

Rôle des récepteurs NMDA endothéliaux dans un modèle murin de sclérose en plaques

Richard Macrez¹, Denis Vivien^{1,2}, Fabian Docagne¹

¹ Normandie Univ, Unicaen, Inserm, physiopathology and imaging of neurological disorders (PhIND), boulevard Becquere, 14000 Caen, France ;

² Service de biologie, délégation recherche clinique et innovation, centre hospitalier universitaire de Caen, 14000 Caen, France.

docagne@cyceron.fr

> La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central conduisant à la destruction de la myéline isolant les fibres nerveuses. Cette maladie est la première cause de handicap chez le jeune adulte et touche actuellement environ 90 000 personnes en France. Grâce aux modèles animaux de SEP, la compréhension de la physiopathologie de cette maladie, bien que toujours incomplète, a largement progressé au cours des dernières décennies. Aujourd'hui, on considère qu'une altération locale des barrières hématoencéphalique¹ (dans le cerveau) et hématomédullaire¹ (dans la moelle épinière) est associée à l'apparition de la maladie, conduisant à l'infiltration de cellules immunitaires vers les tissus nerveux, puis à la destruction de la myéline et des axones.

Diverses études ont mis en évidence les effets toxiques du glutamate dans les modèles animaux de SEP [1]. Ces résultats ont conduit à la mise en place d'essais cliniques, dont certains sont toujours en cours, visant à tester l'efficacité de modulateurs des récepteurs du glutamate, et plus particulièrement du récepteur du N-méthyl-D-aspartate (NMDA), dans la SEP [1]. Au-delà de son expression classiquement décrite

au niveau des neurones, où il participe à la neurotransmission glutamatergique [2] (→), le récepteur NMDA est aussi exprimé par de nombreux autres types cellulaires, en particulier les cellules endothéliales cérébrales [3]. Il a de plus été suggéré que le récepteur NMDA pouvait intervenir dans le contrôle de la migration des cellules inflammatoires à travers l'endothélium vasculaire cérébral [3].

Le récepteur NMDA présente plusieurs sites régulateurs, dont un site sensible à une protéase, l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). L'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA induit une augmentation d'activité de ces récepteurs [4, 5]. Notre équipe a montré que le tPA, en activant les récepteurs NMDA des cellules endothéliales cérébrales, permettait l'infiltration des cellules inflammatoires vers le tissu cérébral et la moelle épinière [6]. Afin de bloquer l'action du tPA sur ce récepteur, nous avons développé un anticorps monoclonal (Glnomab[®]) [7] reconnaissant le site de fixation du tPA sur la partie N-terminale du récepteur NMDA (Figure 1). En traitant des souris avec le Glnomab[®], nous avons arrêté la progression des dommages chez les souris soumises à un modèle de SEP [6].

Le Glnomab[®] agit sur la barrière hématomédullaire pour bloquer l'infiltration des cellules inflammatoires

L'infiltration des cellules inflammatoires à travers les barrières hématoencéphalique

et hématomédullaire peut être mimée en utilisant un modèle de culture de cellules endothéliales. Dans ce modèle, les monocytes et les lymphocytes sont capables de traverser une couche de cellules endothéliales cérébrales humaines (cellules hMEC-D3 [8]) en conditions inflammatoires. En traitant les cellules endothéliales avec le Glnomab[®], nous avons bloqué cette infiltration. Avant de passer à des tests chez l'animal, nous avons préalablement étudié si le Glnomab[®] avait la capacité de cibler les cellules endothéliales de la moelle épinière. Nous avons observé sur des coupes de moelle épinière de souris et de sujets humains que le Glnomab[®] se fixait au niveau des vaisseaux de la moelle épinière, à leur surface luminale et à proximité des protéines formant les jonctions serrées (claudine 5, occludine et *zonula occludens-1* [ZO-1]), nécessaires à la perméabilité de la barrière hématomédullaire. Ces résultats montraient, d'une part, pour la première fois, la présence de récepteurs NMDA au niveau de l'endothélium vasculaire de la moelle épinière et suggéraient, d'autre part, que le Glnomab[®] puisse agir sur ces récepteurs NMDA.

