

## Apoptose des cellules endothéliales et lésions vasculaires : un mécanisme pathogène commun aux maladies impliquant le ligand de Fas ?

Jean-Claude Ameisen

Inserm EMI U9922,  
Hôpital Bichat,  
Université Paris 7,  
46, rue Henri Huchard,  
75877 Paris Cedex 18,  
France.

quent que les  
cellules endo-  
théliales sont

> Fas (ou CD95), exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, est l'un des principaux «récepteurs de mort» [1]. Sa multimérisation, consécutive à la fixation de son ligand physiologique - le CD95L, exprimé à la surface d'une cellule ou libéré sous forme soluble - provoque une activation des caspases déclenchant la mort cellulaire programmée. L'apoptose induite par le CD95L joue un rôle majeur dans le fonctionnement normal du système immunitaire [1]. En revanche, l'apoptose causée par une expression anormale ou excessive du CD95L est considérée comme un mécanisme pathogène important dans de nombreuses maladies, dont les hépatites fulminantes virales et alcooliques [2], la maladie du greffon contre l'hôte (pour les références, voir [3]), les réactions de rejet de greffe, des maladies auto-immunes [4, 5], le SIDA [6], certaines maladies cutanées allergiques [7] ou toxiques [8], et les lésions tissulaires causées par la croissance tumorale [9]. Ces maladies - ou les modèles expérimentaux qui les reproduisent chez la souris - impliquent la mort de nombreux types cellulaires dans de nombreux organes [1-9]. Pourtant, de manière paradoxale, l'injection chez la souris d'anticorps agonistes anti-CD95 ou de

CD95L soluble multimérique, bien que létale, n'entraîne apparemment de lésions apoptotiques que dans un nombre limité d'organes - le foie et les organes lymphoïdes - et dans seulement trois types cellulaires - les hépatocytes, les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques et les lymphocytes [10-12]. Une explication possible de cette discordance est que la plupart des maladies dans lesquelles un rôle pathogène du CD95L a été proposé nécessitent en fait des mécanismes effecteurs ou facilitateurs additionnels, qui ne sont pas induits lors de l'injection de ligands solubles du récepteur CD95. Une autre possibilité est que des lésions d'apoptose additionnelles, impliquant d'autres types cellulaires et d'autres organes, surviennent dans ces modèles murins, mais n'ont pas, à ce jour, été identifiés.

Dans une étude réalisée en collaboration avec Anne Janin, Gérard Socié et Eliane Gluckman (CHU St-Louis, Paris, France), nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle les vaisseaux sanguins puissent représenter l'une de ces cibles méconnues, impliquées dans la pathogénie des maladies causées par le CD95L [3]. Notre hypothèse était fondée sur deux séries de données. Premièrement, bien que de nombreux travaux réalisés *in vitro* indi-

quents que les cellules endothéliales sont résistantes à l'apoptose induite par le CD95L, ce n'est pas le cas *in vivo*, chez la souris, pour les cellules endothéliales de certains vaisseaux dans au moins deux organes : les sinusoides du foie [11] et les vaisseaux sous-rétiniens de l'œil [13]. S'agit-il là d'une exception ou de deux exemples d'une sensibilité générale des cellules endothéliales à la transduction de signaux de mort par le récepteur CD95 ? Par ailleurs, le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) - un autre membre de la superfamille de ligands à laquelle appartient le CD95L - provoque, chez la souris, l'apoptose des cellules endothéliales dans de nombreux organes, causant des lésions vasculaires qui précèdent l'apoptose d'autres types cellulaires, et le choc létal [14]. Le CD95L pourrait-il partager cette propriété avec le TNF $\alpha$  ?

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que l'injection systémique chez la souris de CD95L soluble multimérique (ou d'anticorps agonistes anti-CD95) induit très rapidement (en même temps que l'apoptose des hépatocytes) l'apoptose disséminée des cellules endothéliales de la plupart des vaisseaux sanguins dans tous les organes que nous avons explorés - le foie, les reins, le cœur, les poumons, le cerveau, le pancréas, l'intestin, la peau, etc. [3].



