

L'endothélium vasculaire, composante majeure de la maladie drépanocytaire : les cellules circulantes en sont le reflet

Cinquante ans après la description de la drépanocytose comme première « maladie moléculaire », et malgré une somme de travaux impressionnante par son abondance et son aspect multidisciplinaire, le mode évolutif de la maladie reste encore une énigme pour le clinicien. En effet, alors qu'elle résulte d'une mutation unique affectant la chaîne β de l'hémoglobine (mutation β_s , Hb S), alors que le processus physiopathologique qui en découle est univoque et parfaitement connu au niveau moléculaire et dans ses conséquences sur le globule rouge drépanocytaire, une des grandes caractéristiques de la maladie est l'extrême variabilité de son expression clinique. Dominée classiquement par l'existence d'épisodes vaso-occlusifs invalidants ou même mortels, d'un risque infectieux majeur résultant de l'autosplénectomie, et de l'anémie, elle peut aussi évoluer de façon quasiment inapparente, permettant une vie normale. Imprévisible dans sa sévérité, elle est imprévisible aussi dans la survenue des complications majeures, traduisant en fait notre ignorance de leurs facteurs déclenchants.

Polymérisation et anomalies membranaires

A ce jour, la recherche d'éléments modulateurs s'est essentiellement focalisée sur les facteurs susceptibles d'intervenir aux différentes étapes du processus physiopathologique [1]. Au niveau moléculaire, la polymérisation anormale de l'Hb S sous forme désoxygénée est influencée par la présence dans le globule rouge d'hémoglobines autres que l'Hb S.

L'Hb fœtale (Hb F) en particulier peut interrompre le polymère [2] et, statistiquement, les patients conservant une expression résiduelle d'Hb F présentent une forme relativement atténuée de la maladie. Pour la première fois, en 1995, un médicament, l'hydroxyurée, s'est avéré efficace pour réduire la fréquence des crises [3]. Ce succès est celui d'un abord thérapeutique raisonné, puisque le but était la stimulation pharmacologique de la synthèse d'Hb F. Au niveau cellulaire, la polymérisation de la désoxy-Hb S entraîne la distorsion du globule rouge, typiquement en faucille. Il en résulte à la fois une rigidification et une fragilisation du globule rouge, expliquant respectivement son blocage éventuel dans la microcirculation, d'où les crises vaso-occlusives, et l'hémolyse. La polymérisation induit aussi des lésions membranaires modifiant les mouvements ioniques, dont la fuite d'ions K^+ [4]. La déshydratation cellulaire qui en résulte accentue le phénomène, puisque la formation du polymère est majorée de façon très importante par une augmentation de la concentration intracellulaire de l'Hb S. Un traitement d'appoint par le magnésium réduisant cette déshydratation cellulaire a été récemment proposé [5]. Cependant, on est resté trop longtemps sur le schéma physiopathologique décrit ci-dessus, en ignorant l'importance du temps de latence (*delay time*) nécessaire pour la polymérisation et le fait que, dans les conditions physiologiques, celui-ci est supérieur au temps du trajet circulaire [6]. Le globule rouge subit en fait plusieurs cycles de désoxygénation/réoxygénation avant que la

déshydratation cellulaire ne soit suffisante pour que s'amorce un processus pathologique irréversible. On comprend alors que tout ralentissement circulatoire puisse accélérer le phénomène et enclencher la phase, hypoxie et polymérisation. À côté de ses dimensions moléculaires et cellulaires, la drépanocytose prend donc une nouvelle dimension vasculaire et rhéologique [7].

Adhérence des drépanocytes à l'endothélium

En fait, l'adhérence anormale du globule rouge drépanocytaire aux cellules de l'endothélium vasculaire a été décrite depuis 1980 [8]. Elle a fait l'objet de nombreux travaux, souvent difficiles à comparer, car utilisant des systèmes expérimentaux différents : étude sur cellules isolées, étude *ex vivo* sur mésocœcum de rat, *in vivo* sur cremaster de souris, ou chez l'animal transgénique. Une synthèse est d'autant plus difficile à réaliser que ces études se sont aussi, de façon un peu arbitraire, focalisées indépendamment sur l'un ou l'autre système d'adhérence alors que ceux-ci agissent clairement en synergie [9]. Le regain actuel d'intérêt est dû à la reconnaissance de la nature inducible de ces mécanismes et donc au fait qu'ils doivent participer de façon majeure à l'aspect le plus surprenant de la maladie drépanocytaire : la survenue imprévisible, dans le temps comme dans sa topographie, d'un accident vaso-occlusif, simple crise douloureuse ou accident majeur de type cérébral ou pulmonaire [10]. Si les phénomènes d'adhérence à l'endothélium vasculaire impliquent les globules rouges, surtout la popu-