Le Glnomab[®] bloque la progression de la maladie dans un modèle de SEP chez la souris

Le Glnomab[®] étant capable de bloquer l'infiltration des cellules immunitaires dans des modèles cellulaires et de se fixer aux récepteurs NMDA exprimés à la surface des vaisseaux de la moelle épinière, nous avons par la suite testé son efficacité dans un modèle de SEP chez

¹ Les barrières hématoencéphalique (dans le cerveau) et hématomédullaire (dans la moelle épinière) sont des barrières physiologiques limitant le passage de molécules et de cellules depuis le sang vers les tissus nerveux. Les cellules endothéliales formant ces barrières ont la particularité d'être jointes par des jonctions serrées et de ne pas présenter de fenestrations. De plus, des prolongements (« pieds ») astrocytaires et des péricytes viennent entourer ces vaisseaux pour augmenter encore leur imperméabilité.

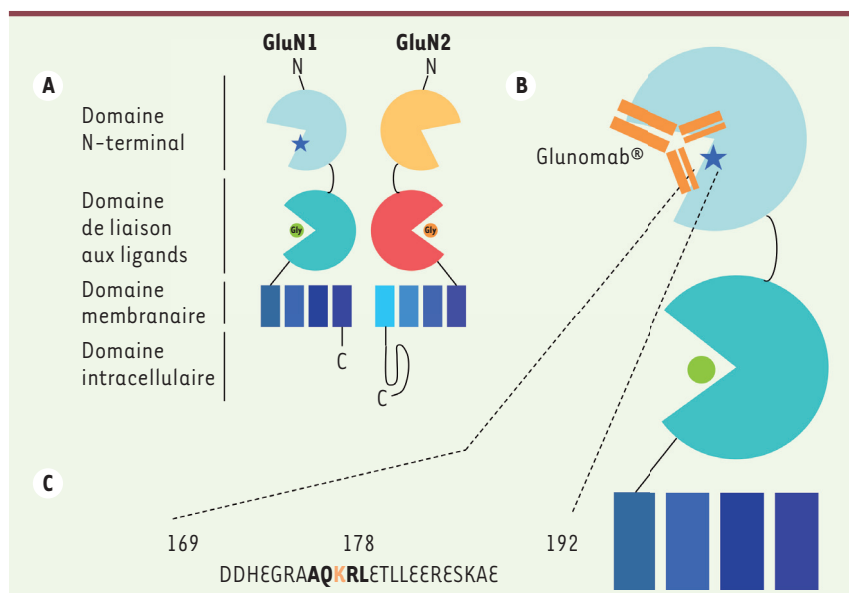


Figure 1. Le Glunomab® cible un site régulateur du récepteur NMDA activé par le tPA.

A. Représentation schématique du récepteur NMDA. Le récepteur NMDA contient la sous-unité GluN1, comportant un site de fixation de la glycine (co-agoniste obligatoire, rond vert) et un site de fixation et d'action du tPA (étoile bleue). La sous-unité GluN2 contient, elle, le site de fixation du glutamate (agoniste principal, rond orange). **B.** Fixation du Glunomab®. Le Glunomab® se fixe sur le site de fixation du tPA, situé au niveau du domaine N-terminal de la sous-unité GluN1. **C.** Détail du site de fixation du Glunomab® (en gras : épitope minimal du tPA ; en orange : la lysine 178, site de clivage de GluN1 par le tPA). NMDA : N-méthyl-D-aspartate ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène.

la souris : l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE).

Dans un premier temps, nous avons réalisé trois injections successives de notre anticorps, par voie intraveineuse chez la souris : (1) à la déclaration des symptômes, (2) au cours de la phase de progression de ces symptômes et (3) au cours de la phase chronique. Ces injections ont permis d'infléchir la courbe de progression des symptômes : les animaux traités avec un anticorps contrôle ont subi une aggravation des symptômes jusqu'à la paralysie des membres postérieurs, alors que, chez ceux traités avec le Glunomab®, ces symptômes se sont limités à une faiblesse des membres postérieurs. Par la suite, une deuxième phase de tests a été réalisée avec une seule injection chez des animaux présentant une faiblesse avérée des membres postérieurs. De nouveau, alors que les animaux contrôles évoluaient jusqu'à la paralysie, la progression des symptômes a été totalement bloquée par l'injection de Glunomab®. En procédant à l'analyse des tissus de moelle épinière, nous avons mis en évidence une réduction très importante de l'étendue des lésions démyélinisantes chez les souris traitées avec le Glunomab®, ce qui concorde avec leurs symptômes moins graves.

Nous avons ensuite cherché à comprendre si cet effet bénéfique du Glunomab® était lié à une action sur la barrière hématomédullaire. Nous avons observé par des techniques d'immunohistologie que VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*), un marqueur d'activation endothéliale, était moins présent à la surface des vaisseaux chez les souris traitées avec le Glunomab® que chez les souris contrôles. De plus, le fibrinogène, qu'on ne retrouve dans la moelle épinière que si la barrière hématomédullaire est altérée, était également moins présent chez les souris traitées avec l'anticorps que chez les souris contrôles. Enfin, nous avons mis en évidence par cytométrie en flux et immunohistochimie une réduction drastique de l'infiltration des cellules immunitaires (lymphocytes T CD4⁺, monocytes/macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) dans la moelle épinière des souris traitées avec le Glunomab®.

