



Imagerie moléculaire : recherche de vecteurs peptidiques spécifiques de l'apoptose par la méthode du phage display

SERVICE DE CHIMIE ORGANIQUE ET BIOMÉDICALE
LABORATOIRE DE RMN ET D'IMAGERIE MOLÉCULAIRE
UNIVERSITÉ DE MONS-HAINAUT
FACULTÉ DES SCIENCES

BELGIQUE

DISSERTATION ORIGINALE PRÉSENTÉE PAR **CATHERINE LAUMONIER**
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES.

JUIN 2005

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui, directement ou indirectement m'ont permis de mener à terme ce projet. Ils sont nombreux, que ceux ou celles qui n'auraient pas été cités soient remerciés et m'en excusent.

Ce travail a été possible grâce à de nombreuses collaborations au sein de l'Université de Mons-Hainaut et je tiens à en remercier l'ensemble de ses acteurs :

- Les expériences de microscopie confocale ont été réalisées dans le service de biologie et d'embryologie dirigé par le Prof. Henri Alexandre avec la précieuse aide de Mme Virginie Delsinne.
- Les expériences d'histologie visant à mettre en évidence l'apoptose par la méthode TUNEL ont été réalisées dans le service d'Histologie dirigé par le Prof. Gérard Toubeau et avec l'indispensable aide du Dr Denis Nonclercq et de Mme Annik Maes.
- Le séquençage de l'ADN phagique et une partie des cultures cellulaires ont été possibles grâce à la collaboration du Prof. Alexandra Belayew et de son équipe.
- Certaines étapes du phage display ont été possibles grâce au matériel mis à disposition par le Prof. Paul Falmagne et par le Dr. Guy Laurent.
- Les synthèses du peptide E3 et de son dérivé GG-E3 ont été gracieusement réalisées par le Dr. Alain Michel.

Je tiens à remercier à nouveau le Prof. Alexandra Belayew pour avoir été à la base de l'utilisation de la technique du phage display et pour ses nombreux conseils recueillis aux cours de conversations des plus sympathiques.

Je remercie l'ensemble de mes collègues (actuels ou passés) qui ont fait de mon passage dans le laboratoire de R.M.N. et d'imagerie moléculaire une expérience agréable et enrichissante. Je pense particulièrement au Dr. Jérôme Segers (compagnons de paillasse des bons et des mauvais jours), au Dr. Sophie Laurent (pour la partie chimie de ce travail et parce qu'elle a toujours été présente pour résoudre les problèmes), au Dr. Alain Roch (disponible pour répondre à mes questions, même plusieurs fois!), à Mme Isabelle Gabric (qui en a cherché des articles et résolu des problèmes informatiques), au Prof. Luce Vander Elst (pour l'aspect RMN de ce travail et pour les multiples débogages de l'Avance), sans oublier

tous les autres, le Dr. Michel Anseau, le Dr. Horacio Tellez Oliva, le Dr. François Botteman, le Dr. Yves Gossuin, le Dr. Carmen Burtea, Melle Coralie Thirifays, Melle Céline Hénoumont, Melle Delphine Forge, Mme Corinne Pierart, M. Saliou Diallo, M. Sébastien Boutry, Melle Virginie Henrotte, M. David Rouzé, Mme Assia Ouakssim, M. Rudy Potdevin, M. Antoine Vroman, M. Alexandre Theodorou, Melle Stéphanie Brunin et M. Lionel Larbanoix.

Je remercie le Prof. Robert Muller pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon mémoire et mon travail de thèse au sein de son équipe, de présenter à de multiples reprises mon travail dans des colloques et congrès et par la même occasion, de voyager, et de m'avoir donné un large champ d'action qui m'a permis de beaucoup apprendre et de m'épanouir.

Je souhaite également remercier les ARC pour le financement de mes quatres années de doctorat.

Je remercie chaleureusement le Dr David Seveno pour m'avoir initié à titre personnel à la modélisation moléculaire. Je le remercie également pour son soutien et pour le soleil qu'il m'a apporté il y a près d'un an.

Même si je ne pourrais jamais le faire suffisamment, je voudrais remercier ma famille, et plus particulièrement papa, maman et Jean pour leur soutien quotidien, leur patience et la confiance et la fierté qu'ils ont placées en moi.

A Missoulit et à Richard

Résumé

La détection de l'apoptose revêt un intérêt considérable en raison de son implication dans de nombreuses pathologies d'incidence élevée, comme le cancer ou la maladie d'Alzheimer pour n'en citer que deux. Des méthodes de mise en évidence de ce phénomène se multiplient et se développent sans cesse visant à détecter *in vitro* voire même *in vivo*, cette forme de mort cellulaire programmée. Grâce à son pouvoir de résolution élevé et à des agents de contraste spécifiques, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) offre la possibilité de détecter, de manière non invasive, les cellules apoptotiques. Cette approche trouvera son utilité pour la mise au point de traitements anti-tumoraux et pour leur suivi en clinique. Aujourd'hui, il existe des agents de contraste magnétiques capables de reconnaître les cellules apoptotiques, mais leurs molécules vectrices sont constituées de protéines, d'anticorps ou de leurs domaines dont on ne peut ignorer l'important pouvoir immunogène. Des molécules mimétiques ou des oligomères de petite taille comme des peptides seraient plus adaptés et plus simples à synthétiser chimiquement. Notre travail porte sur la sélection, de peptides capables de reconnaître spécifiquement les cellules apoptotiques, en se fixant à la phosphatidylsérine (molécule marqueur des cellules apoptotiques). Ces peptides ont été sélectionnés par la méthode du phage display. Le phage display est une technique de biologie moléculaire permettant de sélectionner, entre autre, des peptides de longueur déterminée, en fonction de leur affinité pour une cible donnée. Plusieurs milliards de séquences peptidiques exposées par les phages constituant la bibliothèque, peuvent être testés simultanément. Les meilleures séquences sont ensuite synthétisées chimiquement et testées indépendamment du phage.

Dans la première partie de ce travail, plusieurs protocoles de phage display basés sur différentes méthodes d'immobilisation de la cible, et différents types de bibliothèques de phages ont été testés et comparés. A l'issue de ces sélections, plusieurs phages présentant une affinité élevée pour la phosphatidylsérine ont été sélectionnés. Un des peptides exposés par un de ces phages, nommé E3, a été synthétisé et étudié dans la seconde partie de ce travail. Le peptide E3 a été d'abord greffé à un contrastophore magnétique de type superparamagnétique (Ultra Small Particle Iron Oxide) pour être testé *in vitro* sur des systèmes biologiques (apoptose induite chez des cellules Hep G2 par la camptothécine). Après avoir été testé avec succès sur culture cellulaire, ce nouvel agent de contraste magnétique

a été utilisé, *in vivo* dans le modèle murin d'apoptose hépatique induite par injection i.v. d'anticorps anti-Fas. Comme tout agent de contraste de type particulaire, le GG-E3-USPIO (peptide E3 greffé aux USPIOs par un pont diglycyle) serait capté de manière non spécifique par le foie. Il doit donc être rendu "furtif" pour permettre l'exploitation de sa spécificité. Afin de contourner le problème de capture non spécifique par le foie, le GG-E3-Gd-DTPA (peptide E3 greffé au Gd-DTPA par un pont diglycyle), un autre agent de contraste, cette fois de type paramagnétique, a été synthétisé. Les agents de contraste GG-E3-USPIO-PEG (peptide E3 greffé aux USPIO recouvertes de polyéthylène glycol par un pont diglycyle) et GG-E3-Gd-DTPA se sont avérés efficaces, provoquant respectivement une diminution et un rehaussement du signal des foies apoptotiques de souris en IRM.

Mots-clés : Apoptose, Phage Display, IRM, Phosphatidylsérine et Agents de Contraste

Summary

Apoptosis is a phenomenon of paramount importance because its implication in many pathologies of high incidence, like cancer or Alzheimer disease. Methods of detection are unceasingly developed aiming at tackling this form of programmed cell death *in vitro* and as well as *in vivo*. Thanks to its high resolution and its specific contrast agent, Magnetic Resonance Imaging (MRI) makes it possible to detect, in a noninvasive way, the tissue containing apoptotic cells. Such "molecular imaging" contrast agents would find their utility in medicine in the follow-up of antitumor treatments. Some magnetic contrast agents have been proposed to recognize apoptotic cells, however their vectoring molecules are made of proteins or protein domains. Because of the important immunogenic character of these systems it is more suitable to use mimetic molecules or small-size oligomers like peptides which on the other hand are easier to synthesize and purify. In this work, we have selected peptides able to specifically target the apoptotic cells, because of their affinity for phosphatidylserine, a marker of the apoptotic cells. These peptides were selected by phage display, a technique of molecular biology making it possible to select, amongst others, peptides according to their affinity for a given target. Thanks to this technique, several billion peptide sequences exposed by the phages constituting a "library" can be tested simultaneously. The best candidate can then be synthesized chemically and tested independently of the phage.

In the first part of this work, several protocols of phage display involving various methods of immobilization of the target, as well as various types of libraries of phages, were tested and compared. At the end of the phage display selection several phages showing a high affinity for the phosphatidylserine were selected. One of the peptides (Thr-Leu-Val-Ser-Ser-Leu) exposed by one of these phages, named E3, was synthesized and studied in the second part of this work. Firstly, E3 peptide was grafted with a magnetic contrastophore of the superparamagnetic type (Ultra Small Particle Iron Oxide) to be tested *in vitro* on biological systems (apoptosis induced in Hep G2 cells by camptothecin). After being tested successfully on cellular culture and after some modifications, this new vector for contrast agent was tested *in vivo* in the murine model of hepatic apoptosis induced by i.v. injection of anti-Fas antibody. Because of its particulate nature, the GG-E3-USPIO (E3 peptide grafted in USPIO by a diglycyl bridge) was apparently collected in a nonspecific way by the liver and had thus to be made furtive to reveal its specificity. In order to circumvent

the problem of the nonspecific capture by the liver, GG-E3-Gd-DTPA (E3 peptide grafted with Gd-DTPA by a diglycyl bridge), another contrast agent, of the paramagnetic nature, was synthesized on the base of the E3 peptide. It was observed that the contrast agent GG-E3-USPIO-PEG (E3 peptide grafted in USPIO covered with polyethyleneglycol by a diglycyl bridge) and the contrast agent GG-E3-Gd-DTPA respectively decrease and increase the signal coming from the apoptotic livers of mice as expected for a negative (particulate) and a positive (molecular) contrast agents.

Keywords : Apoptosis, Phage Display, MRI, Phosphatidylserine and Contrast Agent

Table des matières

I	<i>Introduction générale</i>	15
1	L'apoptose	16
1.1	Historique et évolution du concept d'apoptose	16
1.2	Apoptose versus nécrose	17
1.3	Machinerie apoptotique	20
1.3.1	Caspases : molécules clés de l'apoptose	20
1.3.2	Récepteurs de mort	22
1.3.3	Les BCl-2 et l'apoptosome mitochondrial	24
1.3.4	Participation du réticulum endoplasmique et du calcium dans la régulation de l'apoptose	27
1.3.5	Implication du duo perforine/granzyme dans l'induction de l'apoptose	28
1.3.6	Connexines : communication de mort	29
1.3.7	Protéine p53 et induction de l'apoptose suite à l'altération de l'ADN	29
1.3.8	Protéines de stress	29
1.3.9	Potassium : régulateur des enzymes apoptotiques	30
1.3.10	Rôle inhibiteur des kinases	30
1.3.11	Action de la transglutaminase II	30
1.3.12	Dégradation de l'ADN	30
1.4	Clairance des cellules et corps apoptotiques	31
1.4.1	Remodelage de la membrane	31
1.4.2	Phagocytose des cellules et corps apoptotiques	32
1.4.3	Absence de réaction inflammatoire	33
1.5	Rôles de l'apoptose	33
1.5.1	Rôles physiologiques	33
1.5.2	Rôles pathologiques	34
1.5.3	Rôles thérapeutiques	35
1.6	Conclusion	35
2	Détection de l'apoptose	36
2.1	Annexine V	36

2.2	Revue des outils de biologie moléculaire disponibles pour la mise en évidence de l'apoptose	37
2.2.1	Systèmes basés sur la détection de la morphologie de la cellule apoptotique	37
2.2.2	Systèmes basés sur la détection de la fragmentation de l'ADN	38
2.2.3	Systèmes basés sur les changements de la membrane plasmique	38
2.2.4	Systèmes basés sur les changements subis par la mitochondrie	39
2.2.5	Systèmes basés sur l'activité des caspases	39
2.3	Spectroscopie RMN de l'apoptose	41
2.3.1	Principe de la spectroscopie RMN	41
2.3.2	De la RMN du proton au dosage de l'apoptose	42
2.3.3	Existence d'une signature de l'apoptose en RMN du phosphore	42
2.4	Apport des temps de relaxation	43
2.4.1	Principe de la relaxométrie	43
2.4.2	Temps de relaxation transversale et diagnostic de l'apoptose	43
2.5	Diagnostic de l'apoptose par IRM	44
2.5.1	Principe de l'imagerie par résonance magnétique	44
2.5.2	Agents de contraste IRM	45
2.5.3	L'IRM au service de la détection de l'apoptose	46
2.6	Autres méthodes d'imagerie moléculaire clinique	46
2.7	Conclusion	48
3	Technique du phage display	49
3.1	Philosophie et principe du phage display	49
3.2	Vecteur du phage display	49
3.3	Structure du virion	50
3.4	Cycle d'amplification du phage M13	50
3.5	Bibliothèques de phages	51
3.6	Principe de sélection ou la recherche d'une aiguille dans une botte de foin	54
3.6.1	Présentation et immobilisation de la cible	55
3.6.2	Elution	56
3.6.3	Analyse individuelle du phage	56
3.7	Applications de la technique du phage display	57
3.8	Optimisation de la technique du phage display	57
3.9	Autres techniques de chimie combinatoire	57
3.9.1	Notion d'aptamère et d'évolution systématique	57
3.9.2	Chimie combinatoire : solution miracle ou outil pratique pour le chercheur?	59

II	<i>But du travail</i>	62
III	<i>Sélection par phage display de vecteurs potentiels pour l'imagerie moléculaire de l'apoptose</i>	65
4	Introduction	66
5	Matériel et méthodes	67
5.1	Caractéristiques des bibliothèques	67
5.1.1	Bibliothèque hexamérique linéaire	67
5.1.2	Bibliothèque heptamérique cyclique	67
5.2	Méthodes de sélection	68
5.2.1	Sélection <i>in vitro</i>	68
5.2.1.1	Immobilisation de la cible	69
5.2.1.2	Validation du modèle	69
5.2.1.3	Protocole de sélection	69
5.2.2	Sélection sur culture cellulaire	70
5.2.2.1	Maintien de la culture et induction de l'apoptose	70
5.2.2.2	Validation du modèle par microscopie confocale	71
5.2.2.3	Protocole de sélection	71
5.2.3	Sélection <i>ex vivo</i>	72
5.2.3.1	Induction de l'apoptose et perfusion du foie	72
5.2.3.2	Validation du modèle par la méthode TUNEL	73
5.2.3.3	Protocole de sélection utilisé pour la bibliothèque C7	74
5.2.3.4	Protocole de sélection utilisé pour la bibliothèque L6	75
5.3	Amplification des bibliothèques de phages	75
5.3.1	Amplification des phages L6	75
5.3.2	Amplification des phages C7	76
5.4	Dosage des phages	76
5.4.1	Dosage par densité optique	77
5.4.2	Titration par infection	77
5.5	Evaluation de l'affinité globale des bibliothèques intermédiaires	79
5.6	Amplification clonale	80
5.7	ELISA ponctuelle	81
5.8	Courbe de fixation	82
5.9	Courbe de compétition	82
5.10	Séquençage de l'ADN phagique	82
5.10.1	Obtention et purification de l'ADN phagique	83

5.10.2	Réaction de séquençage	84
5.10.3	Obtention de la séquence peptidique	84
6	Résultats	85
6.1	Validation des modèles	85
6.1.1	Immobilisation de phospholipides <i>in vitro</i>	85
6.1.2	Induction de l'apoptose par la camptothécine sur culture cellulaire . .	86
6.1.3	Validation de l'induction de l'apoptose hépatique par injection d'anticorps anti-Fas	87
6.2	Evolution des bibliothèques au cours des sélections	89
6.2.1	Sélection <i>in vitro</i> à partir de la bibliothèque C7	89
6.2.2	Sélection sur culture cellulaire à partir de la bibliothèque C7	90
6.2.3	Sélection <i>ex vivo</i> à partir de la bibliothèque C7	90
6.2.4	Sélection <i>ex vivo</i> à partir de la bibliothèque L6	92
6.3	Efficacité des phages obtenus	93
6.4	Séquences des clones sélectionnés	96
6.4.1	Enrichissement en acides aminés	98
6.4.2	Emergence de séquences consensus	100
6.4.2.1	Séquences consensus calculées	100
6.4.2.2	Séquences consensus réelles	105
6.4.3	Profil d'hydrophobicité et de charges	105
6.5	Caractéristiques des clones sélectionnés	107
6.6	Affinité apparente des clones efficaces	110
6.7	Validation du concept de coefficient d'efficacité	116
6.8	Expériences de compétition avec l'annexine V	116
6.9	Recherche d'épitopes séquentiels	119
7	Discussion	121
7.1	Mise en oeuvre du phage display	121
7.2	Critère de sélection	125
7.3	Phage display : obtention d'épitopes séquentiels ou conformationnels	125
7.4	Phage versus peptide	125
7.5	Applications des phages spécifiques	126
8	Conclusions	129
9	Perspective : modélisation moléculaire ?	131
9.1	Généralités	131
9.2	La dynamique moléculaire	132

9.3	Modélisation des peptides	135
9.4	Modélisation d'une bicouche phospholipidique	136
9.5	Conclusion	137

IV Synthèse et caractérisation d'un agent de contraste IRM apopto-spécifique **138**

10 Introduction **139**

11 Matériel et méthodes **140**

11.1	Synthèses et greffages	140
11.1.1	Synthèse des peptides	140
11.1.2	Biotinylation des peptides	140
11.1.3	Marquage du peptide E3 à la fluorescéine	141
11.1.4	Greffage des peptides sur les USPIO	141
11.1.5	Greffage des peptides sur des USPIO pegylées	141
11.1.6	Greffage des peptides sur un chélate de gadolinium	142
11.2	Caractérisation physico-chimique	142
11.2.1	Spectrométrie de masse	142
11.2.2	Dosage du fer	143
11.2.3	Profils NMRD	143
11.2.4	Mesure de la taille hydrodynamique	143
11.2.5	Mesure de la stabilité vis-à-vis de la transmétallation	143
11.3	Caractérisation biologique	144
11.3.1	Courbe de fixation des peptides biotinylés	144
11.3.2	Courbe de compétition du peptide E3 avec le phage E3	145
11.3.3	Courbe de compétition des peptides avec l'annexine V biotinylée	145
11.4	Etude sur culture cellulaire des agents de contraste particuliers	146
11.4.1	Maintenance de la culture et induction de l'apoptose	146
11.4.2	Validation des modèles	147
11.4.2.1	Validation par microscopie confocale	147
11.4.2.2	Validation par RMN du proton	147
11.4.3	Imagerie par microscopie confocale	147
11.4.4	Marquage des cellules et imagerie par résonance magnétique	147
11.4.5	Mesure des temps de relaxation	148
11.5	Etude <i>in vivo</i> des agents de contraste spécifiques	148
11.5.1	Imagerie par résonance magnétique <i>in vivo</i>	148
11.5.1.1	Tests des agents de contraste positifs à base de Gd-DTPA	148

11.5.1.2	Tests des agents de contraste négatifs à base de particules pegylées	149
11.5.2	Minéralisation et dosage ICP	149
12	Résultats	150
12.1	Caractérisation physico-chimique du peptide E3 et de ses produits dérivés . .	150
12.1.1	Caractérisation des particules superparamagnétiques vectorisées . . .	154
12.1.2	Caractérisation des chélates de gadolinium vectorisés	157
12.2	Evaluation <i>in vitro</i> de l'affinité du peptide E3, de ses produits dérivés et des peptides contrôles	158
12.2.1	Evaluation de l'affinité des peptides biotinylés pour la phosphatidyl- sérine	158
12.2.2	Comparaison de l'affinité du peptide E3 à celle du phage E3 pour la phosphatidylsérine	160
12.2.3	Comparaison de l'affinité pour la phosphatidylsérine du peptide E3 avec celle de ses dérivés	161
12.2.4	Comparaison de l'affinité pour la phosphatidylsérine du peptide E3 avec celle des peptides contrôles	163
12.3	Evaluation de la détectabilité de l'apoptose par le peptide E3 sur culture cellulaire	164
12.3.1	Validation du modèle par microscopie confocale	164
12.3.2	Validation du modèle par RMN du proton	164
12.3.3	Imagerie par microscopie confocale	166
12.3.4	IRM et relaxométrie sur cellules Hep G2	166
12.3.5	IRM et relaxométrie sur cellules JURKAT	167
12.4	Evaluation de l'efficacité <i>in vivo</i> du peptide GG-E3 greffé sur des contrasto- phores IRM	169
12.4.1	Evaluation de l'efficacité du peptide GG-E3 greffé sur un chélate de gadolinium	169
12.4.1.1	Imagerie par résonance magnétique	169
12.4.1.2	Cinétique de biodistribution du GG-E3-Gd-DTPA, du 6xG- Gd-DTPA et du contrôle Gd-DTPA dans les organes de souris	177
12.4.2	Evaluation de l'efficacité du peptide GG-E3 greffé sur des particules superparamagnétiques pegylées	180
13	Discussion	183
13.1	Phage versus peptide	183
13.2	Pertinence de l'espaceur	184
13.3	Choix des modèles biologiques	185

13.4	Pertinence et choix du contrôle négatif	186
13.5	Contrastophore positif ou négatif?	189
13.6	Applications, résolution et sensibilité	190
14	Conclusions	191
V	<i>Conclusion générale</i>	192

"Celui qui ne se souvient du passé est condamné à le revivre".

Sir Winston Churchill

Première partie

Introduction générale

Chapitre 1

L'apoptose

1.1 Historique et évolution du concept d'apoptose

L'apoptose a été décrite pour la première fois dans les années 60 par J. F. R. Kerr [1]. Lors d'examens histologiques du foie, il observe un type de mort cellulaire différent de la nécrose, jusqu'alors la seule connue. Il la nomme "shrinkage necrosis". Au cours des années 70, ce nouveau type de mort cellulaire fut abondamment étudié par différents groupes et sur différents tissus. L'ensemble de ces observations aboutit à la même conclusion : il s'agissait bien d'un tout autre mode de mort cellulaire, dite programmée et baptisée apoptose. Le terme "Apoptose" provient du grec "chute en se détachant" en référence à la chute des feuilles en automne.

Sans l'avoir nommée ainsi, l'apoptose avait déjà été observée à de multiples reprises dès le 19^{ème} siècle [2]. En 1885, elle fut en effet observée par Flemming dans des follicules ovariens de lapin et appelée chromatolyse en référence à la fragmentation du noyau. Un an plus tard, un étudiant en médecine, F. Nissen, observa le même phénomène dans des glandes mammaires. L. Gräper l'observa et l'illustra à son tour en 1914.

Durant ces dernières décennies, l'apoptose a fait l'objet d'une recherche de plus en plus extensive visant à en comprendre la régulation et les mécanismes sous-jacents (Figure 1.1).

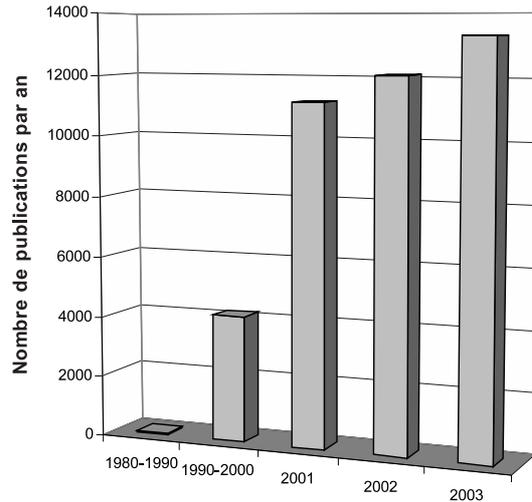


FIG. 1.1 – Nombre de publications traitant de l’apoptose dans le domaine médical.

1.2 Apoptose versus nécrose

L’apoptose et la nécrose sont deux notions souvent comparées et opposées (figure 1.2). Elles sont traditionnellement définies par les aspects morphologiques suivants [3] :

- Lors de l’apoptose, l’ADN est découpé de manière régulière entre les nucléosomes, alors que la dégradation de l’ADN est aléatoire pendant la nécrose.
- La chromatine se condense et se présente sous la forme de croissant de lune tapissant l’intérieur du noyau durant le phénomène d’apoptose, tandis que durant la nécrose, il se produit un phénomène de pycnose c’est-à-dire une condensation de la chromatine qui, cette fois, aboutit à la formation d’une masse homogène.
- L’intégrité de la membrane est conservée pendant l’apoptose alors qu’elle est très vite compromise durant la nécrose.
- Les mitochondries gonflent uniquement lors de la nécrose.
- A l’inverse de la nécrose, l’apoptose ne produit pas d’inflammation.
- Généralement, l’apoptose n’affecte que quelques cellules d’un tissu alors que la nécrose se comporte comme un phénomène massif.
- Le volume de la cellule diminue lors de l’apoptose mais augmente rapidement lors de la nécrose.
- Alors que la nécrose se termine par une lyse de la cellule, l’apoptose aboutit à la production de corps apoptotiques qui sont par la suite phagocytés par les cellules voisines ou les macrophages.

On aura également tendance à opposer nécrose et apoptose en terme de besoin énergétique. En effet, à l’opposé de la nécrose, l’apoptose est un phénomène actif qui requiert de l’énergie et qui est contrôlé génétiquement.

D'après certains auteurs, comparer ainsi la nécrose et l'apoptose est scientifiquement injustifié [3]. En effet, il est insensé de comparer le processus par lequel la cellule meurt (la mort cellulaire) et ses modifications *post mortem*, autrement dit la nécrose. Ces deux processus sont temporellement distincts et représentent les deux extrêmes d'un continuum. Le processus de nécrose peut seulement commencer quand la cellule est morte, après que le point de non retour ait été atteint.

On est alors en droit de se demander ce qu'il advient des corps apoptotiques s'ils ne sont pas phagocytés. D'après Majno et Joris [2], les cellules apoptotiques qui ne sont pas phagocytées montrent quelques-uns des aspects nécrotiques à l'exception du processus inflammatoire [4]. Il y aurait donc une nécrose apoptotique différente de la nécrose souvent opposée à l'apoptose.

D'autre part, une autre forme de mort cellulaire a été mise en évidence par D. Bredesen [5, 6]. Il s'agit de la parapoptose, au cours de laquelle des vacuoles se développent à l'intérieur du cytoplasme, donnant à la cellule un aspect voisin mais différent de celui caractérisant une nécrose. Contrairement à l'apoptose, la parapoptose déclenche une réaction inflammatoire, toutefois modérée. Les phénomènes parapoptotiques étant observés chez des organismes très simples, il est possible qu'elle représente une des premières voies de mort cellulaire programmée s'étant développée au cours de l'évolution.

Pour Clarke [7], il existe deux grands groupes de mort cellulaire : les morts cellulaires programmées dans lesquelles les cellules jouent un rôle actif et les morts cellulaires passives comme la nécrose. La mort cellulaire observée durant le développement et l'homéostasie cellulaire a été classifiée en trois principaux groupes morphologiques : le type 1, nucléaire ou apoptotique, le type 2 ou autophagique et le type 3 ou cytoplasmique.

Une autre forme de mort cellulaire induite par ischémie montrant une morphologie non apoptotique est appelée oncose (du grec *onkos* signifiant gonflement) ou nécrose oncotique [8]. Ce terme avait déjà été proposé en 1910 par von Recklinghausen pour décrire des cellules dilatées [2].

A la lumière de ces considérations, il serait plus judicieux de comparer l'apoptose à l'oncose (figure 1.3). Toutes deux mènent à une nécrose, soit par caryorexie et par condensation pour la première, soit par caryolyse et gonflement pour la seconde. On peut définir l'oncose de la manière suivante : l'oncose est accompagnée d'un gonflement de la cellule et de ses organites, de bourgeonnements et d'une augmentation de la perméabilité membranaire. Elle est typiquement causée par une ischémie et probablement par des agents toxiques qui interfèrent avec la génération d'ATP ou une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique. Elle est généralement accompagnée d'une caryolyse. L'ADN est, dans ce cas, clivé de manière non spécifique.

Pour H. Jaeschke, l'apoptose et la nécrose oncotique sont deux voies indissociables et constamment interconnectées faisant partie du même concept de nécrapoptose [9, 10]. C'est

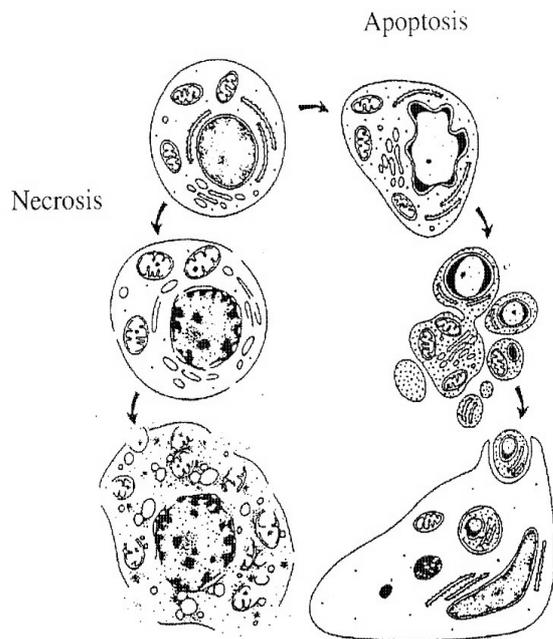


FIG. 1.2 – Illustration de l'apoptose et de la nécrose selon J. F. R. Kerr [2].

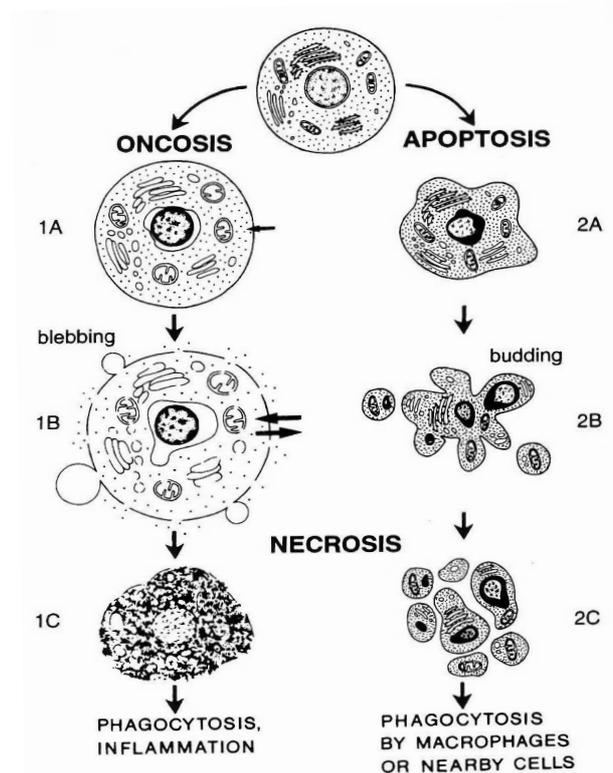


FIG. 1.3 – Deux voies de mort cellulaire conduisant à la nécrose. 1A Gonflement. 1B : Vacuolisation, bourgeonnement et augmentation de la perméabilité. 1C : Changements nécrotiques, c'est-à-dire condensation et caryolyse. 2A : Condensation et pyknose. 2B : Bourgeonnement et caryorexie. 2C : Changements nécrotiques, c'est-à-dire fragmentation de la cellule en corps apoptotiques [4].

principalement en fonction de son contenu en ATP que la cellule terminera sa course en apoptose ou en nécrose [11, 12].

Il y a plus de vingt ans, Farnum et Wilsman identifiaient des cellules condensées par le nom de "dark chondrocytes". La chondroptose [13] signifie que les chondrocytes subissent l'apoptose d'une manière inhabituelle. Il se produit dans ces cellules une augmentation et une expansion du REG (système réticuloendoplasmique granuleux) et de l'appareil de Golgi. On y observe des vacuoles autophagiques et une extrusion du matériel cellulaire dans l'espace extracellulaire aboutissant à une vacuole vide.

Il a été rapporté des réactions d'apoptose ne faisant pas intervenir de caspases [14]. Ces protéines sont néanmoins décrites comme des molécules primordiales de l'apoptose, ce qui ajoute encore à la complexité du concept apoptotique.

Ce problème de sémantique est présent dans la plupart des ouvrages de référence ainsi que dans les articles scientifiques où l'on confronte nécrose et apoptose. Si tout ceci n'est pas d'un intérêt capital pour ce travail, il est essentiel de préciser de quelle manière la phosphatidylsérine est exposée dans le feuillet externe de la membrane plasmique lors des différentes modalités de mort cellulaire, car cette molécule sera la cible que nous viserons. L'exposition de la phosphatidylsérine lors de l'apoptose est un phénomène déjà bien étudié. Bien que le mécanisme ne soit pas encore identifié, il se pourrait que la membrane cellulaire perde également son asymétrie lors de l'oncose [15, 16]. Toutefois une simple observation morphologique permettrait de différencier ces deux types de mort cellulaire programmée.

1.3 Machinerie apoptotique

1.3.1 Caspases : molécules clés de l'apoptose

Les caspases [17, 18, 19] sont à juste titre associées au phénomène d'apoptose car elles y jouent un rôle clé. Ce sont des protéases cytoplasmiques qui clivent différentes protéines cellulaires en aval d'un résidu aspartate. Leur site actif est une cystéine d'où leur nom "CysteinyAspartate - Specific ProteinASE". Cette famille de protéines comprend actuellement 14 membres que l'on retrouve dans l'ensemble du règne animal. L'avantage que trouve la cellule à utiliser des protéases plutôt que des protéines de transduction du signal plus conventionnelles, comme les kinases ou les phosphatases, est qu'elles produisent des événements irréversibles qui engagent la cellule dans une voie de non retour.

Mécanismes d'activation

Chez l'homme, les caspases sont exprimées de manière ubiquitaire en tant que zymogènes latents, attendant un stimulus d'activation approprié. La conversion de la caspase de l'état zymogène à celui d'enzyme mature nécessite au moins deux clivages (figure 1.4). Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle. Une première coupure se fait entre la grande et la petite sous-unité, elle est suivie par la libération du pro-domaine. La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et deux petites sous-unités.

Classification des caspases

Les caspases peuvent être classées sur base de leur structure, de leur spécificité pour un substrat ou sur base de leur fonction. Ces trois critères sont inévitablement interconnectés. Alors que sept membres (caspases 2, 3 et 6 - 10) sont généralement considérés comme faisant partie de la machinerie apoptotique, trois autres (caspases 1, 4 et 5) sont employés par les

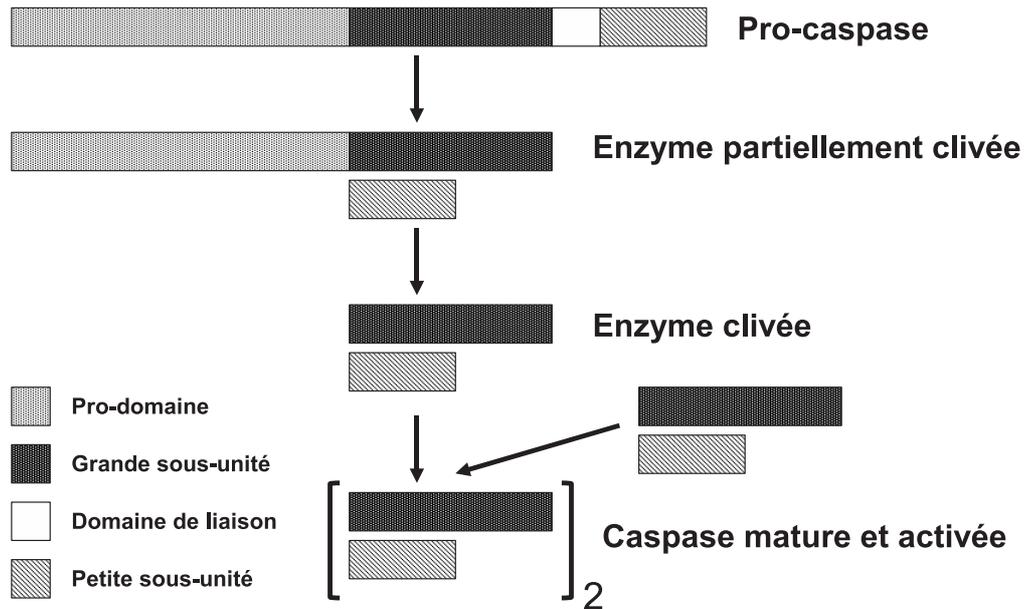


FIG. 1.4 – Structure et activation des caspases.

mécanismes de défense, plus précisément dans l'activation de cytokines pro-inflammatoires, comme l'interleukine-1 (IL-1) [20]. On parle donc de caspases activatrices de cytokines, initiatrices et effectrices (figure 1.5).

Caspases initiatrices

Elles convertissent l'information de déclenchement de l'apoptose reçue par la cellule en activité protéolytique. Elles intègrent les signaux provenant de la stimulation des récepteurs de mort (voie extrinsèque avec les caspases 8 [21] et 10 [22], parfois 2 [23]) ou en réponse au stress cellulaire (voie intrinsèque avec la caspase 9 [24]). Le recrutement et l'activation des caspases initiatrices s'achève par la fixation de molécules adaptatrices (FADD :Fas Associated protein with Death Domain et TRADD : TNF-R1 Associated protein with Death Domain) les reliant aux récepteurs via les pro-domaines DEDs (Death Effector Domains) pour les caspases 8 et 10 ou via les pro-domaines CARD (Caspase Recruitment Domain) entre la caspase 9 et le cofacteur Apaf 1 ((Apoptotic protease activating factor).

Caspases effectrices

A l'inverse des caspases initiatrices, les caspases 3 [25], 6 et 7 possèdent un petit pro-domaine. Ces caspases seront activées par les caspases initiatrices et cliveront à leur tour différents substrats détaillés par la suite.

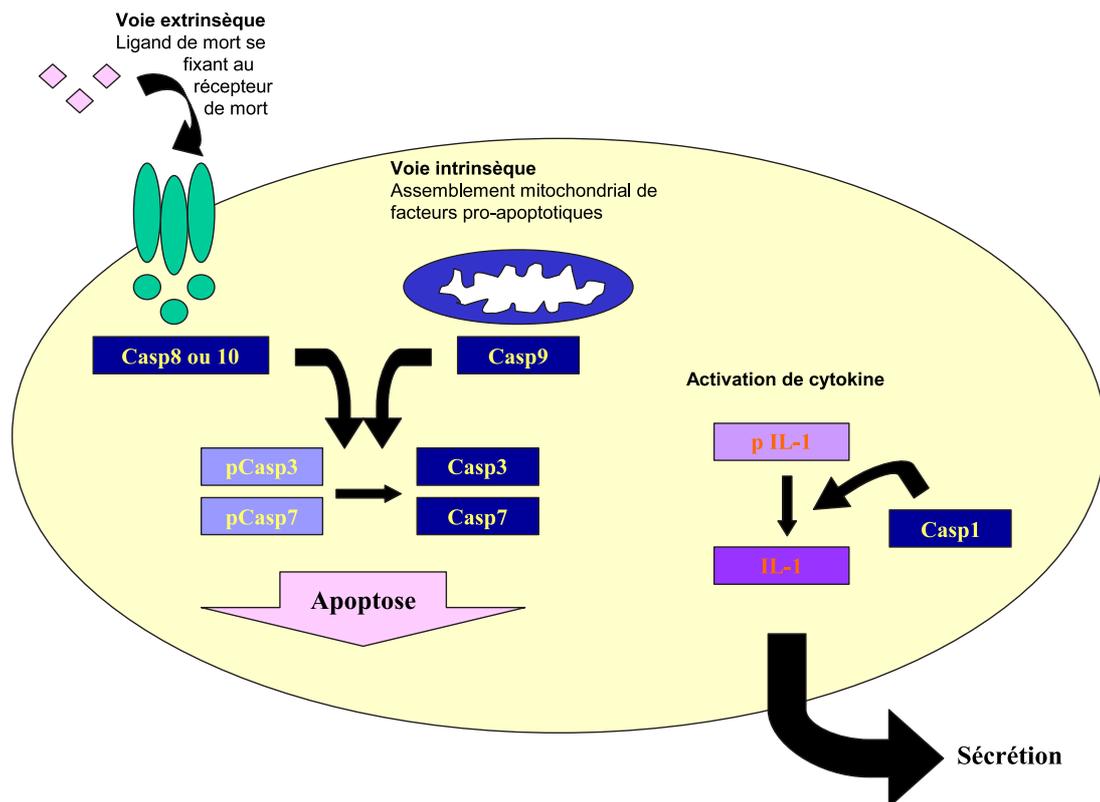


FIG. 1.5 – Implications des caspases dans la machinerie apoptotique et dans l'activation des cytokines pro-inflammatoires.

Substrats des caspases

On connaît une vingtaine de substrats qui une fois clivés, conduisent la cellule vers la morphologie apoptotique précédemment décrite. Les principales protéines cytoplasmiques subissant l'assaut des caspases sont les caspases elles-mêmes et les protéines du cytosquelette, conduisant à sa réorganisation, au bourgeonnement de la membrane plasmatique et à une diminution des interactions intercellulaires. Le clivage de certaines protéines nucléaires conduit à des modifications de l'architecture du noyau favorisant l'exposition de l'ADN aux endonucléases.

1.3.2 Récepteurs de mort

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. Toutefois, il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de celle-ci : les récepteurs de mort [26]. L'expression "récepteur de mort" désigne un sous groupe de la famille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor). Ces protéines trans-membranaires peuvent induire l'apoptose via une région cytoplasmique conservée, le DD (Death Domain). La mort induite par ces récepteurs conduit toujours à l'activation des caspases et en est dépendante. A ce jour, 8 de ces ré-

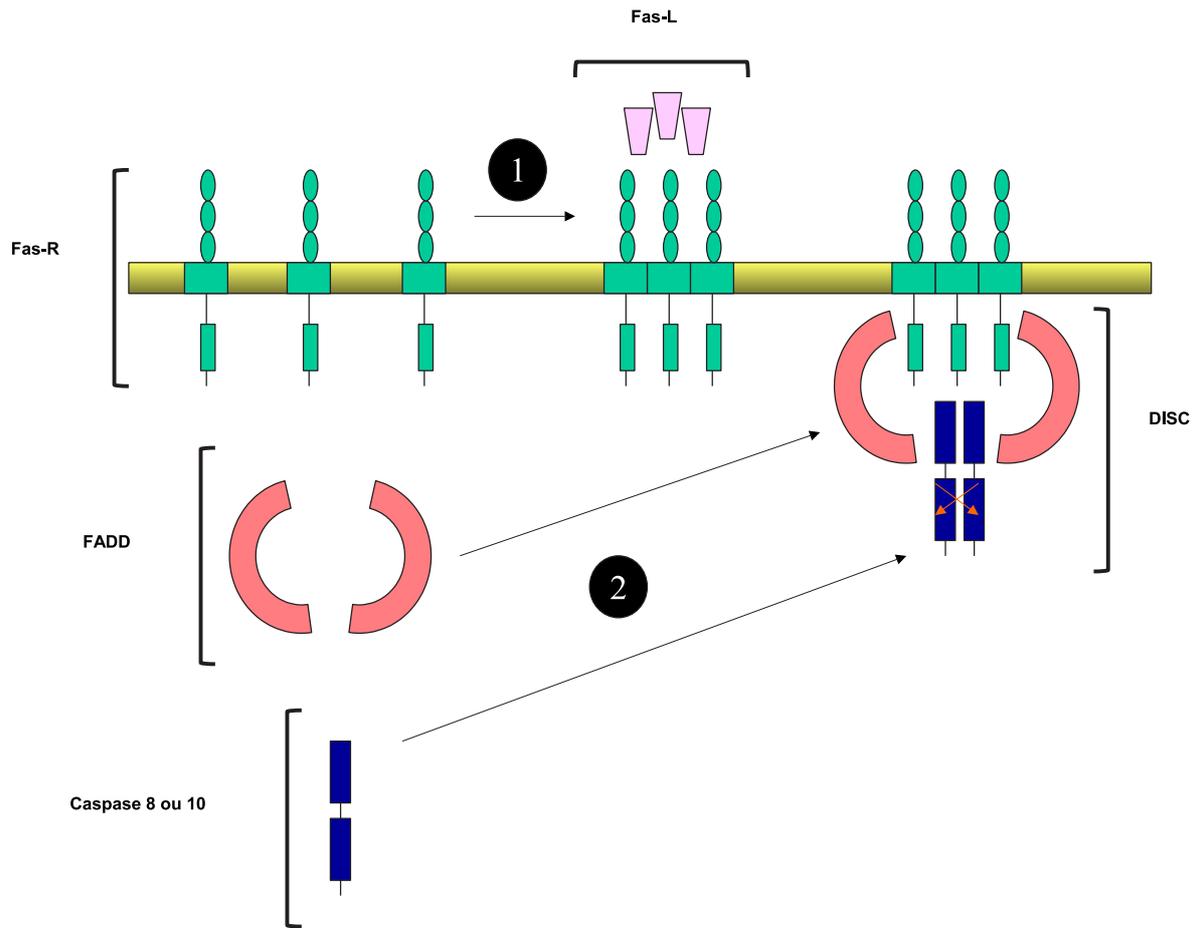


FIG. 1.6 – Formation du complexe de mort DISC et autoprotéolyse des caspases 8 et 10 (flèches croisées)

cepteurs sont connus (Fas-R/Apo-1/CD95, TNF-R1, DR3 (Death Receptor 3), TRAIL-R1 (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1), TRAIL-R2, DR6, p75-NGFR (p75-nerve growth factor receptor), EDAR (ectodermal dysplasia receptor)).

Induction de l'apoptose par le couple Fas-R (Récepteur) - Fas-L (Ligand)

En l'absence du ligand Fas, les récepteurs Fas [27, 28] sont inactifs. L'interaction avec Fas-L (ou un anticorps agoniste) provoque la trimérisation et l'activation du complexe Fas (figure 1.6). Après quelques secondes, un complexe multi-moléculaire sous-membranaire se met en place. Ce complexe est nommé DISC (Death Inducing Signaling Complex) et comprend les protéines adaptatrices FADD et les caspases 8 et 10 qui vont initier le processus d'apoptose. Ainsi, en les rapprochant, le DISC permet l'activation des caspases par autoprotéolyse.

Autres voies d'induction récepteur dépendantes

Le récepteur TNF-R1 est impliqué dans au moins deux voies d'activation différentes [26]. D'une manière similaire au couple que forment Fas-R et Fas-L, il peut s'associer avec son ligand (TNF- α) et ainsi réaliser un complexe sous-membranaire (figure 1.7). Celui-ci diffère du premier par l'insertion d'une molécule adaptatrice supplémentaire (TRADD) entre FADD et la région DD du domaine cytoplasmique du récepteur.

L'activation du même récepteur peut aboutir à l'activation de la caspase 2 par l'intermédiaire d'autres molécules adaptatrices (TRADD, RIP (Receptor Interacting Protein) et RAIDD (RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain)).

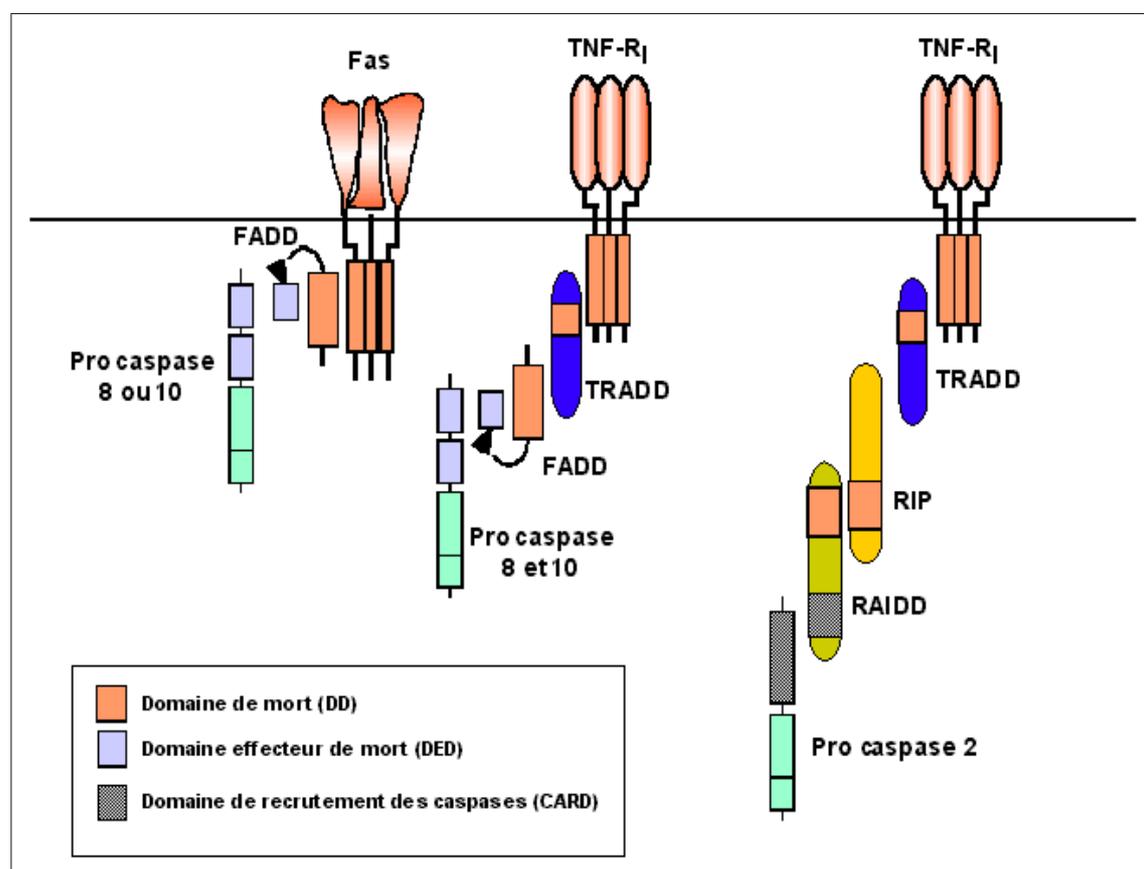


FIG. 1.7 – Activation des caspases par les récepteurs de mort.

1.3.3 Les BCL-2 et l'apoptosome mitochondrial

La famille des BCL-2

Les membres de la famille BCL-2 jouent un rôle pivot dans le processus apoptotique [29, 30]. Alors que les caspases ont une action cytoplasmique, la famille BCL-2 présente une action au niveau mitochondrial. Cette famille de protéines comprend 20 membres que l'on

peut classer en 2 sous-familles selon leur fonction : les membres anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, Mcl-1, Boo/Diva, A1/Bfl-1) et les membres pro-apoptotiques. Cette dernière sous-famille pouvant être scindée en 2 groupes : le groupe Bax (Bax, Bak) et le groupe des BH3 "only" (Bad, Bim, Bmf, Bid, Noxa, Puma). Ces protéines comprennent de 3 à 4 domaines BH (BCL-2 Homology) allant de BH1 à BH4, sauf le groupe des BH3 "only" qui, comme son nom l'indique, ne possède qu'un domaine BH. Ces domaines BH leur permettent de former des homo- ou hétérodimères. Tous les membres de cette famille, à l'exception des BH3 "only", possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet de s'insérer dans la membrane mitochondriale, dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et dans la membrane nucléaire externe. Certains membres semblent avoir la capacité de former des pores membranaires.

Les deux groupes de protéines pro-apoptotiques sont nécessaires pour initier l'apoptose : les protéines BH3 "only" semblent agir comme antagonistes des protéines anti-apoptotiques en formant avec ces dernières des hétérodimères, alors que le groupe Bax agit plus activement, en "rompant" la membrane mitochondriale.

En bref, BCL-2 et ses homologues anti-apoptotiques maintiennent l'intégrité de la membrane mitochondriale jusqu'à ce qu'ils soient neutralisés par les BH3 "only". Bax et Bak forment des homo-oligomères dans la même membrane provoquant une augmentation de sa perméabilité et la libération de molécules apoptogènes (figure 1.8).

Formation de l'apoptosome mitochondrial

Sous l'action des membres pro-apoptotiques de la famille des BCL-2, la mitochondrie libère dans le cytoplasme des molécules apoptogènes comme le cytochrome c, le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor), la protéine Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases / direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low pI), la protéine HtrA2 (high temperature-requiring proteins) et l'endonucléase G [31].

Le cytochrome c cytoplasmique initie la formation d'un complexe composé de Apaf-1, d'ATP et de la caspase 9. Ce complexe porte le nom d'apoptosome (figure 1.9) et permet la maturation et l'activation de la caspase 9.

L'activité de la caspase 9 est inhibée par les IAPs (inhibitors of apoptosis) et pour que le processus d'apoptose puisse se poursuivre, la protéine Smac/DIABLO va se charger d'inhiber IAPs. Htr A2 peut également neutraliser IAPs et donc permettre l'activité des caspases. L'AIF et l'endonucléase G prennent la direction du noyau pour, entre autres, y dégrader l'ADN.

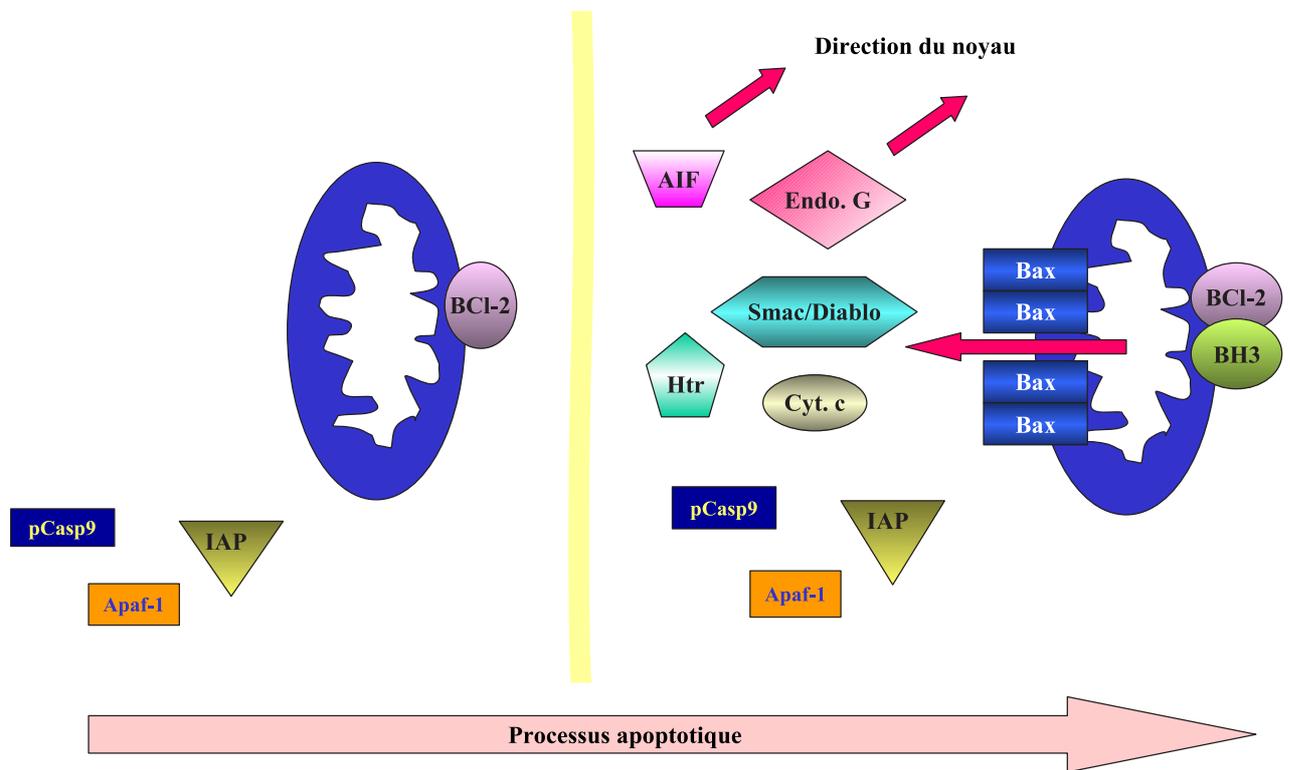


FIG. 1.8 – Action des BCL-2 pro-apoptotiques sur la mitochondrie et libération des molécules apoptogènes.

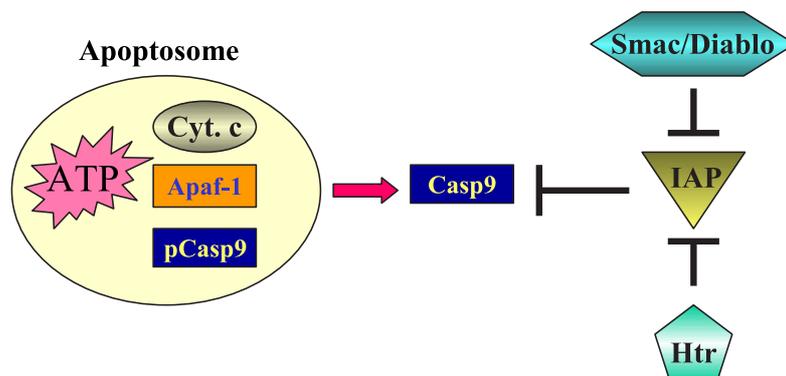


FIG. 1.9 – Formation de l'apoptosome et contrôle de l'activité de la caspase 9.

1.3.4 Participation du réticulum endoplasmique et du calcium dans la régulation de l'apoptose

Le réticulum endoplasmique (RE) peut intervenir dans l'induction et la régulation de l'apoptose [32]. Le RE initie l'apoptose dans la mesure où un stress qu'il subit, par exemple un mauvais repliement des protéines, engendre l'activation de la pro-caspase 12 située sur la face externe de sa membrane. La caspase 12 est capable d'activer entre autres la caspase 9.

Il a été observé qu'une élévation de la concentration cytoplasmique en calcium se produisait en début et fin d'apoptose [33]. Toutefois, une augmentation trop élevée de cette concentration aboutit à la nécrose.

Comme déjà mentionné précédemment, lors de l'apoptose, il se produit une sur-expression de BH3 "only" et de BCL-2 du groupe Bax. Les BH3 "only" forment des hétérodimères avec les BCL-2 anti-apoptotiques présents dans la membrane du RE et régulent la sortie de calcium du RE. Les membres du groupe Bax formeraient des canaux dans la membrane du RE permettant la sortie du calcium.

L'excès de calcium cytoplasmique a un effet sur le comportement de la mitochondrie qui est avide de calcium et qui voit sa membrane se dépolariiser. Elle libère ensuite son contenu en agents pro-apoptotiques.

Un autre effet de l'élévation de la concentration cytoplasmique en calcium est l'activation des calpains qui sont synthétisées sous forme de pro-enzymes et activées par clivage autocatalytique en présence de calcium (figure 1.10). Les calpains activées clivent ensuite les membres de la famille BCL-2, la caspase 12 et l'IAP.

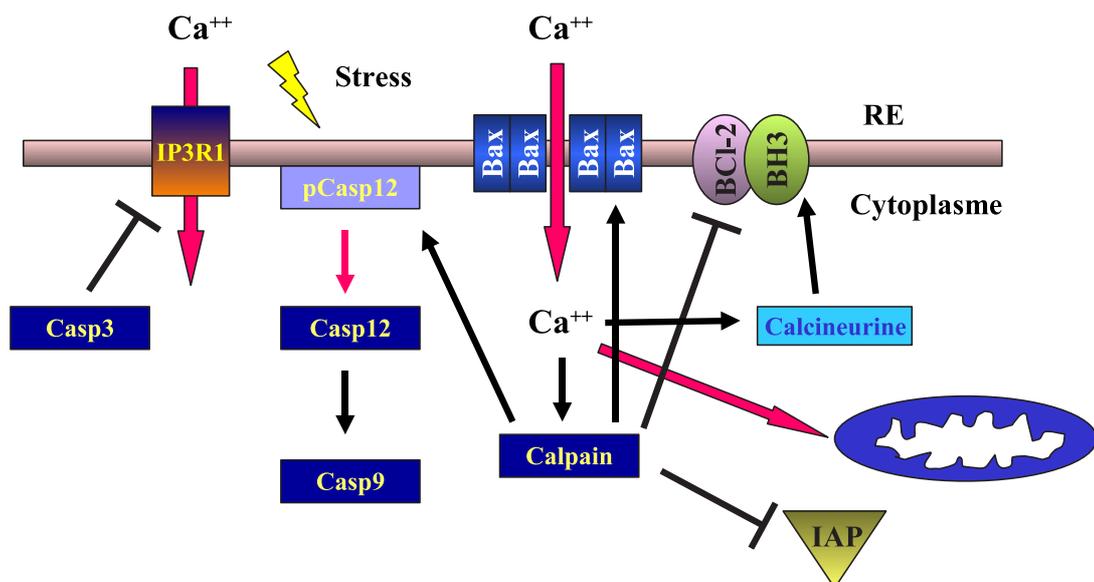


FIG. 1.10 – Implication du calcium et du réticulum endoplasmique dans l'apoptose.

Le calcium active également la calcineurine qui déphosphoryle et active BAD et donc augmente son hétérodimérisation avec les BCL-2 anti-apoptotiques et promeut ainsi l'apoptose.

Il est intéressant de signaler qu'il existe un rétrocontrôle négatif au niveau du RE. En effet, la caspase 3 clive et inactive IP3R1 (IP3-receptor1) qui favorise la sortie de calcium. Ce contrôle permettrait au système de ne pas s'emballer et de produire une nécrose.

1.3.5 Implication du duo perforine/granzyme dans l'induction de l'apoptose

Il existe une voie d'induction du mécanisme apoptotique qui fait intervenir les perforines et les granzymes [34]. Ces protéines sont sécrétées par les lymphocytes T cytotoxiques ou les "natural killer" pour éliminer de l'organisme les cellules infectées par un virus ou les cellules transformées. A ce jour, différents modèles d'action de ce système sont connus. Toutefois, tous mentionnent une action combinée de la perforine et des granzymes.

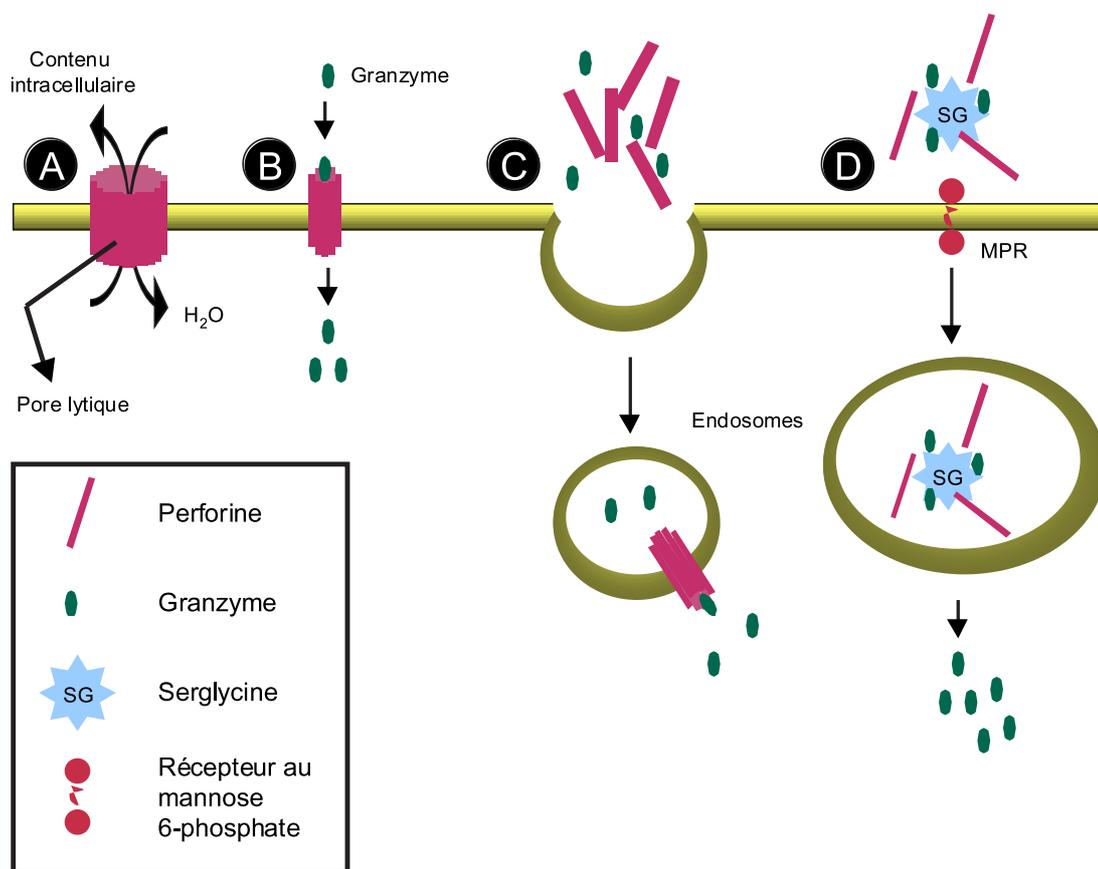


FIG. 1.11 – Modèles du mode d'action des granzymes et de la perforine dans l'induction de l'apoptose.

Le modèle initial (figure 1.11 A.) développé dans les années 80 ne tenait compte que de la perforine. On pensait que les cellules mouraient en se vidant de leur cytoplasme. Le

second modèle est apparu suite à la découverte de l'implication des granzymes. Dans ce modèle (figure 1.11 B.), les granzymes diffusent au travers du canal formé par la perforine pour accéder à leurs substrats, les caspases. Un autre modèle a vu le jour dans les années 90 (figure 1.11 C.) : les granzymes entrent dans la cellule par endocytose indépendamment de la perforine. En absence de perforine, les granzymes restent séquestrés dans les vésicules d'endocytose. Lorsque la perforine est présente, ils sont alors libérés dans le cytoplasme. Le modèle le plus récent (figure 1.11 D.), qui fait encore l'objet de nombreux débats, est similaire au troisième. Dans ce modèle, les granzymes et la perforine associés à d'autres molécules comme la serglycine seraient endocytés suite à l'interaction avec le récepteur au mannose 6-phosphate.

1.3.6 Connexines : communication de mort

Les connexines sont des jonctions de type gap qui propageraient l'apoptose de cellules en cellules [35]. Un des messagers qui emprunterait ces canaux serait le calcium.

1.3.7 Protéine p53 et induction de l'apoptose suite à l'altération de l'ADN

Un des rôles de l'apoptose est d'éliminer les cellules présentant des défauts au niveau de l'ADN. Suite à la détection d'une altération du brin d'ADN, la cellule en arrête momentanément la réplication et suspend sa division cellulaire. Selon l'ampleur des dommages, la cellule prend la décision de réparer l'ADN ou de rentrer en apoptose. Il a été abondamment démontré que la protéine p53 jouait plusieurs rôles dans ce processus [36].

p53 serait capable de repérer les régions d'ADN endommagées et d'éventuellement les réparer. p53 peut activer la transcription de nombreux gènes (gènes codant pour la famille BCL-2 et pour Fas-R) et réguler négativement la transcription de gènes codant pour les IAPs. p53 pourrait également agir plus directement, en neutralisant les IAPs ou en inhibant les BCL-2 anti-apoptotiques en s'y fixant.

1.3.8 Protéines de stress

Les protéines de stress, ou hsp (heat shock protein) sont des protéines chaperonnes qui se lient aux protéines en cours de synthèse pour permettre leur repliement et leur translocation dans les organites appropriés. Elles sont aussi capables de rétablir la fonction de protéines dénaturées. Bien qu'aucun mécanisme précis n'ait été décrit, les hsp montrent un effet protecteur de suppression de l'apoptose [37]. Les deux hsp les plus connues sont hsp 70 et hsp 27. Elles inhiberaient l'activation de la pro-caspase 9 en se fixant à apaf 1 et réguleraient négativement la caspase 3.

1.3.9 Potassium : régulateur des enzymes apoptotiques

Le calcium n'est pas le seul médiateur ionique de l'apoptose. En effet, suite à une modification du comportement de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, la concentration cytoplasmique en potassium diminue lors de l'apoptose [38]. La diminution de la concentration de cet ion est indispensable au bon déroulement de la cascade apoptotique. En effet, l'activation des caspases est totalement inhibée par un niveau physiologique de potassium. De plus, il semble que le potassium inhiberait directement les nucléases apoptotiques.

1.3.10 Rôle inhibiteur des kinases

Ces kinases font partie d'une cascade qui permet de maintenir la cellule en vie suite à la stimulation de récepteurs trophiques par un facteur de croissance, par exemple le NGF (Nerve Growth Factor) dans le cas des neurones. Les membres de la famille Raf sont des protéines sérine/thréonine kinases qui sont impliquées dans ce type de cascade. Par exemple, Raf est capable d'inactiver Bad par phosphorylation. Il existe d'autres cibles mitochondriales, par exemple VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) avec lesquelles Raf peut interagir et donc inhiber l'apoptose [39].

Certaines tyrosines kinases déclenchent des cascades de phosphorylation qui débouchent sur la phosphorylation de Bad qui s'associe alors avec une protéine cytoplasmique, la 14-3-3.

1.3.11 Action de la transglutaminase II

Cette enzyme est dépendante du calcium et forme des liaisons entre les protéines. Ce processus permet la formation d'une coque rigide en dessous de la membrane des corps apoptotiques. Cela a pour but de prévenir la fuite de matériel cellulaire avant la phagocytose des corps apoptotiques.

1.3.12 Dégradation de l'ADN

La dégradation de l'ADN lors de l'apoptose est caractéristique. Les nucléases produisent des fragments de chromatines multiples de 180-200 paires de base, ce qui correspond à des clivages au niveau de l'espace entre deux unités internucléosomales (figure 1.12). Une des nucléases qui en est responsable est la CAD (Caspase-Activated Dnase). Elle est séquestrée sous forme inactive dans le cytoplasme par ICAD (Inhibitor of CAD) qui possède un site de clivage pour la caspase 3.

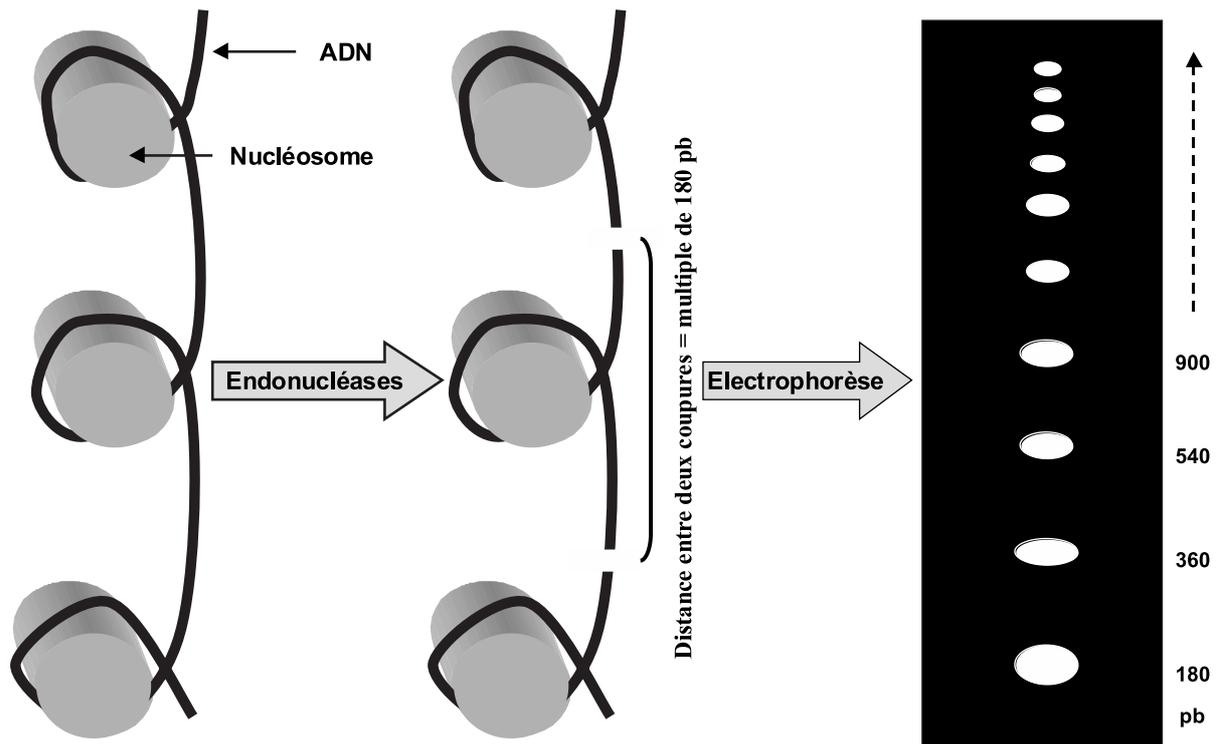


FIG. 1.12 – Dégradation de l'ADN durant l'apoptose.