lation réticulocytaire, ils impliquent aussi les leucocytes et des protéines plasmatiques, normalement présentes ou libérées par les plaquettes, par exemple la thrombospondine. Dans ce processus complexe et multiparamétrique commencent à se définir quelques interactions mieux précisées (figure 1) [11, 12]. Un aspect important à considérer est l'hétérogénéité des cellules endothéliales. Par exemple, la protéine CD36 (ou GPIV) et le facteur de von Willebrandt (vWF) sont tous les deux capables de promouvoir l'adhérence des globules rouges drépanocytaires à l'endothélium. Mais la première, induite par l'IFN- γ , n'est exprimée que sur les cellules de la microvasculature, alors que le second est fixé aux cellules endothéliales des gros

vaisseaux. Cependant, l'hétérogénéité entre différents organes ou différents territoires de l'organisme est peu documentée. Les cellules endothéliales expriment aussi des protéines de la superfamille des immunoglobulines: ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) faiblement exprimée de façon constitutive, à laquelle adhèrent des leucocytes, et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), dont l'expression est induite par l'interleukine-1 (IL-1) ou le TNF (*tumor necrosis factor*), et qui constitue un mécanisme majeur de liaison avec l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ présente à la surface du réticulocyte drépanocytaire. Les sélectines, P- et E-sélectine, également inductibles, fixent des neutrophiles. On imagine donc que les cellules endothéliales sont soumises à

un nombre considérable de stimulus et d'agents modulateurs, encore peu étudiés dans le contexte de la drépanocytose, susceptibles de modifier leur état pro-adhésif. Différents agents inflammatoires, le TNF, les interleukines, en particulier IL-1, des médiateurs de type prostacyclines, sont souvent augmentés chez les drépanocytaires. Un excès de production de thrombine crée un état qu'on a pu qualifier de pro-coagulant. Les affections intercurrentes, infectieuses ou virales, enclenchent ces stimulations. Il faut ajouter enfin la régulation du tonus vasculaire, par l'endothéline ou le monoxyde d'azote (NO), dont la production est elle-même inductible, et sans doute soumise à des oscillations. On a pu aussi récemment montrer *in vitro* que l'expression de l'endothéline dans les cellules endothéliales était stimulée par des globules rouges homozygotes pour l'hémoglobine S falciforme [13].

Les cellules endothéliales circulantes en grand nombre...

L'étude de la participation des cellules endothéliales à la physiopathologie des accidents vaso-occlusifs de la drépanocytose se heurte, cependant, à une difficulté majeure du fait de leur manque d'accessibilité. Dans ce contexte, un travail récent par le groupe de R.P. Hebbel (Université du Minnesota à Minneapolis, MN, USA), déjà responsable d'une partie des travaux cités, apporte une contribution importante car il démontre que l'analyse des cellules endothéliales circulantes peut constituer un outil d'exploration de l'état d'activation de l'endothélium dans la drépanocytose, et potentiellement dans d'autres conditions d'agression vasculaire [14]. Le travail comporte plusieurs aspects. Les auteurs ont d'abord affirmé l'origine endothéliale de ces cellules circulantes. Ils ont parallèlement procédé à une étude quantitative et qualitative de ces cellules par comparaison à divers contrôles. Ils ont enfin vérifié leur viabilité, pour s'assurer que le phénotype observé était un reflet authentique des cellules de l'endothélium et non un processus secondaire à leur

