

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Année 2011

N°

**MALADIE DE BEHÇET :
RECHERCHE DE MARQUEURS BIOLOGIQUES
ET CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-VE-
CADHERINE**

THESE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

Antoine BAUDET

Né le 26/10/1981 à Suresnes

Thèse soutenue publiquement à la faculté de médecine de Grenoble*

Le 08 / 04 / 2011

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Christian MASSOT

Président du jury

Monsieur le Professeur Patrick CARPENTIER

Monsieur le Professeur Christophe CHIQUET

Madame le Docteur Isabelle VILGRAIN

Madame le Docteur Marie-José STASIA

Madame le Docteur Laurence BOUILLET

Directeur de thèse

** La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Année 2011

N°

**MALADIE DE BEHÇET :
RECHERCHE DE MARQUEURS BIOLOGIQUES
ET CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-VE-
CADHERINE**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

Antoine BAUDET

Né le 26/10/1981 à Suresnes

Thèse soutenue publiquement à la faculté de médecine de Grenoble*

Le 08 / 04 / 2011

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Christian MASSOT

Président du jury

Monsieur le Professeur Patrick CARPENTIER

Monsieur le Professeur Christophe CHIQUET

Madame le Docteur Isabelle VILGRAIN

Madame le Docteur Marie-José STASIA

Madame le Docteur Laurence BOUILLET

Directeur de thèse

** La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

LISTE DES PROFESSEURS D'UNIVERSITE- PRATICIENS HOSPITALIERS

NOM	PRENOM	ADRESSE
ALBALADEJO	Pierre	CLINIQUE D'ANESTHESIE PÔLE 2 ANESTHESIE - REANIMATIONS
ARVIEUX-BARTHELEMY	Catherine	CLINIQUE DE CHIRURGIE ET DE L'URGENCE POLE 6 DIGIDUNE
BACONNIER	Pierre	BIostatISTIQUES ET INFORMATIQUE MEDICALE PAVILLON D POLE 17 SANTE PUBLIQUE
BAGUET	Jean-Philippe	CLINIQUE DE CARDIOLOGIE / HYPERTENSION ARTERIELLE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE
BALOSSO	Jacques	RADIOTHERAPIE PÔLE 5 CANCEROLOGIE
BARRET	Luc	CLINIQUE MEDECINE LEGALE POLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE
BAUDAIN	Philippe	CLINIQUE RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE POLE 13 IMAGERIE
BEANI	Jean-Claude	CLINIQUE DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE- PHOTOBIOLOGIE ET ALLERGOLOGIE POLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE
BENHAMOU	Pierre Yves	CLINIQUE ENDOCRINO DIABETO NUTRITION EDUCATION THERAPEUTIQUE/ DIABETOLOGIE - POLE 6 DIGIDUNE
BERGER	François	ONCOLOGIE MEDICALE POLE 5 CANCEROLOGIE
BLIN	Dominique	CLINIQUE CHIRURGIE CARDIAQUE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE
BOLLA	Michel	CENTRE COORD. CANCEROLOGIE POLE 5 CANCEROLOGIE
BONAZ	Bruno	CLINIQUE HEPATO-GASTRO- ENTEROLOGIE POLE 6 DIGIDUNE
BOSSON	Jean-Luc	DPT DE METHODOLOGIE DE L'INFORMATION DE SANTE POLE 17 SANTE PUBLIQUE
BOUGEROL	Thierry	PSYCHIATRIE D'ADULTES POLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE
BRAMBILLA	Elisabeth	DPT ANATOMIE & CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES POLE 14 BIOLOGIE
BRAMBILLA	Christian	CLINIQUE DE PNEUMOLOGIE POLE 7 MEDECINE AIGÛE & COMMUNAUTAIRE
BRICHON	Pierre-Yves	CLINIQUE DE CHIRURGIE VASCULAIRE ET THORACIQUE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE

BRIX	Muriel	CLINIQUE CHIR. MAXILLO-FACIALE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
CAHN	Jean-Yves	CANCEROLOGIE POLE 5 CANCEROLOGIE
CARPENTIER	Patrick	CLINIQUE MEDECINE VASCULAIRE POLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE
CARPENTIER	Françoise	CLINIQUE URGENCE POLE 1 SAMU SMUR
CESBRON	Jean-Yves	IMMUNOLOGIE POLE 14 BIOLOGIE
CHABARDES	Stephan	Clinique de Neurochirurgie
CHABRE	Olivier	CLINIQUE ENDOCRINO DIABETO NUTRITION EDUCATION THERAPEUTIQUE / ENDOCRINOLOGIE POLE 6 DIGIDUNE
CHAFFANJON	Philippe	CLINIQUE CHIRURGIE THORACIQUE, VASCULAIRE ET ENDOCRINIENNE
CHAVANON	Olivier	CLINIQUE DE CHIRURGIE CARDIAQUE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE
CHIQUET	Christophe	CLINIQUE OPHTALMOLOGIQUE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
CHIROSEL	Jean-Paul	ANATOMIE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
CINQUIN	Philippe	DPT D'INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES- POLE 17 SANTE PUBLIQUE
COHEN	Olivier	DELEGATION - HC FORUM (création entreprise) - rémunération universitaire conservée
COUTURIER	Pascal	CLINIQUE MEDECINE GERIATRIQUE POLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE
CRACOWSKI	Jean-Luc	Laboratoire de Pharmacologie
DE GAUDEMARIS	Régis	DPT MEDECINE & SANTE DU TRAVAIL POLE 17 SANTE PUBLIQUE
DEBILLON	Thierry	CLINIQUE REA. & MEDECINE NEONATALE POLE 9 COUPLE/ENFANT
DEMATTEIS	Maurice	Clinique de Médecine légale et d'Addictologie
DEMONGEOT	Jacques	BIostatistiques ET INFORMATIQUE MEDICALE POLE 17 SANTE PUBLIQUE
DESCOTES	Jean-Luc	CLINIQUE UROLOGIE POLE 6 DIGIDUNE
ESTEVE	François	Dir. Equipe 6 U836 - ID17 /ESRF Grenoble Institut des Neurosciences
FAGRET	Daniel	CLINIQUE DE MEDECINE NUCLEAIRE POLE 13 IMAGERIE
FAUCHERON	Jean-Luc	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE ET DE L'URGENCE POLE 6 DIGIDUNE

FAVROT	Marie Christine	DPT DE BIOLOGIE INTEGREE / CANCEROLOGIE POLE 14 BIOLOGIE
FERRETTI	Gilbert	CLINIQUE RADIOLOGIE & IMAGERIE MEDICALE POLE 13 IMAGERIE
FEUERSTEIN	Claude	GIN
FONTAINE	Eric	CLINIQUE NUTRITION ARTIFICIELLE POLE 7 MED. AIGÛE & COMMUNAUTAIRE
FRANCOIS	Patrice	DPT DE VEILLE SANITAIRE POLE 17 SANTE PUBLIQUE
GARNIER	Philippe	
GAUDIN	Philippe	CLINIQUE DE RHUMATOLOGIE POLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR GERIATRIE CHISSE
GAY	Emmanuel	CLINIQUE NEUROCHIRURGIE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
GRIFFET	Jacques	Chirurgie infantile
HALIMI	Serge	CLINIQUE ENDOCRINO-DIABETO-NUTRITION POLE 6 DIGIDUNE
HOMMEL	Marc	CLINIQUE DE NEUROLOGIE POLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE
JOUK	Pierre-Simon	DEPARTEMENT GENETIQUE ET PROCREATION POLE 9 COUPLE/ENFANT
JUVIN	Robert	CLINIQUE DE RHUMATOLOGIE POLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR & GERIATRIE CHISSE
KAHANE	Philippe	CLINIQUE DE NEUROLOGIE POLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE
KRACK	Paul	CLINIQUE DE NEUROLOGIE POLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE
KRAINIK	Alexandre	CLINIQUE NEURORADIOLOGIE & IRM POLE 13 IMAGERIE
LANTUEJOUL	Sylvie	DEPARTEMENT D'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES PÔLE 14 BIOLOGIE
LE BAS	Jean-François	CLINIQUE NEURORADIOLOGIE & IRM POLE 13 IMAGERIE
LEBEAU	Jacques	CLINIQUE CHIR. MAXILLO-FACIALE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
LECCIA	Marie-Thérèse	CLINIQUE DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE- PHOTOBIOLOGIE ET ALLERGOLOGIE POLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE
LEROUX	Dominique	DEPARTEMENT BIOLOGIE ET PATHOLOGIE DE LA CELLULE POLE 14 BIOLOGIE
LEROY	Vincent	CLINIQUE D'HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE POLE 6 DIGIDUNE
LETOUBLON	Christian	CLINIQUE CHIRURGIE DIGESTIVE & URGENCE POLE 6 DIGIDUNE

LEVERVE	Xavier	LABORATOIRE THERAPEUTIQUE UFR BIOLOGIE BAT 72 UJF BP 53X
LEVY	Patrick	PHYSIOLOGIE POLE 12 REEDUCATION & PHYSIOLOGIE
LUNARDI	Joël	BIOCHIMIE ADN- POLE 9 COUPLE/ENFANT
MACHECOURT	Jacques	CLINIQUE DE CARDIOLOGIE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE
MAGNE	Jean-Luc	CLINIQUE CHIRURGIE VASCULAIRE & THORACIQUE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE
MAITRE	Anne	Médecine du travail EPSP/DPT DE BIOLOGIE INTEGREE - POLE 14 BIOLOGIE
MASSOT	Christian	CLINIQUE MEDECINE INTERNE POLE 8 PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE
MAURIN	Max	DEPARTEMENT DES AGENTS INFECTIEUX / BACTERIOLOGIE POLE 14 BIOLOGIE
MERLOZ	Philippe	CLINIQUE CHIR. ORTHOPEDIE TRAUMATOLOGIE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
MORAND	Patrice	DPT DES AGENTS INFECTIEUX / VIROLOGIE POLE 14 BIOLOGIE
MOREL	Françoise	
MORO-SIBILOT	Denis	PNEUMOLOGIE PHTISIOLOGIE BUREAU HD11
MOUSSEAU	Mireille	ONCOLOGIE MEDICALE POLE 5 CANCEROLOGIE
MOUTET	François	CHIR. PLASTIQUE ET RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE
PASSAGIA	Jean-Guy	ANATOMIE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
PAYEN DE LA GARANDERIE	Jean-François	CLINIQUE REANIMATION POLE 2 ANESTHESIE-REANIMATION
PELLOUX	Hervé	DEPARTEMENT DES AGENTS INFECTIEUX PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE POLE 14 BIOLOGIE
PEPIN	Jean-Louis	CLINIQUE PHYSIOLOGIE SOMMEIL & EXERCICE - POLE 12 REEDUCATION & PHYSIOLOGIE
PERENNOU	Dominique	CLINIQUE MPR POLE 12 REEDUCATION & PHYSIOLOGIE
PERNOD	Gilles	CLINIQUE DE MEDECINE VASCULAIRE- POLE PLURIDISCIPLINAIRE DE MEDECINE - POLE 8
PIOLAT	Christian	Clinique de chirurgie infantile
PISON	Christophe	CLINIQUE PNEUMOLOGIE POLE 7 MEDECINE AIGUË & COMMUNAUTAIRE
PLANTAZ	Dominique	CLINIQUE MEDICALE PEDIATRIQUE POLE 9 COUPLE/ENFANT

POLACK	Benoît	DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE DE LA CELLULE POLE 14 BIOLOGIE
POLLAK	Pierre	NEUROLOGIE POLE 10 PSYCHIATRIE & NEUROLOGIE
PONS	Jean-Claude	CLINIQUE UNIVERSITAIRE GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE POLE 9 COUPLE/ENFANT
RAMBEAUD	J Jacques	CLINIQUE UROLOGIE POLE 6 DIGIDUNE
REYT	Emile	CLINIQUE O.R.L. POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
RIGHINI	Christian	CLINIQUE O.R.L. POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
ROMANET	J. Paul	CLINIQUE OPHTALMOLOGIQUE POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
SARAGAGLIA	Dominique	CLINIQUE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIE POLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR & GERIATRIE CHISSE
SCHAAL	Jean-Patrick	CLINIQUE UNIVERSITAIRE GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE POLE 9 COUPLE/ENFANT
SCHMERBER	Sébastien	CLINIQUE O.R.L. POLE 3 TETE & COU & CHIR. REPARATRICE
SEIGNEURIN	Daniel	DPT ANATOMIE & CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES POLE 14 BIOLOGIE
SELE	Bernard	DPT GENETIQUE & PROCREATION POLE 9 COUPLE/ENFANT
SESSA	Carmine	CHIRURGIE THORACIQUE VASCULAIRE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE
STAHL	Jean-Paul	CLINIQUE INFECTIOLOGIE POLE 7 MEDECINE AIGÛE & COMMUNAUTAIRE
TIMSIT	Jean-François	CLINIQUE REANIMATION MEDICALE POLE 7 MED. AIGUE & COMMUNAUTAIRE
TONETTI	Jérôme	CLINIQUE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIE POLE 11 APPAREIL LOCOMOTEUR & GERIATRIE CHISSE
TOUSSAINT	Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE POLE 14 BIOLOGIE
VANZETTO	Gérald	CLINIQUE DE CARDIOLOGIE POLE 4 CARDIO VASC. & THORACIQUE
VUILLEZ	Jean-Philippe	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
ZAOUI	Philippe	CLINIQUE NEPHROLOGIE POLE 6 DIGIDUNE
ZARSKI	Jean-Pierre	CLINIQUE HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE POLE 6 DIGIDUNE

LISTE DES MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES- PRATICIENS HOSPITALIERS

NOM	PRENOM	ADRESSE
BOTTARI	Serge	Laboratoire de bioénergétique INSERM U884
BOUTONNAT	Jean	Département de Biologie et Pathologie de la Cellule - Pôle 14: Biologie
BRENIER-PINCHART	M.Pierre	Département des agents infectieux Parasitologie Mycologie Pôle 14 : Biologie
BRICAULT	Ivan	Clinique de radiologie et imagerie médicale Pôle 13: Imagerie
BRIOT	Raphaël	Pôle Urgence SAMU
CALLANAN-WILSON	Mary	Génétique
CROIZE	Jacques	Département des agents infectieux Microbiovigilance Pôle 14 : Biologie
DERANSART	Colin	GIN Equipe 9
DETANTE	Olivier	Clinique de Neurologie
DUMESTRE-PERARD	Chantal	Immunologie
EYSSERIC	Hélène	Clinique de Médecine Légale Pôle 8 : Pôle Pluridisciplinaire de Médecine
FAURE	Anne-Karen	Biologie de la procréation / CECOS Département génétique et procréation Pôle 9 : Couple/enfant
FAURE	Julien	Département génétique et procréation Pôle 9 : Couple/enfant
GARBAN	Frédéric	Unité clinique thérapie cellulaire Pôle 5 : Cancerologie
GAVAZZI	Gaëtan	Clinique médecine interne gériatrique Pôle 8 : Pôle pluridisciplinaire de Médecine
GILLOIS	Pierre	Laboratoire TIMC
GRAND	Sylvie	Clinique de Radiologie et Imagerie Médicale Pôle 13 : Imagerie
HENNEBICQ	Sylviane	Biologie de la procréation / CECOS Département génétique et procréation Pôle 9 : Couple/enfant
HOFFMANN	Pascale	Clinique Universitaire Gynécologie Obstétrique Pôle 9 : Couple/enfant
JACQUOT	Claude	Clinique d'Anesthésie Pôle 2 : Anesthésie - Réanimations
LABARERE	José	Département de veille sanitaire Pôle 17 : Santé Publique
LAPORTE	François	Département de biologie intégrée Pôle 14 : Biologie

LARDY	Bernard	Département de biologie et pathologie de la cellule - Laboratoire d'Enzymologie Pôle 14 : Biologie
LARRAT	Sylvie	Département des agents infectieux Pôle 14 : Biologie
LAUNOIS-ROLLINAT	Sandrine	Clinique de Physiologie sommeil et exercice Lab. explor. fonct. cardio-respiratoires Pôle 12 : Rééducation et physiologie
MALLARET	Marie-Reine	Unité d'Hygiène Hospitalière Pavillon E
MAUBON	Danièle	Département des agents infectieux Parasitologie- Mycologie
MOREAU-GAUDRY	Alexandre	Département d'innovations technologiques Pôle 17 Santé Publique
MOUCHET	Patrick	Clinique de Physiologie sommeil et exercice Lab. explor. fonct. cardio-respiratoires Pôle 12 : Rééducation et physiologie
PACLET	Marie-Hélène	Département de biologie et pathologie de la cellule - Laboratoire d'Enzymologie Pôle 14 : Biologie
PALOMBI	Olivier	Clinique de neurochirurgie Pôle 3 : Tête et cou et chirurgie réparatrice
PASQUIER	Dominique	Département d'anatomie et cytologie pathologiques Pôle 14 : Biologie
PELLETIER	Laurent	Centre d'innovation biologique
PAYSANT	François	Clinique de Médecine Légale Pôle 8 : Pôle Pluridisciplinaire de Médecine
RAY	Pierre	Biologie de la reproduction Département génétique et procréation Pôle 9 : Couple/enfant
RENVERSEZ	J.Charles	Département de biologie intégrée Biochimie et Biologie Moléculaire Pôle 14 : Biologie
RIALLE	Vincent	Laboratoire TIMC
SATRE	Véronique	Génétique chromosomique Département génétique et procréation Pôle 9 : Couple/enfant
STANKE-LABESQUE	Françoise	Laboratoire de Pharmacologie
STASIA	Marie-Josée	Département de biologie et pathologie de la cellule Pôle 14 : Biologie
TAMISIER	Renaud	Clinique de Physiologie sommeil et exercice Lab. explor. fonct. cardio-respiratoires Pôle 12 : Rééducation et physiologie
WEIL	Georges	Biostatistiques et Informatique Médicale Pôle 17 Santé Publique

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christian MASSOT, pour me faire l'honneur de présider cette thèse. Je vous remercie de vos enseignements et de votre bienveillance durant mes années d'internat. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Patrick CARPENTIER, pour me faire l'honneur de juger mon travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon respect.

A Monsieur le Professeur Christophe CHIQUET, pour avoir participé à ce projet depuis son initiation et œuvré au recrutement des patients dans votre service. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Laurence BOUILLET. Merci de m'avoir lancé sur ce projet enrichissant, merci de ton soutien, de ton enthousiasme et de ta constante disponibilité au cours de ces années.

A Madame le Docteur Isabelle VILGRAIN, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et initié au travail de laboratoire et plus généralement à la biologie expérimentale.

A Madame le Docteur Marie-José STASIA, pour votre investissement dans ce projet depuis le début. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur le Dr Mathieu TONINI, pour son aide dans la saisie des données ophtalmologiques.

A Monsieur le Dr Barnabe CHUMPITAZI, pour son aide dans la réalisation du dosage des anticorps anti-HSP70.