1.4 Clairance des cellules et corps apoptotiques

1.4.1 Remodelage de la membrane

Exposition de la phosphatidylsérine

En temps normal, les phospholipides constituant la membrane plasmique sont distribués de manière asymétrique [40]. La phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline sont majoritairement présentes dans la couche externe, alors que la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont préférentiellement confinées dans la couche interne. Cette asymétrie est maintenue par une série de protéines qui régulent le phénomène de "flip-flop", c'est-à-dire l'échange de phospholipides entre les deux couches. La translocase est une flippase qui favorise le passage de la PC depuis la couche interne vers la couche externe de la bicouche lipidique. L'amino phospholipide translocase (APT) est également une flippase mais qui cette fois rapatrie la PS et la PE exposées. Les scramblases assurent un brassage des phospholipides entre les deux feuillet de la membrane plasmique. Il existe une autre classe de transporteur de phospholipides, les floppases qui assurent un rôle inverse aux flippases. Ces floppases sont ATP et calcium dépendantes.

L'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium qui se produit lors de l'apoptose engendre une inhibition des flippases [41], une sur-activation des scramblases [42]

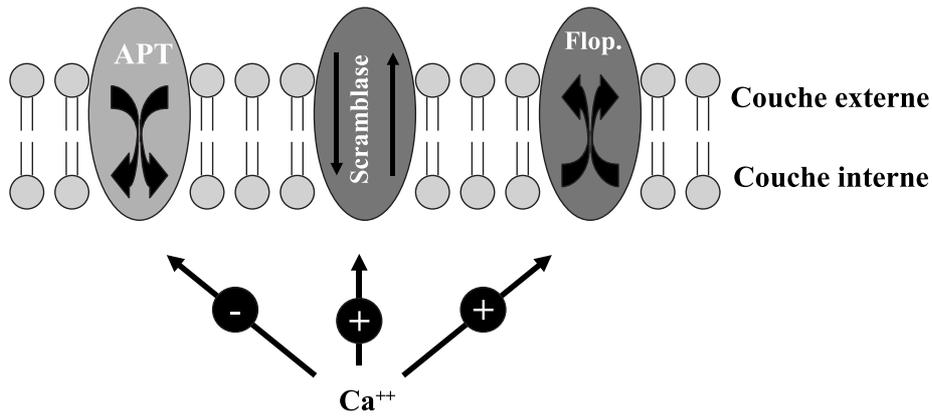


FIG. 1.13 – Régulation de l'exposition de la phosphatidylsérine.

et une activation des floppases [42] (figure 1.13). Toutefois, certaines études ont montré que les scramblases pouvaient être la cible des caspases. Certains auteurs ont également démontré qu'une oxydation sélective de la PS par le cytochrome c faciliterait son exposition [43].

Il résulte de toutes ces modifications des transporteurs assurant le flip-flop, une exposition de la PS dans le feuillet externe de la membrane de la cellule apoptotique.

Autres modifications de la structure des membranes

Lors de l'apoptose, on assiste également à un changement de la nature des glycoprotéines membranaires. Après la perte des acides sialiques terminaux, ces glycoprotéines peuvent être reconnues par des lectines situées à la surface des macrophages [44].

Il se produit également un affichage de marqueurs membranaires (CD36) et extracellulaires (thrombospondine et vitronectine) qui assurent la reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques par les macrophages.

1.4.2 Phagocytose des cellules et corps apoptotiques

L'exposition de la PS et la modification des sucres membranaires sont des signaux adressés aux macrophages ou aux cellules voisines. Le message destiné à ces cellules est "mangez-moi!". Il existe beaucoup de récepteurs membranaires sur les macrophages qui peuvent reconnaître ces signaux : les récepteurs "scavenger", les LDLR (Low Density Lipoprotein Receptors), CD14, β 2 glycoprotéine 1 ou gas-6, lectines [44]. Toutefois, il semble qu'un récepteur spécifique à la PS soit aussi responsable de la reconnaissance des cellules apoptotiques et de leur phagocytose [44]. Ces récepteurs montrent une interaction stéréospécifique avec la PS et sont largement exprimés dans différents tissus.

1.4.3 Absence de réaction inflammatoire

A l'inverse de la nécrose, on associe souvent apoptose et absence de réaction inflammatoire. On peut justifier cela par l'absence de déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire et la rapidité d'élimination des cellules apoptotiques par le système réticulo-endothélial qui jouent en faveur de cette absence d'inflammation. Cependant, il a été montré que les récepteurs de PS ont aussi un rôle actif dans cette discrétion envers le système inflammatoire [45]. La stimulation de plusieurs des récepteurs impliqués dans la phagocytose des cellules apoptotiques a pour effet la production de protéines anti-inflammatoires comme le TGF- β 1 et la PGE2, ce qui est associé à la diminution de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-8.

1.5 Rôles de l'apoptose

1.5.1 Rôles physiologiques

L'apoptose trouve son utilité tout au long de la vie d'un organisme. On retrouve cette forme de mort cellulaire chez tous les organismes vivants. Parmi les exemples les plus connus, on peut citer : la chute des feuilles en automne et la régression de la queue du têtard lors de sa métamorphose en grenouille. L'apoptose est abondamment sollicitée lors du développement [46]. Elle est, par exemple, responsable :

- de la délétion des espaces interdigitaux,
- de l'atrésie folliculaire,
- de l'élimination de près de 85 % des neurones dans le cerveau en développement suite à une privation de facteurs de croissance comme le NGF [47],
- de la disparition de 95 % des cellules du système immunitaire pendant la sélection opérée au niveau du thymus [48]. Durant cette sélection, l'apoptose est induite par le biais des récepteurs Fas.

A l'âge adulte, l'apoptose aura principalement pour rôle de maintenir l'homéostasie cellulaire, c'est-à-dire d'éliminer les cellules vieillissantes pour laisser place aux nouvelles cellules issues d'une mitose. L'apoptose permet également à l'organisme d'éliminer toutes cellules présentant un danger pour celui-ci, par exemple les cellules infectées [49], endommagées ou potentiellement cancéreuses.

1.5.2 Rôles pathologiques

Pathologies liées à un défaut d'apoptose

Le cancer est en partie causé par à un défaut d'apoptose. Lorsque la cellule devient cancéreuse, son génome subit différentes mutations qui entre autres lui éviteront de rentrer en apoptose [50]. Ainsi la mutation de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques interdit à la cellule de se sacrifier pour l'intérêt de l'organisme. Parmi eux, on trouve le gène p53. Certaines mutations ont pour effet la surexpression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques, comme BCL-2.

Les maladies auto-immunitaires comme le lupus érythémateux [51] ou l'arthrite rhumatoïde sont des maladies caractérisées par la production d'auto-anticorps produits par les lymphocytes T autoréactifs qui n'ont pas correctement été éliminés au niveau du thymus.

Pathologies liées à un excès d'apoptose

Les maladies neurodégénératives [52] comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique se caractérisent par une perte progressive de neurones. L'apoptose responsable de cette perte de neurones est induite par la présence dans le cerveau de protéines neurotoxiques comme la protéine amyloïde- β dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

Durant le développement embryonnaire, d'autres substances toxiques, par exemple l'alcool, peuvent avoir un effet délétère sur le développement du cerveau de l'enfant, c'est ce que l'on appelle le syndrome alcoolique foetal [53].

Les neurones peuvent également emprunter la voie apoptotique lorsqu'ils ne font pas l'objet de neurotransmission. En effet, un blocage des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) au début de la vie suffit pour engendrer une mort par apoptose des neurones [54]. Cependant, il a aussi été constaté qu'une stimulation trop importante de ces mêmes récepteurs provoquait une élévation de la concentration cytoplasmique en calcium et une diminution de la concentration cytoplasmique en potassium [55] qui, comme déjà mentionné précédemment débouche sur le phénomène apoptotique.

Les maladies neurodégénératives ne sont pas les seules à être causées par un excès d'apoptose, l'excès d'apoptose est également impliqué dans :

- les phénomènes d'ischémie-reperfusion [56] et de rejet de greffe [57],
- les maladies virales comme le SIDA [58] ou l'hépatite,
- l'instabilité et la rupture des plaques d'athérosclérose [59],
- le diabète [60],
- l'anémie, la neutropénie, la thrombocypénie et l'alopecie.

1.5.3 Rôles thérapeutiques

Les thérapies anti-tumorales sont souvent basées sur l'induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuses [61]. La survie et le développement de certaines tumeurs sont dépendants de facteurs trophiques, c'est le cas des tumeurs hormono-dépendantes comme certains cancers de la prostate et du sein. Ce dernier peut par exemple être traité par le tamoxifène qui n'est rien d'autre qu'un anti-œstrogène. D'autres agents chimio-thérapeutiques ont un effet cytotoxique sur les cellules en bloquant leur division ou la réplication de leur ADN. Grâce à ces traitements, non seulement la cellule cesse de proliférer, mais en plus elle rentre en apoptose. Pour entraver la réplication de l'ADN, certains agents interagissent directement avec celui-ci, par exemple les sels de platine. D'autres interagissent avec les topoisomérases, c'est le cas de l'anthracycline, de l'ectoposine et de la camptothécine, ou se comportent en antimétabolites (gemcitabine). Il existe aussi des drogues comme le taxol qui empêche la formation du fuseau mitotique.

1.6 Conclusion

L'apoptose est une forme de mort cellulaire discrète et programmée qui suit un mécanisme commun à tout organisme vivant. Elle trouve son utilité à plusieurs reprises dans le développement embryonnaire et durant la vie adulte. Un large spectre de pathologies peut faire suite à sa mauvaise régulation. Elle est abondamment utilisée par les oncologues lors des traitements chimiothérapeutiques. C'est pour toutes ces raisons qu'un nombre toujours grandissant de systèmes de détection, de mise en évidence et d'identification de ce processus sont développés.

Chapitre 2

Détection de l'apoptose

2.1 Annexine V

L'annexine V est une protéine soluble dans l'eau qui se lie à la phosphatidylsérine avec une forte affinité (K_d de l'annexine V bovine = $6 \cdot 10^{-9}M$, mesure réalisée par ellipsométrie) en présence de calcium [62, 63]. Elle est par conséquent utilisée dans bon nombre de systèmes de détection de l'apoptose qui seront développés dans les paragraphes suivants.

Cette protéine cytoplasmique, largement répandue parmi les organismes vivants, est connue sous de multiples appellations (PAPI, endonexine II, inhibiteur de la coagulation sanguine, 35K-calelectrine, PP4 (Placental Protein), $VAC\alpha$ (Vascular AntiCoagulant), anchorine CII, 35- γ -calcimedine, calphobindine I ou lipocortine V), chacune évoquant une de ses fonctions étudiées au moment de sa (re)découverte (inhibition de la coagulation sanguine, inhibition de la phospholipase A2, canal ionique, interaction avec le cytosquelette, implication dans l'endo- et l'exocytose, inhibition de protéines kinases, implication dans la prolifération et la différenciation cellulaire).

L'annexine V [64] est une protéine de 35,8 kDa composée de 320 acides aminés répartis en 4 domaines (I à IV), chacun formé par 5 hélices alpha organisées en super hélices droites (Figure 2.1). Les domaines I/III et II/IV sont fortement homologues deux à deux, tandis que les domaines I/IV et II/III sont étroitement associés par un effet hydrophobe. La protéine est donc divisée en deux modules relativement distants qui présentent face à face des résidus polaires et chargés formant un pore hydrophile au centre de la molécule. Ce pore renferme des molécules d'eau structurée.

De profil, l'annexine V est légèrement incurvée avec une face concave et une face convexe, où se situent 5 sites de haute affinité pour le calcium au niveau d'une séquence consensus X-K-G-X-G-T (où X = V ou L). Il est maintenant évident que l'annexine V se fixe aux têtes polaires des phospholipides par l'intermédiaire des ions calcium. Le mécanisme global d'interaction n'est pas encore bien défini. Il a toutefois été montré que certains résidus jouaient un rôle primordial dans cette interaction. C'est le cas du tryptophane-187 [65] ou

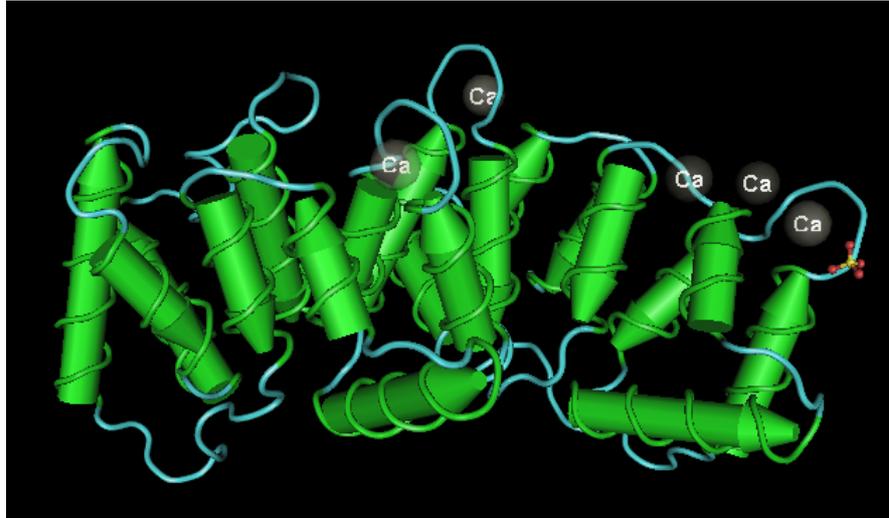


FIG. 2.1 – Représentation 3D de l'annexine V.

de certains résidus arginine [66] .

Au contact de la bicouche lipidique, l'annexine V forme des cristaux bidimensionnels dans lesquels elle s'organise spontanément sous forme de trimère [67]. L'annexine s'approche de la bicouche par sa face convexe et interagit avec elle par l'intermédiaire des ions calcium qu'elle arbore. Si on considère que la surface de la tête polaire d'un phospholipide est de $0,65 \text{ nm}^2$ et que celle de l'annexine V est de $27,4 \text{ nm}^2$, la liaison d'une seule molécule d'annexine affecte plus de 40 phospholipides.

2.2 Revue des outils de biologie moléculaire disponibles pour la mise en évidence de l'apoptose

La boîte à outils du chercheur déborde de systèmes de mise en évidence du processus apoptotique. Les catalogues de biologie moléculaire regorgent de kits de détection tous plus efficaces les uns que les autres. Leurs applications sont toutefois limitées aux tests *in vitro* (ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), cytométrie de flux et microscopie). Comme tel, aucun d'entre eux ne peut être appliqué *in vivo* (Tableau 2.1). Ces systèmes de détection sont néanmoins d'une grande utilité et indispensables dans l'étude de l'apoptose.

2.2.1 Systèmes basés sur la détection de la morphologie de la cellule apoptotique

La morphologie des cellules apoptotiques peut être observée en microscopie optique, électronique [68] ou confocale. Grâce à une coloration de la chromatine par des fluorochromes tel que l'Hœchst, il est possible d'observer la formation de croissants de lune dans le noyau

apoptotique. Il est également possible d'observer la structure générale de la cellule apoptotique (voir §1.2).

2.2.2 Systèmes basés sur la détection de la fragmentation de l'ADN

Barreaux d'échelle [69]

La fragmentation de l'ADN durant l'apoptose est tout a fait particulière dans la mesure où elle se fait de manière régulière (voir §1.3.12). Ce phénomène peut être visualisé en faisant migrer sur gel d'agarose l'ADN provenant d'une cellule en apoptose. Après coloration par du bromure d'éthidium, le gel laisse apparaître une figure en "barreaux d'échelle" avec chaque barre correspondant à un multiple de 180 pb (figure 1.12).

Méthode TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling) [70]

La méthode TUNEL permet de détecter les extrémités 3' libres de l'ADN générées par l'intervention des endonucléases. La Terminal deoxynucleotide Transferase (TdT) utilisée dans cette méthode est une enzyme capable d'incorporer des bases aux extrémités 3' de l'ADN sans utiliser de modèle. Si les bases incorporées sont marquées avec de la biotine, les noyaux apoptotiques peuvent être mis en évidence par incubation avec de la streptavidine couplée à une molécule rapporteuse (peroxydase, phosphatase, fluorescéine, etc.). Par contre si les bases sont couplées à de la fluorescéine (FITC) l'observation peut se faire directement par microscopie ou par cytométrie de flux.

Détection des fragments d'ADN associés aux histones [71]

Cette détection se fait par ELISA de type sandwich. Des anti-histones sont fixés sur la plaque avant que l'on y ajoute l'échantillon contenant les histones et l'ADN. Le complexe formé par ces derniers est ensuite mis en évidence par l'ajout d'anti-ADN-peroxydase.

2.2.3 Systèmes basés sur les changements de la membrane plasmique

L'apoptose provoque la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique (voir §1.4.1). La phosphatidylsérine exposée peut être détectée par l'utilisation d'annexine V [69, 72, 73] ou plus rarement d'anticorps polyclonaux spécifiques [74].

L'annexine peut être couplée directement à des molécules rapporteuses comme le FITC, le Cy3.18 ou la biotine qui sera reconnue par de la streptavidine elle-même couplée à une molécule rapporteuse (phosphatase, peroxydase, FITC, rouge Texas, etc.).

Ce type de système est abondamment employé mais il présente une lacune car il n'est pas totalement spécifique de l'apoptose. En effet, lors de la nécrose la membrane cellulaire se rompt ce qui donne accès à la phosphatidylsérine confinée dans la face interne de la membrane. Il est donc recommandé d'utiliser un double marquage pour différencier ces deux types de mort. Le second marquage se base généralement sur la mise en évidence grâce à l'iodure de propidium de la différence de perméabilité membranaire entre les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques. Ce second marquage peut également se faire par du 6-CFDA (diacétate de 6-carboxyfluorescéine) qui devient fluorescent une fois hydrolysé par les estérases présentes dans les cellules saines et apoptotiques.

2.2.4 Systèmes basés sur les changements subis par la mitochondrie

La dissipation du potentiel de membrane mitochondriale qui a lieu durant l'apoptose peut être détectée par l'utilisation de fluorochromes cationiques qui changent de longueur d'onde d'émission en fonction de leur concentration [69]. Il est également possible de marquer les molécules libérées par la mitochondrie telles que le cytochrome c ou l'AIF (voir §1.3.3) par des anticorps mono ou polyclonaux [69].

2.2.5 Systèmes basés sur l'activité des caspases

La présence de l'activité des caspases (voir §1.3.1) peut être démontrée par la capacité qu'a le lysat cellulaire à cliver des substrats peptidiques synthétiques (dérivés de la rhodamine) qui miment la séquence spécifiquement reconnue par l'enzyme [69, 73]. On peut également utiliser des anticorps dirigés contre la forme activée des caspases.

Système basés sur :	détecteur	molécule rapporteuse	instrument et technique	conservation de l'intégrité de la cellule	quantitatif
L'observation morphologique					
	Hoechst possible	—	microscopie optique, confocale et électronique	non car fixation	non
La dégradation de l'ADN					
"barreaux d'échelle"	—	—	électrophorèse	non	non
TUNEL	nucléotide-biotine	streptavidine-peroxydase et streptavidine-phosphatase	microscopie optique	non car fixation	non
	nucléotide-FITC	streptavidine-FITC	microscopie confocale et cytométrie de flux	oui	possible
complexe histone-ADN	anti-histone	anti-ADN peroxydase	ELISA	non	oui
L'exposition de la phosphatidylsérine					
	annexine V - biotine	streptavidine-peroxydase et streptavidine-phosphatase	microscopie optique	non car fixation	non
	annexine V - FITC	streptavidine-FITC et streptavidine-rouge Texas	microscopie confocale et cytométrie de flux	oui	possible
	annexine V - Cy3.18	—			
Les modifications de la mitochondrie					
diminution du potentiel de la membrane mitochondriale		fluorochrome cationique	microscopie confocale et cytométrie de flux	oui	possible
libération de molécules : cytochrome c et AIF	Anticorps mono ou poly clonaux	Anticorps secondaires marqués			
			ELISA	non	oui
L'activation des caspases					
		Substrat de caspases	ELISA	non	oui
	Anticorps anti-caspases activées	Anticorps secondaires marqués	microscopie confocale et cytométrie de flux	oui	possible

TAB. 2.1 – Revue des différentes modalités de détection de l'apoptose *in vitro*

2.3 Spectroscopie RMN de l'apoptose

2.3.1 Principe de la spectroscopie RMN

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) [75] est basé sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques, comme l' ^1H , le ^{13}C ou le ^{31}P qui possèdent un nombre de spin non nul. Les noyaux de spin égal à $1/2$ peuvent prendre une orientation parallèle ou antiparallèle à la direction du champ magnétique. A l'équilibre, l'orientation parallèle est plus peuplée, car son niveau d'énergie est plus bas. La différence d'énergie entre les deux orientations est proportionnelle à la valeur du champ et la fréquence qui lui est associée est appelée fréquence de Larmor. Le phénomène de résonance se produit lorsqu'une onde électromagnétique, de fréquence identique à la fréquence de Larmor des noyaux, leur transmet son énergie. Le retour à l'équilibre du système s'accompagne de l'émission d'un signal RMN. Pour une facilité de compréhension, on peut aborder ce phénomène à l'échelle macroscopique. Ainsi la résultante de noyaux précessant autour de la direction du champ magnétique (B_0) est équivalente à un moment magnétique, appelé aimantation nette (M_0). M_0 bascule d'un angle déterminé lorsqu'il est soumis à une impulsion de radiofréquence (RF) de durée déterminée (Figure 2.2).

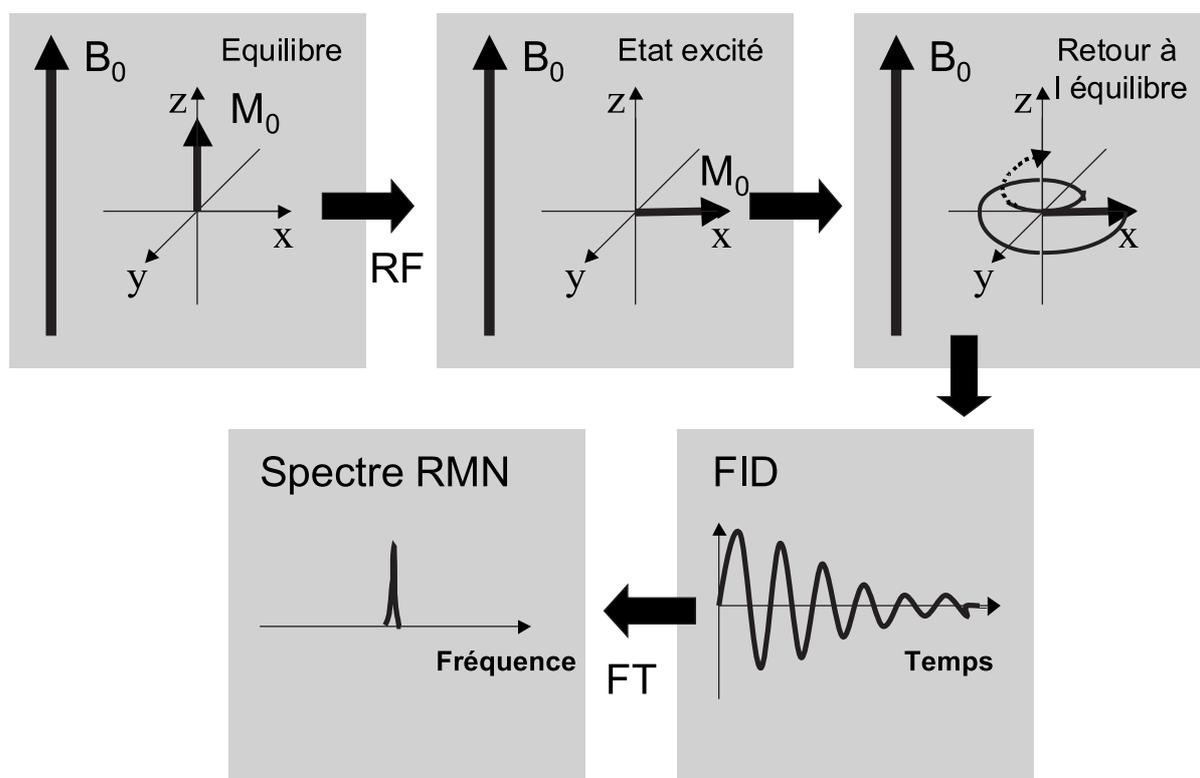


FIG. 2.2 – Principe de la spectroscopie RMN.

Le retour du vecteur macroscopique vers l'état d'équilibre est accompagné d'une précession autour de B_0 à la fréquence de Larmor. Ceci crée un champ magnétique oscillant qui

crée une tension alternative aux bornes de l'antenne de réception. Le signal décroissant émis par un échantillon placé dans un champ magnétique suite à une impulsion RF est appelé signal de précession libre ou FID (Free Induction Decay). L'application de la transformée de Fourier permet de transformer le signal détecté dans le domaine de temps en un spectre, c'est-à-dire un graphique représentant l'intensité du signal en fonction de la fréquence. Le noyau étudié émet un signal dont la fréquence dépend de son environnement magnétique, c'est ce que l'on appelle le "déplacement chimique". Sur un spectre RMN, il y a donc autant de déplacements chimiques qu'il y a de positions différentes du noyau au sein de la molécule.

2.3.2 De la RMN du proton au dosage de l'apoptose

Il a été démontré qu'il était possible de déterminer la proportion de cellules apoptotiques dans des populations cellulaires par RMN du proton. En effet, en 1996, Blankenberg et ses collaborateurs [76] ont observé une augmentation du rapport du signal du méthylène (1,2 ppm) et du méthyle (0,9 ppm) provenant d'un échantillon de cellules Jurkat (lymphocytes tumoraux) après traitement par un agent pro-apoptotique, la doxorubicine (figure 2.3). Par la suite, les auteurs ont corrélé cette augmentation du rapport CH_2/CH_3 avec le pourcentage de cellules apoptotiques [77]. Il a également été observé chez les cellules exposées, une diminution du pic de la choline au cours du temps.

Tous ces changements seraient dus à la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme de la cellule apoptotique [78, 79, 80, 81], suite à l'activation des phospholipase A2 et C. La phospholipase A2 hydrolyse la phosphatidylcholine en acides gras et en lysophosphatidylcholine. La phosphatidylcholine et sa version lyso subissent ensuite l'action de la phospholipase C, ce qui aboutit à la formation de phosphocholine.

Depuis d'autres groupes ont tenté d'appliquer les mêmes mesures *in vivo* [82]. Bien que les résultats semblent différer quelque peu en fonction du type de modèle utilisé, des changements significatifs au niveau de l'intensité des pics lipidiques au cours de traitements anti-tumoraux ont été observés.

2.3.3 Existence d'une signature de l'apoptose en RMN du phosphore

Beaucoup d'études de RMN du phosphore ont été conduites sur des extraits cellulaires et ont permis de mettre en évidence certaines modifications du métabolisme se produisant lors de l'apoptose. Certains chercheurs ont étudié les changements métaboliques associés à l'apoptose. Bien qu'ils aient observé une importante augmentation en fructose 1,6 bis-phosphate *in vitro* [83], le même examen *in vivo* [84] ne s'est pas avéré fructueux. Ce type d'étude n'est cependant pas d'un grand intérêt dans le contexte de la mise en évidence de l'apoptose en clinique, on préférera des études non invasives menées *in vivo*.

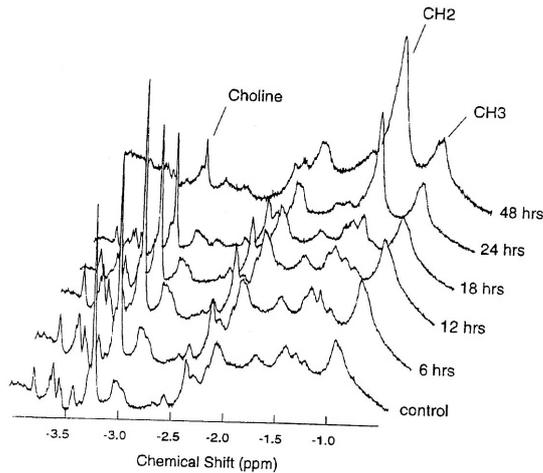


FIG. 2.3 – Evolution des spectres RMN du proton au cours du temps dans une culture traitée à la doxorubicine [77].

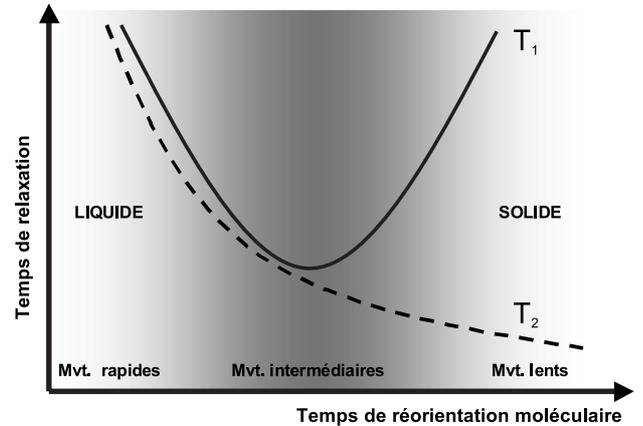


FIG. 2.4 – T_1 et T_2 en fonction de la nature du milieu

2.4 Apport des temps de relaxation

2.4.1 Principe de la relaxométrie

Les temps de relaxation T_1 (temps de relaxation longitudinale ou spin-réseau) et T_2 (temps de relaxation transversale ou spin-spin) caractérisent le phénomène de relaxation magnétique nucléaire [75]. La relaxation est le processus par lequel les spins excités évoluent et retournent à leur état d'équilibre. Le T_1 caractérise l'évolution temporelle du vecteur M_0 vers sa valeur d'équilibre le long de l'axe longitudinal (axe z). T_2 caractérise sa décroissance dans le plan transverse (x-0-y). Les valeurs de ces temps de relaxation sont étroitement liés à la dynamique moléculaire de l'édifice auquel appartient le noyau. La figure 2.4 montre que le T_2 diminue à mesure que le milieu devient solide, c'est-à-dire que les mouvements sont de plus en plus lents. T_1 présente un comportement plus complexe car il atteint une valeur minimale lors de mouvements intermédiaires dont la fréquence est proche de celle de la résonance des noyaux considérés.

2.4.2 Temps de relaxation transversale et diagnostic de l'apoptose

Il a été démontré qu'une diminution du T_2 protonique d'une suspension cellulaire pouvait être corrélée avec la présence de l'activation des caspases [85]. Il est évident que la réorganisation du cytosquelette contribue à ces variations. Cependant, l'augmentation de la concentration en peptides produits par la protéolyse des caspases en serait la cause majeure. Bien que très intéressante, cette technique n'a pas encore été appliquée *in vivo*.

2.5 Diagnostic de l'apoptose par IRM

2.5.1 Principe de l'imagerie par résonance magnétique

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) [75] fournit des images composées de pixels (Picture Elements) dont le niveau sur l'échelle de gris représente l'intensité du signal produit par le voxel (Volume Element) correspondant. Une image IRM est donc une cartographie du signal RF (Radio Fréquence) produit par un élément. Ce signal généralement issu de ^1H est influencé par la concentration de cet élément, mais aussi par la nature chimique et physique du milieu qui l'entoure.

Une expérience IRM est réalisée selon les étapes suivantes :

- localisation des noyaux d'intérêt,
- excitation des noyaux sélectionnés,
- encodage spatial du signal,
- détection du signal et reconstruction de l'image.

Afin de localiser les différentes parties de l'échantillon, on fait varier le champ magnétique de façon linéaire à travers l'espace. Les fréquences de résonance varient elles aussi en fonction de leur position dans le gradient de champ magnétique (Figure 2.5). En combinant des gradients de champ appliqués selon les trois axes de l'espace, il est possible de localiser avec précision les noyaux contenus dans l'échantillon.

Pour obtenir l'image d'une tranche au travers de l'échantillon, il suffit alors d'appliquer une onde RF à la fréquence correspondant au champ magnétique auquel sont soumis les noyaux de la tranche choisie (Figure 2.6). Ainsi, seuls ces noyaux seront excités.

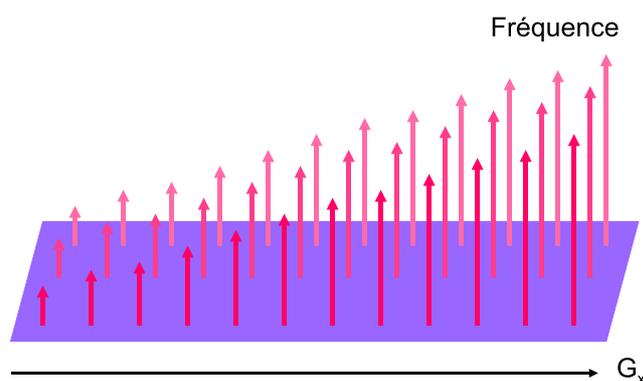


FIG. 2.5 – Effet du gradient de champ magnétique sur les fréquences de résonance

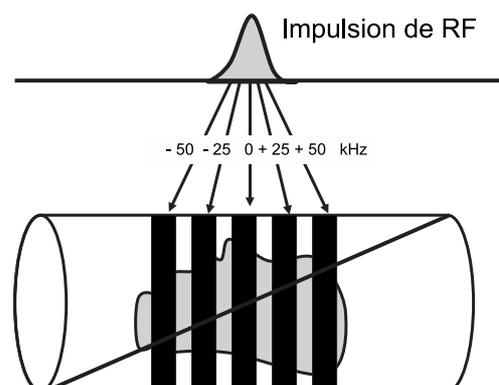


FIG. 2.6 – Sélection de coupes à travers un échantillon

L'épaisseur de la coupe est inversement proportionnelle à l'intensité du gradient et à la longueur de l'impulsion appliquée. La position de chaque voxel est déterminée grâce à la combinaison de deux méthodes d'encodage : l'encodage en phase et en fréquence. Le gradient d'encodage en phase (selon l'axe y) et le gradient d'encodage en fréquence (selon

l'axe x) déphasent les spins et donnent des informations complémentaires sur la position des voxels par rapport à la direction des gradients. Le signal provenant de chaque voxel est ensuite détecté et l'image est reconstruite.

En clinique, la résolution spatiale de l'IRM est de l'ordre du millimètre. Les imageurs de recherche permettent d'atteindre une résolution de $100\ \mu\text{m}$. La résolution temporelle dépend fortement du type de séquence employée et les techniques dites d'imagerie rapide diminuent fortement le temps d'acquisition mais généralement au détriment de la résolution spatiale.

Il existe un nombre important de séquences d'imagerie. Certaines favorisent l'influence du T_1 et sont appelées "séquences pondérées en T_1 " et d'autres, qui valorisent préférentiellement T_2 sont appelées "séquences pondérées en T_2 " [86].

2.5.2 Agents de contraste IRM

Bien que la qualité des images obtenues par IRM soit nettement supérieure à celle obtenue par des méthodes plus classiques comme les ultrasons ou les rayons x, le contraste peut être amélioré grâce à l'intervention d'agent de contraste. Ces produits possèdent des propriétés magnétiques qui influencent localement la relaxation des protons de l'eau tissulaire. Un agent de contraste IRM diminue les temps de relaxation T_1 et T_2 . Selon l'importance relative de leur effet sur T_1 et T_2 , ils sont qualifiés d'agent de contraste positif ou négatif.

Les agents de contraste positifs

Ces agents de contraste contiennent un ion métallique paramagnétique qui accélère la relaxation des protons voisins. Le gadolinium (^{157}Gd) en fait partie car il possède 7 électrons non appariés capables d'interagir avec les moments magnétiques des protons environnants. Ces agents rehaussent le signal du tissu dans lequel ils s'accumulent.

Les agents de contraste négatifs

Ceux-ci diminuent l'intensité du signal dans la région où ils sont présents. Ce sont principalement des particules superparamagnétiques formées de cristaux de magnétite (Fe_3O_4). Ces nanoparticules possèdent un moment magnétique important qui perturbe l'homogénéité du champ local. La taille de ces particules varie de quelques nanomètres à plusieurs micromètres selon l'application recherchée. Elles sont classées sur base de leur taille ; on parle par exemple de SPIO (Small Particle Iron Oxide) et USPIO (Ultra Small Particle Iron Oxide).

2.5.3 L'IRM au service de la détection de l'apoptose

L'IRM est très sensible aux changements du contenu en eau des tissus. L'eau liée aux macromolécules (T2 très court) et l'eau libre (T2 long) s'échangent très rapidement et de façon permanente. Tout changement dans la proportion d'eau liée et libre peut donc être détecté par IRM pondérée T2. Locke et Brauer [87] ont montré que le gonflement des cellules produisait une augmentation du T2 et donc une augmentation de l'intensité du signal sur des images pondérées T2. Ces résultats permettent de penser que l'apoptose pourrait être diagnostiquée sur base d'un assombrissement de l'image, mais en pratique cela semble beaucoup moins évident.

L'IRM de diffusion est basée sur l'effet de la diffusion moléculaire de l'eau des tissus. Dans ce type de séquence, l'aimantation et le signal IRM observé seront altérés proportionnellement à la liberté de mouvement des molécules d'eau. Il a été observé que le coefficient de diffusion diminuait chez les cellules apoptotiques [88] le signal devrait par conséquent être moins affecté.

L'IRM du sodium est potentiellement une bonne méthode de détection *in vivo* de l'apoptose [89]. Le noyau ^{23}Na est relativement sensible et sa concentration est élevée dans les tissus. Cette technique est très sensible aux interactions de l'électrolyte avec les macromolécules associées à la nécrose et à l'ischémie-reperfusion.

Ces trois méthodes d'IRM semblent *a priori* très intéressantes. Mais aucune étude n'a démontré clairement leur efficacité. Elles n'ont dès lors pas été mises en pratique clinique. Les résultats les plus concrets sont obtenus grâce à l'emploi de marqueurs exogènes, en l'occurrence des agents de contraste spécifiques. A ce jour, seule la phosphatidylsérine fait l'objet d'un tel ciblage. L'annexine V a déjà abondamment été utilisée dans ce contexte et après couplage à des contrastophores magnétiques comme les SPIOs [84] et les CLIOs (Cross Linked Iron Oxide) [90].

Le domaine C2 de la synaptotagmine I est un domaine de protéine qui lie les phospholipides anioniques dans les membranes cellulaires tout comme l'annexine V. Le domaine C2 a été couplé à des particules superparamagnétiques [91] et a fait l'objet d'étude *in vitro* et *in vivo*. Récemment, le domaine C2 a été greffé sur un chélate de gadolinium et est actuellement étudié *in vivo* par le même groupe [92].

2.6 Autres méthodes d'imagerie moléculaire clinique

La partie spécifique des agents de contraste cités précédemment peut être greffée sur des contrastophores propres à d'autres modalités d'imagerie médicale telles que la médecine nucléaire, l'imagerie optique ou les ultrasons (Figure 2.7).

Bien que sa résolution soit de loin inférieure à celle de l'IRM, la **médecine nucléaire**

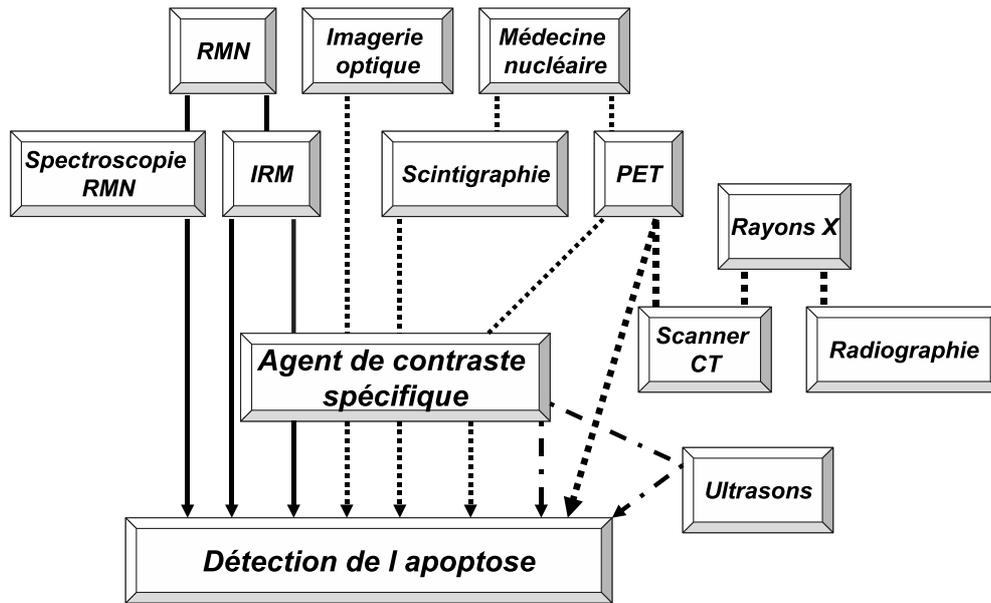


FIG. 2.7 – Diagramme reprenant les différentes modalités d'imagerie médicale

offre l'énorme avantage d'une très haute sensibilité. Cela signifie qu'une moins grande concentration en contrastophore est nécessaire pour produire un effet sur l'image. Du ^{99m}Tc a été greffé sur de l'annexine V et a été utilisé pour l'imagerie de l'apoptose *in vivo* sur différents modèles comme celui du foie traité par anti-Fas [93, 94] mais aussi lors de traitement de tumeurs et en imagerie néonatale pour évaluer les lésions cérébrales consécutives à une hypoxie [95]. Le ^{99m}Tc annexine V est actuellement en évaluation clinique aux USA et en Europe pour son efficacité dans le cadre du suivi des rejets de greffe cardiaque [96]. Le PET (Positron Emission Tomography) offre, lui aussi, des perspectives intéressantes. Ici, le contrastophore est un isotope comme le ^{18}F [97] ou le ^{124}I [98], qui est incorporé à l'annexine V. Combinée à l'imagerie par **rayon X CT (Computerized Tomography)**, la caméra PET permet un examen qui allie sensibilité et résolution ce qui en fait un outil très performant mais aussi très coûteux.

L'usage des **ultrasons** peut également s'avérer efficace pour détecter l'apoptose. En effet, les changements subis par le noyau de la cellule apoptotique en modifiant le comportement vis à vis des ultrasons de haute fréquence [99]. Un agent de contraste constitué de microbulles vectorisées [100] peut également être employé et permettre l'imagerie *in vivo* de l'apoptose et de ses pathologies associées.

Grâce à l'utilisation d'agents de contraste fluorescents, l'**imagerie optique** peut également apporter des solutions à la mise en évidence de l'apoptose [101, 102]. Bien que légèrement invasive, cette technique est très intéressante et prometteuse étant donné qu'elle permet une observation à l'échelle cellulaire. Ainsi, l'apoptose d'une cellule nerveuse a été observée en temps réel et *in vivo* dans le cas d'une neurodégénération rétinienne [103]. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé de l'annexine V marquée avec une molécule fluorescente.

2.7 Conclusion

Toutes ces méthodes sont tournées vers un même objectif : la mise en évidence de l'apoptose. Qu'elles s'appliquent *in vitro* ou *in vivo*, il n'est plus possible aujourd'hui de se passer d'elles. En effet, elles sont devenues essentielles en recherche dans le domaine de l'étude des morts cellulaires programmées. Mais leur application la plus importante en terme de quantité de personnes concernées est sans nul doute l'imagerie médicale. De telles techniques trouveraient rapidement leur place au sein de l'arsenal d'examen clinique dont disposent les médecins. Elles permettraient le diagnostic, l'évaluation et/ou le suivi des affections touchant le système nerveux (hypoxies cérébrales et certaines formes de démences), les poumons, le cœur (infarctus, cardiomyopathies et maladies des coronaires comme l'athérosclérose), la moelle osseuse (anémie, thalassémie et maladies auto-immunes) et les articulations, mais aussi des rejets de greffe et de l'efficacité des traitements anti-tumoraux.

Cependant pour être utilisées en routine comme outil de dépistage, elles doivent répondre à quelques exigences. Ces techniques doivent préférentiellement être non invasives, elles ne doivent donc pas mettre la vie du patient en danger ni lui causer un quelconque désagrément. C'est ainsi que toutes les méthodes *in vitro* s'opérant sur des biopsies sont écartées. Il est évident que les agents de contraste administrés ne doivent pas être toxiques. Les sondes liées à ces produits de contraste doivent montrer un caractère non immunogénique, ce qui n'est pas l'atout majeur des protéines comme l'annexine V ou la synaptotagmine I. Dans les différentes méthodes d'imagerie citées précédemment, il serait bon de disposer de sondes hautement spécifiques non immunogéniques, de coût modéré et dont la synthèse et la purification seraient efficaces. C'est le cas des oligopeptides issus du phage display.

Chapitre 3

Technique du phage display

3.1 Philosophie et principe du phage display

On peut comparer le phage display au principe de sélection naturelle décrit par Charles Darwin en 1859. Le phage display est la réalisation pratique d'une évolution chimique artificielle. Le chercheur confronte un ensemble d'individus à une situation et conserve ceux qui parmi eux présentent les meilleures caractéristiques pour y faire face. Tout comme le font les organismes qui peuplent ou ont peuplé la terre jusqu'à nos jours.

Le phage display a été présenté pour la première fois par G. Smith en 1985 [104], comme une manière très efficace de produire un très grand nombre de peptides et protéines différents et d'isoler la molécule qui produit une fonction spécifique. D'une manière plus concrète et pratique, le phage display est un outil alliant microbiologie et biologie moléculaire, qui permet entre autres de sélectionner des peptides (ou des protéines) ayant une affinité élevée pour une cible donnée.

3.2 Vecteur du phage display

Comme son nom l'indique, cette technique se base sur l'utilisation des phages comme vecteurs. Les phages, ou bactériophages, sont des virus utilisant les bactéries pour leur multiplication. Il en existe deux grandes catégories qui, toutes deux, peuvent être utilisées en phage display. Bien que prometteuse, la première catégorie qui comprend des phages complexes tels que les phages lambda, T4 et T7 n'est pas très utilisée pour l'instant. A l'inverse les phages filamenteux, tel que le phage M13 utilisé dans ce travail, sont abondamment exploités en phage display.

3.3 Structure du virion

Le phage filamentueux M13 "sauvage" [105] peut être décrit comme un bâtonnet flexible de plus ou moins $1\ \mu\text{m}$ de long et de $6\ \text{nm}$ de diamètre (figure 3.1). Il est formé à 87% d'un tube hélicoïdal composé de 2700 copies de la protéine pVIII (protéine majeure du manteau) codée par un seul gène. Ce tube renferme de l'ADN monocaténaire composé de 6407 nucléotides formant 9 gènes codant pour 10 protéines (de I à X). A une des extrémités de la particule phagique, se trouvent 5 copies des protéines mineures du manteau pIII et pVI, respectivement codées par les gènes III et VI ; les autres protéines mineures du manteau, pVII et pIX, respectivement codées par les gènes VII et IX, sont situées de l'autre côté du virion.

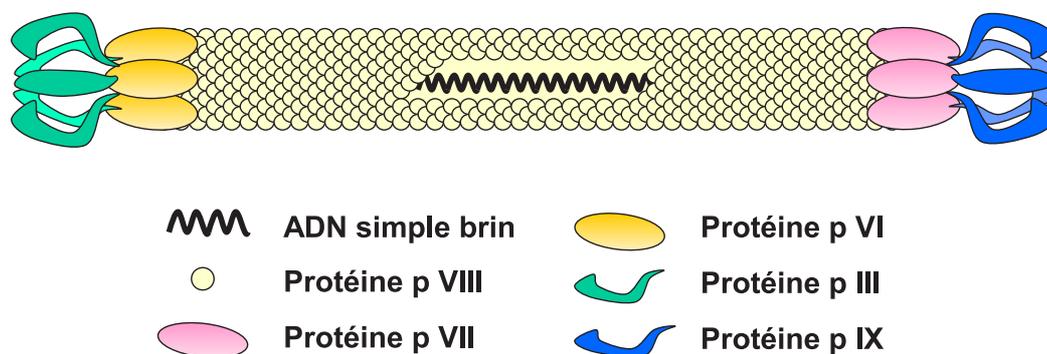


FIG. 3.1 – Structure d'un phage filamentueux.

3.4 Cycle d'amplification du phage M13

Le phage M13 se réplique en infectant la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) par son pilus F [105]. C'est la partie N-terminale de pIII qui en se fixant à l'extrémité du pilus F provoque la rétraction de celui-ci et le passage du virion au travers de la membrane externe de la bactérie. Une fois à la surface de la membrane interne, le phage se désassemble et l'ADN monocaténaire pénètre dans le cytoplasme où il sera répliqué par les enzymes de l'hôte. Toutes les protéines codées par le génome du phage sont synthétisées par la batterie enzymatique de la bactérie hôte. L'ADN produit s'associe avec pV pour prendre une forme de bâtonnet (figure 3.2). Un complexe de protéines incluant la thioredoxine codée par la bactérie et les protéines pI, pVII et pIX, ancre l'ADN monocaténaire dans la membrane cellulaire interne et initie l'assemblage du virion et son passage au travers de cette membrane. Durant le processus d'assemblage, la pV est remplacée par la pVIII et le processus se termine avec l'assemblage de pVI et pIII. Le phage traverse ensuite la membrane externe par un canal spécifique formé de 10 à 12 copies de pIV. La bactérie produit ainsi plusieurs centaines de virions par cycle de division. Les virions sont sécrétés de manière continue par la cellule

infectée qui continue de se diviser à une vitesse moins élevée que les cellules non infectées. Il est utile de signaler qu'une fois infectée par un phage, la bactérie ne peut plus faire l'objet d'une seconde infection par un autre phage.

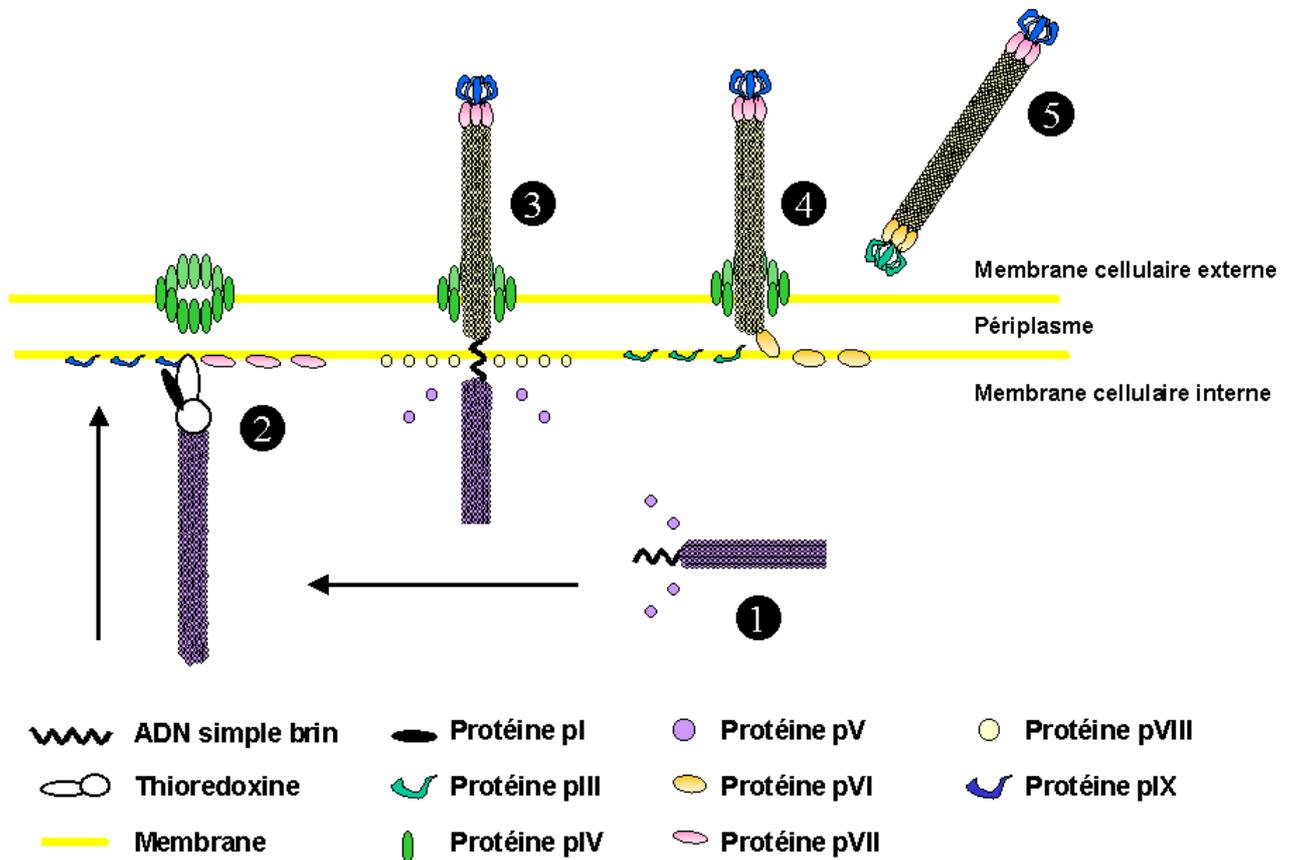


FIG. 3.2 – Assemblage du phage M13.

3.5 Bibliothèques de phages

Une bibliothèque combinatoire de phages est un mélange hétérogène d'individus présentant chacun un insert différent à sa surface. Elle est obtenue grâce à deux modifications majeures apportées au génome du phage, à savoir l'insertion d'un oligonucléotide codant pour le peptide à "randomiser" et l'insertion d'un gène codant pour un facteur de résistance à un antibiotique.

Il existe différents types de bibliothèques de phages en fonction de la localisation de l'insert, de la nature de celui-ci et du type de vecteur utilisé [106, 107].

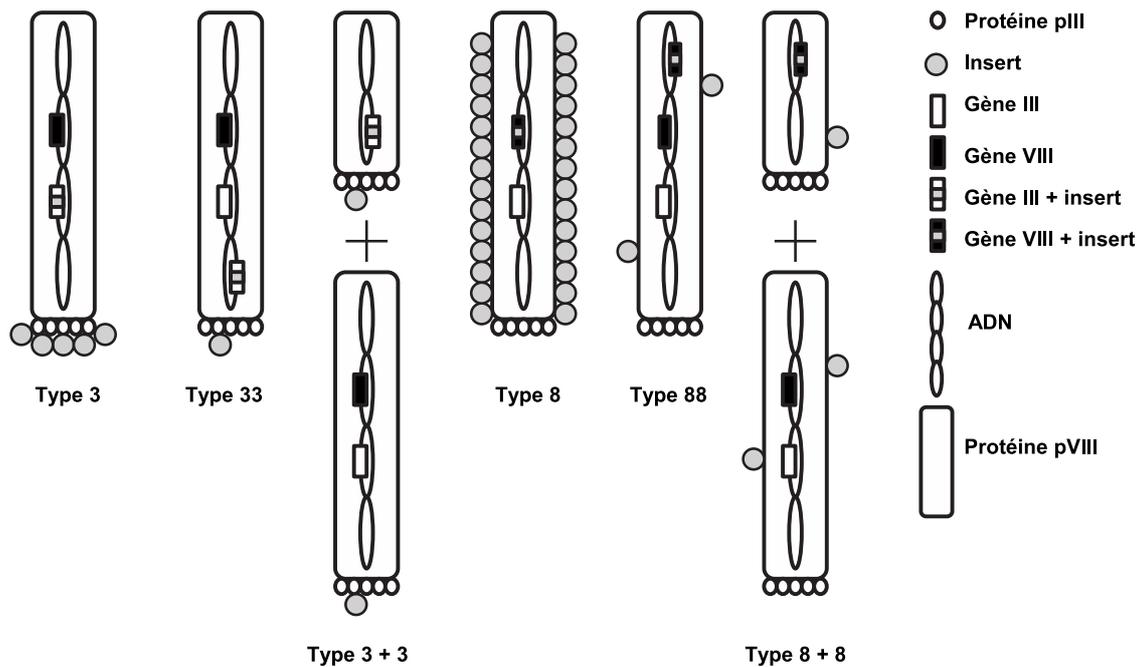


FIG. 3.3 – Types de système d'exposition de l'insert.

L'insert peut être localisé sur les protéines pIII, pVI ou pVIII (figure 3.3). Les bibliothèques de type 3 sont composées de phages dont l'insert nucléotidique est situé dans le gène III. Le virion résultant porte alors 5 copies du peptide réparties sur les 5 protéines pIII. Il est également envisageable de construire des bibliothèques de phages qui portent moins de peptide à leur surface. Il est en effet possible de "diluer" les protéines portant l'insert avec des protéines "sauvages" en construisant des phages qui produisent les deux types de protéines, dans ce cas l'ADN contient les deux gènes (avec et sans insert). Le même résultat peut également être obtenu en infectant les bactéries avec un plasmide, appelé phagemide, contenant le gène modifié et avec un phage "helper" portant le gène "sauvage". On parle de type 33 dans le premier cas et de type 3+3 pour le second. Les mêmes pratiques peuvent être appliquées pour l'insertion dans les gènes des protéines pVIII et pIV. Dans ce cas, on parle de type 6, 66, 6+6, 8, 88 et 8+8. L'avantage du type 8 est de présenter un grand nombre d'inserts (+/- 2700) à sa surface. A cause de sa taille, il est parfois indispensable que l'insert soit contenu dans la protéine pIII qui est nettement plus grande et dont la structure ne souffre pas de l'insertion d'une plus longue séquence.

Comme déjà mentionné, l'insert peut être de nature différente. Il peut s'agir de peptide, comme dans ce travail, mais aussi de protéines ou d'anticorps [108]. Selon l'origine de l'insert, on distingue : les bibliothèques aléatoires, génomiques et d'ADN recombinant.

Dans les bibliothèques aléatoires, le peptide est synthétisé chimiquement par l'apport de mélanges de nucléotides à une chaîne en croissance. Donc, par exemple, dans la séquence $(NNK)_n$, chaque N est un mélange équimolaire de A, C, T et G alors que chaque K est en

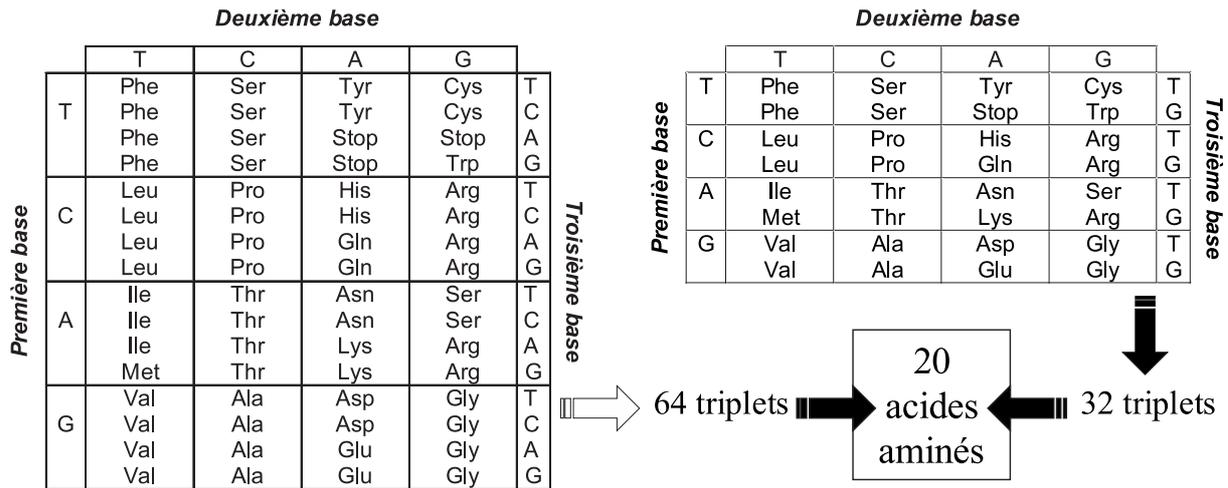


FIG. 3.4 – Code génétique universel à gauche et code génétique réduit à droite.

mélange équimolaire de G et de T. 32 triplets codant pour les 20 acides aminés naturels sont ainsi obtenus (figure 3.4). Cette synthèse permet d’obtenir une représentation moins biaisée en acides aminés étant donné que le code génétique est redondant. Les bibliothèques génomiques sont construites avec des fragments d’ADN chromosomique appartenant à un organisme. Les bibliothèques d’ADN recombinant sont construites avec l’ADN issu de la copie de l’ARNm extrait d’un tissu ou d’une population cellulaire [109].

Parmi les bibliothèques peptidiques aléatoires, il existe encore différentes catégories en fonction de la longueur du peptide et de la présence de contrainte. La présence de contrainte diminue l’entropie de la liaison du peptide à la cible et donc augmente l’affinité d’interaction. De plus, un tel peptide mis en solution a plus de chance de conserver sa structure et donc son affinité [110].

La contrainte peut être introduite en ajoutant deux résidus cystéine de part et d’autre de l’insert. Dans un environnement oxydant, tel que le périplasma de *E. coli*, les cystéines forment des ponts disulfure.

Travailler avec des bibliothèques à insert peptidique de longue taille implique de manipuler un très grand nombre de phages ou d’accepter que la bibliothèque soit incomplète car la complexité de la bibliothèque augmente exponentiellement avec la longueur de l’insert. Par exemple, pour un hexapeptide, il y a 20^6 ($6,4 \cdot 10^7$) peptides différents et 32^6 ($1,1 \cdot 10^9$) oligonucléotides possibles. La taille de la bibliothèque doit donc toujours être supérieure à ces valeurs.

3.6 Principe de sélection ou la recherche d'une aiguille dans une botte de foin

La sélection consiste à mettre en présence la bibliothèque naïve (bibliothèque d'entrée) et la cible afin de "récolter" les phages qui restent fixés à cette dernière [106, 110]. Dans la plupart des cas, la bibliothèque d'entrée de la première sélection est très grande (chaque phage devant être représenté une centaine de fois) et la sous-population sélectionnée (bibliothèque de sortie) est une faible fraction de la bibliothèque d'entrée contenant les phages qui se fixent le mieux à la cible. Cette population est amplifiée par infection de *E. coli* afin de produire un stock contenant des millions de copies d'un même phage. Le nouvel input alors obtenu peut faire l'objet d'une nouvelle sélection et ainsi de suite. Généralement, 3 à 4 sélections sont menées (figure 3.5).

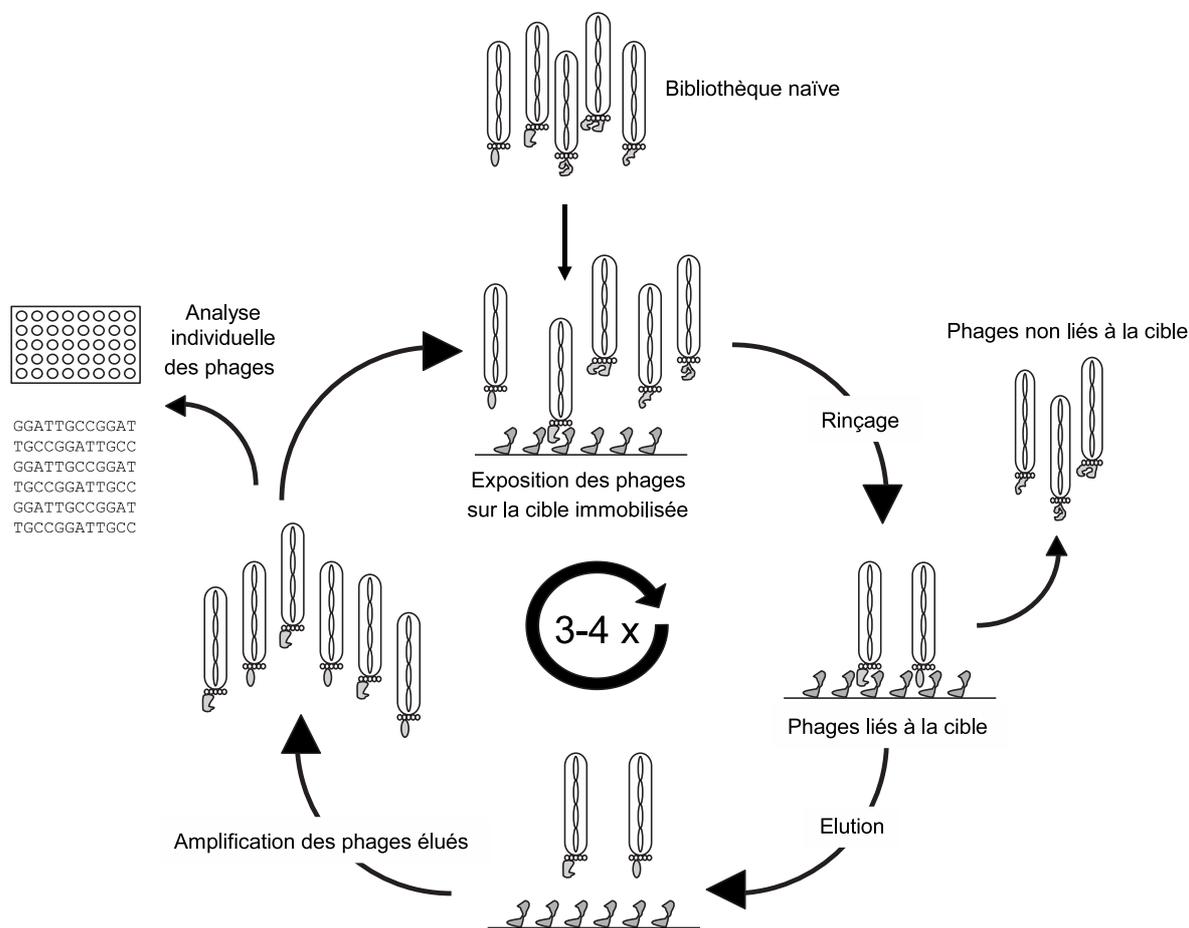


FIG. 3.5 – Schéma d'une sélection de phage display.

Deux paramètres de sélection peuvent être manipulés : la stringence, c'est-à-dire le degré avec lequel les phages de haute affinité sont favorisés par rapport aux autres phages et le rendement correspondant à la fraction de phages avec une affinité donnée qui est sélectionnée. Le premier paramètre ne sera renforcé qu'à partir de la seconde sélection, par exemple, en

diminuant le nombre de récepteurs disponibles ou en diminuant le temps ou la température d'incubation. Etant donné l'ampleur de la bibliothèque naïve, une pression sélective trop importante dès la première phase de sélection risquerait de mener à la perte définitive de phages ayant de l'affinité pour la cible. Durant les cycles suivants, on favorisera la rigueur de la sélection et on diminuera le rendement, car cette fois, les phages sont présents en millions d'exemplaires.

Les phages contenus dans l'éluat final sont ensuite caractérisés un à un. Leur affinité est évaluée par ELISA (Enzyme-Linked Immunorbent Assay) et la séquence du peptide qu'ils portent est déterminée par séquençage de la partie du génome qui contient l'oligonucléotide codant pour le peptide.

3.6.1 Présentation et immobilisation de la cible

Selon l'application ou la nature de la cible, le phage display peut être réalisé *in vitro*, directement sur la molécule ou sur une culture cellulaire, *ex vivo* sur un organe perfusé, ou *in vivo* (figure 3.6).

Pour réaliser une sélection *in vitro*, la cible doit être immobilisée. Il existe une gamme étendue de possibilités. Les supports solides sur lesquels la cible peut être immobilisée sont des supports de surface (plaques de polystyrène), des billes plastiques imperméables, des membranes de nitrocellulose, des billes magnétiques et des billes perméables en gel d'agarose. La cible peut être attachée directement sur le support par lien covalent ou non. Elle peut aussi y être fixée par l'intermédiaire d'un système biotine / streptavidine.

Lors de sélections sur culture cellulaire [111, 112], sur organe perfusé [113], ou *in vivo* [114, 115, 116], c'est la cellule qui joue le rôle de support de la cible. Dans les deux derniers types de sélection cités, la bibliothèque de phages est injectée dans le circuit de perfusion de l'organe ou directement par voie intraveineuse.



FIG. 3.6 – Variabilité du mode de présentation et d'immobilisation de la cible.

3.6.2 Elution

Les éluions non spécifiques se basent sur la diminution du pH de la solution. Les peptides changent alors de conformation et se détachent de la cible. Les éluions spécifiques vont, quant à elles, être réalisées par compétition avec un ligand de la cible déjà identifié ou en retirant un composé nécessaire à la fixation du phage sur la cible, par exemple en chélatant le calcium dans le cas d'interactions qui en dépendent. L'éluion spécifique offre l'énorme avantage de limiter la récolte aux phages spécifiques de la cible, mais elle peut entraîner la perte de phages d'affinité plus élevée que celle du compétiteur. Par ailleurs, le compétiteur n'est pas toujours disponible. Dans certains cas, l'éluion peut se baser sur l'activité enzymatique du phage [117]. Tout comme la technique d'immobilisation de la cible, le type d'éluion à utiliser doit être déterminé au cas par cas.

3.6.3 Analyse individuelle du phage

A la fin des cycles de sélection, les clones contenus dans la bibliothèque finale sont séparés les uns des autres. Cela n'est possible qu'à deux conditions : qu'une bactérie ne puisse être infectée que par un seul phage et que le phage contienne un gène qui permette de discriminer les bactéries infectées des non infectées. Ce gène peut conférer la résistance à un antibiotique (par exemple la tétracycline) ou coder pour la β -galactosidase qui colore les colonies en bleu dans un milieu contenant de l'IPTG et de l'Xgal. Donc lorsque l'on réalise une infection d'*E. coli* par la bibliothèque finale et que l'on étale sur boîte de Petri une dilution suffisamment importante de la culture, on obtient, après incubation, des colonies bien distinctes produisant chacune un type de phage. Une fois isolés, ces phages sont amplifiés en vue de l'évaluation de leur affinité pour la cible par ELISA et pour le séquençage de leur ADN (figure 3.7).

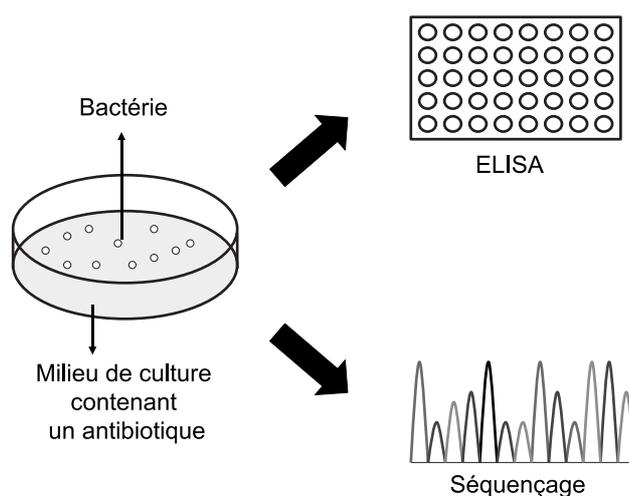


FIG. 3.7 – Séparation des phages et analyse individuelle.

