extracellulaire, dont les propriétés adhésives permettent des interactions homophiliques entre molécules de VE-cadhérine, et un domaine intracellulaire qui se lie aux composants du cytosquelette et solidifie la cohésion du tapis cellulaire. Le rôle de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse a été démontré dans les années 1995-99, et les recherches sur ses modifications post-traductionnelles en physiopathologie

vasculaire se poursuivent actuellement [1].

#### Phosphorylation/déphosphorylation

Les processus de phosphorylation/déphosphorylation des protéines sont des réactions enzymatiques majeures impliquées dans la prolifération, la migration, et la différenciation cellulaires. Ainsi, dans les cellules endothéliales, la modification covalente des protéines des jonctions adhésives participe à la déstabilisation de l'endothélium vasculaire au cours de processus inflammatoires et/ou angiogéniques. En situation physiologique, ces processus sont régulés par un équilibre entre protéine kinases et phosphatases. Nous avons montré qu'un domaine spécifique de la VE-cadhérine (LY<sup>685</sup>AQV) est un substrat privilégié pour la tyrosine kinase Src ; l'environnement de séquence de ce domaine correspond à un site consensus pour les kinases de cette famille (YxxV/I/L). De façon intéressante, ce motif est unique à la VE-cadhérine humaine. En réponse au VEGF (*vascular endothelial growth factor*), puissant agent angiogénique et inducteur de perméabilité, c'est ce site qui est phosphorylé *in vitro* [2].

*In vivo*, ce processus existe également dans des organes soumis à une angiogenèse physiologique tels que l'utérus et l'ovaire, dont l'évolution cyclique est soumise à une régulation hormonale et dépendante de la production locale de VEGF [3]. Le rôle de ce domaine spécifique est étudié actuellement par analyse d'une souris *knock-in* pour la VE-cadhérine Y685F [4]. Depuis quelques années, nous avons observé que, au plan cinétique, cette modification covalente de la VE-cadhérine par phosphorylation précède le clivage de son domaine extracellulaire, appelé VE-cadhérine soluble (sVE). Actuellement en cours d'étude, le lien mécanistique entre les deux processus pourrait être un changement de conformation de la protéine VE-cadhérine après l'incorporation des charges phosphate qui rend la protéine plus susceptible à la protéolyse. Ces données ont abouti au développement, par le laboratoire, d'un dosage par ELISA de sVE présent dans le sang des patients ; la méthode et son application ont été brevetées par l'Inserm et l'université de Grenoble [5].

<sup>1</sup> Inserm, Unité 1036, biologie du cancer et de l'infection, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France ;

<sup>2</sup> UJF-Grenoble 1, biologie du cancer et de l'infection, Grenoble, F-38041, France ;

<sup>3</sup> CEA, DSV/iRTSV, biologie du cancer et de l'infection, Grenoble, F-38054, France ;

<sup>4</sup> centre hospitalier universitaire de Grenoble, département de médecine interne, centre national de référence des angioœdèmes (CREAK), Grenoble, F-38043, France ;

<sup>5</sup> centre hospitalier universitaire de Rouen, département de rhumatologie, Inserm U905 et CIC1404, Institut de recherche et d'innovation en biomédecine, université de Rouen, F-76031 Rouen Cedex, France ;

<sup>6</sup> adresse actuelle : université de Genève, CH-1211, Genève, Suisse.

[ivilgrain@cea.fr](mailto:ivilgrain@cea.fr)

## VE-cadhérine soluble: un biomarqueur potentiel en médecine ?

### Exemple 1 : l'angioedème héréditaire

L'angioedème héréditaire (AOH) est une maladie génétique caractérisée par la survenue d'œdèmes sous-cutanés et/ou sous-muqueux transitoires et récidivants. La prévalence est de l'ordre de 1/50 000 à 1/100 000 individus. La maladie débute le plus souvent vers l'âge de 12-14 ans et se manifeste par des œdèmes circonscrits, blancs, non prurigineux, persistant 48 à 72 heures et récidivant à une fréquence variable. Les œdèmes peuvent toucher toutes les parties du corps dont les secteurs ORL et digestif. L'angioedème abdominal se manifeste par un syndrome pseudo-occlusif pouvant aller jusqu'au choc hypovolémique. L'œdème des voies aériennes supérieures met en jeu le pronostic vital avec un risque de décès de 25 % en l'absence de traitement approprié. Les œdèmes sont déclenchés par une augmentation très localisée de la perméabilité vasculaire secondaire à un excès de bradykinine (BK) et de kallikréine (KK). La crise d'angioedème ressemble cliniquement aux crises d'angioedème histaminique (allergique), beaucoup plus fréquent. Ce dernier répond à l'adrénaline et aux anti-histaminiques, ce qui n'est pas le cas des angioedèmes héréditaires, qui ne répondent qu'à des médicaments ciblés très coûteux, comme un antagoniste des récepteurs B2 de la bradykinine (Icatibant) et un inhibiteur de la kallikréine (Ecallantide) [6]. Il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur biologique spécifique de la crise d'angioedème héréditaire, ce qui rend le diagnostic, et donc la prise en charge, difficiles.