A toute l'équipe du laboratoire d'enzymologie. Remerciements particuliers à Sylvain BEAUMEL pour la réalisation des expériences de stimulations des lymphocytes et neutrophiles.

A toute l'équipe, du laboratoire JEA pour m'avoir encadré et aidé tout au long de mon master 2.

A mes amis Bourguignons, Olivier, Guillaume & Claire, Julien, LN & Nico, Florian, JB et Sophie, the Bègue Team, François, Florie, pour toutes ces années partagées.

A mon frère, avec qui j'ai grandi parfois en face à face et souvent côte à côte.

A ma grand-mère, sans qui ma culture scrabble serait certainement moindre.

A mes parents, merci pour votre soutien pendant ces longues années d'étude. Merci de m'avoir transmis votre curiosité du monde et votre éthique de vie.

A Ludivine, merci pour ton soutien à tout point de vu pendant l'écriture de ces lignes. Merci pour ces années passées et futures avec toi. Le meilleur est à venir.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	10
TABLE DES MATIERES	12
RESUME	15
ABSTRACT.....	16
ARTICLE 1 : MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA MALADIE DE BEHÇET	17
<i>INTRODUCTION.....</i>	17
<i>MATERIELS ET METHODES</i>	20
Populations	20
A. Population de patients atteints de maladie de Behçet.....	20
B. Populations de sujets sains	21
Méthodes biologiques	21
A. Détection de la VE-cadhérine circulante	21
1. Western-Blot (Immunoempreinte)	21
2. Dosage de la VE-cadhérine : Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	21
B. Dosage des anticorps anti-VE-cadhérine par ELISA.....	22
C. Dosage des anticorps anti-HSP70 par ELISA	22
D. Dosages enzymatiques plasmatiques	23
1. Dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO) plasmatique	23
2. Dosage de la concentration du complexe élastase des polynucléaires neutrophiles / α 1-Proteinase Inhibitor	23
3. Dosage de l'activité Adénosine Désaminase plasmatique (ADA)	23
E. Purification des cellules mononuclées du sang périphérique et des polynucléaires neutrophiles par gradient de Ficoll-Hypaque	24
F. Dosage fluorimétrique de la production de peroxyde d'hydrogène extracellulaire par les polynucléaires neutrophiles activés. (Activité de la NADPH oxydase)	25
G. Etude de la sécrétion des cytokines IL-6 et TNF α par les cellules mononuclées non- CD19 après incubation avec des stimulants des Toll-Like-Receptor.....	26
1. Purification des cellules mononuclées non-CD19 à partir des cellules mononuclées du sang périphérique	26
2. Etude de la sécrétion des cytokines IL-6 et TNF α par les cellules mononuclées non-CD19 après incubation avec des stimulants des Toll-Like-Receptor.....	26
Méthodes statistiques	28

<i>RESULTATS</i>	29
Population.....	29
VE-cadhérine circulante.....	29
Anticorps anti-VE-cadhérine	30
Anticorps anti-Heat-Shock-Protein 70	30
Marqueurs des polynucléaires neutrophiles	31
Activité adénosine désaminase plasmatique	32
Etude de la réponse cytokinique TNF α des CMSP non-CD19 après stimulation par des ligands des Toll-Like-Receptor.....	32
Etude de la réponse cytokinique IL-6 des CMSP non-CD19 après stimulation par des ligands des Toll-Like-Receptor, TNF α et IL-1 β	32
<i>DISCUSSION</i>	33
<i>FIGURES ET TABLEAUX</i>	34
Tableau 1. Population de patients atteints de maladie de Behçet avec atteinte oculaire : Caractères cliniques et génétiques	34
Tableau 2. Activités de la maladie et traitements	35
Figure 2. Identification de VE-cadhérine plasmatique chez 16 patients atteints de maladie de Behçet.....	36
Tableau 3. Relation entre les marqueurs biologiques et l'activité de la maladie de Behçet	37
Figure 3. Dosage ELISA des anticorps anti-VE-cadhérine	38
Tableau 4. Corrélations des anticorps anti-VE-cadhérine avec les autres paramètres biologiques étudiés	39
Figure 4. Dosage ELISA des anticorps anti-HSP70.....	40
Tableau 5. Corrélations des anticorps anti-HSP70 avec les autres paramètres biologiques étudiés	41
Figure 5. Concentrations plasmatiques en myéloperoxydase et en élastase	42
Tableau 6. Corrélations de l'élastase plasmatique avec les autres paramètres biologiques étudiés	43
Figure 6. Activité de la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles après stimulation in vitro chez patients Behçet (16) et des sujets sains (16)	44
Figure 7. Activité plasmatique de l'Adénosine Désaminase (ADA) chez les patients Behçet (13) et chez des sujets sains (14).....	45
Figure 8. Concentrations en TNF α (pg/ml) des surnageants de culture de cellules mononuclées du sang périphérique non-CD19 après incubation avec différents stimulants (PolyU, LTA, Pam3, PGN, LPS) chez les patients Behçet (16) et des sujets sains (12).....	46
Figure 9. Concentrations en IL-6 (pg/ml) des surnageants de culture de cellules mononuclées du sang périphérique non-CD19 après incubation avec différents stimulants chez les patients Behçet (16) et des sujets sains (12)	47

ARTICLE 2 : CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-VE-CADHERINE CHEZ UN PATIENT ATTEINT DE NEURO-BEHÇET	48
<i>INTRODUCTION</i>	48
<i>MATERIELS ET METHODES</i>	50
1. Sujets étudiés	50
2. Dosage des anticorps anti-VE-cadhérine par ELISA.....	50
3. Purification des IgG par chromatographie d'affinité	50
4. Immunodétection par Western-Blot des fragments recombinants EC1-4, EC1, EC1-2, EC1-3 et EC3-4	51
5. Spécificité du dosage anticorps anti-VE-cadhérine	51
6. Culture cellulaire.....	51
7. Immunofluorescence	52
<i>RESULTATS</i>	53
CAS CLINIQUE.....	53
CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES ANTICORPS ANTI-VE-CADHERINE	54
1. Caractérisation des anticorps anti-VE-cadhérine en Western-Blot et ELISA.....	54
2. Identification moléculaire des idiotypes des anticorps anti-VE-cadhérine isolés.....	54
3. Effet des IgG purifiées à partir d'un patient Behçet sur une culture cellulaire d'HUVEC55	
<i>DISCUSSION</i>	56
<i>FIGURES ET TABLEAUX (suite)</i>	58
Figure 10. IRM médullaire du patient Behçet en séquence T2, coupe sagittale.....	58
Figure 11. Anticorps plasmatique anti-VE-cadhérine par ELISA.....	59
Figure 12. Caractérisation d'anticorps anti-VE-cadhérine (EC1-4) chez un patient Behçet	60
Figure 13. Identification moléculaire des idiotypes des anticorps anti-VE-cadhérine isolés à partir d'un patient Behçet.....	61
CONCLUSION	63
BIBLIOGRAPHIE	64
SERMENT D'HIPPOCRATE	68

RESUME

Introduction : La maladie de Behçet est une maladie inflammatoire chronique multisystémique. Les mécanismes physiopathologiques impliquent une hyperactivation des polynucléaires neutrophiles (PNN), une activation des cellules endothéliales et la participation de l'immunité acquise humorale et cellulaire.

Objectif : Identifier des marqueurs biologiques pour le diagnostic et le suivi de la maladie de Behçet.

Méthodes : Tous les patients porteurs d'une maladie de Behçet avec atteinte oculaire ont été inclus entre 01.2008 et 02.2009 au CHU de Grenoble. Les données cliniques et des prélèvements sanguins ont été recueillis. Les paramètres biologiques explorés ont été : VE-cadhérine circulante, anticorps anti-VE-cadhérine, anticorps anti-HSP70, concentrations plasmatiques en élastase, myéloperoxydase, adénosine désaminase, activité de la NADPH oxydase des PNN et production de TNF α et d'IL6 par les cellules mononuclées du sang périphérique non-CD19 après stimulation.

Résultats : Les anticorps anti-VE-cadhérine, les anticorps anti-HSP70 et la concentration en élastase plasmatique sont augmentés dans la maladie de Behçet par rapport aux sujets sains (Respectivement $p = 0,00021$, $p < 0,001$, $p = 0,03$). Aucun de ces marqueurs n'a été corrélé à l'activité de la maladie globale ou oculaire. A partir du plasma d'un patient porteur d'un neuro-Behçet et présentant des anticorps anti-VE-cadhérine très élevés, nous avons montré que ces anticorps ciblent la partie 3-4 du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine.

Conclusion : Nous avons décrit pour la première fois des anticorps anti-VE-cadhérine dans la maladie de Behçet.

ABSTRACT

Introduction: Behçet's disease (BD) is a chronic multisystemic inflammatory disease. Pathogenesis of BD involves neutrophilic hyperactivity, activated endothelium, humoral and cellular immunity.

Aim: To find biological markers for the diagnosis and the follow-up of BD.

Materials and Methods: All patients who consulted with ocular BD at the University Hospital of Grenoble, between January 2008 and February 2009, were included. Clinical data and blood samples were gathered. The following biological parameters were investigated: circulating VE-cadherin, anti-VE-cadherin antibodies, anti-HSP70 antibodies, plasmatic elastase level, myeloperoxidase level, adenosin deaminase plasmatic activity, neutrophilic NADPH oxidase activity and TNF α and IL-6 supernatant concentrations released by non-CD19 peripheral blood mononuclear cell after stimulation.

Results: Anti-VE-cadherin antibodies, anti-HSP70 antibodies and plasmatic elastase levels were increased in BD compared to healthy people (Respectively p 0,00021, p <0,001, p 0,03). None of these biological markers was correlated with general or ocular activities of BD. From a neuro-BD patient's serum with a very high anti-VE-cadherin antibodies level, we showed that anti-VE-cadherin antibodies were aimed against the VE-cadherin extracellular domains 3-4.

Conclusion: We described for the first time anti-VE-cadherin antibodies in BD.

ARTICLE 1 : MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA MALADIE DE BEHÇET

INTRODUCTION

La maladie de Behçet est une maladie inflammatoire chronique multisystémique. Elle se présente cliniquement par une aphtose orale récidivante, des symptômes oculaires, des lésions cutanées et des ulcérations génitales. Histologiquement, les lésions correspondent à des lésions de vascularite des vaisseaux de toutes tailles, veines ou artères. Des mécanismes immunologiques et inflammatoires ont été mis en évidence dans la pathogenèse de la maladie.(1)

Le rôle physiopathologique du couple HSP70 (Heat-Shock-Protein) - anticorps anti-HSP70 est discuté dans la maladie de Behçet. Les protéines de choc thermique (HSP) sont synthétisées quand des cellules pro- ou eucaryotes sont exposées à différents stimuli (infection, traumatisme, chaleur, hypoxie et froid). Elles possèdent des séquences conservées par l'évolution. Par exemple, les HSP des mycobactéries et des streptococcus sp. présentent des homologies avec les HSP60 humaines. Il semble qu'une réaction croisée entre les HSP microbiennes et humaines puisse stimuler la sélection de lymphocytes autoréactifs. Les anticorps anti-HSP70 ont été retrouvés plus élevés dans la maladie de Behçet que chez des sujets sains.(2)(3)

Les lymphocytes T $\gamma\text{-}\delta$ participent à la pathogenèse de la maladie de Behçet.(4) L'adénosine désaminase (ADA) est une enzyme cytoplasmique de la voie du catabolisme des purines. L'activité de l'ADA est en particulier détectée dans les lymphocytes T. Elle est nécessaire à la prolifération, la maturation et la différenciation lymphocytaire. L'ADA est utilisée comme marqueur non spécifique de l'activation lymphocytaire T. L'activité plasmatique de l'ADA a été rapportée comme augmentée dans la maladie de Behçet.(5)(6),(7),(8),(9)

L'hyperactivité des polynucléaires neutrophiles (PNN) est une autre singularité de la maladie de Behçet. Elle se manifeste sous la forme d'une production

augmentée de radicaux libres oxygénés, d'une majoration de l'adhésion endothéliale, d'un hyperchimiostase, et d'une hyperphagocytose.(10) Les PNN sont retrouvés dans les lésions de la maladie et au niveau de la réaction pathologique.(11),(12) Ils possèdent une enzyme, la NADPH oxydase qui participe au « burst oxydatif ». Leurs granulations contiennent différentes enzymes dont l'élastase et la myéloperoxydase. Ces enzymes sont relarguées dans le sang lorsque les PNN sont activés.

Des concentrations plasmatiques élevées en cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8 et TNF α) ont été mises en évidence dans la maladie de Behçet.(13),(14),(15),(16) Le rôle des monocytes dans cette surproduction est peu étudié. L'expression du Toll-Like-Receptor 2 (TLR-2) est augmentée à la surface des monocytes dans la maladie de Behçet.(17)

L'altération du phénotype des cellules endothéliales joue un rôle clef dans la pathogenèse. Elle participe à l'augmentation de la diapédèse leucocytaire, à l'altération de la vasodilatation artérielle NO-dépendante et à l'hypercoagulabilité.(18),(19) La VE-cadhérine est la protéine majeure des jonctions adhérentes de l'endothélium vasculaire. Ses interactions homophiliques permettent le maintien de l'intégrité de l'endothélium et empêchent l'exposition de la matrice sous endothéliale. La VE-cadhérine intervient dans la régulation de la perméabilité capillaire, l'inhibition de contact, la migration des cellules endothéliales et l'extravasation des leucocytes.(20),(21),(22) Lorsque les cellules endothéliales rencontrent des neutrophiles activés, le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine peut être clivé et libéré dans le sang par l'action de l'élastase, de la cathepsine G et de l'ADAM10.(24)(19)(23) Une augmentation de la concentration en VE-cadhérine circulante a été rapportée dans la maladie de Behçet, bien que non corrélée à l'activité de la maladie.(25) Dans l'athérome coronarien, la concentration en VE-cadhérine circulante a été corrélée à l'importance des lésions.(26)

Les anticorps monoclonaux synthétiques anti-VE-cadhérine sont capables de dissocier les jonctions adhérentes et d'inhiber l'effet anti-apoptotique du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).(27) Les anticorps humains polyclonaux anti-VE-cadhérine pourraient jouer un rôle dans les pathologies vasculaires notamment les vascularites. Les auto-anticorps anti-VE-cadhérine n'ont jamais été décrits chez l'homme.

La maladie de Behçet est une maladie rare, invalidante, notamment dans ses formes avec atteinte oculaire. Il n'existe pas de marqueurs biologiques pour aider au diagnostic ou à l'évaluation de l'activité de la maladie.

Nous avons cherché à mettre en évidence des marqueurs biologiques d'intérêt pouvant servir au diagnostic et au suivi de la maladie de Behçet. Les marqueurs biologiques que nous avons choisis d'étudier sont : la VE-cadhérine circulante, les anticorps anti-VE-cadhérine, les anticorps anti-HSP70, la concentration en myéloperoxydase plasmatique, la concentration en élastase plasmatique, l'activité des PNN en NADPH oxydase après stimulation, l'activité adénosine désaminase plasmatique et la production de cytokines TNF α et IL-6 par les cellules mononuclées du sang périphérique non-CD19 après stimulations.

MATERIELS ET METHODES

Populations

A. Population de patients atteints de maladie de Behçet

Dans le cadre du protocole maladie de Behçet-Marqueurs biologiques (Numéro AFSSAPS : 2007-A00430-53) promu par le CHU de Grenoble, tous les patients atteints d'une maladie de Behçet avec atteinte oculaire ont été inclus entre janvier 2008 et février 2009.

Les patients inclus ont rempli les critères diagnostiques de la maladie de Behçet proposés en 2006 (International Criteria for Behçet's Disease (ICBD)).(28)

International Criteria for Behçet's Disease (ICBD)

• Aphthose orale	1 point (critère obligatoire)
• Aphthose génitale	2 points
• Lésions cutanées	1 point
• Atteinte oculaire	2 points
• Test pathergique positif	1 point

Diagnostic établi si 3 critères positifs

Les données cliniques générales ont été standardisées à l'aide d'un questionnaire rempli par un médecin lors de la consultation d'inclusion. Nous avons recueilli : l'âge au moment de l'inclusion, le sexe, les manifestations cliniques présentées depuis le début de la maladie, les signes d'activité de la maladie présents à l'inclusion, la prise d'une corticothérapie ou d'un immunosuppresseur par voie systémique et l'HLA-B51. Les données ophtalmologiques ont été recueillies avec l'aide d'un ophtalmologue (pour les interprétations de fond d'œil et d'angiographie).

Des paramètres évaluant l'activité de la maladie ont été définis :

- Activité globale : actif si au moins un signe d'activité de la maladie, inactif si aucun signe d'activité de la maladie.
- Nombre d'organes présentant une activité de la maladie au moment de l'inclusion (NOA)
- Activité oculaire : actif ou inactif selon les données cliniques et les angiographies réalisées.

B. Populations de sujets sains

Du fait des contraintes liées aux techniques biologiques utilisées, nous avons utilisé 3 populations de témoins :

- La première issue des Etablissements Français du Sang (43 et 75 témoins) pour les dosages concernant le VE-cadhérine et les anticorps anti-VE-cadhérine.
- La deuxième composée de 67 témoins avec une sérologie positive pour la toxoplasmose pour le dosage des anticorps anti-HSP70.(29)
- La troisième composée de témoins sains de laboratoire pour les dosages enzymatiques plasmatiques, l'activité de la NADPH oxydase des PNN, l'étude de la sécrétion d'IL-6 et de TNF α par les cellules mononuclées de sang périphérique non-CD19.

Méthodes biologiques

A. Détection de la VE-cadhérine circulante

1. Western-Blot (Immunoempreinte)

Les plasmas des patients ont été dilués au 1/100 (dans un tampon phosphate PBS 10 mM Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl 150 mM pH 7,5 contenant CaCl₂, MgCl₂, Triton 0,5%, leupeptine) puis 10 μ l ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12% (149V, 1h30). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (110 V, 1h, 4°C). Après saturation de la membrane dans du tampon PBS-Tween-lait (PBS, Tween 20 à 0,05%, lait écrémé en poudre 5 g pour 100ml), l'anticorps primaire BV9 1 μ g/ml (IgG monoclonal de souris anti-VE-cadhérine dirigé contre le segment extracellulaire EC3-4) a été ajouté sur la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (anti-mouse Gentec) a été ajouté pendant 2 à 4h. L'utilisation du kit ECL (electrochimiluminescence) a permis la visualisation de protéines immunoréactives.

2. Dosage de la VE-cadhérine : Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Les plaques de micro-titration (Greiner-Bio One, Deutcher, France) ont été coatées une nuit à 4°C avec 100 μ l d'une solution de BV9 à 10 μ g/ml dans un tampon Na₂CO₃/NaHCO₃ à pH 9,6. Après saturation par PBS-HSA (1% albumine sérique humaine), 200 μ l de plasma de patients dilués au 1/100 dans un tampon Tris/HCL 50 mM pH8, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, HSA 0,1%, leupeptine 1,25 ng/ μ l ont été

incubés 2 h à 37 °C. Après 3 lavages au PBS-Tween, 100 µl d'une solution anticorps anti-EC3 diluée au 1/500 dans PBS-HSA (0,05%) ont été ajoutée 1h à température ambiante. Cent microlitres d'IgG anti-lapin biotinylée dilués au 1/5000 dans du PBS-HSA 0,05% ont été ensuite ajoutés. La streptavidine couplée à une phosphatase alcaline a été rajoutée et la réaction enzymatique a été visualisée par l'ajout du pNPP (p-nitrophenyl phosphate). Les densités optiques ont été lues à 10 min à 405 nm.