3.7 Applications de la technique du phage display

Les applications du phage display sont extrêmement variées. Le phage display est abondamment employé pour identifier peptides, protéines ou anticorps capables de se fixer à un récepteur [118]. Cette stratégie est souvent appliquée pour la recherche de nouveaux outils de diagnostic ou de nouveaux vecteurs pour les médicaments. Dans ce contexte, des types cellulaires, par exemple des cellules tumorales [114], des tissus [115, 116] ou des organes entiers [119] peuvent être les cibles des phages. L'identification d'agonistes, d'antagonistes, de substrats ou d'inhibiteurs d'enzyme peut également avoir recours à la technique du phage display [120]. La technique permet aussi d'identifier les épitopes [121] responsables de la fixation d'un ligand sur son récepteur ou d'une enzyme sur son substrat.

3.8 Optimisation de la technique du phage display

Typiquement, une expérience de phage display comprenant 3 à 5 cycles de sélection qui sont réalisés en plusieurs semaines. Récemment, une variante du phage display a été développée et est désignée par l'acronyme URSA [122] pour Ultra Rapid Selection of Antibodies. Selon ce nouveau protocole, les étapes d'amplification des phages ne sont pas suivies d'une purification comme c'est le cas traditionnellement. C'est parce que la bibliothèque de sortie est amplifiée en présence de la cible que l'amplification et la purification des phages est évitée. Cette méthode permet 3 à 5 cycles de sélection en un seul jour.

3.9 Autres techniques de chimie combinatoire

La chimie combinatoire [123] offre la possibilité de générer simultanément un grand nombre de structures (bibliothèque), par biosynthèse ou par synthèse chimique. Parmi les molécules synthétisées chimiquement, on trouve des oligomères synthétiques (peptides, oligonucléotides ou oligosaccharides), des petites molécules non oligomériques (hétérocycles), et des analogues synthétiques de biopolymères plus résistants à l'hydrolyse enzymatique comme les peptoïdes (peptides avec les chaînes latérales situées sur l'azote), les oligocarbamates (peptides avec une fonction carbamate qui remplace la fonction amine) ou les oligourées (peptides avec une fonction de type urée qui remplace la fonction amine).

3.9.1 Notion d'aptamère et d'évolution systématique

A l'origine, le terme aptamère désigne une molécule d'ARN obtenue par sélection *in vitro* et qui lie une cible donnée. Apatamère vient du mot latin "aptus" qui signifie attaché, fixé. Ce terme est maintenant utilisé pour désigner tout acide nucléique ou analogue d'acide

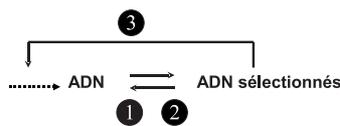


FIG. 3.8 – Evolution d’ADN par SELEX.

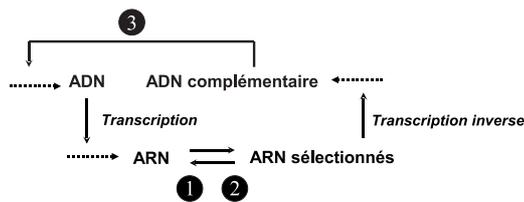


FIG. 3.9 – Evolution d’ARN par SELEX.

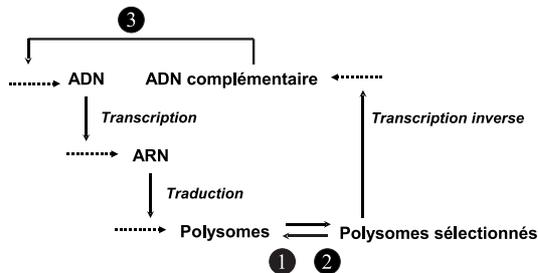


FIG. 3.10 – Evolution de peptide par SPERT.

Les trois étapes impliquées dans ces procédés sont : 1) la sélection des ligands par liaison à la cible, 2) séparation des molécules liées à la cible et des molécules libres et 3) amplification par PCR des séquences des ligands

nucléique qui est apte à lier une protéine ou une petite molécule avec une haute affinité. La technique par laquelle ces oligonucléotides sont obtenus a été dénommée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) par ses inventeurs Tuerk et Gold en 1990 [124].

Le principe du SELEX est relativement simple [125] (figure 3.9) et s’apparente à celui du phage display. Après avoir mélangé une protéine cible avec une bibliothèque d’ARN, les molécules d’ARN liées à la protéine sont séparées des ARNs libres par passage sur un filtre de nitrocellulose. Les protéines s’y collent, y compris les complexes protéine-ARN, alors que les ARNs non liés sont éliminés. Les molécules d’ARN collectées sont éluées et copiées en ADN complémentaires. Elles sont ensuite amplifiées par PCR suivie d’une transcription *in vitro* pour produire une nouvelle bibliothèque d’ARN de concentration suffisante pour le prochain cycle. Ces étapes de sélection et d’amplification sont répétées jusqu’au niveau d’enrichissement souhaité en séquences d’ARN qui se fixe à la protéine.

Il existe beaucoup de variantes à ce protocole, notamment l’utilisation directe de l’ADN (figure 3.8). Ce type de SELEX est évidemment plus rapide puisqu’il ne demande ni transcription, ni transcription inverse lors de l’amplification. Tuerk et Gold ont également élaboré une méthode de sélection de peptides appelée SPERT (figure 3.10) (Systematic Peptide Evolution by Reverse Translation) qui passe par une étape d’amplification de l’ADN complémentaire et donc par les étapes de transcription (transcription inverse) et de traduction (traduction inverse). Ce protocole étant beaucoup plus lourd et plus délicat que le phage display, il n’a pas souvent été utilisé.

La méthode de séparation des oligonucléotides libres et attachés est adaptée à la nature

de la cible. Pour des petites molécules, il n'est pas possible d'utiliser les filtres de nitrocellulose. Dans ce cas, la cible est immobilisée sur un support solide comme pour le phage display [126]. Il est également possible de séparer les complexes des acides nucléiques libres par électrophorèse. Tout comme pour le phage display, il est possible de réaliser ces expériences sur culture de cellules. Toutefois, les acides nucléiques n'étant pas stables dans les fluides biologiques, ils doivent être modifiés [127]. Ces modifications doivent être compatibles avec les enzymes d'amplification comme la transcriptase inverse ou l'ADN et l'ARN polymérase. Les modifications les plus couramment utilisées sont la substitution du groupement 2'-OH des pyrimidines par un groupement 2'-fluoro ou 2'-amino.

Les aptamères peuvent également être employés *in vivo* [128]. Dans ce cas, la molécule d'ARN peut être synthétisée directement par la propre machinerie transcriptionnelle de la cellule, on parlera alors d'intramère. Etant exprimé dans la cellule, l'intramère peut être utilisé pour cibler une protéine intracellulaire dans son environnement naturel.

Les bibliothèques d'ADN sont généralement limitées à 10^{14} et 10^{15} séquences. Le SELEX est une méthode rapide et simple. 8 à 15 cycles sont généralement nécessaires et de manière similaire au phage display, une expérience typique de SELEX prend approximativement 2 à 3 mois.

3.9.2 Chimie combinatoire : solution miracle ou outil pratique pour le chercheur ?

L'imagerie moléculaire et la pharmacologie sont sans cesse à la recherche de molécules relativement petites qui présentent une faible immunogénicité, des possibilités de synthèse chimique et un faible coût. Alors que les ligands naturels de grande taille ou les anticorps ne satisfont pas ces exigences, le phage display et les autres techniques de chimie combinatoire offrent des voies de recherche prometteuses.

Choisir parmi toutes ces techniques de chimie combinatoire n'est guère aisé. Les bibliothèques générées par biosynthèse présentent l'énorme avantage de "laisser agir la nature" et de générer ainsi plusieurs billions de molécules originales. Toutefois ces molécules resteront toujours des molécules biologiques sensibles à la dégradation enzymatique. Par exemple, les peptides ainsi produits seront toujours des peptides constitués d'acides aminés de type L. La chimie combinatoire "classique" peut intervenir efficacement en produisant par exemple des peptides construits à partir d'acides aminés de type D ou des peptoïdes qui ne seront pas dégradés aussi rapidement. Il est parfois possible de détourner ce problème en utilisant la technique du phage display "mirror". Dans ce cas, la sélection de phage display est réalisée sur un récepteur constitué d'acides aminés de type D et le peptide sélectionné est synthétisé chimiquement dans sa version D en espérant qu'il ait une affinité pour le récepteur de type L. Néanmoins, les limites d'une telle méthode sont rapidement atteintes. La cible doit être

une protéine de moins de 100 kDa et sa structure doit être connue. Il est également possible d'apporter au ligand des modifications chimiques qui n'altéreront pas son affinité pour la cible mais renforceront sa capacité à résister à la digestion par les enzymes cellulaires. Il n'est pas non plus exclu de faire appel à la modélisation moléculaire pour concevoir les mimétiques de ces ligands sensibles.

Malgré ces quelques désavantages, le phage display et le SELEX restent des méthodes de choix pour sélectionner un peptide ou un oligonucléotide spécifique d'une structure. En effet, elles permettent de sélectionner rapidement à partir de bibliothèques d'une très grande diversité, des molécules non immunogéniques de petite taille, de très haute affinité pour la cible et d'un faible coût de synthèse. De plus elles ne nécessitent aucune information préalable sur la cible. C'est parce qu'elles remplissent le cahier des charges que nous avons choisi d'appliquer l'une de ces deux méthodes dans ce travail.

Bibliothèque générée par :		biosynthèse			synthèse chimique		
Technique		phage display	SELEX	SPERT	chimie combinatoire		
Nature du ligand		peptide	ADN et ARN	peptide	oligomère synthétique	analogue synthétique de biopolymère	petite molécule non oligomérique
Taille du ligand		6 à 15 résidus (n)	+/- 24 résidus (n)	—	diffère selon la nature du ligand		
Taille de la bibliothèque		souvent 10^{12}	souvent 10^{15}	?	plus faible qu'en biosynthèse		
Diversité maximum		20^n	4^n	20^n	diffère selon la nature du ligand		
Nombre de cycles nécessaires		3-4	8-15	?	—		

TAB. 3.1 – Caractéristiques des différents types de bibliothèques disponibles

Deuxième partie

But du travail

Le diagnostic non invasif de l'apoptose revêt une importance particulière, principalement dans le domaine de l'oncologie. Par sa très haute résolution, son innocuité et avec l'aide d'agents de contraste spécifiques à développer, l'imagerie de résonance magnétique nucléaire apparaît comme une méthode puissante pour la mise en évidence des tumeurs et le suivi des thérapies anti-tumorales. La conception d'agents de contraste IRM spécifiques de l'apoptose relève de l'imagerie moléculaire. Ces agents se composent d'un rapporteur magnétique ou contrastophore et d'un vecteur spécifique d'une cible. La cible choisie est la phosphatidylsérine qui est un marqueur membranaire efficace de l'apoptose à la fois en terme de nombre et d'accessibilité.

Avec le souci de rendre la conception, la synthèse et les applications de l'agent de contraste magnétique plus aisées, nous avons décidé de greffer un vecteur peptidique. La technique du phage display a donc été adoptée et développée au laboratoire.

Dans le contexte de la mise au point et de la caractérisation d'un agent de contraste spécifique de l'apoptose, plusieurs protocoles de sélection de phage display seront testés et comparés, permettant ainsi de mieux comprendre et mieux utiliser la méthodologie dans les travaux futurs. Trois méthodes d'immobilisation de la cible et deux types de bibliothèques seront évalués. Les méthodes envisagées pour l'immobilisation de la phosphatidylsérine varieront de l'*in vitro* strict à l'*ex vivo* en passant par une sélection sur culture cellulaire. Ces trois types de supports de la phosphatidylsérine seront utilisés en association avec des bibliothèques de phages exposant des peptides hexamériques linéaires et heptamériques cycliques.

Dans ce travail, les phages seront donc sélectionnés en fonction de leur affinité pour la phosphatidylsérine. Parmi eux, un choix sera effectué en vue du séquençage, sur base des affinités relatives pour la phosphatidylsérine et la phosphatidylcholine, élevées pour la première et faibles pour la seconde. Un des peptides ainsi identifié sera greffé à un "contrastophore" moléculaire ou particulaire et fera l'objet de caractérisations physico-chimiques et biologiques *in vitro* pour finalement être testé *in vivo*.

Dans un premier temps, le peptide sélectionné sera greffé à des nanoparticules superparamagnétiques de type USPIO et l'agent obtenu sera testé sur culture cellulaire par relaxométrie et par imagerie de résonance magnétique nucléaire. Par ailleurs, l'affinité du peptide sera comparée à celle du phage correspondant ainsi qu'à celle du peptide greffé aux particules.

Les particules superparamagnétiques étant capturées de manière non spécifique par les cellules de Kupffer contenues dans le foie, le couple peptide - particule superparamagnétique

ne pourra pas être testé tel quel sur le modèle de foie apoptotique qui sera mis en oeuvre dans ce travail. Pour permettre ces tests *in vivo*, le peptide sera donc greffé à des particules dites "furtives", c'est-à-dire recouvertes de polyéthylène glycol, leur conférant la capacité d'échapper aux cellules de Kupffer. Le même peptide sera également couplé à un chélate de gadolinium, dérivé du Gd-DTPA, pour être testé chez la souris. Dans ce cas, les tests *in vivo* réalisés par IRM s'accompagneront de biodistributions.

Troisième partie

*Sélection par phage display de vecteurs
potentiels pour l'imagerie moléculaire
de l'apoptose*

Chapitre 4

Introduction

Dans la littérature, les expériences de phage display sont multiples et variées. A ce jour, aucun critère ne permet *a priori* de favoriser l'une ou l'autre méthode ou de préférer une bibliothèque ou une autre.

Nous étions, dès l'aube du projet, désireux de disposer d'un peptide spécifique de la phosphatidylsérine. Pour arriver à nos fins, nous avons donc utilisé des bibliothèques peptidiques, c'est-à-dire des bibliothèques constituées de phages exposant des peptides à leur surface. Un choix restait à faire au niveau de la longueur du peptide et de la présence de contrainte en son sein. En ce qui concerne la longueur du peptide, nous avons opté pour de courtes séquences (6 ou 7 résidus d'acide aminé) permettant ainsi une synthèse ultérieure plus rapide et moins onéreuse. Pour permettre une comparaison, nous avons utilisé à la fois une bibliothèque contrainte ainsi qu'une non contrainte.

Etant donné que les méthodes de sélections sont elles aussi extrêmement variées, nous avons choisi d'en tester trois, toutes adaptées à la cible étudiée (en l'occurrence la phosphatidylsérine), qui s'inscrivent dans un continuum trouvant sa source dans la sélection purement *in vitro* pour cheminer jusqu'à une sélection se rapprochant de l'*in vivo*.

Chapitre 5

Matériel et méthodes

5.1 Caractéristiques des bibliothèques

5.1.1 Bibliothèque hexamérique linéaire

La bibliothèque fUSE5/6-mère [121], que nous appellerons L6 pour plus de facilité, est une bibliothèque de phages exprimant à leur surface 5 copies d'un peptide linéaire hexamérique. Chaque peptide étant situé sur une des 5 copies de la protéine pIII du phage M13, il s'agit donc d'une bibliothèque de type 3 (figure 3.3). Le génome de ses virions contient également un gène permettant à la cellule infectée de résister à l'action de la tétracycline (Tc). La diversité de cette bibliothèque est théoriquement de $4 \cdot 10^7$, sa capacité d'infectivité de 5% et la taille de l'ADN de ses virions est de 9225 bases. Cette bibliothèque est distribuée gracieusement par le laboratoire du professeur Smith (Université du Missouri, Columbia, USA).

5.1.2 Bibliothèque heptamérique cyclique

La bibliothèque Ph.D.-C7C, que nous appellerons plus simplement C7 est une bibliothèque de phages exprimant à leur surface 5 copies d'un peptide cyclique heptamérique. Tout comme la précédente, cette bibliothèque est de type 3 et le génome de ses virions contient également un gène de résistance à la tétracycline. Sa diversité est théoriquement de $1,2 \times 10^9$ et la taille de l'ADN de ses virions est de 9312 bases. Cette bibliothèque est fournie sous forme de kit (Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit) par New England BioLabs (Beverly, MA, USA).

5.2 Méthodes de sélection

Les méthodes de sélection proposées par le groupe de Smith [104, 129] et New England BioLabs [130] ont été adaptées aux différentes modalités d'immobilisation de la cible envisagées dans ce travail. Néanmoins, elles reposent toutes sur le même schéma de base (figure 3.5) : immobilisation de la cible, incubation de la bibliothèque avec la cible, élimination des phages de faible affinité pour la cible, élution, amplification des phages récupérés et initiation d'un nouveau cycle.

5.2.1 Sélection *in vitro*

Cette expérience de phage display se déroule en deux étapes : une contre-sélection envers la phosphatidylcholine suivie d'une sélection positive contre la phosphatidylsérine (figure 5.1). La contre-sélection a pour objectif d'éliminer les phages qui interagissent avec la phosphatidylcholine mais aussi avec son support, dans ce cas le polystyrène constituant les puits. La sélection positive retient préférentiellement les phages d'affinité pour la phosphatidylsérine parmi un lot de phages n'ayant pas ou peu d'affinité pour la phosphatidylcholine ou le polystyrène.

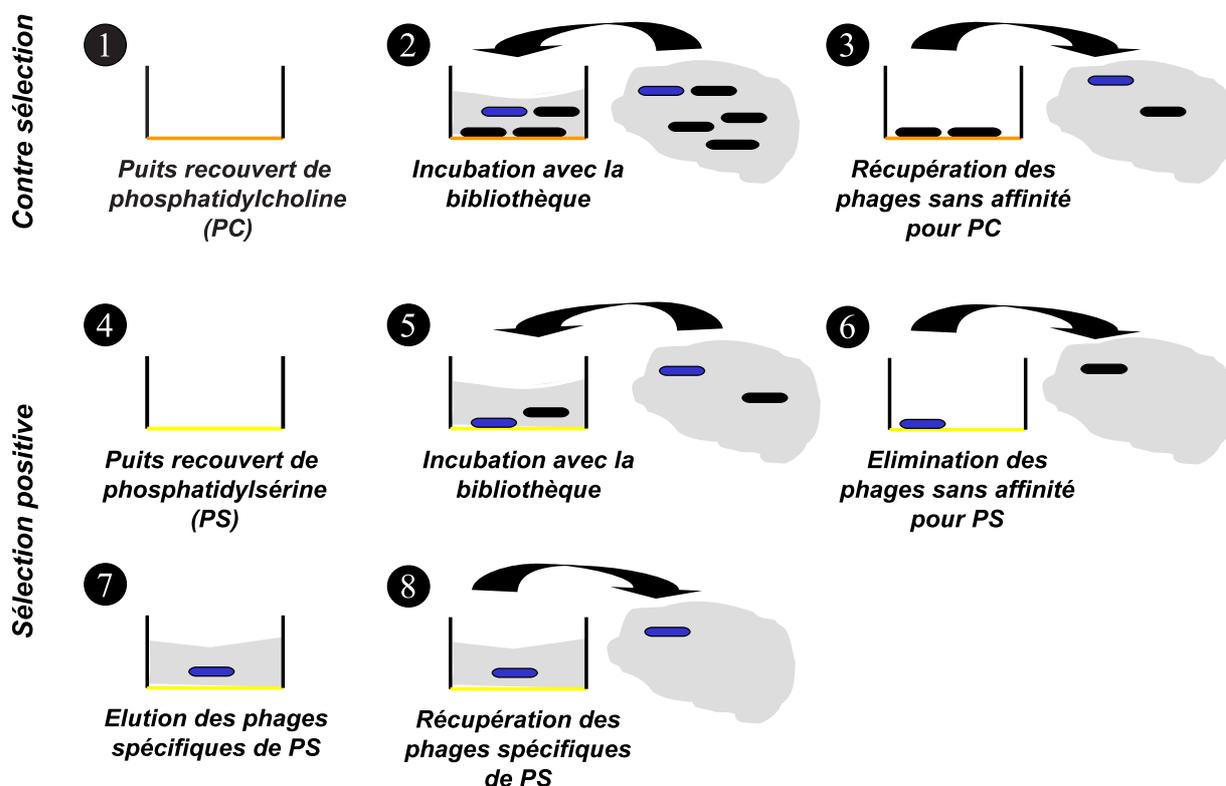


FIG. 5.1 – Principe de la sélection *in vitro* : contre-sélection sur phosphatidylcholine et sélection positive sur phosphatidylsérine.

5.2.1.1 Immobilisation de la cible

25 mg de DPPS (DiPalmitoylPhosphatidylSérine, Genzyme Pharmaceuticals - Sygena Facility, Liestal, Suisse) ou de DPPC (DiPalmitoylPhosphatidylCholine, Avanti, Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, Alabama, USA) sont solubilisés dans 30 ml d'éthanol sous léger chauffage. 500 μ l de chaque solution sont disposés dans des puits distincts de plaque de culture 4 puits (VWR, International, Leuven, Belgique). L'éthanol est évaporé sous hotte aspirante à température ambiante durant une nuit.

5.2.1.2 Validation du modèle

L'immobilisation des phospholipides sur les puits de polystyrène et leur résistance face aux différents traitements ont été vérifiées par coloration au Noir Soudan. Le Noir Soudan est un colorant diazoïque possédant un important coefficient de solubilité dans les lipides acides et neutres. Les puits recouverts de phospholipides par la préparation décrite précédemment sont incubés 20 minutes avec 200 μ l d'une solution de Noir Soudan (0,3 g/100 ml). Les puits sont ensuite rincés à l'eau déminéralisée et séchés à l'étuve. Les phospholipides sont re-solubilisés dans l'éthanol afin de quantifier par lecture de la densité optique à 400 nm, les dépôts de noir Soudan et donc la présence de phospholipides.

5.2.1.3 Protocole de sélection

2×10^{11} phages contenus dans 1 ml de tampon calcium sont ajoutés sur le puits recouvert de DPPC et laissés 1 heure à température ambiante. Le tampon calcium contenant les phages qui n'ont pas interagi avec la DPPC est récupéré et ajouté aux puits contenant la DPPS. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, le tampon calcium contenant les phages qui ne se sont pas liés à la DPPS est éliminé. Les phages fixés sont ensuite élués par addition de 1 ml de glycine - HCl 0,2 M à pH 2,2. La solution agit 10 minutes sous agitation lente. La solution de glycine contenant les phages élués est transférée dans un tube de microcentrifugation et neutralisée avec 150 μ l de Tris - HCl 1M à pH 9,1. Dans le jargon du phage display, cette solution est appelée **output** ou bibliothèque de sortie et est destinée à être amplifiée. *A contrario*, la solution contenant la bibliothèque initiale est appelée **input** ou bibliothèque d'entrée. Lors de cette expérience de phage display 4 cycles ont été réalisés selon le protocole décrit ci-dessus.

5.2.2 Sélection sur culture cellulaire

Dans cette méthode de sélection, on considère la cellule apoptotique comme le support de la phosphatidylsérine et la cellule saine comme le support de la phosphatidylcholine. Cette expérience de phage display se déroule selon le même schéma expérimental que la précédente (figure 5.2). La contre-sélection s'opère sur les cellules non traitées et la sélection positive sur les cellules traitées, donc apoptotiques.

Le modèle choisi pour cette sélection est un modèle d'apoptose induite par la camptothécine (CPT) (voir 1.5.3) [131] à des cellules Hep G2 (hépatocytes issus de carcinome humain) en culture.

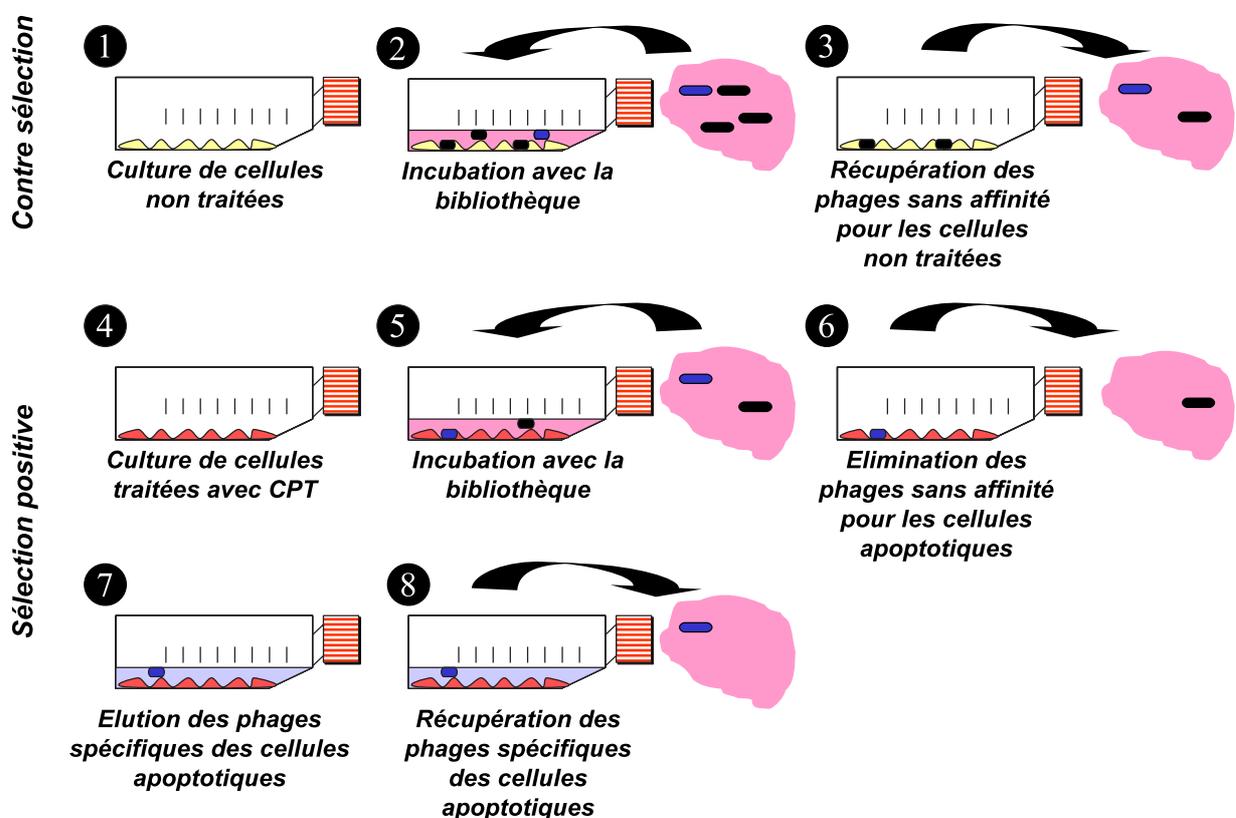


FIG. 5.2 – Principe de la sélection sur culture cellulaire : contre-sélection sur cellules non traitées et sélection positive sur cellules traitées.

5.2.2.1 Maintien de la culture et induction de l'apoptose

Les cellules Hep G2 sont maintenues en culture dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant de la L-glutamine, du D-glucose 4500 mg/l, et du pyruvate de sodium, additionné de 1% d'acides aminés non-essentiels, de 1% de mélange pénicilline / streptomycine et de 10% de FBS (Foetal Bovine Serum). Tous ces produits ont été fournis

par N. V. Invitrogen S.A., Merelbeke, Belgique. Les passages de cette culture de cellules sont assurés par un traitement à l'acutase (PAA Laboratories GmbH, Linz, Autriche). La viabilité cellulaire est estimée par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique).

L'apoptose est induite en incubant 2 heures à 37°C sous atmosphère de 5% en CO₂, une culture à sous-confluence dans un milieu contenant une solution finale de 1 μM en camptothécine (ICN, Asse-Relegem, Belgique).

5.2.2.2 Validation du modèle par microscopie confocale

Les cellules sont cultivées sur des lamelles rondes stériles de 12 mm de diamètre. Lorsque la sous-confluence est atteinte, la culture est traitée avec la camptothécine comme décrit au paragraphe précédent. Avant de procéder au double marquage, la lamelle est rincée avec du TBS. La lamelle portant les cellules est ensuite incubée 10 minutes dans l'obscurité avec 10 μl de solution contenant 50 μg/ml d'iodure de propidium (PI) et 50 mM de 6-CFDA (voir 2.2.3) tous deux fournis par Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique). La lamelle est rincée trois fois avec du TBS puis montée sur une lame porte-objet. Le montage est observé au moyen d'un système CLSM (Confocal Laser-scanning Microscope, Leica TCS 4 D argon-krypton) utilisant des filtres FITC (515-545) et TRITC (585-615).

5.2.2.3 Protocole de sélection

2×10^{11} phages contenus dans 1 ml de HBSS (cycle pair) ou de DMEM (cycle impair) sont ajoutés dans le puits contenant les cellules non traitées et le tout est incubé 1 heure à 37°C sous atmosphère de 5% en CO₂. Le HBSS (ou le DMEM) contenant les phages qui n'ont pas interagi avec les cellules non traitées est récupéré et ajouté au puits contenant les cellules traitées par la CPT. Après 1 heure d'incubation à 37°C, le HBSS (ou le DMEM) contenant les phages qui ne se sont pas liés aux cellules traitées est éliminé. Les cellules sont suspendues dans 1 ml de HBSS et centrifugées 5 minutes à 3000 rpm (rotations par minute) et à 4°C. Après que le surnageant ait été éliminé, les phages fixés aux cellules sont élués par addition au culot de 1 ml de glycine - HCl 0,2 M à pH 2,2. La solution de glycine contenant les phages élués est débarrassée des cellules par 10 minutes de centrifugation à 10000 rpm et à 4°C, et est neutralisée avec 150 μl de Tris - HCl 1M à pH 9,1 pour constituer l'**output**. Lors de cette expérience de phage display, 4 cycles ont été réalisés selon le protocole décrit ci-dessus.

5.2.3 Sélection *ex vivo*

Cette fois, c'est un organe tout entier qui constitue le support de la cible. Le modèle qui a été choisi est un modèle d'induction d'apoptose hépatique par injection intraveineuse d'anticorps anti-Fas (figure 1.6) [132]. Le foie est ensuite isolé et perfusé pour permettre la sélection de phage display. Tout comme pour les deux autres expériences de phage display, celle-ci est divisée en deux parties : une contre-sélection sur foie sain et une sélection positive sur foie apoptotique (figure 5.3).

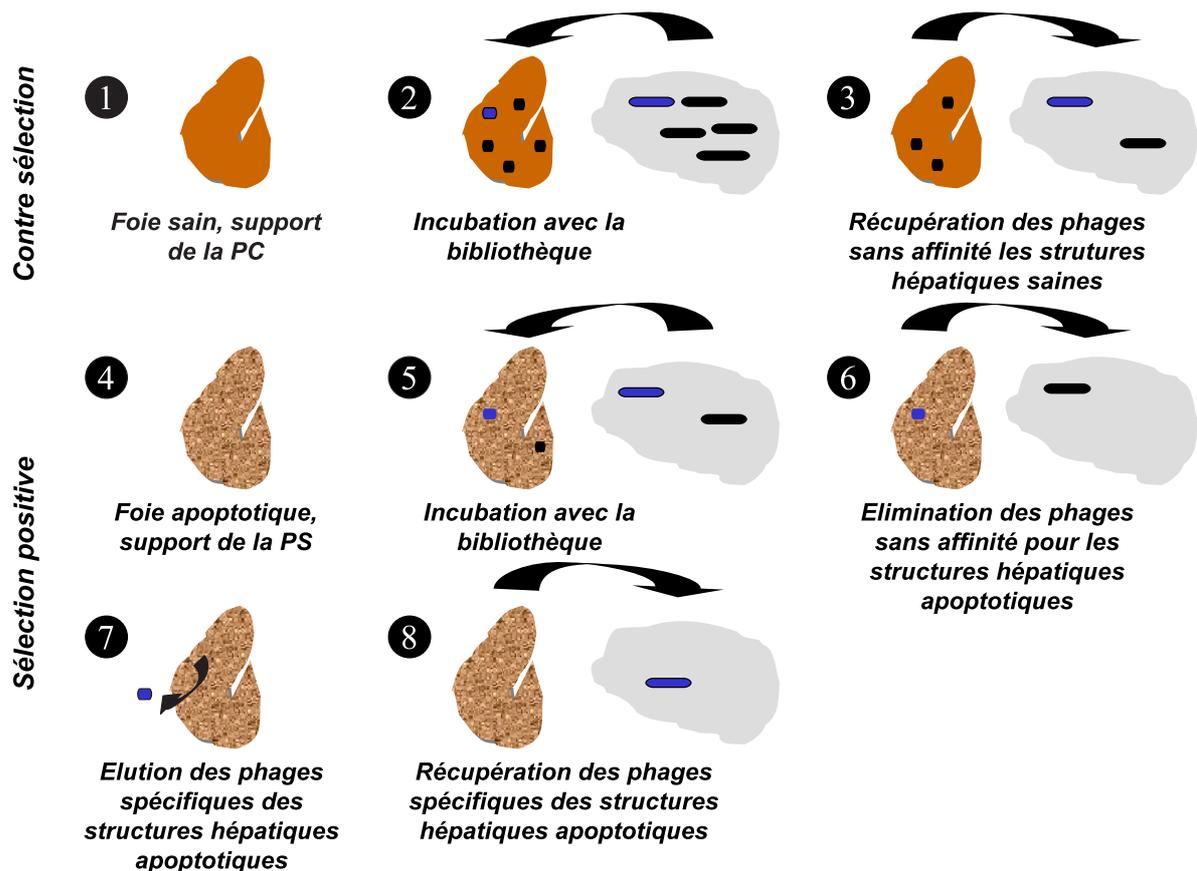


FIG. 5.3 – Principe de la sélection *ex vivo* : contre-sélection sur foie sain et sélection positive sur foie traité. Ce schéma expérimental a été utilisé pour les sélections menées à partir de la bibliothèque C7.

5.2.3.1 Induction de l'apoptose et perfusion du foie

L'apoptose est induite par injection intraveineuse de 10 μl d'anti-Fas (Jo2, Becton-Dickinson, Erembodegem, Belgique) à des souris BALB/cByJlco âgées de 5 à 6 semaines. Deux heures après l'injection, le foie apoptotique est isolé et perfusé. Pour cela, l'animal est anesthésié par injection intra-péritonéale de Nembutal® (Sanofi Santé Animale Bruxelles, Belgique). Pour éviter toute coagulation, 25 μl d'héparine (Léo Pharmaceutical Product, Belgique) sont injectés dans la veine cave inférieure. Le cathéter (24 G, Angiocath *TM*,

Becton-Dickinson, France) est inséré dans la veine porte et ligaturé pour être rapidement raccordé au circuit de perfusion. Immédiatement après, la veine cave est sectionnée afin d'éviter une surpression au niveau du foie. Le foie est isolé et placé dans le tube en verre du circuit de perfusion. Une solution de Krebs-Henseleit est amenée au foie de souris à un débit physiologique de 28 ml/min par une pompe péristaltique (Masterflex 7521-10, Cole-Parmer Instrument, Chicago, USA). L'oxygénation du perfusat est assurée par du carbogène (95% O₂ et 5% CO₂). Un piège à bulles est placé sur le circuit de perfusion. La solution de perfusion ainsi que le tube contenant le foie sont maintenus à 37°C par un bain thermostatique. La taille des tuyaux du circuit de perfusion et la capacité des récipients sont choisies les plus petites possibles.

5.2.3.2 Validation du modèle par la méthode TUNEL

Les échantillons de foie prélevés sont fixés très rapidement dans une solution de paraformaldéhyde 4% où ils restent 24h. Les échantillons sont ensuite déshydratés par plusieurs passages dans des bains successifs d'éthanol 70°, d'éthanol 95° et de butanol. L'enrobage dans la paraffine est réalisé par trois bains à 60°C. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées sur un microtome (Reichert Autocut 2040). Les coupes sont étalées sur une goutte d'eau distillée déposée sur des lames porte-objet prétraitées au silane (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) et déposées sur une plaque chauffante à 37°C.

Les noyaux des cellules apoptotiques sont ensuite détectés par la méthode TUNEL (voir 2.2.2). Dans ce but, les coupes sont déparaffinées et réhydratées par passages dans des bains de toluène (2 fois 10 minutes), d'éthanol (3 fois quelques secondes) et d'eau courante (10 minutes). Afin de permettre une légère décondensation de l'ADN, les coupes sont placées 1 heure dans l'eau à 60°C. Les coupes sont ensuite incubées 15 minutes à 37°C avec du tampon de réaction pour la TdT. Elles sont incubées pendant 2 h à 37°C avec le tampon contenant les réactifs (0,005 nmol/µl biotine-dUTP, 0,02 nmol/µl dATP et 0,5 U/µl enzyme TdT dilué dans le tampon TdT) (figure 5.4). Après trois rinçages de 5 minutes dans du PBS, les coupes sont incubées 30 minutes à température ambiante avec le complexe ABC constitué de streptavidine et de peroxydase biotinylée. Les coupes sont à nouveau rincées trois fois dans du PBS avant d'être révélées avec une solution 0,02 % de DAB (DiAminoBenzidine) dans du tampon PBS et 0,01% d'H₂O₂ préalablement filtrée sur un filtre de 0,22 µm. La réaction est stoppée par un bain d'eau distillée, les noyaux apoptotiques apparaissent brun foncé, ce qui correspond à la précipitation du DAB. Les coupes sont contre-colorées à l'hémalum et au bleu luxol, déshydratées dans des bains d'alcool puis de toluène et montées.

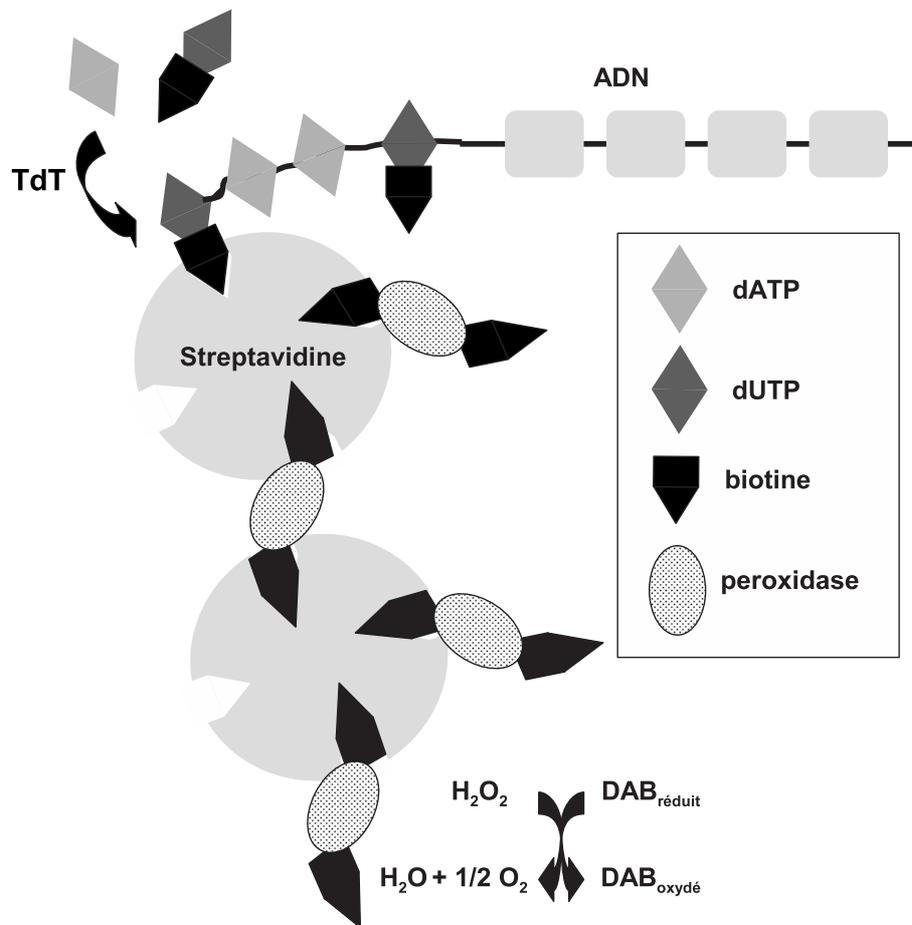


FIG. 5.4 – Détection de l'ADN fragmenté dans les cellules apoptotiques par la méthode TUNEL

5.2.3.3 Protocole de sélection utilisé pour la bibliothèque C7

Quelques minutes après le début de la perfusion d'un foie sain, 2×10^{11} phages sont ajoutés au perfusat et circulent en circuit fermé au travers du circuit de perfusion durant 30 minutes (ou 40 minutes lors de la dernière sélection). L'entièreté du perfusat est ensuite récupérée et ajoutée au liquide perfusant un foie apoptotique déjà isolé et perfusé depuis quelques minutes. Après une nouvelle incubation de 30 minutes (ou 20 minutes lors des deux dernières sélections), le foie apoptotique est récupéré et homogénéisé à l'aide d'un Ultraturrax T25 (IKA-Labortechnik, Janke and Kunkel, Staufen, Allemagne). L'homogénat est alors centrifugé 10 minutes à 3000 rpm à 4°C. Après élimination du surnageant, les phages fixés aux cellules sont élués par re-suspension des cellules dans 1 ml de glycine - HCl 0,2 M à pH 2,2. La solution agit 10 minutes sous agitation lente. La solution de glycine contenant les phages élués est débarrassée des cellules par 10 minutes de centrifugation à 10000 rpm et à 4°C, et est neutralisée avec 150 μ l de Tris - HCl 1M à pH 9,1 pour constituer l'**output**. Après amplification, l'**output** est utilisé pour un nouveau cycle. Lors de cette expérience de phage display, 4 cycles ont été réalisés selon le protocole décrit ci-dessus.

5.2.3.4 Protocole de sélection utilisé pour la bibliothèque L6

2×10^{12} phages sont ajoutés au perfusat et circulent 30 minutes au travers du circuit de perfusion d'un foie sain. Les phages contenus dans le perfusat sont ensuite amplifiés avant un nouveau cycle. Quatre contre-sélections sont ainsi effectuées sur foie sain suivies de trois cycles de sélection positive sur foie apoptotique. Dans ce cas, 2×10^{12} phages sont ajoutés au perfusat d'un foie apoptotique, y circulent 30 minutes et les phages contenus dans le foie sont récupérés et amplifiés. Pour cela le foie apoptotique est homogénéisé. L'homogénat est alors centrifugé 10 minutes à 3000 rpm à 4°C. Après élimination du surnageant, les phages fixés aux cellules sont élués en re-suspendant les cellules dans 1 ml de glycine - HCl 0,1 M à pH 2. La solution agit 30 minutes sous agitation lente. La solution de glycine contenant les phages élués est débarrassée des cellules par 10 minutes de centrifugation à 10000 rpm et à 4°C et est neutralisée avec 125 μ l de Tris - HCl 1M à pH 8 pour constituer l'**output**. Après amplification, l'**output** est utilisé pour un nouveau cycle de sélection positive.

5.3 Amplification des bibliothèques de phages

Les phages sont amplifiés après chaque cycle à l'exception du dernier (souvent le quatrième). L'amplification se fait par infection de *E. coli* (voir 3.4). Deux protocoles d'amplification ont été utilisés dans ce travail en fonction de la bibliothèque à amplifier. Cependant, ils se basent tous deux sur le même principe, à savoir une multiplication dans la culture de *E. coli*, suivie par une étape d'élimination des bactéries, elle-même suivie par une étape de précipitation facilitée par le PEG (Poly Ethylène Glycol) et une étape de purification.

5.3.1 Amplification des phages L6

La souche de *E. coli* utilisée dans ce protocole est la souche TG1 (F' Δ (lac-proAB) supE thi Δ (hsdD5) traD36 proA⁺B⁺ lacI^q lacZ Δ M15). Une pré-culture de *E. coli* TG1 est réalisée dans 20 ml de milieu LB (Luria-Bertoni). Le lendemain, la culture est diluée 100 fois dans 20 ml de milieu 2 YT (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique). Lorsque la culture a atteint une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) située entre 0,5 et 0,7, elle est infectée par les phages contenus dans l'output. Après 30 minutes d'incubation, le mélange est centrifugé 10 minutes à 2000 rpm. Le culot est repris dans 1ml de LB_{Tc} afin de l'étaler à raison de 250 μ l par boîte de pétri de 20 cm de diamètre contenant du LB agar. Les boîtes sont placées une nuit à 37°C. Le lendemain, les phages amplifiés sont récupérés en déposant sur les boîtes 3 ml de LB. Les bactéries et les phages y sont re-suspendus par raclage à l'aide d'une spatule de verre. La suspension est centrifugée 20 minutes à 8000 rpm et à 4°C. 1/5 V PEG₆₀₀₀/NaCl est ajouté au surnageant et le mélange est incubé pendant 2 heures dans la glace. Le mélange est ensuite centrifugé 20 minutes à 3200 rpm et à 4°C. Le surnageant

est éliminé et le culot est repris dans 1 ml d'eau stérile. 1/5 V PEG₆₀₀₀/NaCl est à nouveau ajouté et la préparation est incubée 30 minutes à 4°C. Après une centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm et à nouveau à 4°C, le culot est remis en suspension dans 500µl de TBS. Le nouveau stock de phages est ensuite conservé à -20°C dans une solution contenant 5% de glycérol (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique).

5.3.2 Amplification des phages C7

Cette fois la souche de *E. coli* utilisée porte le nom de ER2738 (F' Δ(lac-proAB) supE thi Δ((hsdMS-mcrB)5(r_k⁻m_k⁻McrBC⁻)) zzf : :Tn10(Tet^R/fhuA2 proA⁺B⁺ lacI^q lacZΔM15). Une pré-culture de *E. coli* ER2738 est réalisée dans 20 ml de milieu LB. Le lendemain, la culture est diluée 100 fois dans 20 ml de milieu LB. Lorsque la culture a atteint une DO₆₀₀ d'environ 0,5, elle est infectée par les phages contenus dans l'output. Après 30 minutes d'incubation, de la tétracycline est ajoutée au milieu pour obtenir une concentration finale de 10 µg/ml. La culture est transférée dans un tube de 50 ml après 4,5 heures d'incubation. La culture est centrifugée 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et re-centrifugé. Les 80% supérieurs du surnageant sont pipetés et transférés dans un nouveau tube et 1/6 V PEG₈₀₀₀/NaCl y est ajouté. Après une nuit à 4°C les phages ont précipités. La solution est ensuite centrifugée 15 minutes à 10000 rpm et à 4°C. Le surnageant est éliminé à l'aide d'une pipette. Le culot est repris dans 1 ml de TBS et transféré dans un tube de micro-centrifugation. La solution est centrifugée brièvement avant d'être à nouveau transférée dans un tube de micro-centrifugation. 1/6 V PEG₈₀₀₀/NaCl y est ajouté et le tout est laissé à incuber durant 1 heure. Une dernière centrifugation de 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C permet d'éliminer le surnageant. Le culot est ensuite repris dans 200 µl de TBS contenant 0,02% de NaN₃. Tout comme à la fin du premier protocole, le nouveau stock de phages peut être conservé à -20°C dans une solution contenant 5% de glycérol.

5.4 Dosage des phages

Le dosage des phages peut être effectué selon deux procédures. Selon que la solution est faiblement ou fortement concentrée, on utilisera la titration par infection ou le dosage par lecture de la DO. Ainsi les solutions stock venant d'être amplifiées sont aisément et rapidement dosées par simple mesure de la DO à des longueurs d'onde données. A l'inverse, les milieux, les tampons, les perfusats ou les homogénats contenant les phages non spécifiques ou les phages spécifiques avant amplification ne sont pas assez concentrés pour être dosés par lecture de DO et sont donc titrés par infection.

5.4.1 Dosage par densité optique

Les phages étant composés de protéines et d'ADN, une solution les contenant présente des pics d'absorption confondus à 260 nm et 280 nm (figure 5.5). Il suffit donc de mesurer la DO à 270 nm et à 320 nm et d'appliquer la formule suivante :

$$\text{concentration phagique (phages/ml)} = \frac{(DO_{270} - DO_{320}) \times 6 \times 10^{16}}{\text{nombre de bases/phage}} \quad (5.1)$$

La mesure de la densité optique donne accès à une information supplémentaire qui est la pureté des phages. En effet, si le spectre présente d'autres pics que celui de 260 nm et 280 nm, c'est qu'il reste des impuretés comme par exemple des débris bactériens. Ces mesures ont été réalisées sur un spectrophotomètre HP8452 Diode Array (Hewlett-Packard, Bruxelles, Belgique).

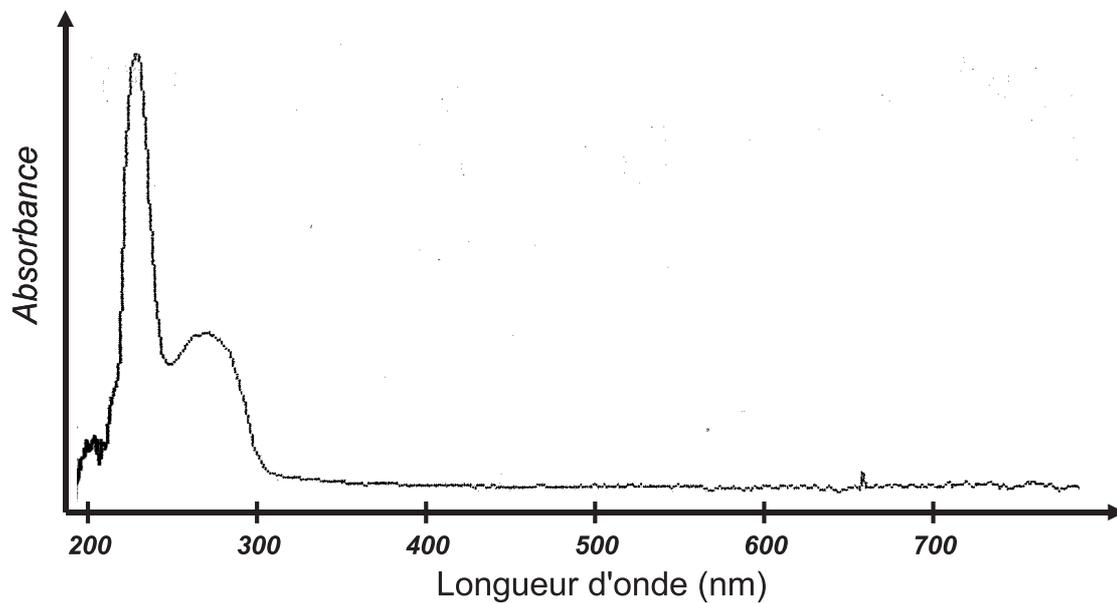


FIG. 5.5 – Spectre UV-visible d'une solution de phages

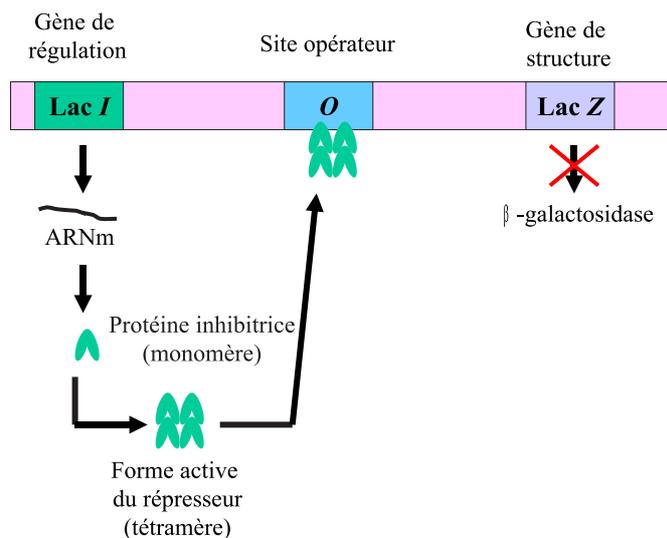
5.4.2 Titration par infection

Le dosage par infection permet le dosage de solutions bien moins concentrées en faisant appel au pouvoir d'infectivité des phages.

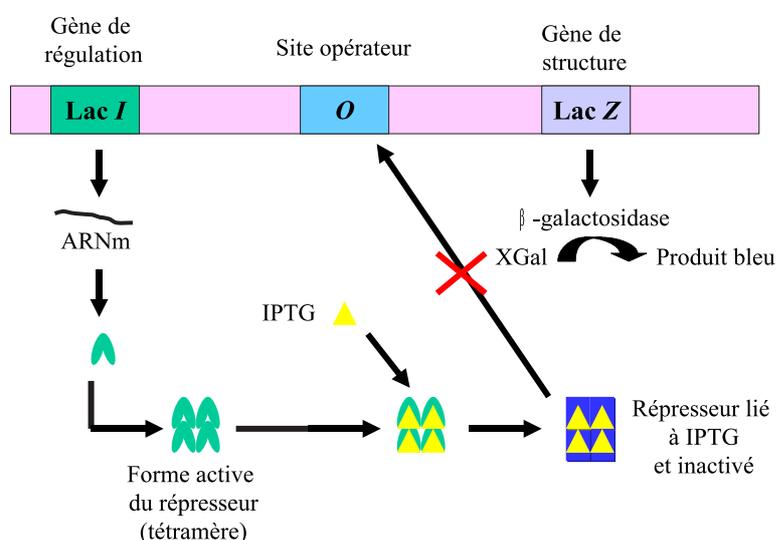
Pour doser les phages appartenant à la bibliothèque L6, 10 ml de LB sont inoculés avec une colonie de TG1 et sont incubés à 37°C et sous agitation jusqu'à une DO_{600} située entre 0,5 et 0,7. Une série de dilutions de la solution à doser est préparée dans des tubes de microcentrifugation. Lorsque la culture atteint la DO_{600} souhaitée, 900 μl de culture sont ajoutés à 100 μl de chaque dilution. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 100 μl de chaque

dilution sont versés et étalés sur une boîte de pétri contenant du LB_{Tc} agar. Après 5 minutes, les boîtes sont inversées et incubées à $37^{\circ}C$ pour une nuit. Le lendemain, les colonies de bactéries peuvent être comptées. Hors saturation, le nombre de bactéries correspond à 10 fois le nombre de phages qui étaient présents dans les $100 \mu l$ de dilution. Ceci est possible car seules les bactéries infectées sont capables de survivre sur le milieu contenant de la tétracycline. En effet, les phages L6 leur apportent, en les infectant, un gène de résistance à cet antibiotique.

Pour doser les phages appartenant à la bibliothèque C7, 10 ml de LB sont inoculés avec une colonie de ER2738 et sont incubés à $37^{\circ}C$ et sous agitation jusqu'à une DO_{600} de 0,5. Des aliquotes de 3 ml d'agarose préalablement fondu sont réalisées et conservées à $45^{\circ}C$. Une série de dilutions de la solution à doser est préparée dans des tubes de microcentrifugation. Lorsque la culture atteint la DO_{600} souhaitée, $200 \mu l$ de culture sont ajoutés à $10 \mu l$ de chaque dilution. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les bactéries infectées sont transférées dans le tube contenant l'agarose. Une fois vortexé, le contenu du tube est versé sur une boîte de pétri préchauffée contenant du LB/IPTG/Xgal agar. Après 5 minutes, les boîtes sont inversées et mises à $37^{\circ}C$ pour une nuit. Le lendemain, les colonies bleues de bactéries peuvent être comptées. Celles-ci sont bleues car le phage leur a apporté l'information génétique nécessaire à la métabolisation de l'Xgal (figure 5.6). Hors saturation, le nombre de bactéries bleues correspond au nombre de phages qui étaient présents dans les $10 \mu l$ de chaque dilution.



Le gène *LacZ* apporté par le phage lors de l'infection de la bactérie, code pour la β -galactosidase. Son expression est réprimée par une protéine inhibitrice codée par le gène *LacI* situé sur le même opéron en amont du gène *LacZ*.



L'IPTG contenu dans le milieu de culture se fixe à la protéine inhibitrice et empêche sa fixation au site opérateur. La transcription et la traduction du gène *LacZ* sont alors possibles. La β -galactosidase synthétisée peut alors métaboliser le Xgal, également présent dans le milieu de culture, en un produit bleu.

FIG. 5.6 – Principe de coloration des bactéries infectées par les phages C7 dans un milieu de culture LB/IPTG/Xgal agar.

5.5 Evaluation de l'affinité globale des bibliothèques intermédiaires

Le bon déroulement de la sélection peut être évalué par une estimation de l'affinité globale des bibliothèques intermédiaires, constituées par les outputs amplifiés, pour la cible étudiée. Cette mesure est réalisée par la méthode ELISA selon la séquence suivante (figure 5.7) : immobilisation de la cible, incubation avec la solution de phages à tester, rinçage et élimination des phages non fixés à la cible, incubation avec un anticorps anti-phage couplé à une peroxydase, rinçage et élimination des anticorps non fixés aux phages, incubation avec le substrat de la peroxydase et mesure de la DO.

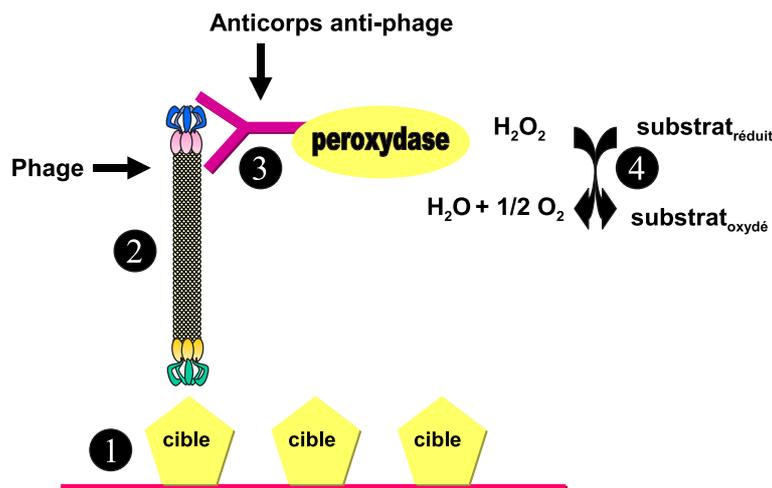


FIG. 5.7 – Principe de l'évaluation de l'affinité des phages par ELISA

L'immobilisation des phospholipides est réalisée comme décrit au point 5.2.1.1 mais dans des puits de plaque 96 puits (Greiner GmbH, Frickenhausen, Allemagne) et à raison de $200 \mu\text{l}$ par puits. La plaque est incubée avec $200 \mu\text{l}$ /puits d'une solution de blocage. Après 2 heures, la plaque est rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 (ICN, Asse-Relegem, Belgique) à l'aide d'un laveur de plaque (Adil Instruments, Schiltigheim, France). Les phages issus des bibliothèques intermédiaires sont ajoutés dans leur puits respectif, à raison de 10^{10} /puits contenus dans $50 \mu\text{l}$ de TBS. Après 1 heure 30 minutes d'incubation à 37°C , la plaque est à nouveau rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20. $100 \mu\text{l}$ /puits d'anticorps anti-M13-HRP (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Roosendaal, Pays-Bas) dilué 5000 fois dans de la solution de blocage sont ajoutés à chaque puits et la plaque est incubée 1 heure. La plaque est rincée une dernière fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 avant que $160 \mu\text{l}$ /puits de mélange réactionnel OPD soient ajoutés. Après 30 minutes, la réaction est arrêtée avec $50 \mu\text{l}$ /puits d'une solution 4M d'acide sulfurique et les DO_{450} sont lues dans les différents puits à l'aide d'un spectrophotomètre (Stat Fax- 2100, Awareness Technology Inc., Palm City, Floride, USA).

5.6 Amplification clonale

A la fin du dernier cycle de sélection, l'output contient un lot de phages qui vont, à partir de ce point, être individualisés et donc traités par la suite de manière individuelle. On parlera maintenant de clones qui, dans ce cas, représentent un ensemble de phage tous identiques car tous sont issus du même phage parent. Les clones sont individualisés à partir des dilutions réalisées pour la titration du dernier output. Les colonies bleues qui ont déjà fait l'objet d'un comptage au point précédent sont prélevées et mises en culture. Chacune d'elles produira un clone, donc un seul type de phage.

Les clones sont pré-amplifiés en parallèle dans des plaques de culture 24 puits (Greiner GmbH, Frickenhausen, Allemagne). 1 ml de pré-culture bactérienne diluée 100 fois est distribué par puits. Chaque pré-culture est infectée par une colonie prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile. Le tout est incubé à 37°C sous agitation vigoureuse durant 5 heures. Le contenu de chaque puits est transféré dans un tube de microcentrifugation et centrifugé 1 minute à 1000 rpm et à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et centrifugé à nouveau. La quantité nécessaire pour les ELISA ponctuelles est prélevée et le reste est conservé à -20°C après ajout d'un volume égal de glycérol.

Si besoin en est, les clones pré-amplifiés peuvent être amplifiés à plus grande échelle pour permettre des études plus approfondies, comme le séquençage. Pour cela, une pré-culture est diluée 100 fois dans 20 ml de LB et 5 μ l de la solution pré-amplifiée y sont ajoutés. L'incubation est menée sous agitation vigoureuse à 37°C durant 4,5 heures. La culture est ensuite transférée dans un tube et centrifugée 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C. Le surnageant est transféré dans un tube et est centrifugé à nouveau. Les 80 % supérieurs du surnageant sont transférés dans un tube, 1/6 V PEG₈₀₀₀/NaCl y est ajouté et le tout est incubé durant une nuit à 4°C. La solution est centrifugée 15 minutes à 10000 rpm et à 4°C, et le surnageant est éliminé à l'aide d'une pipette. Le culot est repris dans 1 ml de TBS et transféré dans un tube de microcentrifugation. Après avoir été centrifugé brièvement, le surnageant est transféré dans un tube, 1/6 V PEG₈₀₀₀/NaCl y est ajouté. Après 1 heure d'incubation, la solution est centrifugée 15 minutes à 10000 rpm et à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 200 μ l de TBS contenant 0,02% de NaN₃.

5.7 ELISA ponctuelle

Le terme "ELISA ponctuelle" désigne des ELISA réalisées à une seule concentration en clone. Les phages sont directement issus de la pré-amplification clonale et leur concentration exacte n'est pas déterminée. Ce test permet de réaliser rapidement un classement entre les différents clones issus de la sélection. Le principe de l'ELISA est identique à celui décrit au point 5.5 à ceci près qu'il ne s'agit plus d'un mélange de phages mais bien de phages identiques, les clones.

5.8 Courbe de fixation

La courbe de fixation permet d'évaluer la constante de dissociation apparente (K_d app) ou d'association apparente (K_a app) existant entre un type de phage et un type de phospholipide. Il s'agit simplement d'une ELISA comme précisé au point 5.7 mais avec de multiples concentrations décroissantes en clones réalisées dans du tampon calcium. La concentration au point d'inflexion donne la valeur du K_d app. La courbe est calculée avec la formule suivante :

$$y = \frac{a}{1 + \exp[-(x - b)/c]} \quad (5.2)$$

où y = densité optique, x = concentration en clones, a = densité optique au plateau supérieur, b = concentration en clone au point d'inflexion et c = densité optique au point d'inflexion.

5.9 Courbe de compétition

Les courbes de compétition permettent d'observer le comportement de clones en terme d'affinité en présence d'un ligand d'affinité connue. Dans ce travail, c'est l'annexine V (voir 2.1) qui a été utilisée comme compétiteur.

L'immobilisation des phospholipides est réalisée comme pour les autres ELISA. La plaque est incubée avec 200 μ l/puits d'une solution de blocage. Après 2 heures, la plaque est rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 à l'aide d'un laveur de plaque. Une solution stock d'annexine V (Annexine V de placenta humain, 33 kD, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) préparée dans du tampon calcium additionné de 0,4 % de lait en poudre est diluée de 2 en 2 pour couvrir une gamme de 10^{-6} à 10^{-11} M. 50 μ l de chaque dilution sont ajoutés dans chaque puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 50 μ l de tampon calcium contenant les clones à une concentration déterminée par le point d'inflexion de la courbe de fixation, sont ajoutés. Après 1 heure 30 minutes d'incubation à 37°C, la plaque est à nouveau rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 et la suite du protocole est identique à celui utilisé au point 5.5.

5.10 Séquençage de l'ADN phagique

La séquence du peptide est obtenue par traduction inverse de la séquence de l'oligonucléotide. Afin d'obtenir cette séquence, la région d'ADN contenant le gène III doit être séquencée. Dans ce travail, le séquençage est réalisé par la méthode de Sanger (figure 5.8). Dans cette méthode [133], l'ADN monocaténaire est hybridé à une amorce d'oligonucléotides. Une ADN polymérase allonge cette amorce sur base du modèle fourni par l'ADN monocaténaire. Le milieu réactionnel contient un mélange des 4 dNTP (désoxyribonucléotide

triphosphate) et des 4 ddNTP (didésoxyribonucléotide triphosphate). Puisque les ddNTP ne possèdent pas d'hydroxyle 3', l'allongement ne peut pas progresser au-delà de ce résidu. La réaction va donc générer des chaînes terminées prématurément pour chaque résidu, qui seront séparées sur un gel de séquençage. Les ddNTP utilisés émettant à des longueurs d'onde données, la séquence peut ainsi être déterminée.

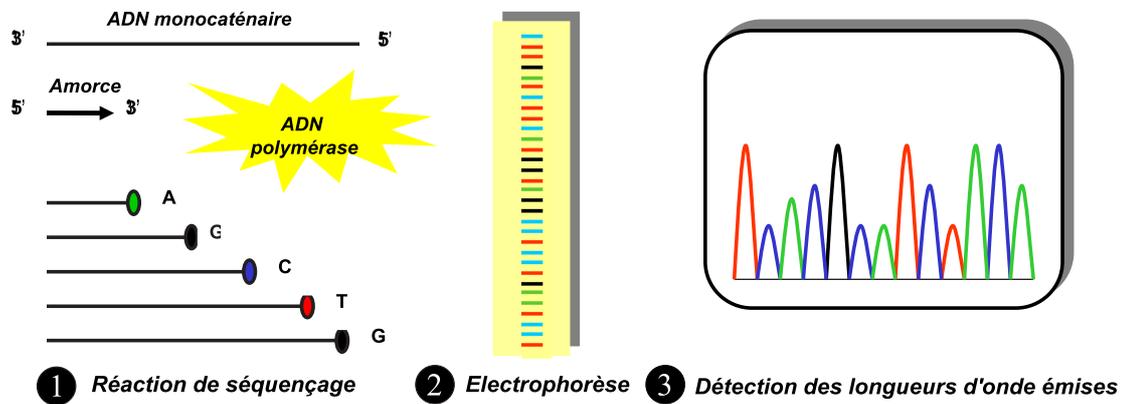


FIG. 5.8 – Principe du séquençage d'ADN selon Sanger

5.10.1 Obtention et purification de l'ADN phagique

50 μl de TBS contenant les clones obtenus lors de la seconde amplification du point 5.6 sont portés à 400 μl avec du TE. 100 μl de phénol (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) sont ajoutés. Après avoir été vortexée 1 minute, la solution est incubée à température ambiante pendant 10 minutes dans un rotateur et centrifugée 10 minutes à 13000 rpm. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 100 μl de phénol y sont ajoutés. La solution est à nouveau vortexée, incubée et centrifugée. Un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) est ajouté à la phase aqueuse transférée dans un nouveau tube. Le tout est vortexé 15 secondes et centrifugé 5 minutes à 13000 rpm. La phase aqueuse est récupérée et 1/10 de volume de NaClO_4 (5M) et un volume égal d'isopropanol 100% sont ajoutés. Après un bref vortexage, la solution est centrifugée 25 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé et 200 μl d'éthanol 75% sont ajoutés une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est séché à 37°C pendant 5 minutes. 15 μl de TE sont finalement ajoutés et l'ADN est remis en suspension par 15 minutes d'incubation dans le rotateur. 5 μl de cette solution sont ensuite prélevés et portés à 300 μl avec du TE pour permettre une lecture de DO_{260} qui donne la concentration en ADN de la solution par la formule suivante :

$$\text{ADN}(\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{DO}_{260} \times \text{dilution} \times 33 \quad (5.3)$$

5.10.2 Réaction de séquençage

La réaction de séquençage est réalisée dans des tubes de 200 μl (Greiner GmbH, Frickenhausen, Allemagne). 12 - x μl d'eau distillée sont ajoutés à x μl de solution d'ADN contenant 227 ng d'ADN. L'ADN est dénaturé par un chauffage d'une minute à 95°C puis 2 μl d'amorce à 1,6 μM sont ajoutés à la solution. L'amorce utilisée pour les phages provenant de la bibliothèque L6 est 5'GGA GTA TGT CTT TTA AGT^{3'} (N.V. Invitrogen S.A., Merelbeke, Belgique) et celle utilisée pour les phages provenant de la bibliothèque C7 est 5'CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG^{3'} (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). Avant de subir 35 cycles d'amplification (20 secondes à 96°C, 20 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C), 6 μl de mélange de séquençage sont finalement ajoutés. La réaction est ensuite arrêtée par addition de 4 μl d'une solution contenant 1,5 M d'acétate de sodium et 50 mM d'EDTA (sel disodique de l'acide éthylènediamine tétraacétique). Afin de faire précipiter l'ADN, 1 μl de glycogène (20 mg/ml) (Beckman CoulterTM, Fullerton, Californie, USA) est ajouté à la solution et le tout est ensuite vortexé plusieurs minutes. 60 μl d'éthanol 95% froid sont ajoutés à la solution qui est ensuite vortexée et centrifugée 15 minutes à 14000 rpm et à 4°C. Le surnageant est délicatement éliminé et le culot est rincé avec 200 μl d'éthanol 70% froid. Le surnageant est éliminé après 5 minutes de centrifugation à 14000 rpm et à 4°C. Le rinçage est effectué une seconde fois. Le culot est ensuite séché à l'aide d'un speed-vac durant 20 à 25 minutes pour finalement être repris dans 40 μl de SLS (Beckman CoulterTM, Fullerton, Californie, USA). L'ADN est ensuite séquençé à l'aide d'un système CEQTM 2000 XL (Beckman CoulterTM, Fullerton, Californie, USA).

5.10.3 Obtention de la séquence peptidique

La séquence de l'insert oligonucléotidique est retrouvée au sein de la séquence du gène III. Dans l'ADN des phages de la bibliothèque L6, l'insert est bordé par les régions 5'TAT TCT CAC TCG GCC GAC GGG GCT (NNK)₆ GGG GCC GCT GGG GCC GAA ACT GTT^{3'} et par les régions 5'GTG GTA CCT TTC TAT TCT CAC TCT TGT (NNK)₇ TGT GGT GGA GGT TCG GCC GAA ACT GTT GAA^{3'} pour l'ADN des phages de la bibliothèque C7 (avec N = A, C, G ou T et K = G ou T). C'est le complémentaire de cette séquence qui est donné par le séquenceur. Pour traduire l'insert oligonucléotidique en peptide, nous avons besoin de son complémentaire inverse qui peut être obtenu par différents outils informatiques disponibles sur le site internet du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Il reste ensuite à appliquer le code génétique pour retrouver la séquence du peptide exposé.

Chapitre 6

Résultats

6.1 Validation des modèles

6.1.1 Immobilisation de phospholipides *in vitro*

Grâce à la coloration des phospholipides au noir Soudan, on peut observer la présence de ceux-ci dans le fond des puits après leur immobilisation décrite au point 5.2.1.1. Les résultats exprimés en pourcentage de densité optique à 400 nm (DO_{400}) reflètent la capacité des phospholipides à rester immobilisés suite aux rinçages successifs (figure 6.1). La fixation de DPPS ne semble pas altérée par les différents rinçages, ni par la présence de détergent (Tween 20) dans le liquide de rinçage. A l'inverse, la fixation de DPPC est nettement altérée lorsque la concentration en Tween 20 passe de 0,1 à 0,25%. Sur base de ces résultats, nous avons décidé de ne jamais utiliser une concentration en Tween 20 supérieure à 0,1 % dans les liquides de rinçage.

