

Imagerie de l'athérosclérose par IRM

Carmen Burtea et Robert Muller

Service de Chimie Générale, Organique et Biomédicale, Laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire, Université de Mons-Hainaut, Avenue du Champ de Mars 24, Mons B-7000, Belgique







Les maladies cardiovasculaires: des complications de l'athérosclérose



 Des progrès importants dans la thérapie et la prévention de maladies cardiovasculaires

Malgré ce progrès, l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral représentent la cause primordiale de décès dans les pays occidentaux



Libby P, Nature, 420, 2002, 868 – 874



L'anatomie de la plaque d'athérome → la sténose artérielle



La paroi artérielle normale









Diagnostic actuel de la plaque d'athérome

 Repose principalement sur l'évaluation de la sténose artérielle par ARM (angiographie de résonance magnétique), ultrasonographie Doppler, angiographie avec soustraction digitale intra-artérielle



CE-MRA (a) reveals moderate ostial stenosis (arrow) of the left renal artery. The right renal artery (arrowhead) is hypoplastic. The DSA image (b) confirms the diagnosis of ostial stenosis (arrow) of the left renal artery as demonstrated on CE-MRA.



Schneider G et al 1 Magn Reson Imag

J Magn Reson Imaging, 26, 2007, 1020



Diagnostic spécifique de la plaque d'athérome

- La rupture de la plaque d'athérome n'est pas toujours précédée par un rétrécissement important de la lumière artérielle (sténose).
- Les accidents cardiovasculaires ne sont pas toujours prévenus par des symptômes.
- Méthodes de diagnostic spécifique, capables d'identifier les plaques vulnérables

 ciblage de biomolécules surexprimées dans la plaque d'athérome

 imagerie moléculaire









Mécanismes inflammatoires de l'athérogenèse → la signature moléculaire de la plaque d'athérome



Kelley J et al, Molecular Medicine Today, 6, 2000, 304

- Lésion de la paroi artérielle par:
 - hypercholestérolémie, diabète, cigarettes, hypertension

Réactions inflammatoires:

- expression de molécules d'adhésion
- synthèse de cytokines et de facteurs de croissance
- adhésion et transmigration endothéliale de leukocytes
- monocytes

 macrophages

 cellules spumeuses
- migration de cellules musculaires lisses (SMCs) de media vers l'intima
- synthèse de collagène





L'imagerie moléculaire





- PET, SPECT: radio-isotopes
- Imagerie optique: probes fluorescents
- MRI: catalyseurs de relaxation





Imagerie de la plaque d'athérome



FDG-PET-CT



de fluorescence



IRM



IRM moléculaire





Traceurs pour l'imagerie moléculaire de résonance magnétique



- Rapporteur IRM = catalyseur de la relaxation protonique T₁ (complexes de Gd) et T₂ (nanoparticules d'oxyde de fer)
 - haute relaxivité et susceptibilité magnétique afin d'être facilement détectable dans des zones de faibles concentrations tissulaires





Small molecule screening Criblage des molécules de petite taille

Criblage à haut débit (High Throughput Screening, HTS) -> analyser les effets d'une grande banque de molécules de petite taille sur un système biologique.



Gordon EJ, ACS Chem Biol. 2007 Jan 23;2(1):9-16





Small molecule screening Criblage des molécules de petite taille





Small molecule screening Criblage des molécules de petite taille





Domaines essentiels d'intéraction moléculaire (restreints à quelques acides aminés)





Small molecule screening

Bibliothèques des molécules naturelles ou synthétiques



Développement des méthodes de diagnostic in vivo et in vitro

Thérapie: Découverte et optimisation des médicaments



Traceurs pour l'imagerie moléculaire





Les bibliothèques des molécules synthétiques Exemple: le motif RGD dans le ciblage des intégrines





Ciblage de l'intégrine $\alpha_{v}\beta_{3}$ exprimée par les vaisseaux angiogèniques: diagnostic IRM de l'athérosclérose à l'aide d'un peptidomimétique RGD conjugué à Gd-DTPA



Burtea C, Laurent S, Murariu O, Rattat D, Toubeau G, Verbruggen A, Vansthertem D, Vander Elst L, Muller RN, Cardiovasc Res, 2008, 78, 148–157





Ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ exprimée par les vaisseaux angiogèniques: diagnostic de l'athérosclérose (souris ApoE^{-/-}) par IRM





Burtea C, Laurent S, Murariu O, Rattat D, Toubeau G, Verbruggen A, Vansthertem D, Vander Elst L, Muller RN, Cardiovasc Res, 2008, 78, 148–157