Conclusions et perspectives

Nos travaux montrent que le tPA, en augmentant l'activité des récepteurs NMDA présents sur les cellules endothéliales, facilite l'infiltration des cellules immunitaires et inflammatoires. Le Glunomab®, en empêchant l'action du

tPA sur ces récepteurs NMDA, bloque l'infiltration des cellules immunitaires et inflammatoires, et est ainsi capable de limiter la progression des symptômes dans un modèle de SEP chez la souris (Figure 2). Ces résultats suggèrent que le site d'activation par le tPA sur les récepteurs NMDA des vaisseaux pourrait constituer une cible thérapeutique d'intérêt dans la SEP. Un anticorps-médicament, sur le modèle du Glunomab®, pourrait donc présenter des effets bénéfiques contribuant à limiter la progression des symptômes dans cette maladie. En marge des applications thérapeutiques potentielles, notre étude montre également l'implication de ces récepteurs NMDA endothéliaux dans la régulation de la perméabilisation des barrières hématoencéphalique et hématomédullaire. Toutefois, le mécanisme précis conduisant à une « ouverture » de ces barrières à la suite de l'activation des récepteurs NMDA reste à définir, même si plusieurs hypothèses ont été formulées dans des études antérieures, dont l'inhibition d'expression de protéines des jonctions serrées [9] ou l'induction d'une toxicité mitochondriale [10]. Il conviendra également, en marge de leurs rôles au cours de pathologies telles que la SEP, de mieux

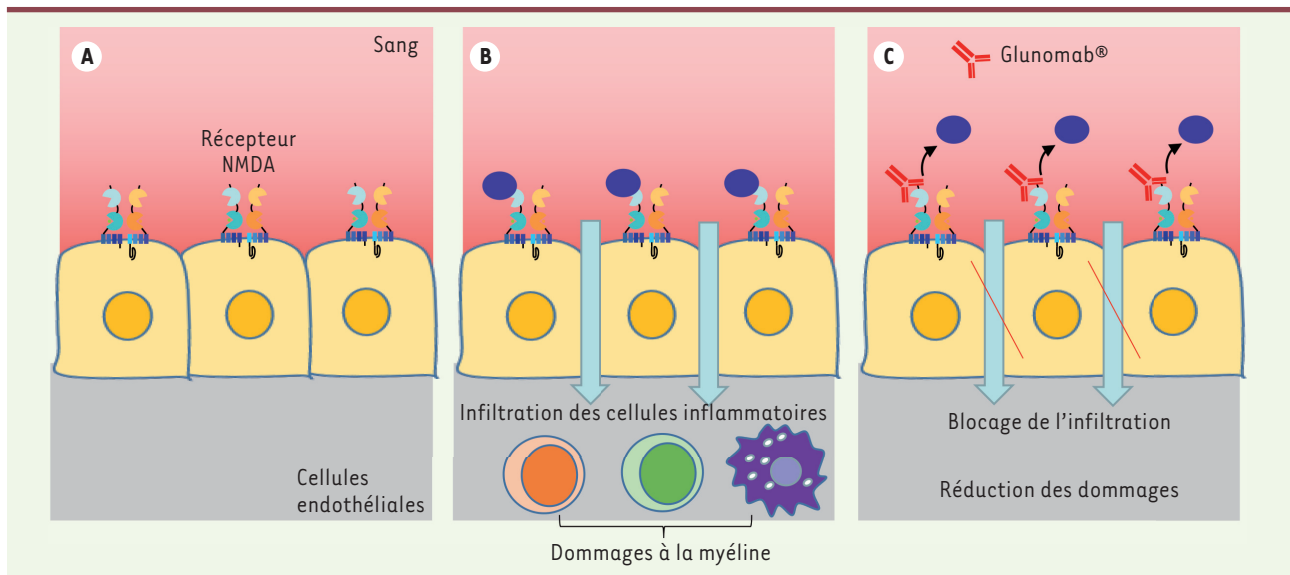


Figure 2. Mode d'action du Glunomab®. **A.** Les cellules endothéliales cérébrales présentent à leur surface apicale (face en contact avec le sang) des récepteurs NMDA. **B.** En cas d'activation de ces récepteurs par le tPA, la barrière hémato-médullaire s'ouvre, permettant le passage de cellules inflammatoires (lymphocytes, neutrophiles et monocytes) vers le tissu nerveux, causant ainsi les dommages à ce tissu. **C.** Le Glunomab®, en empêchant la fixation du tPA sur le récepteur NMDA, limite l'entrée des cellules inflammatoires et réduit ainsi les dommages. NMDA : N-méthyl-D-aspartate ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène.

comprendre comment les récepteurs NMDA endothéliaux agissent en conditions physiologiques.