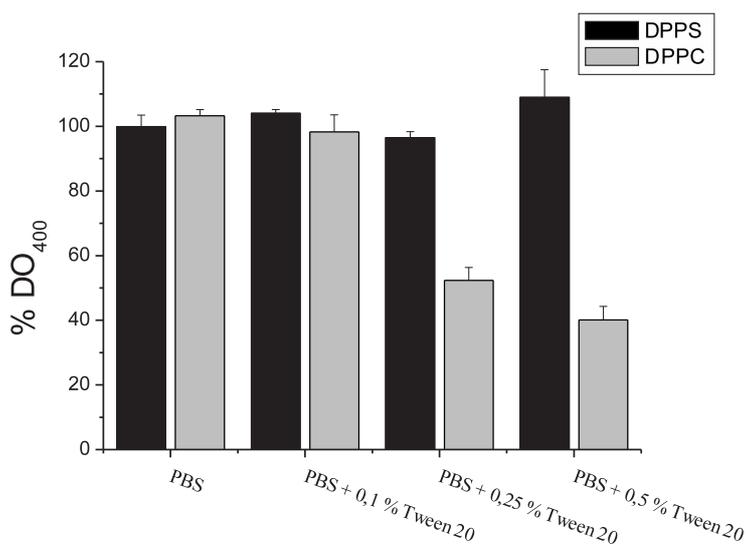


FIG. 6.1 – Présence de phospholipides en fonction des rinçages. ($n=3$)

6.1.2 Induction de l'apoptose par la camptothécine sur culture cellulaire

Les tests de viabilité réalisés par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan montrent que pour une concentration constante en camptothécine, le nombre de cellules mortes augmente en fonction du temps d'incubation (figure 6.2). L'augmentation est rapide en début d'incubation et s'atténue nettement après 1 h. Les résultats repris dans la figure 6.3 montrent une augmentation de la mortalité cellulaire en fonction de la dose de camptothécine administrée. A des concentrations en camptothécine plus élevées, la différence entre 2 heures et 4 heures d'incubation est très faible voire inexistante. Le pourcentage de cellules mortes augmente jusqu'à une concentration de $1\mu\text{M}$ en camptothécine pour ensuite ne plus varier de manière significative lors d'une nouvelle augmentation de la concentration. A la lumière de ces résultats, nous avons décidé d'incuber les cellules pendant 2 heures avec une concentration en camptothécine de $1\mu\text{M}$.

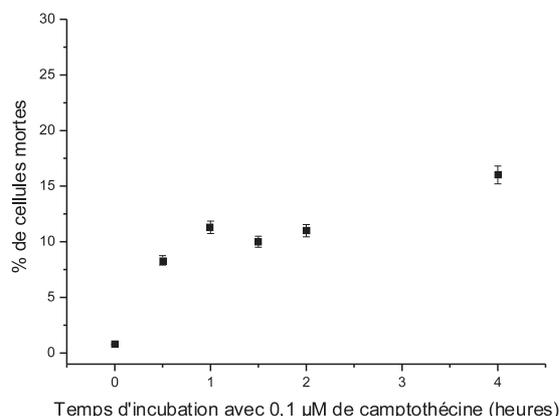


FIG. 6.2 – Evolution de la mortalité cellulaire en fonction du temps dans une culture de Hep G2 incubée avec $0,1\mu\text{M}$ de camptothécine. ($n=3$)

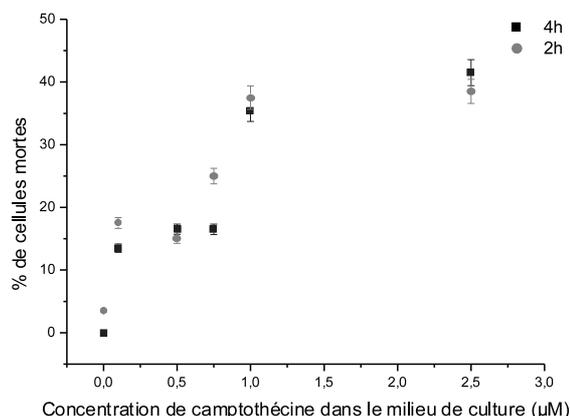


FIG. 6.3 – Evaluation de la mortalité cellulaire dans une culture de Hep G2 en fonction de la concentration en camptothécine dans le milieu de culture. ($n=3$)

La microscopie confocale réalisée avec le double marquage 6-CFDA et PI permet de différencier les cellules mortes par nécrose et par apoptose. La figure 6.4 montre que bien que la mortalité cellulaire ne cesse d'augmenter, le taux de cellules apoptotiques est le plus élevé après 2 heures d'incubation. A 4 heures, la majorité des cellules mortes apparaissent nécrotiques. Il s'agit probablement des cellules en apoptose qui ne sont plus capables de métaboliser le 6-CFDA et de le rendre fluorescent.

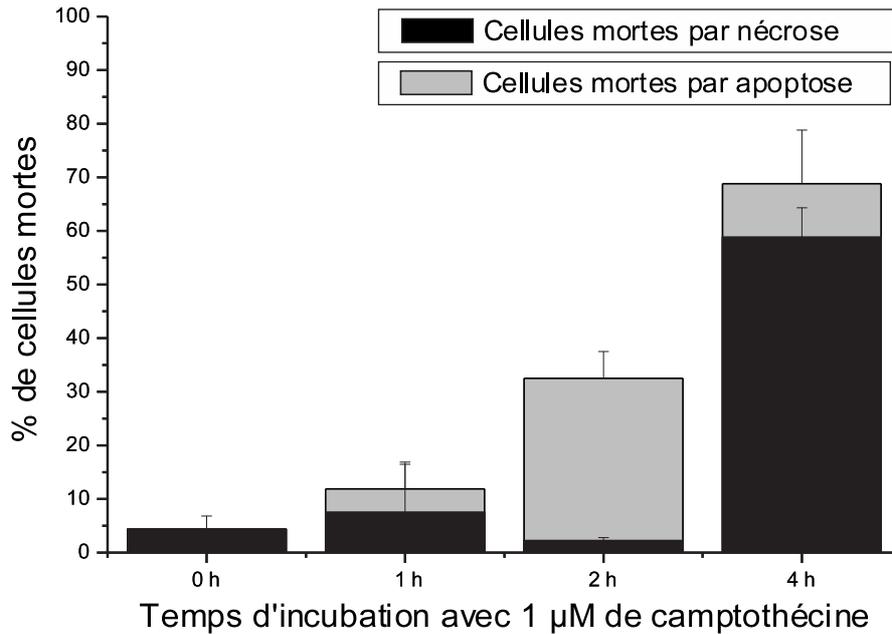


FIG. 6.4 – Evolution du type de mort au cours du temps dans une culture contenant $1 \mu\text{M}$ de camptothécine. ($n=3$)

6.1.3 Validation de l'induction de l'apoptose hépatique par injection d'anticorps anti-Fas

La méthode TUNEL a permis de mettre en évidence les cellules apoptotiques dans les foies de souris traitées par anti-Fas (figures 6.5 et 6.6). Les noyaux des cellules apoptotiques apparaissent en brun foncé alors que les noyaux des cellules saines restent colorés en bleu. Ces résultats nous montrent que 2 heures après injection *i.v.* de $10 \mu\text{l}$ d'anti-Fas chez la souris, plus de 70 % des hépatocytes sont apoptotiques (figure 6.7). Les microphotographies de la figure 6.5 montrent que les noyaux apoptotiques se concentrent en bordure des espaces porte. C'est en fait à ce niveau que le sang pénètre dans les lobules hépatiques et l'anti-Fas est donc délivré en premier lieu aux hépatocytes bordant ces espaces.

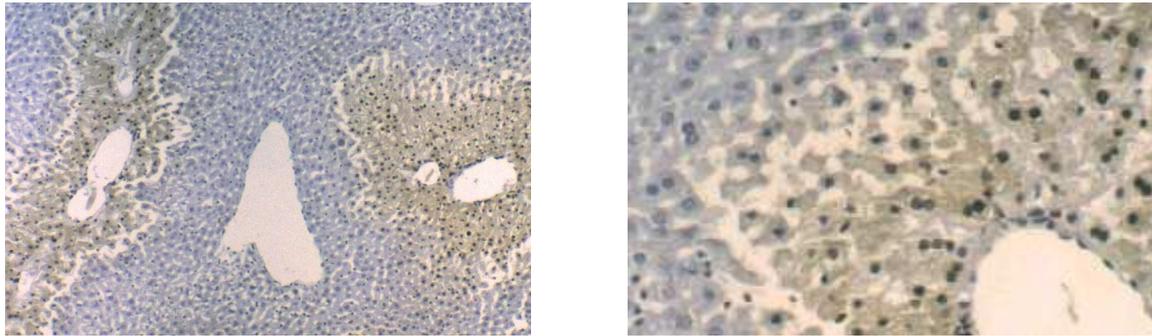


FIG. 6.5 – Microphotographies d’une coupe de foie de souris traitée par anti-Fas montrant des zones de cellules apoptotiques dont les noyaux sont colorés en brun foncé par la méthode TUNEL. Les zones apoptotiques se situent autour des espaces porte. *Contre-coloration à l’hémalum.* x 130 à gauche et x 200 à droite.

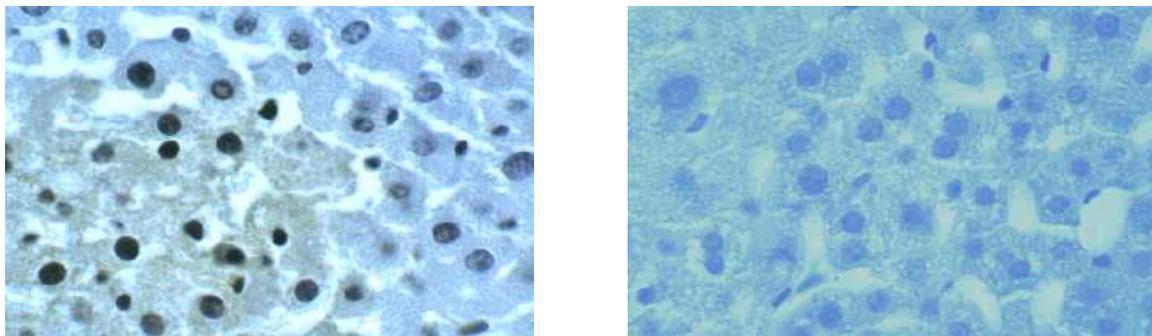


FIG. 6.6 – Microphotographies de coupes de foie colorées par la méthode TUNEL montrant des hépatocytes apoptotiques à gauche et sains à droite. Ces foies proviennent respectivement de souris traitées ou non par l’anti-Fas. *Contre-coloration à l’hémalum.* x 540.

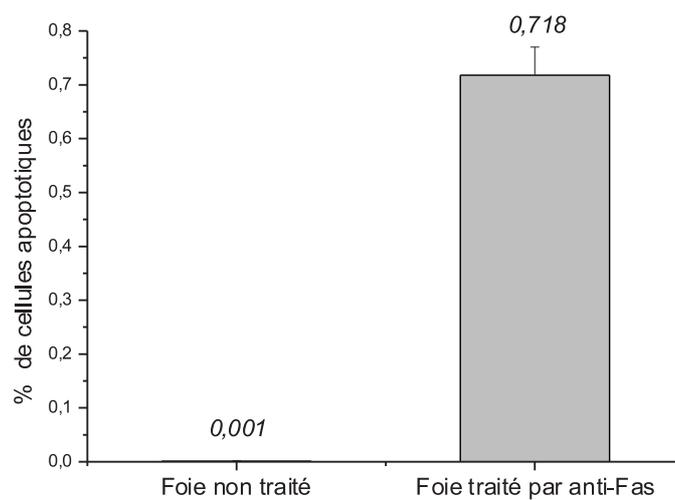


FIG. 6.7 – Comparaison du pourcentage de cellules apoptotiques trouvées dans un foie sain et dans un foie de souris traitée à l’anti-fas. ($n=4$)

6.2 Evolution des bibliothèques au cours des sélections

Alors que la bibliothèque L6 n'a fait l'objet que d'une sélection *ex vivo* sur foie perfusé, la bibliothèque C7 a été utilisée dans trois sélections menées en parallèle : une sélection *in vitro* sur phospholipides immobilisés sur des plaques en polystyrène, une sélection sur culture cellulaire et une sélection *ex vivo* sur foie perfusé. L'évolution de ces quatre expériences de phage display a été suivie à la fois en terme d'affinité des bibliothèques intermédiaires pour PS et PC, mais aussi en terme de quantité de phages élués lors de chaque cycle de sélection.

6.2.1 Sélection *in vitro* à partir de la bibliothèque C7

La figure 6.8 nous montre que l'affinité globale des bibliothèques C7 intermédiaires pour la phosphatidylsérine (PS), augmente fortement dès le second cycle de sélection pour ensuite cesser d'évoluer. D'une manière surprenante, l'affinité pour la phosphatidylcholine (PC) de ces mêmes bibliothèques tend à augmenter progressivement tout au long des sélections. Il semble que ce système de sélection ait mené à un enrichissement de la bibliothèque en phages présentant à la fois de l'affinité pour PS et pour PC. La quantification des phages présents sur la DPPS et la DPPC (bibliothèque de sortie) montre que lors de chaque cycle, bien que moins nombreux que ceux restés fixés à la PS, les phages restent fixés à la PC pendant les différents cycles. Il semble donc que la contre-sélection ne se soit pas montrée efficace, ce qui explique que l'affinité pour PC des bibliothèques intermédiaires n'ait jamais diminué.

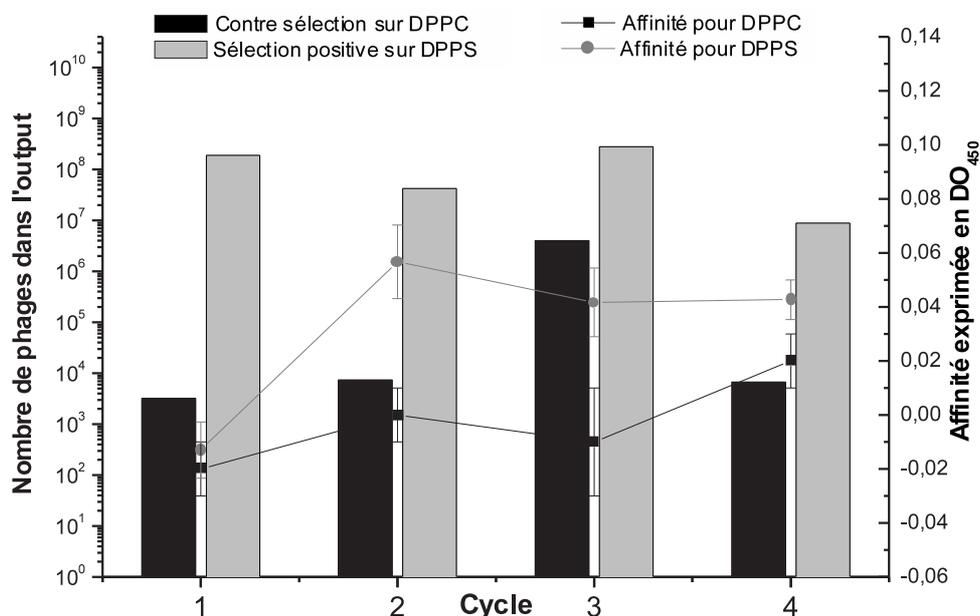


FIG. 6.8 – Evolution de l'affinité des bibliothèques intermédiaires et du nombre de phages récupérés dans la bibliothèque de sortie au cours des cycles de sélection *in vitro* à partir de la bibliothèque C7. ($n=3$)

6.2.2 Sélection sur culture cellulaire à partir de la bibliothèque C7

Les résultats repris dans la figure 6.9 montrent que les affinités des bibliothèques C7 intermédiaires pour PS et PC, qui jusqu'au deuxième cycle étaient aux erreurs expérimentales près identiques, divergent lors des troisièmes et quatrièmes cycles. En effet, lors des deux dernières sélections, l'affinité pour PS est presque deux fois supérieure à celle mesurée pour PC. Cette même figure montre également que dès le premier cycle, la quasi-totalité des phages ayant de l'affinité pour les cellules non traitées est éliminée. Ces résultats montrent que le système de contre-sélection et de sélection positive sur culture de cellules semblent efficaces.

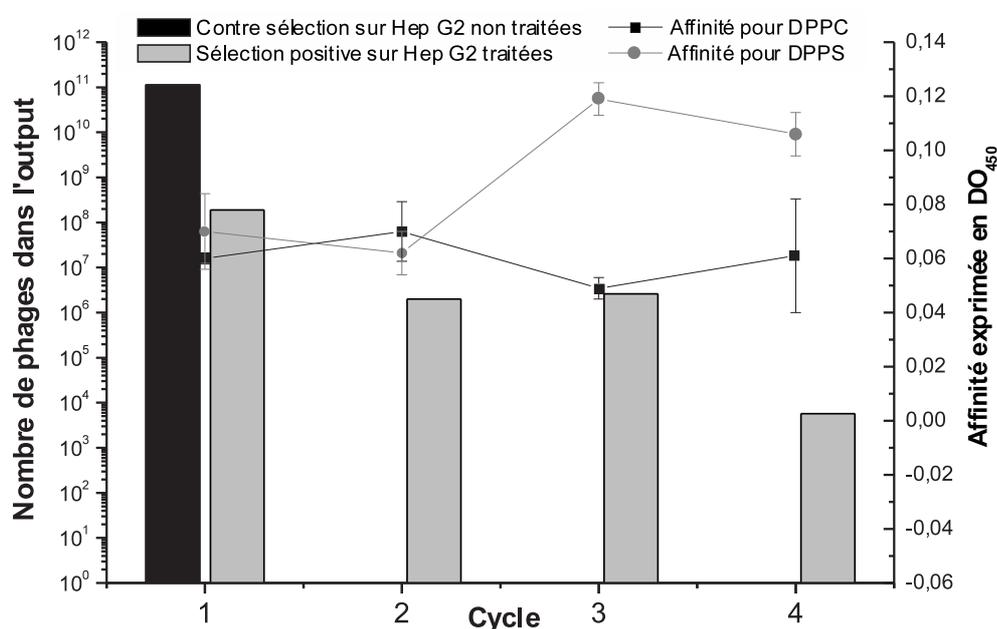


FIG. 6.9 – Evolution de l'affinité des bibliothèques intermédiaires et du nombre de phages récupérés dans la bibliothèque de sortie au cours des cycles de sélection sur culture cellulaire à partir de la bibliothèque C7. ($n=3$)

6.2.3 Sélection *ex vivo* à partir de la bibliothèque C7

La quantité de phages récupérés dans la bibliothèque de sortie est globalement moins élevée dans cette sélection que pour les deux autres types de sélection (figure 6.10). Cela n'est pas étonnant et est certainement dû à l'effet de dilution. Bien que le circuit de perfusion ait été adapté, son volume est néanmoins d'une centaine de millilitres, soit supérieur de deux ordres de grandeur au volume de tampon ou de milieu utilisé dans les sélections *in vitro*.

Bien que l'affinité des bibliothèques intermédiaires pour PS n'augmente plus de manière significative après le troisième cycle, l'affinité de cette même bibliothèque pour PC diminue drastiquement lors du dernier cycle. Le nombre de phages récupérés dans les foies sains est toujours supérieur à celui des phages récupérés dans les foies de souris traitées, à l'exception du foie sain du second cycle. Cette étape ne semble pas avoir bien fonctionné et semble même avoir produit une re-convergence des affinités pour PS et PC de la bibliothèque. Par la suite, les conditions de sélection ont été renforcées. Le temps de circulation dans le foie sain a été diminué de 30 à 20 minutes dans le foie apoptotique lors du troisième cycle et le temps de circulation dans le foie sain a été porté à 40 minutes lors du dernier cycle. Ces modifications du protocole sont perceptibles sur les résultats repris dans la figure 6.10 qui montre que le nombre de phages récupérés dans le foie sain a nettement diminué lors du troisième cycle, conduisant la bibliothèque intermédiaire vers une affinité pour PS plus élevée. Cette même figure nous montre également qu'après le dernier cycle, la bibliothèque s'est appauvrie en phages interagissant avec la PC. L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible de moduler l'efficacité d'une sélection en ajustant ses paramètres.

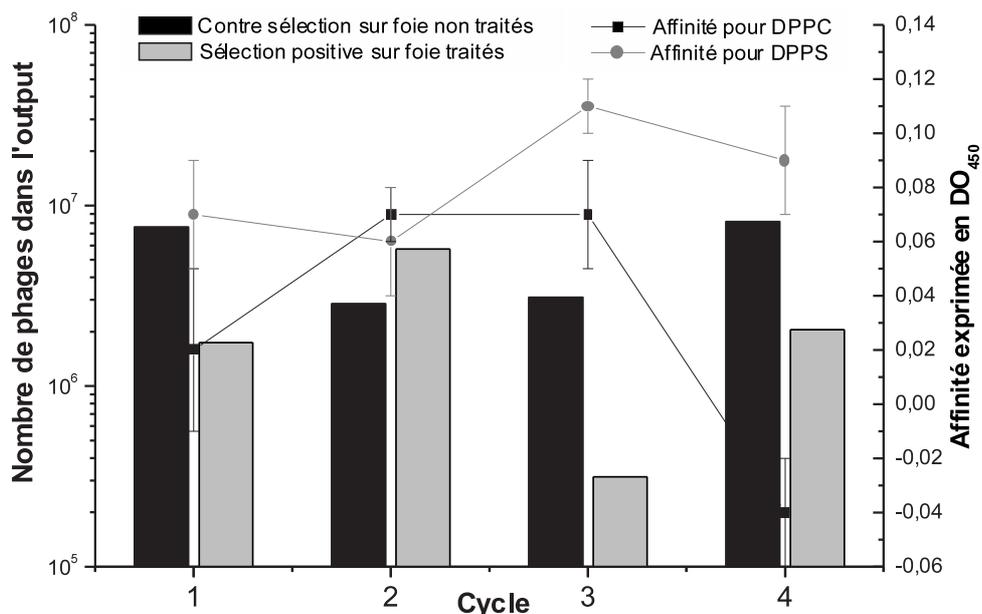


FIG. 6.10 – Evolution de l'affinité des bibliothèques intermédiaires et du nombre de phages récupérés dans la bibliothèque de sortie au cours des cycles de sélection *ex vivo* à partir de la bibliothèque C7. ($n=3$)

6.2.4 Sélection *ex vivo* à partir de la bibliothèque L6

Le schéma de cette expérience de sélection diffère quelque peu des précédents. Alors que dans les trois sélections décrites précédemment un cycle est composé d'une contre-sélection directement suivie d'une sélection positive, cette expérience de phage display comprend 4 cycles de contre-sélection sur foie sain (S1 à S4) suivis de 3 cycles de sélection positive sur foie apoptotique (A1 à A3).

La figure 6.11 montre que l'affinité globale de la bibliothèque décroît au fur et à mesure des contre-sélections sur foie sain. Cette chute d'affinité pour PS peut être associée à un appauvrissement de la bibliothèque en phages ayant de l'affinité pour les structures saines et pour la PS. A l'inverse, durant les trois cycles de sélection positive sur foie apoptotique, l'affinité de la bibliothèque augmente. Cela s'explique par un enrichissement de la bibliothèque en phages ayant de l'affinité pour les structures apoptotiques telles que la PS.

Le secteur de la figure 6.11 représente la proportion de phages récupérés dans le foie, lorsque la bibliothèque vectorisée est injectée dans le circuit de perfusion d'un foie sain. Moins de 2% de ces phages y restent fixés. Cette donnée supplémentaire montre que la contre-sélection s'est elle aussi avérée efficace.

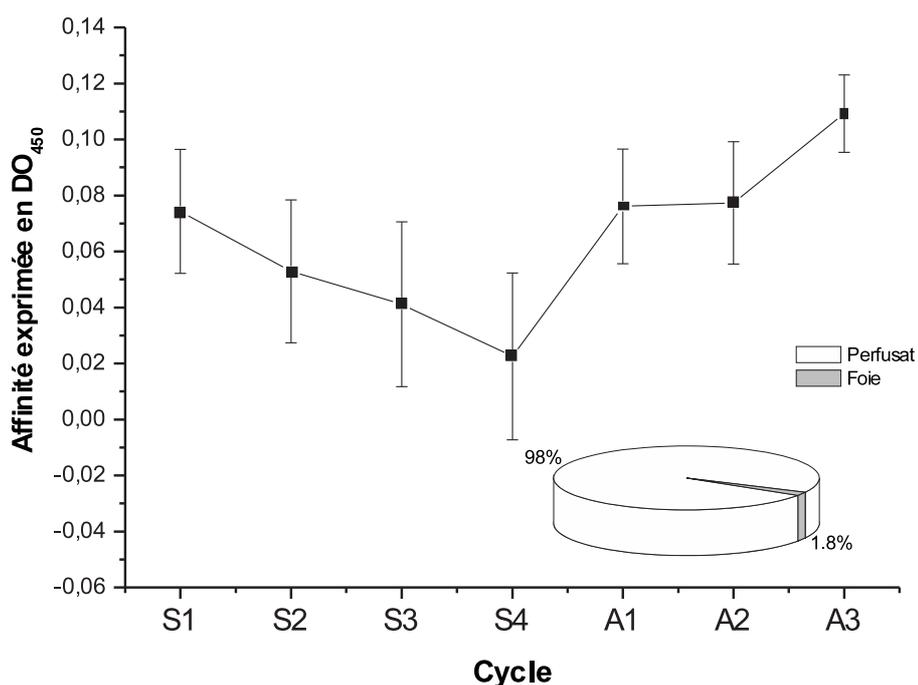


FIG. 6.11 – Evolution de l'affinité des bibliothèques intermédiaires pour PS au cours des cycles de sélection *ex vivo* à partir de la bibliothèque L6 ($n=3$). Le secteur représente le nombre de phages récupérés dans un foie sain lors de l'injection de la bibliothèque vectorisée dans celui-ci.

6.3 Efficacité des phages obtenus

A la fin des cycles de sélection, les phages présents dans les bibliothèques de sortie ont été isolés et amplifiés individuellement. L'affinité envers la PS et la PC de chacun de ces clones a ensuite été évaluée par des séries d'ELISAs réalisées sur la PS et la PC, mais aussi sur la solution de blocage. Plus de 300 clones ont été testés de cette manière, générant ainsi plus de 1900 valeurs de DO. Afin d'établir un classement parmi les clones et d'en sélectionner les plus "efficaces", nous avons calculé un coefficient d'efficacité. Ce coefficient est défini de la manière suivante :

$$Coe\text{f.} = (DO_{450} \text{ PS} - DO_{450} \text{ PC}) \times (DO_{450} \text{ PS} - DO_{450} \text{ sln de blocage}) \quad (6.1)$$

Pour que son coefficient d'efficacité soit élevé, le clone doit donc remplir trois conditions. Son affinité pour PS doit être la plus élevée tandis que son affinité pour PC et pour la solution de blocage doit être simultanément la plus faible.

Les meilleurs clones ont ensuite été sélectionnés selon ce classement basé sur leur "efficacité".

La figure 6.12 reprend les coefficients d'efficacité des clones isolés à partir de différentes bibliothèques de sortie. Pour les sélections menées à partir de la bibliothèque C7, ce sont les bibliothèques de sortie des 3ème et 4ème cycles qui ont été choisies sur base de leur affinité globale. Dans le cas de la sélection *ex vivo* menée à partir de la bibliothèque L6, les clones sont exclusivement issus de la bibliothèque de sortie du dernier cycle et ce pour les mêmes raisons.

Toutes les bibliothèques de sortie n'ont par fourni un même nombre de clones. Cela trouve son explication dans l'expérimentation. En effet, les clones sont amplifiés à partir des colonies de bactéries infectées poussant sur boîte de pétri destinées à la titration par infection. Selon les dilutions, les colonies poussent bien distinctement et peuvent alors être prélevées. Si ce n'est pas le cas, les colonies ne sont pas prélevées pour éviter d'étudier un mélange de phages. Nous avons donc décidé de travailler avec le maximum de colonies prélevables sur les boîtes. Ce qui explique que les différentes bibliothèques de sortie ne soient pas toutes représentées de la même manière.

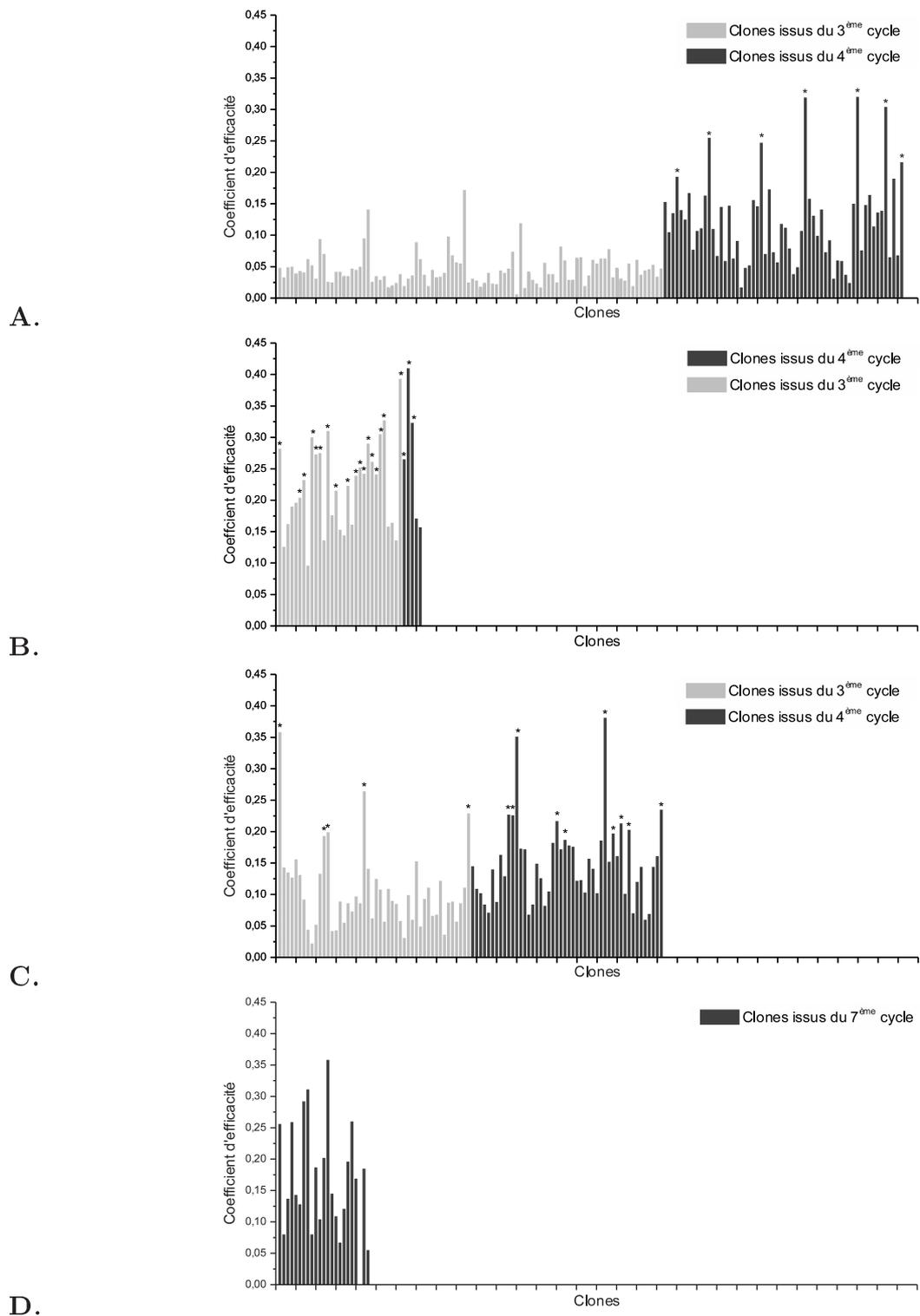


FIG. 6.12 – Coefficient d'efficacité des clones isolés de la bibliothèque C7 à partir des sélections *in vitro* (A), sur culture cellulaire (B), *ex vivo*(C) et de la bibliothèque L6 (D) lors de la sélection *ex vivo*, ($n=3$). Les clones marqués d'une * ont été sélectionnés pour le séquençage ainsi que l'ensemble des clones (L6) issus du 7^{ème} cycle de la sélection *ex vivo*.

Les moyennes des coefficients d'efficacité reprises dans la figure 6.13 sont calculées à partir des coefficients d'efficacité des clones issus d'une même bibliothèque de sortie. Ce graphique permet d'observer que cette moyenne a tendance à être plus élevée pour les bibliothèques de sortie des derniers cycles en comparaison des cycles précédents. Le même graphique montre que la sélection sur culture cellulaire a permis la sélection de clones qui sont en moyenne plus efficaces que les clones issus des autres types de sélection. Il est également possible d'observer sur cette figure que les deux sélections *ex vivo* ont abouti au même résultat en terme de moyenne des coefficients d'efficacité alors que les bibliothèques qui ont initié ces sélections sont, de par nature, différentes.

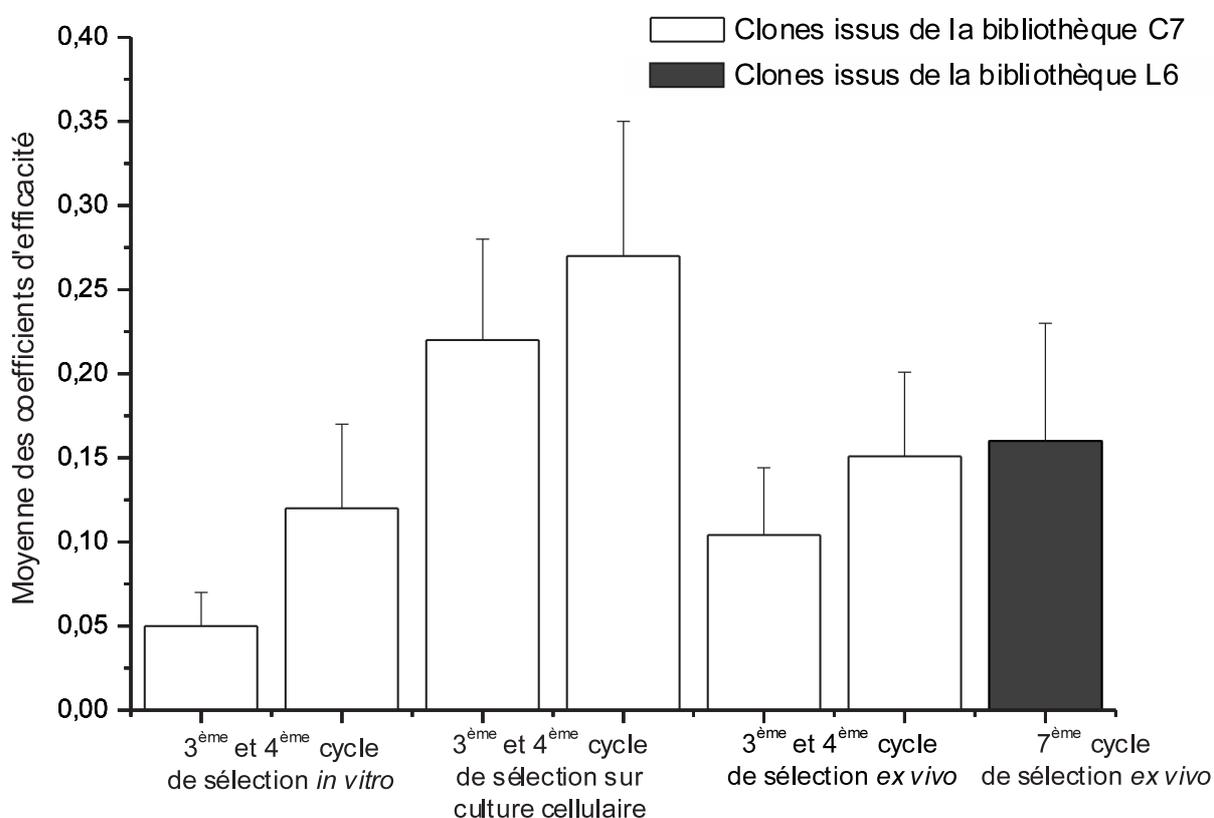


FIG. 6.13 – Coefficients d'efficacité moyens des différentes bibliothèques de sortie.

Lors du quatrième cycle de sélection *in vitro*, la population de clone ayant un mauvais coefficient d'efficacité ($<0,1$) diminue à l'avantage des clones de coefficient d'efficacité plus élevés (voir figure 6.14). Le même phénomène est observé entre le troisième et quatrième cycle de sélection sur culture cellulaire et *ex vivo*, à la différence près que globalement les clones sont déjà très efficaces dès le troisième cycle de sélection sur culture cellulaire. A la

vue de ces résultats, il semble que la sélection *in vitro* soit la moins efficace étant donné que 73% de ses clones n'atteignent pas un coefficient d'efficacité supérieur à 0,1. Par contre, les autres types de sélection réduisent ce pourcentage à 19 et 24 % pour les sélections *ex vivo* respectivement menées à partir des bibliothèques L6 et C7, et vont même jusqu'à l'annuler dans le cas de la sélection sur culture cellulaire.

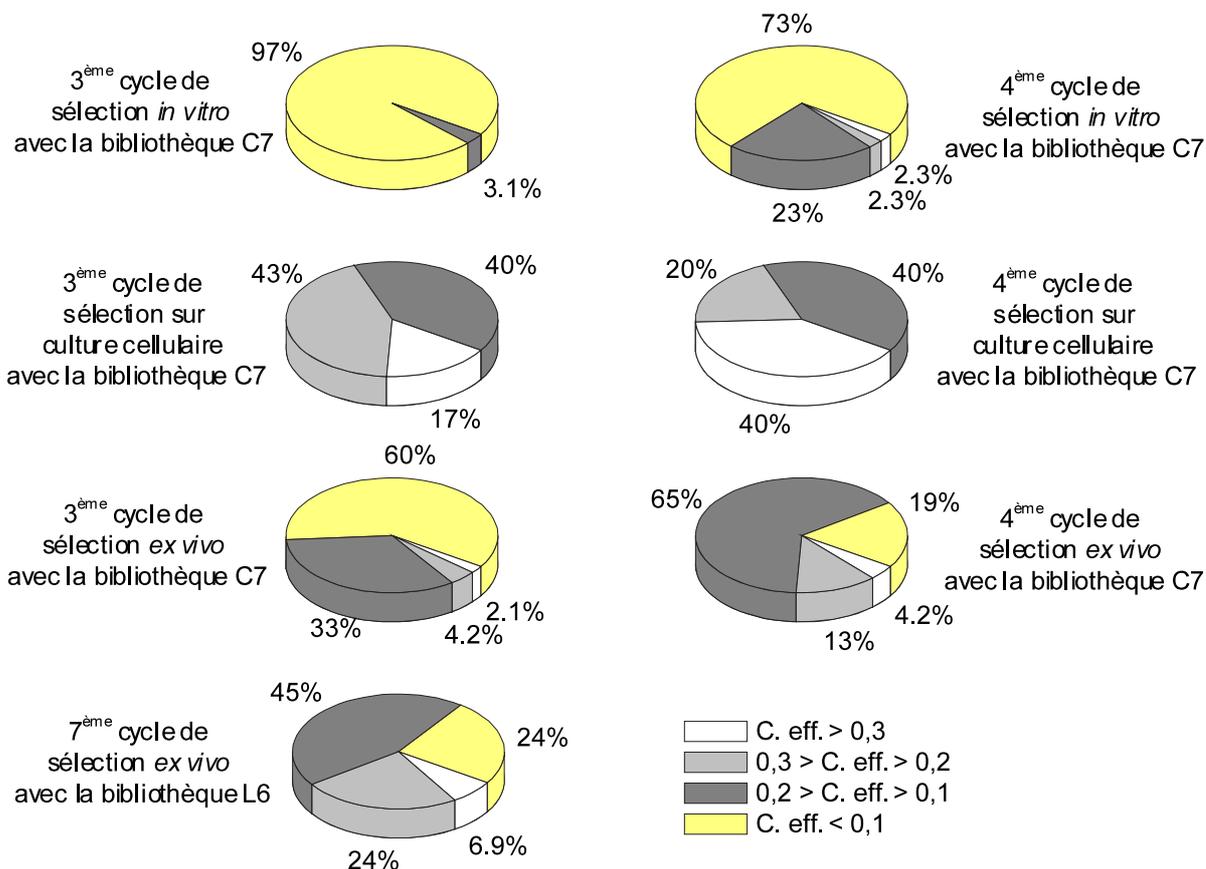


FIG. 6.14 – Evolution du coefficient d'efficacité moyen en fonction des cycles de sélection. Pourcentage de clones répartis en 4 catégories en fonction de leur coefficient d'efficacité (C. eff.).

6.4 Séquences des clones sélectionnés

Au total 68 clones (7 issus de la sélection *in vitro*, 21 issus de la sélection sur culture cellulaire, 15 issus de la sélection *ex vivo* menée à partir de la bibliothèque C7 et 23 à partir de la bibliothèque L6) ont été séquencés. Ils ont été choisis sur base de leur coefficient d'efficacité. Les séquences obtenues sont listées dans les tableaux 6.2 et 6.1.

Nom du clone	Séquence							Mode de sélection	Fréquence
FB10	T	M	H	R	N	H	T	<i>ex vivo</i>	1
FF12	Y	S	T	H	A	V	T	<i>ex vivo</i>	1
FE10/FE12/FH12	N	S	T	H	A	G	T	<i>ex vivo</i>	3
HF5	N	H	Q	H	H	R	L	cult. cel.	1
FG10	N	L	I	M	A	R	A	<i>ex vivo</i>	1
FH2/HH2/HF1	T	L	L	P	A	R	T	cult. cel. et <i>ex vivo</i>	3
P2E10	T	T	F	P	S	R	S	<i>in vitro</i>	1
P2A12	T	L	Q	F	P	L	K	<i>in vitro</i>	1
HG6	N	S	L	K	I	H	L	cult. cel.	1
P2C1	N	R	M	F	G	G	H	<i>in vitro</i>	1
P2C12	P	K	M	Q	S	G	I	<i>in vitro</i>	1
HF9	P	K	Q	P	H	R	H	cult. cel.	1
HG9	P	S	P	D	V	W	W	cult. cel.	1
P2E1	S	K	Y	G	H	A	G	<i>in vitro</i>	1
HH8	S	P	S	A	K	F	V	cult. cel.	1
HF11	S	R	L	T	M	P	L	cult. cel.	1
HH10	F	S	N	T	P	K	V	cult. cel.	1
HG3	F	P	R	S	S	P	Y	cult. cel.	1
HG12	F	P	R	A	P	H	H	cult. cel.	1
P2E12	H	A	G	P	R	H	H	<i>in vitro</i>	1
HG8	L	Q	H	S	K	Y	H	cult. cel.	1
HH3	L	R	S	P	S	Q	F	cult. cel.	1
FG12	L	P	S	L	A	Q	L	<i>ex vivo</i>	1
FG9	H	L	A	P	Y	R	G	<i>ex vivo</i>	1
FF9	H	E	R	F	S	R	T	<i>ex vivo</i>	1
FE11	H	I	T	S	H	P	R	<i>ex vivo</i>	1
HH1	D	P	R	G	P	P	A	cult. cel.	1
FA12	D	Q	N	M	R	L	P	<i>ex vivo</i>	1
HG10	Q	F	P	Q	K	K	S	cult. cel.	1
HF6	Q	W	T	Q	P	W	Q	cult. cel.	1
HG11	V	H	A	Q	S	L	Q	cult. cel.	1
P2E8	K	L	H	Q	L	L	Q	<i>in vitro</i>	1
FH4	K	P	N	T	L	W	A	<i>ex vivo</i>	1
HG1	K	F	S	T	T	T	Y	cult. cel.	1
HF7	Y	N	S	P	T	S	R	cult. cel.	1
HF10	V	A	T	Y	P	Q	M	cult. cel.	1
HH9	W	S	K	H	R	D	L	cult. cel.	1
FB1	R	P	F	L	A	A	D	<i>ex vivo</i>	1
FA1	E	R	W	L	V	S	A	<i>ex vivo</i>	1

TAB. 6.1 – Séquences des heptapetides exposés par les clones sélectionnés à partir de la bibliothèque C7.

Nom du clone	Séquence						Mode de sélection	Fréquence
E10	Q	A	G	F	S	V	<i>ex vivo</i>	1
D3	H	G	S	T	E	V	<i>ex vivo</i>	1
B11	H	P	T	G	S	M	<i>ex vivo</i>	1
F6	H	P	T	N	R	Q	<i>ex vivo</i>	1
F5	L	A	S	N	R	Q	<i>ex vivo</i>	1
G2	A	L	G	R	F	G	<i>ex vivo</i>	1
C5	A	E	K	V	L	H	<i>ex vivo</i>	1
G6	A	W	A	L	R	F	<i>ex vivo</i>	1
G1	S	S	R	I	G	F	<i>ex vivo</i>	1
F1	S	I	F	P	P	K	<i>ex vivo</i>	1
H2	S	L	W	R	L	S	<i>ex vivo</i>	1
F7	F	R	L	I	R	S	<i>ex vivo</i>	1
C2	P	L	G	V	M	R	<i>ex vivo</i>	1
G10	P	W	A	W	T	S	<i>ex vivo</i>	1
F4	L	D	A	M	V	S	<i>ex vivo</i>	1
G7	L	P	A	K	S	P	<i>ex vivo</i>	1
E7	K	F	A	G	V	N	<i>ex vivo</i>	1
F3	D	G	S	S	K	L	<i>ex vivo</i>	1
E3	T	L	V	S	S	L	<i>ex vivo</i>	1
G5	I	G	L	T	R	Y	<i>ex vivo</i>	1
E4	N	N	G	G	L	T	<i>ex vivo</i>	1
C8	W	Y	T	A	P	T	<i>ex vivo</i>	1
E6	M	V	K	W	G	T	<i>ex vivo</i>	1

TAB. 6.2 – Séquences des hexapetides exposés par les clones sélectionnés à partir de la bibliothèque L6.

6.4.1 Enrichissement en acides aminés

L'enrichissement subi par les acides aminés au cours des sélections a été calculé pour chacun d'eux indépendamment de leur position au sein des peptides portés par les clones sélectionnés (figure 6.15). L'enrichissement se mesure par le rapport entre la fréquence observée de l'acide aminé dans la bibliothèque initiale et sa fréquence observée dans la bibliothèque de sortie finale.

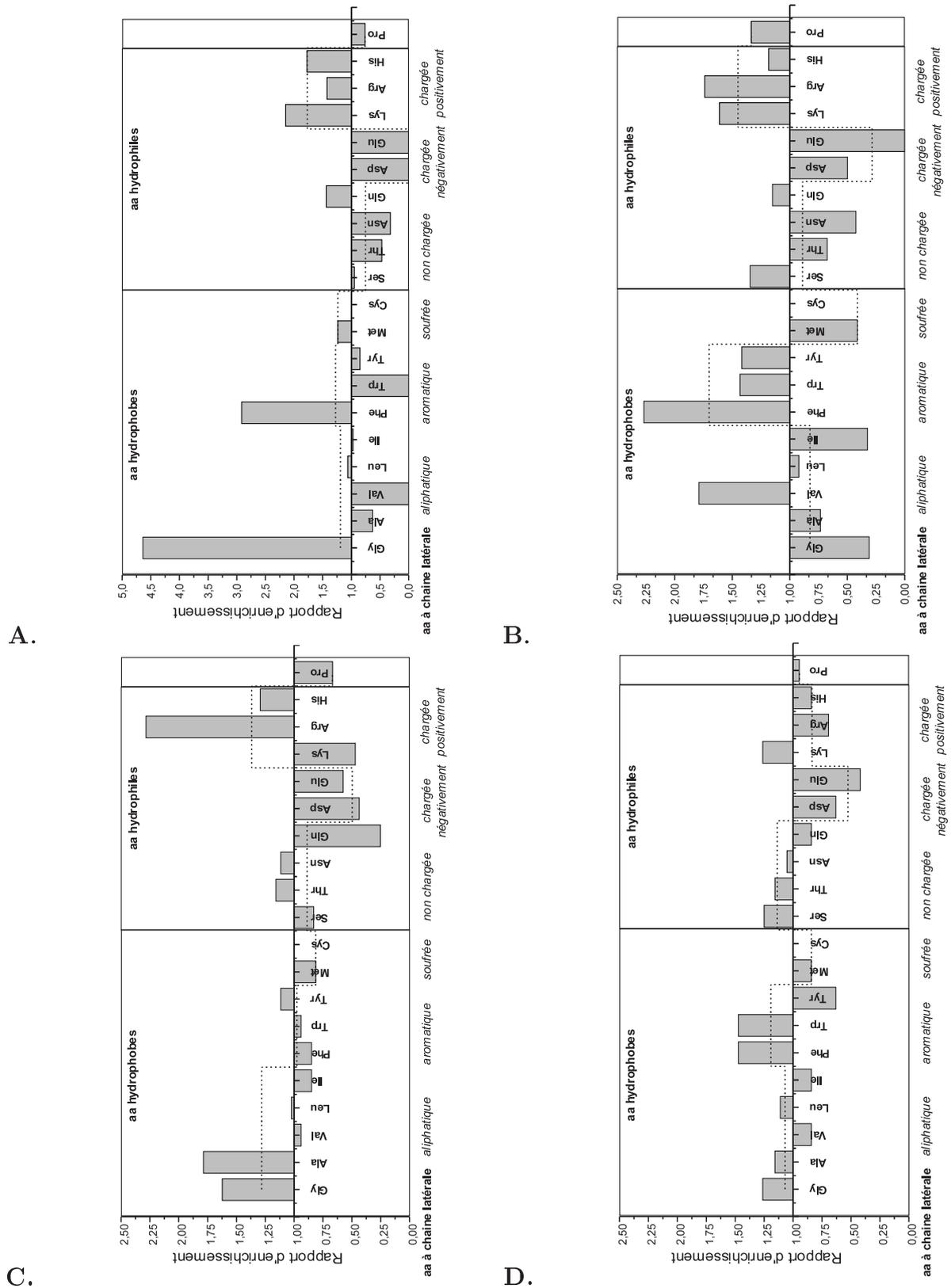


FIG. 6.15 – Rapport d'enrichissement en acides aminés par les sélections *in vitro* (A), sur culture cellulaire (B), *ex vivo* à partir de la bibliothèque C7 (C) et de la bibliothèque L6 (D).

Toutes les sélections ont abouti à un appauvrissement en acides aminés à chaîne latérale chargée négativement. A l'inverse, les trois sélections réalisées à partir de la bibliothèque C7 semblent avoir mené à un enrichissement en acides aminés à chaîne latérale chargée positivement. Il semble que l'enrichissement en acides aminés chargés positivement puisse être attribué à leur attraction par les charges négatives présentées par la cible, la phosphatidylsérine. Par conséquent, une grande partie des peptides présentant ces acides aminés pourraient voir leur affinité pour la phosphatidylsérine expliquée par des liaisons de type électrostatiques. L'hydrophilie et l'hydrophobie des acides aminés, indépendamment de leur position, ne semblent pas être le facteur déterminant de l'interaction. La proline qui est un acide aminé particulier de par sa capacité à former des coudes au sein des protéines ou peptides, est défavorisée dans toutes les sélections, sauf dans le cas de celle pratiquée sur culture cellulaire.

6.4.2 Emergence de séquences consensus

Une séquence consensus est par définition une séquence retrouvée de manière totalement ou partiellement identique chez différents clones. Une séquence consensus dite calculée est une séquence théorique constituée à partir des acides aminés les plus souvent présents à chaque position.

6.4.2.1 Séquences consensus calculées

Des séquences consensus calculées (tableau 6.3) ont été établies sur base des résultats repris dans les figures 6.16, 6.17, 6.18 et 6.19. Les séquences consensus calculées sont reconstituées à partir des acides aminés les plus abondants pour chaque position au sein du peptide. Aucune séquence calculée ne se dégage clairement des séquences peptidiques issues de la sélection *in vitro*. A l'inverse, les deux autres types de sélection semblent être plus à même de fournir un "consensus" au niveau des résidus occupant certaines positions. On peut observer une sur-représentation de la sérine (Ser) en deuxième position et de l'arginine (Arg) en sixième position, commune à la bibliothèque de sortie des sélections sur culture cellulaire et *ex vivo* menées à partir de la bibliothèque C7. Il en va de même pour la thréonine (Thr) et la proline (Pro) respectivement en première et quatrième position de la bibliothèque de sortie des sélections sur culture cellulaire et *in vitro*. La séquence calculée obtenue à partir de la bibliothèque L6 ne peut évidemment pas être comparée aux séquences des peptides issus de la bibliothèque C7. En effet, ces derniers présentent une structure secondaire qui leur est conférée par la contrainte imposée par le pont disulfure formé à partir des deux cystéines bordant l'insert.

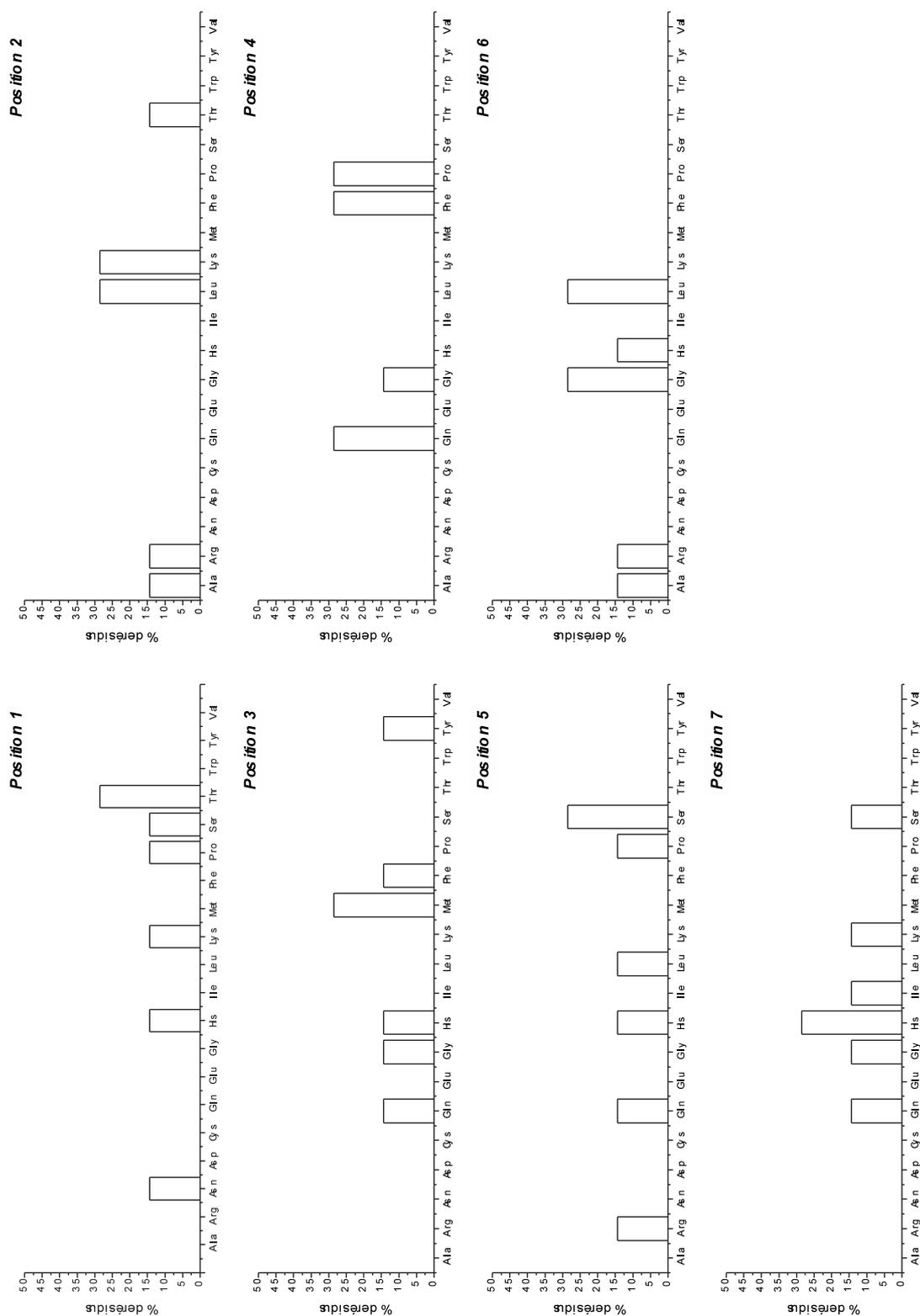


FIG. 6.16 – Pourcentage en résidus pour chaque position dans le peptide parmi l'ensemble des clones issus de la sélection *in vitro* à partir de la bibliothèque C7.

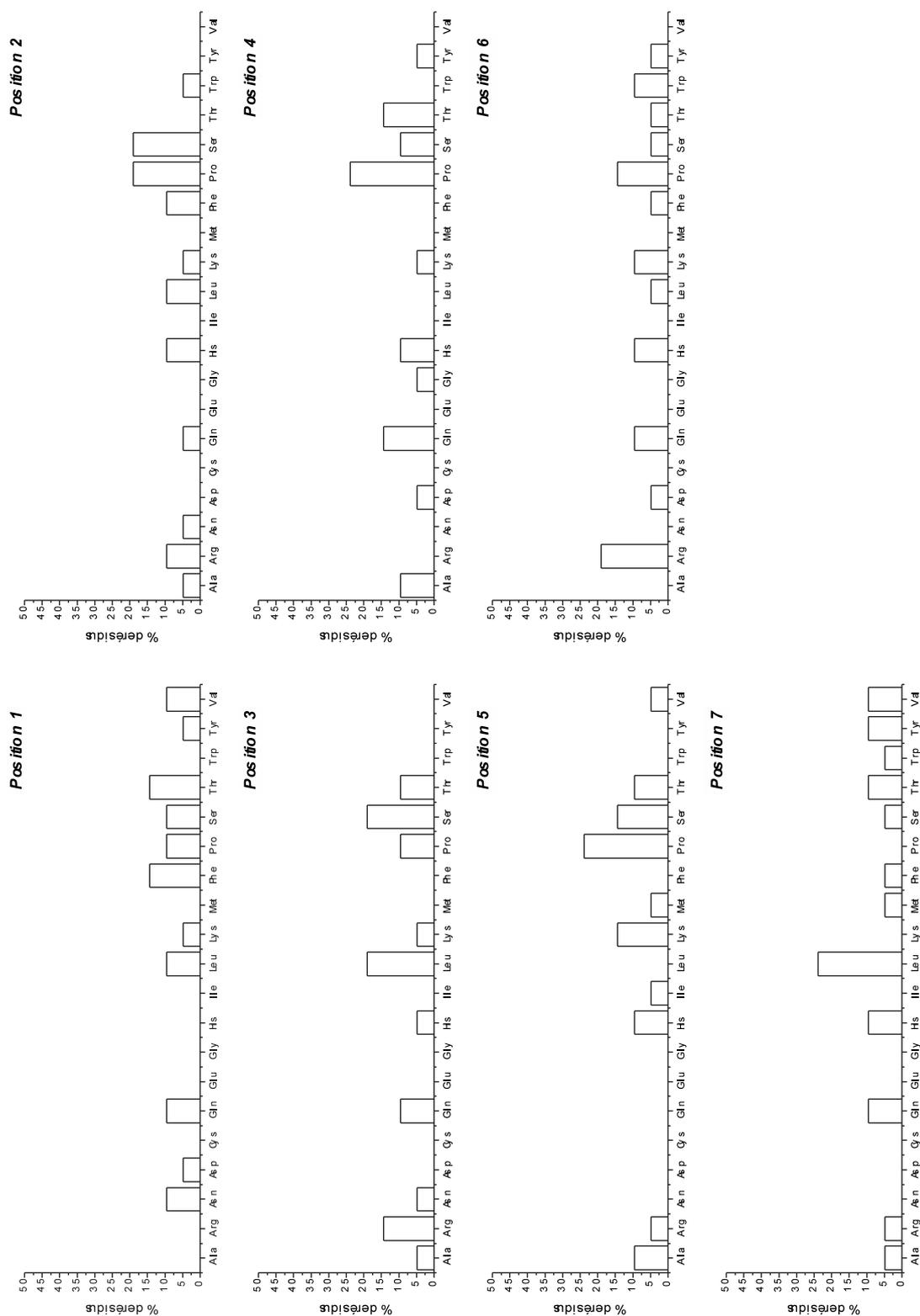


FIG. 6.17 – Pourcentage en résidus pour chaque position dans le peptide parmi l'ensemble des clones issus de la sélection sur culture cellulaire à partir de la bibliothèque C7.

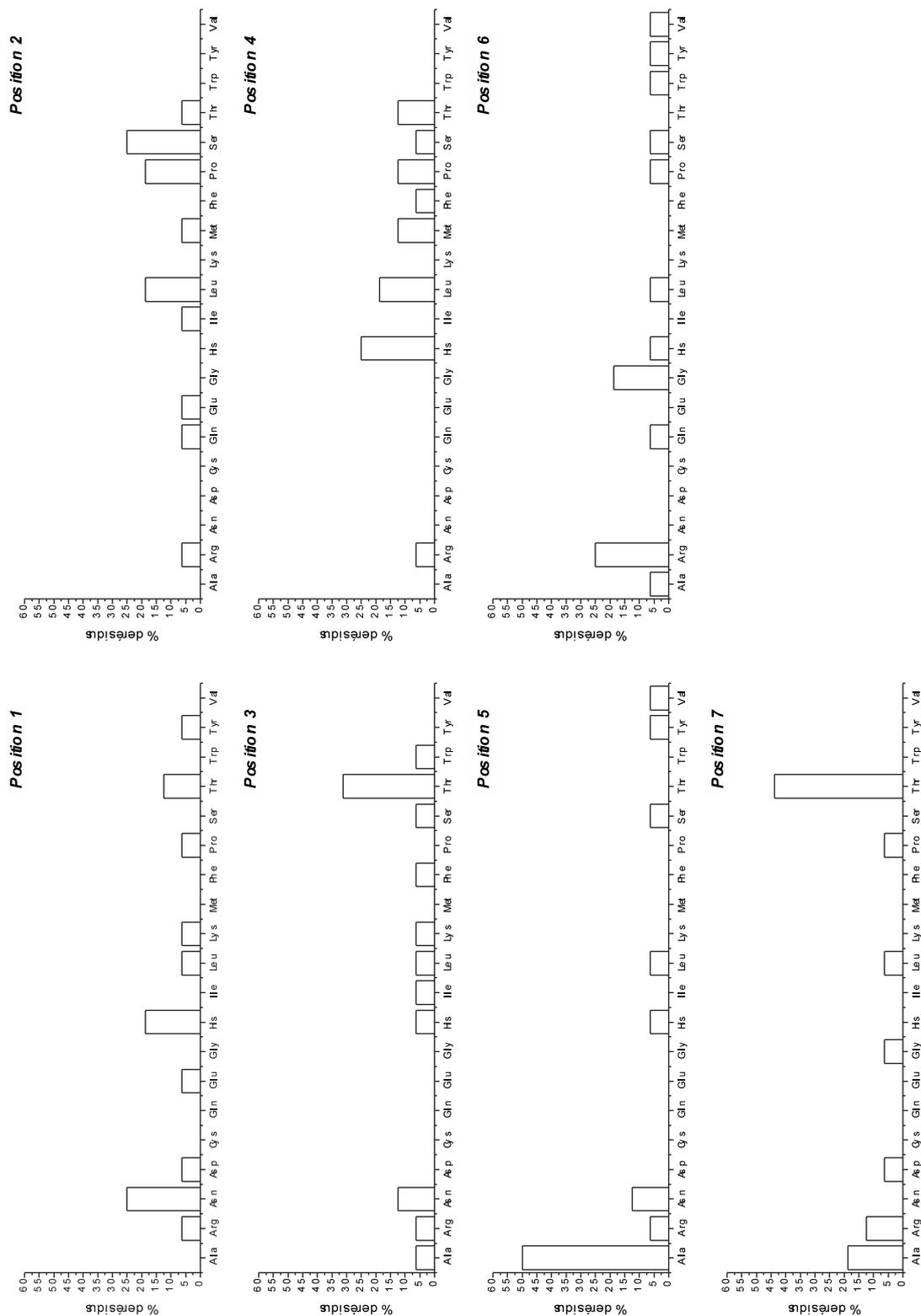


FIG. 6.18 – Pourcentage en résidus pour chaque position dans le peptide parmi l'ensemble des clones issus de la sélection *ex vivo* à partir de la bibliothèque C7.

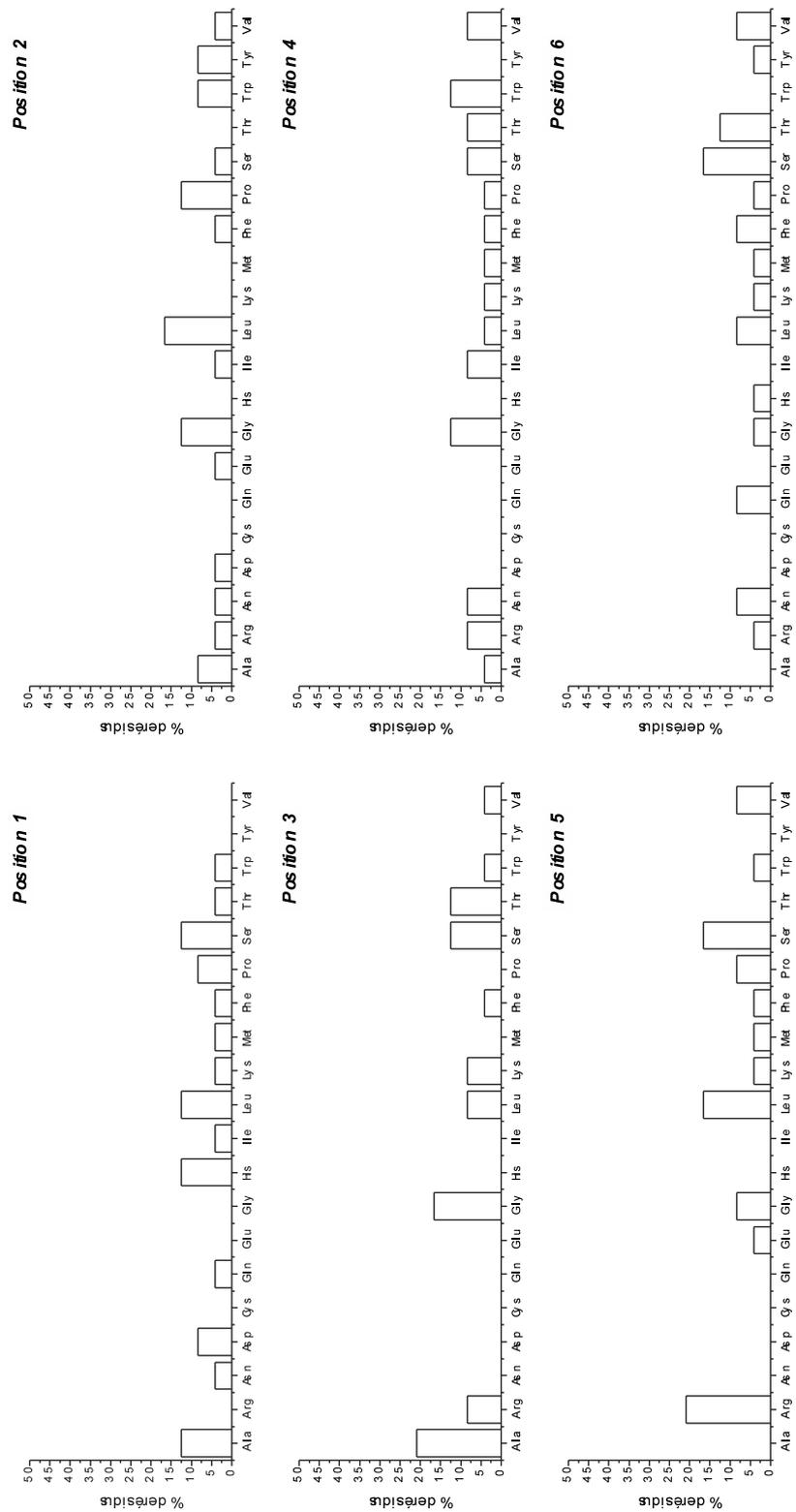


FIG. 6.19 – Pourcentage en résidus pour chaque position dans le peptide parmi l'ensemble des clones issus de la sélection *ex vivo* à partir de la bibliothèque L6.

Position	1	2	3	4	5	6	7
Sélection <i>in vitro</i> (C7)	Thr	Leu Lys	Met	Gln Phe Pro	Ser	Gly Leu	His
Sélection sur culture cellulaire (C7)	Phe Thr	Ser Pro	Leu Ser	Pro	Pro	Arg	Leu
Sélection <i>ex vivo</i> (C7)	Asn	Ser	Thr	His	Ala	Arg	Thr
Sélection <i>ex vivo</i> (L6)	Leu His Ser Ala	Leu	Ala	Gly Trp	Arg	Ser	

TAB. 6.3 – Séquences calculées établies sur base des résultats repris dans les figures 6.16, 6.17, 6.18 et 6.19.

6.4.2.2 Séquences consensus réelles

Certaines séquences ont été identifiées à de multiples reprises au sein d'une même sélection, comme la séquence Asn-Ser-Thr-His-Ala-Gly-Thr (tableaux 6.2 et 6.1). Une autre séquence est présente dans la bibliothèque de sortie de deux types de sélection différentes. Il s'agit de Thr-Leu-Leu-Pro-Ala-Arg-Thr qui a été sélectionnée sur culture cellulaire et *ex vivo*. Les probabilités de retrouver trois fois la séquence Thr-Leu-Leu-Pro-Ala-Arg-Thr et Asn-Ser-Thr-His-Ala-Arg-Thr sur un échantillon de 68 clones provenant d'une bibliothèque non vectorisée sont respectivement de $5,54 \cdot 10^{-18}$ et $4,24 \cdot 10^{-20}$.

Cependant aucune séquence consensus ne peut clairement se dégager de l'ensemble de ces résultats. Seuls quelques motifs de deux ou trois acides aminés parfois discontinus sont présents dans plusieurs peptides. C'est par exemple le cas du motif Phe-Pro-Arg présent dans les peptides HG3 et HG12, du motif Leu-X-Ser-X-X-Gln présents dans les peptides HH3 et HG12 et du motif His-Pro-Thr présent dans les peptides P11 et F6.

6.4.3 Profil d'hydrophobicité et de charges

Les séquences issues des trois types de sélection, ne présentent pas de consensus en ce qui concerne le positionnement des résidus hydrophobes au sein de la séquence peptidique (figure 6.20). Les positions les plus souvent occupées par les résidus hydrophobes semblent être les troisièmes et sixièmes positions pour les clones issus de la sélection *in vitro*, la septième position pour les clones issus de la sélection sur culture cellulaire et la cinquième position pour la sélection *ex vivo*, toutes réalisées à partir de la bibliothèque C7. Dans le cas de la sélection menée à partir de la bibliothèque L6, ce sont les positions 2, 3 et 4 qui sont privilégiées pour les résidus hydrophobes.