Nous avons abordé l'étude des mécanismes moléculaires de l'hyperperméabilité vasculaire responsable de l'angioedème jusqu'alors mal connus. Nous avons analysé les effets de la bradykinine et de la kallikréine sur une monocouche de cellules endothéliales mimant la face interne du vaisseau sanguin. Nous avons montré que ces deux effecteurs induisent une augmentation de la perméabilité endothéliale

associée à une dissociation des jonctions endothéliales faisant suite à la phosphorylation de la VE-cadhérine, et l'apparition de sVE [6]. Au cours d'une crise d'angioedème, le taux de ces deux médiateurs dans la circulation sanguine est augmenté. Au vu des résultats obtenus au plan cellulaire, nous avons recherché la présence de sVE dans le sang de patients en crise. Un fragment sVE de même taille que celui détecté dans les cellules endothéliales traitées *in vitro* par la bradykinine, est présent chez un patient en crise. De façon remarquable, pour un même patient, le taux de sVE peut être évolutif en fonction des crises [7]. Ces toutes nouvelles données suggèrent que le dosage de la sVE pourrait être utilisé comme marqueur de la crise d'angioedème, en particulier dans le cas d'une localisation abdominale, ce qui améliorerait la prise en charge des patients.

### Exemple 2 : la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme inflammatoire le plus fréquent, et il affecte 0,3 % de la population française [8]. Cette maladie est caractérisée par une inflammation persistante de la membrane synoviale qui peut progresser, à terme, vers la destruction articulaire. Lors du processus inflammatoire, la membrane synoviale s'épaissit pour former un pannus synovial qui envahit le cartilage et l'os sous-chondral. L'hyperplasie du tissu synovial est associée à une angiogenèse. La morbidité vasculaire chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde est augmentée du fait d'une athérosclérose prématurée, pouvant entraîner des accidents vasculaires cérébraux, des ischémies cérébrales transitoires et des événements coronariens [9]. La découverte de marqueurs prédictifs de l'atteinte vasculaire chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde pourrait être une aide clinique importante pour guider la prise en charge des patients.

Nous avons étudié les modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine induites par le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*), médiateur inflammatoire majeur

dans la polyarthrite rhumatoïde. Nous avons démontré que le TNF $\alpha$  induit le clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine (sVE) dans des cellules endothéliales, un processus bloqué par des inhibiteurs de tyrosine kinases dont Src, suggérant un lien entre phosphorylation et clivage. De façon très intéressante, le taux de sVE analysé avant traitement dans une cohorte de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (n = 63), est corrélé au score d'activité de la maladie, semblant indiquer que sVE pourrait être proposé comme un nouveau marqueur dans cette affection [9].

### Exemple 3 : les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont secondaires à un dysfonctionnement immunitaire qui induit une réaction d'auto-agression dirigée contre un ou plusieurs organes. Elles représentent la troisième cause de morbidité après les affections cardiovasculaires et les cancers. Le tableau clinique se présente souvent sous la forme d'une altération de l'endothélium vasculaire qui se traduit par une vascularite ou une athérosclérose accélérée. Indépendamment des processus de phosphorylation, il a été démontré que les jonctions endothéliales pouvaient également être déstabilisées par l'intervention d'anticorps ciblant le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine. En effet, l'injection *in vivo* chez la souris de certains anticorps dirigés contre la VE-cadhérine est capable de cibler la vasculature tumorale sans affecter le reste du réseau vasculaire normal. En revanche, selon l'épitope ciblé par l'anticorps, des hémorragies ont été observées, suggérant donc que des anticorps anti-VE-cadhérine peuvent affecter le réseau vasculaire [10]. Au vu de ces données, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'autoanticorps anti-VE-cadhérine (AAVE) dans les pathologies auto-immunes ; ils pourraient présenter un intérêt certain pour les cliniciens, en particulier dans les cas de vascularites auto-immunes primitives ou secondaires à une connectivite. Un test ELISA a été mis au point au



laboratoire utilisant différents recombinants de VE-cadhérine pour détecter ces AAVE dans le sérum de patients. Ce test, réalisé sur 275 patients, s'est avéré positif chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé, de polyarthrite rhumatoïde, mais aussi de la maladie de Behçet (vascularite systémique) et de la choriorétinopathie de Birdshot (vascularite oculaire). Le pouvoir dissociant de ces autoanticorps anti-VE-cadhérine a pu être démontré chez un patient atteint de la maladie de Behçet [11]. Devant le besoin grandissant de biomarqueurs du stress vasculaire dans les maladies auto-immunes, la détection d'autoanticorps anti-VE-cadhérine devrait s'avérer utile pour la prise en charge des patients (Figure 1).