Une autre question intéressante est celle des ligands endogènes qui permettent d'activer les récepteurs NMDA endothéliaux. Différents types de cellules immunitaires et inflammatoires produisent du glutamate, agoniste naturel du récepteur NMDA [1], mais également du tPA [11, 12], qui augmente l'activité de ce récepteur. On peut donc imaginer que ces cellules, en produisant du glutamate et du tPA, vont participer à l'ouverture des barrières hématoencéphalique et hémato-médullaire, pour faciliter leur propre infiltration vers les tissus nerveux. Le fait que le Glunomab® bloque leur infiltration, comme nous le décrivons dans notre étude, est en faveur de cette hypothèse. Certains types d'auto-anticorps dirigés contre les récepteurs NMDA sont responsables d'une maladie neurologique nommée encéphalite anti-récepteurs NMDA [13]. Toutefois, ces auto-anticorps ciblent une région différente (acides aminés 368 et 369) [14] de celle reconnue par le Glunomab® (acides aminés

169 à 192). De plus, à la différence des anticorps responsables de l'encéphalite [15], le Glunomab® ne réduit pas l'activité basale des récepteurs NMDA, mais seulement l'augmentation de sa réponse par le tPA, ce qui va dans le sens d'une absence d'effet sur la transmission glutamatergique physiologique. Les effets secondaires inacceptables des composés bloquant totalement les récepteurs NMDA, ont contraint à arrêter les essais cliniques [1]. Il y a donc un intérêt grandissant pour des molécules à action modulatrice des récepteurs NMDA, qui n'affecteraient pas la transmission basale. Le Glunomab®, qui module spécifiquement le site d'action du tPA sur ce récepteur, entre dans cette catégorie de modulateurs et apporte donc de nouveaux espoirs de translation vers la clinique. ♦

Role of endothelial NMDA receptors in a mouse model of multiple sclerosis

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs de cet article apparaissent comme inventeurs sur un brevet (ref: WO/2014/187879) concernant l'utilisation du Glunomab® dans les maladies neurodégénératives.

RÉFÉRENCES

1. Macrez R, Stys PK, Vivien D, et al. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities. *Lancet Neurol* 2016 ; 15 : 1089-102.
2. Gielen M. Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate : des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 65-72.
3. Reijerkerk A, Kooij G, Pol SMA van der, et al. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J Neurochem* 2010 ; 113 : 447-53.
4. Nicole O, Docagne F, Ali C, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001 ; 7 : 59-64.
5. Samson AL, Medcalf RL. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* 2006 ; 50 : 673-8.
6. Macrez R, Ortega MC, Bardou I, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2016 ; 139 : 2406-19.
7. Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell death Dis* 2016 ; doi:10.1038/cddis.2016.279.
8. Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* 2005 ; 19 : 1872-4.
9. Andrés IE, Deli MA, Veszleka S, et al. The NMDA and AMPA/KAR receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007 ; 27 : 1431-43.



RÉFÉRENCES

10. Kamat PK, Kalani A, Tyagi SC, et al. Hydrogen sulfide epigenetically attenuates homocysteine-induced mitochondrial toxicity mediated through NMDA receptor in mouse brain endothelial (bEnd3) cells. *J Cell Physiol* 2015 ; 230 : 378-94.
11. Lin L, Jin Y, Mars WM, et al. Myeloid-derived tissue-type plasminogen activator promotes macrophage motility through FAK, Rac1, and NF- κ B pathways. *Am J Pathol* 2014 ; 184 : 2757-67.
12. Uhl B, Zuchtriegel G, Pühr-Westerheide D, et al. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 ; 34 : 1495-504.
13. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008 ; 7 : 1091-8.
14. Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci* 2012 ; 32 : 11082-94.
15. Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, et al. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 2012 ; 135 : 1606-21.