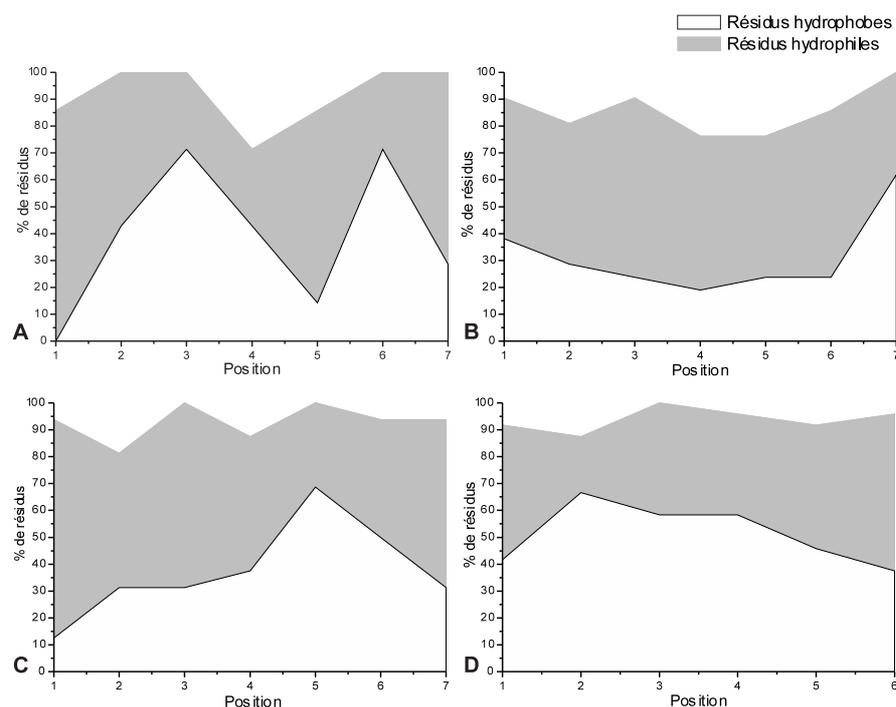


FIG. 6.20 – Profils d’hydrophobicité de l’ensemble des bibliothèques de sortie finales des sélections *in vitro* (A), sur culture cellulaire (B), *ex vivo* à partir de la bibliothèque C7 (C) et de la bibliothèque L6 (D). La proline ne présentant pas un net caractère hydrophobe, elle n’a pas été classée dans le groupe des résidus hydrophobes.

Bien que rien ne se dégage de l’ensemble des séquences sélectionnées, certains peptides présentent une répartition identique en acides aminés à caractère hydrophobes et hydrophiles. C’est par exemple le cas des couples de peptide FG10 et FH2/HH2/HF1, HF6 et P2E8 ou encore FG12 et HF10 qui voient leur acides aminés hydrophobes ou hydrophiles distribués aux mêmes positions (voir 6.4).

Nom du clone	Séquence						
FG10	N	L	I	M	A	R	A
FH2/HH2/HF1	T	L	L	P	A	R	T
HF6	Q	W	T	Q	P	W	Q
P2E8	K	L	H	Q	L	L	Q
FG12	L	P	S	L	A	Q	L
HF10	V	A	T	Y	P	Q	M

TAB. 6.4 – Similitudes de distribution d’acides aminés à caractère hydrophobe ou hydrophile trouvées dans les peptides sélectionnés.

Les différents types de sélection ne présentent pas non plus de consensus en terme de distribution des charges le long des séquences peptidiques. Néanmoins, les profils de charge (figure 6.21) confirment comme attendu (figure 6.15) que les résidus chargés négativement sont sous-représentés dans toutes les sélections et même absents dans le cas de la sélection *in vitro*.

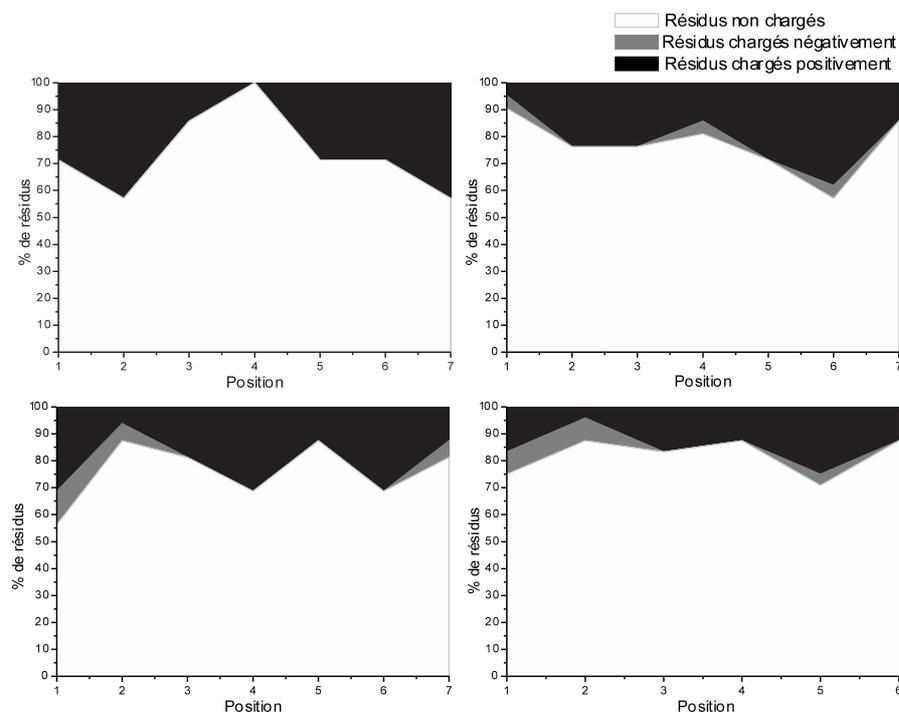


FIG. 6.21 – Profils de charge de l’ensemble des bibliothèques de sortie finales des sélections *in vitro* (A), sur culture cellulaire (B), *ex vivo* à partir de la bibliothèque C7 (C) et de la bibliothèque L6 (D).

6.5 Caractéristiques des clones sélectionnés

L’index aliphatique a été calculé pour chaque peptide sélectionné. Cet index est défini comme le volume relatif des chaînes latérales des acides aminés aliphatiques (alanine, valine, isoleucine et leucine) d’une chaîne peptidique [134] et calculé de la manière suivante :

$$\text{Index aliphatique} = P(\text{Ala}) + a \times P(\text{Val}) + b \times (P(\text{Ile}) + P(\text{Leu})) \quad (6.2)$$

où $P(\text{aa})$ est la fraction molaire en pourcentage de l’acide aminé considéré et où a et b sont des coefficients de poids ($a = 2,9$ et $b = 3,9$).

Les résultats des calculs de l’index aliphatique sont repris dans les tableaux 6.6 et 6.5. On peut y constater qu’aucun index aliphatique ne fait l’unanimité et qu’ils sont répartis

Nom du clone	Point isoélectrique du peptide	Index aliphatique
E10	6,01	65
D3	5,12	48,33
P11	7,84	0
F6	11,04	0
F5	11,04	81,67
C2	11,04	81,67
C5	7,84	130
G6	11,04	98,33
G1	11,04	65
F1	10,09	65
H2	11,04	130
F7	12,4	130
C2	11,04	113,33
G10	6,01	16,67
F4	3,1	130
G7	10,09	81,67
E7	10,09	65
F3	6,77	65
E3	6,01	243,33
G5	9,84	130
E4	6,01	65
C8	6,01	16,67
E6	10,09	48,33

TAB. 6.5 – Valeurs calculées du point isoélectrique et de l’index aliphatique des peptides sélectionnés à partir de la bibliothèque L6.

sur une large gamme s’étendant de 0 jusqu’à plus de 140 pour les peptides sélectionnés à partir de la bibliothèque C7 et de 0 à plus de 240 pour ceux issus de la bibliothèque L6.

Le point isoléctrique (PI) théorique a été calculé grâce au programme *Compute pI/Mw tool* [135] pour chaque peptide sélectionné (tableaux 6.6 et 6.5). La valeur du pH correspondant au point isoélectrique est calculée à l’aide de la théorie des équilibres multiples (Wyman ou encore Bellon). Dans le cas des peptides cycliques, deux valeurs ont été calculées, l’une tenant compte des cystéines qui bordent le peptide et l’autre n’en tenant pas compte. Parmi les peptides sélectionnés à partir de la bibliothèque C7, on trouve une majorité de peptides (28/39) à caractère nettement basique ($PI > 9$), c’est-à-dire chargés positivement au pH physiologique, alors que seulement (1/39) présente un caractère nettement acide ($PI < 5$), c’est-à-dire chargé négativement. Il en est de même pour les peptides issus de la bibliothèque L6, parmi lesquels on trouve une moitié de peptides nettement basiques et seulement un peptide sur 23 à caractère nettement acide.

Nom du clone	Point isoélectrique du peptide	Point isoélectrique du peptide bordé de 2 cystéines	Index aliphatique
FB10	11,04	8,33	0
FF12	7,84	7,01	43,33
FE10/FE12/FH12	7,84	7,01	11,11
HF5	11,04	8,33	43,33
FG10	11,04	8,33	108,89
FH2/HH2/HF1	11,04	8,33	97,78
P2E10	11,04	8,33	0
P2A12	11,09	8,33	86,67
HG6	10,09	8,33	130
P2C1	11,04	8,33	0
P2C12	10,09	8,33	43,33
HF9	11,45	9,16	0
HG9	3,1	3,1	32,22
P2E1	9,84	8,33	11,11
HH8	10,09	8,33	43,33
HF11	11,04	8,33	86,67
HH10	10,09	8,33	32,22
HG3	9,84	8,33	0
HG12	11,04	8,33	11,11
P2E12	11,04	8,33	11,11
HG8	9,84	8,33	43,33
HH3	11,04	8,33	43,33
FG12	6,01	5,18	141,11
FG9	9,84	8,33	54,44
FF9	10,89	8,33	0
FE11	11,04	8,33	43,33
HH1	6,77	5,94	11,11
FA12	6,77	5,94	43,33
HG10	10,5	9,16	0
HF6	6,01	5,18	0
HG11	7,84	7,01	86,67
P2E8	10,09	8,33	130
FH4	10,09	8,33	54,44
HG1	9,84	8,33	0
HF7	9,84	8,33	0
HF10	6,01	5,18	43,33
HH9	10,09	8,33	43,33
FB1	6,77	5,94	65,56
FA1	6,97	6,14	86,67

TAB. 6.6 – Valeurs calculées du point isoélectrique et de l'index aliphatique des peptides sélectionnés à partir de la bibliothèque C7.

6.6 Affinité apparente des clones efficaces

Les clones qui présentaient les coefficients d'efficacité les plus élevés ont fait l'objet d'une étude plus approfondie. Dans un premier temps, l'affinité apparente pour la PS et la PC de 12 clones issus de la bibliothèque C7 et de 4 clones issus de bibliothèque L6 a été déterminée par ELISA. Des courbes de fixation sur les deux phospholipides ont donc été réalisées pour chaque clone, y compris pour le phage de type sauvage.

Les courbes de fixation sur la PS et la PC des clones issus de la bibliothèque C7 sont reprises dans les figures 6.23, 6.24 et 6.25. Celles des clones issus de la bibliothèque L6 et les mêmes mesures réalisées pour le phage de type sauvage sont respectivement reprises dans les figures 6.26 et 6.22. On peut voir sur les graphiques de la figure 6.22 que le phage de type sauvage se comporte de manière indifférenciée vis-à-vis de la PS et la PC et n'a aucune affinité pour la PS ou pour la PC. A l'inverse, tous les clones sélectionnés ont une affinité toujours plus élevée pour la PS que pour la PC.

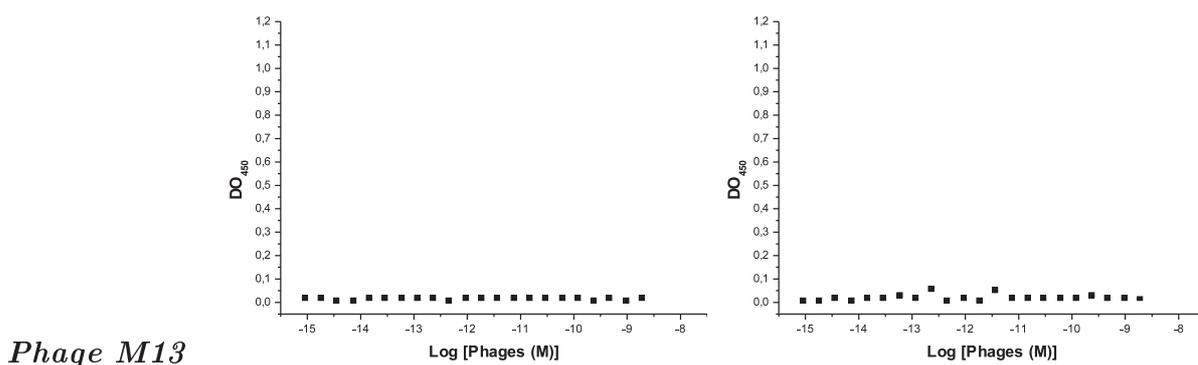


FIG. 6.22 – Courbes de fixation du phage M13 de type sauvage sur la PS à gauche et sur la PC à droite.

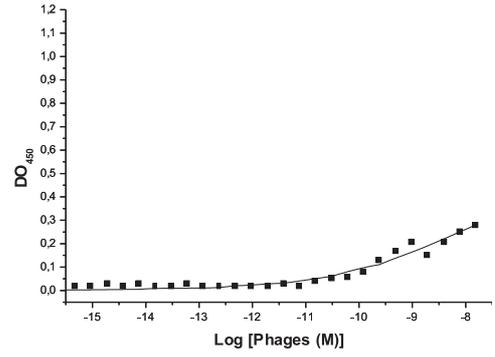
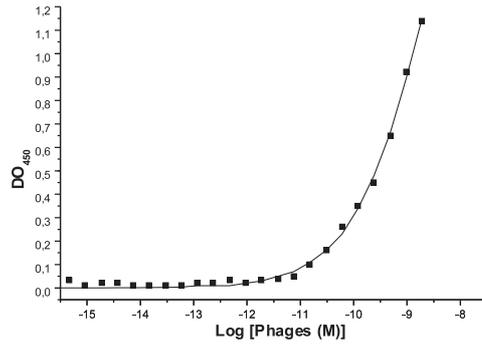
Pour effectuer une nouvelle sélection parmi ces clones, le rapport $Kd_{app. PS} / Kd_{app. PC}$ a été calculé (tableau 6.7). Plus celui-ci est faible et plus le clone a une bonne affinité pour la PS et une faible affinité pour la PC, ce qui assure une meilleure sélectivité. C'est par exemple le cas des clones HG6, FE10/FE12/FH12 et HF10 qui ont été choisis pour la suite des expérimentations parmi les clones issus de la bibliothèque C7.

Les Kd_{app} pour la PS les plus élevés ont été atteints par les clones issus de la bibliothèque L6, alors que les plus faibles ont été obtenus avec la bibliothèque C7. Il est également possible d'observer dans le tableau 6.7 que le moins bon résultat en terme de différence d'affinité pour PS et PC a été obtenu avec la sélection *in vitro*.

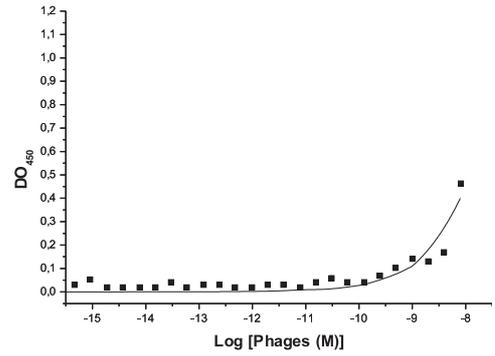
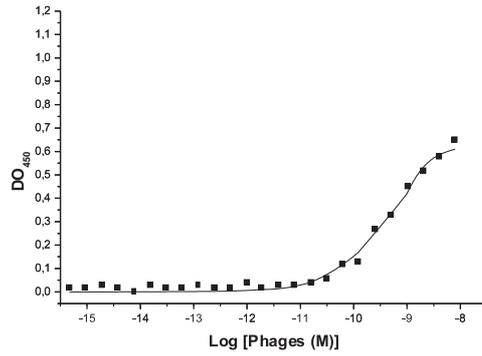
Nom du clone	Bibliothèque	Type de sélection	Kd app. _{PS} (M)	Kd app. _{PS} /Kd app. _{PC}
P2E10	C7	<i>in vitro</i>	$(3,42 \pm 0,18).10^{-09}$	$2,37.10^{-01}$
HF5	C7	cult. cel.	$(1,05 \pm 0,18).10^{-10}$	$6,37.10^{-02}$
HF6	C7	cult. cel.	$(9,27 \pm 0,99).10^{-11}$	$1,61.10^{-05}$
HF10	C7	cult. cel.	$(1,25 \pm 0,19).10^{-10}$	$1,69.10^{-07}$
HG1	C7	cult. cel.	$(8,02 \pm 2,84).10^{-10}$	$3,31.10^{-07}$
HG3	C7	cult. cel.	$(2,18 \pm 0,36).10^{-10}$	$7,94.10^{-07}$
HG6	C7	cult. cel.	$(5,37 \pm 1,11).10^{-12}$	$1,80.10^{-07}$
HG9	C7	cult. cel.	$(1,38 \pm 0,16).10^{-10}$	$2,43.10^{-07}$
HH3	C7	cult. cel.	$(2,87 \pm 1,44).10^{-10}$	$2,03.10^{-06}$
FE10/FE12/FH12	C7	<i>ex vivo</i>	$(2,89 \pm 0,45).10^{-10}$	$4,11.10^{-08}$
FG10	C7	<i>ex vivo</i>	$(9,70 \pm 2,53).10^{-10}$	$1,71.10^{-04}$
FH2/HH2/HF1	C7	<i>ex vivo</i> et cult. cel.	$(9,37 \pm 1,42).10^{-11}$	$1,27.10^{-05}$
E3	L6	<i>ex vivo</i>	$(6,11 \pm 0,84).10^{-12}$	$4,89.10^{-08}$
F3	L6	<i>ex vivo</i>	$(1,47 \pm 0,30).10^{-11}$	$5,46.10^{-09}$
G5	L6	<i>ex vivo</i>	$(9,12 \pm 1,66).10^{-12}$	$1,15.10^{-08}$
G7	L6	<i>ex vivo</i>	$(1,66 \pm 0,35).10^{-11}$	-

TAB. 6.7 – Constantes de dissociation apparente (Kd app.) des clones sélectionnés mesurée par ELISA sur la PS et la PC.

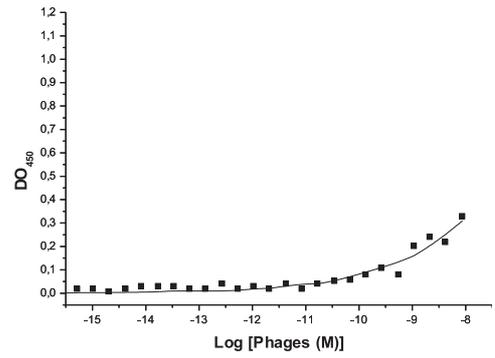
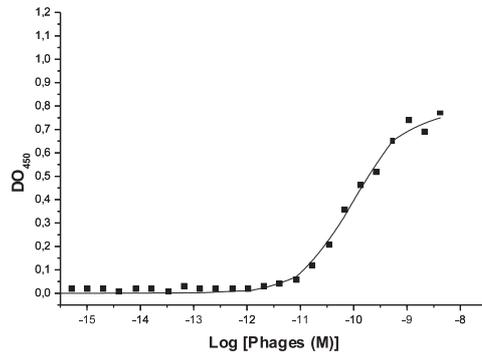
Clone P2E10



Clone HF5



Clone HF6



Clone HF10

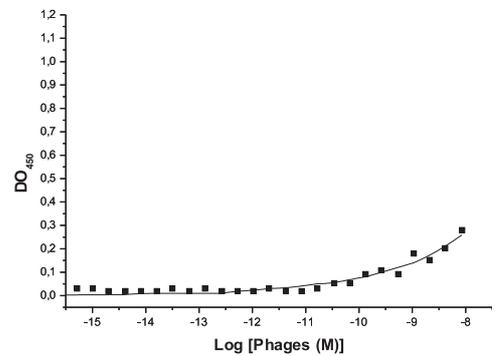
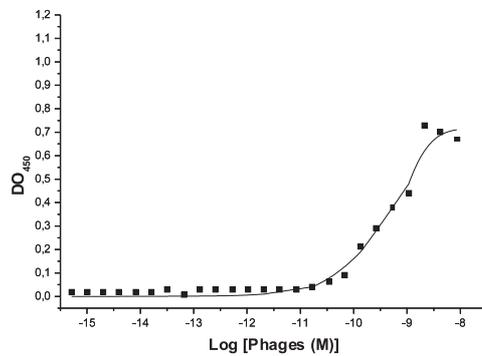
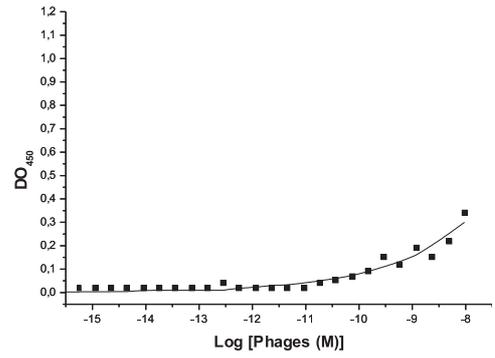
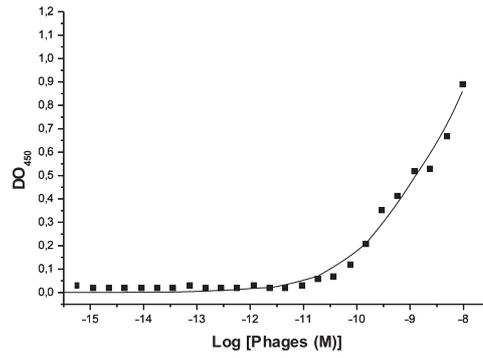
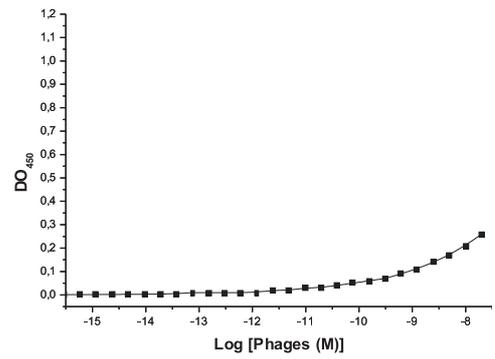
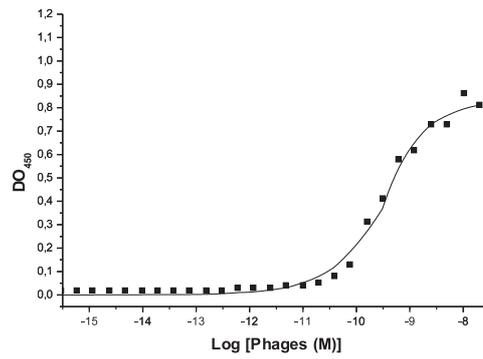


FIG. 6.23 – Courbes de fixation des clones issus de la bibliothèque C7 sur la PS à gauche et sur la PC à droite.

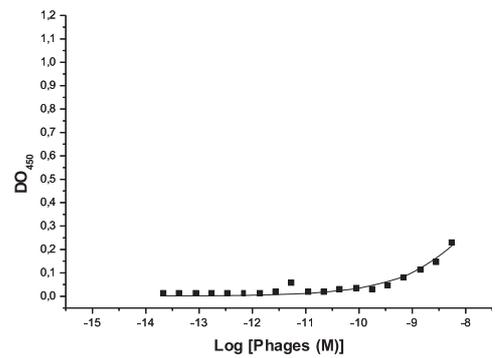
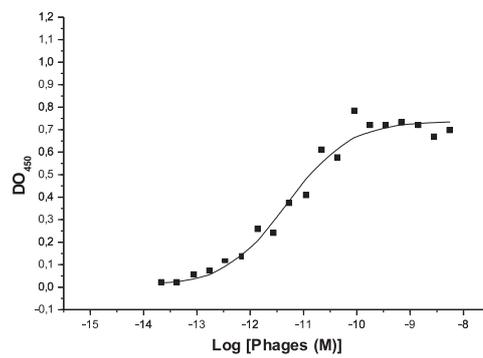
Clone HG1



Clone HG3



Clone HG6



Clone HG9

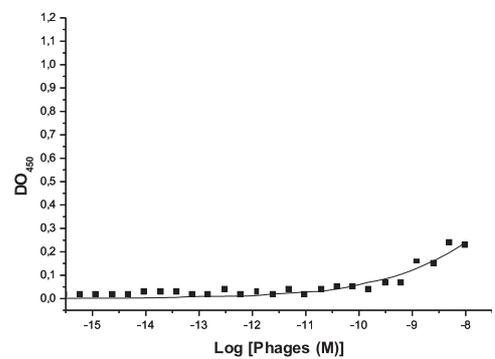
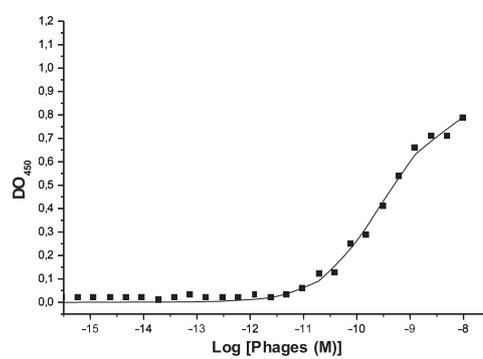
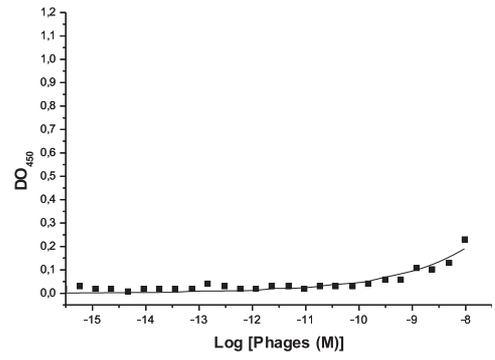
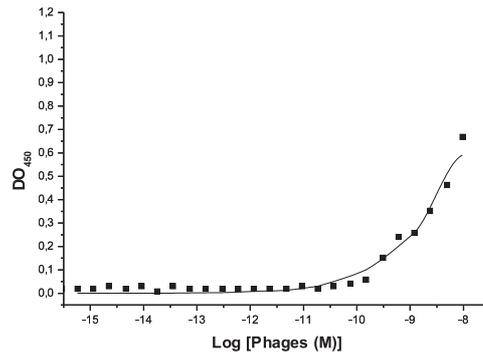
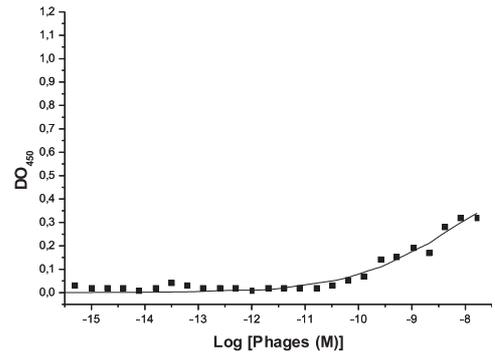
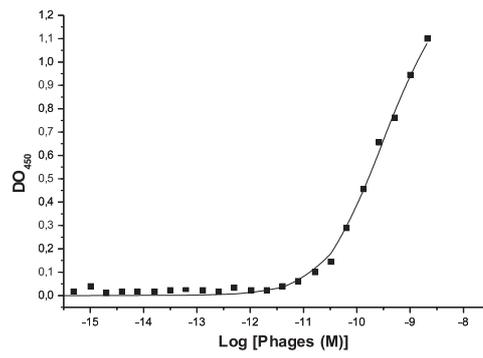


FIG. 6.24 – Courbes de fixation des clones issus de la bibliothèque C7 sur la PS à gauche et sur la PC à droite (suite).

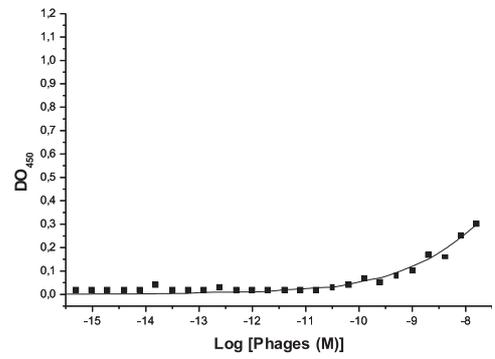
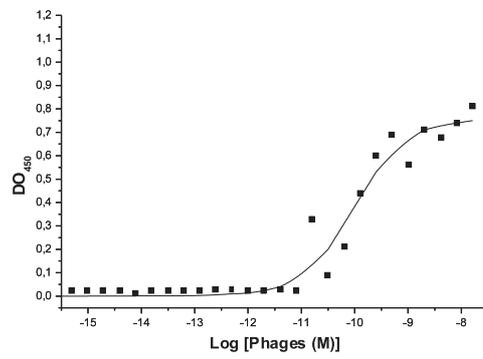
Clone HH3



Clone FE10/FE12/FH12



Clone FG10



Clone FH2/HH2/HF1

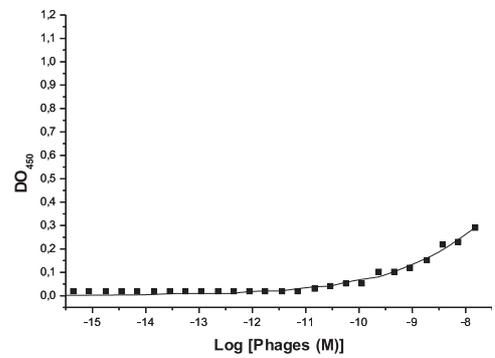
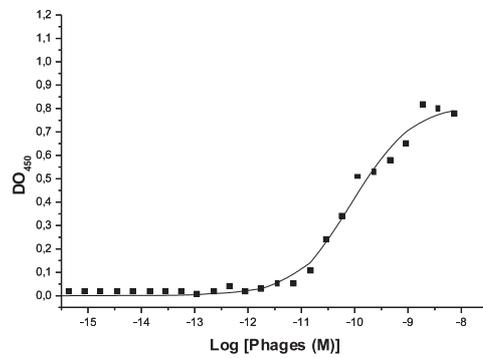
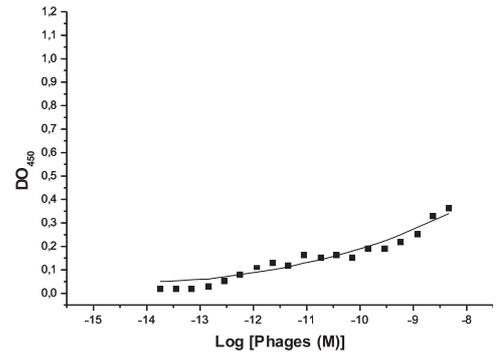
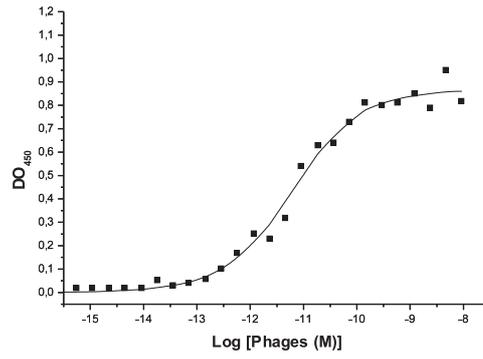
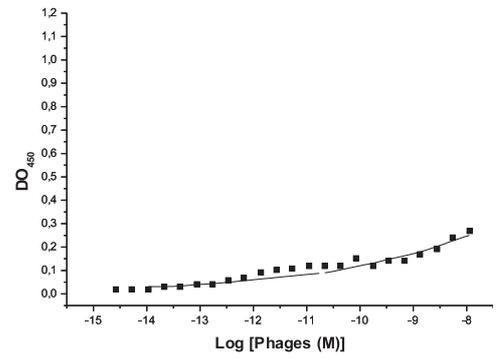
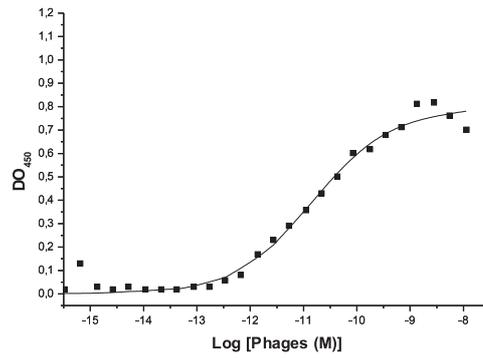


FIG. 6.25 – Courbes de fixation des clones issus de la bibliothèque C7 sur la PS à gauche et sur la PC à droite (suite).

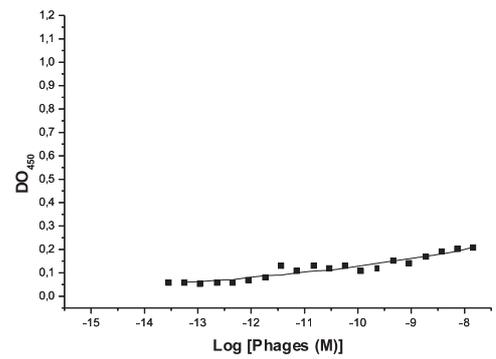
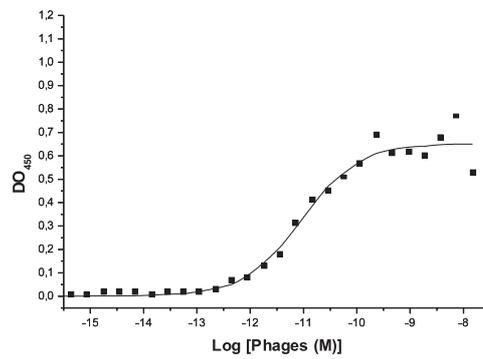
Clone E3



Clone F3



Clone G5



Clone G7

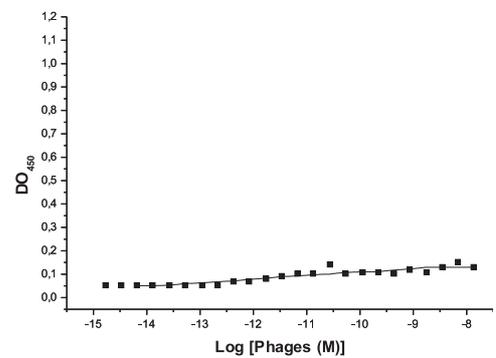
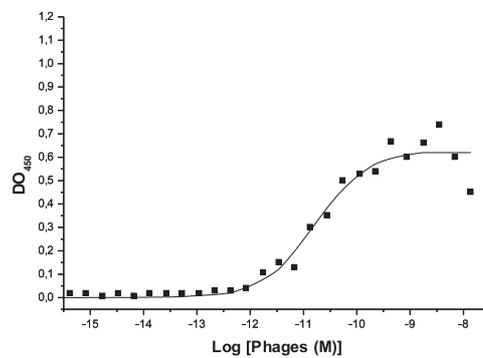


FIG. 6.26 – Courbes de fixation des clones issus de la bibliothèque L6 sur la PS à gauche et sur la PC à droite.

6.7 Validation du concept de coefficient d'efficacité

Le coefficient d'efficacité a été introduit intuitivement pour choisir les "meilleurs" clones. Il peut être validé *a posteriori* en comparant le coefficient d'efficacité à la constante d'affinité pour la PS des clones sélectionnés. La figure 6.27 montre qu'il existe une corrélation entre le coefficient d'efficacité et la constante d'affinité. A l'exception de deux d'entre eux, les points s'inscrivent le long d'une droite. Plus la constante d'affinité est élevée et plus le coefficient d'efficacité est élevé. Choisir les clones sur base de leur coefficient d'efficacité s'avère donc être un bon critère de sélection.

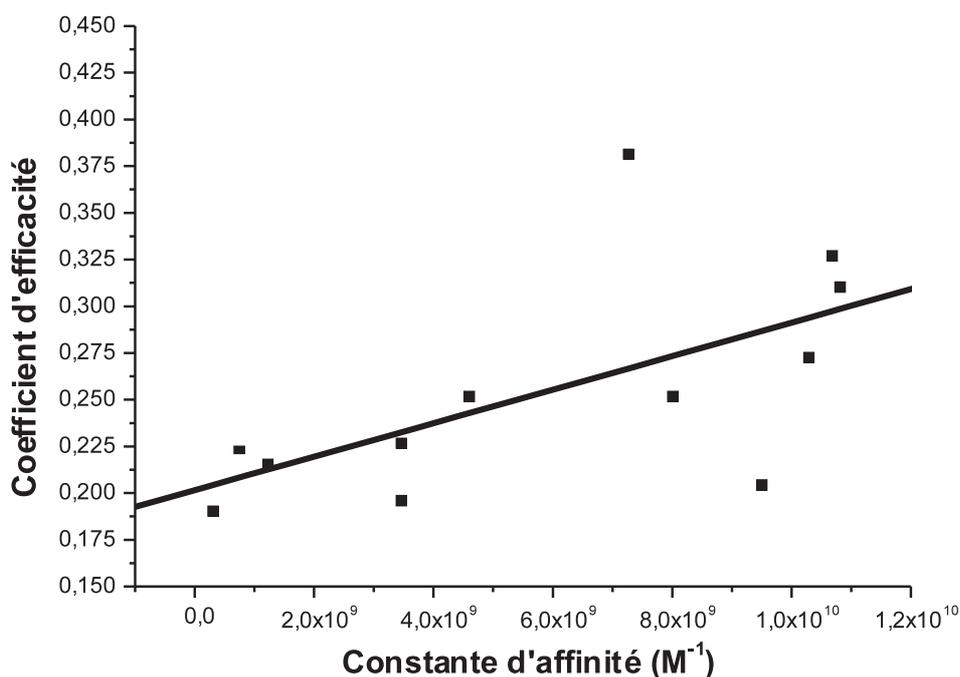


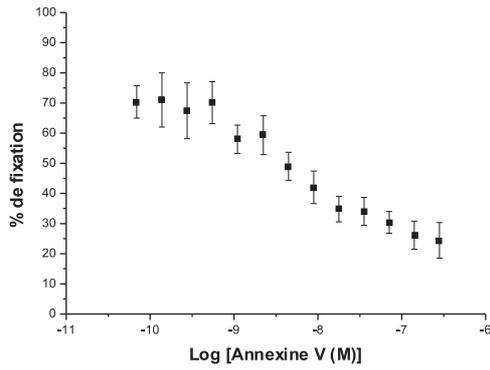
FIG. 6.27 – Coefficient d'efficacité en fonction de la constante d'affinité pour la PS

6.8 Expériences de compétition avec l'annexine V

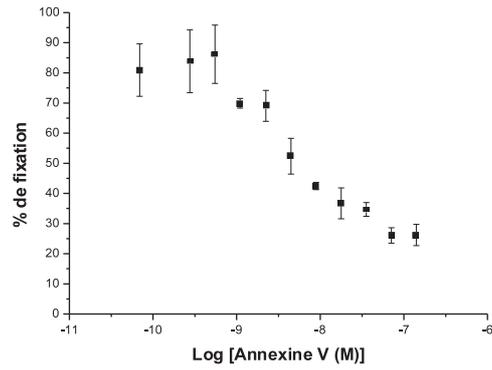
Sept clones ont été sélectionnés sur base de leur constante d'affinité apparente pour la PS et la PC. Ils ont ensuite été mis en situation de compétition avec l'annexine V qui est un ligand naturel de la PS (voir 2.1).

La fixation de tous les clones testés sur la PS diminue au fur et à mesure que la concentration en annexine V s'élève (figure 6.28). Ces résultats montrent qu'il existe bien une compétition entre les clones et l'annexine V et donc, que les clones et l'annexine V se fixent à la même cible, la phosphatidylsérine.

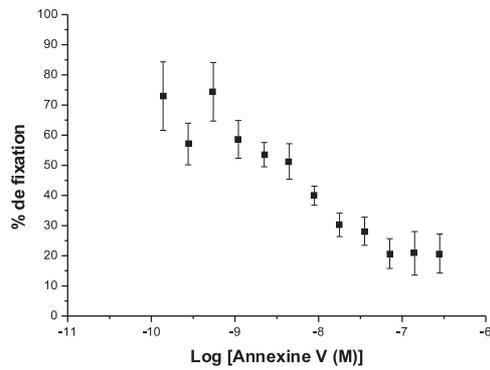
Clone E3 [phages]= $6,11 \cdot 10^{-12} M$



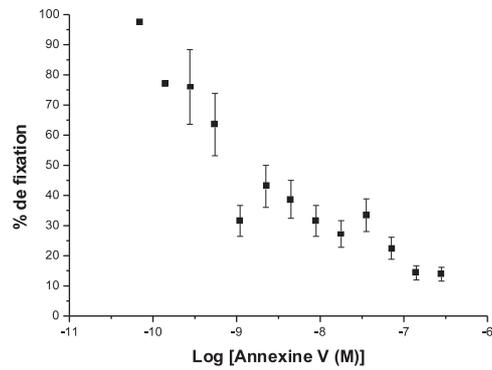
Clone F3 [phages]= $1,47 \cdot 10^{-11} M$



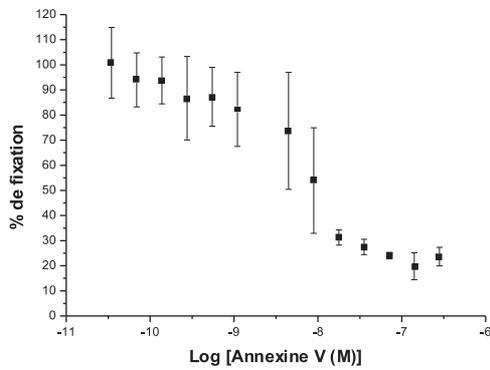
Clone G5 [phages]= $9,12 \cdot 10^{-12} M$



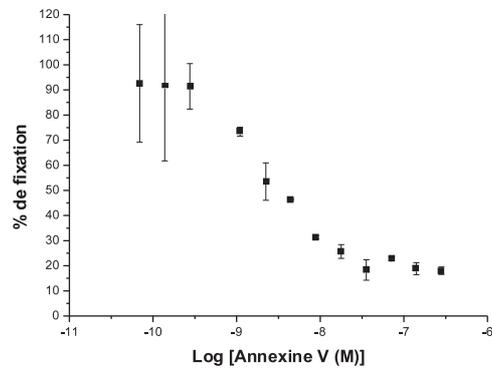
Clone G7 [phages]= $1,66 \cdot 10^{-11} M$



Clone HG6 [phages]= $5,37 \cdot 10^{-12} M$



Clone HF10 [phages]= $1,25 \cdot 10^{-10} M$



Clone FE10/FE12/FH12 [phages]= $2,89 \cdot 10^{-10} M$

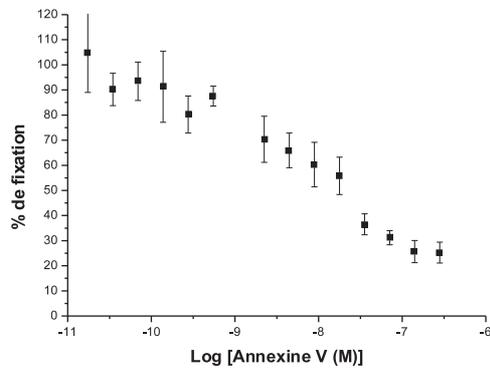


FIG. 6.28 – Courbes de compétition entre différents clones et l'annexine V. ($n=4$)

Etant donné que la concentration en phages utilisée dans ces expériences est égale à la concentration en ceux-ci au point d'inflexion de leur courbe de fixation à la PS (tableau 6.7), les IC_{50} obtenus par la courbe de compétition ne peuvent pas être directement comparés. Dans le tableau 6.8, le rapport entre l' IC_{50} de l'expérience de compétition et le Kd_{PS} obtenu par la courbe de fixation a été calculé pour chaque clone testé.

Nom du clone	IC_{50} (M)	Rapport IC_{50}/Kd_{PS}
HG6	$(1,02 \pm 0,35).10^{-8}$	1899
G5	$(8,31 \pm 3,01).10^{-9}$	912
F3	$(1,00 \pm 0,43).10^{-8}$	680
E3	$(3,16 \pm 1,65).10^{-8}$	513
G7	$(1,70 \pm 0,91).10^{-9}$	102
FE10/FE12/FH12	$(1,52 \pm 0,52).10^{-8}$	55,2
HF10	$(1,82 \pm 1,63).10^{-9}$	18,7

TAB. 6.8 – IC_{50} obtenus à partir des courbes de compétition clones - annexine V et rapport Kd_{PS} / IC_{50} .

La valeur obtenue traduit le facteur par lequel il faut diviser la concentration en annexine V utilisée pour obtenir la concentration en phages qui déplace 50 % des molécules d'annexine V. Les facteurs ainsi calculés s'étendent sur une vaste gamme allant de 18,7 à 1899. Ce qui signifie que dans le meilleur des cas, 1899 fois moins de phages que d'annexine V sont nécessaires pour déplacer 50% de celle-ci. Ces valeurs sont d'autant plus impressionnantes que l'annexine V a un Kd de 6×10^{-9} M et que sa surface de recouvrement est similaire à celle du phage si celui-ci se fixe perpendiculairement à la surface de la PS (surface de recouvrement de l'annexine V = $27,4 \text{ nm}^2$ et surface de recouvrement du phage M13 = $28,27 \text{ nm}^2$). Il n'est toutefois pas exclu que les phages s'inclinent lors de leur fixation sur le phospholipide (figure 6.29). Ceux-ci ne se fixeraient que par l'intermédiaire d'un seul peptide et occuperaient alors une surface plus importante, gênant donc la fixation d'un plus grand nombre de molécules d'annexine V. On peut également expliquer ce résultat étonnant par le fait que chaque phage expose 5 copies du peptide et que de ce fait la concentration locale en peptide serait plus élevée. On peut alors imaginer l'interaction phage - PS comme une interaction dynamique. Un premier peptide se fixerait à la PS et s'en éloignerait assez rapidement laissant place à un second peptide et ainsi de suite. La conséquence globale d'un tel mécanisme serait le maintien du phage à proximité de la PS.

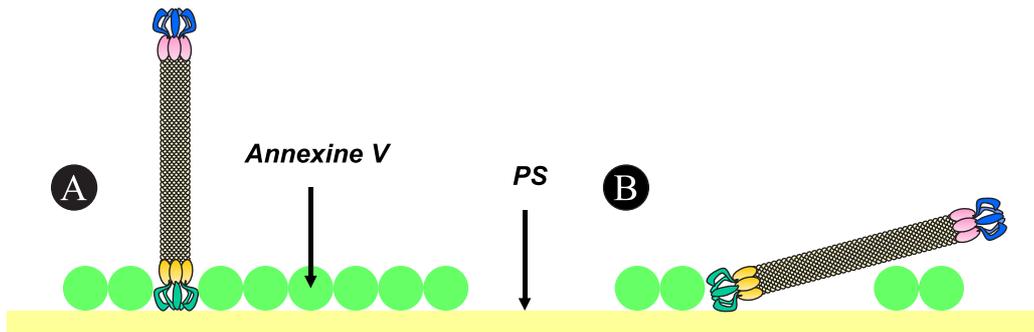


FIG. 6.29 – Hypothèses du mode de fixation du phage sur la phosphatidylsérine (A. fixation perpendiculaire et B. fixation oblique).

6.9 Recherche d'épitopes séquentiels

Lorsque la cible est reconnue par un épitope séquentiel (figure 6.30), il est possible que le peptide sélectionné corresponde à l'épitope, donc à un morceau de la séquence primaire de la protéine. Si la cible est reconnue par un épitope conformationnel, il est encore possible que le peptide sélectionné corresponde à l'épitope conformationnel, bien qu'aucun morceau de la séquence primaire de la protéine n'y soit identique. Le peptide peut aussi ne pas correspondre à un épitope qu'il soit séquentiel ou conformationnel, mais simplement en mimer la structure, on parle alors de mimotope (figure 6.30 et tableau 6.9).

Bien qu'il soit plus probable que les séquences obtenues correspondent à des épitopes conformationnels ou à des mimotopes et non à des épitopes séquentiels de protéines ciblant la phosphatidylsérine, l'existence de ces peptides au sein des séquences de protéine connues pour interagir avec la phosphatidylsérine telles que l'annexine V, la phospholipase A₁ [136], des scramblases [137], le transporteur d'aminophospholipides [137], les facteurs de coagulation V [138], VIII [139] et X [140] et la synaptotagmine a été recherchée. Aucune des séquences peptidiques identifiées n'est reprise dans son entièreté dans les séquences de ces protéines. Seules des séquences de 4 résidus y sont reprises et rien n'indique que ce soit au niveau des sites de reconnaissance de la phosphatidylsérine.

Une recherche a également été effectuée grâce au programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mis à disposition par la NCBI. Alors qu'aucun des heptapeptides cycliques n'est repris dans son entièreté dans une séquence de protéine, certains hexapeptides linéaires apparaissent dans la structure primaire de protéine. Ainsi l'entièreté de la séquence du peptide E3 se retrouve dans la séquence de la ninéine [141] dont on ignore si elle interagit avec la phosphatidylsérine. Cependant, la ninéine est une protéine qui joue un rôle important dans le positionnement et l'ancrage des microtubules et pourrait, de ce fait interagir avec la phosphatidylsérine. Le peptide F3 a été identifié dans la séquence du

facteur de von Willebrand d'un grand nombre d'espèce. Ce facteur joue un rôle clé dans la coagulation sanguine, mécanisme dans lequel la phosphatidylsérine est omniprésente.

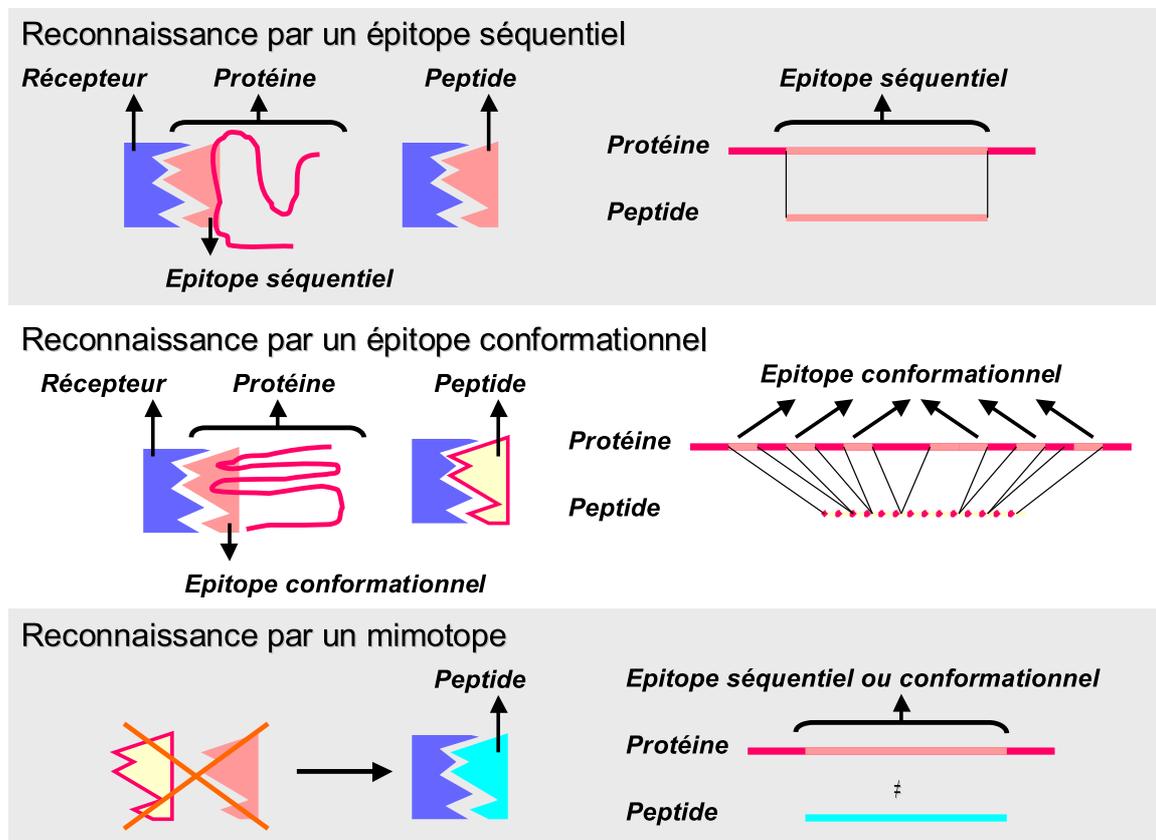


FIG. 6.30 – Reconnaissance d'un récepteur par un épitope conformationnel, par un épitope séquentiel ou un mimotope.

Un épitope séquentiel ou continu est une structure formée par des acides aminés consécutifs au sein de la séquence primaire de la protéine à laquelle ils appartiennent.
Un épitope conformationnel ou discontinu est une structure formée par des acides aminés non consécutifs au sein de la séquence primaire de la protéine à laquelle ils appartiennent, et juxtaposés lors des repliements de cette protéine.
Un mimotope est un mime moléculaire d'un épitope, c'est-à-dire une molécule qui est capable d'interagir avec une structure donnée sans avoir nécessairement une parenté avec l'épitope.

TAB. 6.9 – Définitions des notions d'épitopes conformationnel et séquentiel et de mimotope.

Chapitre 7

Discussion

7.1 Mise en oeuvre du phage display

Dans ce travail, trois types de sélection de phage display (*in vitro*, sur culture cellulaire et *ex vivo*) ont été appliqués en parallèle dans le but de sélectionner un peptide spécifique de la phosphatidylsérine. Ces trois modalités de sélection ont été menées sur une bibliothèque de phages exposant des peptides heptamériques cycliques (C7). La sélection *ex vivo* a également été réalisée à partir d'une bibliothèque exposant des peptides hexamériques linéaires (L6).

Que ce soit en terme d'affinité pour la phosphatidylsérine ou la phosphatidylcholine, ou encore en terme de quantité de phages récupérés dans l'output, le suivi de l'évolution des différentes expériences de phage display a montré qu'à l'exception de la sélection *in vitro*, les sélections se sont toutes révélées être efficaces. Toutes ont mené à l'obtention de bibliothèques vectorisées comprenant des phages de plus ou moins forte affinité pour la phosphatidylsérine et de plus ou moins faible affinité pour la phosphatidylcholine, et donc caractérisés par des coefficients d'efficacité plus ou moins élevés.

La comparaison des coefficients d'efficacité moyens des différents outputs montre que la sélection sur culture cellulaire s'avère la plus performante, suivie de près par les sélections *ex vivo*. Toutefois, l'observation de l'évolution du coefficient d'efficacité moyen en fonction des cycles de sélection montre que même si la sélection *in vitro* n'a pas fourni une bibliothèque riche en phages de coefficient d'efficacité élevé après quatre cycles de sélection, elle exerçait néanmoins une pression sélective sur la bibliothèque. Dans ce cas précis, quatre cycles ne sont pas suffisants, il est donc probable que ce type de sélection demande un plus grand nombre de cycles. La sélection sur culture cellulaire occupe une situation tout à fait opposée, car celle-ci produit dès le troisième cycle une bibliothèque avec un taux plus que satisfaisant de phages d'efficacité élevée.

Aucune séquence consensus, qu'elle soit calculée ou réelle, ne se dégage clairement des séquences obtenues par sélection *in vitro*. Par contre plusieurs séquences ont été identifiées à plusieurs reprises au sein des bibliothèques vectorisées issues de la sélection sur culture cellulaire et *ex vivo* (Asn-Ser-Thr-His-Ala-Gly-Thr). Une même séquence a même été observée à la fois dans la bibliothèque vectorisée par ces deux sélections (Thr-Leu-Leu-Pro-Ala-Arg-Thr). De plus, la séquence consensus calculée (Asn-Ser-Thr-His-Ala-Arg-Thr), établie sur base des enrichissements en résidus pour la sélection *ex vivo* correspond, à un résidu près, à une des séquences observées à de multiples reprises dans la bibliothèque vectorisée par la sélection *ex vivo*.

Bien qu'il n'existe pas de consensus au niveau du positionnement des résidus hydrophobes, hydrophiles ou chargés, tous les peptides sélectionnés présentent à la fois des résidus hydrophobes et hydrophiles dans leur séquence. Parmi les résidus chargés, ceux chargés négativement sont largement sous représentés dans l'ensemble des séquences obtenues.

Les 16 clones les plus efficaces montrent des courbes de fixation différentes sur la phosphatidylsérine et la phosphatidylcholine, alors que le phage de type sauvage se comporte de manière indifférenciée dans les deux cas. Il semble que la bibliothèque L6 ait fourni des clones de très forte affinité pour la phosphatidylsérine et que la bibliothèque C7 ait elle, permis l'obtention de clones de très faible affinité pour la phosphatidylcholine, à l'exception de ceux issus de la sélection *in vitro*.

Outre le choix de la bibliothèque, du système d'immobilisation de la cible ou du nombre de cycles nécessaires, plusieurs autres paramètres peuvent être modifiés pour améliorer l'efficacité de la sélection. Par exemple, la présence de détergent, la température, le temps de fixation et d'éluion et l'alternance des sélections négatives et positives peuvent varier d'une expérience de phage display à l'autre mais aussi d'un cycle à l'autre.

On sait que la présence de détergent lors de l'incubation de la bibliothèque avec la cible permet de réduire les interactions non spécifiques entre les phages et la cible et avec le produit de blocage. Il est tout à fait possible d'augmenter graduellement la concentration en détergent lors de chaque cycle. Cependant, dans notre étude, l'utilisation de détergent est trop risquée compte tenu de la nature lipidique de la cible. Des phages de très bonne qualité se perdraient lorsque la cible se désolidariserait de son support, les entraînant avec elle lors de la sélection *in vitro* tandis que les membranes cellulaires seraient désorganisées lors des sélections *ex vivo* et sur culture cellulaire.

La contrainte de la sélection peut être modifiée en changeant la température d'incubation. Selon que l'interaction est principalement gouvernée par l'enthalpie ou l'entropie, la contrainte de sélection peut être respectivement augmentée ou diminuée en augmentant la température de l'étape de fixation. Pour les sélections *ex vivo* et sur culture cellulaire, la sélection a été réalisée à 37°C pour maintenir le support (foie et cellule) en bon état. Seule la sélection *in vitro* aurait pu être réalisée à des températures différentes.

Une diminution du temps d'incubation avec la cible permet de sélectionner des phages caractérisés par une vitesse de fixation (k_{on}) élevée. A l'inverse, de longs temps d'élution permettent de sélectionner des phages avec une vitesse d'élution (k_{off}) faible. Puisque la constante d'équilibre K_a de la fixation du phage sur la cible est égale à $(k_{on})/(k_{off})$, l'efficacité de la sélection peut être augmentée en diminuant le temps de fixation et en augmentant le temps d'élution. Il faudrait donc éluer en deux étapes. Une première élution courte permettrait d'éliminer les phages avec un (k_{off}) élevé. Et la seconde élution plus longue permettrait de récupérer les phages avec un (k_{off}) faible. Lors des sélections réalisées *ex vivo*, le temps d'incubation a été modifié entre chaque cycle. Ainsi la période d'incubation a été allongée lors de la sélection négative et raccourcie lors de la sélection positive de manière à favoriser les phages de plus faible affinité pour les foies sains et de plus forte affinité pour les foies apoptotiques. La durée de l'élution n'a quant à elle jamais été supérieure à 10 minutes afin d'éviter la digestion des cellules par l'acide ainsi que l'altération de l'infectivité des phages.

On peut également discuter de la succession des sélections négatives et positives. Dans ce travail, les sélections négatives ont toujours précédé les sélections positives (figure 7.1 A.). *A priori*, rien n'indique que le contraire ne puisse se faire ou modifier les résultats obtenus (figure 7.1 B.). Le seul paramètre qui changerait serait le nombre de phages présents lors des sélections. Lorsque la sélection positive suit la sélection négative, le nombre de phages encore présents est fortement diminué surtout lors du premier cycle, alors que dans la situation inverse, la quantité de phages présents n'aurait pas encore été réduite. Cela peut avoir une influence si le nombre de cibles est inférieur au nombre de phages présents, ce qui n'était pas le cas dans les expériences réalisées dans cette étude. En effet, si nous considérons que la tête polaire des phospholipides PS et PC a un encombrement de 0,65 nm², que la surface des puits utilisés lors des sélections est de 1 cm² et que ceux-ci sont complètement recouverts de phospholipides, on peut estimer que le nombre de sites disponibles s'élève à 1,5 x 10¹⁴, soit 750 fois plus que de phages présents dans la solution. Le même calcul peut être effectué pour les sélections sur culture cellulaire et sur foie perfusé. On sait qu'en moyenne 5 x 10⁴ cellules sont présentes par puits lors des sélections sur culture cellulaire et que la surface d'une cellule est de 314 μm². Si l'on considère que la moitié de la surface est composée de phospholipides et que la moitié de ceux-ci sont accessibles, on peut déduire que 6 x 10¹²

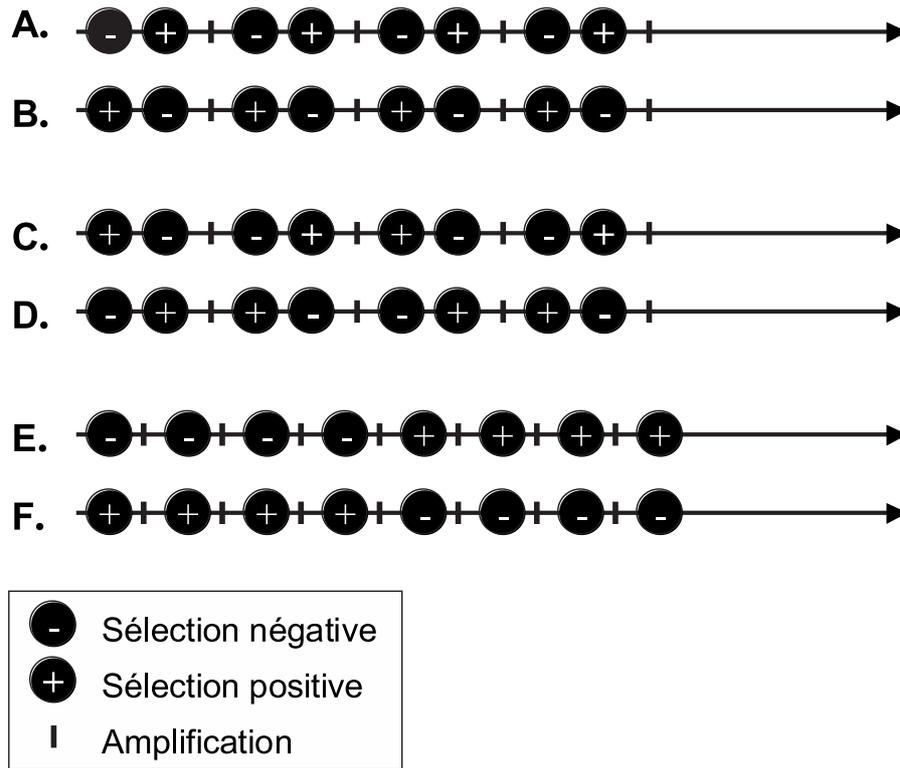


FIG. 7.1 – Modalités de succession des sélections positives et négatives. A. Répétition de cycles composés d’une sélection négative suivie d’une sélection positive, B. Répétition de cycles composés d’une sélection positive suivie d’une sélection négative, C. et D. Alternance des cycles présentés en A. et B., E. et F. Regroupement des sélections négatives et positives en deux séquences distinctes.

sites sont susceptibles d’être reconnus par les phages. Le nombre de sites disponibles est encore plus élevé dans les sélections *ex vivo* car les foies de souris contiennent de l’ordre de 10^{14} cellules. Il est aussi possible de réaliser plusieurs cycles de sélection négative suivis de plusieurs cycles de sélection positive (figure 7.1 E.), ou inversement (figure 7.1 F.), comme cela a été réalisé lors de la sélection *ex vivo* avec la bibliothèque L6. On pourrait également envisager d’alterner l’ordre des sélections pour chaque cycle afin que l’expérience bénéficie des avantages que pourraient fournir ces deux manières de faire succéder les sélections positives et négatives (figure 7.1 C. et D.). Nous manquons encore de recul vis-à-vis de cette technique pour déterminer *a priori* quelle séquence de sélection est la plus appropriée et la plus efficace. Il faudrait tester ces différentes séquences en maintenant constants d’autres paramètres tels que le type de bibliothèque, la taille de la bibliothèque d’entrée ou encore le temps d’incubation.

7.2 Critère de sélection

Dans toute expérience de phage display, il est important de définir clairement quels sont les critères de sélection des clones, qui découlent directement de l'objectif à atteindre. Dans certains cas, le choix se fera sur base d'un seul critère comme l'affinité du phage pour la cible étudiée, alors que dans d'autres applications, il faudra composer avec plusieurs critères, comme c'est le cas dans cette étude. C'est ainsi que nous avons été amenés à définir un coefficient artificiel tenant compte de critères concrets, le coefficient d'efficacité. A la fin de la caractérisation des clones choisis, les constantes d'affinité obtenues ont été confrontées au coefficient d'efficacité déterminé au préalable. Les clones choisis sur base de leur coefficient d'efficacité s'avèrent être réellement efficaces, c'est-à-dire spécifiques et sélectifs envers la phosphatidylsérine. Ils le sont d'autant plus que le coefficient d'efficacité est élevé, ce qui indique que dans cette étude, le coefficient d'efficacité est un bon critère de sélection.

7.3 Phage display : obtention d'épitopes séquentiels ou conformationnels

Le phage display réalisé à partir de bibliothèques de phages exposant des peptides, permet *a priori* de sélectionner des épitopes séquentiels ou conformationnels. Dans cette étude, aucune des séquences contraintes n'est présente dans les séquences de protéines connues pour leur affinité pour la phosphatidylsérine. Cela n'est guère étonnant étant donné que la présence de contraintes confère au peptide une structure secondaire l'empêchant de se fixer linéairement à sa cible. A l'inverse, les séquences linéaires obtenues peuvent être identifiées au sein de séquences protéiques connues. On peut donc s'attendre à identifier préférentiellement des épitopes séquentiels à partir de bibliothèques linéaires alors que les bibliothèques contraintes ne semblent fournir que des épitopes de type conformationnel.

7.4 Phage versus peptide

Certains clones sélectionnés sont très efficaces dans les expériences de compétition avec l'annexine V. Les phages HG6 et E3 se montrent respectivement 1900 et 500 fois plus affins pour la phosphatidylsérine que l'annexine V dans le contexte des expériences de compétition. Ces résultats plus qu'étonnants trouvent plusieurs explications dans la structure même du phage et ne sont malheureusement pas directement transposables au peptide isolé. On peut attribuer ce comportement à la multiplicité des sites de liaisons identiques présents sur le phage ou à un encombrement stérique et/ou à une concentration locale en peptide plus élevée au niveau du phage, donc à proximité de la phosphatidylsérine.

Même si, dans ce cas, il semble que les peptides pourraient coopérer pour se fixer à la cible, il est probable que des phages sélectionnés sur un autre type de cible s'y fixent d'une manière monovalente. Ainsi, par exemple, dans le cas d'une cible protéique, on peut émettre l'hypothèse qu'une fois fixé à la cible par l'intermédiaire d'un de ses peptides, le phage soit physiquement trop éloigné d'une autre cible pour qu'il s'y fixe simultanément, la distance minimum séparant les deux cibles étant déterminée par leur propre taille. Plusieurs des peptides pourraient se fixer à différentes parties de la protéine, dans ce cas le peptide devrait reconnaître une structure présente en de multiples exemplaires sur la protéine. La phosphatidylsérine peut être comparée à ce dernier cas. Lorsque celle-ci est immobilisée dans des puits de polystyrène ou exposée à la surface de la cellule, elle l'est en grande quantité. Ainsi, plusieurs motifs sont susceptibles d'interagir simultanément avec plusieurs peptides appartenant au même phage. On peut contourner ce problème ainsi que celui de l'augmentation locale en peptide aux alentours du phage en utilisant des bibliothèques de type 33 ou 3+3 (voir 3.5), dont les phages n'exposent statistiquement qu'un peptide à leur surface. L'encombrement produit par le phage ne peut quand à lui être évité qu'en travaillant avec le peptide isolé.

7.5 Applications des phages spécifiques

Parallèlement à la réalisation d'un agent de contraste spécifique de l'apoptose par greffage du peptide E3 sur un contrastophore, le phage E3 a été utilisé dans son entièreté comme vecteur de contrastophore IRM. Ce nouveau concept appelé magnétophage [141] a été mis au point et testé dans notre laboratoire par J. Segers au cours de sa thèse de doctorat [142]. Dans un premier temps, l'affinité du magnétophage E3 pour la phosphatidylsérine a été comparée à celle du phage non marqué (figure 7.2). Ces résultats montrent que l'affinité est conservée car les constantes de dissociation données par les courbes de fixation sont très proches (K_d app du phage E3 = $(6,11 \pm 0,84) \times 10^{-12}$ M et K_d app du magnétophage E3 = $(1,53 \pm 1,81) \times 10^{-11}$ M). Les magnétophages E3 spécifiques de la phosphatidylsérine ont été utilisés dans des expériences de filtration magnétique. Grâce à un aimant et à des colonnes appropriées, il est en effet possible de séparer des cellules saines et apoptotiques incubées avec des magnétophages E3. La figure 7.3 montre qu'il est possible d'enrichir la solution en cellules apoptotiques en utilisant les magnétophages E3. Ceux-ci ont ensuite été péglés de manière à les rendre furtifs et ont été injectés à des souris saines et traitées à l'anti-Fas. La figure 7.4 montre que le signal mesuré dans les foies évolue différemment selon les groupes. Les magnétophages E3 permettent donc de discriminer les foies sains des foies apoptotiques. L'ensemble de ces résultats montre que les magnétophages E3 permettent de distinguer *in vitro* et *in vivo* des cellules apoptotiques des cellules saines.

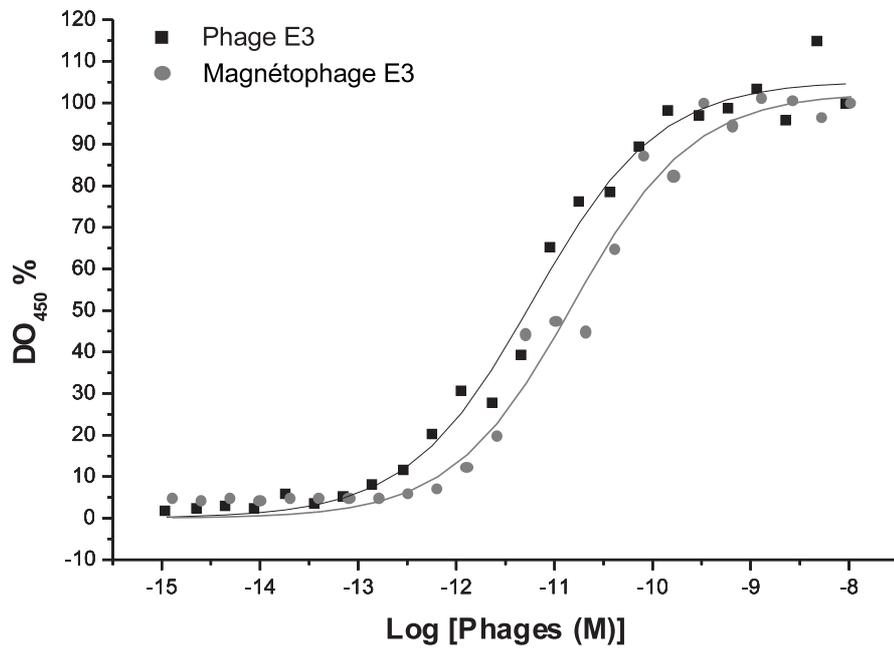


FIG. 7.2 – Courbes de fixation du phage E3 et du magnétophage correspondant.