B. Dosage des anticorps anti-VE-cadhérine par ELISA

Cinq microgrammes du fragment recombinant VE-EC1-4 ont été coatés dans 96 puits de plaque ELISA et incubés sur la nuit à 4 °C. Les puits ont été lavés et saturés pendant 2 h à 37°C avec BSA 1,5% (bovin serum albumin). Deux cents microlitres de plasma de patients dilués au 1/100 dans PBS-Tween-BSA ont été déposés pendant 2 h à 37 °C. Après lavages, 100 µl d'une solution d'Ig chèvre anti-IgG humaines biotinylées (Southernbiotech) au 1/5000, ont incubé 1h à température ambiante. La streptavidine couplée à la phosphatase alcaline a été ajoutée puis l'activité enzymatique a été mesurée par ajout du substrat pNPP. Les densités optiques ont été lues à 10 min à 405 nm.

C. Dosage des anticorps anti-HSP70 par ELISA

Le dosage a été réalisé selon la méthode mise au point par Chumpitazi et al..(29) Les plaques de micro-titration (Greiner-Bio One, Deutcher, France) ont été coatées avec 100 µl d'une solution de HSP70 recombinante humaine (NSP-555, Stressgen-Tebu, Saint Quentin-Yvelines, France) à 2 µg/ml dans un tampon Na₂CO₃/NaHCO₃ 0,05 M à pH 9,6 pendant une nuit à 4°C. Après saturation avec du PBS-tween-lait, 100 µl de plasma de patients dilués au 1/200 dans PBS-tween-lait ont été incubées 1 h à 37 °C. Après 3 lavages dans PBS-Tween (0,05%), les puits ont été incubés 1h à 37°C avec 100 µl d'une solution d'Ig de chèvre anti-IgG humaine marquées à la peroxydase diluées au 1/1500 dans PBS-Tween-lait. Après un cycle de lavage au PBS-Tween, l'activité enzymatique a été révélée par ajout de substrat O-phénylène-diamine dihydrochloride (3 mg/ml), par 0,8 µl/ml 30% H₂O₂ pendant 10 min à température ambiante dans le noir. La réaction a été arrêtée par 25 µl de 8N H₂SO₄ et l'absorbance a été lue à 492 nm.

D. Dosages enzymatiques plasmatiques

1. Dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO) plasmatique

Le dosage a été réalisé à l'aide du Calbiochem® InnoZyme™ Myeloperoxydase Activity Kit (Darmstadt, Allemagne), selon les recommandations du fabricant. Le test a utilisé un anticorps monoclonal spécifique de la MPO humaine, immobilisé sur une plaque de microtitration de 96 puits, pour capturer spécifiquement la MPO. L'activité de la MPO capturée a été mesurée en utilisant un réactif comprenant du Tetramethylbenzidine TMB et du peroxyde d'hydrogène. La réaction a été arrêtée par de l'acide sulfurique. L'absorbance du TMB oxydé a été mesurée à 450 nm (fluorimètre Multiscan spectrum Thermo Labsystem®). La concentration a été calculée par interpolation des points de la courbe de calibration (0 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml, 60 ng/ml, 80 ng/ml, 100 ng/ml,). (Sensibilité 330 pg/ml).

2. Dosage de la concentration du complexe élastase des polynucléaires neutrophiles / α 1-Proteinase Inhibitor

Le dosage a été réalisé à l'aide de Calbiochem® PMN Elastase/ α 1-PI complex ELISA Kit (Darmstadt, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Dans des plaques de microtitration couvertes par un premier anticorps monoclonal spécifique de l'élastase humaine, ont été déposés les plasmas dilués au 1/100 (ou les témoins de gamme), 1 h à température ambiante. Après lavage, ont été ajoutés des anticorps polyclonaux de lapin anti- α 1-Proteinase Inhibitor conjugués à HRP (horseradish peroxidase), 1 h à température ambiante. Après lavage, un substrat Tetramethylbenzidine TMB a été ajouté. L'absorbance a été lue à 450 nm (fluorimètre Multiscan spectrum Thermo Labsystem®). La concentration a été calculée par interpolation des points de la courbe de calibration (0 ng/ml, 0,16 ng/ml, 0,31 ng/ml, 0,63 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml).

3. Dosage de l'activité Adénosine Désaminase plasmatique (ADA)

Le dosage a été réalisé selon le protocole en vigueur au CHU de Grenoble (Méthode colorimétrique de GIUSTI et GALANTI), basé sur la dégradation de l'ammoniaque produit par l'ADA en présence d'hypochlorite de sodium et de phénol en milieu

alcalin. L'indophénol formé développe une coloration bleue intense dont l'absorbance lue à 620 nm est proportionnelle à l'activité de l'ADA.

1^{ère} phase : Pour les dosages d'échantillon, 50 µl de plasma ont été mis en contact dans des tubes à hémolyse à 37°C pendant 60 minutes avec 1 ml adénosine 21 mM/tampon phosphate 50 mM pH 6,5.

2^e phase : Trois millilitres d'une solution de phénol 106 mM/nitroprussiate de sodium 0,17 mM et 3 ml d'une solution de NaOCl 11 mM/NaOH 125 mM ont été ajoutés pendant 30 minutes à 37°C.

3^e phase : Lecture à 620 nm de la DO échantillon (spectrophotomètre UVIKON Kontron®). Parallèlement les dosages contrôles ont été réalisés :

- Blanc réactif : Seul 1 ml de tampon phosphate 50 mM pH 6,5 a été mis pendant la phase 1. (Pas de plasma ni d'adénosine)
- Standard : Seul 1 ml de (NH₄)₂SO₄ à 75 µM/tampon phosphate 50 mM pH 6,5 a été mis pendant la phase 1.
- Blanc échantillon : Le plasma n'a pas été mis pendant la phase 1 mais pendant la phase 2 (50 µl).

L'activité de l'ADA a été définie comme ci-dessous :

$$\text{activité de l'ADA (U/L)} = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échantillon})}{(\text{DO standard} - \text{DO blanc réactif})} \times 50$$

E. Purification des cellules mononuclées du sang périphérique et des polynucléaires neutrophiles par gradient de Ficoll-Hypaque

Le sang total humain a été centrifugé à 800 g, 5 minutes. Le plasma a été récupéré et congelé à -80 °C. Le volume de plasma éliminé a été remplacé par un volume équivalent de PBS/TCN 1% (citrate de sodium trisodique 1g/100ml). Une nouvelle dilution au ½ du volume total a été réalisée avec du PBS/TCN 1%. Quatre volumes de cette solution ont été déposés sur 3 volumes de FICOLL puis centrifugés 30 minutes à 20 °C, 400 g.

La phase surnageante, correspondant aux cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP) a été lavée 2 fois par une solution de RPMI 1640 (-LGlut)(GIBCO) / Pénicilline 1g/100ml/streptomycine 1g/100ml / L-glutamine 1g/100ml. L'interphase entre les CMSP et les neutrophiles (le Ficoll) a été éliminée par aspiration. Quarante millilitres de tampon de lyse des globules rouges glacé (NH₄

155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 2 H₂O 0,1 mM, pH 7,4) ont été ajoutés au mélange neutrophiles et globules rouges. Après 15 minutes de lyse des globules rouges dans la glace, une centrifugation a été réalisée (7 minutes, 4°C, 460 g) et le surnageant a été éliminé (globules rouges lysés). Pour terminer la lyse des globules rouges, le culot de PNN a été de nouveau repris par du tampon de lyse glacé et centrifugé immédiatement de la même façon. Le culot de PNN a été mis en suspension dans du PBS et ramené à une concentration de 10^8 cellules/ml de PBS.

F. Dosage fluorimétrique de la production de peroxyde d'hydrogène extracellulaire par les polynucléaires neutrophiles activés. (Activité de la NADPH oxydase)

La NADPH oxydase des PNN peut être activée par des agents solubles (PMA, PAF-fMLP) ou particulaires (zymosan opsonisé). Cette enzyme réduit l'oxygène en anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui se transforme en H_2O_2 , soit spontanément, soit par l'action de la superoxyde dismutase. L' H_2O_2 formé excite un fluorophore amplex red®, qui émet à 590 nm.

Les PNN préalablement séparés du sang total à 10^8 cellules/ml (cf. E.) ont été dilués au 1/100 dans du PBS. Dans une plaque de microtitration, 100 μl d'une solution de PBS / CaCl_2 0,9 mM / MgCl_2 0,5 mM / glucose 0,8 M / Amplex Red® 10 mM / HRP 10 U/ml ont été déposés. Ont été ensuite ajoutés soit 50 μl de PBS / CaCl_2 0,9 mM / MgCl_2 0,5 mM pour les blancs, soit 50 μl de solutions d' H_2O_2 de concentrations variables pour la gamme (0,2 μM , 1 μM , 4 μM , 6 μM , 10 μM , 100 μM), soit 50 μl de PNN à 10^6 /ml par puits pour les échantillons. La plaque a été incubée 5 minutes à 37 °C. Dans les puits adéquats ont été ajoutés 10 μl d'activateur (PMA à 10 ng/ml ou PAF-FMLP 1,25 μM ou zymosan opsonisé 1 mg/ml). Le fluorimètre (VARIOSKAN Thermo Scientific®) a lu après 10 minutes d'incubation à 37°C (excitation à 530 nm et émission à 590 nm). Les valeurs de fluorescence ont été reportées sur la gamme d'étalonnage. Les résultats ont été exprimés en μmol d' H_2O_2 produites/min/ 10^6 PNN.

G. Etude de la sécrétion des cytokines IL-6 et TNF α par les cellules mononuclées non-CD19 après incubation avec des stimulants des Toll-Like-Receptor

1. Purification des cellules mononuclées non-CD19 à partir des cellules mononuclées du sang périphérique

Les cellules mononuclées non-CD19 ont été purifiées à partir des CMSP par une technique de tri cellulaire magnétique (MAGnetic Cell Sorting : MACS) utilisant des microbilles magnétiques couplées à un anticorps anti-CD19 humain (CD19 MicroBeads Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne).

Préparation de l'échantillon : La concentration de CMSP a été ajustée à 10^7 cellules pour 80 μ l de tampon PBS / albumine 0,5 % / EDTA 2mM. Vingt microlitres de CD19-MicroBeads ont été ajoutés pour 80 μ l de cette CMSP. L'incubation a duré 15 min à 6°C. Les CMSP ont été lavées par 2 mL du même tampon puis concentrées à 10^8 cellules dans 500 μ l par centrifugation 300 g, 10 minutes.

Séparation magnétique : La colonne MACS MS a été rincée par 500 μ l de tampon et placée dans le champ magnétique. Les cellules ont été passées dans la colonne rincée par 3 x 500 μ l de tampon. Les CMSP non-CD19 ont été récupérées dans l'éluant.

Numération : Les CMSP non-CD19 ont été ajustées à une concentration de 5×10^5 cellules/ml de solution RPMI1640 (-LGlut) (GIBCO) additionnée de Pénicilline 1U/100ml/ streptomycine 1 μ g/100ml / L-glutamine 2mM / Sérum de veau fétal 10 %, par centrifugation 400 g, 10 minutes, 20°C.

2. Etude de la sécrétion des cytokines IL-6 et TNF α par les cellules mononuclées non-CD19 après incubation avec des stimulants des Toll-Like-Receptor.

Un millilitre de cellules (5×10^5 cellules non-CD19) a été déposé dans chaque puit. Les stimulants cellulaires ont été ajoutés dans les puits.

Concentrations finales des activateurs incubés avec les cellules mononuclées du sang périphérique non CD-19

	Activateur	Fournisseurs	TLR et récepteurs activés	Cytokines dosées	Concentration du stimulant déposé
Blanc milieu	-	-	Activation non spécifique des TLR par le milieu	TNF α et IL-6	-
Blanc cellules	-	-	Activation non spécifique des TLR par les cellules non activées	TNF α et IL-6	-
Pam3CSK4	Synthetic triacetylated lipoprotein	Calbiochem	1/2	TNF α	100 ng/ml
LTA	Lipoteichoic acid	Sigma	2	TNF α	50 μ g/ml
LPS	Lipopolysaccharide	Invivogen	4	TNF α	10 μ g/ml
Flagellin	Flagellin	Invivogen	5	IL-6	100 ng/ml
PGN	Peptidoglycans	Fluka	6	TNF α	30 μ g/ml
Imiquimod	Imiquimod-R837	Invivogen	7	IL-6	10 μ g/ml
PolyU	ssPolyU/LyoVec	Invivogen	8	TNF α	1 μ g/ml
CpG	ODN M362	Invivogen	9	IL-6	10 μ g/ml
TNF α	Recombinant human TNF α	RD system	RTNF α	IL-6	20 ng/ml
IL-1 β	Recombinant human IL-1 β	RD system	IL-1R	IL-6	50 ng/ml

ssPolyU/LyoVec : PolyUracile mono-brin complexé à un lipide cationique LyoVec™, TNF : tumor necrosis factor, RTNF α : récepteur au TNF α , IL1 β : interleukine 1 β , IL-1R : récepteur de l'IL1, TLR : Toll-Like-Receptor.

Les cellules ont incubé sur la nuit à 37°C, 5% CO₂. Une centrifugation de 10 minutes à 1500 tours/min a permis de récupérer les surnageants dans lesquels ont été dosées les cytokines.

Selon le stimulant utilisé, un dosage de TNF α ou d'IL-6 a été réalisé :

- La concentration en TNF α des surnageants a été mesurée grâce au kit EIA TNF α (Enzymoimmunoassay) (Immunotech®, France), selon les recommandations du fabricant.

Dans des plaques de microtitration coatées par un premier anticorps anti-TNF α , ont été déposés les surnageants (ou un témoin de gamme) et un 2^e anticorps anti-TNF α couplé à une phosphatase alcaline. Après incubation et lavages des puits, l'activité enzymatique a été révélée par un substrat chromogénique (diethanolamine-HCl). La réaction a été stoppée à 45 minutes. L'absorbance a été lue à 405 nm (fluorimètre

Multiscan spectrum Thermo Labsystem®). La concentration a été calculée par interpolation des points de la courbe de calibration (0 pg/ml, 15,6 pg/ml, 62,5 pg/ml, 250 pg/ml, 1000 pg/ml). (sensibilité 5 pg/ml, spécificité : pas de réaction croisée connue avec d'autres cytokines ou récepteurs, coefficient de variation intra-test 1,6-10%, coefficient de variation inter-test 5,4-12,8%).

- La concentration en IL-6 des surnageants a été dosée grâce au kit EIA IL-6 (Enzymoimmunoassay) (Immunotech®, France), selon les recommandations du fabricant.

Dans des plaques de microtitration coatées par un premier anticorps anti-IL-6, ont été déposés les surnageants (ou un témoin de gamme) et un 2^e anticorps anti-IL-6 couplé une acétylcholinestérase (ACE). Après incubation et lavage des puits, l'activité enzymatique a été révélée par un substrat chromogénique. La réaction a été stoppée à 30 minutes. L'absorbance a été lue à 405 nm (fluorimètre Multiscan spectrum Thermo Labsystem®). La concentration a été calculée par interpolation des points de la courbe de calibration (0 pg/ml, 12,3 pg/ml, 37 pg/ml, 111 pg/ml, 333 pg/ml, 1000 pg/ml). (Sensibilité 3 pg/ml, spécificité : pas de réaction croisée connue avec d'autres cytokines ou récepteurs, coefficient de variation intra-test 1,6-6,8%, coefficient de variation inter-test 7,9-14,6%).

Méthodes statistiques

Des tests statistiques non-paramétriques (test de Mann-Whitney et coefficient de corrélation de Spearman) ont été utilisés. Le test de Student et le coefficient de Pearson ont été utilisés lorsque les distributions ont été testées comme normales, par le test de Shapiro-Wilk. Nous avons choisi un seuil de significativité à 0,05. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel TANAGRA 1.4.38.

RESULTATS

Population

Dix-huit patients atteints d'une maladie de Behçet ont été inclus. La population a été composée de 61 % de femmes et de 39 % d'hommes (âge moyen = 39,4 ans). Tous les patients ont présenté une aphtose buccale récidivante et une atteinte oculaire au cours de l'évolution de leur maladie. Tous ont rempli les nouveaux critères ICBD. Cinq sur dix-huit n'ont pas rempli les critères ISG 1990. Les autres manifestations ont été composées d'atteinte cutanée (66%), d'atteinte articulaire (50%). Un seul patient a présenté une atteinte neurologique. Aucun des patients n'a présenté d'atteinte veineuse, artérielle, digestive ou cardiaque. La recherche d'HLA-B51 a été positive chez un tiers des patients (Tableau 1).

Deux tiers des patients étaient traités par corticothérapie systémique ou immunosuppresseurs.

Un seul patient (patient 3) n'a pas présenté de signe clinique au moment de l'inclusion (NOA=0). Les patients ont eu en moyenne 1,94 organes présentant des signes d'activité de la maladie. Des signes d'activité oculaire étaient présents chez 44 % des patients (Tableau 2 et figure 1).

VE-cadhérine circulante

La VE-cadhérine plasmatique a été détectée en Western-blot chez tous les patients atteints de Behçet à 90 KDa (Figure 2.A). Le poids moléculaire correspond à celui du domaine extracellulaire de la protéine. Le dosage ELISA n'a pas retrouvé de différence entre les patients Behçet et les sujets sains ($p = 0,23$) (Figure 2.B).

Le taux de VE-cadhérine n'a pas été corrélé avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire (respectivement, Rho de Spearman = -0,007, $p = 0,98$; test U de Mann-Whitney : $p = 0,60$) (Tableau 3).

Anticorps anti-VE-cadhérine

Les taux d'anticorps anti-VE-cadhérine (EC1-4) chez les patients atteints de maladie de Behçet ont été plus élevés chez les sujets sains (test U de Mann-Whitney : $p = 0,00021$) (Figure 3.A).

La courbe ROC (Receiver-Operating Characteristic curve) a permis de dessiner une aire sous la courbe (ASC) de 0,79. Nous avons défini un seuil optimal de positivité des anticorps à 0,262 (pour un index de Youden à 0,55) qui correspond à une sensibilité de 75,0 % et une spécificité de 80,0 % (Figure 3.B).

Le taux d'anticorps anti-VE-cadhérine n'a pas été corrélé avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire (respectivement, Rho de Spearman = 0,017, $p = 0,95$; test U de Mann-Whitney : $p = 0,83$) (Tableau 3). Le taux d'anticorps anti-VE-cadhérine a été corrélé positivement avec le taux d'anticorps anti-HSP70. (Rho de Spearman = 0,667, $p = 0,013$). La corrélation avec la VE-cadhérine circulante a été à la limite de la significativité. (Rho = 0,476, $p = 0,073$) (Tableau 4).

