

19. SOZZI M *et al.*- Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* infection: the role of *cagA* status. *Am J Gastroenterol*, 1998, **93**, 375-379.

20. STONEGD *et al.*- PCR-RFLP typing of *ureC* from *Helicobacter pylori* isolated from gastric biopsies during a European multicountry clinical trial. *J Antimicrob Chemother*, 1997, **40**, 251-256.

21. STROBEL S *et al.*- Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient

groups in Germany. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 1285-1289.

22. TELFORD JL *et al.*- Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med*, 1994, **179**, 1653-1658.

23. VAN DOORN L *et al.*- Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 2597-2603.

24. VAN DOORN L *et al.*- Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridiza-

tion. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 1271-1276.

25. WEBB P *et al.*- Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive *Helicobacter pylori*, serum pepsinogens: An international study. *Gastroenterology*, 1999, **116**, 269-276.

26. YAMAOKA Y *et al.*- Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 2258-2263.

Etude de la prévalence des cellules endothéliales circulantes (CEC) et de leurs profils d'expression dans le paludisme cérébral.

Mariam IDRISSE BOUBOU

INSERM U511, CHU Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Objectifs et intérêts

Un des éléments pathogéniques essentiels observés lors du neuropaludisme est une lésion centrée sur l'endothélium microvasculaire. Les conséquences en sont une rupture de la monocouche endothéliale pouvant entraîner des hémorragies. Le rôle joué par la cellule endothéliale dans la genèse du neuropaludisme est manifeste, avec schématiquement deux classes de molécules pouvant être impliquées, les récepteurs susceptibles d'interagir avec le parasite d'une part et les molécules induites par le processus d'activation d'autre part. Nous avons posé l'hypothèse que les cellules endothéliales circulantes (CEC) pourraient initier et/ou amplifier les complications vasculaires du neuropaludisme.

L'approche que nous proposons devrait nous aider à préciser :

- la valeur diagnostique et pronostique des CEC,
- leur association potentielle avec la gravité ou l'évolution de la maladie.

Etat de la question

Les mécanismes responsables de l'intégrité de la monocouche endothéliale, de son maintien et de sa rupture restent encore mal connus. Différents modèles animaux ont montré que cette rupture pouvait s'observer dans des situations pathologiques telles que l'injection d'endotoxines ou l'infection par des bactéries à tropisme endothélial. Ces travaux ont démontré l'existence de zones de désendothélialisation, détectables sur des biopsies. Elles sont associées à la présence, dans le sang périphérique, de cellules non hématopoïétiques, d'origine endothéliale probable sur des critères morphologiques. En pathologie humaine, la présence de telles cellules a été rapportée dans les années 1970 par BOUVIER et LHADOVEC, sans pouvoir clairement établir leur nature endothéliale, par manque de

marqueurs spécifiques.

La difficulté concernant l'étude des cellules endothéliales circulantes est qu'elles appartiennent à la catégorie des "événements rares" présents dans le sang périphérique. Leur détection repose donc sur l'utilisation de techniques sensibles et spécifiques. Ceci a conduit l'équipe de J. SAMPOL à développer un anticorps monoclonal dirigé contre l'endothélium humain et non réactif sur les cellules hématopoïétiques afin d'isoler de façon spécifique des cellules endothéliales à partir du sang périphérique (5). En couplant l'anticorps S Endo1 à des microbilles magnétiques, un système d'immunocapture spécifique a été développé, dont la sensibilité permet d'isoler jusqu'à une cellule endothéliale par millilitre de sang (3). Par cette méthode, il a été mis en évidence des CEC dans différentes pathologies vasculaires associées à des complications thrombotiques ou inflammatoires telles que les angioplasties coronariennes, les infections par les rickettsies, le purpura thrombotique thrombocytopenique, la maladie de BEHÇET, l'angor instable ou l'infarctus du myocarde (3, 4, 6, 8). Dans tous les cas, le nombre des cellules isolées est en accord avec la notion d'événements rares. En effet, les taux détectés varient de 5 à 500 cellules par millilitre de sang alors qu'ils sont inférieurs à trois chez l'adulte normal. Ces données quantitatives ont été confirmées par d'autres groupes utilisant des méthodologies basées sur des sondes spécifiques de l'endothélium (10, 12, 13).