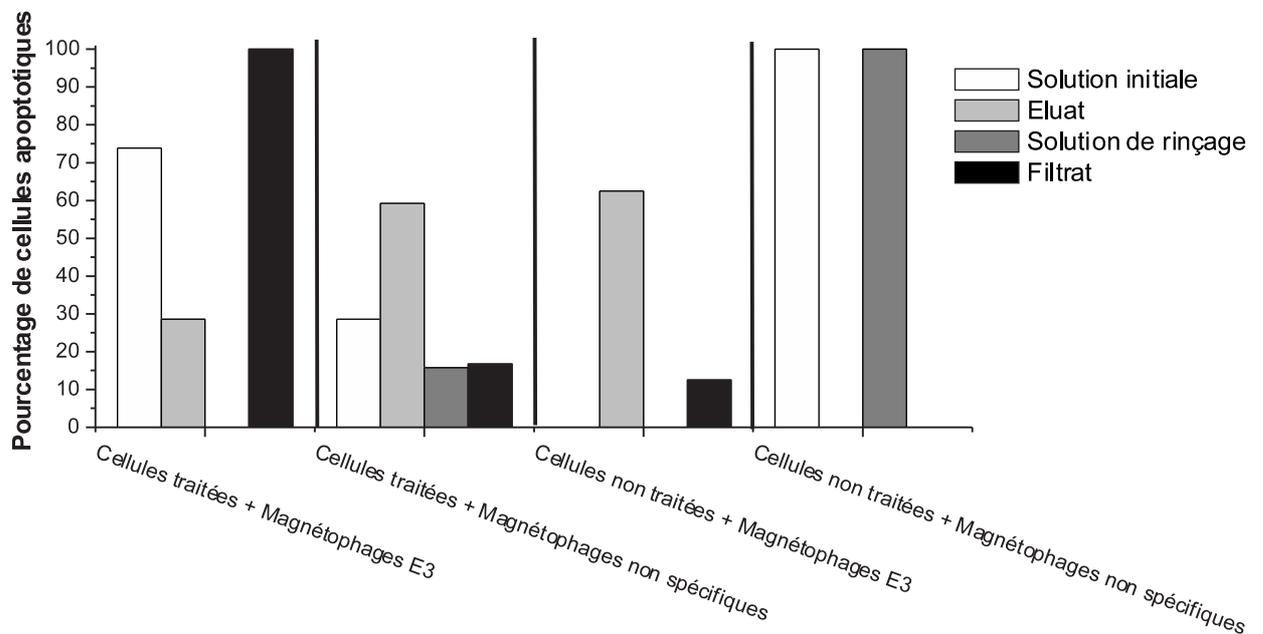


FIG. 7.3 – Enrichissement par filtration magnétique, d'une solution en cellules apoptotiques marquées par des magnétophages.

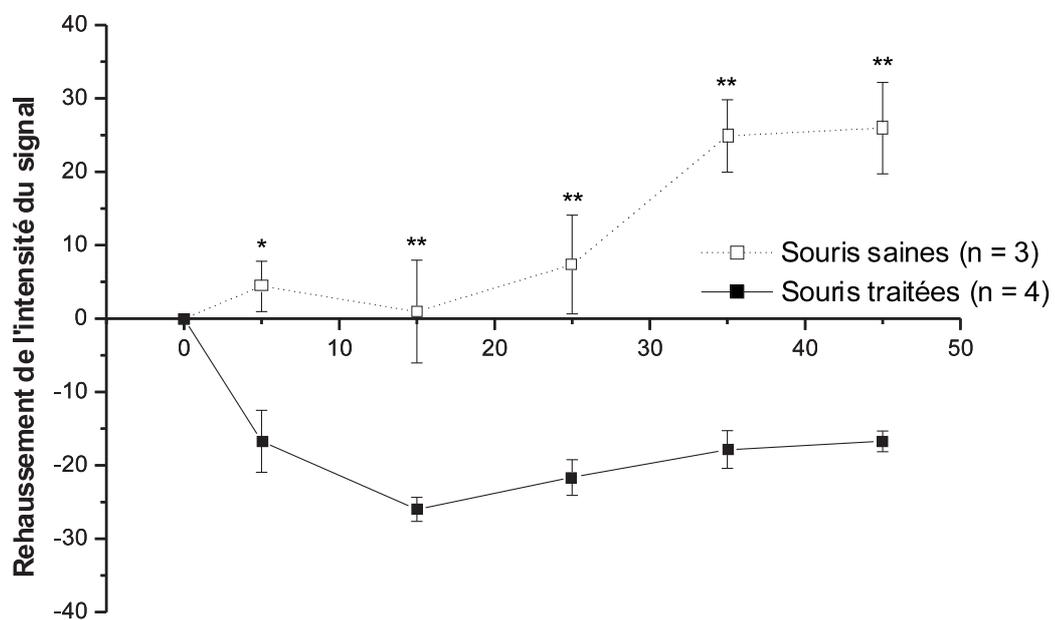


FIG. 7.4 – Modifications du signal IRM après injection des magnétophages furtifs E3 à des souris saines et à des souris traitées à l'anti-Fas. * : statistiquement significatif par rapport à l'autre groupe ($P < 0,05$) et ** : hautement significatif par rapport à l'autre groupe ($P < 0,01$).

Chapitre 8

Conclusions

En conclusion, les deux types de bibliothèques utilisées (L6 et C7) sont capables de fournir des phages spécifiques de la phosphatidylsérine. La présence d'une contrainte au sein du peptide n'est ni un avantage ni un désavantage dans cette application. De toute évidence la sélection *in vitro* n'est pas la plus performante, alors que c'est la seule qui permet d'exposer la cible de manière isolée. Dans les autres sélections, les phages sont exposés à une gamme très étendue de structures mais ces sélections sur culture cellulaire et *ex vivo* ont l'avantage de présenter la cible de manière très proche, même identique, à celle qui existe réellement *in vivo*. L'inconvénient de la sélection *ex vivo* est d'ordre pratique, elle impose le traitement de grands volumes ce qui demande de travailler à plus grande échelle.

Toutefois, il semble impossible de déterminer *a priori* quelle bibliothèque ou quel type de sélection seront les plus efficaces. De la même manière, il est impossible de déterminer au préalable le nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'une bibliothèque correctement vectorisée. Chaque cible et application étant de nature différente, il est impossible et inutile de tirer des conclusions globales pour toutes les expériences de phage display.

Quoi qu'il en soit, ce travail a permis l'obtention de phages spécifiques de la phosphatidylsérine, exposant des peptides susceptibles d'avoir eux aussi une forte affinité pour la phosphatidylsérine. Ceux-ci pouvant servir par la suite de vecteurs pour des contrastophores destinés à l'imagerie moléculaire de l'apoptose.

Comme beaucoup d'autres techniques de biologie moléculaire, le phage display est une technique relativement coûteuse à mettre en oeuvre. Bien que cette méthode soit peu gourmande en récepteur, c'est toutefois l'étape d'immobilisation de celui-ci qui est la plus onéreuse. Ce travail a néanmoins pu être réalisé à moindre coût car la phosphatidylsérine et la phosphatidylcholine sont deux récepteurs de prix peu élevé. Une estimation du budget nécessaire à la réalisation d'expériences de phage display menées au laboratoire est donnée à

titre indicatif. Le coût d'une expérience de phage display complète, comprenant l'étape d'immobilisation de la cible, quatre cycles de sélection, les ELISA individuelles pour 96 clones, le séquençage de 24 clones et les courbes de fixation pour quatre clones revient à ± 900 euros pour une sélection *in vitro* réalisée sur la phosphatidylsérine et la phosphatidylcholine et à ± 9000 euros pour une sélection sur le récepteur au VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor). Malgré son coût, la technique du phage display reste une méthode compétitive car elle permet de tester un très grand nombre de candidats simultanément et en une période de temps relativement courte, de l'ordre du mois pour les cycles de sélection.

Chapitre 9

Perspective : modélisation moléculaire ?

Le but de ce court chapitre n'est pas d'étudier en profondeur les détails de la modélisation moléculaire et de ses applications sur les systèmes étudiés expérimentalement mais de se questionner sur la faisabilité et l'intérêt de calculs numériques portant sur les biomolécules décrites précédemment.

9.1 Généralités

Grâce au formidable développement de la puissance des ordinateurs, le calcul numérique est devenu, dans de nombreux domaines, un outil capable de rivaliser et de compléter, voire de devancer, une approche expérimentale classique. Selon la taille des systèmes étudiés et la résolution temporelle souhaitée, plusieurs méthodes sont disponibles et reconnues. Pour les plus petits systèmes, de l'ordre d'une centaine d'atomes, la mécanique quantique offre une description très détaillée des propriétés électroniques des atomes. Cette technique est particulièrement efficace pour calculer, par exemple, la répartition des charges au sein d'une molécule. Pour des systèmes plus importants allant jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'atomes, la mécanique quantique n'est plus adaptée car trop gourmande en temps de calcul. Une description faisant appel à une mécanique plus classique est alors utilisée. Un atome est considéré comme un point matériel insécable interagissant avec d'autres atomes par l'intermédiaire de potentiels énergétiques intramoléculaires (liaison élastique, angle de valence, angle dièdre, etc) et intermoléculaires (Van der Waals, électrostatique principalement et liaisons hydrogène). L'ensemble de ces interactions définissant un champ de forces. Cette modélisation peut par la suite être utilisée, entre autre, pour déterminer la configuration la plus stable d'une molécule (mécanique moléculaire) ou observer le comportement temporel d'un système (dynamique moléculaire). Pour des systèmes encore plus grands, de l'ordre du micromètre ou même du millimètre, des techniques comme DPD (Dissipative Particle Dynamics) sont maintenant disponibles. Contrairement à la dynamique moléculaire, les méthodes DPD ne modélisent pas les interactions entre atomes mais entre groupements

d'atomes ce qui autorise l'étude de systèmes de taille beaucoup plus grande. Ces groupements ou "billes" interagissent via un potentiel effectif constitué de termes conservatifs, dissipatifs et aléatoires. De telles techniques fournissent principalement des informations sur l'hydrodynamique des systèmes étudiés. L'intérêt est de combler le vide entre les méthodes atomistiques et la mécanique des milieux continus, adaptée à des études macroscopiques. Enfin, une autre méthodologie de recherche *in silico*, nommée "arrimage moléculaire" ou "docking", pourrait également être envisagée dans le cadre de la conception d'agents de contraste magnétiques spécifiques. Ce type de modélisation moléculaire permet d'étudier des interactions, non plus au niveau atomique, mais au niveau macromoléculaire, en fonction de la structure tridimensionnelle de la cible et du ligand étudiés. Cette technique est souvent utilisée en recherche pharmaceutique pour l'identification de nouveaux couples cible - ligand. Ce sont généralement des interactions entre deux protéines ou entre une protéine et un ligand de petite taille qui sont étudiées. Bien que dans ce travail, le ligand et la cible soient tous deux de petite taille, cet outil pourrait être développé au laboratoire et utilisé en parallèle à la méthode du phage display dans le cas du ciblage de protéines.

Ici, la taille des systèmes moléculaires (plusieurs milliers d'atomes pour la bicouche) ainsi que la nature du phénomène observé (adsorption sélective d'un peptide sur la bicouche) privilégient l'utilisation de la dynamique moléculaire. Le chapitre suivant décrit donc les principales caractéristiques de cette technique.

9.2 La dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire a pour principe la résolution de la seconde équation de Newton appliquée à chaque atome i , $\vec{F}_i = m_i \times \vec{a}_i$ où \vec{F}_i est la force exercée sur l'atome i , m_i est sa masse et \vec{a}_i son accélération. Par intégration successive de son accélération a_i , la vitesse v_i puis la position de l'atome (x_i, y_i, z_i) peuvent alors être calculées. Il reste à savoir ce que représente F_i .

Dans le cas de système moléculaire, la force appliquée sur un atome dérive d'un potentiel et c'est celui-ci qui va déterminer toute la physique qui va être introduite dans la modélisation. Il existe de nombreuses formes de potentiel (ou champs de forces) et l'un des principaux problèmes de la dynamique moléculaire est de choisir un champ de forces qui décrive de manière la plus adéquate les atomes (et leurs interactions) présents dans le système.

Sous une forme simple mais complète, un champ de force se doit de décrire les interactions intramoléculaires et intermoléculaires liant les atomes.

L'équation 9.1 [143] propose un exemple de ce type de champ de force.

$$\begin{aligned}
 E_{\text{total}} = & \sum_{\text{Liaisons}} K_r (r - r_{eq})^2 & + & \sum_{\text{Angles}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\
 & + \sum_{\text{Diedres}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] & + & \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \\
 & + \sum_{\text{Liaisons-H}} \left[\frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right]
 \end{aligned} \tag{9.1}$$

Les trois premiers termes décrivent des interactions intramoléculaires. Le quatrième terme reprend les interactions intermoléculaires sous la forme de la somme d'un potentiel de Lennard-Jones (Van der Waals) et d'un potentiel électrostatique de charge ponctuelle comme illustré par la figure 9.1. Un dernier terme modélise la formation de liaisons hydrogènes. Il est important de remarquer que les constantes relatives à chaque terme énergétique (K_r et r_{eq} pour une liaison et K_θ et θ_{eq} pour un angle de Valence par exemple) doivent être connus pour tous les atomes. Ces constantes sont généralement déterminées à partir de mesures expérimentales (diffraction de rayon X) et de calculs de mécanique quantique. Pour des systèmes contenant seulement des atomes de type commun (Oxygène, Carbone, Hydrogène, Azote) cela ne pose pas de problème. Par contre, dès que l'étude fait intervenir des atomes plus "exotiques", la détermination de paramètres décrivant leurs propriétés devient plus problématique et bien souvent, il est nécessaire d'ajouter soi-même ces paramètres ce qui nécessite de nombreuses étapes de validation.

Un champ de force ne représente donc pas seulement un ensemble d'équations mais aussi toutes les constantes de force qui décrivent celui-ci.

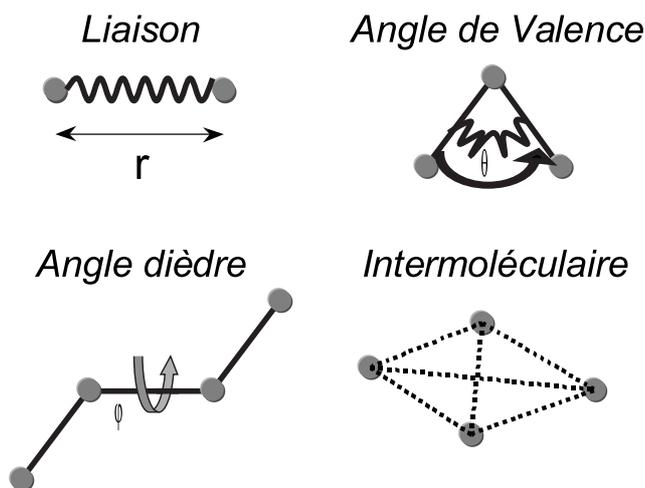


FIG. 9.1 – Interactions intra et intermoléculaires.

Selon la nature des molécules étudiées, de nombreux champs de force peuvent être utilisés parmi lesquels AMBER [143], CHARMM [144], MM3 [145], GROMACS [146, 147]

(molécules biologiques), COMPASS [148] (molécules inorganiques) ou encore OPLS [149] (état liquide).

Ces champs de forces peuvent être très complexes (le terme de liaison élastique pour COMPASS est modélisé par la somme de 6 termes) ce qui améliore la précision de la description des propriétés des atomes mais ralentit grandement la vitesse de calcul et donc l'analyse des résultats. Le choix du champ de forces est primordial et doit principalement se faire en fonction de la nature du système moléculaire étudié, même si le temps de calcul est aussi une composante à ne pas négliger.

La dynamique moléculaire ne se résume pas au seul choix du champ de forces, il est aussi nécessaire de s'attarder au choix d'un bon outil d'intégration numérique, à la définition de conditions périodiques aux bords, d'ajuster un pas de temps optimal (de l'ordre de la femtoseconde), de fixer une température et une pression et surtout de choisir une méthode permettant de les atteindre, ... Pour une description détaillée de tous ces paramètres voir les références [150, 151, 152].

Il existe sur le marché des logiciels complets tels que ceux proposés par Accelrys (COMPASS, CHARMM) qui "offrent" en même temps le champ de forces et le module de dynamique moléculaire associé. Cependant ces outils souffrent d'un prix de revient très élevé et de l'effet "boîte noire". Il existe d'autres alternatives, comme NAMD [153], TINKER [154] ou GROMACS, qui sont gratuits, multi plate-formes et "open source". L'utilisateur a alors tout le loisir de modifier et d'améliorer le programme pour qu'il corresponde mieux à son problème. Ces logiciels ont le soutien d'une forte communauté scientifique et il est donc aisé de trouver des renseignements sur leur utilisation. Cependant, la première étape qui consiste en la construction du modèle moléculaire est souvent absente. C'est un point faible qui rebute bon nombre de néophytes.

Ici, GROMACS a été choisi car son champ de forces est le mieux adapté au système moléculaire étudié et parce qu'il offre un module complet de calcul et d'analyse. Un autre attrait de cet outil est qu'il est possible de limiter le nombre d'atomes en ne prenant explicitement en compte que les atomes d'hydrogène polaires. Ainsi (voir figure 9.2), les atomes d'hydrogène des chaînes aliphatiques sont implicitement pris en compte par les atomes de carbone qui leur sont liés.

9.3 Modélisation des peptides

La modélisation des peptides s'est faite en deux parties. D'abord, une étape de construction dans TINKER (PyMOL [155] peut aussi être utilisé pour les peptides linéaires) suivie d'une optimisation géométrique dans GROMACS en présence d'eau. Ensuite, une courte dynamique moléculaire de 200 ps à 300° K et 1 bar a été lancée pour les peptides E3 (hexapeptide linéaire spécifique de la phosphatidylsérine), 6xG (hexapeptide linéaire non spécifique) et FE10/FE12/FH12 (heptapeptide cyclique spécifique de la phosphatidylsérine). Un aperçu de ces calculs est donné par la figure 9.2. Une rapide analyse permet de

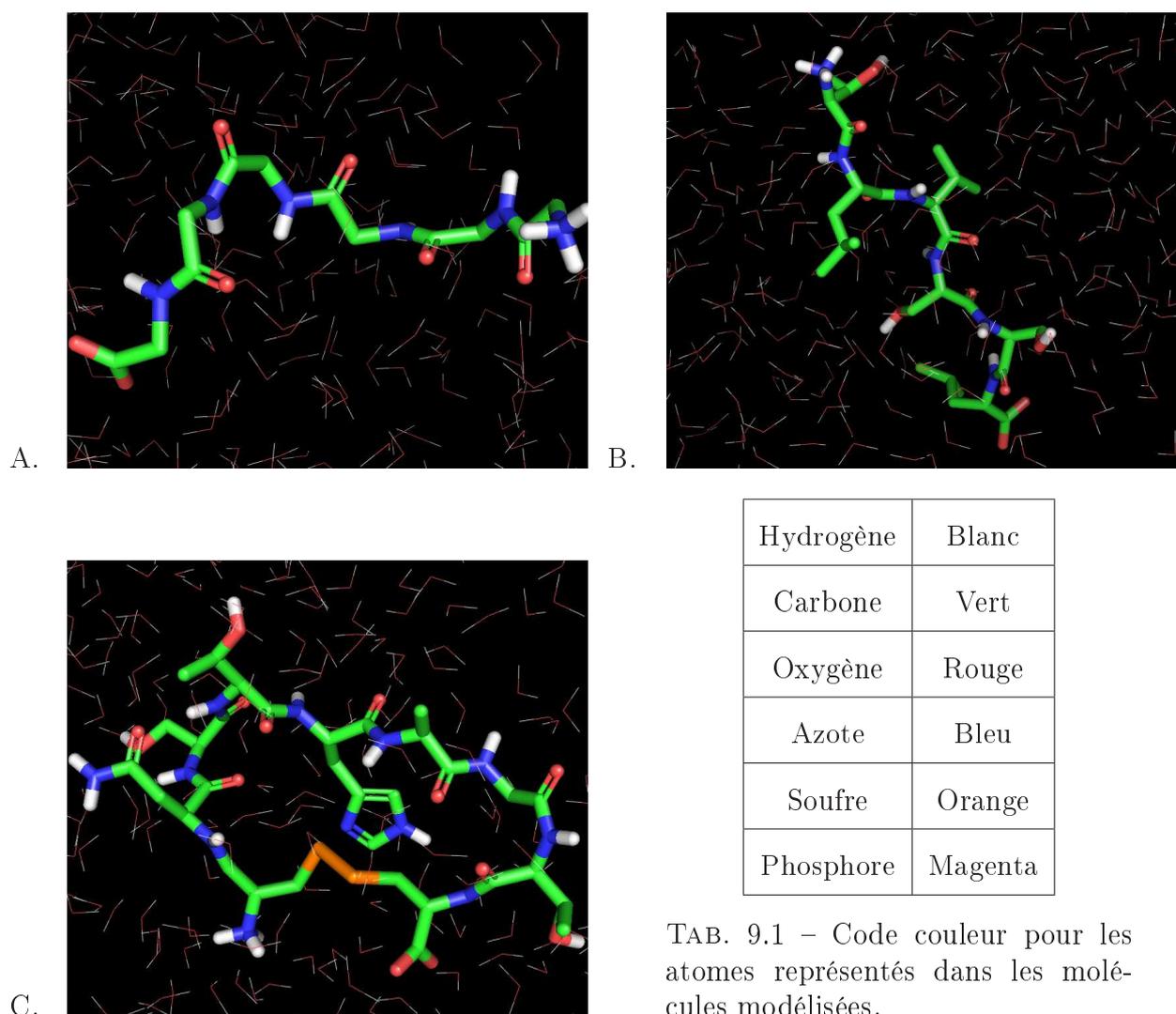


FIG. 9.2 – Modélisation moléculaire des peptides 6xG (A.), E3 (B.) et FE10/FE12/FH12 (C.) dans une boîte d'eau à pH physiologique. Le code couleur est donné par la table 9.1.

constater que le nombre de liaisons hydrogènes est élevé pour les 3 peptides (30, 25 ± 2 , 9 pour FE10/FE12/FH12, $21, 3 \pm 2$, 14 pour E3 et $19, 74 \pm 2$, 27 pour 6xG) et que leur interaction électrostatique avec l'eau est la contribution majeure à l'énergie du système. Cette

tendance devrait être encore plus marquée en présence des têtes polaires de la bicouche phospholipidique puisque celles-ci sont chargées négativement.

9.4 Modélisation d'une bicouche phospholipidique

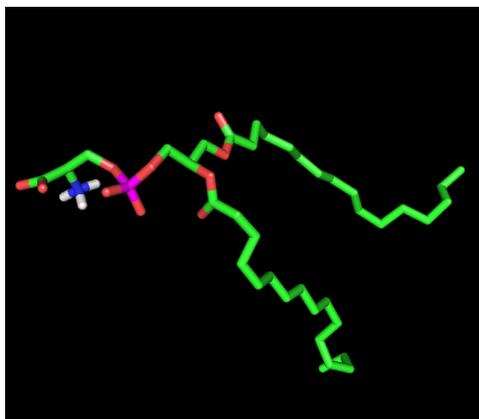


FIG. 9.3 – Modélisation moléculaire de la molécule de dipalmitoylphosphatidylsérine.

L'idée est d'assembler chaque peptide à cette bicouche et de laisser le système évoluer dans le temps. Il devrait alors être possible de suivre la trajectoire du peptide et donc de vérifier son accrochage aux têtes polaires des DPPS mais aussi de déterminer la manière dont ce peptide se fixe à la bicouche, comme cela a été entrepris par Lensink et al. [158] avec un peptide plus long (16 acides aminés). De plus, une analyse énergétique devrait être en mesure de déterminer quantitativement, le potentiel d'interaction entre un peptide et la bicouche. Il serait alors possible d'établir un classement des peptides en fonction de leur affinité pour celle-ci.

De tels calculs requièrent des ressources matérielles qui ne sont pas disponibles au laboratoire. A titre d'exemple, une dynamique moléculaire de 100 ns pour un système de 20000 atomes nécessite environ 50 jours de calcul sur un PC de bureau possédant un processeur tournant à 2.4 GHz.

Du point de vue de la modélisation moléculaire, l'élément de base de la bicouche phospholipidique, la molécule de dipalmitoylphosphatidylsérine (Figure 9.3) est une molécule difficile à construire car elle est en fait constituée de 3 parties différentes. En effet, cette molécule est constituée de deux longues chaînes aliphatiques, d'un glycérol et d'une fonction phosphosérine. La molécule de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) est, par contre, plus simple à modéliser car beaucoup plus étudiée. De manière traditionnelle, il n'existe pas de paramètres décrivant les interactions entre groupements de différent types. Il a donc été nécessaire de trouver un champ de forces spécifique à cette molécule. Ce type d'approche a été

developpé, entre autres, par Pandit et al. [156, 157] et Lensink et al. [158]. La figure 9.4 présente une bicouche de DPPS additionnée de contre-ions Na^+ et d'une couche d'eau. L'obtention d'une telle bicouche n'est pas aisée. Elle nécessite de nombreuses étapes de construction ainsi qu'un temps de calcul non négligeable.

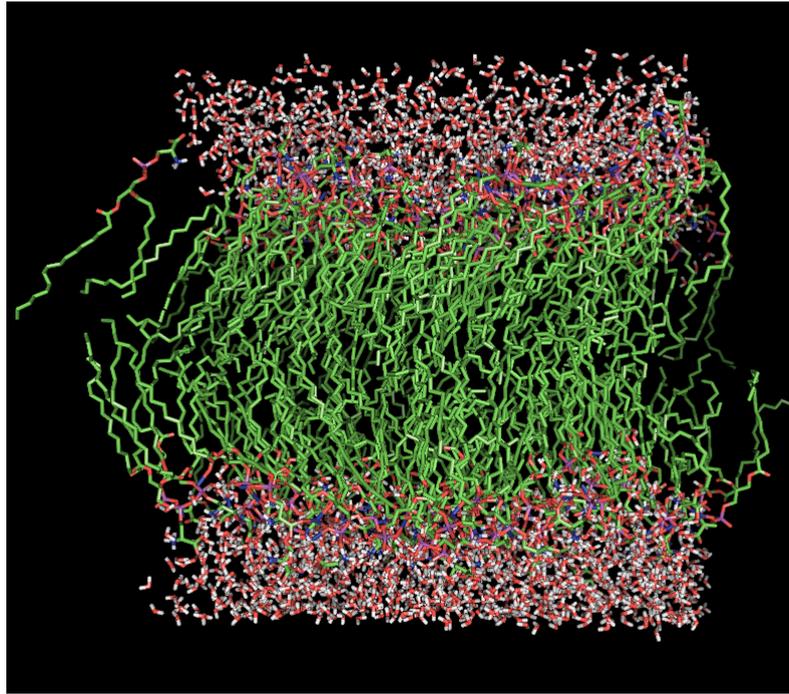


FIG. 9.4 – Modélisation moléculaire d’une bicouche de DPPS d’après Pandit et al. [157].

9.5 Conclusion

Cette première approche a démontré la faisabilité d’une étude, par dynamique moléculaire, de l’accrochage de différents types de peptide à la surface d’une bicouche de DPPS. Les peptides ont été entièrement modélisés lors de ce travail tandis que la bicouche a été obtenue par l’intermédiaire des travaux de Pandit et al. [157]. L’étape suivante qui consiste à étudier l’évolution de ces deux entités réunies n’a pu être effectuée dans le cadre ce travail mais est tout à fait réalisable dans des conditions de temps et de ressources matérielles améliorées. Elle devrait permettre de classer les peptides en fonction de leur affinité envers la bicouche.

Quatrième partie

Synthèse et caractérisation d'un agent de contraste IRM apopto-spécifique

Chapitre 10

Introduction

La seconde partie de ce travail est dédiée à la mise au point et à la caractérisation d'agents de contraste spécifiques des cellules apoptotiques. Plusieurs agents de contraste ont été synthétisés sur base du peptide E3 dont la séquence a été préalablement déterminée lors de la première partie de ce travail. Ces agents de contraste répondent au même schéma de base : tous sont composés d'un rapporteur magnétique, le contrastophore, et d'un vecteur en l'occurrence le peptide sélectionné. La présence d'un espaceur entre les deux constituants a également été envisagée.

La première étape consiste à vérifier que le peptide E3, une fois séparé de son phage, conserve de l'affinité pour la phosphatidylsérine. En effet, il est douteux que le peptide conserve, à l'identique, ses propriétés mesurées sur le phage dont il est issu.

Etant donné que différents contrastophores pour l'imagerie par résonance magnétique sont développés au laboratoire, deux d'entre eux, appartenant à des catégories différentes, seront testés. Il s'agit de particules superparamagnétiques de type USPIO (agent de contraste négatif) et de chélate de gadolinium Gd-DTPA (agent de contraste positif). Il sera ensuite intéressant de juger de la pertinence de l'insertion d'un espaceur entre le peptide et le contrastophore.

Une fois caractérisés au point de vue chimique et physico-chimique, ces nouveaux agents de contraste seront testés sur culture cellulaire avant d'être étudiés *in vivo* sur le modèle de l'apoptose hépatique induite par l'anticorps anti-Fas.

Chapitre 11

Matériel et méthodes

11.1 Synthèses et greffages

11.1.1 Synthèse des peptides

Le peptide E3 de structure primaire Thr-Leu-Val-Ser-Ser-Leu et le peptide GG-E3 de structure primaire Gly-Gly-Thr-Leu-Val-Ser-Ser-Leu ont été obtenus par synthèse en phase solide (méthode de Merrifield) au moyen de la chimie de type Fmoc / t-butyle. Une résine de type Wang (alcool p-alkoxybenzylique) a été employée. Le groupement Fmoc (fluorénylméthylloxycarbonyle) a été utilisé pour la protection de la fonction α -NH₂ des acides aminés. La DCC (dicyclohexylcarbodiimide) a été employée comme agent de couplage. Les fonctions hydroxyles des résidus thréonine et sérine ont été protégées par de l'éther t-butyle. La déprotection totale et le clivage de la résine ont été réalisés au moyen de TFA (acide trifluoroacétique). Finalement, le peptide a été purifié par chromatographie (HPLC) en phases inversées sur un support de type C18 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Allemagne).

Le peptide 6xG de structure primaire Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly a été fourni par la firme Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique).

11.1.2 Biotinylation des peptides

15 μ mol de biotine-NHS et d'hexapeptide sont solubilisés dans 1 ml de DMF (diméthylformamide) et le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante. 5 ml d'eau déminéralisée sont ajoutés, la solution est filtrée et dialysée pendant 48 heures (cut-off des membranes = 500). Le peptide biotinylé est isolé sous forme de poudre après lyophilisation.

11.1.3 Marquage du peptide E3 à la fluorescéine

8 μmol de FITC (IsoThioCyanate de Fluorescéine, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) et 5 μmol d'hexapeptide E3 ont été solubilisées dans 2 ml de DMF et agitées durant 24 heures à température ambiante. La fonction isothiocyanate réagit avec la fonction N terminale du peptide pour former un lien isothiourée. 5 ml d'eau ont été ajoutés, la solution est ensuite filtrée et dialysée (cut-off des membranes = 500, Spectra/Por, VWR, Leuven, Belgique).

11.1.4 Greffage des peptides sur les USPIO

Les particules superparamagnétiques utilisées dans cette expérience sont des particules de type USPIO (diamètre hydrodynamique de 20 - 30 nm) stabilisées par une couche de dextran. Le peptide a été greffé sur ces nanoparticules d'oxyde de fer en deux étapes (figure 11.1) : la réaction du dextran avec l'épichlorhydrine est suivie de sa réaction avec le groupe amine du peptide. 5 ml de USPIO (100 mg de fer) sont dilués dans 25 ml d'eau et traités avec 20 ml de NaOH 5N et 10 ml d'épichlorhydrine. Le mélange est agité pendant 24 heures à 40°C dans l'obscurité et est ensuite dialysé (cut-off des membranes = 12000-14000 ; Spectra/Por, VWR, Leuven, Belgique). Une solution de peptide (5 mg dans 2 ml d'eau) est ajoutée à la suspension de USPIO-épichlorhydrine (90 μmol de fer). Le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit et est exhaustivement dialysé pour éliminer les peptides libres. Les nouveaux agents de contraste ainsi obtenus à partir du peptide E3 et GG-E3 portent respectivement les noms de E3-USPIO et GG-E3-USPIO.

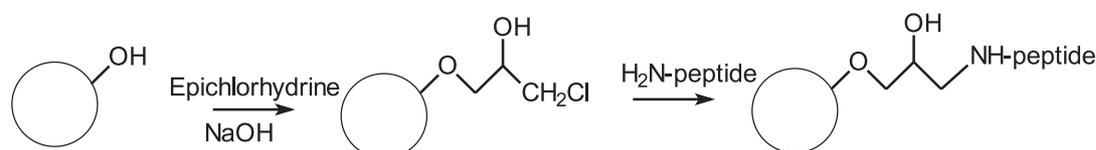


FIG. 11.1 – Greffage d'un peptide sur le coating de dextran des USPIO.

11.1.5 Greffage des peptides sur des USPIO pegylées

Les particules USPIO-épichlorhydrine (3,2 ml à une concentration de 64 mM de fer) sont traitées avec 0,5 g de diamine PEG 2000 pendant 24 heures à température ambiante. Les particules sont dialysées (cut-off des membranes = 12000-14000). Les particules PEG sont ensuite traitées avec de l'épichlorhydrine (10 ml). L'excès est aussi éliminé par dialyse. Les particules sont alors incubées avec le peptide pendant 24 heures puis à nouveau dialysées.

11.1.6 Greffage des peptides sur un chélate de gadolinium

Le peptide GG-E3 a été greffé sur du DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique) par réaction avec du pSCN-Bz-DTPA (Macrocyclics, Dallas, Tx, USA) (figure 11.2). Le ligand DTPA-GG-E3 a ensuite été complexé avec du $\text{GdCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$. L'absence de gadolinium libre a été contrôlée par le test à l'arsenazo.

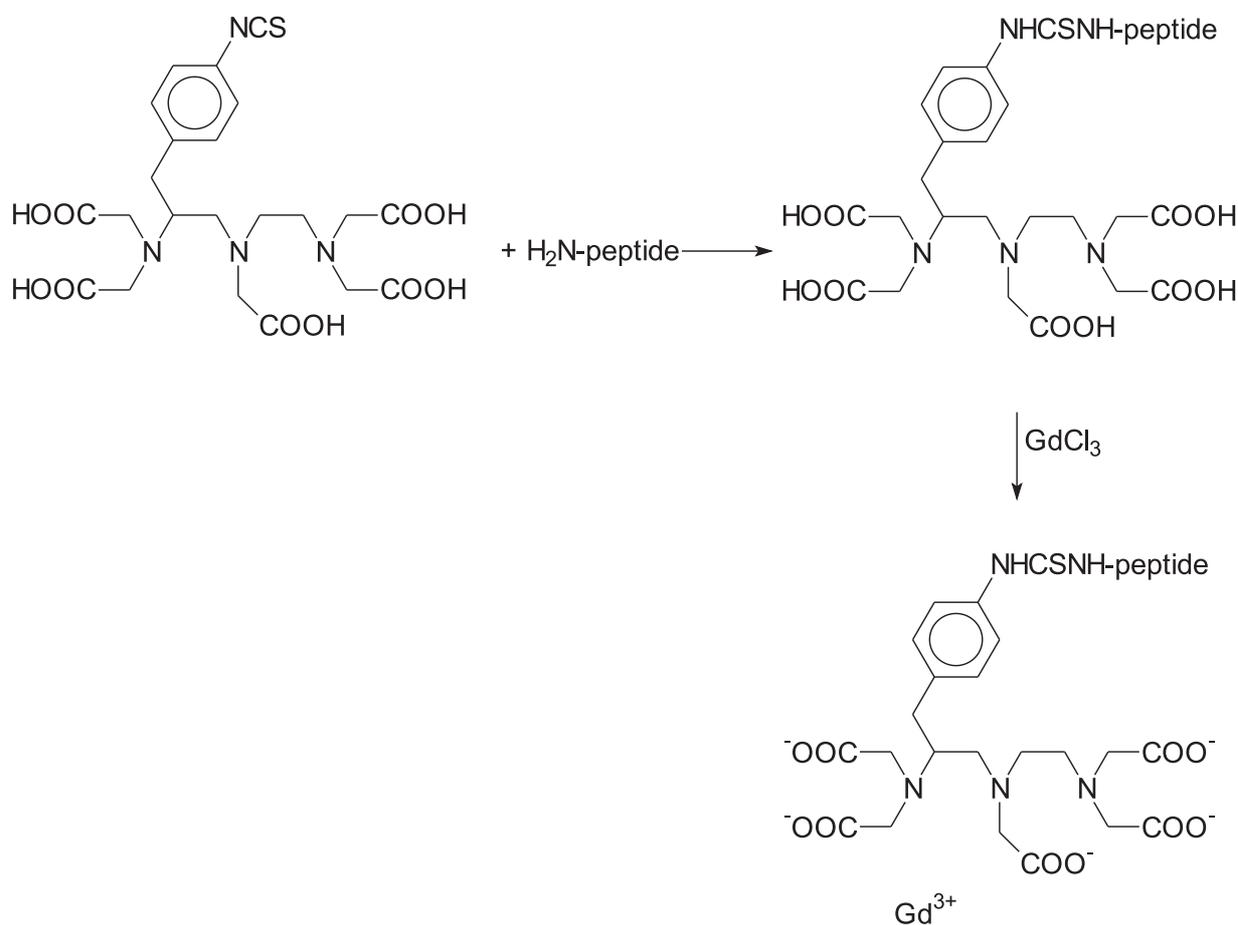


FIG. 11.2 – Greffage d'un peptide sur DTPA et complexation avec du gadolinium.

11.2 Caractérisation physico-chimique

11.2.1 Spectrométrie de masse

La séquence des peptides a été confirmée par spectrométrie de masse de type électrospray sur un appareil Q-tof-2 (Micromass, Royaume-Uni). Pour l'analyse, 0,1 mg de peptide est dissous dans 1 ml d'un mélange acide formique/ acétonitrile/ eau (0.5%/ 50%/ 49.5%).

11.2.2 Dosage du fer

La concentration en Fe^{3+} est déterminée par relaxométrie à 20 MHz (Bruker Minispec, Karlsruhe, Allemagne) et à 37 °C après minéralisation. Celle-ci est effectuée en conditions oxydante et acide (0,6 ml HNO_3 and 0,3 ml H_2O_2) au moyen d'un four à micro-onde (Milestone MSL-1200, Sorisole, Italie). La valeur de R1 de l'échantillon est ensuite reportée sur une droite de calibration préalablement réalisée à partir des valeurs de R1 d'échantillons de concentrations différentes en Fe^{3+} .

11.2.3 Profils NMRD

Les profils NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion), qui montrent l'évolution de la relaxivité (l'augmentation de la vitesse de relaxation d'une suspension aqueuse de particules contenant 1 mmol/l de fer) avec l'intensité du champ magnétique ont été acquis à 37°C sur un relaxomètre à champ cyclé de type Stelar (Mede, Italie). Les relaxivités (r_1) ont été mesurées sur la gamme de champ couverte par le relaxomètre à champ cyclé qui s'étend de 0,24 mT à 0,24 T. Des mesures supplémentaires à 20 et 60 MHz ont été respectivement obtenues sur des Minispecs PC-20 et Mq 60 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne).

11.2.4 Mesure de la taille hydrodynamique

La mesure de la taille hydrodynamique des particules superparamagnétiques est obtenue à l'aide d'un appareil de marque Brookhaven de type BI-160 équipé d'un goniomètre et d'un corrélateur BI-9000AT-BIC. La source lumineuse est un laser He-Ne d'une longueur d'onde de 633 nm et d'une puissance de 17 mW.

11.2.5 Mesure de la stabilité vis-à-vis de la transmétallation

La stabilité des dérivés du Gd-DTPA vis-à-vis de la transmétallation avec le zinc est estimée par la mesure de l'évolution de la vitesse de relaxation des protons de l'eau (R_{1p}) d'un tampon phosphate à pH 7 contenant 2,5 mM de complexe de gadolinium et 2,5 mM de ZnCl_2 . Lorsque des ions gadolinium sont substitués par des ions zinc, il y a apparition d'ions libres de gadolinium dans la solution. Ceux-ci interagissent alors avec les phosphates présents en solution et précipitent. Le gadolinium précipité n'intervenant plus dans le phénomène de relaxation, il se produit une baisse de la vitesse de relaxation en fonction du temps. Le R_{1p} est obtenu après soustraction de la contribution diamagnétique à la relaxation des protons de l'eau de la vitesse de relaxation observée ($R_1=1/T_1$). Ces mesures, qui font partie intégrante des tests de caractérisation des complexes paramagnétiques, ont été réalisées à 20 MHz et à 37°C sur un Minispec PC-20. Les échantillons sont maintenus à 37°C sur un "dry block" entre les mesures (jusqu'à 4320 minutes).

11.3 Caractérisation biologique

11.3.1 Courbe de fixation des peptides biotinylés

L'affinité apparente du peptide biotinylé pour la PS et la PC peut être évaluée par ELISA. L'expérience se déroule selon la séquence suivante (figure 11.3) : immobilisation de la cible, incubation avec la solution de peptide biotinylé, rinçage et élimination des peptides non fixés à la cible, incubation avec de la streptavidine couplée à une peroxydase, rinçage et élimination de la streptavidine non fixée aux peptides biotinylés, incubation avec le substrat de la peroxydase et mesure de la DO.

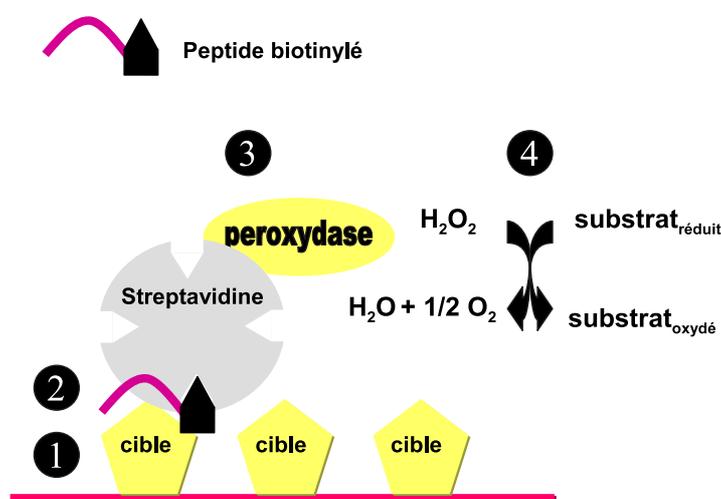


FIG. 11.3 – Principe de l'évaluation de l'affinité des peptides biotinylés par ELISA

L'immobilisation des phospholipides et l'incubation de la plaque avec une solution de blocage est réalisée comme au point 5.5. La plaque est ensuite rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 à l'aide d'un laveur de plaque. Des dilutions de 2 en 2 de peptide biotinylé sont réalisées dans du tampon calcium pour couvrir une gamme allant de $\pm 4 \times 10^{-5}$ à $2 \times 10^{-12} M$. 100 μl de ces dilutions sont ensuite ajoutés dans leur puits respectif. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la plaque est à nouveau rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20. 100 μl /puits de streptavidine-HRP (Streptavidin - Peroxidase Polymer, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) diluée 500 fois dans du PBS + 0,05 % Tween 20 sont ajoutés à chaque puits et la plaque est incubée 1 heure à température ambiante. La plaque est encore rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 avant que 160 μl /puits de mélange réactionnel OPD soient ajoutés. Après 30 minutes, la réaction est arrêtée avec 50 μl /puits d'une solution 4M d'acide sulfurique et les DO_{450} sont lues dans les différents puits à l'aide d'un spectrophotomètre.

11.3.2 Courbe de compétition du peptide E3 avec le phage E3

L'affinité du peptide E3 isolé peut être comparée à celle du phage E3 par ELISA de compétition. L'expérience se déroule selon la séquence suivante : immobilisation de la cible, incubation avec un mélange de peptides et de phages, rinçage et élimination des peptides et phages non fixés à la cible, incubation avec de l'anticorps anti-M13 couplé à une peroxydase, rinçage et élimination des anticorps non fixés aux phages, incubation avec le substrat de la peroxydase et mesure de la DO.

L'immobilisation de la DPPS et l'incubation de la plaque avec une solution de blocage est réalisée comme décrit au point 5.5. La plaque est incubée avec 200 μl /puits d'une solution de blocage. Après 2 heures, la plaque est rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 à l'aide d'un laveur de plaque. Une solution stock de peptide E3 préparée dans du tampon calcium additionné de 0,4 % de lait en poudre est diluée de 2 en 2 pour couvrir une gamme de $\pm 10^{-6}$ à 10^{-10} M. 50 μl de chaque dilution sont ajoutés dans chaque puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 50 μl de tampon calcium contenant le phage E3 à une concentration de $1,2 \times 10^{-12}$, sont ajoutés. Après 1 heure 30 minutes d'incubation à 37°C, la plaque est à nouveau rincée 6 fois avec du PBS + 0,1 % Tween 20 et la suite du protocole est identique à celui utilisé au point 11.3.1.

11.3.3 Courbe de compétition des peptides avec l'annexine V biotinylée

L'affinité du peptide E3 isolé pour la PS peut être comparée à celle de l'annexine V biotinylée par ELISA de compétition. L'expérience se déroule selon la séquence suivante : immobilisation de la cible, incubation avec un mélange de peptide et d'annexine biotinylée, rinçage et élimination des peptides et molécules d'annexine non fixés à la cible, incubation avec de la streptavidine couplée à une peroxydase, rinçage et élimination de la streptavidine non fixée à l'annexine biotinylée, incubation avec le substrat de la peroxydase et mesure de la DO.

3 mg de phospholipides sont solubilisés dans 30 ml d'éthanol sous léger chauffage. 200 μl sont disposés dans les puits d'une plaque de 96 puits. L'éthanol s'évapore sous hotte aspirante à température ambiante durant une nuit. La plaque est ensuite incubée avec une solution de blocage à base de BSA et incubée 2 heures à 4°C. La plaque est ensuite rincée 3 fois avec du tampon calcium. 50 μl de tampon calcium sont ajoutés dans chaque puits pour réaliser les dilutions. La solution initiale en peptide (ou en un de ses dérivés) est réalisée dans du tampon calcium contenant 1/10 de volume de tampon calcium + 4% de lait en poudre. Des dilutions de 2 en 2 de peptide sont directement réalisées sur la

plaque pour couvrir une gamme allant de $\pm 2 \times 10^{-5}$ à 1×10^{-10} M. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 50 μ l/puits d'annexine biotinylée (Annexin V Biotin Conjugate, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) diluée 400 fois dans du tampon calcium sont ajoutés aux puits et l'ensemble est incubé 1 heure 30 minutes à 37°C. La plaque est à nouveau rincée 3 fois avec du tampon calcium. 100 μ l/puits de streptavidine-HRP diluée 500 fois dans du PBS + 0,05 % Tween 20 sont ajoutés à chaque puits et la plaque est incubée 1 heure à température ambiante. La plaque est encore rincée 3 fois avec du tampon calcium avant que 200 μ l/puits de mélange réactionnel ABTS (acide 2,2'-azino bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonique)) soient ajoutés. Après 10 minutes, les DO₄₀₅ sont lues dans les différents puits à l'aide d'un spectrophotomètre.

11.4 Etude sur culture cellulaire des agents de contraste particuliers

11.4.1 Maintenance de la culture et induction de l'apoptose

La souche cellulaire utilisée dans ce modèle est la souche JURKAT. Ces cellules lymphocytaires tumorales humaines présentent la caractéristique de croître en suspension, et sont, pour cette raison, plus adaptées aux expériences d'imagerie. L'apoptose est induite par incubation avec la camptothécine [159].

Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Parck Memorial Institute) contenant de la L-glutamine et du NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) additionné de 10% de FCS (Fœtal Calf Serum, N.V. Invitrogen S.A., Merelbeke, Belgique) et de 1% de solution d'antibiotique / antimycotique (N.V. Invitrogen S.A., Merelbeke, Belgique).

L'apoptose est induite en incubant 24 heures, à 37°C et sous atmosphère de 5% en CO₂, une culture ayant atteint une concentration de 1×10^6 cellules/ml dans du milieu contenant une solution finale de 1 μ M en camptothécine. L'incubation est réalisée dans un incubateur avec une atmosphère humidifiée de 5% en CO₂ et à 37°C.

L'autre modèle d'induction d'apoptose est celui déclenché chez les cellules Hep G2 toujours par incubation avec la camptothécine (pour la maintenance de la culture, l'induction de l'apoptose et la validation du modèle voir 5.2.2).

11.4.2 Validation des modèles

11.4.2.1 Validation par microscopie confocale

Les cellules sont rincées avec du tampon de fixation et amenées à une concentration de $\pm 10^6$ cellules/ml. 50 μl de la suspension cellulaire sont ensuite déposés sur une lamelle préalablement recouverte de poly-L-Lysine. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les lames sont rincées 3 fois dans du tampon de fixation. 50 μl de tampon de fixation contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de d'iodure de propidium et 50 mM de 6-CFDA sont ajoutés sur la lame. Après 10 minutes d'incubation dans l'obscurité, la lame est à nouveau rincée 3 fois. Avant l'observation, les cellules disposées sur la lame sont recouvertes d'une lamelle. L'observation se fait ensuite de la même manière qu'au point 5.2.2.2.

11.4.2.2 Validation par RMN du proton

La présence de cellules apoptotiques dans la culture de JURKAT traitée a également été mise en évidence par RMN du proton. Pour cela, la culture est centrifugée 10 minutes à 3000 rpm et à température ambiante et le culot cellulaire est repris dans du HBSS deutéré pour atteindre une concentration de 4×10^7 cellules/ml. 600 μl , contenus dans un tube de haute résolution de 5 mm de diamètre, sont introduits dans l'aimant. Après saturation du pic de l'eau, le spectre de la suspension cellulaire est acquis par un spectromètre AMX-300 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne). Les signaux provenant du $-\text{CH}_3$ de lipides et quelques acides aminés situés entre 0,85-0,92 ppm, du $-(\text{CH}_2)_n-$ provenant de lipides situés entre 1,62-1,32 ppm et du $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la choline situés entre 3,10 et 3,30 ppm, ont ensuite été intégrés [80].

11.4.3 Imagerie par microscopie confocale

La visualisation des cellules Hep G2 apoptotiques par microscopie confocale se base sur l'utilisation du peptide E3 marqué au FITC. Le protocole appliqué est rigoureusement identique à celui utilisé au point 11.4.2.1 pour la validation des modèles par microscopie confocale, à l'exception du remplacement du 6-CFDA par le peptide E3 marqué au FITC.

11.4.4 Marquage des cellules et imagerie par résonance magnétique

Les E3-USPIO ou les USPIO sont ajoutés à 200 μl de suspension de cellules JURKAT ou à la culture de Hep G2 (2×10^6 cellules) préalablement traitées à la camptothécine ou non traitées, à différentes concentrations finales. Après 2 heures d'incubation à 37°C , les cellules sont rincées 2 fois avec du milieu de culture. Les cellules sont ensuite reprises dans 100 μl de milieu de culture et la suspension cellulaire est alors introduite dans un tube de 200 μl (Greiner, Wemmel, Belgium).

Les échantillons sont placés dans un appareil Bruker AVANCE-200 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'un aimant supraconducteur de 4,7 T et d'une sonde de mini-imagerie 3.6. L'acquisition des images est réalisée avec une séquence écho de spin (TR/TE : 3000/15 msec, NA : 2, FOV : 4 cm, matrice : 256 x 256, épaisseur de coupe : 1,5 mm, nombre d'échos : 24).

11.4.5 Mesure des temps de relaxation

La mesure des temps de relaxation T1 et T2 des échantillons préparés au point 11.4.4 a été réalisée à 60 MHz sur le Minispec Mq 60. Le T2 a également été mesuré à 200 MHz sur l'imageur AVANCE-200.

11.5 Etude *in vivo* des agents de contraste spécifiques

Le modèle expérimental utilisé est le modèle d'induction d'apoptose hépatique par injection d'anticorps anti-Fas qui a été détaillé au point 5.2.3.1.

11.5.1 Imagerie par résonance magnétique *in vivo*

11.5.1.1 Tests des agents de contraste positifs à base de Gd-DTPA

Après anesthésie au Nembutal[®], l'animal est placé dans le système d'imagerie. La séquence utilisée est une séquence écho de spin (TR/TE : 300/15 msec, NA : 2, FOV : 5 cm, matrice : 256 x 256, épaisseur de coupe : 1,5 mm, nombre de coupes : 3, distance inter-coupe : 2,5 mm, nombre d'échos : 24).

Les agents de contraste ont été injectés à la dose de 0,1 mmol/Kg de poids corporel dans une des veines caudales. Une image pré-contraste et plusieurs images post-contraste (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes) ont été acquises.

L'intensité du signal dans les régions d'intérêt a été mesurée à l'aide du programme ParaVision 2.01. Le rehaussement du signal de RMN est ensuite calculé par la formule suivante :

$$\text{Rehaussement du signal} = \frac{\frac{S_{ROI} \text{ postC}}{S_{Ref}} - \frac{S_{ROI} \text{ preC}}{S_{Ref}}}{\frac{S_{ROI} \text{ preC}}{S_{Ref}}} \quad (11.1)$$

où S_{ROI} est la moyenne de l'intensité de signal RMN des pixels dans la région d'intérêt (ROI) et S_{Ref} est la moyenne de l'intensité de signal RMN des pixels dans la référence preC (pré contraste) ou postC (post contraste).

11.5.1.2 Tests des agents de contraste négatifs à base de particules pegylées

Après anesthésie au Nembutal®), l'animal est placé dans le système d'imagerie. La séquence utilisée est une séquence écho de spin (TR/TE : 1200/10 msec, NA : 2, FOV : 5 cm, matrice : 256 x 256, épaisseur de coupe : 2 mm, nombre de coupes : 2, distance inter-coupe : 8 mm, nombre d'échos : 2).

Les agents de contraste ont été injectés à la dose de 30 μ mol de fer/Kg de poids corporel dans une des veines caudales. Une image pré-contraste et plusieurs images post-contraste (1, 15 et 30 minutes) ont été acquises.

L'intensité du signal dans les régions d'intérêt a été mesurée de la même manière que pour les agents de contraste gadoliniés.

11.5.2 Minéralisation et dosage ICP

Dans le but de réaliser une biodistribution, des souris saines et traitées, ayant été injectées par les différents agents de contraste testés, ont été sacrifiées après 10, 30 et 60 minutes postinjection. Le foie, les reins, la rate, les poumons et le coeur ont été prélevés, pesés et séchés à 70°C durant 24 heures. Après déshydratation, les organes sont à nouveau pesés et minéralisés. La minéralisation se fait en milieu acide au moyen d'un four à micro-onde MLS-1200. Un maximum de 0,4 g d'organe sec et un mélange de 2 ml d'HNO₃ et 1ml d'H₂O₂ sont introduits dans les bombes du four. La concentration en gadolinium a ensuite été déterminée par spectroscopie ICP (Inductively Coupled Plasma-atomic emission spectroscopy, Jobin Yvon JY70+, Longjumeau, France).

Chapitre 12

Résultats

12.1 Caractérisation physico-chimique du peptide E3 et de ses produits dérivés

Le peptide E3 de structure Thr-Leu-Val-Ser-Ser-Leu (figure 12.3 A) identifié lors de la première partie de ce travail a été synthétisé puis caractérisé par spectrométrie de masse (figures 12.1 et 12.2). Un dérivé de ce peptide a fait l'objet d'une nouvelle synthèse ; il s'agit du même peptide auquel deux résidus glycines sont ajoutés du coté N terminal (figure 12.3 B) en vue de constituer un espaceur lors du greffage sur les particules superparamagnétiques et sur le chélate de gadolinium (Gd-DTPA) (figure 12.4 D). Pour les besoins de cette étude, le peptide E3 a été biotinylé (figure 12.3 C) et couplé au FITC (figure 12.4 A). Deux peptides "contrôles" ont également été synthétisés et caractérisés. Il s'agit du peptide E3 dont la séquence a fortement été perturbée (Ser-Val-Ser-Leu-Leu-Thr) (figure 12.4 B) et de l'hexaglycine (6xG) (figure 12.4 C). Ces six nouveaux produits ont également fait l'objet d'une caractérisation par spectrométrie de masse (tableau 12.1).

		$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	
	Peptide E3	619	641	
	Peptide GG-E3	733	755	
	Peptide E3 biotinylé	845	867	
	Peptide E3 marqué au FITC	1008	1030	
	Peptide 6xG biotinylé	587	-	
	Peptide E3 perturbé	619	641	

TAB. 12.1 – Masses obtenues par spectrométrie de masse

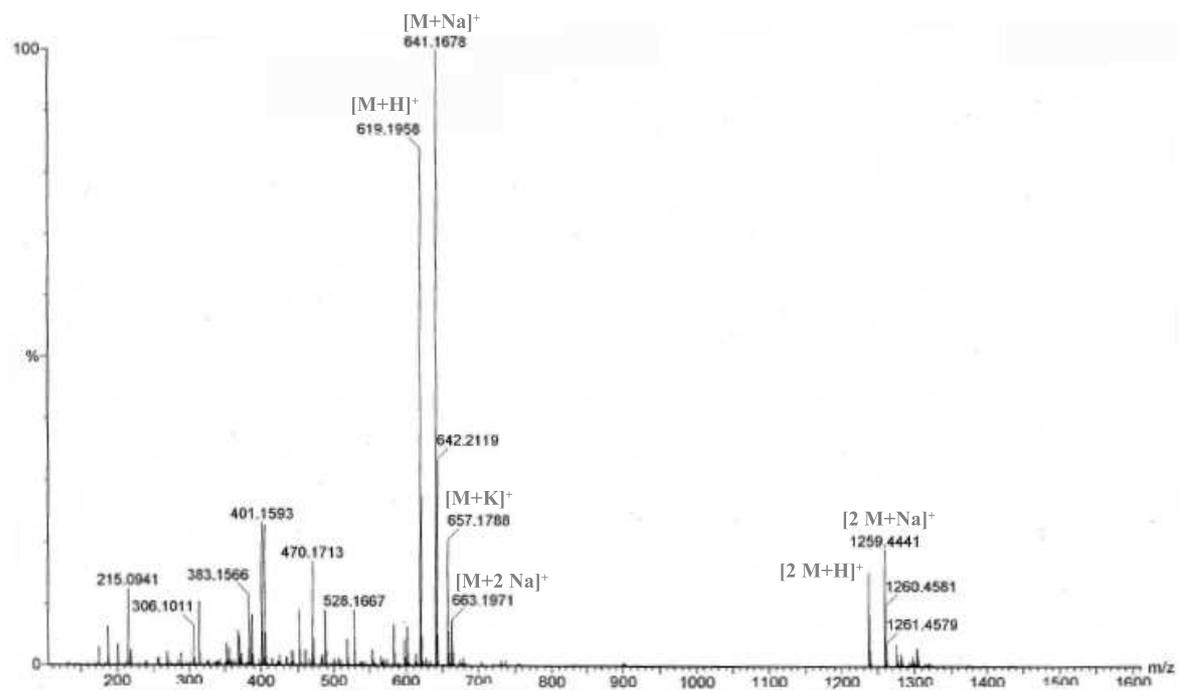


FIG. 12.1 – Spectre de masse MS ES du peptide E3.

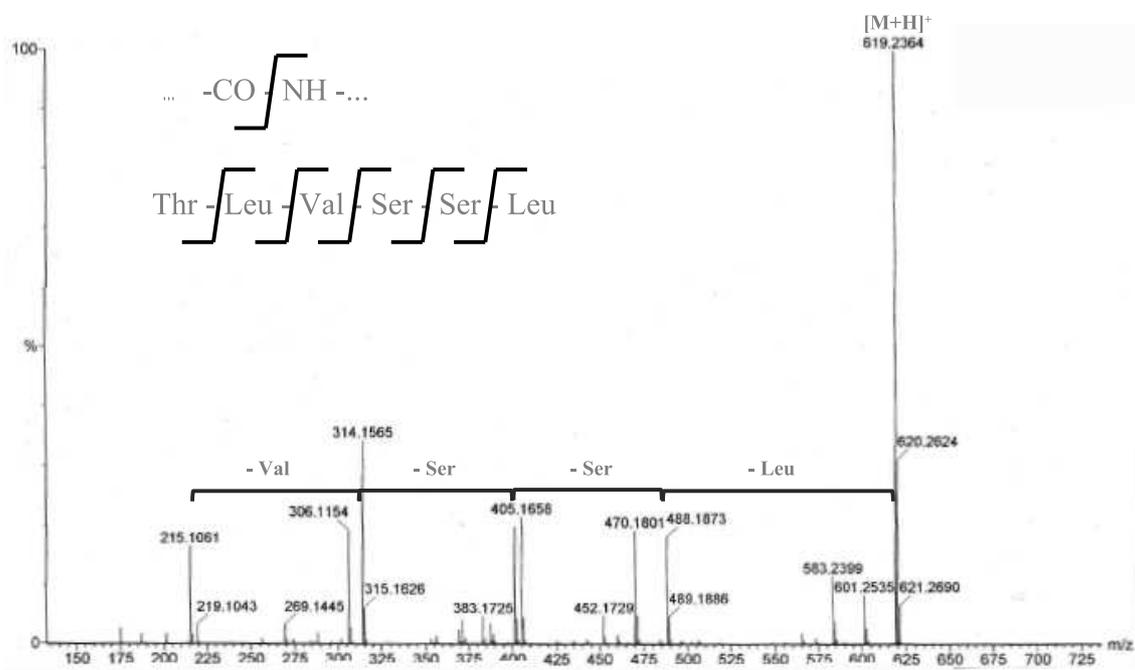
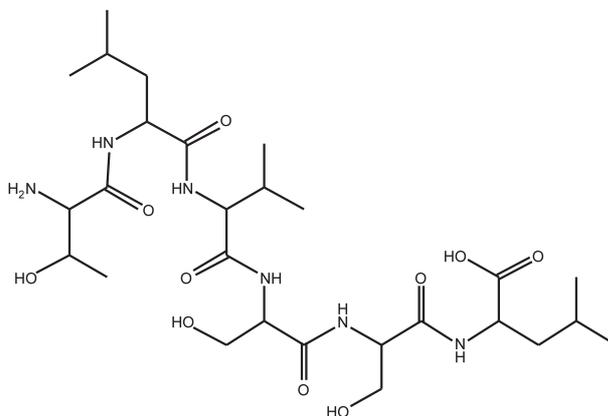
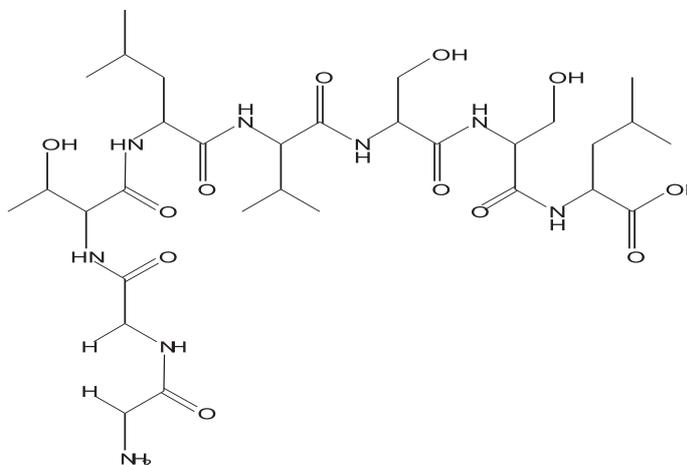


FIG. 12.2 – Spectre de masse MS MS ES du peptide E3.

A.



B.



C.

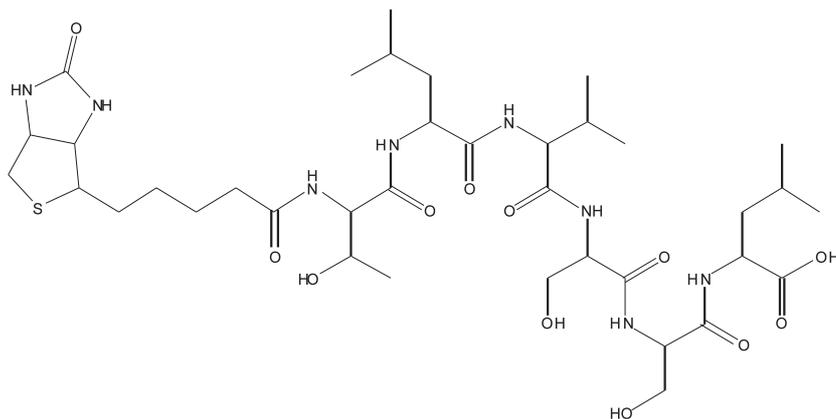
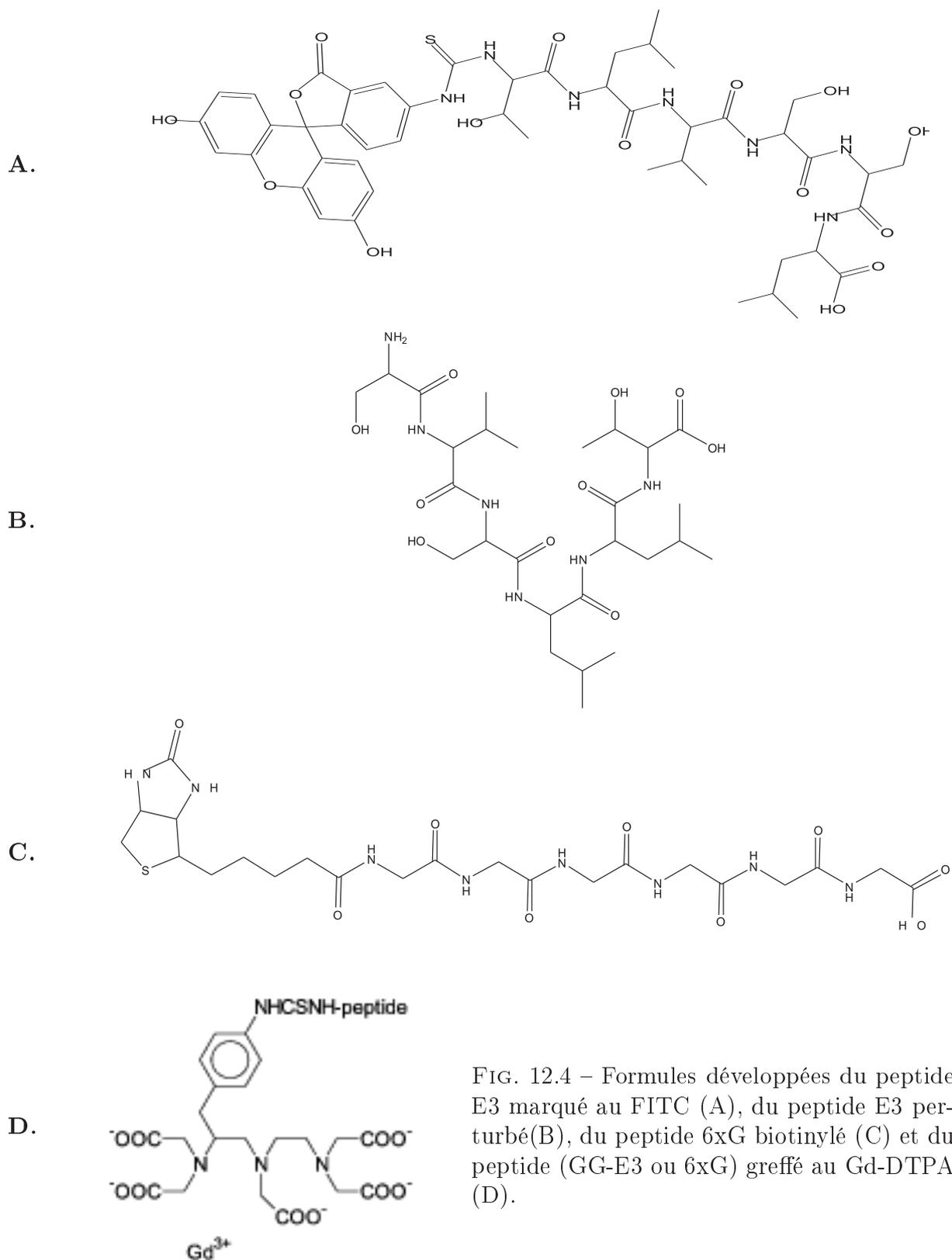


FIG. 12.3 – Formules développées du peptide E3 (A), du peptide GG-E3 (B) et du peptide E3 biotinylé (C).



12.1.1 Caractérisation des particules superparamagnétiques vectorisées

La taille hydrodynamique des particules non greffées, des particules vectorisées avec le peptide E3 et GG-E3 ainsi que des particules pegylées vectorisées avec le peptide GG-E3 et 6xG a été déterminée par PCS.

Les résultats repris dans le tableau 12.2 montrent que la taille augmente légèrement suite au greffage des peptides. Cette augmentation pourrait être attribuée à deux phénomènes. Le premier est l'agglomération des particules. Lors de l'élaboration des particules vectorisées des dialyses sont pratiquées, ce qui pourrait entraîner une diminution du recouvrement des particules par le dextran qui n'y est pas lié de manière covalente, et produire une agglomération. L'observation du rapport $r2/r1$ permet d'appréhender l'état d'agglomération des particules, car le $r2$ est dominé par l'influence des agglomérations cristallines, alors que le $r1$ n'est soumis qu'à l'influence du cristal. Ainsi, s'il y a agglomération le $r2$ augmente tandis que le $r1$ reste inchangé. Dans notre cas, la mesure du rapport $r2/r1$ évolue peu ce qui indique l'absence d'agglomération (tableaux 12.3 et 12.4). La première hypothèse étant écartée, on pourrait attribuer l'augmentation de la taille hydrodynamique à la présence du peptide en surface de la particule (figure 12.5). De plus, on peut remarquer que l'augmentation de la taille hydrodynamique est plus élevée de 40% dans le cas du peptide GG-E3 qui est plus long que le peptide E3 à raison de 33%. Les particules recouvertes de PEG présentent toutes deux un diamètre largement plus important que les particules non pegylées. Etant donné que le rapport $r2/r1$ évolue peu (tableaux 12.3 et 12.4) et que la présence de PEG en surface des particules ne peut suffire à expliquer une telle augmentation de taille, on est en droit de supposer que la modification de surface influence le comportement des particules lors de la mesure PCS. Cette anomalie de taille reste encore à investiguer.

	Tailles hydrodynamiques mesurées par PCS
USPIO	24 nm
E3-USPIO	29 nm
GG-E3-USPIO	31 nm
GG-E3-USPIO-PEG	138 nm
6xG-USPIO-PEG	126 nm

TAB. 12.2 – Tailles hydrodynamiques mesurées par PCS des particules non greffées et vectorisées avec le peptide E3, GG-E3 et 6xG.

	r1 (20 MHz)	r2 (20 MHz)	r2/r1 (20 MHz)
USPIO	24,4 mM s ⁻¹	55,0 mM s ⁻¹	2,3
E3-USPIO	33,9 mM s ⁻¹	115,8 mM s ⁻¹	3,4
GG-E3-USPIO	23,7 mM s ⁻¹	69,0 mM s ⁻¹	2,9
GG-E3-USPIO-PEG	17,8 mM s ⁻¹	52,6 mM s ⁻¹	2,9
6xG-USPIO-PEG	17,5 mM s ⁻¹	53,8 mM s ⁻¹	3,1

TAB. 12.3 – Relaxivité r1 et r2 mesurée à 20 MHz des particules non greffées et vectorisées avec le peptide E3, GG-E3 et 6xG pegylées ou non.

	r1 (60 MHz)	r2 (60 MHz)	r2/r1 (60 MHz)
USPIO	11,3 mM s ⁻¹	63,0 mM s ⁻¹	5,6
E3-USPIO	13,7 mM s ⁻¹	114,8 mM s ⁻¹	8,4
GG-E3-USPIO	9,8 mM s ⁻¹	69,4 mM s ⁻¹	7,1
GG-E3-USPIO-PEG	6,8 mM s ⁻¹	53,6 mM s ⁻¹	7,9
6xG-USPIO-PEG	6,5 mM s ⁻¹	54,6 mM s ⁻¹	8,4

TAB. 12.4 – Relaxivité r1 et r2 mesurée à 60 MHz des particules non greffées et vectorisées avec le peptide E3, GG-E3 et 6xG pegylées ou non.