(IRM Avance-200, 4.7 T; protocole RARE : TR/TE = 1048.5 / 4 ms, facteur RARE = 4, NEX = 4, matrice = 256, FOV = 2.3 cm, épaisseur de la tranche = 0.8 mm, résolution spatiale = 90 µm)

Immunodétection de l'expréssion de l'intégrine $\alpha_{v}\beta_{3}$ au niveau de la plaque d'athérome (souris ApoE^{-/-})





Immunodétection de l'angiogenèse dans la plaque d'athérome (souris ApoE-/-)

Burtea C, Laurent S, Murariu O, Rattat D, Toubeau G, Verbruggen A, Vansthertem D, Vander Elst L, Muller RN, Cardiovasc Res, 2008, 78, 148–157





Expréssion du PECAM-1 (souris ApoE^{-/-}) (whole-mount aorta)

Expréssion du PECAM-1 (souris contrôle)

(f)

(whole-mount aorta)





Les bibliothèques des peptides (phage display) Structure du phage M13 (Genre Inovirus)





Les bibliothèques des peptides (phage display) La fusion des peptides au niveau des P3, P6 et P8









Les bibliothèques des peptides (phage display) Criblage de vecteurs spécifiques (panning)





Les bibliothèques des peptides (phage display) Ciblage du VCAM-1 et de l'apoptose (phosphatidylsérine, PS) dans la plaque d'athérome à risque



UMH



Ciblage du VCAM-1 par phage display







Phage display: Rounds de sélection







Clones sélectionés après 4 rounds de panning Coefficient d'affinité spécifique envers VCAM-1







Fréquence d'acides aminés dans la structure de peptides



Arg, His, Ser, Thr → interaction ionique ou d'hydrogène avec VCAM-1





Homologie (BLAST) avec la séquence de protéines pertinentes

Peptide symbol	Peptide alignement
R834	α -4 subunit of VLA 4
R833	T-cell receptor delta chain
R832	Leukocyte Ig-like receptor B Leukocyte common antigen-related protein
	Protocadherin
	Integrin alpha 2b
R831	Leukocyte Ig-like receptor A
	α -4 subunit of VLA 4





Evaluation du K_d pour l'interaction avec VCAM-1 Estimation de l' IC_{50} par compétition avec les lymphocytes Jurkat T







IRM moléculaire du VCAM-1 dans un modèle murin d'hépatite (concanavaline A) avec Gd-DOTA-R832 (1h30' post-contraste) Avance-200 MRI, 4.7 T, MSME (TR/TE = 307.4/14.7 ms, FOV = 5 cm, épaisseur de la tranche = 3 mm, matrice = 256, NEX = 4, TA = 5'14" résolution spatiale = 195 µm)







Immunomarquage du VCAM-1 dans le foie de souris (concanavaline A) en présence du peptide R832 biotinylé (A et C) ou d'un anticorps anti-VCAM-1 (B et D) (coloré en brun; flèches)







ÎRM moléculaire du VCAM-1 dans la plaque d'athérome (souris ApoE^{-/-}) avec Gd-DOTA-R832 (~27 min post-contraste)

Comparaison avec Gd-DOTA (Coupes virtuelles successives de l'aorte sur une longueur de 3.2 mm ; Avance-200 MRI, 4.7 T, RARE, TR/TE = 1048.5 / 4 ms, facteur RARE = 4, FOV = 2.3 cm, épaisseur de la tranche = 0.8 mm, matrice = 256, NEX = 4, TA = 5'14", résolution spatiale = 90 μ m)







IRM moléculaire du VCAM-1 dans la plaque d'athérome (souris ApoE^{-/-}) avec Gd-DOTA-R832 (~27 min post-contraste)

Comparaison avec Gd-DOTA-R832.Scramble

(Avance-200 MRI, 4.7 T, RARE, TR/TE = 1048.5 / 4 ms, facteur RARE = 4, FOV = 2.3 cm, épaisseur de la tranche = 0.8 mm, matrice = 256, NEX = 4, TA = 5'14", résolution spatiale = 90 μ m)





Immunomarquage du VCAM-1 dans la plaque d'athérome (souris ApoE^{-/-}) en présence du peptide R832 biotinylé (A) ou d'un anticorps anti-VCAM-1 (B) (coloré en brun; flèches)



Burtea C, Laurent S, Port M, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Toubeau G, Vander Elst L, Corot C, Muller R, World Molecular Imaging Congres, Nice, France, 2008.