Anticorps anti-Heat-Shock-Protein 70

Les taux d'anticorps anti-HSP70 ont été plus élevés chez les patients Behçet que chez les sujets sains (t de Student : $p < 0,001$) (Figure 4.A).

La courbe ROC a permis de dessiner une aire sous la courbe (ASC) de 0,71. A l'aide de l'index de Youden, nous avons défini un seuil optimal de positivité des anticorps à 0,255 (pour un index de Youden à 0,40) qui correspond à une sensibilité de 93,3 % et une spécificité de 47,0 % (Figure 4.B).

Le taux d'anticorps anti-HSP70 n'a pas été corrélé avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire (respectivement, Rho de Spearman = 0,337, $p = 0,26$; test U de Mann-Whitney : $p = 0,51$) (Tableau 3). Le taux d'anticorps anti-HSP70 a été corrélé positivement avec l'activité désaminase plasmatique et la production de TNF α par les CMSP non-CD19 après stimulation par du Pam3. (Respectivement Rho = 0,810, $p = 0,001$ et Rho = 0,616, $p = 0,025$) (Tableau 5).

Marqueurs des polynucléaires neutrophiles

Les concentrations des enzymes provenant des granulations des PNN (MPO et Elastase) ont été retrouvées augmentées chez les patients atteints de maladie de Behçet. Le seuil de significativité n'a été atteint que pour la concentration en élastase plasmatique (Elastase $p = 0,03$; MPO $p = 0,07$) (Figure 5). La courbe ROC de l'élastase permet de mesurer l'aire sous la courbe à 0,73. Comme précédemment, nous définissons un seuil à 106,6 ng/ml (index de Youden à 0,5), définissant une sensibilité à 68,8 % et une spécificité à 81,2 %.

Les concentrations en myéloperoxydase ou en élastase n'ont pas été corrélées avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire (MPO : Rho de Spearman = -0,15, $p = 0,65$; test U de Mann-Whitney $p = 0,46$) (élastase : Rho de Spearman = -0,30, $p = 0,91$; test U de Mann-Whitney $p = 0,91$) (Tableau 3). L'élastase plasmatique n'a été corrélée à aucun des paramètres biologiques étudiés (Tableau 6).

Après avoir isolé les PNN à partir du sang total, nous avons étudié l'activité de la NADPH oxydase des PNN après stimulations via différentes voies. Quel que soit le stimulant utilisé, les PNN des patients Behçet et des sujets sains présentent la même activité NADPH oxydase (zymosan $p = 0,69$; PMA $p = 0,57$; PAF/fMLP $p = 0,60$) (Figure 6).

Les activités de la NADPH oxydase après stimulations n'ont pas été corrélées avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire. (Zymosan : Rho de Spearman = -0,15, $p = 0,59$; test U de Mann-Whitney $p = 0,23$), (PMA : Rho de Spearman = -0,20, $p = 0,47$; test U de Mann-Whitney $p = 0,10$), (PAF/fMLP : Rho de Spearman = -0,29, $p = 0,30$; test U de Mann-Whitney $p = 0,59$) (Tableau 3).

Activité adénosine désaminase plasmatique

L'activité plasmatique en adénosine désaminase a été identique chez les patients Behçet et les sujets sains ($p = 0,75$) (Figure 7). L'activité plasmatique de l'adénosine désaminase n'a pas été corrélée avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire (Zyosan : Rho de Spearman = 0,11, $p = 0,74$; test de U Mann-Whitney $p = 0,46$) (Tableau 3).

Etude de la réponse cytokinique TNF α des CMSP non-CD19 après stimulation par des ligands des Toll-Like-Receptor

Les réponses cytokiniques en TNF α des CMSP non-CD19 après stimulations par des ligands des Toll-Like-Receptor (PolyU, LTA, Pam3, PGN, LPS) ont été identiques chez les patients Behçet et les sujets sains (polyU : $p = 0,56$, LTA : $p = 0,38$, Pam3CSK4 : $p = 0,82$, PGN : $p = 0,55$, LPS : $p = 0,42$) (Figure 8).

Les réponses cytokiniques en TNF α après stimulations n'ont pas été corrélées avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire (Tableau 3).

Etude de la réponse cytokinique IL-6 des CMSP non-CD19 après stimulation par des ligands des Toll-Like-Receptor, TNF α et IL-1 β

Les réponses cytokiniques en IL-6 des CMSP non-CD19 après stimulations par des ligands des Toll-Like-Receptor (CpG, Imiquod, Flagelline), le TNF α et l'IL-1 β ont été identiques chez les patients Behçet et les sujets sains (CpG : $p = 0,52$, TNF α : $p = 0,68$, Imiquod : $p = 0,43$, Flagelline : $p = 0,14$, IL-1 β : $p = 0,11$) (Figure 9).

Les réponses cytokiniques en IL-6 après stimulations n'ont pas été corrélées avec les paramètres d'activité de la maladie : NOA et activité oculaire (Tableau 3).

DISCUSSION

Pour la première fois dans la maladie de Behçet, des anticorps anti-VE-cadhérine ont été identifiés. Les anticorps anti-VE-cadhérine ont été plus élevés que chez les sujets sains. Ce nouveau marqueur biologique de la maladie permet de discriminer avec une bonne sensibilité (75%) et une bonne spécificité (80%) les patients Behçet des sujets sains. Nous ne savons pas comment se comportent les anticorps anti-VE-cadhérine dans les pathologies pouvant être des diagnostics différentiels de la maladie de Behçet. Des études complémentaires sont nécessaires pour valider ce paramètre dans une démarche diagnostique.

La présence d'anticorps anti-VE-cadhérine nécessite une rupture de tolérance envers la VE-cadhérine. Des phénomènes de mimétisme moléculaire ou d'« epitope spreading » pourraient être en jeu. La tendance (non significative) à la corrélation positive entre le taux de VE-cadhérine circulante et les anticorps anti-VE-cadhérine est un argument dans ce sens.

Nul ne sait si ces anticorps constituent un épiphénomène ou s'ils jouent un rôle pathogène dans la maladie de Behçet. Parmi les anticorps monoclonaux anti-VE-cadhérine, certains augmentent le recrutement des polynucléaires neutrophiles et d'autres augmentent la perméabilité endothéliale.(27),(21) Les anticorps dirigés contre la VE-cadhérine, protéine endothéliale, sont à rapprocher des anticorps anti-cellules endothéliales (AACE). Les AACE sont présents chez 18,1% à 50 % des patients Behçet.(30),(31),(32)

Nos résultats confirment l'augmentation des anticorps anti-HSP70 dans la maladie de Behçet. Néanmoins, contrairement à d'autres auteurs, nous n'avons pas retrouvé de lien avec l'activité de la maladie.(2),(3) L'effectif faible de patients et la prise d'un traitement immunosuppresseur ont pu participer à l'absence d'identification de cette liaison.

Comme dans d'autres études, une augmentation de l'élastase plasmatique a été retrouvée.(33),(34) Cette augmentation est concordante avec l'hyperactivation des PNN décrite dans la maladie de Behçet.(1) Il est intéressant de noter que cette hyperactivation ne concerne pas la réponse des PNN aux différents stimulants de la NADPH oxydase. Il n'y a pas de préactivation de cette fonction (pas de régulation positive des voies de stimulation, ni de surexpression de la NADPH oxydase).

FIGURES ET TABLEAUX

Tableau 1. Population de patients atteints de maladie de Behçet avec atteinte oculaire : Caractères cliniques et génétiques

Patients	Age (ans)	Sexe	Manifestations cliniques de la maladie ajoutées à l'aphthose buccale récidivante et à l'atteinte oculaire	HLA-B51
1	32	h	atteinte cutanée	présent
2	60	f	atteinte cutanée	présent
3	32	h	atteinte cutanée, aphthose génitale	présent
4	32	f	atteinte cutanée, aphthose génitale	absent
5	23	h	atteintes cutanée et articulaire	ND
6	23	f	atteintes cutanée et articulaire	absent
7	40	f	atteintes cutanée et articulaire, aphthose génitale, test pathergique positif	absent
8	49	f	atteinte cutanée	absent
9	51	h	atteintes cutanée, et articulaire, test pathergique positif	présent
10	37	h	atteintes cutanée et articulaire, aphthose génitale	absent
11	54	f	atteintes cutanée et articulaire, test pathergique positif, atteinte neurologique centrale	absent
12	24	f	test pathergique négatif	absent
13	52	f	atteinte articulaire	absent
14	24	h	atteinte cutanée, aphthose génitale	absent
15	44	h	atteinte articulaire, test pathergique négatif	absent
16	56	f	atteinte articulaire, aphthose génitale	présent
17	26	f	pas d'autres manifestations	ND
18	50	f	pas d'autres manifestations	ND

h : homme, f : femme, ND : non disponible

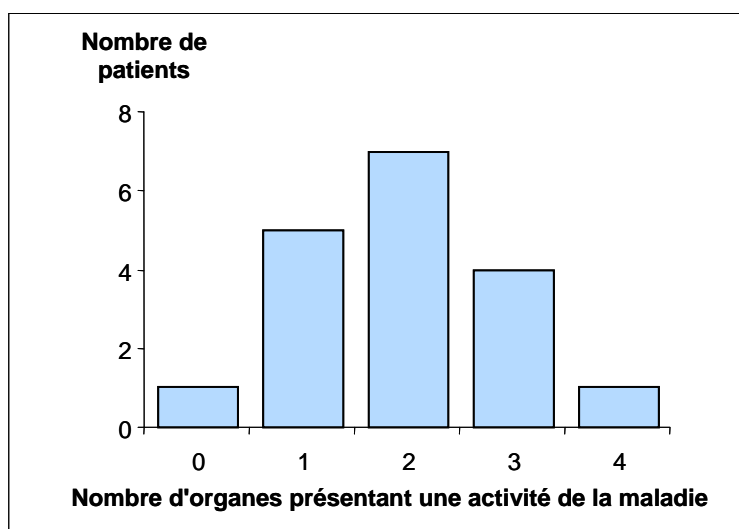


Figure 1. Répartition de l'activité de la maladie chez les patients Behçet

Tableau 2. Activités de la maladie et traitements

Patients	Activité globale de la maladie	NOA	Activité oculaire	Traitement par corticoïdes systémiques ou immunosuppresseurs
1	active	2	inactive	oui
2	active	3	active	non
3	inactive	0	inactive	oui
4	active	2	active	oui
5	active	2	inactive	oui
6	active	4	inactive	oui
7	active	2	active	oui
8	active	1	inactive	oui
9	active	2	active	oui
10	active	1	inactive	non
11	active	3	active	non
12	active	1	inactive	oui
13	active	2	inactive	oui
14	active	1	active	oui
15	active	3	active	non
16	active	3	active	oui
17	active	2	inactive	non
18	active	1	inactive	non

L'activité globale de la maladie a été évaluée par le médecin au moment des prélèvements biologiques. NOA : nombres d'organes pour lesquels la maladie est active. L'activité oculaire a été évaluée selon les données cliniques et angiographiques. Les immunosuppresseurs étaient : mycophénolate mofétil, azathioprine ou adalimumab.

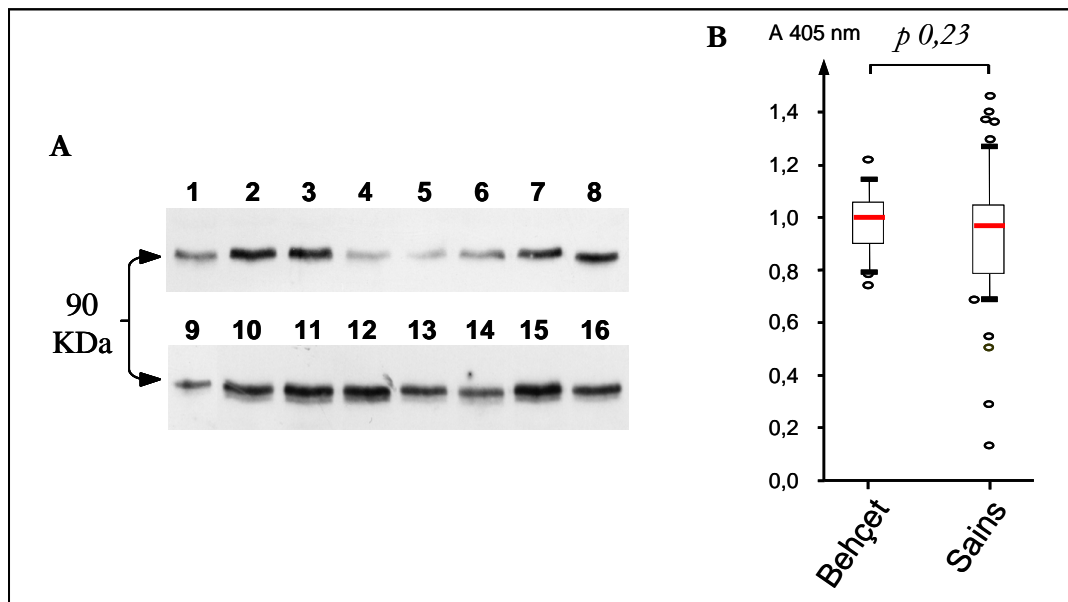


Figure 2. Identification de VE-cadhérine plasmatique chez 16 patients atteints de maladie de Behçet

A. Western-Blot de plasmas (10 μ l au 1/100) de patients avec BV9 (anticorps anti-VE-cadhérine).

B. ELISA de la VE-cadhérine circulante des plasmas de patients Behçet (16) et de sujets sains (43). Tous les échantillons ont été testés en double et sur deux expériences différentes. Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément. La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney.

Tableau 3. Relation entre les marqueurs biologiques et l'activité de la maladie de Behçet

		Corrélation partielle de Spearman avec l'activité de la maladie NOA			U de M-W	
		r	p-value	Intervalle de confiance à 95 %	Activité oculaire	
					p-value	
	VE-cadhérine	-0,01	0,98	-0,50	0,49	0,60
	Anticorps anti-VE-cadhérine	0,02	0,95	-0,48	0,51	0,83
	Anticorps anti-HSP70	0,34	0,26	-0,24	0,74	0,52
	Myéloperoxydase	-0,15	0,65	-0,65	0,44	0,46
	Elastase	-0,30	0,29	-0,69	0,23	0,91
	Adénosine Désaminase	0,11	0,74	-0,47	0,62	0,46
TNF α (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	LTA	0,10	0,72	-0,42	0,57	0,13
	PGN	-0,07	0,81	-0,55	0,44	0,83
	PolyU	-0,09	0,75	-0,56	0,42	0,45
	LPS	0,10	0,72	-0,42	0,57	1,00
	Pam3	0,16	0,57	-0,37	0,61	0,39
IL-6 (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	CpG	-0,15	0,59	-0,60	0,37	0,83
	IL1beta	0,03	0,91	-0,47	0,52	0,13
	flagelline	-0,06	0,84	-0,54	0,45	0,45
	Imiquimod	-0,02	0,93	-0,51	0,48	0,28
	TNFalpha	-0,17	0,54	-0,62	0,35	0,28
Activité de la NADPH oxydase des PNN	Zymosan	-0,15	0,59	-0,60	0,37	0,23
	PMA	-0,20	0,47	-0,63	0,33	0,10
	PAF/fMLP	-0,29	0,30	-0,69	0,24	0,59

Les corrélations de Spearman entre les paramètres biologiques et l'activité de la maladie selon NOA ont été calculées en contrôlant l'âge. Chaque paramètre biologique a été comparé à l'activité oculaire de la maladie par un test de Mann-Whitney (U de M-W).

LTA : lipoteichoic acid ; PGN : peptidoglycans ; PolyU : ssPolyU/LyoVec ; LPS : Lipopolysaccharide ; Pam3 : Pam3CSK4 ; CpG : ODN M362 ; IL1 β : interleukine 1 β ; imiquod-R837 ; TNF α : tumor necrosis factor α ; zymosan ; PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate ; PAF/fMLP : platelet-activating factor/f-Met-Leu-Ala

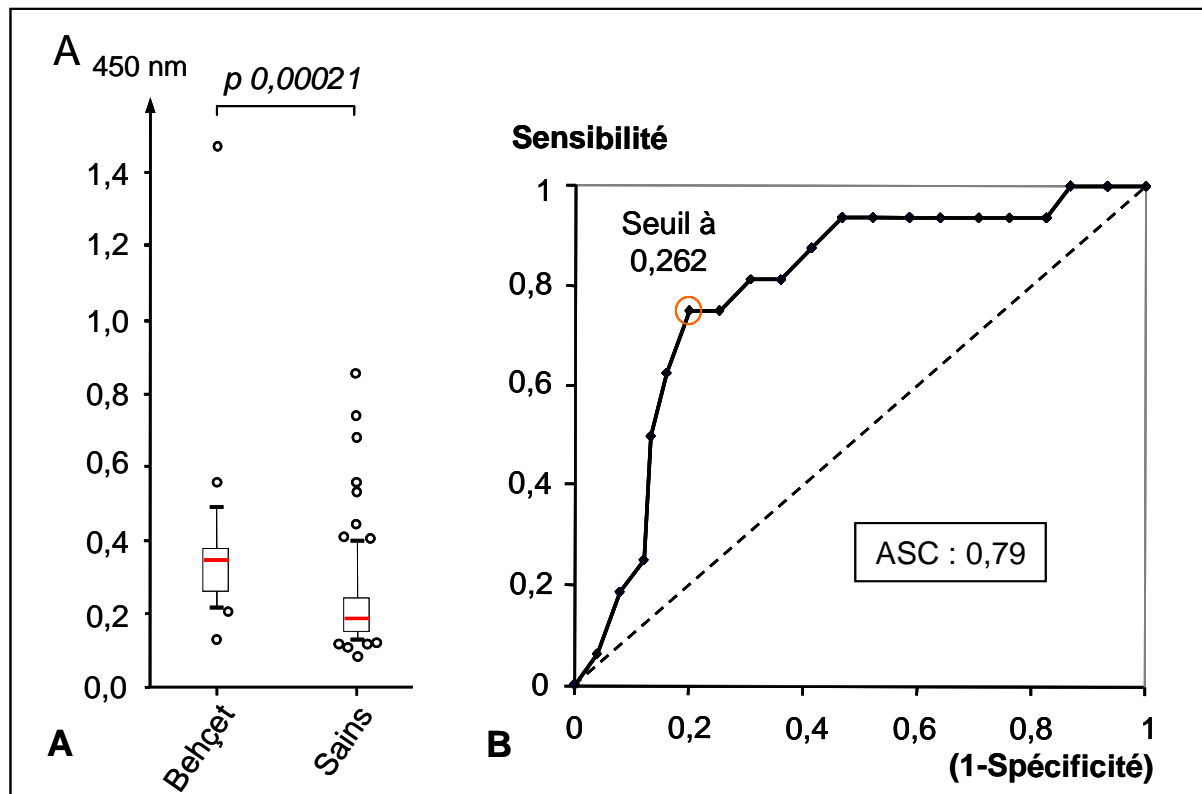


Figure 3. Dosage ELISA des anticorps anti-VE-cadhérine

A. Dosage ELISA chez des patients Behçet (16) et des sujets sains (75). Tous les échantillons ont été testés en doublon et sur trois expériences différentes pour les plasmas Behçet. La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney. Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément.