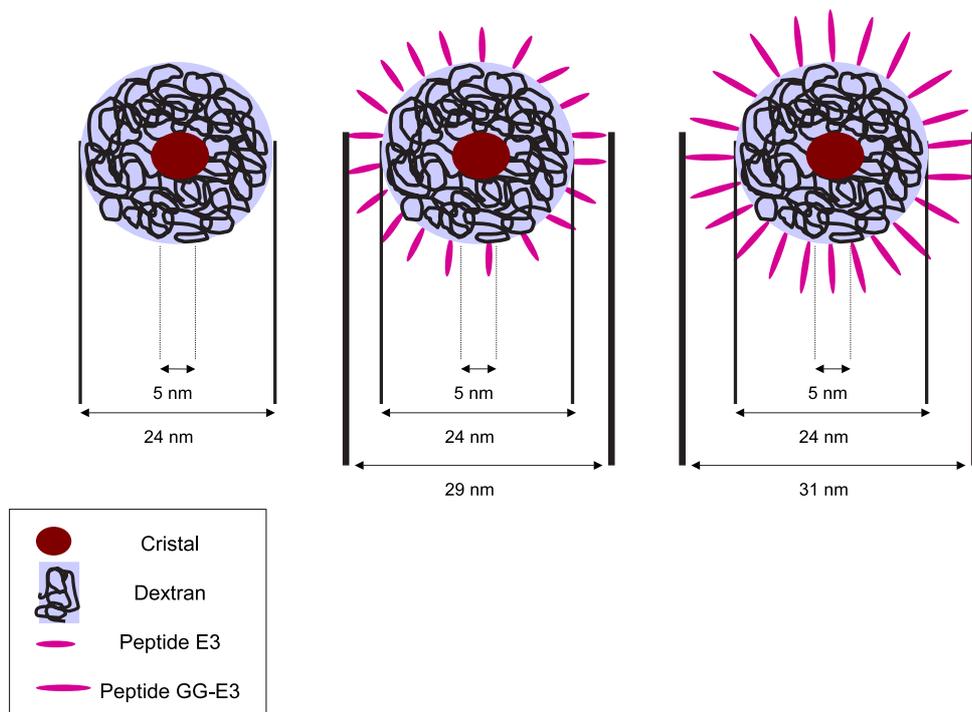


FIG. 12.5 – De gauche à droite, représentation d'une particule non greffée, greffée avec le peptide E3 et GG-E3.

Les profils NMRD apportent la preuve que le greffage de petits peptides tels que E3 et GG-E3 sur le manteau de dextran (figures 12.7 A et B) conserve le caractère superpara-ramagnétique des particules. Il en va de même pour le greffage du peptide GG-E3 et du 6xG sur les polymères de PEG ou du greffage de PEG lui-même sur le dextran (figures 12.7 C et D). Seule l'amplitude des courbes des quatres types de particules diffère quelque peu de celle des particules nues (figure 12.6). Toutefois, ces différences sont infimes à 60 MHz, c'est-à-dire à la fréquence correspondant au champ usuel de l'imagerie clinique.

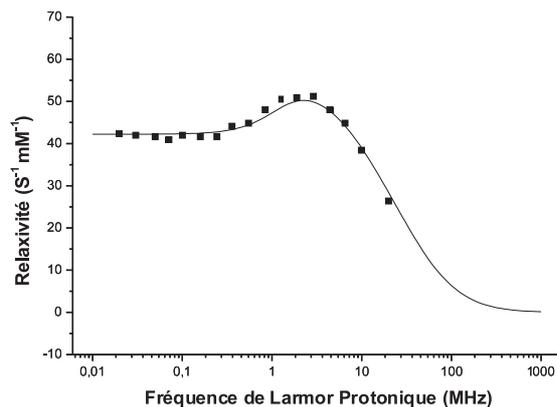


FIG. 12.6 – Profil NMRD de particules nues non vectorisées.

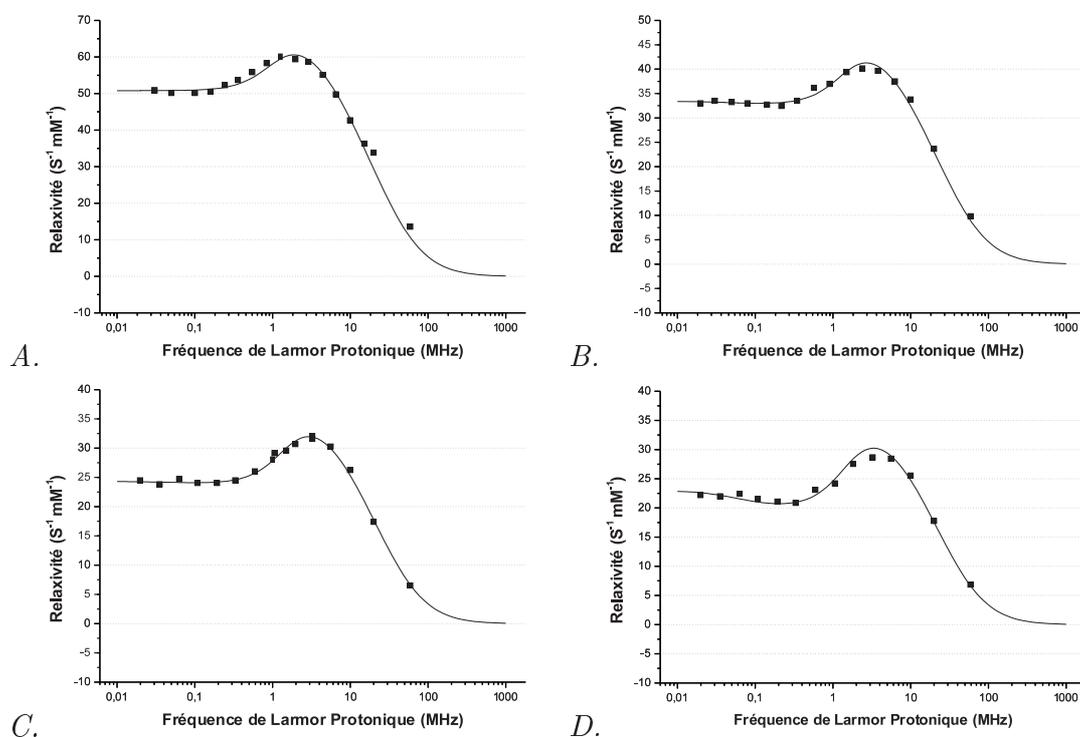


FIG. 12.7 – Profils NMRD du E3-USPIO (A.), du GG-E3-USPIO (B.), du 6xG-USPIO-PEG (C.) et du GG-E3-USPIO-PEG (D.).

12.1.2 Caractérisation des chélates de gadolinium vectorisés

Les profils NMRD des deux dérivés du Gd-DTPA sont caractéristiques des complexes du gadolinium de taille légèrement supérieure à celle du complexe parent (figure 12.8) [160].

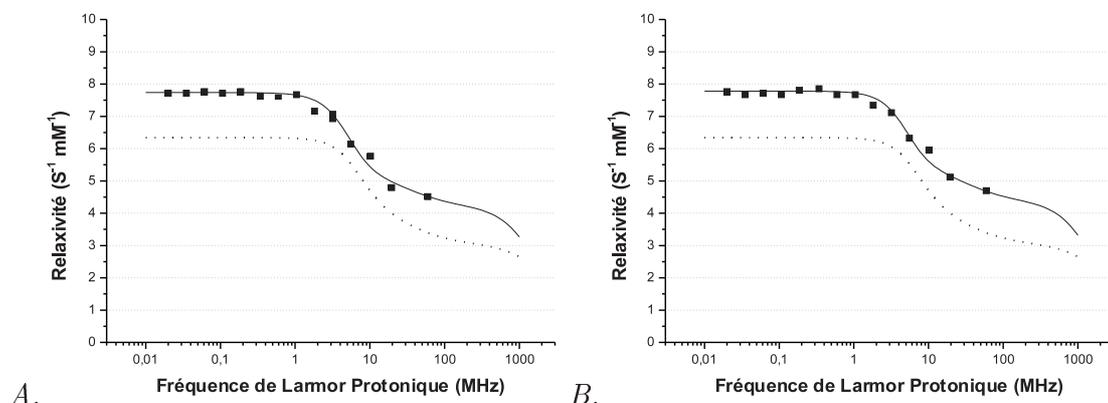


FIG. 12.8 – Profils NMRD du 6xG-Gd-DTPA (A.) et du GG-E3-Gd-DTPA (B.) Le profil NMRD du Gd-DTPA est représenté en pointillé.

	r1 (20 MHz)	r1 (60 MHz)
Gd-DTPA	3,8 mM s ⁻¹	3,3 mM s ⁻¹
GG-E3-Gd-DTPA	5,1 mM s ⁻¹	4,7 mM s ⁻¹
6xG-Gd-DTPA	4,8 mM s ⁻¹	4,5 mM s ⁻¹

TAB. 12.5 – Relaxivité r1 mesurée à 20 et 60 MHz du Gd-DTPA non greffés et vectorisés avec le GG-E3 et 6xG.

La stabilité des dérivés du Gd-DTPA a été évaluée par la mesure de leur stabilité vis-à-vis de la transmétallation avec le zinc. Le zinc a été choisi en tant que compétiteur, car il présente un rayon atomique, bien que légèrement plus petit, similaire à celui du gadolinium. De plus, la constante d'affinité du zinc est très proche de celle du gadolinium pour les mêmes ligands comme par exemple le DTPA ou le DOTA. Une autre raison de l'utilisation du zinc dans le test de transmétallation est sa concentration suffisante dans les fluides biologiques pour présenter un risque de transmétallation [161].

Ce test est important car l'ion gadolinium libre (non chélaté) est fortement toxique, il a tendance à remplacer les ions calcium dans les systèmes biologiques, sans en assurer la fonction. Il peut donc provoquer des troubles au niveau des os, du système nerveux ou cardiaque. De plus, le zinc complexé est éliminé par voie rénale. Des risques d'appauvrissement en zinc endogène ont été évoqués dans cette situation.

Les résultats obtenus (figure 12.9) montrent que les produits 6xG-Gd-DTPA et GG-E3-Gd-DTPA présentent une stabilité plus élevée que le Gd-DTPA [162]. En effet, pour ce dernier, après 3 jours, 50% du complexe est dissocié, ce qui est supérieur aux valeurs obtenues pour les chélates greffés. Cela confirme une étude réalisée au préalable, dans laquelle le Gd-DTPA substitué en C4 par un groupement benzyle voyait sa stabilité améliorée par rapport à celle du Gd-DTPA [161].

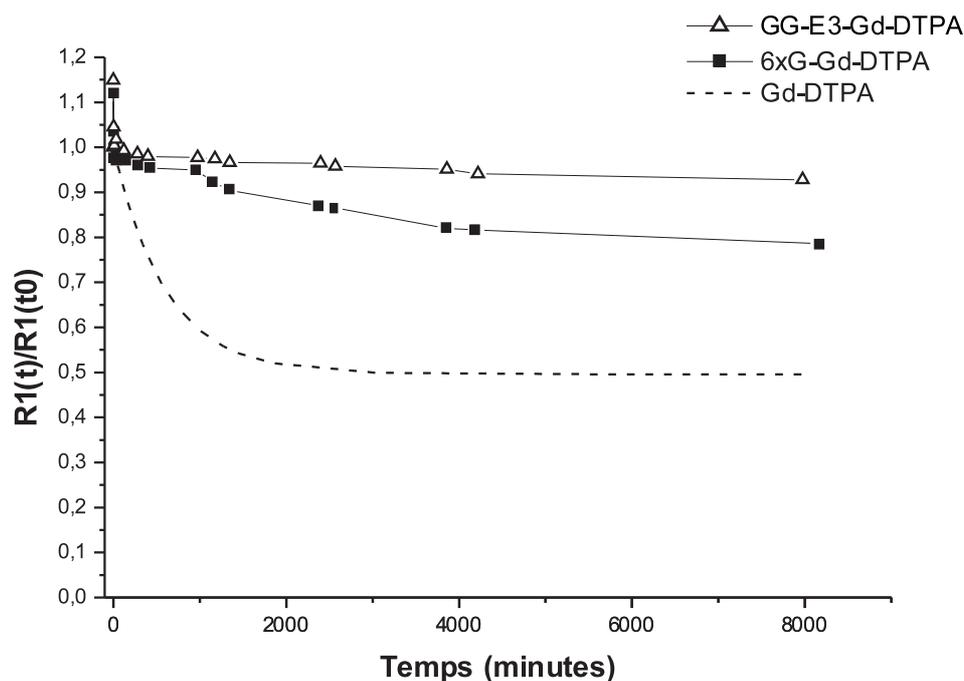


FIG. 12.9 – Transmétallation avec le zinc du Gd-DTPA vectorisé avec le 6xG et le GG-E3

12.2 Evaluation *in vitro* de l'affinité du peptide E3, de ses produits dérivés et des peptides contrôles

12.2.1 Evaluation de l'affinité des peptides biotinylés pour la phosphatidylsérine

Le peptide E3 biotinylé a été utilisé pour réaliser une courbe de fixation sur la PS et la PC (figure 12.10). Ces résultats montrent tout d'abord que son comportement vis-à-vis des deux phospholipides est radicalement différent. La constante de dissociation obtenue à partir de la courbe de fixation sur la PS est de $(3,34 \pm 0,84) \cdot 10^{-7}$ M. Cette valeur est près

de $1,8 \times 10^5$ fois plus élevée que la valeur obtenue lors de la même expérience réalisée avec le phage E3. Cette différence d'affinité peut s'expliquer par le fait que 5 copies du peptide sont présentes sur le phage et qu'elles peuvent coopérer pour la fixation à la cible. On peut ici aussi tenir le même raisonnement qu'au point 6.8. L'affinité peut être augmentée par la multiplicité des sites de liaison sur le phage et/ou par l'augmentation locale de la concentration peptidique aux abords de la cible. Il n'est pas non plus exclu que la fixation de la biotine sur le peptide E3 en diminue l'affinité pour la PS.

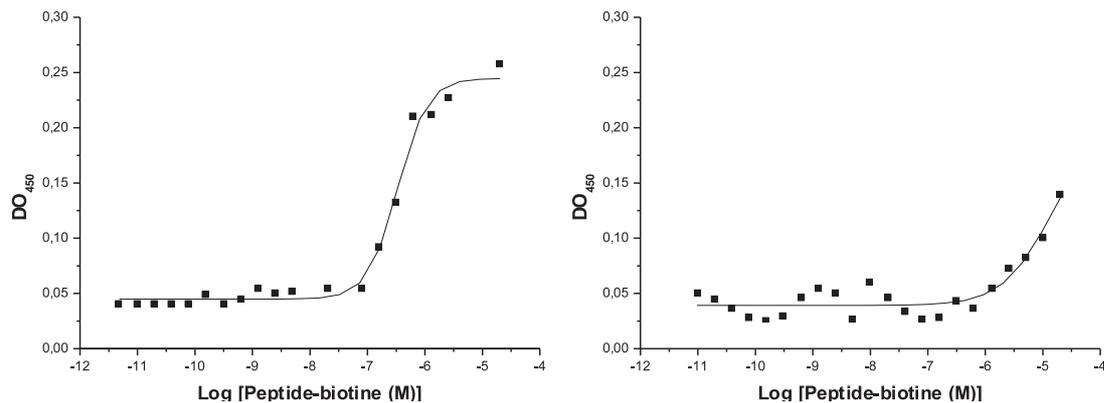


FIG. 12.10 – Courbes de fixation du peptide E3 biotinylé sur la PS (gauche) et sur la PC (droite).

Le peptide 6xG biotinylé a lui aussi fait l'objet des mêmes tests. Les résultats repris dans la figure 12.11 montrent que ce peptide est à la fois dépourvu d'affinité pour la PS et pour la PC. Ce peptide peut donc être considéré comme peptide "contrôle".

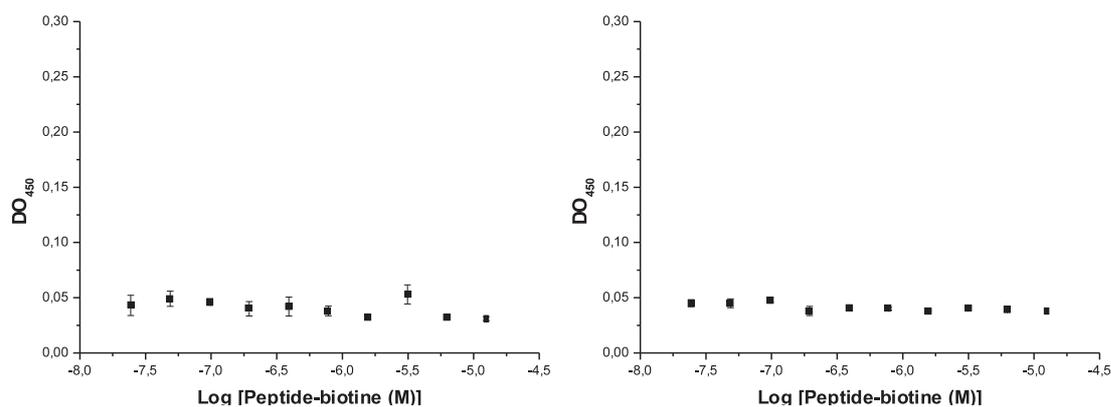


FIG. 12.11 – Courbes de fixation du peptide 6xG biotinylé sur la PS (gauche) et sur la PC (droite).

12.2.2 Comparaison de l'affinité du peptide E3 à celle du phage E3 pour la phosphatidylsérine

L'affinité du phage E3 a été comparée à celle du peptide E3 par expérience de compétition (figure 12.12), de la même manière que l'affinité du phage E3 a été comparée à celle de l'annexine V dans la première partie de ce travail. A partir de l' IC_{50} obtenue par l'expérience de compétition entre le phage E3 et le peptide E3 ($IC_{50} = (2,18 \pm 0,92) \cdot 10^{-7} M$), on peut en déduire que 35390 fois plus de peptides que de phages sont nécessaires pour déplacer 50% des phages. Les résultats obtenus pour la compétition entre le phage E3 et l'annexine V montrent que seulement 513 fois plus de molécule d'annexine V que de phages E3 sont nécessaires pour déplacer 50% des phages E3. Il faudrait donc une concentration 69 fois plus élevée en peptides E3 qu'en annexine V pour produire le même déplacement de phage E3.

Si l'on admet que la constante de dissociation du peptide E3 est 69 fois plus grande que celle de l'annexine V et que celle-ci a une affinité pour la PS caractérisée par une constante de dissociation de $6 \times 10^{-9} M$, on peut alors en déduire que la constante de dissociation du peptide est de l'ordre de $4 \times 10^{-7} M$. Etant donné que l'affinité du peptide biotinylé pour PS est du même ordre de grandeur, on peut en déduire que la biotinylation du peptide E3 n'est pas responsable de la diminution de son affinité pour la PS. De plus, la perte en affinité lors du passage du phage au peptide étant largement supérieure à un facteur 5 correspondant au nombre de copies du peptide sur le phage, il est clair que l'affinité élevée du phage E3 pour la PS est due à un phénomène de synergie des 5, ou du moins de plusieurs copies du peptide.

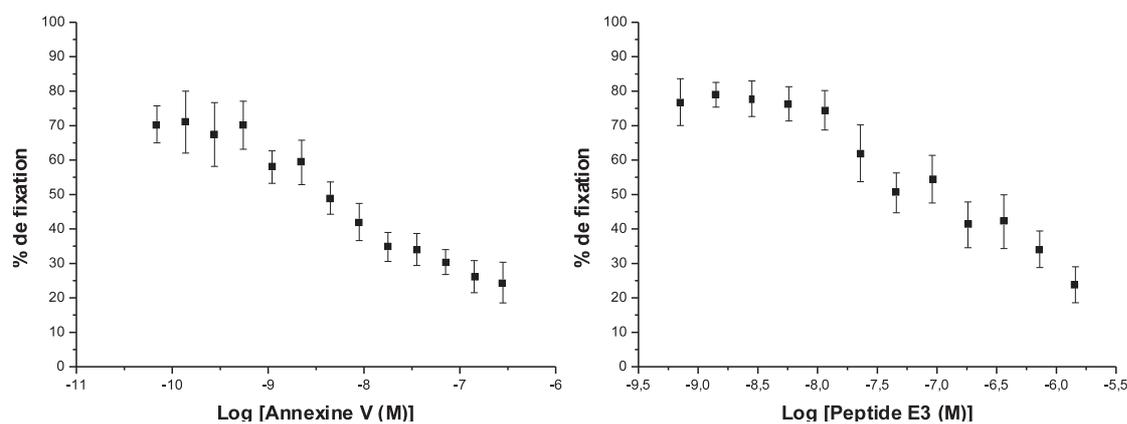


FIG. 12.12 – Courbes de compétition entre le phage E3 et l'annexine V (à gauche, ($n=4$)) et entre le phage E3 et le peptide E3 (à droite ($n=10$)). [*phages E3*] $=6,11 \cdot 10^{-12} M$

12.2.3 Comparaison de l'affinité pour la phosphatidylsérine du peptide E3 avec celle de ses dérivés

La figure 12.13 montre que l'addition de deux résidus glycine en position N-terminale n'affecte pas le comportement du peptide E3 dans le contexte d'une expérience de compétition avec l'annexine V biotinylée. Il semble donc que l'extrémité N-terminale n'intervienne pas, ou très peu dans la reconnaissance de la PS. Les contrastophores ou molécules rapporteuses (USPIO, Gd-DTPA, FITC et biotine) peuvent donc être liés au peptide par son extrémité N-terminale.

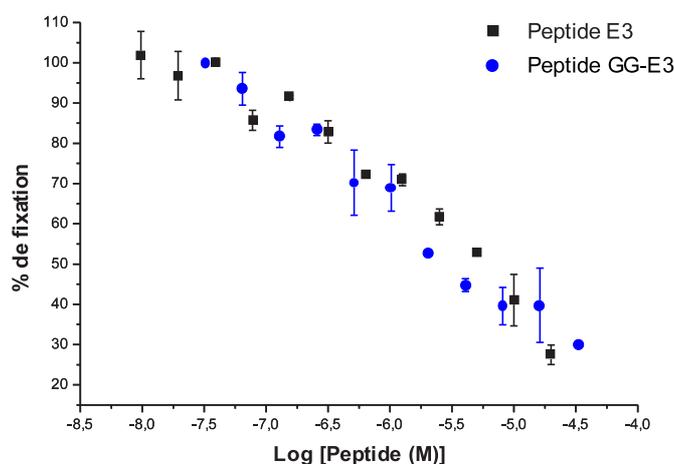


FIG. 12.13 – Courbes de compétition entre le peptide E3 et l'annexine V biotinylée (en noir $n=2$) et entre le peptide GG-E3 et l'annexine V biotinylée (en bleu $n=2$) pour la fixation sur la phosphatidylsérine.

Si on compare le comportement de GG-E3-USPIO et de E3-USPIO (figure 12.14), on remarque qu'il y a un léger avantage pour le produit GG-E3-USPIO. Si le nombre de peptides greffés par particule est identique, on peut conclure que la présence d'un espaceur entre le peptide E3 et le contrastophore semble améliorer la conservation de l'affinité du peptide pour la PS.

Il ne nous a pas été possible de comparer les peptides avec leurs homologues USPIO car nous n'avons pu déterminer le nombre de peptides liés par particule. Il nous est par contre permis de comparer le peptide GG-E3 avec son dérivé gadoliné (GG-E3-Gd-DTPA) étant donné qu'un seul peptide peut se fixer par DTPA. On peut voir sur la figure 12.15 que la courbe correspondant au dérivé gadoliné est déplacée vers la droite par rapport à celle du peptide GG-E3 et donc que son affinité pour la PS est diminuée par rapport à celle du peptide non greffé. Il y a donc ici une diminution de l'affinité malgré la présence de l'espaceur entre le contrastophore et le peptide.

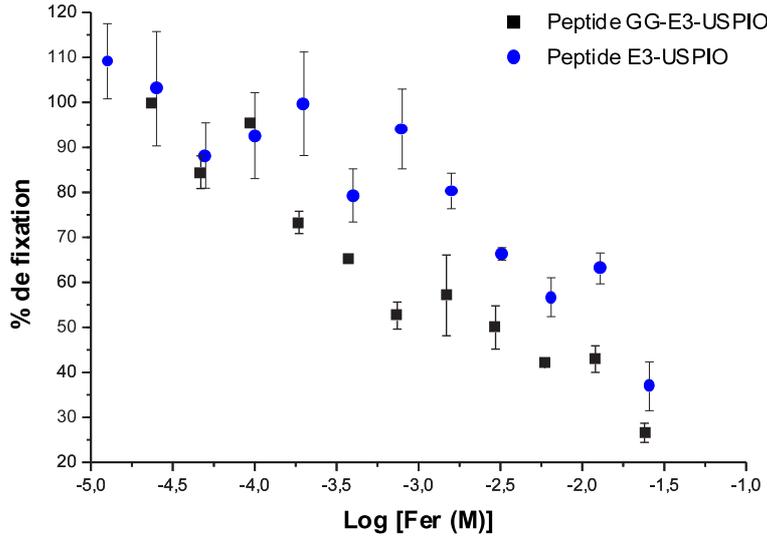


FIG. 12.14 – Courbes de compétition entre E3-USPIO et l’annexine V biotinylée (en bleu $n=2$) et entre le GG-E3-USPIO et l’annexine V biotinylée (en noir $n=2$) pour la fixation sur la phosphatidylsérine. À défaut de pouvoir exprimer la concentration des particules elles-mêmes, la concentration globale en fer des suspensions colloïdales (Fe_3O_4) a été utilisée.

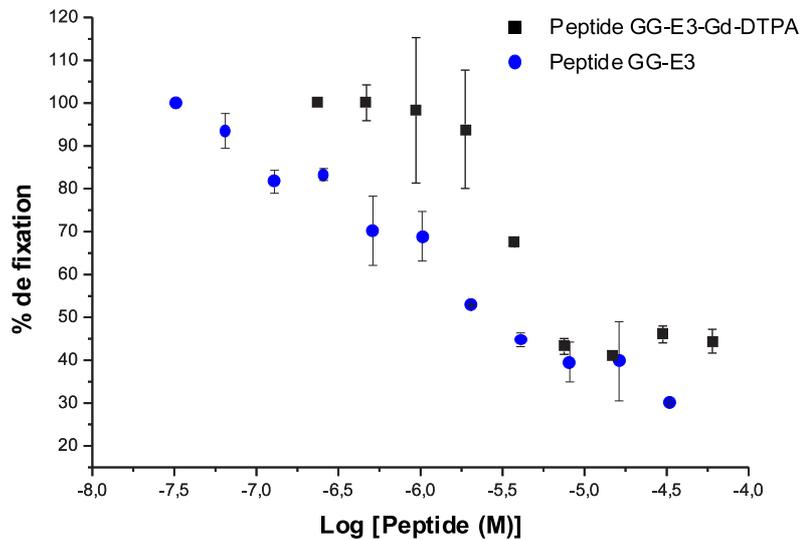


FIG. 12.15 – Courbes de compétition entre le peptide GG-E3 et l’annexine V biotinylée (en bleu $n=2$) et entre le GG-E3-Gd-DTPA et l’annexine V biotinylée (en noir $n=2$) pour la fixation sur la phosphatidylsérine.

12.2.4 Comparaison de l'affinité pour la phosphatidylsérine du peptide E3 avec celle des peptides contrôles

Deux peptides "contrôles" ont été testés : l'hexaglycine (6xG) et le peptide E3 perturbé. On peut voir sur la figure 12.16 que le comportement de ces deux peptides est différent de celui du peptide E3 vis-à-vis de la compétition avec l'annexine V biotinylée. Ces résultats indiquent que leur affinité pour la PS est plus faible que celle du peptide E3. C'est le peptide 6xG qui présente le comportement le plus éloigné de celui du peptide E3. Le peptide E3 perturbé se positionne à un niveau intermédiaire. Cela n'est pas étonnant, étant donné qu'il est composé des mêmes acides aminés que le peptide E3. On peut toutefois observer que l'ordre des acides aminés revêt une grande importance dans la reconnaissance de la cible étudiée, la phosphatidylsérine.

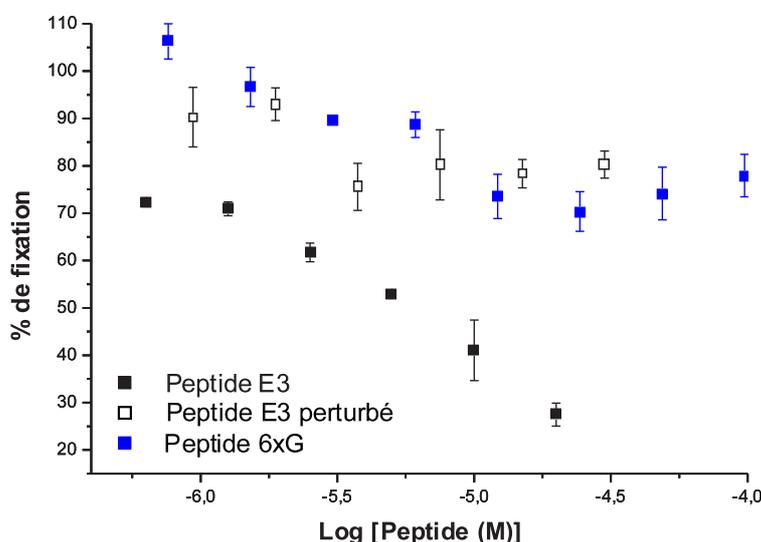


FIG. 12.16 – Courbes de compétition entre le peptide E3 et l'annexine V biotinylée (en noir $n=2$), entre le peptide 6xG et l'annexine V biotinylée (en bleu $n=2$), et entre le peptide E3 perturbé et l'annexine V biotinylée (en noir et blanc $n=2$) pour la fixation sur la phosphatidylsérine.

12.3 Evaluation de la détectabilité de l'apoptose par le peptide E3 sur culture cellulaire

12.3.1 Validation du modèle par microscopie confocale

La validité du modèle d'induction d'apoptose chez les cellules JURKAT a été démontrée par microscopie confocale, suite à un double marquage au PI et 6-CFDA. Les résultats repris dans la figure 12.17 montrent clairement que la camptothécine induit l'apoptose chez les cellules de type JURKAT. Après 24 heures d'incubation, 75% des cellules sont apoptotiques.

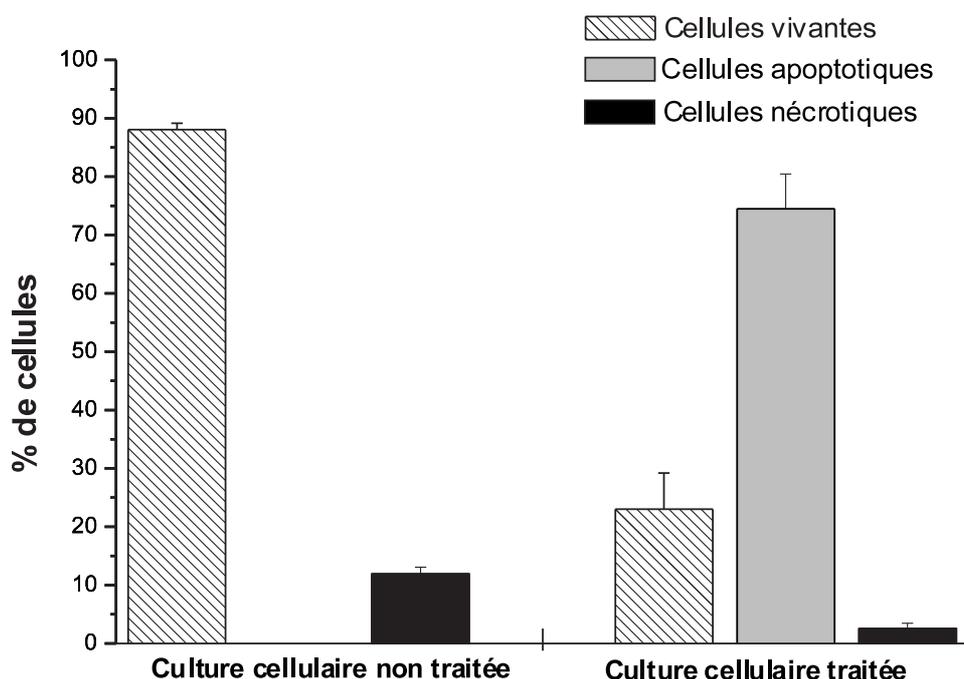


FIG. 12.17 – Pourcentage de cellules vivantes, apoptotiques ou nécrotiques trouvées dans des cultures de JURKAT incubées (ou non) 24 heures avec $1 \mu\text{M}$ de camptothécine. ($n=6$)

La validité du modèle d'induction d'apoptose chez les cellules Hep G2 par incubation avec la camptothécine a été démontrée précédemment au point 6.1.2.

12.3.2 Validation du modèle par RMN du proton

Il est possible de distinguer les cellules non traitées des cellules traitées à la camptothécine sur base de leur spectre protonique. En effet, le spectre des cellules traitées montre une augmentation du pic correspondant au $-(\text{CH}_2)_n-$ (1,2 ppm) (figure 12.18). Ces résultats sont comparables avec les résultats obtenus avec d'autres inducteurs de l'apoptose [80]. Cepen-

nant, on n'observe pas la disparition progressive du pic correspondant au $-N^+(\text{CH}_3)_3$ (3,10 ppm) comme c'est le cas pour les spectres de suspension cellulaire incubées avec d'autres inducteurs et obtenus à un champ différent. Le pic situé entre 2,3 et 2,8 ppm correspond au DMSO (diméthyl sulfoxyde) dans lequel la camptothécine est solubilisée.

Il existe une relation linéaire entre l'augmentation du rapport RE $(\text{CH}_2)_n^- / -\text{CH}_3$ (calculé selon l'équation 10.2) avec l'augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques dans la suspension cellulaire testée par rapport aux suspensions "contrôles" de cellules non traitées $\Delta A\%$ (figure 12.19).

$$RE = \frac{RE_{Echantillon} - RE_{Contrôle}}{RE_{Contrôle}} \quad (12.1)$$

Cependant, dans le modèle utilisé lors de ce travail, cette relation linéaire n'est valable que jusqu'à une augmentation de 50% de cellules apoptotiques, valeur au-delà de laquelle le rapport semble chuter assez rapidement.

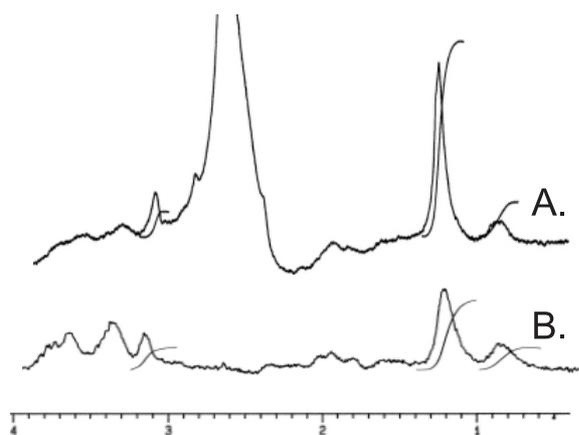


FIG. 12.18 – Exemples de spectres RMN du proton de cellules JURKAT incubées (A), ou non (B) 24 heures avec $1 \mu\text{M}$ de camptothécine.

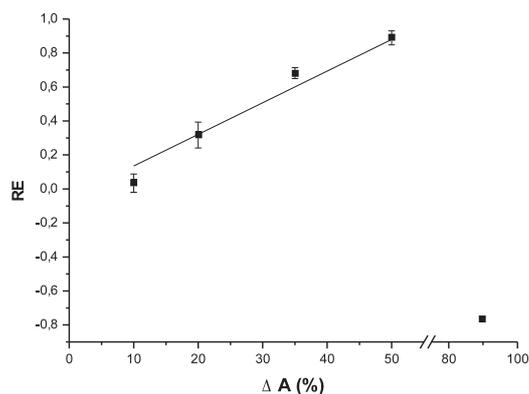


FIG. 12.19 – Evolution de l'augmentation du rapport d'intensité des pics $-(\text{CH}_2)_n^-$ (1,2 ppm) et $-\text{CH}_3$ (0,9 ppm) en fonction du pourcentage de cellules apoptotiques dans la suspension cellulaire.

12.3.3 Imagerie par microscopie confocale

Les cellules Hep G2 ont été doublement marquées par du PI et du E3-FITC. Le PI se concentre dans les noyaux des cellules apoptotiques en révélant leur chromatine en forme de croissant de lune caractéristique de l'apoptose. Le marquage au E3-FITC est plus diffus sur l'entièreté de la cellule apoptotique et est complètement absent des cellules non traitées (figure 12.20).

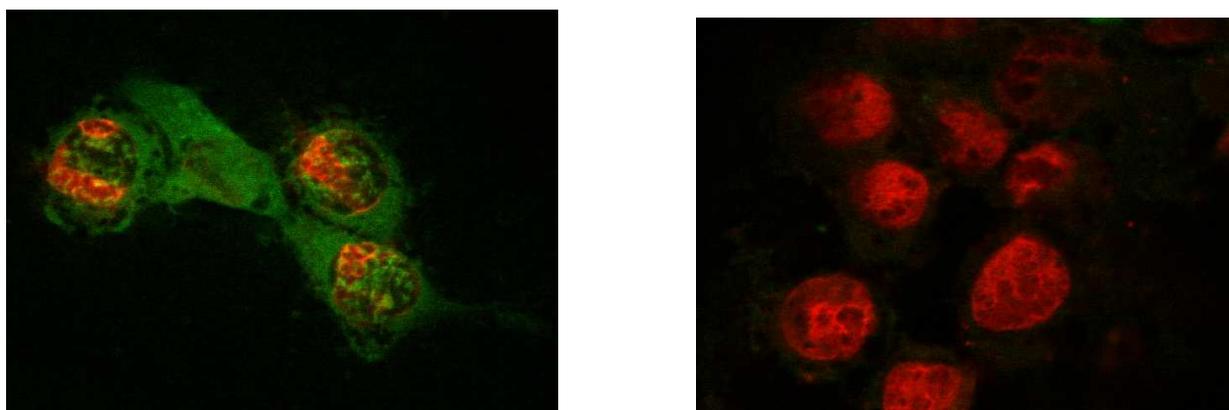


FIG. 12.20 – Microscopie confocale de cellules Hep G2 traitées (à gauche) ou non (à droite) avec $1 \mu\text{M}$ de camptothécine pendant 2 heures et doublement marquées au PI (rouge) et au E3-FITC (vert).

12.3.4 IRM et relaxométrie sur cellules Hep G2

L'IRM (figure 12.21) et les mesures de T2 à 200 MHz (tableau 12.6) réalisées sur culture de cellules Hep G2 marquées au E3-USPIO ne permettent pas de distinguer de façon significative les cultures traitées des cultures non traitées à la camptothécine. Une rapide étude en RMN du proton a montré que les Hep G2 ne survivaient pas aux traitements subis lors de la préparation des échantillons. Une autre lignée cellulaire a donc été utilisée par la suite, il s'agit des cellules JURKAT. Celles-ci poussant en suspension, elles subissent moins de perturbation lors de la préparation de l'échantillon.

Echantillon	T2 à 200 MHz (msec)
1. Cellules traitées	269,3 +/- 11,5
2. Cellules non traitées	284,2 +/- 12,2
3. Milieu de culture	389,5 +/- 16,9

TAB. 12.6 – T2 mesurés à 200 MHz. Toutes les cellules ont été incubées pendant 1 heure avec du E3-USPIO (2 mM en fer), le traitement à la camptothécine $1 \mu\text{M}$ a duré 2 heures.

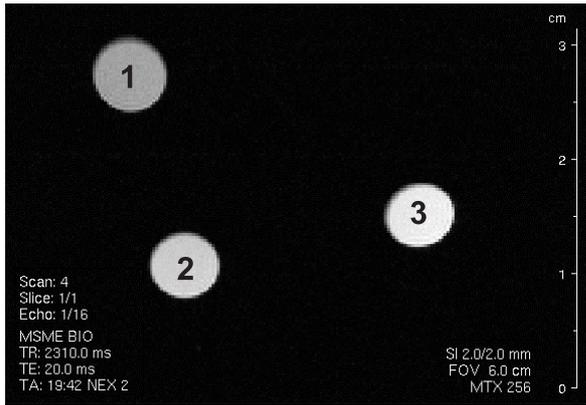


FIG. 12.21 – IRM de cellules Hep G2 traitées (1) ou non (2) avec $1 \mu\text{M}$ de camptothécine pendant 2 heures, toutes incubées pendant 1 heure avec du E3-USPIO (2 mM en fer). (3) Milieu de culture dépourvu de cellules.

12.3.5 IRM et relaxométrie sur cellules JURKAT

Des cellules JURKAT traitées et non traitées à la camptothécine ont été incubées avec différentes concentrations en E3-USPIO. Alors que l'effet sur le signal n'évolue pas pour les cellules non traitées, on peut observer un effet dépendant de la dose sur les cellules traitées (figures 12.22). Pour la suite des expériences, nous avons choisi de travailler à la concentration de 4 mM en fer.

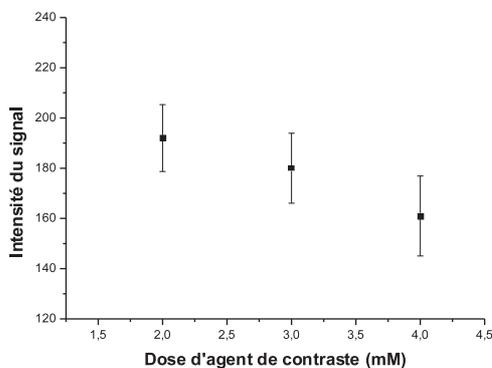


FIG. 12.22 – Evolution de l'intensité du signal au $13^{\text{ème}}$ écho en fonction de la dose d'agent de contraste E3-USPIO

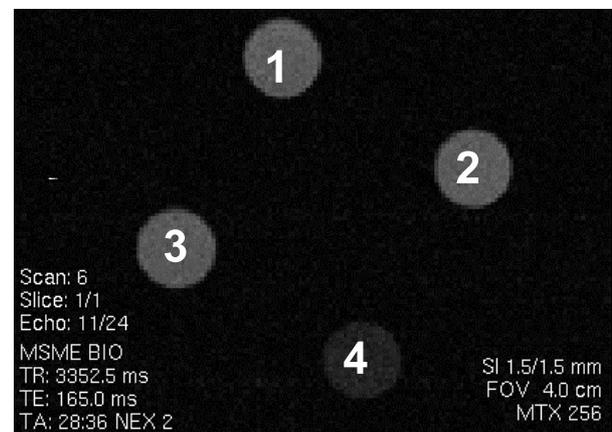


FIG. 12.23 – IRM de cellules JURKAT traitées (2 et 4) ou non (1 et 3) avec $1 \mu\text{M}$ de camptothécine pendant 24 heures, et incubées pendant 30 minutes avec du 4 mM en fer de E3-USPIO (3 et 4) ou avec du 4 mM en fer de USPIO (1 et 2).

La figure 12.23 montre que l'agent de contraste E3-USPIO permet de distinguer sans ambiguïté la culture traitée de la culture non traitée. Que ce soit à 60 MHz ou 200 MHz, les mesures de T2 corroborent ces résultats (figure 12.24). En effet, les T2 des cultures traitées à la camptothécine sont significativement inférieures à ceux des contrôles, ceux-ci étant les cultures traitées à la camptothécine incubées ou non avec les USPIO et les cultures non traitées incubées ou non avec des E3-USPIO et des USPIO.

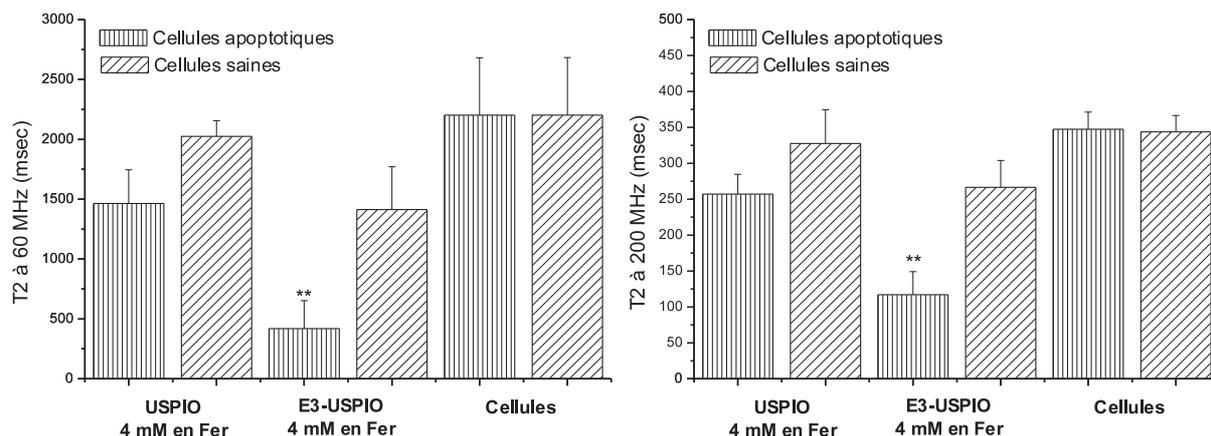


FIG. 12.24 – Temps de relaxation transversale (T2) mesurés à 60 MHz (à gauche) et à 200 MHz (à droite) d'échantillons de cellules saines et apoptotiques incubés avec un agent de contraste non spécifique (USPIO) et avec l'agent de contraste apopto-spécifique (E3-USPIO). ($n=3$), $** = p < 0,05$

Un simple calcul permet d'évaluer la quantité de fer nécessaire au niveau de chaque cellule pour obtenir un tel effet sur le T2. Celui-ci tient compte de la différence entre le R2 de l'échantillon ($3,04 \text{ s}^{-1}$) et celui de l'eau ($0,28 \text{ s}^{-1}$) et de la relaxivité de l'agent de contraste ($114,8 \text{ mM s}^{-1}$). La concentration molaire en fer ainsi obtenue ($0,0241 \text{ mM}$) est ensuite convertie en concentration en atomes de fer ($1,449 \cdot 10^{19}$ atomes/l). En connaissant la concentration cellulaire (10^{10} cellules/l), la quantité de fer par cellule est facilement déterminable et est dans notre cas de l'ordre de $1,5 \cdot 10^9$ atomes de fer par cellule.

$$\text{Concentration en fer (mM)} = \frac{R2 \text{ de la suspension cellulaire (s}^{-1}) - R2 \text{ de l'eau (s}^{-1})}{r2 \text{ du E3 - USPIO (s}^{-1} \text{ mM}^{-1})} \quad (12.2)$$

12.4 Evaluation de l'efficacité *in vivo* du peptide GG-E3 greffé sur des contrastophores IRM

Employer le E3-USPIO *in vivo* est difficile, car comme tous les USPIO il sera rapidement endocytés par les cellules de Kupffer du foie [163, 164]. Ceci provoquera un rehaussement de contraste non spécifique. Cela est principalement dû à l'enrobage de la particule, le dextran qui adsorbe des protéines plasmatiques, les opsonines, responsables de la reconnaissance de la particule par des récepteurs membranaires des cellules de Kupffer. L'endocytose est alors grandement facilitée.

Pour contourner ce problème, deux stratégies ont été suivies. La première est le remplacement du contrastophore USPIO par un agent de type positif, le Gd-DTPA. Si celui-ci n'est pas vectorisé, il ne sera pas retenu par le foie de manière non spécifique.

La seconde est de rendre furtifs les USPIO en les "pegylant", c'est-à-dire, en les couvrant de polyéthylèneglycol (PEG). Des particules "pégyllées" échapperont au système réticuloendothélial et leur temps de rémanence vasculaire en sera prolongé, permettant au ciblage spécifique de se développer. La fixation de PEG à la surface de particules, permettant une capture réduite par le système réticulo-endothéliale, a déjà été décrite et appliquée avec succès [165].

Dans les deux cas, le modèle choisi est celui d'induction de l'apoptose par injection intraveineuse d'anticorps anti-Fas. La validation de ce modèle a été réalisée lors de la première partie de ce travail (voir 6.1.3).

12.4.1 Evaluation de l'efficacité du peptide GG-E3 greffé sur un chélate de gadolinium

12.4.1.1 Imagerie par résonance magnétique

Le GG-E3-Gd-DTPA a été testé *in vivo* sur des souris saines et des souris traitées à l'anti-Fas. En guise de contrôle, deux autres agents de contraste gadoliniés ont également été testés sur ces deux mêmes groupes. Il s'agit du contrastophore dépourvu de vecteur, le Gd-DTPA et du même contrastophore vectorisé par un peptide sans affinité pour la phosphatidylsérine, le 6xG-Gd-DTPA. Au total 6 groupes de souris ont été suivis par IRM pendant 1 heure.

Pour faciliter la compréhension et l'interprétation des images de résonance magnétique, un exemple annoté est repris dans la figure 12.25.

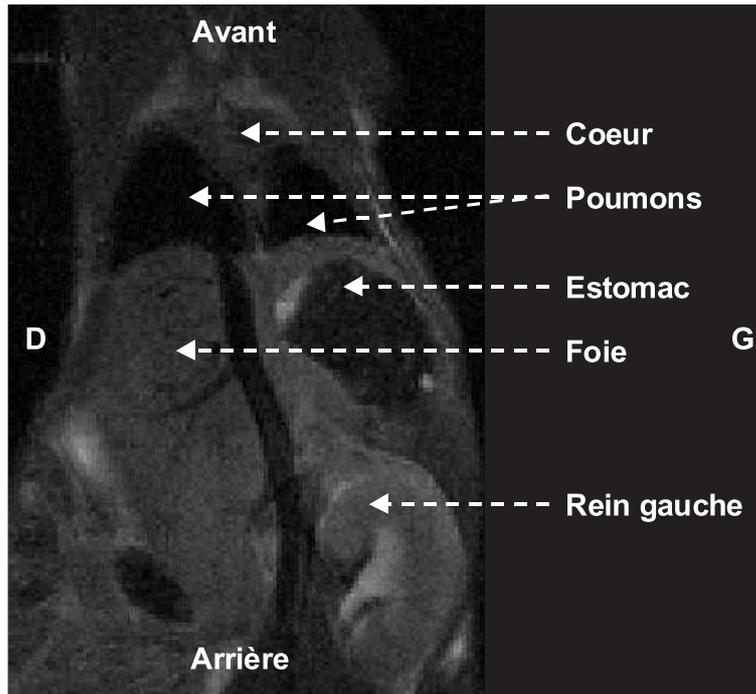


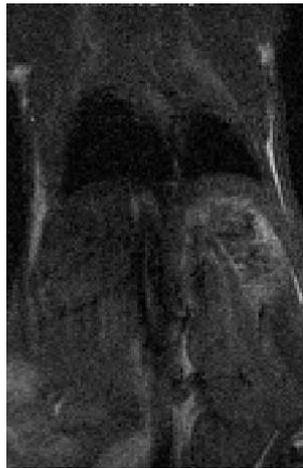
FIG. 12.25 – Localisation IRM des organes principaux de la souris visualisée en coupe sagittale.

La figure 12.26 représente des coupes sagittales réalisées dans une souris traitée à l'anti-Fas et injectée avec 0,1 mmole/Kg de poids corporel de GG-E3-Gd-DTPA. Outre le fait que l'intensité du signal dans les reins augmente en moins de 5 minutes, on peut voir une augmentation du signal au niveau de tissu hépatique. La figure 12.27 montre que l'administration de la même dose du même agent de contraste ne produit pas le même effet sur le foie de la souris saine alors que ses reins continuent à capter rapidement le contraste. On peut observer un comportement similaire au niveau des souris saines ou traitées à l'anti-Fas et injectées avec 0,1 mmole/Kg de poids corporel de 6xG-Gd-DTPA (figures 12.28 et 12.29) ou de Gd-DTPA. Dans ces 4 derniers groupes, aucun rehaussement du signal IRM ne se produit dans le parenchyme hépatique.

L'intensité du signal IRM a été mesurée au niveau des foies et des reins. L'évolution du rehaussement de l'intensité du signal RM a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Rehaussement du signal} = \frac{\frac{S_{ROI} \text{ postC}}{S_{Ref}} - \frac{S_{ROI} \text{ preC}}{S_{Ref}}}{\frac{S_{ROI} \text{ preC}}{S_{Ref}}} \quad (12.3)$$

où S_{ROI} est la moyenne de l'intensité de signal IRM des pixels dans la région d'intérêt (ROI) et S_{Ref} est la moyenne de l'intensité de signal IRM des pixels dans la référence preC (pré contraste) ou postC (post contraste).



Pré contraste



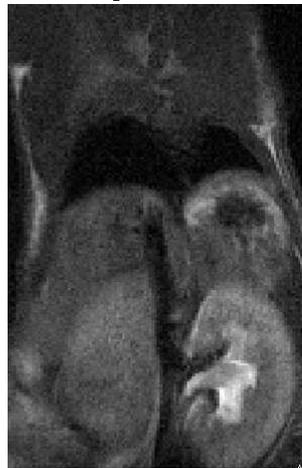
5 min. post contraste



10 min. post contraste



15 min. post contraste



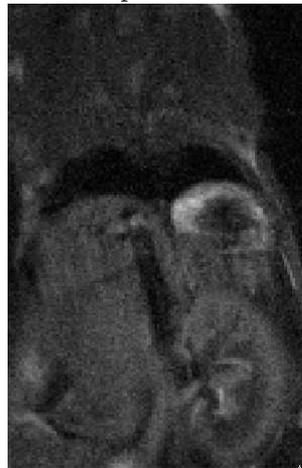
20 min. post contraste



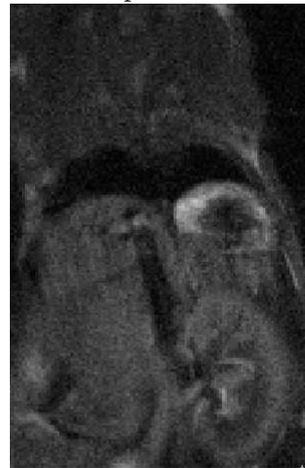
30 min. post contraste



40 min. post contraste



50 min. post contraste

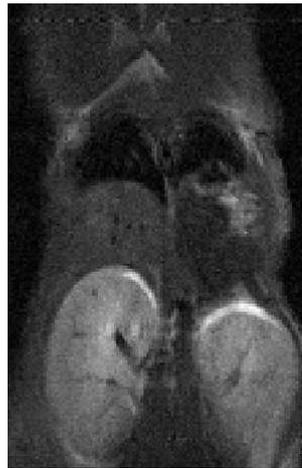


60 min. post contraste

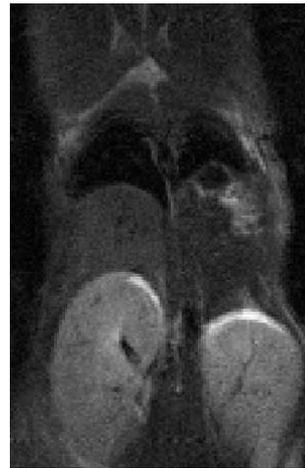
FIG. 12.26 – Images (4,7 T) en coupe sagittale d'une souris traitée à l'anti-Fas avant et à différents temps après injection de 0,1 mmole/Kg de GG-E3-Gd-DTPA. (*TR/TE : 300/15 msec, NA : 2, FOV : 5 cm, matrice : 256 X 256, épaisseur de coupe : 1,5 mm, nombre de coupes : 3, distance inter-coupe : 2,5 mm, nombre d'échos : 24*)



Pré contraste



5 min. post contraste



10 min. post contraste



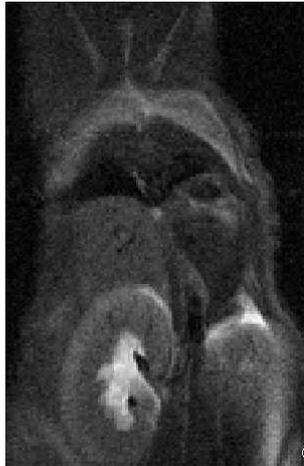
15 min. post contraste



20 min. post contraste



30 min. post contraste



40 min. post contraste



50 min. post contraste

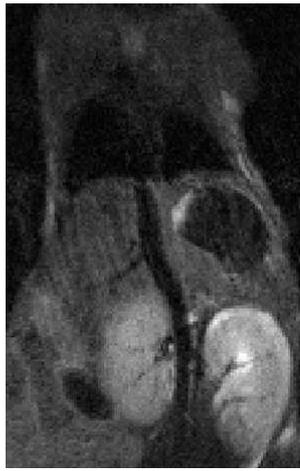


60 min. post contraste

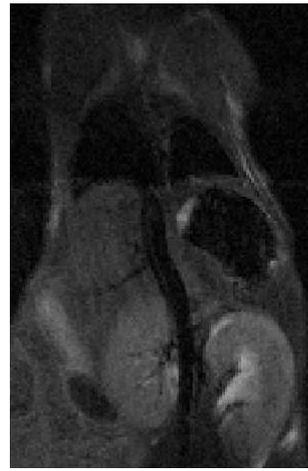
FIG. 12.27 – Images (4,7 T) en coupe sagittale d'une souris saine avant et à différents temps après injection de 0,1 mmole/Kg de GG-E3-Gd-DTPA. ($TR/TE : 300/15$ msec, $NA : 2$, $FOV : 5$ cm, $matrice : 256 \times 256$, $épaisseur$ de coupe : 1,5 mm, $nombre$ de coupes : 3, $distance$ inter-coupe : 2,5 mm, $nombre$ d'échos : 24)



Pré contraste



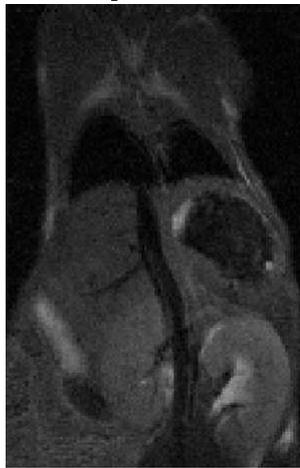
5 min. post contraste



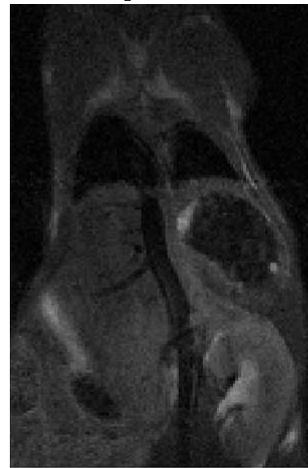
10 min. post contraste



15 min. post contraste



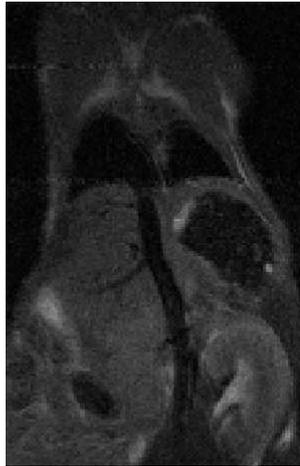
20 min. post contraste



30 min. post contraste



40 min. post contraste

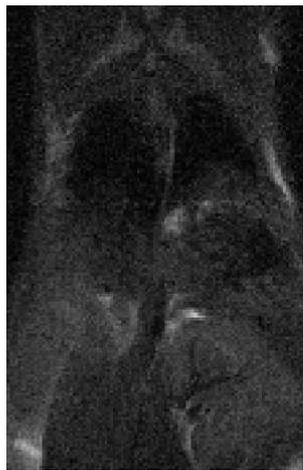


50 min. post contraste



60 min. post contraste

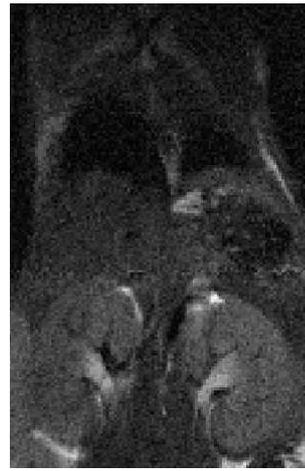
FIG. 12.28 – Images (4,7 T) en coupe sagittale d'une souris traitée à l'anti-Fas avant et à différents temps après injection de 0,1 mmole/Kg de 6xG-Gd-DTPA. (TR/TE : 300/15 msec, NA : 2, FOV : 5 cm, matrice : 256 X 256, épaisseur de coupes : 1,5 mm, nombre de coupe : 3, distance inter-coupe : 2,5 mm, nombre d'échos : 24)



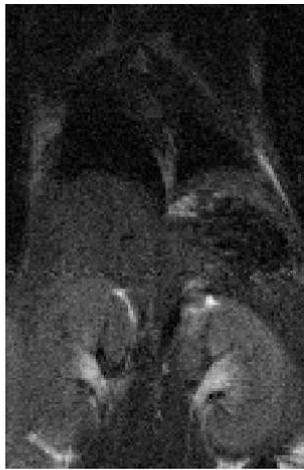
Pré contraste



5 min. post contraste



10 min. post contraste



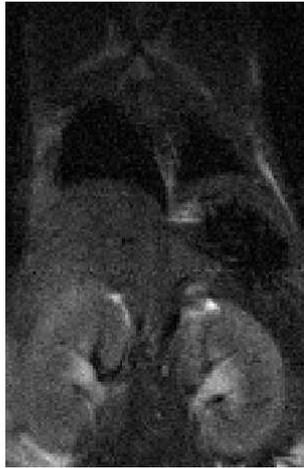
15 min. post contraste



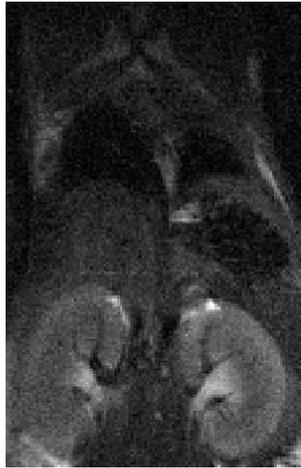
20 min. post contraste



30 min. post contraste



40 min. post contraste



50 min. post contraste



60 min. post contraste

FIG. 12.29 – Images (4,7 T) en coupe sagittale d'une souris saine avant et à différents temps après injection de 0,1 mmole/Kg de 6xG-Gd-DTPA. ($TR/TE : 300/15$ msec, $NA : 2$, $FOV : 5$ cm, $matrice : 256 \times 256$, $épaisseur$ de coupe : 1,5 mm, $nombre$ de coupes : 3, $distance$ inter-coupe : 2,5 mm, $nombre$ d'échos : 24)

La figure 12.30 représente l'évolution de l'intensité du signal IRM mesuré dans le foie de souris traitées à l'anti-Fas après administration de GG-E3-Gd-DTPA. Ces résultats sont comparés à l'intensité du signal mesuré dans les foies des souris saines injectées avec du GG-E3-Gd-DTPA, de souris traitées à l'anti-Fas ou saines injectées avec du 6xG-Gd-DTPA et du Gd-DTPA non vectorisé.

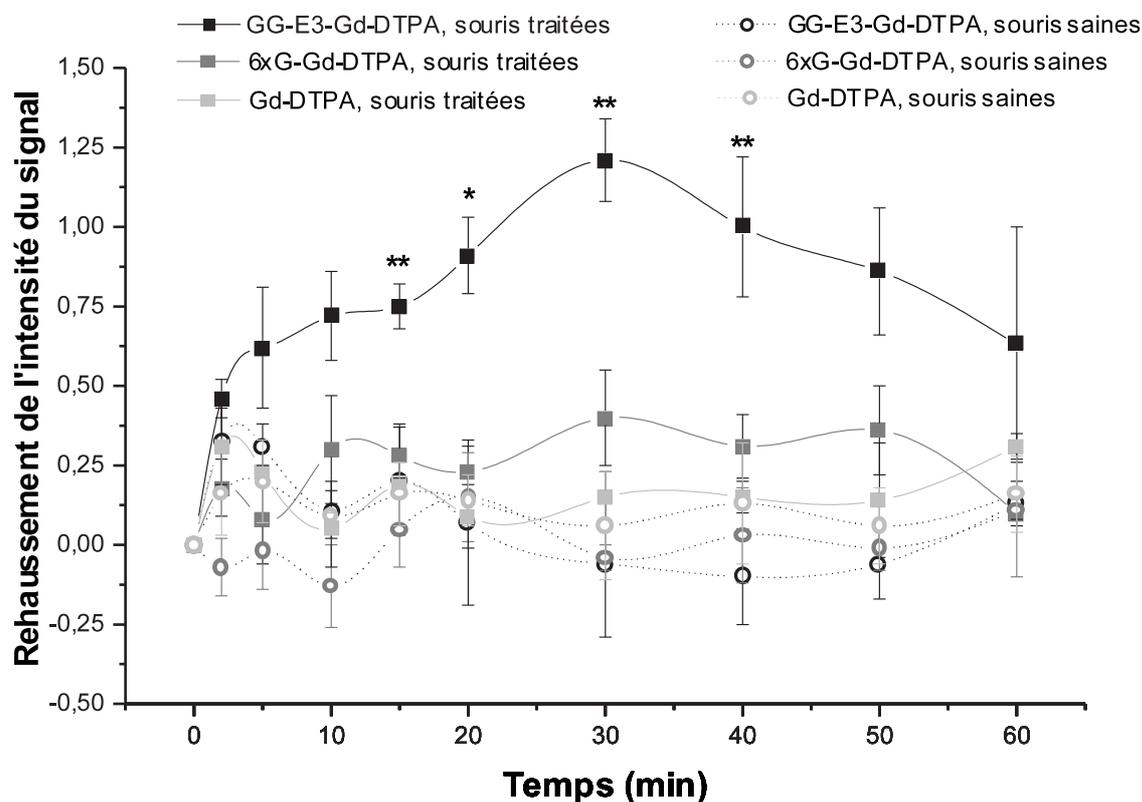


FIG. 12.30 – Evolution du rehaussement de l'intensité du signal RM dans le foie en fonction du temps suite à l'administration d'agents de contraste gadolinés. ($n=3$), $** = p < 0,05$, $* = p < 0,01$

Dès la cinquième minute, le groupe des souris traitées à l'anti-Fas et injectées avec le GG-E3-Gd-DTPA se démarque des 5 autres groupes. La différence est statistiquement significative de la quinzième à la quarantième minute. Le pic d'intensité maximum de signal est atteint à 30 minutes.

Sur le même graphique, on peut voir que l'intensité du signal des foies de souris saines et traitées à l'anti-Fas injectées avec du Gd-DTPA n'évolue pas au cours du temps et est identique pour les deux groupes. Par contre, l'évolution de l'intensité de signal des foies de souris traitées à l'anti-Fas et injectées avec du 6xG-Gd-DTPA est sensiblement différente de celle obtenue pour le groupe des souris saines. Bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative, il est probable que la vectorisation du Gd-DTPA avec le 6xG provoque

une légère rétention de celui-ci dans les foies de souris traitées à l'anti-Fas. Ces résultats confirment quantitativement la spécificité du nouvel agent de contraste GG-E3-Gd-DTPA pour les foies traités à l'anti-Fas.

Les mesures d'intensité du signal dans les reins ont été effectuées de manière à couvrir l'entièreté du rein. En effet, les zones corticales et médullaires ne sont pas toujours discernables sur les coupes.

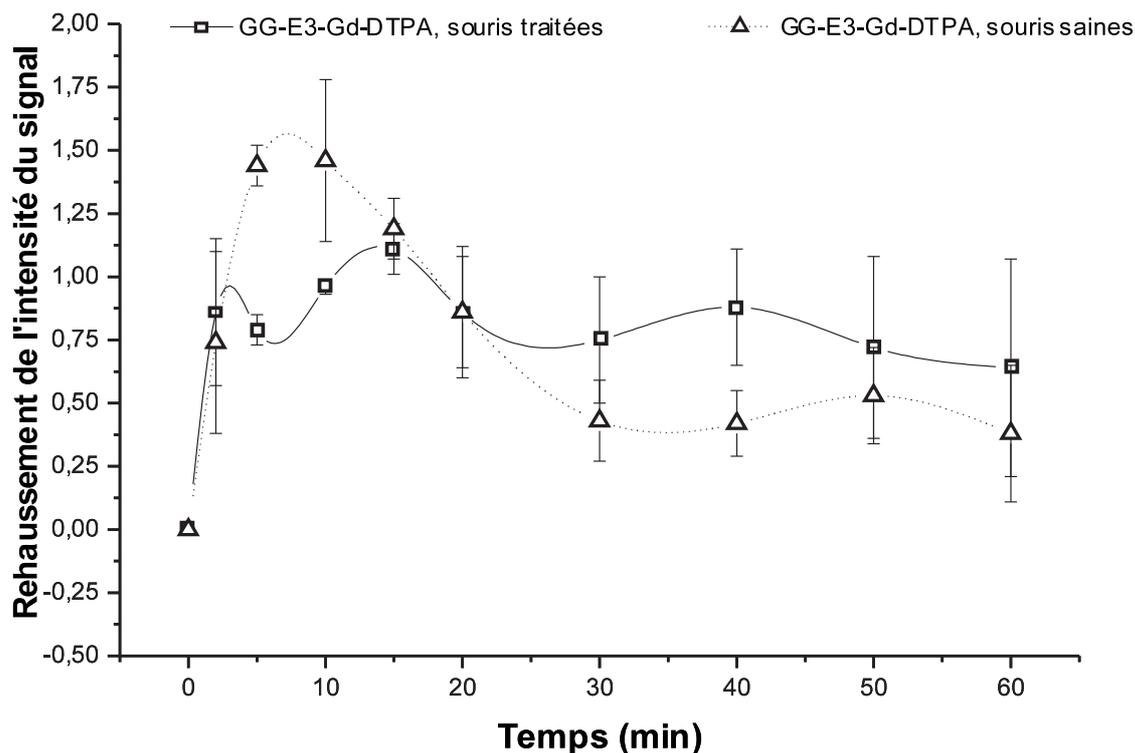


FIG. 12.31 – Evolution du rehaussement de l'intensité du signal IRM dans le rein en fonction du temps suite à l'administration d'agents de contraste gadoliniés. ($n=3$)

La figure 12.31 montre l'évolution du rehaussement du signal en fonction du temps dans les reins de souris traitées ou non à l'anti-Fas et injectées avec du GG-E3-Gd-DTPA. Le produit de contraste semble être capté et éliminé plus rapidement par les reins des souris saines que par ceux des souris traitées à l'anti-Fas. Dans le cas des souris traitées, l'agent de contraste semble être éliminé d'une manière plus constante par les reins tout au long de l'expérience, ce qui indiquerait une rétention du produit de contraste dans une autre partie de l'organisme, en l'occurrence le foie, à moins que ce phénomène ne soit attribué à une filtration glomérulaire moins importante chez les souris traitées.

12.4.1.2 Cinétique de biodistribution du GG-E3-Gd-DTPA, du 6xG-Gd-DTPA et du contrôle Gd-DTPA dans les organes de souris

Les biodistributions ont été réalisées sur des souris sacrifiées à différents temps (10, 30 et 60 minutes) après administration de l'agent de contraste. Le foie, les reins, la rate, le coeur et les poumons ont été prélevés et minéralisés pour le dosage du gadolinium par ICP.

Les biodistributions montrent que la concentration en gadolinium au niveau du foie (figure 12.32) des souris traitées à l'anti-Fas et injectées avec le GG-E3-Gd-DTPA est plus élevée aux temps 30 et 60 minutes que pour les cinq autres groupes contrôles.