### Perspectives : cancer, suivi de biothérapies, marqueurs de vascularites

Nos premiers résultats montrent que le dosage de sVE dans diverses pathologies humaines où des cytokines (bradykinine, TNF $\alpha$ , VEGF) altèrent les cellules endothéliales a toute son utilité. Plusieurs études cliniques sont en cours. Dans le cadre de l'angiœdème héréditaire, une

étude promue par le centre hospitalier universitaire de Grenoble recrute des patients depuis début 2013. Dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde, les molécules anti-TNF $\alpha$  sont utilisables en seconde voire première intention, et leur efficacité clinique nécessite d'être évaluée par certains biomarqueurs. Comme nous avons montré que le TNF $\alpha$  induit le clivage de la VE-cadhérine, il est raisonnable de penser que ces biothérapies pourraient affecter le taux de sVE chez les patients traités. Des analyses en cours sur des cohortes devraient nous permettre d'établir la valeur prédictive de ce dosage pour la réponse à la thérapie, ou l'échappement à ce traitement, ce qui serait un atout majeur pour le clinicien dans le cadre du suivi des patients.

Par ailleurs, la mise en évidence de l'existence d'AAVE dans le cadre de maladies auto-immunes laisse augurer d'un large essor de ce type de biomarqueur. En effet, la cartographie des épitopes de ces anticorps détectés chez les patients permettra d'appréhender leur agressivité potentielle vis-à-vis de l'endothélium vasculaire – une information d'importance majeure pour le clinicien

– celle-ci étant corrélée à leur pouvoir dissociant des cellules endothéliales.  $\diamond$

### Endothelial junctions: exploiting their instability in the development of biomarkers for vascular remodelling

#### LIENS D'INTÉRÊT

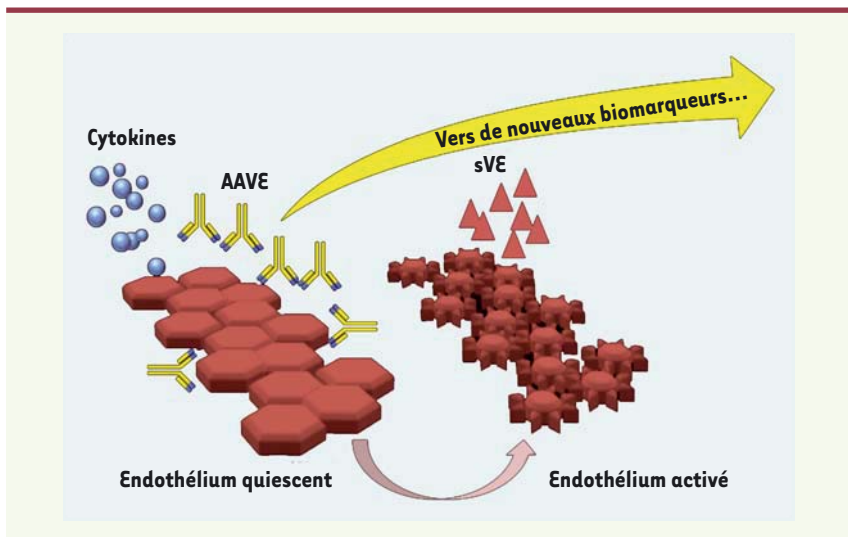
Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier la Fondation Arthritis pour le financement des thèses du Dr Tiphaine Mannic et du Dr Adama Sidibé, la Société française de médecine interne pour le soutien au stage post-doctoral du Pr Laurence Bouillet, la fondation ARC pour le financement du séjour post-doctoral du Dr Helena Polena, la Ligue contre le cancer, comité Isère, l'Inserm et l'Université Grenoble Alpes.

#### RÉFÉRENCES

- Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, et al. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* 1999 ; 126 : 2093-102.
- Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, et al. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 2007 ; 26 : 1067-77.
- Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, et al. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 2005 ; 96 : 384-91.
- Sidibé A, Polena H, Razanajatovo J, et al. VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs. *AJP-Heart Circ Physiol* 2014 (sous presse).
- Vilgrain I, Pelletier L, Cand F. Patent application N° WO2008062314, 2008.
- Cicardi M, Levy RJ, McNeil DL, et al. Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 2010 ; 363 : 523-31.
- Bouillet L, Mannic T, Arboleas M, et al. Hereditary angioedema: key role for kallikrein and bradykinin in vascular endothelial-cadherin cleavage and edema formation. *J Allergy Clin Immunol* 2011 ; 128 : 232-4.
- Guillemet F, Saraux A, Guggenbuhl P, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis* 2005 ; 64 : 1427-30.
- Sidibé A, Mannic T, Arboleas M, et al. Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum* 2012 ; 64 : 77-87.
- Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, et al. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* 2002 ; 100 : 905-11.
- Bouillet L, Baudet AE, Deroux A, et al. Auto-antibodies to vascular endothelial cadherin in humans: association with autoimmune diseases. *Lab Invest* 2013 ; 93 : 1194-202.



**Figure 1.** Schéma illustrant le remodelage de l'endothélium vasculaire sous l'action de cytokines inflammatoires ou d'auto-anticorps anti-VE-cadhérine (AAVE). L'endothélium vasculaire est une monocouche de cellules endothéliales jointives (endothélium quiescent). En présence de cytokines inflammatoires circulantes ou d'AAVE, la monocouche se rétracte, libère des fragments de sVE et perd ainsi son intégrité vasculaire (endothélium activé).