B. Courbe ROC des anticorps anti-VE-cadhérine discriminant les patients Behçet et les sujets sains. Aire sous la courbe (ASC). Seuil 0,262 et index de Youden 0,55.

Tableau 4. Corrélation des anticorps anti-VE-cadhérine avec les autres paramètres biologiques étudiés

Paramètres comparés aux anticorps anti-VE-cadhérine	Rho de Spearman	p-value	
Anticorps anti-HSP70	0,667	0,013	
VE-cadherine circulante	0,476	0,073	
Élastase plasmatique	0,315	0,294	
Myéloperoxydase plasmatique	0,289	0,362	
Adénosine désaminase plasmatique	0,487	0,108	
Activité NADPH oxydase des PNN	Zymosan	-0,051	0,868
	PMA	-0,064	0,835
	PAF/fMLP	0,199	0,515
TNF α (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	LTA	0,098	0,750
	PGN	-0,001	0,999
	PolyU	0,007	0,982
	LPS	0,166	0,589
	Pam3	0,319	0,287
IL-6 (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	CPG	-0,115	0,709
	IL1 β	-0,530	0,062
	flagelline	-0,257	0,398
	Imiquimod	-0,239	0,431
	TNF α	-0,093	0,763

Les corrélations partielles de Spearman ont été contrôlées avec l'âge.

LTA : lipoteichoic acid, PGN : peptidoglycans, PolyU : ssPolyU/LyoVec, LPS : Lipopolysaccharide, Pam3 : Pam3CSK4, CpG : ODN M362, IL1 β : interleukine-1 β , imiquod-R837, TNF α : tumor necrosis factor α , PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate, PAF/fMLP : platelet-activating factor/f-Met-Leu-Ala

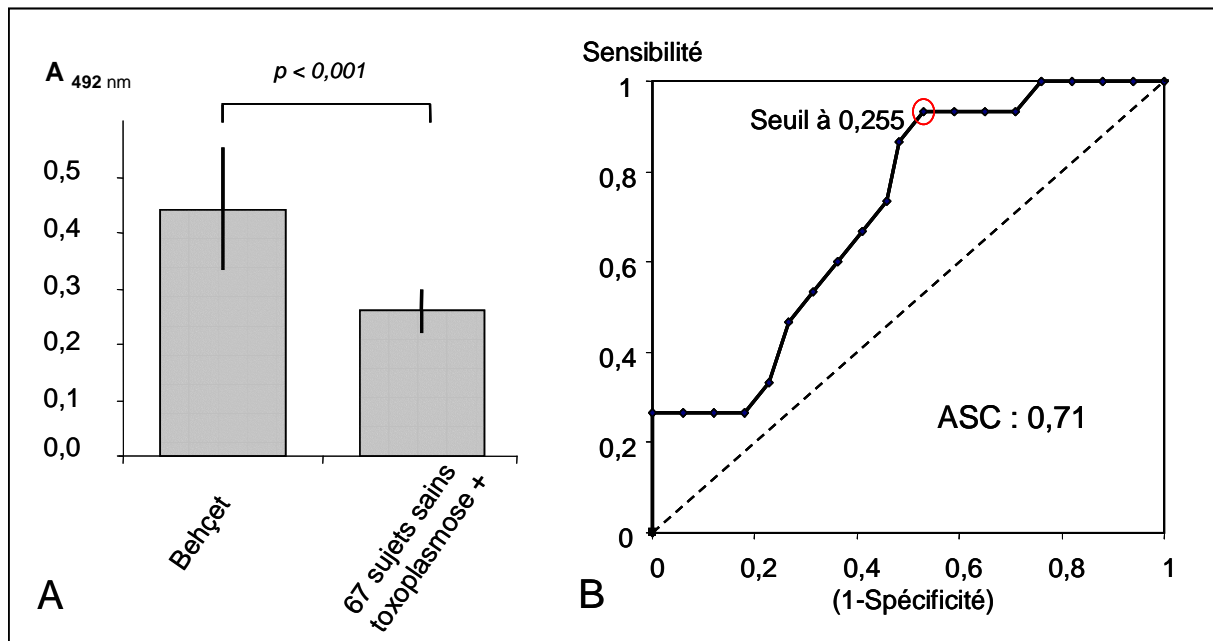


Figure 4. Dosage ELISA des anticorps anti-HSP70

A. Taux d'anticorps anti-HSP70 chez les patients Behçet (15) et 67 sujets sains toxoplasmose +. Les rectangles gris représentent la moyenne des taux d'anticorps anti-HSP70. Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance à 95 %. p selon le test de Student du fait de la normalité de la distribution (test de Shapiro-Wilk).

B. Courbe ROC des anticorps anti-HSP70 discriminant les patients Behçet et les sujets sains. Aire sous la courbe (ASC). Seuil 0,255 et index de Youden 0,40.

Tableau 5. Corrélation des anticorps anti-HSP70 avec les autres paramètres biologiques étudiés

Paramètres comparés aux anticorps anti-HSP70	Rho de Spearman	p-value	
VE-cadherine circulante	0,512	0,074	
Élastase plasmatique	0,110	0,722	
Myéloperoxydase plasmatique	0,007	0,983	
Adénosine désaminase plasmatique	0,810	0,001	
Activité NADPH oxydase des PNN	Zymosan	0,012	0,968
	PMA	0,144	0,638
	PAF/fMLP	0,139	0,650
TNF α (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	LTA	0,346	0,247
	PGN	0,250	0,410
	PolyU	0,374	0,208
	LPS	0,125	0,684
	Pam3	0,616	0,025
IL-6 (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	CPG	0,141	0,647
	IL1 β	-0,020	0,949
	flagelline	-0,050	0,870
	Imiquimod	0,026	0,932
	TNF α	0,216	0,479

Les corrélations partielles de Spearman ont été contrôlées avec l'âge.

LTA : lipoteichoic acid, PGN : peptidoglycans, PolyU : ssPolyU/LyoVec, LPS : Lipopolysaccharide, Pam3 : Pam3CSK4, CpG : ODN M362, IL1 β : interleukine-1 β , imiquod-R837, TNF α : tumor necrosis factor α , PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate, PAF/fMLP : platelet-activating factor/f-Met-Leu-Ala

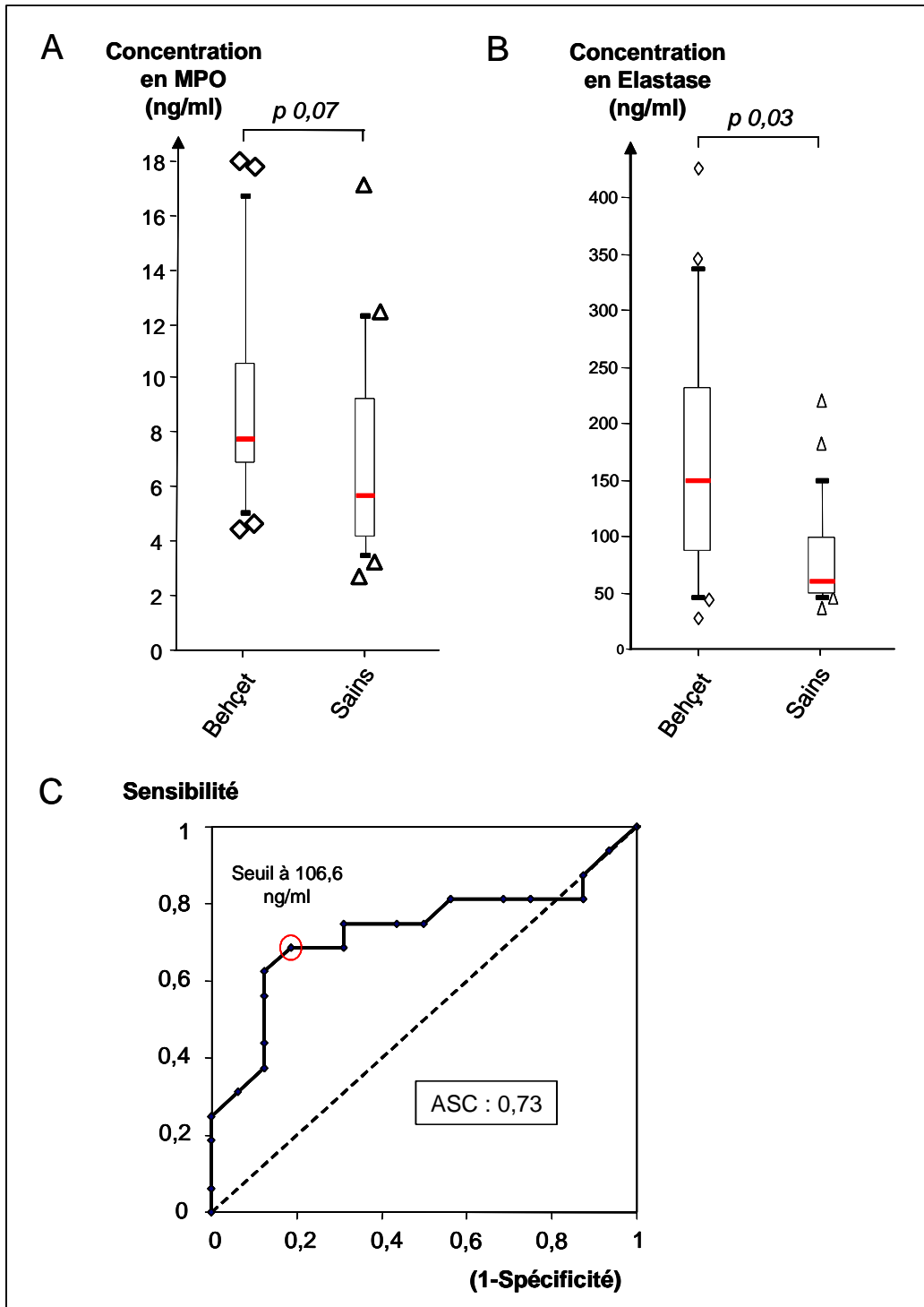


Figure 5. Concentrations plasmatiques en myéloperoxydase et en élastase

A. Concentration plasmatique en myéloperoxydase chez les patients Behçet (13) et des sujets sains (14).

B. Activité enzymatique en élastase chez les patients Behçet (17) et des sujets sains (16). Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément. La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney.

C. Courbe ROC de l'activité élastase discriminant les patients Behçet des sujets sains. Seuil 106,6 ng/ml, index de Youden à 0,5. Aire sous la courbe (ASC).

Tableau 6. Corrélation de l'élastase plasmatique avec les autres paramètres biologiques étudiés

Paramètres comparés à l'élastase plasmatique		Rho de Spearman	p-value
VE-cadherine circulante		-0,092	0,764
Myéloperoxydase plasmatique		0,186	0,562
Adénosine désaminase plasmatique		0,551	0,064
Activité NADPH oxydase des PNN	Zymosan	0,303	0,272
	PMA	0,035	0,901
	PAF/fMLP	0,348	0,203
TNF α (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	LTA	-0,217	0,438
	PGN	-0,298	0,280
	PolyU	0,265	0,340
	LPS	-0,359	0,189
	Pam3	-0,074	0,794
IL-6 (surnageant de culture de CMSP non-CD19)	CPG	0,073	0,797
	IL1 β	-0,163	0,560
	flagelline	-0,100	0,723
	Imiquimod	0,061	0,830
	TNF α	0,173	0,537

Les corrélations partielles de Spearman ont été contrôlées avec l'âge.

LTA : lipoteichoic acid, PGN : peptidoglycans, PolyU : ssPolyU/LyoVec, LPS : Lipopolysaccharide, Pam3 : Pam3CSK4, CpG : ODN M362, IL1 β : interleukine-1 β , imiquod-R837, TNF α : tumor necrosis factor α , PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate, PAF/fMLP : platelet-activating factor/f-Met-Leu-Ala

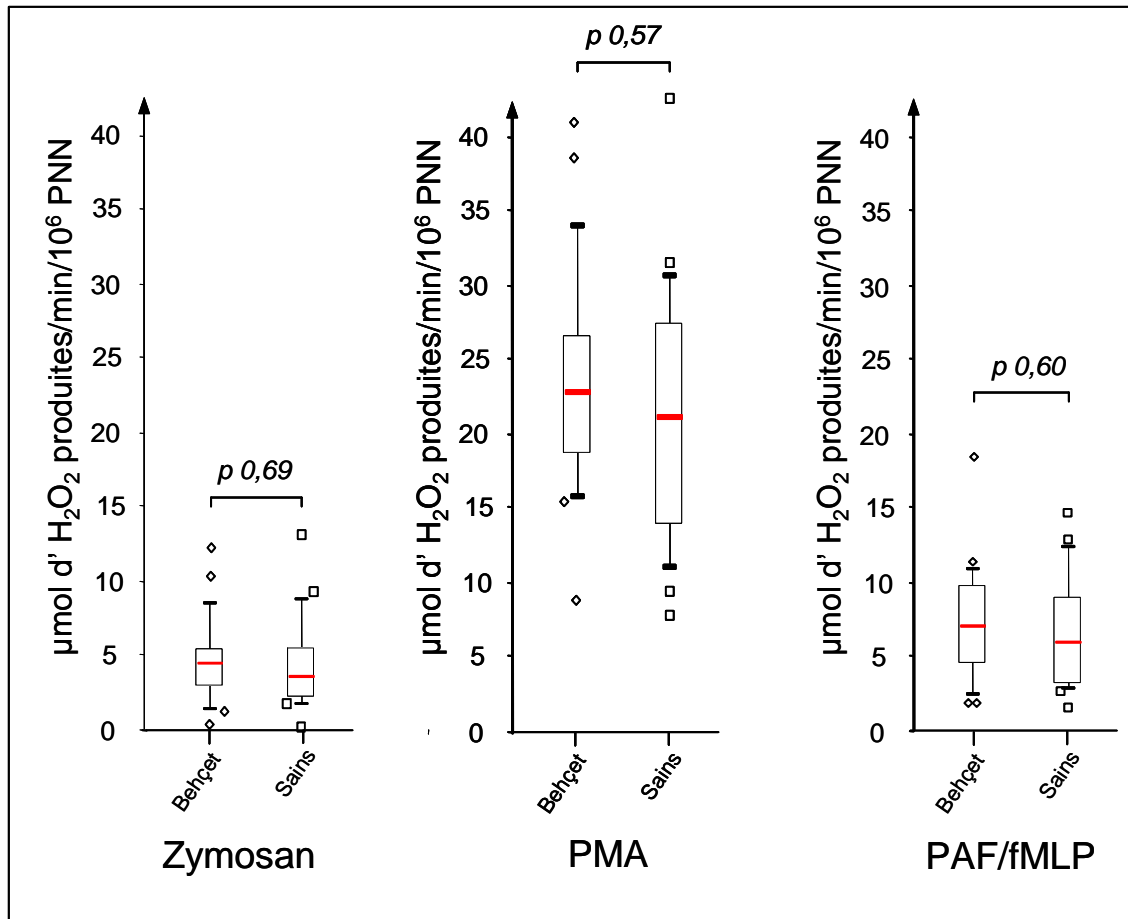


Figure 6. Activité de la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles après stimulation in vitro chez patients Behçet (16) et des sujets sains (16)

Zymosan, PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate, PAF/fMLP : platelet-activating factor/f-Met-Leu-Ala. La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney. Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément.

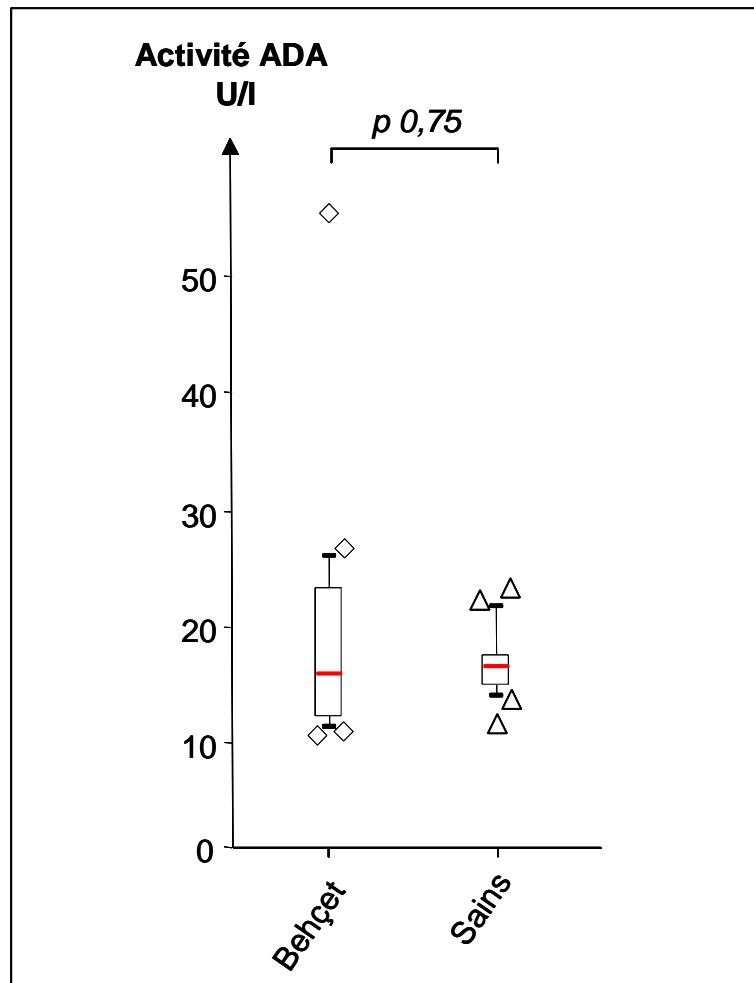


Figure 7. Activité plasmatique de l'Adénosine Désaminase (ADA) chez les patients Behçet (13) et chez des sujets sains (14)

La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney. Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément.