D'un point de vue quantitatif, les CEC présentent un intérêt en tant que marqueur d'altération de la paroi vasculaire. Leur numération apporte des informations dans le suivi de l'évolution clinique des maladies vasculaires, dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement ou dans l'aide au diagnostic de maladies infectieuses impliquant des germes à tropisme endothélial (2). De plus, les CEC représentent une voie alternative

dans l'exploration non invasive de la paroi vasculaire. Grâce à des études phénotypiques et fonctionnelles, il a été montré que les CEC issues de patients présentant des syndromes coronariens aigus proviennent de territoires macrovasculaires, ont un phénotype procoagulant et ne sont pas en apoptose (8). Dans le modèle des anémies drépanocytaires, il a été récemment montré que les CEC expriment un phénotype adhésif et procoagulant, en faveur du rôle de l'endothélium dans les phénomènes thrombotiques et vaso-occlusifs observés chez les patients (13). Leur viabilité ouvre également des pistes nouvelles en tant que vecteur diagnostic et thérapeutique en pathologie vasculaire.

Lieu de la réalisation

L'isolement des cellules endothéliales circulantes, l'immuno-marquage de ces cellules et l'extraction de leur ARNm seront réalisés à Bouaké (Côte d'Ivoire) dans le service de pédiatrie du Pr KJ Plo. L'analyse par microscopie confocale des CEC, l'étude fonctionnelle et l'expression transcriptionnelle des gènes seront réalisées à Paris (Unité INSERM 511) et à Marseille (EA 2195, Laboratoire d'hématologie et d'immunologie, Faculté de pharmacie).

Protocoles expérimentaux

Notre projet sera centré sur deux objectifs :

- 1) l'étude des profils d'expression phénotypiques et fonctionnels des CEC,
- 2) l'étude de leur prévalence dans le paludisme cérébral.

Etude des profils d'expression

Les cellules endothéliales sont caractérisées par une grande plasticité qui leur permet de s'adapter à leur environnement en adoptant un phénotype caractéristique de celui-ci. Ce phénotype dérive de l'expression de gènes conduisant à des profils d'expression qui sont

représentatifs d'un territoire vasculaire ou d'une situation pathologique donnés. Ainsi, les CEC issues de territoire vasculaire lésé pourraient contribuer à la dissémination d'un potentiel prothrombotique dans la circulation générale.

Notre choix se portera sur trois groupes de molécules importantes dans les fonctions hémostatiques et inflammatoires de l'endothélium :

a) **les molécules d'adhésion** ; elles appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (ICAM-I, VCAM-I) et à la famille des sélectines (E et P sélectines) dont la combinatoire est caractéristique de territoires anatomiques donnés (9). Le récepteur de la thrombospondine (CD36), présent de façon préférentielle sur les micro-vaisseaux et la connexine 43, exprimée par les cellules endothéliales du myocarde, seront également étudiés.

b) **les molécules régulant la coagulation**, en nous focalisant sur le facteur tissulaire et la thrombomoduline :

- Le facteur tissulaire (FT) est le facteur initiateur majeur de la coagulation *in vivo*. Sa fixation au facteur VII activé déclenche le processus hémostatique. Le FT est considéré comme l'élément central de l'enveloppe hémostatique du système vasculaire. L'inactivation de son gène chez la souris est létale. Dans un contexte pathologique, de nombreux agents médiateurs des réponses inflammatoires et prothrombotiques favorisent son expression par le monocyte et l'endothélium, pouvant aboutir à la formation d'un thrombus (1).