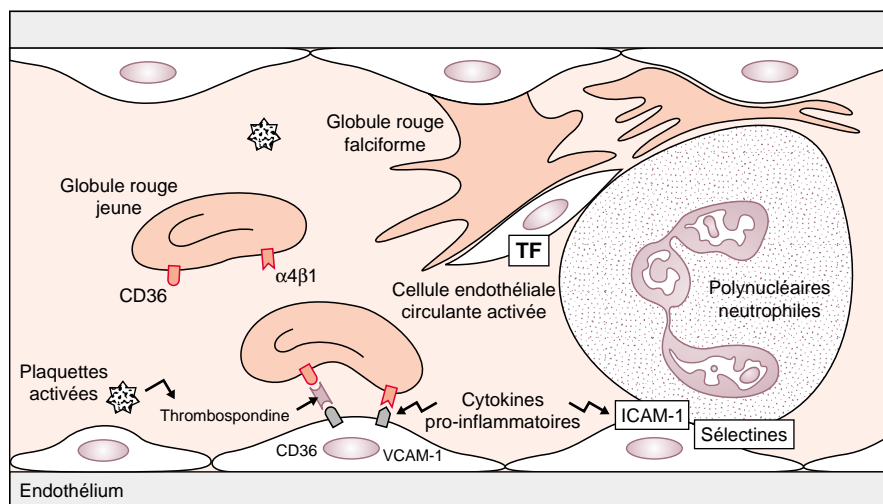


Figure 1. **Représentation schématique de quelques mécanismes d'adhérence du globule rouge à l'endothélium de la microvasculature dans la maladie drépanocytaire.** Les globules rouges (GR) drépanocytaires jeunes expriment à leur surface la glycoprotéine CD36 et l'intégrine $\alpha_4\beta_1$. Cette dernière interagit directement avec VCAM-1 à la surface de l'endothélium activé. CD36 sur le GR interagit indirectement avec une autre molécule de CD36 sur l'endothélium, par l'intermédiaire de la thrombospondine libérée par les plaquettes activées. L'activité pro-adhésive de l'endothélium s'exprime également sur les leucocytes par l'intermédiaire d'ICAM-1 et des sélectines et, tout particulièrement, sur les polynucléaires neutrophiles qui participent alors mécaniquement à l'obstruction du vaisseau. Les cellules endothéliales circulantes doivent participer aussi à l'obstruction qui entraîne un ralentissement circulatoire suffisant pour permettre la polymérisation complète de la désoxy-Hb S dans le GR et la falciformation caractéristique de celui-ci. À noter aussi que l'ensemble se situe dans un contexte pro-coagulant dû aux GR drépanocytaires eux-mêmes et à l'expression de facteur tissulaire (TF) par les cellules endothéliales circulantes. Les principales molécules engagées dans les interactions cellulaires sont encadrées. L'interaction directe entre cellules endothéliales activées et globule rouge drépanocytaire d'une part, polynucléaire neutrophile d'autre part, est encore hypothétique.

libération, puis à leur mort. Toutes ces études ont été faites à partir de la couche supérieure de centrifugation du sang périphérique (le *buffy coat*), classiquement utilisée pour obtenir des cellules nucléées contenant de l'ADN. Un anticorps monoclonal dirigé contre les cellules endothéliales, a été préparé par immunisation de souris par les cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC); la spécificité de cet anticorps (PIH12) est contrôlée par le fait que les cellules marquées par cet anticorps réagissent également vis-à-vis du vWF et de la thrombomoduline, marqueurs classiques des cellules endothéliales.

Le nombre de cellules endothéliales circulantes est augmenté de façon très significative chez les drépanocytaires. Alors que chez les sujets témoins, il est de $2,6 \pm 1,6$ /ml de sang, et qu'il n'est pas modifié au cours d'anémies hémolytiques non drépanocytaires ou chez les sujets hétérozygotes AS, il est de $13,2 \pm 11,8$ /ml ($n=33$, $p=0,002$) chez les sujets homozygotes pour l'hémoglobine S en période d'équilibre et surtout augmenté encore plus fortement au cours des crises vaso-occlusives, $22,8 \pm 18,2$ ($n=24$, $p=0,02$ par rapport à la valeur précédente, et $p<0,001$ par rapport aux témoins). Des études longitudinales ont montré que l'augmentation se poursuit au cours de la crise.

... et activées

Trois tests différents ont été utilisés pour démontrer que ces cellules endothéliales sont viables. Elles réagissent à l'histamine par exposition en surface de la P-sélectine. Quatre essais de remise en culture, après marquage fluorescent intracellulaire, ont été positifs. Enfin, une coloration différentielle distingue cellules vivantes et cellules mortes. Les deux tiers, environ, des cellules endothéliales sont vivantes. Les cellules circulantes expriment CD36 dans environ la moitié des cas chez les témoins. Cette proportion est fortement augmentée chez les drépanocytaires, $78 \pm 15\%$ ($p=0,005$, soit 9 fois la normale en valeur absolue), traduisant le fait qu'elles pro-

viennent majoritairement de la microvasculature. L'exposition d'autres antigènes, témoins de l'état activé de la cellule, a été recherchée parallèlement à la mise en évidence de la spécificité endothéliale. Tous ont été retrouvés dans une proportion significativement accrue. ICAM-1, dont l'expression constitutive est faible, est trouvée dans 88 % des cellules; VCAM-1, la P-sélectine et la E-sélectine qui ne sont normalement pas exprimées, sont trouvées respectivement dans 85 %, 62 % et 82 % des cellules.

Ces données traduisent donc clairement: (1) l'origine majoritairement microvasculaire des cellules circulantes et (2) leur phénotype «activé». Cependant, de nombreuses interrogations subsistent. Quels sont les facteurs d'activation qui induisent l'expression de ces différentes molécules sur les cellules endothéliales? IL-1, endotoxine, TNF, protéine C-réactive, thrombine? Quand et comment agissent-ils? Quel est le mécanisme de la mise en circulation des cellules endothéliales: déplacement physique des cellules par inflammation vasculaire, ou libération par action de protéines définies? Le phénotype activé des cellules endothéliales circulantes est un phénotype pro-adhésif. Les protéines VCAM-1 et CD36, on l'a vu, fixent les réticulocytes homozygotes pour l'hémoglobine S; les autres protéines exposées sont davantage impliquées dans la fixation des leucocytes, en particulier des polynucléaires neutrophiles. Le volume de ces derniers en fait des éléments majeurs du ralentissement circulatoire. Mais, là encore, leur participation est-elle purement passive et mécanique, ou bien participent-ils aussi à l'activation de l'endothélium?