In = intima; M = media; Ad = adventice





Ciblage de l'apoptose par phage display:

La phosphatidylserine dans l'apoptose



Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Rousseaux O, Port M, Vander Elst L, Corot C, Muller R, Identification of Peptide Ligands that Target Apoptotic Cells by Means of Specific Interactions with Phosphatidylserine. Applications to Molecular Imaging by MRI. Submitted to *Accounts of Chemical Research*





Séquences peptidiques et homologie (BLAST) avec la séquence de protéines pertinentes

Relative homology No clones Low voltage-activated T-type calcium 5 channel α-1 subunit Tyrosine protein kinase pp60-c-src 1 Neuronal pp60c-src Matrix metalloproteinase 14 preprotein 7 Matrix metalloproteinase 1, 9, 14 Transient rec. potential Ca²⁺ channel 6C 3 Acyl-coenzyme A oxydase 2 Transient rec. potential Ca²⁺ channel 6C 1 Fas antigen ligand K inwardly-rectifying channel 1 K large conductance pH-sensit. channel Protein Tvr phosphatase 2C 1 Alanine:glyoxylate aminotransferase 2 **Apoptosis associated Tyr-kinase** 1 Ca²⁺ channel β-subunit Transient receptor potential calcium 1 channel 5 (TRPC5) Capacitative calcium entry channel 2

Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Rousseaux O, Port M, Vander Elst L, Corot C, Muller R, Identification of Peptide Ligands that Target Apoptotic Cells by Means of Specific Interactions with Phosphatidylserine. Applications to Molecular Imaging by MRI. Submitted to *Accounts of Chemical Research*



IRM moléculaire de la PS dans le foie apoptotique (anticorps anti-Fas) de souris avec le Gd-DTPA-R826 (~30 min post-contraste) IRM Avance-200, 4.7 T, MSME (TR/TE = 307.4/14.7 ms, FOV = 5 cm, épaisseur de

la tranche = 3 mm, matrice = 256, No d'acquisitions = 4, TA = 5'14", résolution spatiale = 195 μ m)





Immunomarquage de l'apoptose dans le foie de souris (anti-Fas) : annexine V biotinylé et caspase-3

Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Rousseaux O, Port M, Vander Elst L, Corot C, Muller R, Identification of Peptide Ligands that Target Apoptotic Cells by Means of Specific Interactions with Phosphatidylserine. Applications to Molecular Imaging by MRI. Submitted to Accounts of Chemical Research Annexine V

Caspase-3

Foie contrôle Foie apoptotique 00 µm 100 µm Annexine < Caspase-3





IRM moléculaire de la PS (apoptose) dans la plaque d'athérome (souris ApoE^{-/-}) avec Gd-DTPA-R826 (~27 min post-contraste)

Comparaison avec Gd-DTPA (Coupes virtuelles successives de l'aorte sur une longueur de 3.2 mm ; Avance-200 MRI, 4.7 T, RARE, TR/TE = 1048.5 / 4 ms, facteur RARE = 4, FOV = 2.3 cm, épaisseur de la tranche = 0.8 mm, matrice = 256, NEX = 4, TA = 5'14", résolution spatiale = 90 μ m)



Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Rousseaux O, Port M, Vander Elst L, Corot C, Muller R, Identification of Peptide Ligands that Target Apoptotic Cells by Means of Specific Interactions with Phosphatidylserine. Applications to Molecular Imaging by MRI. Submitted to *Accounts of Chemical Research*





Immunomarquage de l'apoptose (anti-Fas) dans la plaque d'athérome (souris ApoE^{-/-}): annexine V biotinylé



Burtea C, Laurent S, Lancelot E, Ballet S, Murariu O, Rousseaux O, Port M, Vander Elst L, Corot C, Muller R, Identification of Peptide Ligands that Target Apoptotic Cells by Means of Specific Interactions with Phosphatidylserine. Applications to Molecular Imaging by MRI. Submitted to *Accounts of Chemical Research*





Remerciements

Département de Chimie Générale, Organique et Biomédicale (UMH, Belgique)

- Prof. Dr. L. VANDER ELST
- Dr. S. LAURENT, Première assistante
- O. MURARIU, Lic. Sc. Chimiques, Assistante de recherche

Département d'Histologie (UMH, Belgique)

Prof. Dr. G. TOUBEAU, Chef de service et son équipe

Société GUERBET (Aulnay-sous-Bois, France)

- Dr. C. COROT, Directeur de la Recherche Scientifique
- Dr. M. PORT
- Dr. E. LANCELOT
- Dr. S. BALLET
- Dr. O. ROUSSEAUX