Ces lésions disséminées s'accompagnent d'une perte de l'intégrité vasculaire et de suffusions hémorragiques localisées, et sont suivies d'apoptose de nombreux types cellulaires résidant dans ces organes, y compris le cerveau. L'utilisation de souris génétiquement déficientes en CD95, en CD95L, ne possédant pas le gène *TNFA*, nous a permis de confirmer que ces lésions sont bien dues à la mobilisation du récepteur CD95 et ne dépendent pas d'un relais impliquant le *TNFA*. Enfin, l'injection de peptides inhibant la caspase 8 (la première des caspases activées par l'engagement du récepteur CD95) empêche la mort de la plupart des cellules endothéliales, et la survenue des lésions vasculaires et tissulaires en réponse à l'injection du CD95L.

Nous avons ensuite recherché si ces lésions vasculaires pouvaient aussi être impliquées dans la pathogénie de l'une des maladies dans lesquelles un rôle du CD95L a été proposé : la maladie du greffon contre l'hôte (GVH). La GVH aiguë, une complication majeure des greffes de moelle osseuse allogéniques, peut être provoquée chez la souris, en l'absence de toute radiothérapie ou chimiothérapie, par le transfert de lymphocytes allogéniques à des souris immunodéficientes. Nous avons découvert que la lésion la plus précoce induite dans ce modèle murin de GVH aiguë était l'apoptose disséminée des cellules endothéliales de la plupart des vaisseaux sanguins dans tous les organes mentionnés ci-dessus. Ces lésions vasculaires précédant, de plusieurs heures, l'apparition des lésions d'apoptose tissulaire (dans le foie, la peau et le tube digestif) classiquement considérées comme caractéristiques de la GVH aiguë. Nous avons aussi observé l'induction d'apoptose de nombreux autres types cellulaires dans la plupart des autres organes. L'induction de l'ensemble de ces lésions précède l'infiltration des lymphocytes allogéniques dans ces tissus cibles, suggérant la mise en jeu de mécanismes indirects. Ainsi, les

lésions induites dans ce modèle expérimental de GVH aiguë ont les mêmes caractéristiques que celles induites par le CD95L soluble (à l'exception d'une apoptose hépatocytaire moins précoce et moins massive dans le premier cas). Dans les deux cas, l'injection de peptides inhibiteurs de la caspase 8 empêche l'induction des lésions vasculaires et tissulaires. Enfin, le transfert de lymphocytes allogéniques provenant de souris génétiquement déficientes en CD95L n'entraîne pas de lésion vasculaire ni tissulaire, y compris après la phase d'infiltration tissulaire des lymphocytes, confirmant que le CD95L joue un rôle crucial dans l'induction de ces lésions [3].

Au total, nos résultats ont plusieurs implications potentiellement importantes. La première concerne les syndromes immunopathologiques et inflammatoires. La plupart d'entre eux se caractérisent par une expression ou une libération accrue de CD95L ou de *TNFA*, il est possible que le développement de lésions vasculaires précoces se révèle être une composante pathogène commune aux réponses immunes et inflammatoires excessives ou inappropriées, qu'il s'agisse des réponses anti-infectieuses, allergiques, ou auto-immunes. La deuxième implication concerne le rôle que pourraient jouer ces atteintes vasculaires dans le développement des atteintes tissulaires ultérieures. Les lésions vasculaires, en provoquant une hypoxie tissulaire et l'extravasation de médiateurs puis de cellules pro-inflammatoires, pourraient directement causer la mort de nombreux autres types cellulaires, dans de nombreux organes, indépendamment du niveau d'expression (et du degré de sensibilité) des récepteurs CD95 ou *TNFA* dans ces cellules. Cette notion est confortée par des résultats indiquant que l'apoptose des cellules endothéliales dans l'intestin, induite chez la souris par une irradiation, est l'événement responsable de la mort ultérieure des cellules épithéliales de l'intestin, complication