A ce phénotype pro-adhésif de l'endothélium, s'ajoute encore un phénotype pro-coagulant. Des études préliminaires ont, en effet, permis d'observer une augmentation importante de l'expression du facteur tissulaire (TF) dans les cellules endothéliales circulantes, $78 \pm 19\%$, contre 10 % chez les témoins ($p<0,001$) [15]. Ce facteur est également réparti entre cellules mortes et cellules vivantes; parallèlement à

l'expression de l'antigène, on met en évidence son ARNm; le facteur tissulaire est fonctionnel, liant le facteur VIIa, et permettant l'activation du facteur X en Xa. Cette participation endothéliale doit se surajouter au caractère pro-coagulant des globules rouges drépanocytaires [16].

Démêler l'écheveau clinique

Au total, et pour la première fois *in vivo*, ces données suggèrent très fortement une participation directe de l'endothélium de la microvasculature dans la physiopathologie de la crise drépanocytaire. Elles démontrent la possibilité d'étudier les variations du phénotype endothélial à partir d'un matériel facile d'accès: les cellules endothéliales circulantes. Clairement, la physiopathologie de la drépanocytose est un mécanisme complexe qui, à partir du phénomène primaire de polymérisation de la désoxy-Hb S, fait intervenir quasiment toutes les cellules sanguines circulantes, les protéines plasmatiques et l'endothélium. Clairement aussi, la recherche du ou des mécanismes déclenchant la crise drépanocytaire doit être ciblée sur les facteurs modulant l'état pro-adhésif et procoagulant des différents partenaires. La voie semble donc tracée pour leur identification. Celle-ci permettra peut-être, après 50 ans de recherche intensive, de prévoir enfin la survenue des complications vaso-occlusives graves de la drépanocytose qui laissent le clinicien tellement démuni devant leur caractère apparemment aléatoire et si souvent imprévu ■

Dominique Labie

Directeur de recherches à l'Inserm, Inserm U. 129, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75674 Paris Cedex 14, France.

Jacques Élion

Professeur à l'Université Paris VII, Université Denis-Diderot, Laboratoire de biochimie génétique et Inserm U. 458, Hôpital Robert-Debré, 48, boulevard Sérurier, 75019 Paris, France.

TIRÉS À PART

D. Labie.

RÉFÉRENCES

1. Labie D, Elion J. Modulation polygénique des maladies monogéniques: l'exemple de la drépanocytose. *Med Sci* 1996; 12: 341-9.
2. Sunshine HR, Hofrichter J, Eaton WA. Requirements for therapeutic inhibition of sickle hemoglobin gelation. *Nature* 1978; 275: 238-40.
3. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR, and the investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1317-22.
4. Brugnara C, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation of erythrocyte cation and water content in sickle cell anemia. *Science* 1986; 232: 388-90.
5. De Franceschi L, Bachir D, Galacteros F, Tchernia G, Cynober T, Alper S, Platt O, Beuzard Y, Brugnara C. Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 1847-52.
6. Mozzarelli A, Hofrichter J, Eaton WA. Delay time of hemoglobin S gelation prevents most cell from sickling *in vivo*. *Science* 1987; 237: 500-6.
7. Elion J, Labie D. Bases physiopathologiques moléculaires et cellulaires du traitement de la drépanocytose. *Hématologie* 1996; 2: 499-510.
8. Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacobs HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium. Possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J Clin Invest* 1980; 65: 154-60.
9. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997; 99: 2561-4.
10. Hebbel RP. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle cell pathophysiology. *Blood* 1991; 77: 214-37.
11. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 762-9.
12. Hebbel RP, Vercellotti GM. The endothelial biology of sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1997; 129: 288-93.
13. Phelan M, Perrine SP, Brauer M, Faller DV. Sickle erythrocytes, after sickling, regulate the expression of the Endothelin-1 gene and protein in human endothelial cells in culture. *J Clin Invest* 1995; 96: 1145-51.
14. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997; 337: 1584-90.
15. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells *in vivo* in sickle cell anemia. *Blood* 1997; 90: 604a.
16. Helley D, Girot R, Guillin MC, Bezeaud A. Sickle cell disease: relation between procoagulant activity of red blood cells from different phenotypes and *in vivo* blood coagulation activation. *Br J Haematol* 1997; 99: 268-72.