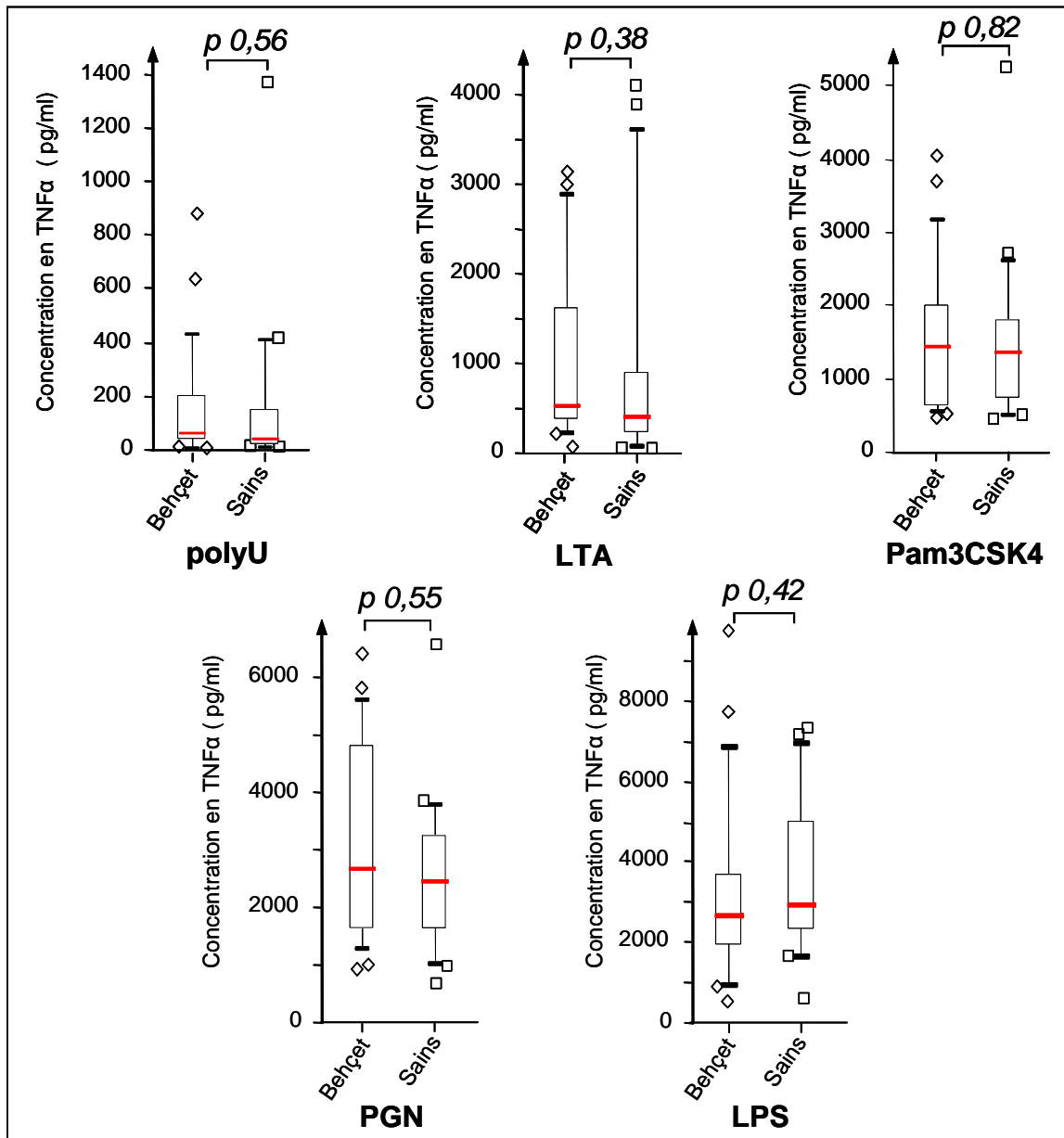


Figure 8. Concentrations en TNF α (pg/ml) des surnageants de culture de cellules mononuclées du sang périphérique non-CD19 après incubation avec différents stimulants (PolyU, LTA, Pam3, PGN, LPS) chez les patients Behçet (16) et des sujets sains (12)

PolyU : PolyUracile mono-brin complexé à un lipide cationique LyoVec™, LTA : Lipoteichoic acid, Pam3CSK4 : lipoprotéine synthétique triacétylée, PGN : Peptidoglycans, LPS : lipopolysaccharide

La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney. Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément.

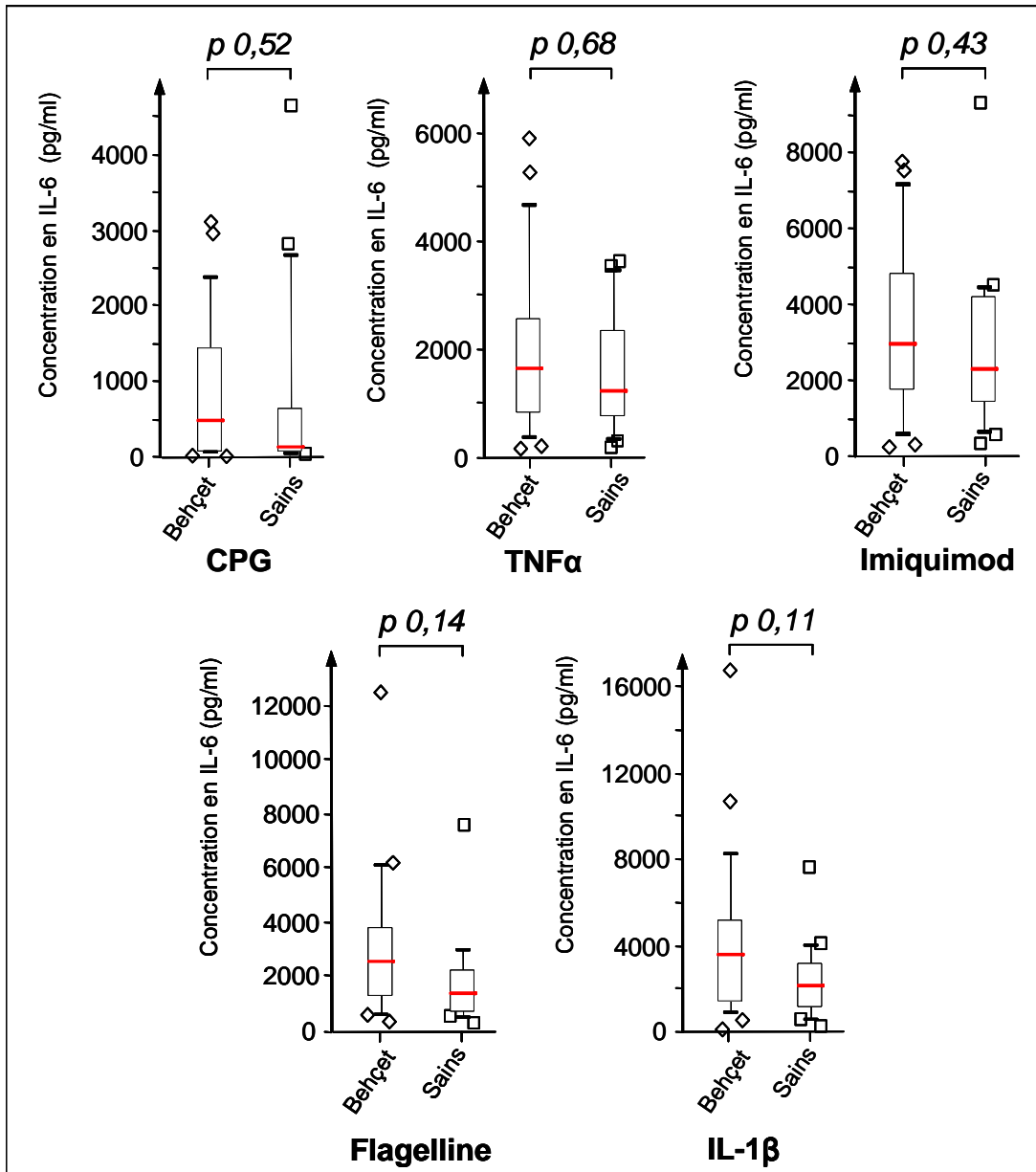


Figure 9. Concentrations en IL-6 (pg/ml) des surnageants de culture de cellules mononuclées du sang périphérique non-CD19 après incubation avec différents stimulants chez les patients Behçet (16) et des sujets sains (12)

La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney. Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément.

ARTICLE 2 : CARACTERISATION D'ANTICORPS ANTI-VE-CADHERINE CHEZ UN PATIENT ATTEINT DE NEURO-BEHÇET

INTRODUCTION

La maladie de Behçet est une vascularite touchant les artères ou les veines de toutes tailles. L'altération du phénotype des cellules endothéliales joue un rôle clef dans la pathogenèse. Elle participe à l'augmentation de la diapédèse leucocytaire, à l'altération de la vasodilatation artérielle NO-dépendante et à l'hypercoagulabilité. (18),(19)

La VE-cadhérine est la protéine majeure des jonctions adhérentes de l'endothélium vasculaire. Grâce à ses interactions homophiliques, elle concourt au maintien de l'intégrité de l'endothélium et prévient l'exposition de la matrice sous endothéliale (événement hautement thrombogène). Elle intervient dans la régulation de la perméabilité capillaire et de l'extravasation des PNN.(20),(21),(22),(24) Parmi les anticorps monoclonaux développés pour étudier la VE-cadhérine, certains possèdent des propriétés biologiques : majoration de la perméabilité endothéliale, inhibition de l'effet anti-apoptotique du VEGF, inhibition de la reformation des jonctions adhérentes.(27) Chez la souris adulte, les anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine augmentent la vitesse de recrutement des polynucléaires neutrophiles.(21)

Des anticorps anti-cellules endothéliales (AACE) ont été décrits dans la maladie de Behçet (prévalence entre 18,1% et 50 %).(30),(31),(32) Les AACE peuvent augmenter l'adhésion leucocytaire aux cellules endothéliales activées et activer les cellules endothéliales.(35),(36) Les mécanismes et les cibles antigéniques restent mal connus.

La VE-cadhérine humaine comme cible antigénique des AACE n'a jamais été investiguée. Les anticorps anti-VE-cadhérine n'ont jamais été recherchés chez

l'homme. Par analogie aux anticorps monoclonaux synthétique anti-VE-cadhérine, les anticorps humains polyclonaux anti-VE-cadhérine pourraient jouer un rôle dans les pathologies vasculaires notamment les vascularites.

Chez une patiente présentant une maladie de Behçet avec atteinte médullaire, nous avons recherché les anticorps anti-VE-cadhérine (EC1-4) et étudié leur spécificité. Nous avons ensuite précisé leur idiotype et la capacité de ces anticorps à reconnaître la VE-cadhérine native sur une culture cellulaire d'HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells).

MATERIELS ET METHODES

1. Sujets étudiés

Dans notre série de patients atteints de maladie de Behçet avec atteinte oculaire (décrite précédemment), nous rapportons le cas d'une patiente atteinte de la maladie de Behçet, à partir de laquelle nous avons caractérisé biologiquement des anticorps anti-VE-cadhérine. Nous avons choisi cette patiente car elle présente 2 caractéristiques spécifiques : elle a une atteinte neurologique centrale et son taux d'anticorps anti-VE-cadhérine est 6,5 fois plus élevé que la moyenne des sujets sains.

2. Dosage des anticorps anti-VE-cadhérine par ELISA

Cinq microgrammes du fragment recombinant VE-EC1-4 ont été coatés dans 96 puits de plaque ELISA et incubés sur la nuit à 4 °C. Les puits ont été lavés et saturés pendant 2 h à 37°C avec BSA 1,5%. Deux cents microlitres de plasma de patients dilués au 1/100 dans PBS-Tween-BSA ont été déposés pendant 2 h à 37 °C. Après lavages, 100 µl d'une solution d'Ig chèvre anti-IgG humaines biotinylées (Southernbiotech) au 1/5000, ont incubé 1 h à température ambiante. La streptavidine couplée à la phosphatase alcaline a été ajoutée puis l'activité enzymatique a été mesurée par ajout du substrat pNPP. Les densités optiques ont été lues à 10 min à 405 nm.

3. Purification des IgG par chromatographie d'affinité

Le sérum du patient Behçet (4 ml) a été dilué dans 36 ml de tampon phosphate NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 0,2M, pH 7,1 et a été incubé en présence de protéine G-Sépharose (2 ml) (préalablement équilibrée avec 12 ml de tampon phosphate NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 0,2M, pH 7,1) dans un tube Falcon pendant une nuit à 4 °C avec une agitation douce. A la fin de l'incubation, le gel a été versé dans une colonne Biorad (1 x 10 cm) et on a gardé la fraction de filtration. Après le rinçage de la colonne avec 60 ml du même tampon, l'ajout de 10 ml de tampon glycine 100 mM, pH 8 a permis l'élution. Des fractions de 1 ml ont été collectées dans des tubes Eppendorf contenant 100 µl Tris 1M, pH 8. Les densités optiques à 280 nm ont été mesurées à partir d'un aliquot de chaque fraction de 1 ml collectée pour déterminer

la concentration en IgG ($DO = \epsilon \times C \times l$ ($DO =$ densité optique ; $\epsilon =$ coefficient d'absorption moléculaire ($\epsilon_{Ig} = 1,45 \text{ L/g/cm}$) ; $C =$ concentration de la solution (g/L) ; $l =$ longueur de la cuve (cm)). Les fractions finales ont été dialysées avec du PBS pendant une nuit à 4 °C avant utilisation. Le même protocole a été utilisé pour purifier des IgG à partir d'un donneur sain.

4. Immunodétection par Western-Blot des fragments recombinants EC1-4, EC1, EC1-2, EC1-3 et EC3-4

Le fragment recombinant a été séparé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 12% ou 15%, puis transféré sur une membrane de nitrocellulose (110V, 1h). Après saturation dans du PBS-Tween-lait, la membrane a été incubée avec les fractions IgG humaines purifiées de patients (250 µg/mL ou 50 µg/ml) en milieu saturant (PBS-tween-lait). Les IgG liées ont été révélées par l'ajout d'anticorps anti-IgG humaine (A2290 sigma) couplés à la peroxydase et utilisation du kit ECL (electrochimiluminescence).

5. Spécificité du dosage anticorps anti-VE-cadhérine

a/ Dilution: des dilutions des purifications d'IgG-Behçet et d'IgG-donneur sain ont été réalisées. On a déposé dans les puits 200 µl de purification de sérum diluée au 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 dans du PBS-Tween 0,05%

b/ Compétition par le fragment recombinant EC 1-4 : 1/100 et 1/400. Des concentrations croissantes de EC 1-4 (17,8 µg/ml, 8,89 µg/ml, 4,495 µg/mL, 2,25 µg/mL, 1,125 µg/mL) ont été ajoutées aux IgG patient Behçet diluées au 1/100 ou au 1/400 dans du PBS-Tween-BSA 1,5%.

6. Culture cellulaire

Les cellules HUVEC ont été isolées selon la méthode précédemment décrite.(37)
Seules les cellules HUVEC issues d'un premier à un troisième passage ont été utilisées.

7. Immunofluorescence

Pour être étudiées en microscopie à immunofluorescence, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre. Les lamelles (diamètre 13 ram.) ont été coatées, la nuit à 4°C, par 7 mg/ml de fibronectine puis lavées par un milieu de culture Medium 199 sans sérum. Dans 0,5 ml de milieu de culture, $3,5 \times 10^4$ cellules/lamelles ont été déposées. Les HUVEC ont été cultivées jusqu'à confluence pendant 72 h. Les monocouches de cellules ont incubées sur la nuit à 37°C, avec les IgG purifiées à partir du sérum d'un patient Behçet (2,5 mg/ml) et à partir d'un donneur sain. Les cellules ont été fixées par 3,5% (p/v) paraformaldéhyde, PBS pendant 20 minutes à température ambiante puis lavées 3 fois par du PBS. La perméabilisation a été réalisée avec du méthanol à - 20 °C pendant 10 minutes suivi d'une incubation de 10 minutes dans du Triton X-100 (0,5% dans du PBS). Les cellules ont été rincées 3 fois par du PBS. Les sites de liaisons non spécifiques ont été saturés avec du PBS/1 mg/ml de BSA pendant 30 minutes. L'incubation avec l'anticorps primaire (anticorps polyclonal de lapin anti-VE-cadhérine décrit précédemment (38)) a été réalisée dans du PBS à température ambiante, 1 h. Après 3 lavages avec du PBS+, les cellules ont incubées 1 h avec un anticorps conjugué à la cyanine 3 anti-IgG de lapin (1 : 1000). Après 3 lavages par du PBS, les noyaux ont été marqués par 1 μ g/ml de Hoechst pendant 5 min puis lavés 3 fois avec du PBS. Les lamelles ont été rincées puis séchées à l'éthanol et montées sur des lames Mowiol 4-88 (Hoechst, Frankfurt, Germany). Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope Zeiss Axioskop 2 (équipé d'une caméra AxioCam color CCD (Zeiss)). Les images ont été numérisées par le logiciel AxioVision software (Zeiss).

RESULTATS

CAS CLINIQUE

Nous rapportons le cas d'une patiente d'origine algérienne âgée de 50 ans lors du début des symptômes en 2004. Elle a présenté une uvéite antérieure de l'œil droit, traitée par corticothérapie locale puis une rechute sous forme d'uvéite postérieure. Elle a présenté une aphtose buccale récidivante, des lésions cutanées à type de pseudofolliculite. Elle a présenté une arthrite du genou droit associée à des polyarthralgies (sacro-iliaques, poignets, mains). Elle a bénéficié en 2004 d'un traitement par corticothérapie en collyre puis par voie systémique associée à de la colchicine et du méthotrexate. La patiente a arrêté d'elle-même ses traitements.

En 2006, on a noté l'apparition de signes neurologiques frustrés à type de trouble de la marche et de troubles sensitifs. L'examen clinique a constaté une origine centrale (hyperréflexie des membres inférieurs, diminution de la sensibilité proprioceptive et extra-lemnisciale). Les signes neurologiques se sont progressivement aggravés sur 18 mois, aboutissant à une réduction de l'autonomie.

L'IRM a montré au niveau cérébral des hypersignaux T2 de la substance blanche supratentorielle, aspécifique. L'IRM médullaire a mis en évidence des hyper signaux T2 du cordon médullaire dorsal au niveau de Th7, Th8, Th9 pouvant s'intégrer dans la maladie de Behçet (Figure 10).

Le liquide céphalorachidien était acellulaire (moins de 5 éléments blancs par mm³), normoglycorachique, normoprotéinorachique, sans cellules malignes. La recherche d'ADN des virus Herpes Simplex et Varicelle-Zona a été négative. L'électrophorèse des protéines du LCR a montré un profil oligoclonal.

Les examens sérologiques étaient négatifs pour le virus HTLV1 et 2 (human T-cell lymphotropic virus 1 et 2), la syphilis, la maladie de Lyme, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le mycoplasme pneumoniae, le cytomegalovirus et le virus Epstein-Barr (EBV). Le bilan auto-immun a retrouvé : l'absence d'anticorps antinucléaire, d'anticorps anti-SSA ou d'anticorps anti-SSB. Les recherches d'anticorps anti-phospholipide et d'ANCA ont été négatives. L'enzyme de conversion de l'angiotensine a été retrouvée normale. La réaction pathergique a été positive. La recherche d'HLA B51 a été négative.

CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES ANTICORPS ANTI-VE-CADHERINE

1. Caractérisation des anticorps anti-VE-cadhérine en Western-Blot et ELISA

Comme décrit précédemment dans notre série de Behçet avec atteinte oculaire (Figure 11), le test ELISA a mis en évidence des anticorps anti-VE-cadhérine (EC1-4) chez les patients atteints de maladie de Behçet à des taux significativement plus élevés (test U de Mann-Whitney $p = 0,00021$) que ceux de la population saine.

Notre patiente décrite ci-dessus a présenté un taux d'anticorps anti-VE-cadhérine (EC1-4) très élevé à 1,47. Ses IgG totales ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne G-Sépharose. Nous avons réalisé de même pour un sujet sain qui présentait un taux d'anticorps anti-VE-cadhérine (EC1-4) faible à 0,29.

Des IgG anti-VE-cadhérine (EC1-4) ont été mises en évidence en Western-Blot dans les IgG purifiées à partir du sérum de notre patiente. Après purification par la même méthode, ces anticorps n'ont pas été détectés chez un témoin sain (Figure 12B). Des dilutions croissantes (100, 200, 400, 800) d'IgG purifiées à partir de notre patiente Behçet et d'un sujet sain ont été testées en ELISA. On a noté une liaison dose-dépendante des IgG à l'antigène EC1-4 coâté sur la plaque (Figure 12C). La pré-incubation des IgG purifiées avec des concentrations croissantes d'antigène EC1-4 avant l'ELISA, a montré une diminution d'immunocapture en faveur d'une spécificité des IgG humaines pour le fragment EC1-4 (Figure 12D).

2. Identification moléculaire des idiotypes des anticorps anti-VE-cadhérine isolés

Pour préciser les idiotypes des anticorps anti-VE-cadhérine, nous avons fait migrer en SDS-PAGE, différents fragments recombinants du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine (Figures 13 A, B). L'immunodétection a été effectuée en Western-Blot avec les IgG purifiées du patient Behçet (50 $\mu\text{g/ml}$). Les anticorps IgG purifiés du patient ont reconnu les fragments recombinants EC1-4 et EC3-4 et non les fragments EC1, EC1-2, EC1-3.

Nous avons réalisé un test ELISA dans lequel 10 µg de chaque fragment recombinant ont été coatés dans différents puits. Les puits ont été incubés avec des dilutions croissantes de plasma Behçet. Les densités optiques obtenues avec EC1-4 et EC3-4 ont été supérieures (4,7 fois) à celles obtenues avec EC1, EC1-2, EC1-3 (Figures 13 C, D).

Les idiotypes des anticorps anti-VE-cadhérine sont dirigés contre le domaine extracellulaire 3-4.

3. Effet des IgG purifiées à partir d'un patient Behçet sur une culture cellulaire d'HUVEC

La culture d'HUVEC incubée avec les IgG purifiées à partir d'un sujet sain a montré un marquage homogène de la VE-cadhérine par un anticorps polyclonal de lapin anti-VE-cadhérine dessinant les jonctions adhérentes.

La culture d'HUVEC incubée avec les IgG purifiées à partir du patient Behçet a montré une diminution de l'immunomarquage de la VE-cadhérine par l'anticorps polyclonal de lapin anti-VE-cadhérine. La distribution du marquage est devenue hétérogène (Figure 14).

DISCUSSION

Chez un patient atteint de neuro-behçet à forme médullaire, nous avons montré pour la première fois, l'existence d'anticorps anti-VE-cadhérine ciblant la partie EC3-4 du domaine extracellulaire de la protéine. Nous avons mis en évidence la diminution et la désorganisation du marquage de la VE-cadhérine sur culture d'HUVEC, provoquées par les IgG purifiées à partir du patient.

La diminution de l'immunomarquage de la VE-cadhérine par l'anticorps polyclonal de lapin anti-VE-cadhérine après incubation avec les IgG purifiées Behçet, peut s'expliquer par deux hypothèses.

- Les anticorps anti-VE-cadhérine EC1-4/3-4 identifiés en ELISA et en Western-Blot présents dans les IgG purifiées du patient Behçet désorganisent les jonctions adhérentes. Cet effet a été décrit avec des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine. Les anticorps monoclonaux BV9 (EC 3-EC4) et BV6 (EC3) entraînent la redistribution de la VE-cadhérine à partir des jonctions intercellulaires.(27) La disparition de la VE-cadhérine des jonctions est liée à la diffusion de la molécule sur la membrane cellulaire et non à son internalisation.(39) Les mécanismes par lesquels les anticorps anti-VE-cadhérine synthétiques modifient les interactions homophiliques de la VE-cadhérine, restent hypothétiques. Corada et al. ont formulé 3 hypothèses.(27) Premièrement, la fixation d'anticorps anti-VE-cadhérine entraînerait un changement conformationnel modifiant les capacités adhésives. Deuxièmement, la fixation d'anticorps provoquerait un encombrement stérique empêchant la formation des liaisons. Troisièmement, le blocage par les anticorps anti-VE-cadhérine d'un des multiples sites de contact adhésif pourrait faciliter la rupture des jonctions adhérentes.
- Les IgG purifiées à partir du patient Behçet contiennent d'autres anticorps ciblant d'autres antigènes endothéliaux entraînant une désorganisation des jonctions adhérentes.

Le rôle des anticorps anti-VE-cadhérine dans la maladie de Behçet n'est pas connu. Nos résultats appuient l'hypothèse d'un rôle de ces anticorps dans la désorganisation des jonctions adhérentes de l'endothélium. Cette désorganisation médiée par un anticorps anti-VE-cadhérine pourrait faciliter la diapédèse leucocytaire

par la voie paracellulaire.(21) Ce phénomène pourrait participer à l'augmentation du recrutement des leucocytes dans les lésions de la maladie de Behçet.

L'apoptose est augmentée dans l'endothélium vasculaire des lésions de la maladie de Behçet.(40) Sur des cellules endothéliales (HUVEC), les anticorps monoclonaux anti-VE-cadhérine Cad 5 (EC1), BV9 (EC3-EC4) et BV6 (EC3) s'opposent à l'effet anti-apoptotique du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).(27) L'augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales a été décrite avec les anticorps anti-cellules endothéliales in vitro et in vivo.(36) Les anticorps anti-VE-cadhérine pourraient favoriser l'apoptose des cellules endothéliales dans la maladie de Behçet.

Il est intéressant de relever que dans notre série de patient Behçet (décrite précédemment), la patiente souffrant d'un neuro-Behçet, présente le plus fort taux d'anticorps anti-VE-cadhérine. Les anticorps anti-cellules endothéliales cérébrales sont augmentés chez les patients présentant un neuro-Behçet.(41) Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Souza et al. qui rapportent dans leur série de patient Behçet une forte association entre les anticorps anti-cellules endothéliales et une atteinte du système nerveux central.(42) Nous nous interrogeons sur la sensibilité du système nerveux central à l'action des anticorps anti-VE-cadhérine chez les patients Behçet. En raison de la rareté des atteintes neurologiques dans la maladie de Behçet, notre cohorte ne permet pas de conclure sur ce lien éventuel. Une étude incluant des effectifs plus important de neuro-Behçet pourrait permettre de répondre à cette question.

Nous pensons que ces travaux apportent des arguments conséquents en faveur de la présence d'anticorps anti-VE-cadhérine dans la maladie de Behçet. Etant donné les différentes activités biologiques décrites pour les anticorps anti-VE-cadhérine monoclonaux, nous pensons que les anticorps anti-VE-cadhérine polyclonaux in vivo pourraient jouer un rôle physiopathologique dans la maladie de Behçet. Ils pourraient participer à l'augmentation du recrutement des polynucléaires neutrophiles sur site et favoriser la rupture de la barrière hémato-encéphalique.

FIGURES ET TABLEAUX (suite)

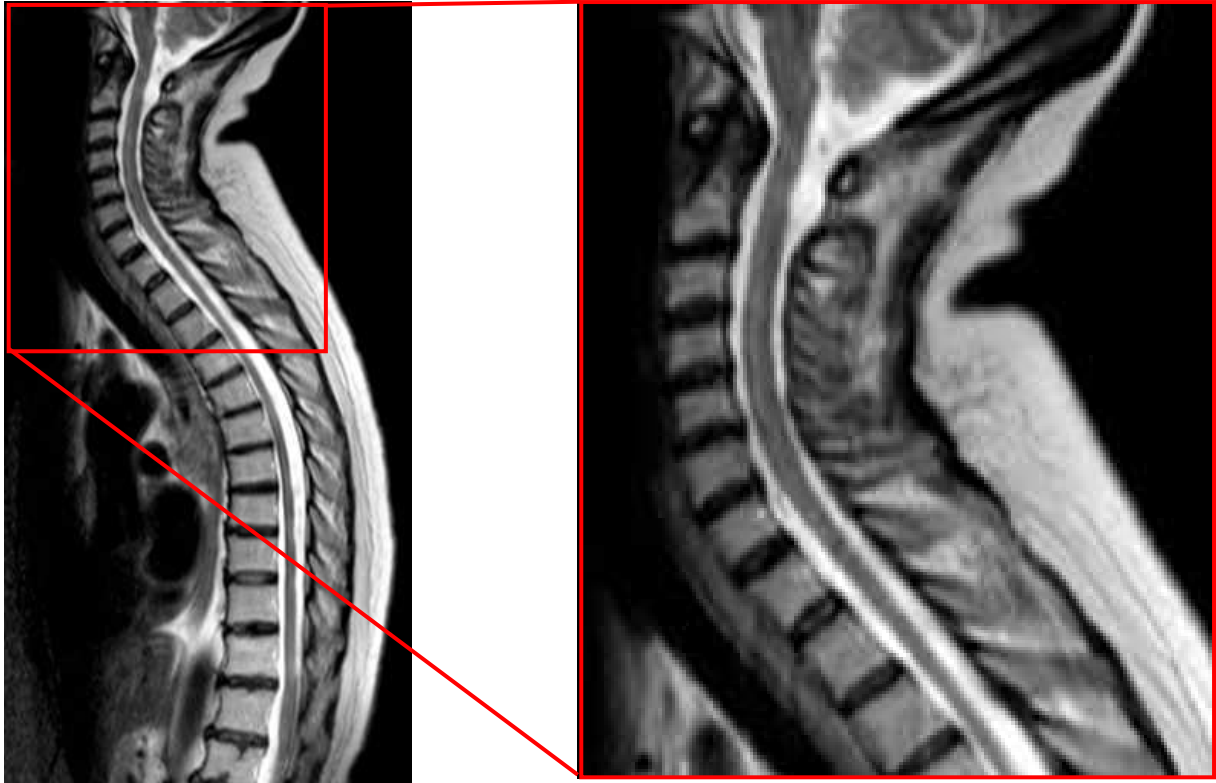


Figure 10. IRM médullaire du patient Behçet en séquence T2, coupe sagittale

Hypersignaux T2 intra-médullaires en regard de C2 et plutôt antérieurs en regard de C3-C4-C5

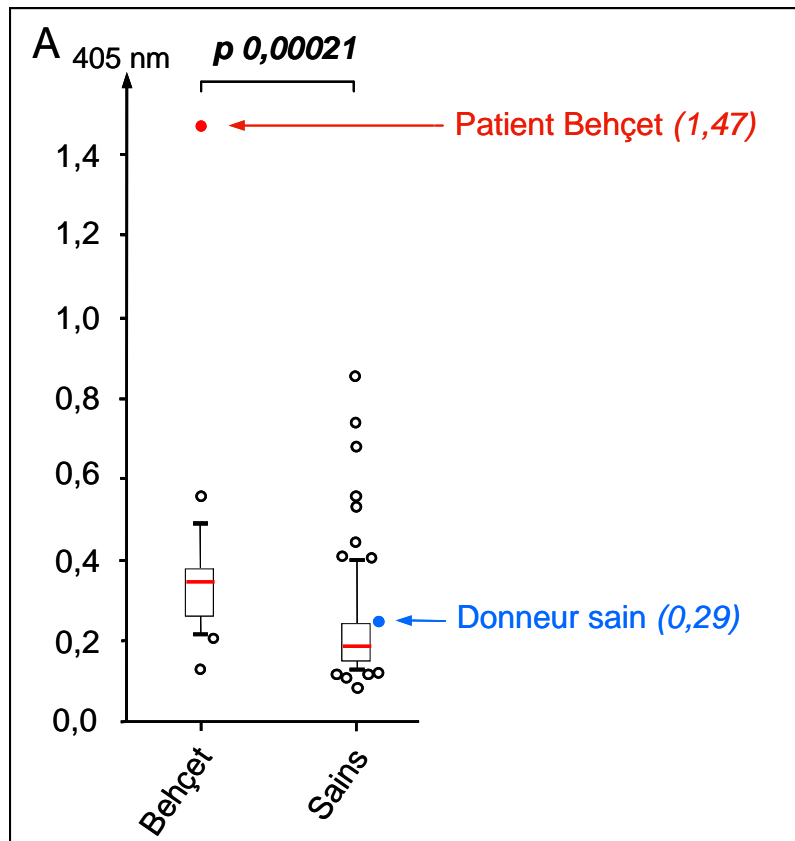


Figure 11. Anticorps plasmatique anti-VE-cadhérine par ELISA

ELISA chez des patients Behçet (16) et des témoins sains (75). Tous les échantillons ont été testés en doublon, et sur trois expériences différentes pour les plasmas Behçet. La valeur p est calculée par un test de Mann-Whitney. Les boîtes à moustache montrent la médiane (trait horizontal rouge), les 1^{er} et 3^e quartiles (rectangle noir) et les 10^e et 90^e percentiles (barres verticales). Les points au dessus ou au dessous sont représentés séparément. Le point bleu correspond au sérum du donneur sain utilisé

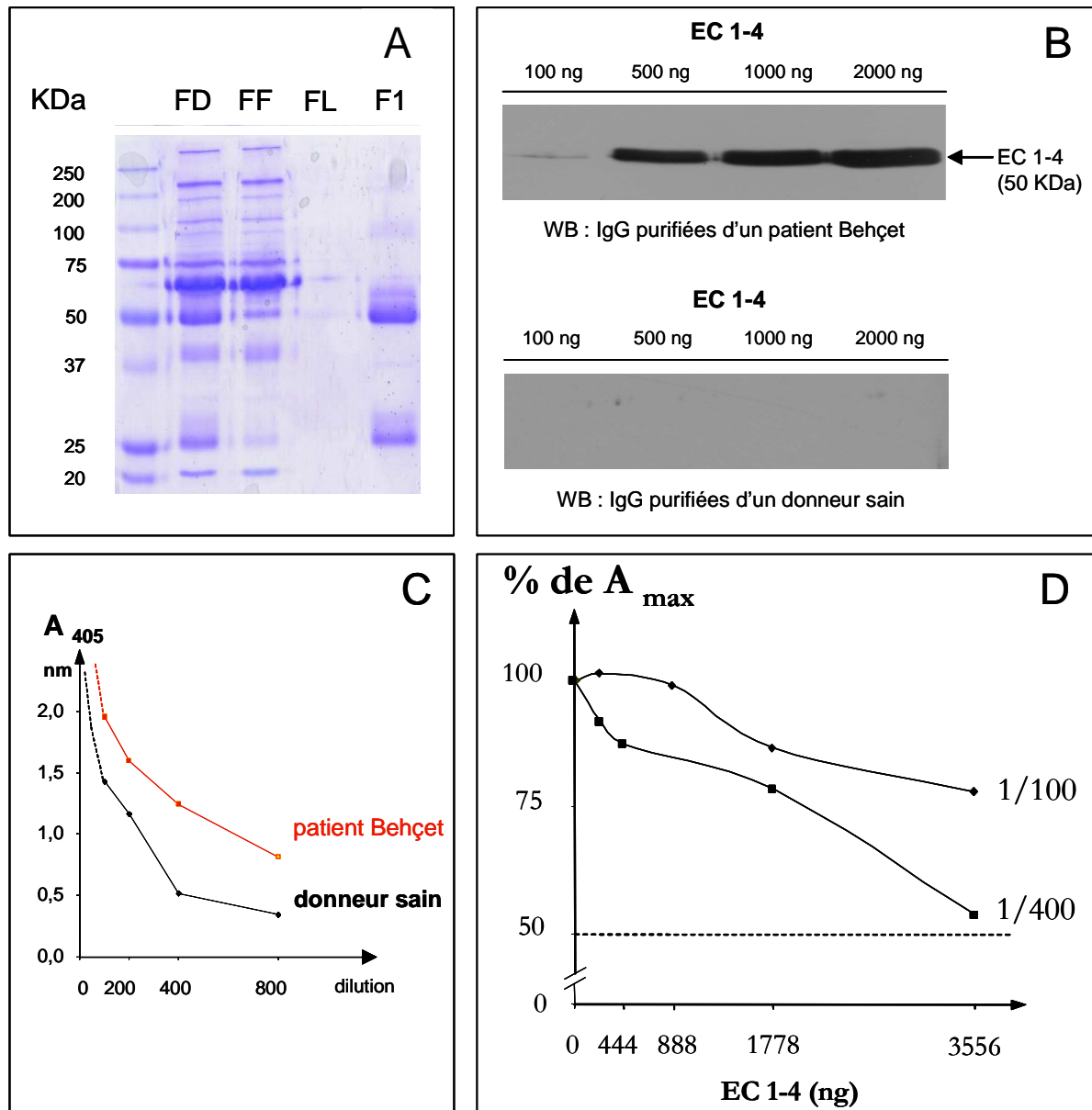


Figure 12. Caractérisation d'anticorps anti-VE-cadhérine (EC1-4) chez un patient Behçet

A. Analyse en bleue de Coomassie de la purification d'immunoglobuline chez un patient Behçet par protéine G-Sépharose. (FD : fraction de dépôt, FF : fraction de filtration, FL : fraction de lavage, F1 : fraction d'élution)

B. Immunodétection du fragment recombinant EC1-4 par méthode Western-blot. Anticorps primaire : IgG totale purifié d'un patient Behçet à 250 µl/ml. Incubation anticorps secondaire : anti-IgG humaine HRP A2290 1/10000.

C. Dilution des IgG purifiées ELISA sur EC1-4 coaté.

D. Compétition : Deux dilutions d'IgG-Behçet 1/100 et 1/400 ont été pré-incubées avec des quantités croissantes de fragment recombinant EC 1-4. En ordonnées est représentée l'absorbance en pourcentage de l'absorbance mesurée en l'absence de EC 1-4.