- La thrombomoduline (TM) est capable de lier la thrombine en lui faisant perdre ses propriétés procoagulantes pour devenir anticoagulante par activation de la protéine C. Certaines cytokines induisent une diminution de l'expression de la TM, ce qui confère aux cellules endothéliales une activité procoagulante (7).

c) **le système u-P A/u-PA récepteur (u-PAR)**

L'urokinase est une sérine-protéase impliquée dans de nombreuses fonctions, incluant la fibrinolyse, la migration cellulaire ou le remodelage des matrices extra-cellulaires. Des données récentes apportées par les modèles animaux suggèrent que l'u-PA jouerait un rôle important dans l'athérogenèse: sa synthèse par les cellules de la paroi est corrélée positivement à la sévérité de l'atteinte, l'inactivation de son gène chez la souris entraîne une diminution de la réponse proliférative des cellules néointimales.

Trois types d'étude seront réalisés :

1. Etude phénotypique

Grâce à des anticorps monoclonaux utilisés en marquages multiples et révélés en immunofluorescence sur les CEC, nous nous proposons d'établir un profil d'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine, P-sélectine, CD36 et connexine 43), des récepteurs régulant la coagulation (FT, TM) et des sérine-protéases de la matrice extracellulaire (système u-PA/u-PAR). Un système d'analyse semi-quantitatif réalisé par microscopie confocale sera utilisé pour interpréter les résultats.

2. Etude fonctionnelle

L'activité prothrombotique de l'endothélium sera explorée par deux types de méthodes :

- l'activité procoagulante dépendante du facteur tissulaire sera étudiée premièrement par un test basé sur la fixation de facteur VII activé marqué par un fluorochrome et, deuxièmement, par un test fonctionnel utilisant la génération de facteur X activé détecté par un substrat fluorescent. Les résultats seront analysés par microscopie confocale.

- l'activité des sérine-protéases (t-PA, u-PA) sera mesurée par des techniques zymographiques reposant sur la digestion de plaques de caséine contenant de la plasmine.

Enfin, nous compléterons ces tests fonctionnels par des méthodes analysant l'engagement des cellules endothéliales dans un processus de mort par apoptose (marquage à l'annexine V, identification des sites de coupure de l'ADN par des nucléotides marqués selon la technique TUNEL).

3. Expression transcriptionnelle des gènes

Nous rechercherons si les CEC expriment des gènes impliqués dans leur caractère prothrombotique (TF) ou associés à l'activation des systèmes protéolytiques (u-PA et u-PAR). En effet, les mécanismes à l'apparition des thromboses et au détachement pourraient moduler la transcription de ces gènes et faire varier leur niveau d'expression. La technologie des micro-arrays n'est guère applicable, à l'heure actuelle, à de si petites quantités de cellules, même si l'équipe de Marie-Claude POTTIER (Ecole normale supérieure) arrive à analyser l'expression de plusieurs dizaines de gènes avec une seule cellule (ROSSIER *et al.* 1999). Avec M.-C. POTTIER, nous essaierons de miniaturiser nos micro-arrays mais l'équipe de F. DIGNAT-GEORGES peut d'ores et déjà réaliser ce type d'études par RT-PCR :

- déplétion totale des cellules leucocytaires par immunosélection utilisant un anticorps dirigé contre le CD45,
- obtention d'ARNm endothélial par des techniques applicables aux cellules rares,
- amplification par PCR nichée.

Etude de la prévalence des CEC

Nous étudierons les taux de CEC chez les patients atteints de paludisme cérébral et les comparerons à ceux trouvés chez les patients souffrant d'un accès plasmodial simple. Les objectifs plus spécifiques de cette étape seront de corrélés les CEC aux critères cliniques et biologiques de ces pathologies afin de préciser leur intérêt dans l'exploration vasculaire. Cette étude sera réalisée chez 64 patients souffrant de neuropaludisme et 64 patients présentant un accès simple, appariés selon l'âge, le sexe et le lieu d'habitation.

Faisabilité

Le projet repose sur l'étroite collaboration entre l'unité INSERM 511 à Paris, le service de pédiatrie du Pr KJ PLO à Bouaké (Côte d'Ivoire) et les équipes des Prs G. GRAU et F. DIGNAT-GEORGE à Marseille dont les expertises sont différentes et complémentaires.