NOUVELLE

Le rôle des protéines BET dans l'intégration des γ -rétrovirus

Olivier Albagli¹, Hélène Pelczar²

¹Inserm U1016 – CNRS UMR 8104 – Institut Cochin, groupe hospitalier Cochin-Port-Royal, bâtiment Cassini, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France ;
²ER6, Université Pierre et Marie Curie, 4, place Jussieu, 75005 Paris, France.
 olivier.albagli@inserm.fr,
 helene.pelczar@upmc.fr

> La réplication des rétrovirus¹ implique l'intégration de leur matériel génétique dans celui de la cellule hôte. L'ARN génomique viral simple brin est rétrotranscrit en un ADN double brin qui s'intègre dans le génome de l'hôte pour former le provirus. Ces deux étapes sont respectivement catalysées par la rétrotranscriptase (RT) et l'intégrase (IN), deux enzymes codées

par le gène viral *pol* [1-4] (→).

Cette propriété d'intégration pré-

sentée par les rétrovirus a suscité le développement d'outils de transfert de gènes, les rétrovecteurs¹. Parmi ceux-ci, les γ -rétrovecteurs (γ RV¹) dérivés du γ -rétrovirus prototypique *Moloney murine leukemia virus* (MLV) sont utilisés en recherche fondamentale et dans

(→) Voir la Synthèse de M. Marin et al., *m/s* n° 3, mars 1994, page 318

plusieurs essais de thérapie génique [5] (Figure 1A).

Les γ RV s'intègrent préférentiellement dans les promoteurs actifs et les enhancers forts

L'intégration permet un transfert stable de gènes mais elle présente deux inconvénients : elle soumet l'expression du(des) gène(s) transféré(s) à l'influence de son (leur) environnement génomique et elle expose le génome de l'hôte à l'inactivation ou la dérégulation de gènes. L'efficacité et la dangerosité des rétrovecteurs dépendent donc en partie de leurs sites d'intégration [6].

Les progrès du séquençage ont permis l'analyse d'un nombre croissant de sites d'intégration. Ces études ont révélé que deux types de région concentrent les intégrations des γ RV : les promoteurs² actifs et les *enhancers*

forts [7-9]. Par exemple, dans des cellules souches hématopoïétiques humaines, 15 % des intégrations d'un γ RV ont lieu dans les promoteurs actifs, soit 14 fois ce que prédit une intégration aléatoire [8] (Figure 1B). L'intégration est d'autant plus fréquente que le promoteur est actif ; les promoteurs inactifs sont même sous-représentés [8]. Les *enhancers* forts concentrent la majorité des autres intégrations [8] (Figure 1B). Une catégorie d'*enhancer* fort est jusqu'à 40 fois plus représentée que le prédit une intégration aléatoire [9]. Notons que ces biais sont observés dans des conditions permettant d'exclure qu'ils ne procèdent que d'une sélection des cellules portant des intégrations favorables à leur survie ou leur prolifération [8, 9].

Profil d'intégration et oncogénicité

Les régions privilégiées par les γ RV pour l'intégration sont donc des éléments *cis*-régulateurs³ actifs de la transcription. Ce tropisme contribue probablement à l'expression des γ RV [6-9] mais il explique aussi, en partie [10], leur oncogénicité marquée car il accroît

¹ Le terme rétrovirus désignera l'ensemble de la famille des rétrovirus (*Retroviridae*). Les γ -rétrovirus et lentivirus sont deux des sept genres constituant cette famille. Leurs dérivés artificiels, défectifs et intégratifs à quelques exceptions près, seront appelés rétrovecteurs (dérivés des rétrovirus, quels qu'ils soient), γ -rétrovecteurs (γ RV, très souvent dérivés de gamma-rétrovirus murins) et lentivecteurs (LV, dérivés des lentivirus, généralement le VIH, virus de l'immunodéficience humaine). Les résultats présentés ici ont été principalement obtenus avec des γ RV défectifs dérivés du γ -rétrovirus murin MLV mais sont probablement valables pour tous les γ -rétrovirus et tous les γ RV (Figure 1A) [3, 8, 11, 12].

² Le terme promoteur désignera une région de 2 kpb centrée sur le site de démarrage de la transcription (SDT) d'un gène. Certains auteurs identifient promoteur et SDT [8]. On gardera ici promoteur car les γ RV s'intègrent préférentiellement de part et d'autre du SDT, mais moins au niveau du SDT lui-même (Figure 1B). De nombreux articles soulignent aussi la tendance des γ RV à s'intégrer près des îlots CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) mais cette donnée apporte peu d'information supplémentaire : les îlots CpG correspondent très majoritairement à des promoteurs, et les rares îlots CpG non promoteurs ne sont pas particulièrement ciblés par les γ RV [7].

³ Séquence d'ADN capable de moduler l'expression d'un gène.