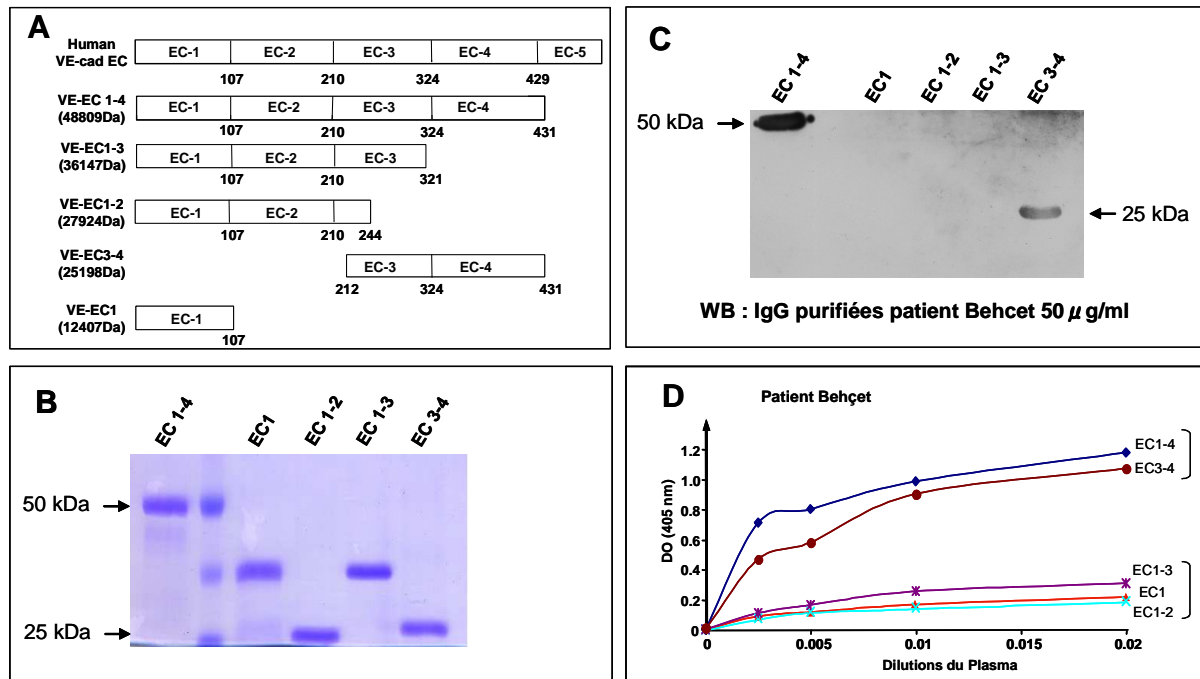


Figure 13. Identification moléculaire des idiotypes des anticorps anti-VE-cadhérine isolés à partir d'un patient Behçet

A : Représentation schématique de la VE-cadhérine humaine & des fragments recombinants EC1-4, EC1, EC1-2, EC1-3, EC3-4. Les nombres correspondent aux acides aminés de VE-cadhérine présents dans chaque fragment.

B : Deux microgrammes de chaque fragment purifié ont été analysés en SDS-PAGE puis coloré au Bleu de Coomassie. Les témoins de poids moléculaire ont migré en 2^e colonne.

C : Deux microgrammes de chaque fragment purifié ont été analysés en SDS-PAGE puis en immunodétection par Western-Blot (WB) en utilisant comme anticorps primaire les IgG purifiées à partir de notre patiente Behçet. Les flèches indiquent les poids moléculaires de EC1-4 et EC3-4.

D : ELISA. Chaque fragment recombinant a été coâté sur une plaque 96 puits et incubé avec des dilutions croissantes de plasma du patient Behçet. Cette expérience a représenté 3 fois 10 µg de chaque fragment. Aux dilutions 0,01 et 0,02, les densités optiques (DO) sont 4,7 fois supérieures pour les anticorps anti-EC1-4/EC3-4 que pour les anticorps anti-EC1/EC1-3/EC1-2.

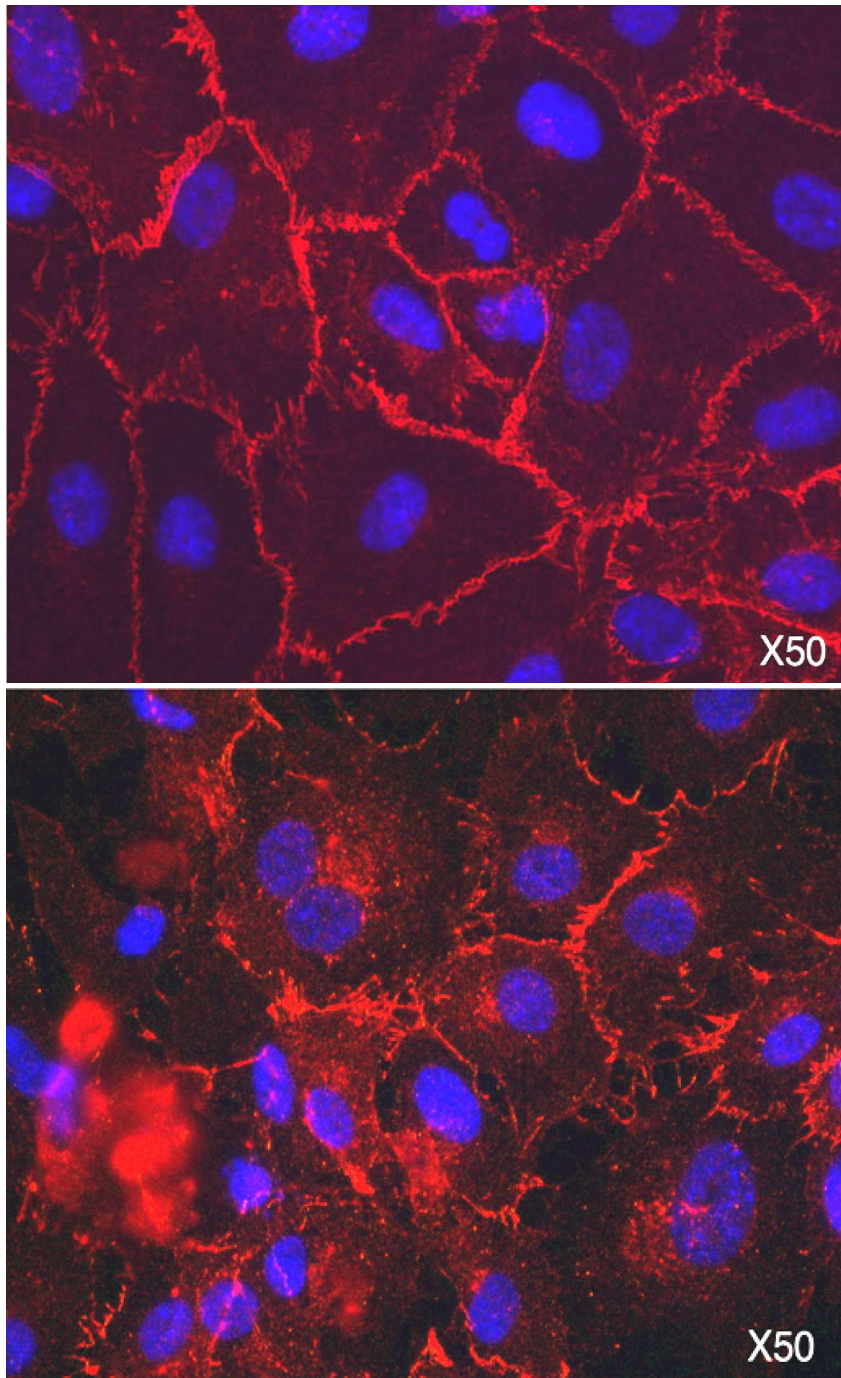


Figure 14. Analyse en microscopie de VE-cadhérine sur une monocouche de cellule endothéliale (HUVEC), après incubation avec des IgG purifiées à partir d'un patient Behçet (2,5 mg/ml) et à partir d'un donneur sain

En haut : donneur sain, en bas : patient Behçet

Les HUVEC ont été cultivées jusqu'à confluence pendant 72 h. Les monocouches de cellules ont été incubées sur la nuit à 37°C, avec les IgG purifiées à partir du patient Behçet (2,5 mg/ml) ou à partir du donneur sain. Les cellules ont alors été incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-VE-cadhérine puis un anticorps conjugué à la cyanine 3 anti-IgG de lapin (rouge). Les noyaux cellulaires sont marqués par une coloration Hoechst (bleu).

THESE SOUTENUE PAR : BAUDET Antoine

TITRE : Maladie de Behçet : Recherche de marqueurs biologiques et caractérisation d'anticorps anti-VE-cadhérine.

CONCLUSION

Introduction : La maladie de Behçet est une maladie inflammatoire chronique multisystémique. Les mécanismes physiopathologiques impliquent une hyperactivation des polynucléaires neutrophiles (PNN), une activation des cellules endothéliales et la participation de l'immunité acquise humorale et cellulaire.

Objectif : Identifier des marqueurs biologiques pour le diagnostic et le suivi de la maladie de Behçet.

Méthodes : Tous les patients porteurs d'une maladie de Behçet avec atteinte oculaire ont été inclus entre 01.2008 et 02.2009 au CHU de Grenoble. Les données cliniques et des prélèvements sanguins ont été recueillis. Les paramètres biologiques explorés ont été : VE-cadhérine circulante, anticorps anti-VE-cadhérine, anticorps anti-HSP70, concentrations plasmatiques en élastase, myéloperoxydase, adénosine désaminase, activité de la NADPH oxydase des PNN et production de TNF α et d'IL-6 par les cellules mononuclées du sang périphérique non-CD19 après stimulation.

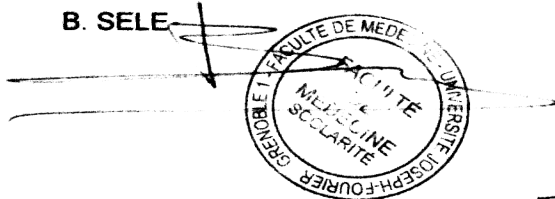
Résultats : Les anticorps anti-VE-cadhérine, les anticorps anti-HSP70 et la concentration en élastase plasmatique sont augmentés dans la maladie de Behçet par rapport aux sujets sains (Respectivement $p = 0,00021$, $p < 0,001$, $p = 0,03$). Aucun de ces marqueurs n'a été corrélé à l'activité de la maladie globale ou oculaire. A partir du plasma d'un patient porteur d'un neuro-Behçet et présentant des anticorps anti-VE-cadhérine très élevés, nous avons montré que ces anticorps ciblent la partie 3-4 du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine.

Conclusion : Nous avons décrit pour la première fois des anticorps anti-VE-cadhérine dans la maladie de Behçet.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 17/3/2011

LE DOYEN

B. SELE



LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR C. MASSOT

BIBLIOGRAPHIE

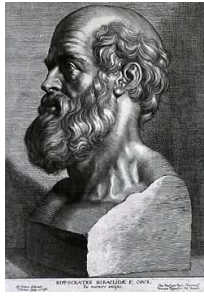
1. Kapsimali VD, Kanakis MA, Vaiopoulos GA, Kaklamanis PG. Etiopathogenesis of Behçet's disease with emphasis on the role of immunological aberrations. *Clin. Rheumatol.* 2010 Nov;29(11):1211-1216.
2. Birtas-Atesoglu E, Inanc N, Yavuz S, Ergun T, Direskeneli H. Serum levels of free heat shock protein 70 and anti-HSP70 are elevated in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2009 Mar 3;26(4 Suppl 50):S96-8.
3. de Smet MD, Ramadan A. Circulating antibodies to inducible heat shock protein 70 in patients with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2001 Juin;9(2):85-92.
4. Yasuoka H, Yamaguchi Y, Mizuki N, Nishida T, Kawakami Y, Kuwana M. Preferential activation of circulating CD8+ and gammadelta T cells in patients with active Behçet's disease and HLA-B51. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008 Aoû;26(4 Suppl 50):S59-63.
5. Sögüt S, Aydın E, Elyas H, Aksoy N, Ozyurt H, Totan Y, et al. The activities of serum adenosine deaminase and xanthine oxidase enzymes in Behçet's disease. *Clin. Chim. Acta.* 2002 Nov;325(1-2):133-138.
6. Köse K, Yazici C, Aşşioğlu O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behçet's disease. *Clin. Biochem.* 2001 Mar;34(2):125-129.
7. Erkiliç K, Evereklioglu C, Cekmen M, Ozkiris A, Duygulu F, Dogan H. Adenosine deaminase enzyme activity is increased and negatively correlates with catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in patients with Behçet's disease: original contributions/clinical and laboratory investigations. *Mediators Inflamm.* 2003 Avr;12(2):107-116.
8. Canpolat F, Unver M, Eskioğlu F, Kösebalaban S, Durmazlar SPK. Serum and erythrocyte adenosine deaminase activities in patients with Behçet's disease. *Int. J. Dermatol.* 2006 Sep;45(9):1053-1056.
9. Calis M, Ates F, Yazici C, Kose K, Kirnap M, Demir M, et al. Adenosine deaminase enzyme levels, their relation with disease activity, and the effect of colchicine on adenosine deaminase levels in patients with Behçet's disease. *Rheumatol. Int.* 2005 Aoû;25(6):452-456.
10. Eksioğlu-Demiralp E, Direskeneli H, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Neutrophil activation in Behçet's disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2001 Oct;19(5 Suppl 24):S19-24.
11. Alpsyoy E, Zouboulis CC, Ehrlich GE. Mucocutaneous lesions of Behçet's disease. *Yonsei Med J.* 2007;48(4):573-585.
12. Ergun T, Gürbüz O, Harvell J, Jorizzo J, White W. The histopathology of pathergy: a

- chronologic study of skin hyperreactivity in Behçet's disease. *Int. J. Dermatol.* 1998 Déc;37(12):929-933.
13. Akdeniz N, Esrefoglu M, Keleş MS, Karakuzu A, Atasoy M. Serum interleukin-2, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide levels in patients with Behçet's disease. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2004 Sep;33(5):596-599.
 14. Bardak Y, Aridoğan BC. The demonstration of serum interleukin 6-8, tumor necrosis factor-alpha, complement, and immunoglobulin levels in Behçet's disease with ocular involvement. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2004 Mar;12(1):53-58.
 15. Evereklioglu C, Er H, Türköz Y, Cekmen M. Serum levels of TNF-alpha, sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behçet's disease. *Mediators Inflamm.* 2002 Avr;11(2):87-93.
 16. Hamzaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K. Cytokine profile in Behçet's disease patients. Relationship with disease activity. *Scand. J. Rheumatol.* 2002;31(4):205-210.
 17. Neves FS, Carrasco S, Goldenstein-Schainberg C, Gonçalves CR, de Mello SBV. Neutrophil hyperchemotaxis in Behçet's disease: a possible role for monocytes orchestrating bacterial-induced innate immune responses. *Clin. Rheumatol.* 2009 Déc;28(12):1403-1410.
 18. Ozoran K, Dügün N, Gürler A, Tutkak H, Tokgöz G. Plasma von Willebrand factor, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and antithrombin III levels in Behçet's disease. *Scand. J. Rheumatol.* 1995;24(6):376-382.
 19. Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, et al. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res.* 2008 Mai 23;102(10):1192-201.
 20. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell. Sci.* 2008 Jul 1;121(Pt 13):2115-2122.
 21. Gotsch U, Borges E, Bosse R, Böggemeyer E, Simon M, Mossmann H, et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell. Sci.* 1997 Mar;110 (Pt 5):583-588.
 22. Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, et al. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol.* 1996 Oct;135(2):497-510.
 23. Cand F, Pelletier L, Vilgrain I. Patent(WO/2008/062314) Circulating VE-Cadherin as a predictive marker of sensitivity or resistance to anti-tumoral treatment, and improved method for the detection of soluble proteins.
 24. Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, Vernet T, et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem.* 2003 Avr 18;278(16):14002-12.

25. Habibagahi Z, Habibagahi M, Heidari M. Raised concentration of soluble form of vascular endothelial cadherin and IL-23 in sera of patients with Behçet's disease. *Mod Rheumatol*. 2010 Avr;20(2):154-159.
26. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N. Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J*. 2004 Jan;68(1):1-5.
27. Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, et al. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood*. 2001 Mar 15;97(6):1679-1684.
28. Davatchi F, Sadeghi Abdollahi B, Shahram F, Nadji A, Chams-Davatchi C, Shams H, et al. Validation of the International Criteria for Behçet's disease (ICBD) in Iran. *Int J Rheum Dis*. 2010 Fév 1;13(1):55-60.
29. Chumpitazi BFF, Bouillet L, Drouet M, Kuhn L, Garin J, Zarski J, et al. Biological autoimmunity screening in hepatitis C patients by anti-HepG2 lysate and anti-heat shock protein 70.1 autoantibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 8;28(2):137-146.
30. Navarro M, Cervera R, Font J, Reverter JC, Monteagudo J, Escolar G, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance. *Lupus*. 1997;6(6):521-526.
31. Aydıntug AO, Tokgöz G, D'Cruz DP, Gürler A, Cervera R, Düzgün N, et al. Antibodies to endothelial cells in patients with Behçet's disease. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 1993 Mai;67(2):157-162.
32. Cervera R, Navarro M, López-Soto A, Cid MC, Font J, Esparza J, et al. Antibodies to endothelial cells in Behçet's disease: cell-binding heterogeneity and association with clinical activity. *Ann. Rheum. Dis*. 1994 Avr;53(4):265-267.
33. Tsutsui K, Hasegawa M, Takata M, Takehara K. Increased plasma granulocyte elastase levels in Behçet's disease. *J. Rheumatol*. 1998 Fév;25(2):326-328.
34. Değer O, Orem A, Akyol N, Bahadır S, Yildirmis S. Polymorphonuclear leukocyte elastase levels in patients with Behçet's disease. *Clin. Chim. Acta*. 1995 Mai 15;236(2):129-134.
35. Florey OJ, Johns M, Esho OO, Mason JC, Haskard DO. Antiendothelial cell antibodies mediate enhanced leukocyte adhesion to cytokine-activated endothelial cells through a novel mechanism requiring cooperation between Fc{gamma}RIIa and CXCR1/2. *Blood*. 2007 Mai 1;109(9):3881-3889.
36. Belizna C, Duijvestijn A, Hamidou M, Cohen Tervaert JW. Antiendothelial cell antibodies in vasculitis and connective tissue disease. *Ann Rheum Dis*. 2006 Déc 1;65(12):1545-1550.

37. Garnier-Raveaud S, Usson Y, Cand F, Robert-Nicoud M, Verdeti J, Faury G. Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors*. 2001;19(1):35-48.
38. Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, Valiron MO, et al. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J. Biol. Chem*. 1998 Nov 6;273(45):29786-29793.
39. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Aoû 17;96(17):9815-9820.
40. Oztaş P, Lortlar N, Polat M, Alli N, Omeroğlu S, Basman A. Caspase-9 expression is increased in endothelial cells of active Behçet's disease patients. *Int. J. Dermatol*. 2007 Fév;46(2):172-176.
41. Tsukada N, Tanaka Y, Yanagisawa N. Autoantibodies to brain endothelial cells in the sera of patients with human T-lymphotropic virus type I associated myelopathy and other demyelinating disorders. *J. Neurol. Sci*. 1989 Mar;90(1):33-42.
42. Souza RC, Lage L, Goldesntein-Schainberg C, Macedo AR, Carrasco S, Gonçalves CR. Anti-endothelial cell antibodies and central nervous system involvement in Behçet's disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007 Déc;62(6):685-690.

SERMENT D'HIPPOCRATE



En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.