Durée

Ce projet est programmé pour s'étaler sur 3 ans, temps nécessaire au recrutement des cas de neuropaludisme et aux prélèvements du matériel d'étude pendant des périodes de forte transmission à Bouaké (Côte d'Ivoire).

Résultats attendus

L'étude des profils d'expression (phénotypiques, fonctionnels) des CEC devrait permettre d'évaluer leur potentiel dans l'exploration directe de l'endothélium. L'étude de leur prévalence dans le neuropaludisme devrait nous permettre de préciser leur valeur diagnostique, pronostique et leur association potentielle avec la gravité ou l'évolution de la maladie.

Références bibliographiques

- CROSSMAN DC, CARR DP, TUDENHAM EG, PEARSON JD & McVEY JH - The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J Biol Chem*, 1990, **265**, 9782-9787.
- DRANCOURT M, GEORGE F, BROUQUI P, SAMPOL J & RAOULT D - Diagnosis of Mediterranean spotted fever by indirect immunofluorescence of *Rickettsia conorii* in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads. *J Infect Dis*, 1992, **166**, 660-663.
- GEORGE F, BRISSON C, PONCELET P, LAURENT JC, MASSOT O, *et al.* - Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-endo 1 monoclonal antibody coupled to immunomagnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost*, 1992, **67**, 147-153.
- GEORGE F, BROUQUI P, BOFFA MC, MUTIN M, DRANCOURT M *et al.* - Demonstration of *Rickettsia conorii*-induced endothelial injury *in vivo* by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in

patients with Mediterranean spotted fever. *Blood*, 1993, **82**, 2109-2116.

5. GEORGE F, PONCELET P, LAURENT JC, MASSOT O, ARNOUX D *et al.* - Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-endo 1 monoclonal antibody. *J Immunol Methods*, 1991, **139**, 65-75.
6. LEFEVRE P, GEORGE F, DURAND JM & SAMPOL J - Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenia purpura. *Thromb Haemost*, 1993, **69**, 522.
7. MOORE KL, ESMON CT & ESMON NL - Tumor necrosis factor leads to internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic

endothelial cells in culture. *Blood*, 1989, **73**, 159-165.

8. MUTIN M, CANAVY I, BLANN A, BORY M, SAMPOL J & DIGNAT-GEORGE F - Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 1999 (in press).
9. PAGE C, ROSE M, YACOUB M & PIGOTT R - Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am J Pathol*, 1992, **141**, 673-683.
10. PERCIVALLE E, RENELLO G, VAGO L, MORINI F & GEMA G - Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in

disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest*, 1993, **92**, 663-670.

11. ROSSIER J, LAMBOLEZ B, AUDINAT E, COULI B & POTIER MC - Neuropuces et RT-PCR sur cellule unique. *4ème colloque de la Société des Neurosciences*. Marseille 25-28 Mai 1999.
12. SBARBATI R, DE BOER M, MARZILLI M, SCARLATTINI M, ROSSI G & VAN MOURIK JA - Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood*, 1991, **77**, 764-769.
13. 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**, 1584-1590.

S O C I É T É
DE
P A T H O L O G I E
E X O T I Q U E

BOURSE 2001-2002
50 000 francs

Attribuée par un jury appartenant aux disciplines concernées

Cette bourse est destinée à aider

un jeune scientifique (- de 35 ans)

à réaliser des travaux personnels dans le domaine des maladies tropicales de l'homme et des animaux, de l'hygiène et des mesures sanitaires destinées à empêcher l'extension des épidémies et des épizooties d'origine exotique, de tout problème de médecine, biologie et santé tropicales, ainsi que de ceux posés par les expatriations et voyages.

Les résultats obtenus par le lauréat seront publiés dans le **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**.



Pour l'année universitaire 2001-2002, les candidatures (titres et travaux, projets) doivent être adressées au Président et déposées **AVANT LE 1er MARS 2001** :

Secrétariat de la Société de pathologie exotique, 25, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS cedex 15
Tél. : 33 (0)1 45 66 88 69 -1 ; fax : 33 (0)1 45 66 44 85 ; e-mail : socpatex@pasteur .fr
<http://www.pasteur.fr/socpatex>