majeure de l'irradiation [15]. La troisième implication concerne les mécanismes par lesquels le CD95 induit l'apoptose *in vivo*. Des travaux réalisés *in vitro* indiquent que, dans certains types cellulaires, la mort induite par le CD95L peut impliquer des mécanismes autres que l'activation des caspases [16]. Nos résultats indiquant que ce n'est pas le cas, *in vivo*, des cellules endothéliales, et que des inhibiteurs de la caspase 8 empêchent l'induction des lésions vasculaires et tissulaires. Enfin, une autre implication concerne la croissance et la dissémination des tumeurs. De nombreuses cellules cancéreuses expriment le CD95L, cette expression pouvant favoriser leur croissance en induisant la mort des cellules normales environnantes [9], et en leur procurant un «privilège immunologique» [1] leur permettant d'induire la mort des lymphocytes cytotoxiques qui les menacent. Il est possible que le CD95L puisse aussi, en altérant l'intégrité vasculaire, favoriser l'implantation métastatique de cellules cancéreuses circulantes. Mais il se pourrait que les tumeurs aient un prix à payer pour l'expression du CD95L. En effet, la construction d'une néovascularisation est une étape importante dans la croissance tumorale [17]. L'induction, par les cellules cancéreuses, de la mort des cellules endothéliales pourrait-elle freiner cette construction, et donc la croissance tumorale ? C'est une question complexe parce que les cellules endothéliales impliquées dans la néovascularisation tumorale sont en prolifération rapide, contrairement à celles qui composent la quasi-totalité des vaisseaux sanguins normaux du corps adulte. Or des travaux récents indiquent que le CD95L peut, dans certains types cellulaires, comme les hépatocytes, avoir un double rôle : induire l'apoptose dans les cellules quiescentes, et augmenter au contraire la prolifération dans des cellules engagées dans un processus de construction tissulaire [18]. En conclusion, nos résultats soulèvent

de nombreuses questions aujourd'hui sans réponse. Comme nous venons de l'évoquer, le CD95L pourrait-il avoir différents effets au niveau des vaisseaux sanguins, induisant à la fois l'apoptose des cellules endothéliales quiescentes dans les vaisseaux normaux, et l'angiogenèse dans les vaisseaux lésés ? Par ailleurs, les cellules endothéliales sont-elles spontanément sensibles à l'apoptose induite par une expression locale du CD95L, ou est-ce l'engagement systémique de CD95 qui les rend sensibles, en induisant la libération d'un facteur circulant non identifié ? Enfin, ce qui

est vrai chez la souris est-il aussi vrai chez l'homme ?

L'expression anormale ou excessive du CD95L a été proposée comme un mécanisme pathogène important dans un grand nombre de maladies [1-9]. S'il s'avérait que les vaisseaux sanguins humains sont aussi une cible majeure du CD95L, le développement de stratégies visant à prévenir sélectivement l'induction précoce de la mort des cellules endothéliales pourrait avoir des implications thérapeutiques dans de nombreuses maladies. ♦

**Endothelial-cell apoptosis and vascular lesions : a shared pathogenic mechanism in diseases involving Fas ligand ?**

## RÉFÉRENCES

1. Kramer P. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000 ; 407 : 789-95.
2. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 1997 ; 3 : 409-13.
3. Janin A, Deschaumes C, Daneshpouy M, et al. CD95 engagement induces disseminated endothelial cell apoptosis *in vivo*: immunopathologic implications. *Blood* 2002 ; 99 : 2940-7.
4. D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, et al. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 1996 ; 184 : 2361-70.
5. Su X, Hu Q, Kristan JM, et al. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2000 ; 164 : 2523-32.
6. Ameisen JC. Apoptosis subversion: HIV-Nef provides both armor and sword. *Nat Med* 2001 ; 7 : 1181-2.
7. Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, et al. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest* 2000 ; 106 : 25-35.
8. Viard I, Wehrli P, Bullani R, et al. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 1998 ; 282 : 490-3.
9. Zeytun A, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Growth of FasL-bearing tumor cells in syngeneic murine host induces apoptosis and toxicity in Fas<sup>+</sup> organs. *Blood* 2000 ; 95 : 2111-7.
10. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effects of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993 ; 364 : 806-9.
11. Lacronique V, Mignon A, Fabre M, et al. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat Med* 1996 ; 2 : 80-6.
12. Huang DCS, Hahne M, Schroeter M, et al. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 14871-6.
13. Kaplan H, Leibole M, Tezel T, Ferguson T. Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med* 1999 ; 5 : 292-7.
14. Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumu S, et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997 ; 186 : 1831-41.
15. Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001 ; 293 : 293-7.
16. Holler N, Zaru R, Micheau O, et al. Fas triggers an alternative caspase 8-independent cell death pathway using kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000 ; 1 : 489-95.
17. Kerbel R. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 1997 ; 390 : 335-6.
18. Desbarats J, Newell MK. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med* 2000 ; 6 : 920-3.