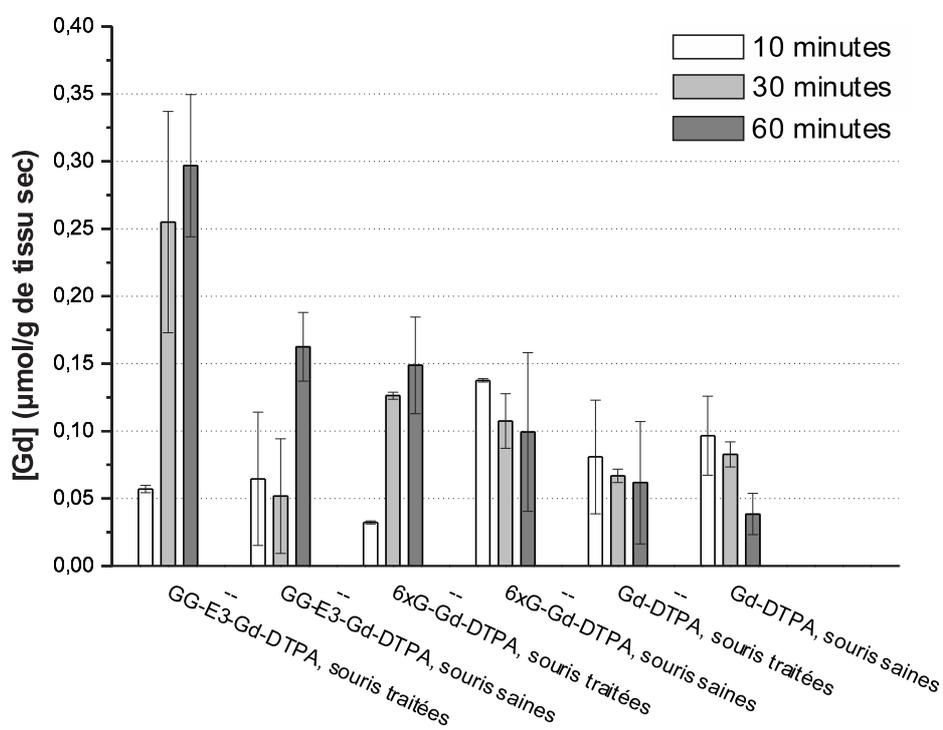


FIG. 12.32 – Evolution de la concentration en gadolinium dans les foies de souris traitées et non traitées à l'anti-Fas après injection de 0,1 mmole/Kg de GG-E3-Gd-DTPA, 6xG-Gd-DTPA ou Gd-DTPA. ($n=2$)

Les mêmes dosages réalisés dans les reins (figure 12.33) et dans les poumons (figure 12.34) montrent que les agents de contraste testés y parviennent plus rapidement chez les souris saines que chez les souris appartenant aux groupes correspondant des souris traitées.

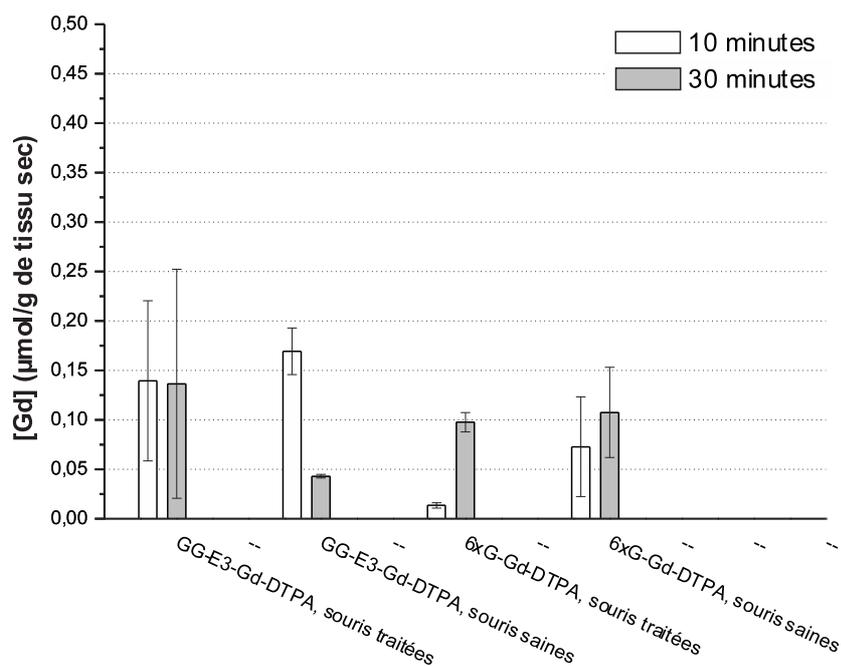


FIG. 12.33 – Evolution de la concentration en gadolinium dans les reins de souris traitées et non traitées à l'anti-Fas après injection de 0,1 mmole/Kg de GG-E3-Gd-DTPA, 6xG-Gd-DTPA ou Gd-DTPA. ($n=2$)

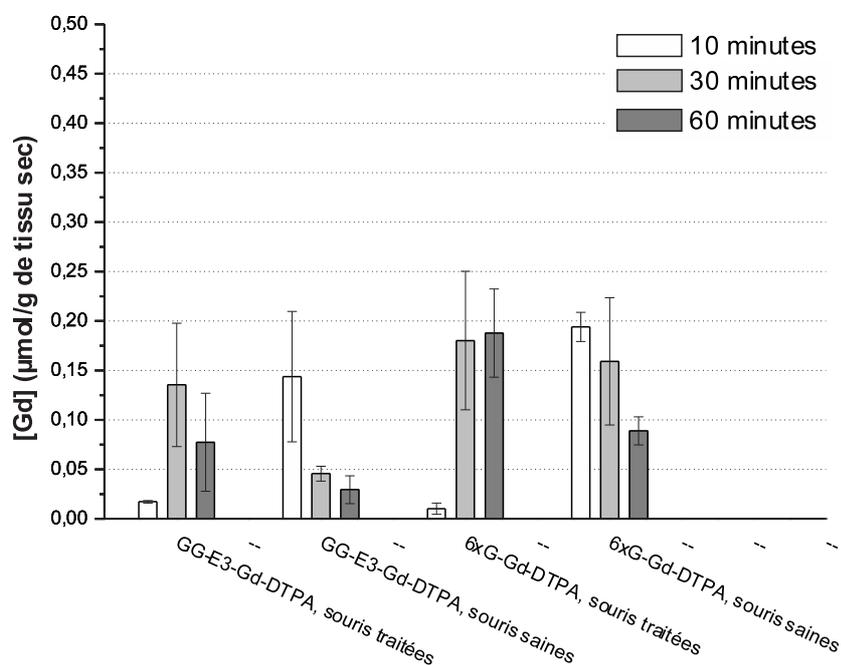


FIG. 12.34 – Evolution de la concentration en gadolinium dans les poumons de souris traitées et non traitées à l'anti-Fas après injection de 0,1 mmole/Kg de GG-E3-Gd-DTPA, 6xG-Gd-DTPA ou Gd-DTPA. ($n=2$)

Les dosages réalisés dans le coeur (figure 12.35) ne montrent pas de comportement particulier des agents de contraste lorsqu'il sont injectés aux différents groupes de souris.

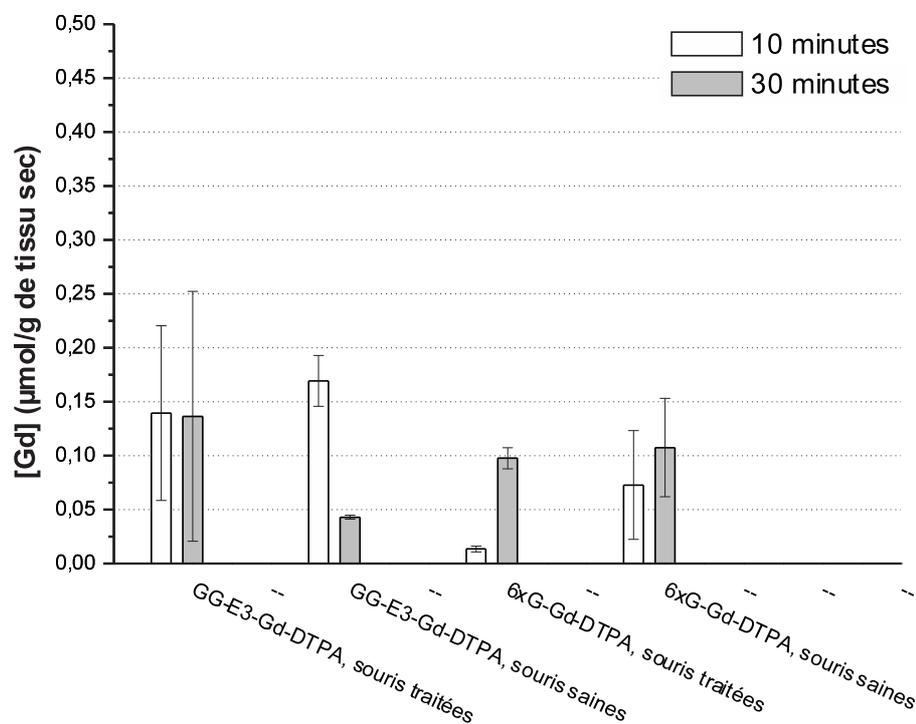


FIG. 12.35 – Evolution de la concentration en gadolinium dans le coeur de souris traitées et non traitées à l'anti-Fas après injection de 0,1 mmole/Kg de GG-E3-Gd-DTPA, 6xG-Gd-DTPA ou Gd-DTPA. ($n=2$)

La concentration en gadolinium mesurée à 30 minutes dans la rate (figure 12.36) des souris traitées à l'anti-Fas et injectées avec le GG-E3-Gd-DTPA est plus élevée que pour les autres groupes contrôles. Cela semble indiquer que le produit de contraste GG-E3-Gd-DTPA permet de mettre en évidence l'apoptose des lymphocytes présents dans la rate. En effet, ceux-ci expriment le récepteur Fas à leur surface et sont donc sensibles à l'anticorps anti-Fas [166].

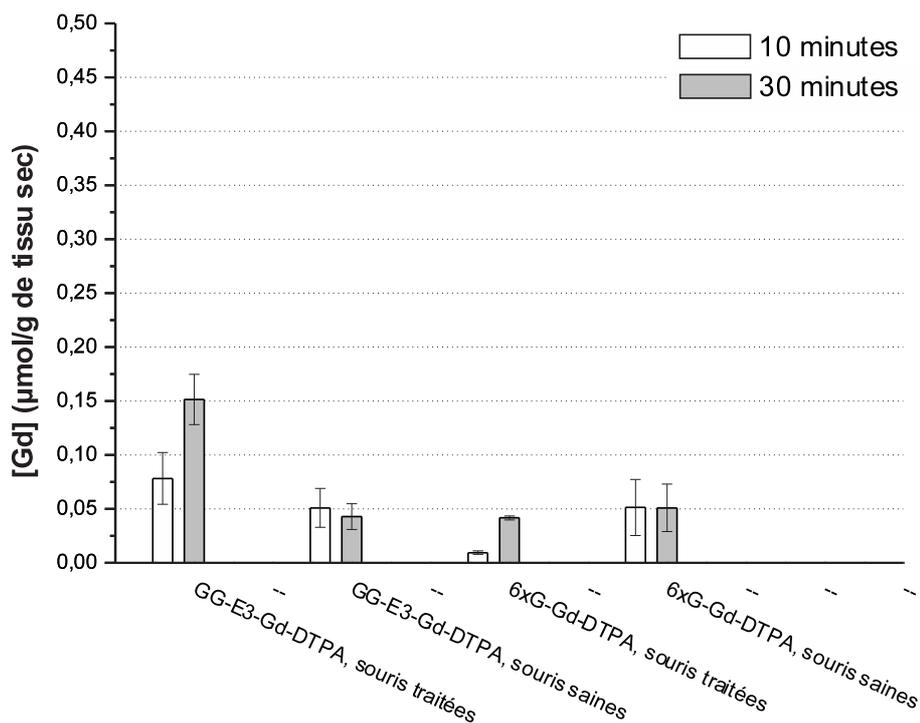


FIG. 12.36 – Evolution de la concentration en gadolinium dans la rate de souris traitées et non traitées à l’anti-Fas après injection de 0,1 mmole/Kg de GG-E3-Gd-DTPA, 6xG-Gd-DTPA ou Gd-DTPA. ($n=2$)

12.4.2 Evaluation de l’efficacité du peptide GG-E3 greffé sur des particules superparamagnétiques pegylées

Comme le GG-E3-Gd-DTPA, le GG-E3-USPIO-PEG a été testé *in vivo* sur des souris saines et des souris traitées à l’anti-Fas. Le 6xG-USPIO-PEG a également été injecté aux souris saines et aux souris traitées. Ainsi, 4 groupes de souris ont été suivis par IRM pendant 30 minutes.

Pour faciliter la compréhension et l’interprétation des images, un exemple annoté est repris dans la figure 12.37.

Les résultats présentés à la figure 12.38 et à la figure 12.39 montrent que les foies des souris traitées à l’anti-Fas ont tendance à retenir plus de particules vectorisées avec le peptide GG-E3 que les foies des souris saines. Les particules vectorisées avec le peptide 6xG ne semblent pas produire un effet significativement différent chez les souris saines et les souris traitées à l’anti-Fas. Cependant, la différence de comportement existant entre le groupe des souris traitées injectées avec le GG-E3-USPIO-PEG et l’ensemble des groupes contrôles n’est pas significativement différente. La grande variabilité des résultats obtenus peut être

attribuée aux difficultés rencontrées lors de l'injection de ces produits de contraste, qui dans ce cas se fait en bolus dans une des veines caudales. En effet, les agents de contraste particuliers tels que ceux-ci sont particulièrement visqueux à la concentration employée pour l'imagerie.

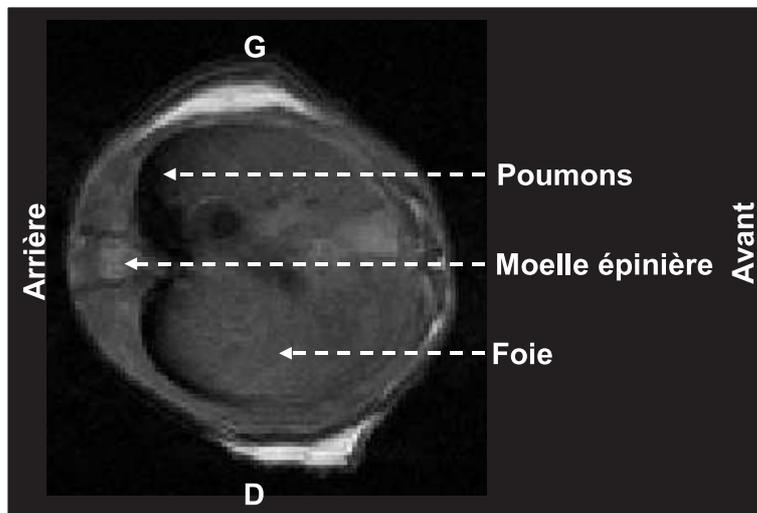


FIG. 12.37 – Localisation des organes principaux sur une image RM de souris en coupe axiale.

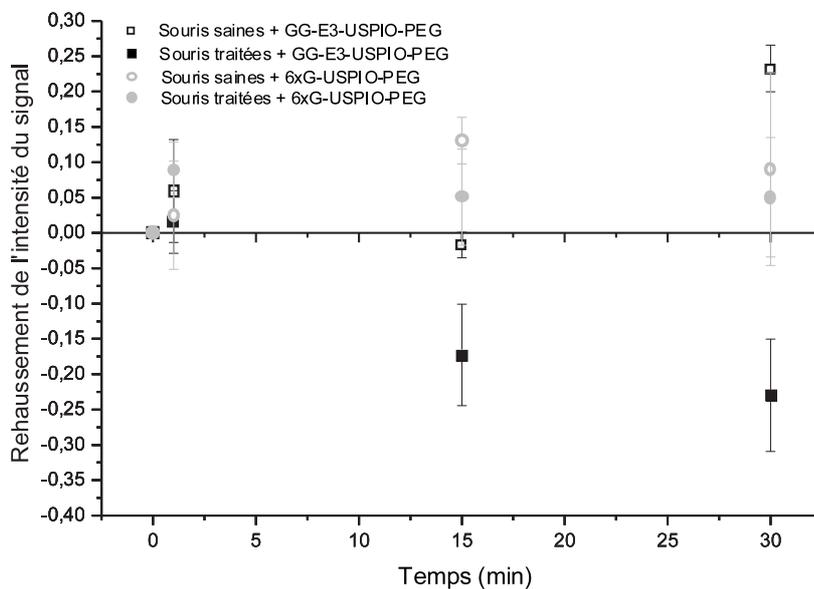


FIG. 12.38 – Evolution du signal IRM dans le foie en fonction du temps suite à l'administration d'agents de contraste particuliers. ($n=3$)

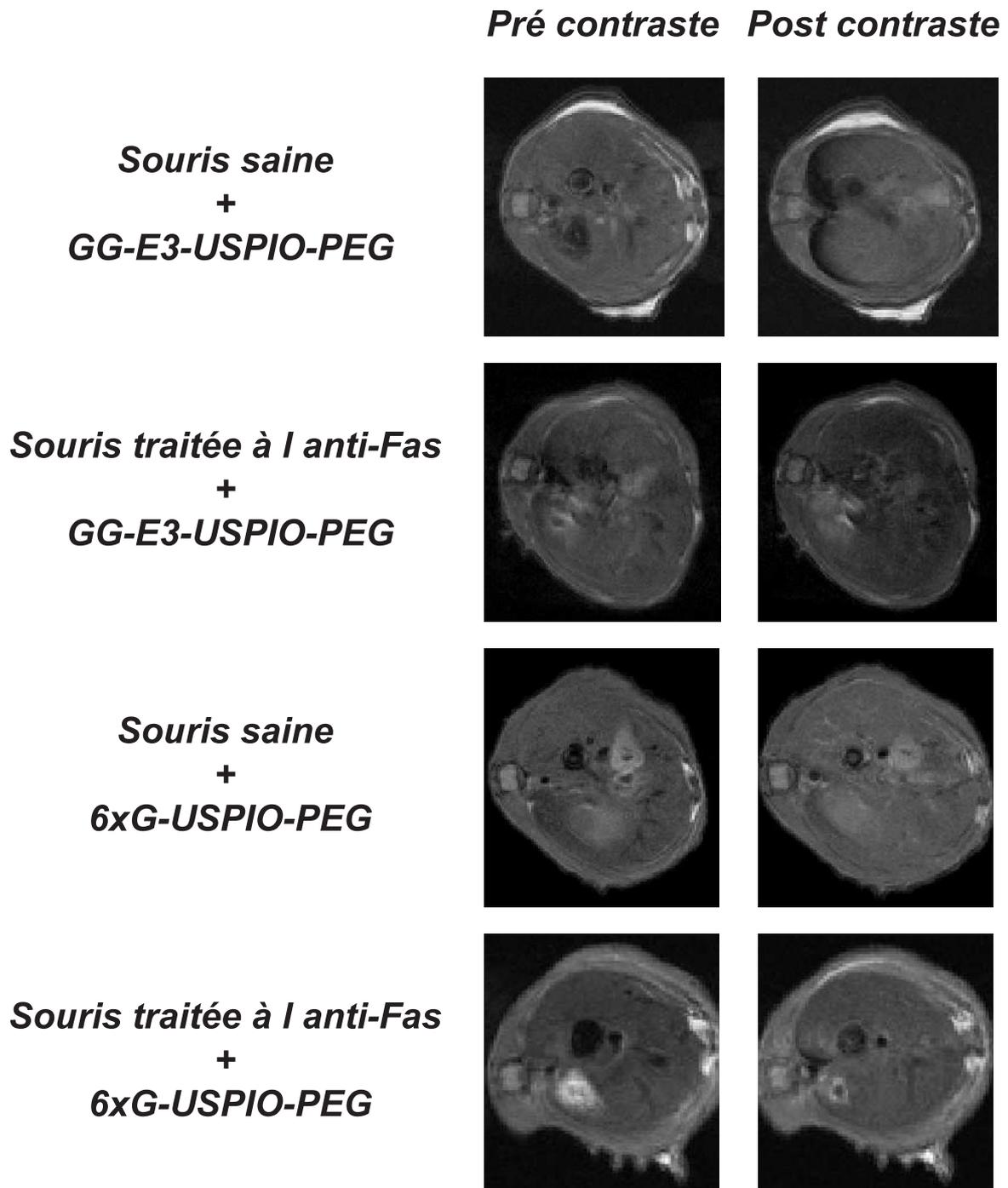


FIG. 12.39 – Images en coupe axiale (4,7 T) de souris saines et traitées à l'anti-Fas avant et 30 minutes après injection de 30 μ mole de fer/Kg de poids corporel de USPIO pegylées vectorisées avec le peptide GG-E3 ou le peptide 6xG. (*TR/TE : 1200/10 msec, NA : 2, FOV : 5 cm, matrice : 256 X 256, épaisseur de coupe : 2 mm, nombre de coupes : 2, distance inter-coupe : 8 mm, nombre d'échos : 2*)

Chapitre 13

Discussion

13.1 Phage versus peptide

Bien que le phage porteur du peptide E3 montre une affinité élevée pour la phosphatidylsérine, rien ne peut garantir *a priori* la conservation de l'affinité de ce peptide une fois isolé de son vecteur (figure 13.1). Son insertion dans la protéine pIII pourrait avoir un effet sur sa flexibilité et sa structure tridimensionnelle. De plus son insertion dans la protéine fusion implique l'engagement de ses extrémités N et C terminales dans des liens peptidiques. Il est donc judicieux de s'assurer de l'affinité du peptide synthétisé avant d'envisager son utilisation comme vecteur de contrastophore. Lorsque le peptide E3 est biotinyllé par son extrémité N terminale, on observe une chute conséquente de son affinité pour la phosphatidylsérine.

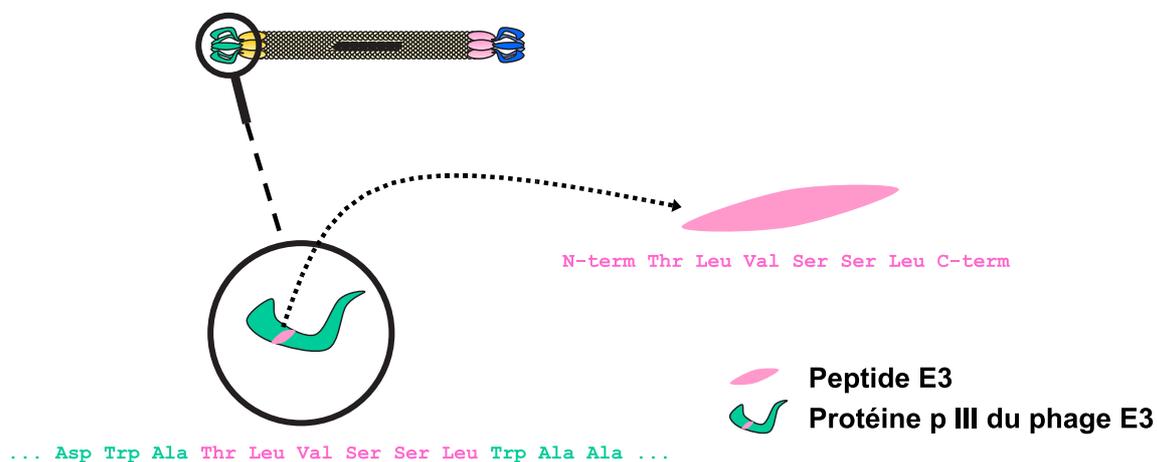


FIG. 13.1 – Illustration du peptide E3 inséré dans la protéine pIII du phage E3 ainsi que du peptide libre

Cette diminution d'affinité peut être attribuée à la biotinylation du peptide et/ou à l'affinité réelle du peptide en solution, c'est-à-dire non supporté par le phage. Le passage du phage au peptide implique une réduction du nombre de copies du peptide de cinq à une. Les

peptides sur le phage sont capables de coopérer pour améliorer la fixation. Grâce aux expériences de compétition entre l'annexine V ou le phage E3 et le peptide E3, on peut déduire que la seconde hypothèse semble être la plus logique. En dépit de cet appauvrissement, le peptide conserve une affinité satisfaisante, même lorsque seule son extrémité N terminale est impliquée dans une liaison à une molécule rapporteuse ou à un espaceur.

Tous ces problèmes pourraient être contournés si l'utilisation du phage remplaçait celle du peptide dans la conception d'agents de contraste spécifiques, comme c'est le cas pour les magnétophages. Cette stratégie permettrait de conserver le peptide dans l'état dans lequel il a été sélectionné et de bénéficier de la synergie avec les quatre copies supplémentaires. Outre ces considérations, le magnétophage se montre également plus efficace, en terme de marquage, étant donné qu'il apporte avec lui un plus grand nombre de particules magnétiques (figure 13.2).

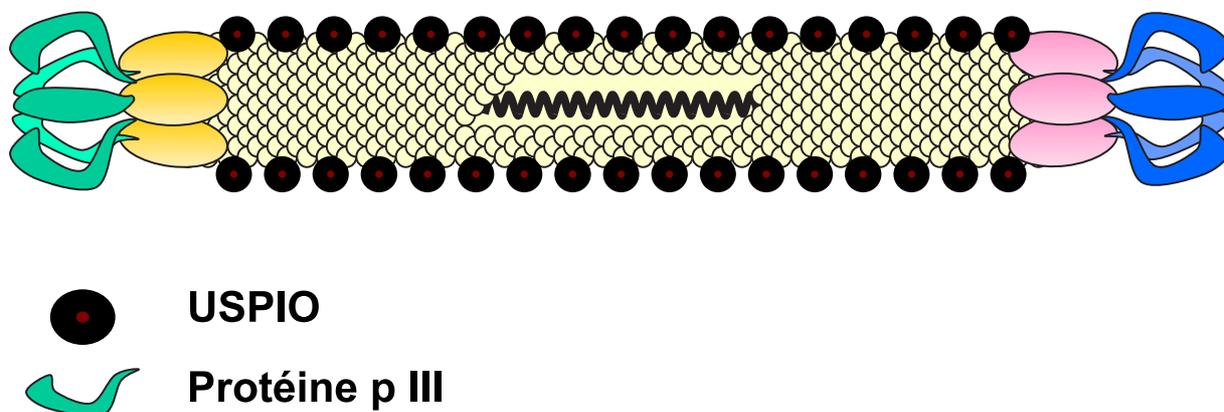


FIG. 13.2 – Illustration du magnétophage

13.2 Pertinence de l'espaceur

L'insertion d'un espaceur entre le peptide et le contrastophore a été envisagée dans le but de préserver au mieux la structure et l'accessibilité du peptide vecteur après sa fixation sur une plus grosse unité, comme un contrastophore IRM. Bien que le peptide E3 greffé aux particules superparamagnétiques leur confère une spécificité envers la PS, des tests ont été envisagés avec l'insertion d'un espaceur. Comme attendu, le GG-E3-USPIO se montre légèrement plus efficace que son homologue dépourvu d'espaceur. L'espaceur utilisé dans cette étude est constitué de deux résidus glycine. Cet acide aminé a été choisi pour sa petite taille et pour l'absence de charge sur sa chaîne latérale. De plus, il n'implique pas de modifications de la structure secondaire du peptide dans lequel il est inséré, comme pourrait le faire une proline. Un autre espaceur, l'acide 6-aminohexanoïque ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$

CH₂-CH₂-CH₂-COOH) qui permet un espacement similaire à celui procuré par l'insertion de deux glycines aurait pu être utilisé. Cette molécule présente un avantage au niveau de la synthèse du peptide car elle peut être ajoutée en une étape alors qu'un espaceur de glycine de taille équivalente requière deux à trois étapes successives. Le choix de la longueur de l'espaceur est également important. Un espaceur trop court est sans intérêt étant donné qu'il n'écarte pas suffisamment les deux molécules greffées mais à l'inverse un espaceur trop long pourrait provoquer un repliement et donc un rapprochement des deux parties que l'on désire tenir à l'écart l'une de l'autre.

13.3 Choix des modèles biologiques

Dans la seconde partie de cette étude, deux modèles ont été employés. L'un utilise les propriétés de la camptothécine pour induire l'apoptose chez les cellules Jurkat, et l'autre consiste en l'induction de l'apoptose *in vivo* grâce à l'anticorps anti-Fas.

A priori, toutes les cellules exposent la phosphatidylsérine dans leur feuillet externe durant le processus apoptotique, et toutes les lignées auraient pu convenir à l'étude *in vitro*. Toutefois, certaines contingences pratiques nous imposaient de travailler sur des cellules en suspension. Pour éviter de fausser les contrôles négatifs, les cellules employées doivent être capables de survivre en suspension. Cela n'est, par exemple, pas le cas des cellules Hep G2 employées dans la première partie du travail. C'est pour cette raison que les expériences de RMN ont été réalisées sur des cellules de type Jurkat qui croissent en suspension.

Le second modèle d'induction d'apoptose est donc un modèle *in vivo* qui utilise les propriétés de l'anticorps anti-Fas. En se fixant sur le récepteur Fas, il déclenche une voie d'activation des caspases menant à l'apoptose de la cellule. Le récepteur Fas étant largement présent sur les hépatocytes, on observe une induction massive de l'apoptose au niveau du foie. Ce modèle permet donc de disposer d'une concentration importante de cellules apoptotiques au sein d'un organe. L'intérêt de ce modèle est toutefois limité par la concentration excessive en cellules apoptotiques. Dans la plupart des pathologies qui y sont associées, l'apoptose est développée de façon modérée. Contrairement à la situation rencontrée dans notre modèle, la majorité des cellules ne rentrent pas en apoptose en même temps. comme c'est le cas dans ce modèle. Notre protocole se rapproche d'avantage d'une induction d'apoptose provoquée par les traitements anti-tumoraux. Le modèle a néanmoins le mérite de permettre d'initier les tests *in vivo*. Pour l'avenir, il sera néanmoins nécessaire de tester des modèles où les cellules apoptotiques sont moins abondantes.

13.4 Pertinence et choix du contrôle négatif

Deux peptides ont été choisis comme contrôles négatifs. Le premier est un hexapeptide linéaire composé exclusivement de glycine (6xG). Il a été choisi de manière à montrer l'importance de la présence des chaînes latérales présentes sur les résidus d'acide aminé. En effet, cet acide aminé ne possède qu'un hydrogène pour toute chaîne latérale. Il a été greffé sur un chélate de gadolinium (6xG-Gd-DTPA) et a été testé *in vivo* en IRM sur un modèle d'apoptose hépatique. Son effet sur le contraste est significativement différent de celui proposé par l'agent de contraste spécifique (GG-E3-Gd-DTPA). La spécificité de ce dernier lui est donc conférée par la nature des résidus d'acide aminé présent dans le peptide vecteur.

Le second contrôle a été réalisé dans le but de tester l'importance de la position des résidus d'acide aminé au sein de celui-ci. Ce peptide "contrôle" contient les mêmes acides aminés que le peptide E3 mais sa séquence est fortement perturbée. Il est possible de classer les acides aminés constituant la séquence du peptide E3 en deux groupes. La leucine (L) et la valine (V) étant très proches, forment le premier groupe. La thréonine (T) et la sérine (S) portent des fonctions hydroxyles sur leur chaîne latérale et forment le second groupe. La séquence du nouveau peptide a été déterminé en partie sur base de ces deux groupes. Ce peptide n'a donc pas été choisi de manière aléatoire. Il fallait éviter qu'un acide aminé ne se retrouve à la même position que dans le peptide E3 ou que des acides aminés appartenant au même groupe ne s'interchangent.

Parmi l'ensemble des combinaisons possibles d'acides aminés appartenant aux deux groupes déterminés plus haut (figure 13.3), une d'entre elle correspond à la combinaison inverse du peptide E3. On pourrait alors envisager les différents peptides construits sur base de ce schéma. Il en existe 9 et sont repris dans la figure 13.4. Cependant, ces séquences montrent des motifs tels que LVS, VS ou SS également présents sur le peptide E3 ou des motifs tels que TS ou ST trop proches de SS (figure 13.5). Par conséquent, c'est la séquence SVSLLT, issue de la séquence VSSLLT dont les deux premiers résidus ont été permutés, qui a été choisie.

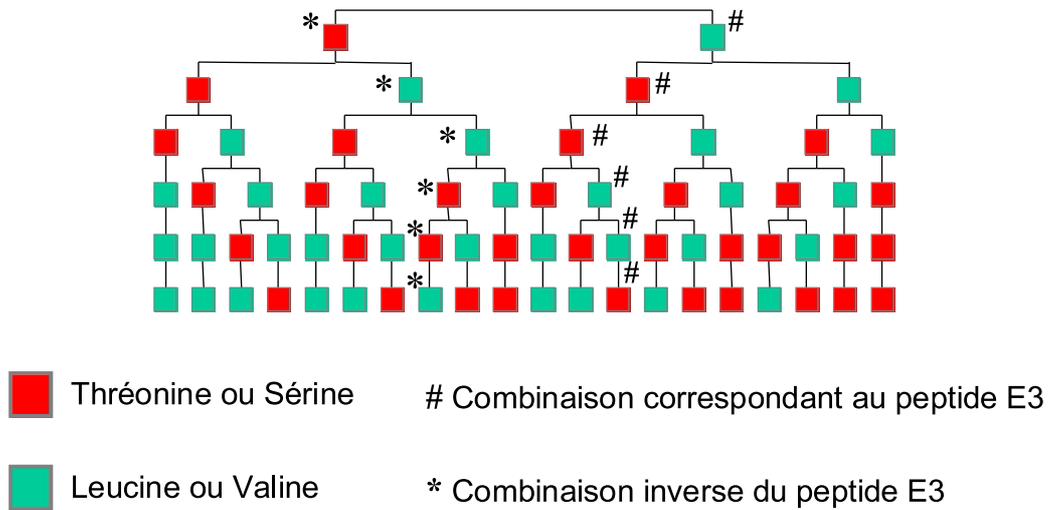


FIG. 13.3 – Ensemble des combinaisons possibles d'acides aminés aux caractéristiques différentes. (vert = acides aminés présentant un hydroxyle sur leur chaîne latérale, rouge = acides aminés ne présentant pas d'hydroxyle sur leur chaîne latérale)

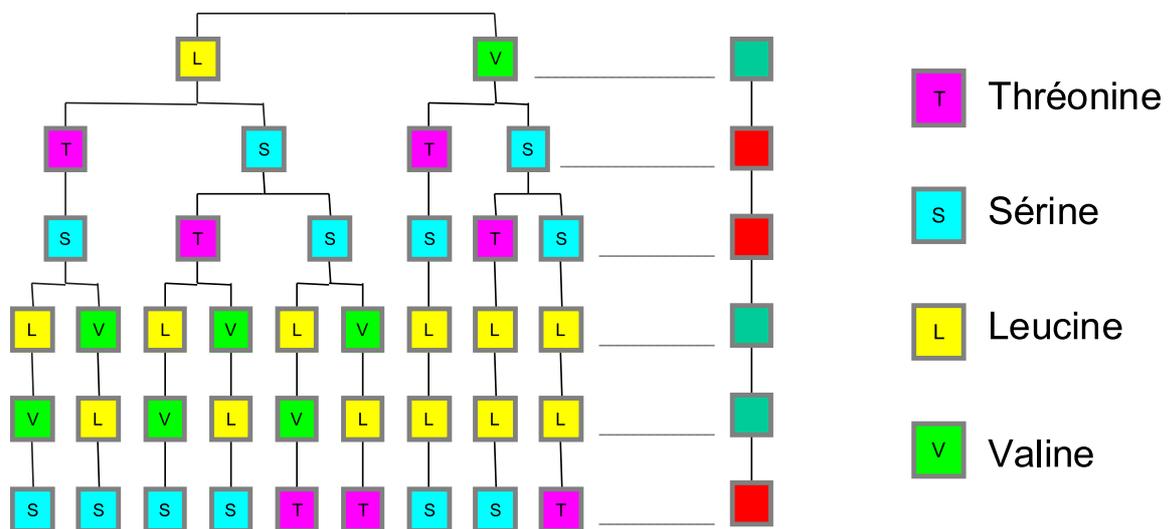
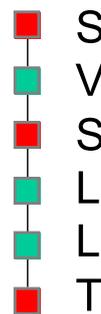
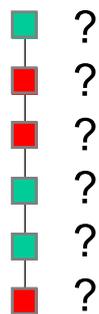


FIG. 13.4 – Ensemble des séquences construites sur base du schéma mis en évidence dans la figure 13.3.

Peptide E3 Combinaison inverse Peptide E3 perturbé



L	T	S	L	V	S
L	T	S	V	L	S
L	S	T	L	V	S
L	S	T	V	L	S
L	S	S	L	V	T
L	S	S	V	L	T
V	T	S	L	L	S
V	S	T	L	L	S
V	S	S	L	L	T

FIG. 13.5 – Séquence du peptide E3, des peptides E3 inversés et du peptide E3 perturbé.

13.5 Contrastophore positif ou négatif ?

Dans cette étude, deux types de contrastophore ont été utilisés. Le premier est constitué d'un chélate de gadolinium (Gd-DTPA) dont l'effet est un rehaussement du signal. Inversement, le second contrastophore, qui est une particule superparamagnétique constituée de cristaux d'oxyde de fer, produit une diminution de l'intensité du signal. En clinique, les agents positifs semblent être préférés aux agents négatifs. En effet, l'oeil humain est ainsi fait, il nous est plus aisé de distinguer une lésion, surtout de petite taille, lorsque son intensité augmente que lorsqu'elle diminue. Toutefois, les agents négatifs sont de plus en plus développés, principalement en imagerie moléculaire.

Ces derniers sont plus efficaces notamment parce que leur relaxivité est beaucoup plus élevée. Si l'on compare les relaxivités r_1 mesurées à 60 MHz du Gd-DTPA et de l'AMI-227 (analogues aux USPIO utilisées dans ce travail), on peut observer une augmentation d'un facteur 3,5. Donc, à ce champ utilisé en clinique, pour une concentration en ions (Gd ou Fe) 3,5 fois moins importante et pour une même séquence d'imagerie, l'effet sur l'image sera identique avec les particules et le chélate de gadolinium. De plus, si l'on utilise une séquence d'impulsion pondérée en T2, on bénéficie alors du r_2 particulièrement élevé des USPIO qui à ce champ clinique, est près de 20 fois plus élevée que le r_2 du Gd-DTPA.

Les particules sont également plus efficaces en terme de ciblage des récepteurs. En effet, lorsque le vecteur reconnaît le récepteur cible, il apporte une grande quantité d'ions fer (environ 10 000) lorsqu'il est couplé aux particules. A l'inverse, lorsqu'il vectorise un chélate de gadolinium, il n'apporte qu'un seul ion gadolinium (figure 13.6). Le marquage de la cellule est donc moins important dans ce dernier cas et le greffage d'un grand nombre de gadoliniums n'est pas sans poser de problèmes de synthèse et de purification.

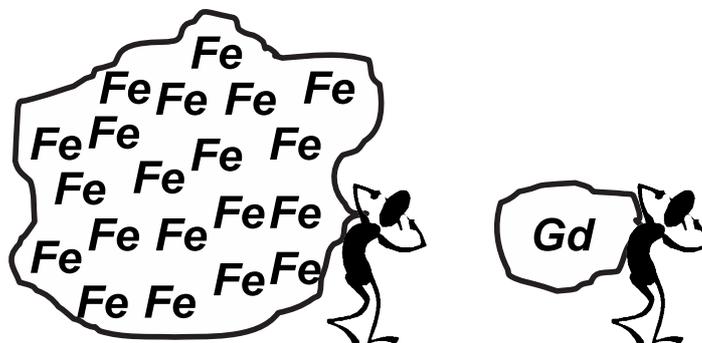


FIG. 13.6 – Représentation imagée d'un peptide portant une particule superparamagnétique contenant beaucoup d'ions fer et d'un peptide portant un chélate de gadolinium ne contenant qu'un ion gadolinium.

13.6 Applications, résolution et sensibilité

Les nouveaux agents de contraste pour l'imagerie moléculaire peuvent trouver leurs applications en laboratoire ou en clinique. Le E3-USPIO peut être employé *in vitro* comme révélateur de toxicité de diverses molécules étudiées au niveau de cultures cellulaires par le biais de la mesure du temps de relaxation ou de l'intensité des images IRM.

Les magnétophages E3, porteurs de plusieurs particules, permettent de réaliser un tri cellulaire [142]. En effet, leur utilisation permet de séparer les cellules saines des cellules apoptotiques mélangées au sein d'une même culture cellulaire (voir §7.5).

Ce travail a montré que le GG-E3-Gd-DTPA et le GG-E3-USPIO-PEG peuvent être employés *in vivo* pour détecter les cellules apoptotiques en IRM. Après s'être assuré de l'absence de toxicité de ces produits, leur application en clinique pourrait être envisagée pour mettre en évidence l'apoptose consécutive aux traitements anti-tumoraux. Beaucoup d'autres applications cliniques pourraient être envisagées, comme le dépistage ou le suivi de l'évolution de pathologies liées à un excès d'apoptose. Cependant, ces pathologies ne font pas intervenir une apoptose massive mais déclenchent la mort cellulaire programmée chez quelques cellules distribuées au sein d'un tissu vivant. Il se pose donc le problème de la sensibilité. Cette limitation est liée à la modalité d'imagerie qui demande des concentrations en produit de contraste de l'ordre du micromolaire alors que d'autres techniques d'imagerie comme la médecine nucléaire requièrent des concentrations 1000 à 1000000 fois inférieures. Le couplage du peptide E3 avec des contrastophores employés en médecine nucléaire permettrait d'utiliser le peptide E3 pour mettre en évidence l'apoptose d'un plus petit nombre de cellules. Son champ d'application serait alors beaucoup plus vaste et diversifié. Par exemple, des maladies neurodégénératives pourraient aussi faire l'objet d'un suivi en imagerie grâce à l'utilisation d'un agent de contraste apopto-spécifique.

Chapitre 14

Conclusions

L'affinité pour la phosphatidylsérine de l'hexapeptide linéaire E3 sélectionné par phage display lors de la première partie de ce travail a été testée *in vitro* par ELISA. Que ses deux extrémités soient libres ou greffées à une molécule rapporteuse, son affinité pour la phosphatidylsérine est nettement supérieure à celle de peptides "contrôles" tels que le peptide 6xG ou le peptide E3 perturbé. Bien que le peptide E3 ait perdu de l'affinité pour la phosphatidylsérine par rapport au phage E3 correspondant, il reste néanmoins un bon vecteur pour les contrastophores IRM spécifiques de l'apoptose. Le peptide E3 a été greffé à un chélate de gadolinium et a été testé *in vivo* chez des souris traitées à l'anti-Fas, inducteur de l'apoptose hépatique chez la souris. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de discriminer les souris saines des souris traitées à l'anti-Fas à l'aide du GG-E3-Gd-DTPA. Une expérience similaire a été réalisée avec des particules furtives vectorisées à l'aide du peptide GG-E3. Les particules GG-E3-USPIO-PEG permettent elles aussi de modifier le contraste du foie d'une manière sélective. Toutefois, cette dernière étude demande d'être répétée. En effet, les résultats obtenus sont beaucoup moins reproductibles que ceux obtenus avec l'homologue gadoliné. Cela peut être attribué à la difficulté d'injection du produit GG-E3-USPIO-PEG qui présente une viscosité élevée à la concentration utilisée. Des concentrations plus faibles, ou une nouvelle formulation pourraient être envisagées afin d'améliorer la reproductibilité des résultats.

En résumé, il est possible d'utiliser des peptides de petite taille, issus par exemple du phage display, pour vectoriser des contrastophores IRM. Particules superparamagnétiques et chélates de gadolinium peuvent y être greffés et ainsi bénéficier de la spécificité du peptide pour sa cible. Dans ce travail, le peptide E3 sélectionné par phage display, a été greffé à des USPIO, des USPIO pegylées ou du Gd-DTPA et confère à ces contrastophores une spécificité pour la phosphatidylsérine, marqueur de l'apoptose. Ces nouveaux agents de contraste, ont montré des résultats positifs sur culture cellulaire et *in vivo* dans un modèle d'apoptose hépatique.

Cinquième partie
Conclusion générale

Ce travail consistait en l'élaboration d'un agent de contraste magnétique spécifique de l'apoptose, dont le vecteur serait de synthèse chimique et de purification relativement aisées en comparaison avec des vecteurs de type protéinique comme l'annexine V ou la synaptotagmine.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes attachés à l'identification d'un peptide permettant la vectorisation des contrastophores magnétiques. Dans ce but, nous avons choisi de cibler la phosphatidylsérine, qui est un des marqueurs principaux de l'apoptose, par la technique du phage display. Cette technique de biologie moléculaire a donc dû être implémentée au sein du laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire et d'Imagerie, jusqu'alors spécialisé dans les problèmes physico-chimiques de la RMN, la chimie organique et les tests de produits de contraste chez les petits animaux de laboratoire.

Différentes sélections de phage display ont été envisagées et menées en parallèle dans le but d'augmenter nos chances de résultats positifs et d'améliorer notre compréhension des différents paramètres utilisés dans cette technique. Nous avons donc choisi de tester trois types d'immobilisation de la phosphatidylsérine ainsi que deux bibliothèques de phages. Les différents supports de la phosphatidylsérine étaient des plaques de polystyrène (sélection *in vitro*), des cellules Hep G2 en culture et rendues apoptotiques par incubation avec la camptothécine (sélection sur culture cellulaire) et enfin, des foies de souris isolés et perfusés dont les hépatocytes étaient entrés en apoptose à la suite d'une injection d'anticorps anti-Fas administrée deux heures auparavant à la souris donneuse (sélection *ex vivo*). Ces trois types de sélection, allant de l'*in vitro* à l'*ex vivo*, ont été réalisés avec une bibliothèque de phages de type C7, c'est-à-dire constituée de phages portant des heptapeptides cycliques. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec les sélections sur culture cellulaire et *ex vivo*, bien que dans ces sélections, la bibliothèque de phages est mise en présence d'une large gamme de molécules, . Une autre bibliothèque appelée L6 et constituée de phages, exposant cette fois des hexapeptides linéaires à leur surface, a été utilisée en association avec une sélection *ex vivo*. Les phages issus de cette seconde bibliothèque présentent globalement une plus grande affinité pour la phosphatidylsérine. Il semble toutefois impossible d'extrapoler ces résultats à d'autres expériences de phage display ciblant d'autres molécules. Les paramètres et les protocoles utilisés doivent en effet être ajustés et réfléchis au cas par cas, voire même en cours d'expérience, afin d'optimiser la sélection.

Un hexapeptide linéaire dont la séquence (Thr-Leu-Val-Ser-Ser-Leu) a été identifiée dans la première partie de ce travail, a été synthétisé. Avant greffage aux différents contrastophores, son affinité pour la phosphatidylsérine a été évaluée et comparée à celle du phage correspondant et à celle d'un ligand naturel de la phosphatidylsérine, l'annexine V. Bien

que l'affinité du peptide pour la phosphatidylsérine soit inférieure à celle du phage, le peptide nommé E3 conserve suffisamment d'affinité pour la phosphatidylsérine et a donc pu être employé comme vecteur de contrastophore pour l'IRM. Ce peptide a donc été couplé à des USPIO soit directement, soit par le biais d'un espaceur. Ces différents produits de contraste ont été comparés par ELISA de compétition avec l'annexine V et ont été testés sur culture cellulaire. Le produit de contraste E3-USPIO permet de différencier par IRM et par relaxométrie les suspensions de cellules Jurkat traitées et non traitées à la camptothécine.

Le même peptide a été greffé à des USPIO pegylées de manière à constituer un agent de contraste particulaire et furtif spécifique de l'apoptose (GG-E3-USPIO-PEG). Ce produit de contraste a été injecté à des souris saines et des souris traitées à l'anti-Fas. Bien que les erreurs expérimentales soient importantes, il est toutefois possible de distinguer les deux groupes de souris par la mesure de l'intensité des régions d'intérêt dessinées au niveau des foies. Il serait intéressant d'améliorer la formulation de manière à permettre une injection plus aisée et donc de réduire les erreurs expérimentales.

Le peptide E3 a également été greffé sur un chélate de gadolinium, pour former le GG-E3-Gd-DTPA et a été testé *in vivo* sur le même modèle. Alors que son influence sur le signal est moins importante que pour un agent de type superparamagnétique, il permet d'obtenir des résultats plus reproductibles. Il est en effet beaucoup moins visqueux et son injection est plus aisée. Les résultats IRM montrent qu'il est possible de mettre en évidence une apoptose hépatique massive sur base d'IRM suite à l'injection du produit GG-E3-Gd-DTPA. Ces résultats ont été confirmés par dosage du gadolinium dans le foie.

Le peptide E3 sélectionné par phage display sur foie apoptotique de souris isolé et perfusé permet de vectoriser des contrastophores magnétiques et de les rendre spécifiques de la phosphatidylsérine, donc de l'apoptose. Cet hexapeptide pourrait donc être greffé à d'autres contrastophores destinés à d'autres modalités d'imagerie, comme la médecine nucléaire, l'imagerie optique ou les ultrasons.

L'originalité de notre travail réside dans la sélection d'un peptide spécifique d'un phospholipide et dans l'application d'une telle méthode à l'IRM. Cela faisant appel à la fois à des compétences dans le domaine de la RMN et de la biologie moléculaire, de multiples collaborations avec des laboratoires extérieurs et au sein même du laboratoire, ont vu le jour tout au long de ce travail.

C'est sans nul doute la pluridisciplinarité du laboratoire d'accueil qui a permis que ce travail ait l'ambition de couvrir la quasi totalité du développement d'un agent de contraste

IRM spécifique de l'apoptose, à partir de l'identification du vecteur jusqu'aux tests *in vivo*, en passant par de multiples caractérisations et applications *in vitro*.

Préparation des solutions et du matériel

Composition des solutions

- **agarose** : LB + 1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 7 g/l agarose.
- **IPTG/Xgal** : 1,25 g IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) et 1 g Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) dans 25 ml de diméthyl formamide.
- **HBSS** : 1,2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5,4 mM KCl, 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl, 4,16 mM NaHCO_3 , 0,134 mM Na_2HPO_4 et 5 mM D-glucose
- **Krebs-Henseleit** : 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 3 mM CaCl_2 , 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM Na_2EDTA (Acide éthylènediaminetétraacétique sel disodique), 25 mM NaHCO_3 et 5,5 mM D-glucose
- **LB** : 5 g/l de NaCl, 10 g/l de tryptone et 5 g/l d'extrait de levure à pH7
- **LB agar** : LB + 15 g/l d'agar
- **LB/IPTG/Xgal Agar** : 1 l LB agar + 1 ml IPTG/Xgal
- **LB_{Tc}** : LB + 10 μ g/ml de tétracycline
- **LB_{Tc} agar** : LB agar + 10 μ g/ml de tétracycline
- **Mélange de séquençage** : 1 μ l de tampon de séquence, 0,5 μ l de dNTP, 1 μ l de ddATP, 1 μ l de ddCTP, 1 μ l de ddGTP, 1 μ l de ddTTP, 6 μ l d'eau distillée et 0,5 μ l de DNA polymérase (Beckman CoulterTM, Fullerton, Californie, USA).
- **Mélange réactionnel ABTS** : 21 ml de solution d'ABTS + 36 μ l H_2O_2
- **Mélange réactionnel OPD** : 10 ml d'acide citrique 0,1 M pH2, 10 ml de disodium phosphate 12 H_2O + 8 μ l H_2O_2 et 200 μ l d'OPD (o-Phénylènediamine dihydrochloride (ICN, Asse-Relegem, Belgique)
- **PEG₆₀₀₀/NaCl** : 20% (w/v) PEG-6000 (polyéthylène glycol - 6000, Acros, Geel, Belgique) + 2,5 M NaCl.
- **PEG₈₀₀₀/NaCl** : 20% (w/v) PEG-8000 (polyéthylène glycol - 8000, ICN, Asse-Relegem, Belgique) + 2,5 M NaCl.
- **PBS** : 137 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 6,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,2 - 7,5)

- **Tampon calcium** : 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 10 mM Hepes et 3 mM NaN₃ à pH 7,5
- **Tampon de fixation** : 2,5 mM CaCl₂, 140 mM NaCl et 10 mM Hepes à pH 7,5
- **TBS** : 50 mM Tris-HCl et 150 mM NaCl à pH 7,5
- **Tampon de réaction pour la TdT** : 0,321 g/l de Na-cacodylate, 0,03 g/l de Tris, 2,5 mg/l de BSA et 0,36 g de CoCl₂.6H₂O
- **TE** : 0,01 M Trizma hydrochloride et 10 mM EDTA à pH 8
- **Solution d'ABTS** : 0,22 g/l d'ABTS (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique), 50 mM de citrate de sodium à pH 4
- **Solution de blocage PBS** + 4 % lait en poudre "gloria"
- **Solution de blocage BSA** PBS + 5 mg/l de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique)

Stérilité des solutions et du matériel

L'entièreté des solutions utilisées durant les cycles de phage display et les étapes d'amplification doivent être stérilisées (autoclavées et filtrées sur filtre à membrane d'acétate de cellulose à pore de 0,45 μ m de diamètre, Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgique). Pour éviter toute contamination il est extrêmement recommandé d'équiper les micropipettes d'un embout à filtre afin d'éviter toute dissémination des phages. Du matériel jetable ou de la verrerie nettoyée à l'eau de Javel avant stérilisation doivent être employés pour éviter toute contamination.

Centrifugeuse

Une centrifugeuse PK121R (ALC international, Milan, Italie), équipée d'un rotor de 0,112 m de rayon (6 x 50 ml) ou d'un rotor de 0,084 m de rayon (24 x 2 ml) a été utilisée dans ce travail. La conversion des rotations par minute (rpm) en nombre de gravité (xg) peut se faire via la formule suivante :

$$xg = 1,1178 \times 10^{-3} \times rpm^2 \times rayon(m) \quad (14.1)$$

Bibliographie

- [1] J. F. R. Kerr. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181 :471–474, 2002.
- [2] G. Majno and I. Joris. Apoptosis, oncosis and necrosis. *American Journal of Pathology*, 146 :3–15, 1995.
- [3] D Kanduc, A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M. G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci, and E. Farber. Cell death : Apoptosis versus necrosis. *International Journal of Oncology*, 21 :165–170, 2002.
- [4] S. Van Cruchten and W. Van den Broeck. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatatomia Histologia Embryologia*, 31 :214–223, 2002.
- [5] S. Sperandio, K. Poksay, I. de Belle, M. J. Lafuente, J. Nasir B. Liu, and D. E. Bredesen. Paraptosis : mediation by map kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell death and Differentiation*, pages 1–10, 2004.
- [6] Y. Wang, X. Li, L. Wang, P. Ding, Y. Zhang, W. Han, and D. Ma. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *Journal of Cell Science*, 117 :1525–1532, 2003.
- [7] P. G. H. Clarke. Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology.*, 181 :195–213, 1990.
- [8] S. Castro-Obregon, R. V. Rao, G. del Rio, S. F. Chen, K. S. Poksay, S. Rabizadeh, S. Vesce, X. Zhang, R. A. Swanson, and D. E. Bredesen. Alternative, nonapoptotic programmed cell death. *Journal of Biochemical Chemistry*, 279 :17543–17553, 2004.
- [9] H. Jaeschke and J. J. Lemasters. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 125 :1246–1257, 2003.
- [10] Jaeschke H, J. S. Gujral, and M. L. Bajt. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver International*, 24 :85–89, 2004.
- [11] Y. Tsujimoto. Apoptosis and necrosis : Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death and Differentiation*, 4 :429–434, 1997.

- [12] P. Nicotera and G. Melino. Regulation of the apoptosis-necrosis switch? *Oncogene*, 23 :2757–2765, 2004.
- [13] H. I. Roach, T. Aigner, and J. B. Kouri. Chondroptosis : A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*, 9 :265–277, 2004.
- [14] R. A. Lockshin and Z. Zakeri. Caspase-independant cell death? *Oncogene*, 00 :1–8, 2004.
- [15] O. Krysko, L. de Ridder, and M. Cornelissen. Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells evidenced by immunogold labelling technique. *Apoptosis*, 9 :495–500, 2004.
- [16] H. Lecoeur, M-C. Prévost, and M-L. Gougeon. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane : A re-consideration of the specificity of the annexin v/propidium iodide assay. *Cytometry*, 44 :65–72, 2001.
- [17] H. R. Stennicke and G. S. Salvesen. Proprieties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387 :17–31, 1998.
- [18] G. M. Cohen. Caspases : the executioners of apoptotis. *Biochemical Journal*, 326 :1–16, 1997.
- [19] J-B. Denault and G. S. Salvesen. Caspases : keys in the ingition of cell death. *Chemical Reviews*, 102 :4489–4499, 2002.
- [20] N. A. Thornberry, H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, K. O. Elliston, J. M. Ayala, F. J. Casano, J. Chin, G. J.-F. Ding, L. A. Egger, E. P. Gaffney, G. Limjuco, O. C. Palyha, S. M. Raju, A. M. Rolando, J. P. Salley, T.-T. Yamin, T. D. Lee, J. E. Shively, M. MacCross, R. A. Mumford, J. A. Schmidt, and M. J. Tocci. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 processing in monocytes. *Nature*, 356 :768–774, 1992.
- [21] G. S. Salvesen. Caspase 8 : igniting the death machine. *Structure*, 7 :225–229, 1999.
- [22] J. Wang, H. J. Chun, W. Wong, and D. M. Spencer and M. J. Lenardo. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 :13884–13888, 2001.
- [23] C. M. Troy and M. L. Shelanski. Caspase-2 redux. *Cell Death and Differentiation*, 10 :101–107, 2003.
- [24] K. Kuida. Caspase-9. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32 :121–124, 2000.
- [25] A. G. Porter and R. U. Jänicke. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and differentiation*, 6 :99–104, 1999.

- [26] H. Wajant. Death receptors. *Essays Biochemistry*, 39 :53–71, 2003.
- [27] F. Rieux-Laucat. Signalisation de l’apoptose par Fas. *Hématologie*, 6(2) :136–142, 2000.
- [28] H. Wajant. The Fas signaling pathway : more than a paradigm. *Science*, 296 :1635–1636, 2002.
- [29] A. Gross. Bcl-2 proteins : Regulators of the mitochondrial apoptotic program. *Life*, 52 :231–236, 2001.
- [30] S. Cory and J. M. Adams. The BCL-2 family : Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews*, 2 :647–656, 2002.
- [31] E. Gulbins, S. Dreschers, and J. Bock. Role of mitochondria in apoptosis. *Physiological Society*, 88 (1) :85–90, 2003.
- [32] D. G. Breckenridge, M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen, and G. C. Shore. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22 :8608–8618, 2003.
- [33] R. Rizzuto, P. Pinton, D. Ferrari, M. Chami, G. Szabadkai, P. J. Magalhaes, F. Di Virgilio, and T. Pozzan. Calcium and apoptosis : facts and hypotheses. *Oncogene*, 22 :8619–8627, 2003.
- [34] J. A. Trapani and M. J. Smyth. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews*, 2 :735–747, 2002.
- [35] A. Kalvelyte, A. Imbrasaitė, A. Bukauskiene, V. K. Verselis, and F. F. Bukauskas. Connexins and apoptotic transformation. *Biochemical Pharmacology*, 66 :1661–1672, 2003.
- [36] C. J. Norbury and B. Zhivotovsky. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23 :2797–2808, 2004.
- [37] H. M. Beere and D. R. Green. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in cell Biology*, 11 (1) :6–10, 2001.
- [38] F. M. Hughes and J. A. Cidlowski. Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Advances in Enzyme Regulation*, 39 :157–171, 1999.
- [39] J. Troppmair and U. R. Rapp. Raf and the road to cell survival : a tale of bad spells, ring bearers and detours. *Biochemical Pharmacology*, 66 :1341–1345, 2003.
- [40] S. M. Van den Eijnde, L. Boshart, C. P. M. Reutelingsperger, C. I. De Zeeuw, and C. Vermeij-Keers. Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry *in vivo* : a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 4 :311–316, 1997.

- [41] D. Dolis, C. Moreau, A. Zachowski, and P. F. Devaux. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophysical Chemistry*, 68 :221–231, 1997.
- [42] P. J. Sims and T. Wiedmer. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thrombosis Haemostasis*, 86 :266–275, 2001.
- [43] V. E. Kagan, J. P. Fabisiak, A. A. Shvedova, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, N. F. Schor, and K. Kawai. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Letters*, 477 :1–7, 2000.
- [44] P. M. Henson, D. L. Bratton, and V. A. Fadok. The phosphatidylserine receptor : a crucial molecular switch? *Nature Reviews*, 2 :627–633, 2001.
- [45] P. Maderna and C. Godson. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1639 :141–151, 2003.
- [46] C. Haanen and I. Vermes. Apoptosis : Programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 64 :129–133, 1996.
- [47] J. Yuan and B. A. Yankner. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407 :802–809, 2000.
- [48] P. H. Krammer. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407 :789–795, 2000.
- [49] M. Aubert and K. R. Jerome. Apoptosis prevention as a mechanism of immune evasion. *International Reviews of Immunology*, 22 :361–371, 2003.
- [50] N. J. Agnantis and A. C. Goussia. Apoptosis and cancer. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 183 (2) :277–287, 1999.
- [51] H.-M. Lorenz, H. Herrmann, T. Winkler, U. Gaipl, and J. R. Kalden. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis*, 5 :443–449, 2000.
- [52] L. S. Honig and N. Rosenberg. Apoptosis and neurologic disease. *Physiology in Medicine*, 108 :317–330, 2000.
- [53] C. Ikonomidou, P. Bittigau, M. J. Ishimaru, D. F. Wozniak, C. Koch, K. Genz, M. T. Price, V. Stefovská, F. Hörster, T. Tenkova, K. Dikranian, and J. W. Olney. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287 :1056–1060, 2000.
- [54] C. Ikonomidou, F. Bosch, M. Miksa, P. Bittigau, J. Vöckler, K. Dikranian, T. Tenkova, V. Stefovská, L. Turski, and J. W. Olney. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283 :70–74, 1999.
- [55] S. P. Yu, C.-H. Yeh, U. Strasser, M. Tian, and D. W. Choi. NMDA receptor-mediated K^+ efflux and neuronal apoptosis. *Science*, 284 :336–338, 1999.

- [56] J. S. Gujral, T. J. Bucci, A. Farhood, and H. Jaeschke. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats : apoptosis or necrosis. *Hepatology*, 33 (2) :397–405, 2001.
- [57] O. M. Martinez and S. M. Krams. Involvement of Fas-Fas ligand interactions in graft rejection. *International Reviews of Immunology*, 18 :527–546, 1998.
- [58] M. Roshal, Y. Zhu, and V. Planelles. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, 6 (1/2) :103–116, 2001.
- [59] Y.-J. Geng, J. E. Phillips, R. P. Mason, and S. W. Casscells. Cholesterol crystallization and macrophage apoptosis : implication for atherosclerotic plaque instability and rupture. *Biochemical Pharmacology*, 66 :1485–1492, 2003.
- [60] T. Mandrup-Poulsen. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochemical Pharmacology*, 66 :1433–1440, 2003.
- [61] K.-M. Debatin. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 53 :153–159, 2004.
- [62] C. P. M. Reutelingspergers H. A. M. Andree, R. Hauptmann, H. C. Hemker, W. Th. Hermens, and G. M. Willems. Binding of vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (9) :4923–4928, 1990.
- [63] C. P. M. Reutelingsperger, J. M. M. Kop, G. Hornstra, and H. C. Hemker. Purification and characterization of a novel protein from bovine aorta that inhibits coagulation. *European Journal of Biochemistry*, 173 :171–178, 1988.
- [64] R. Huber, R. Berendes, A. Burger, H. Luecke, and A. Karshikov. Annexin v : crystal structure and its implications on function. *Behring Institute Mitteilungen*, 91 :107–125, 1992.
- [65] C. Pigault, A. Follenius-Wund, and M. Chabbert. Role of Trp-187 in the annexin v-membrane interaction : A molecular mechanics analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254 :484–489, 1999.
- [66] B. Campos, S. Wang, G. S. Retzinger, M. A. Kaetzel and B. A. Seaton, N. J. Karin, J. D. Johnson, and J. R. Dedman. Mutation of highly conserved arginine residues disrupts the structure and function of annexin v. *Archives of Medical Research*, 30 :360–367, 1999.
- [67] Y. Mo, B. Campos, T. R. Mealy, L. Commodore, J. F. Head, J. R. Dedman, and B. A. Seaton. Interfacial basic cluster in annexin v couples phospholipid binding and trimer formation on membrane surfaces. *The journal of biological chemistry*, 278 (4) :2437–2443, 2003.
- [68] M. K. White and C. Cinti. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*, 285 :105–111, 2004.

- [69] S. Plenchette, R. Filomenko, E. Logette, S. Solier, N. Buron, S. Cathelin, and E. Solary. Analyzing markers of apoptosis *in vitro*. *Methods in Molecular Biology*, 281 :313–331, 2004.
- [70] D. Nonclerq, J. Zanen, G. Toubeau, G. Laurent, and J.-A. Heuson-Stiennon. Apoptosis and cell proliferation in the seminal vesicles and coagulating glands of male syrian hamsters exposed to diethylstilboestrol (DES). *Reproduction, Fertility and Development*, 11 :111–122, 1999.
- [71] M. Leist, I. Gantuer, P. G. Germann, G. Tiegs, and A. Wendel. Murine hepatocyte apoptosis induced *in vitro* and *in vivo* by TNF- α requires transcriptional arrest. *Journal of Immunology*, 153 (4) :1778–1788, 1994.
- [72] E. Kahn, G. Lizard, F. Frouin, J.-C. Bernengo, C. Souchier, G. Bessedé, O. Clément, H. Siitari, P. Gambert, G. Frija, and A. Todd-Pokropek. Confocal analysis of phosphatidylserine externalization with the use of biotinylated annexin v revealed with streptavidin-FITC, -europium, -phycoerythrin or - texas red in oxysterol-treated apoptotic cells. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 23 (1) :47–55, 2001.
- [73] B. Huppertz, H.-G. Frank, and P. Kaufmann. The apoptosis cascade - morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*, 200 :1–18, 1999.
- [74] L. Maneta-Peyret, J.-J. Bessoule, M. Geffard, and C. Cassagne. Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine. *Journal of Immunological Methods*, 108 :123–127, 1998.
- [75] P. A. Rinck. *Magnetic Resonance in Medicine - The basic textbook of the European Magnetic Resonance Forum*. Wissenschaftsverlag, 2003.
- [76] F. G. Blankenberg, R. W. Storrs, L. Naumovski, T. Goralski, and D. Spielman. Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood*, 87 (5) :1951–1956, 1996.
- [77] F. G. Blankenberg, P. D. Katsikis, R. W. Storrs, C. Beaulieu, D. Spielman, J. Y. Chen, L. Naumovski, and J. F. Tait. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood*, 89 (10) :3778–3786, 1997.
- [78] R. Callies, R. M. Sri-Pathmanathan, D. Y. P. Ferguson, and K. M. Brindel. The appearance of neutral lipid signals in the ^1H NMR spectra of a myeloma cell line correlates with the induced formation of cytoplasmic lipid droplets. *Magnetic Resonance in Medicine*, 29 (4) :546–550, 1993.
- [79] A. Ferretti, A. Knijn, E. Iorio, S. Pulciani, M. Giambenedetti, A. Molinari, S. Meschini, A. Stringaro, A. Calcabrini, I. Freitas, R. Strom, G. Arancia, and F. Podo. Biophysical

- and structural characterization of ^1H -NMR-detectable mobile lipid domains in NIH-3T3 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1438 :329–348, 1999.
- [80] M. Di Vito, L. Lenti, A. Knijn, E. Iorio, F. D’Agostino, A. Molinari, A. Calcabrini, A. Stringaro, S. Meschini, G. Arancia, A. Bozzi, R. Strom, and F. Podo. ^1H NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1530 :47–66, 2001.
- [81] J. M. Hakumäki and R. A. Kauppinen. ^1H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 25 :357–362, 2000.
- [82] J. M. Hakumäki, H. Poptani, A.-M. Sandmair, S. Ylä-Herttuala, and R. A. Kauppinen. ^1H NMR detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma : Implications for the *in vivo* detection of apoptosis. *Nature Medicine*, 5 (11) :1323–1327, 1999.
- [83] S. N. O. Williams, M. L. Anthony, and K. M. Brindle. Induction of apoptosis in two mammalian cell lines results in increased levels of fructose-1,6-bisphosphate and CDP-choline as determined by ^{31}P MRS. *Magnetic Resonance in Medicine*, 40 :411–420, 1998.
- [84] M. Brauer. *in vivo* monitoring of apoptosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27 :323–331, 2003.
- [85] S. Hortelano, M.L. Garcia-Martin, S. Cerdan, A. Castrillo, A.M. Alvarez, and L. Bosca. Intracellular water motion decreases in apoptotic macrophages after caspase activation. *Cell Death and Differentiation*, 8 :1022–1028, 2001.
- [86] R. N. Muller. *Contrast agent in whole body MR : operating mechanisms*, *Encyclopedia of NMR*. A. J. Wiley and sons, 1996.
- [87] S. Locke and M. Brauer. Response of the rat liver *in situ* to bromobezene - *in vivo* proton MRI and ^{31}P MRS studies. *Toxicology Applied Pharmacology*, 110 :416–428, 1991.
- [88] J. M. Hakumäki, H. Poptani, A. M. Puumalainen, S. Loimas, L. A. Paljarvi, S. Ylä-Herttuala, and R. A. Kauppinen. Quantitative ^1H nuclear magnetic resonance diffusion spectroscopy of BT4C rat glioma during thymidine kinase-mediated gene therapy *in vivo* : identification of apoptotic response. *Cancer Research*, 58 (17) :3791–3799, 1998.
- [89] P. Winter and N. Bansal. Triple-quantum-filtered ^{23}Na NMR of subcutaneously implanted 91 gliosarcoma in the rat in the presence of TmDOTP. *Journal of Magnetic Resonance*, 152 :70–80, 2001.
- [90] E. A. Schellenberger, A. Bogdanov, D. Högemann, J. Tait, R. Weissleder, and L. Josephson. Annexin v-CLIO : A nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. *Molecular Imaging*, 1 (2) :102–107, 2002.

- [91] M. Zhao, D. A. Beauregard, L. Loizou, B. Davletov, and K. M. Brindle. Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nature Medicine*, 7 (11) :1241–1244, 2001.
- [92] A. Neves, A. S. Krishnan, M. de Backer, and K. M. Brindle. Development of novel contrast agents to detect apoptosis using MRI. *European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology*, Copenhagen :64, 2004.
- [93] F. G. Blankenberg, P. D. Katsikis, J. F. Tait, R. E. Davis, L. Naumovski, K. Ohtsuki, S. Kopywoda, M. J. Abrams, M. Darkes, R. C. Robbins, H. T. Maecker, and H. W. Strauss. *in vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 :6349–6354, 1998.
- [94] F. G. Blankenberg, P. D. Katsikis, J. F. Tait, R. E. Davis, L. Naumovski, K. Ohtsuki, S. Kopywoda, M. J. Abrams, and H. W. Strauss. Imaging of apoptosis (programmed cell death) with ^{99m}Tc annexin v. *The Journal of Nuclear Medicine*, 40 (1) :184–191, 1999.
- [95] H. D’Arceuil, W. Rhine, A. de Crespigny, M. Yenari, J.F. Tait, W. H. Strauss, T. Engelhorn, A. Kastrup, M. Moseley, and F. G. Blankenberg. ^{99m}Tc annexin v imaging of neonatal hypoxic brain injury. *Stroke*, 31 :2692–2700, 2000.
- [96] J Narula, E. R. Acio, N. Narula, L. E. Samuels, B. Fyfe, D. Wood, J. M. Fitzpatrick, P. N. Raghunath, J. E. Tomaszewski, C. Kelly, N. Steinmetz, A. Green, J.F. Tait, J. Leppo, , F. G. Blankenberg, D. Jain, and W. H. Strauss. Annexin-v imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nature Medicine*, 7 :1347–1352, 2001.
- [97] S. Zijlstra, J. Gunawan, and W. Burchert. Synthesis and evaluation of a ^{18}F -labelled recombinant annexin-v derivative, for identification and quantification of apoptotic cells with PET. *Applied Radiation and Isotopes*, 58 (2) :201–207, 2003.
- [98] M. Glaser, D. R. Collingridge, E. O. Aboagye, L. Bouchier-Hayes, O. C. Hutchinson, S. J. Martin, P. Price, F. Brady, and S. K. Luthra. Iodine-124 labelled annexin-v as a potential radiotracer to study apoptosis using positron emission tomography. *Applied Radiation and Isotopes*, 58 (1) :55–62, 2003.
- [99] G. J. Czarnota, M. C. Kolios, J. Abraham, M. Portnoy, F. P. Ottensmeyer, J. W. Hunt, and M. D. Sherar. Ultrasound imaging of apoptosis : high-resolution non-invasive monitoring of programmed cell death *in vitro*, *in situ* and *in vivo*. *British Journal of Cancer*, 81 (3) :520–527, 1999.
- [100] F. S. Villanueva, W. R. Wagner, M. A. Vannan, and J. Narula. Targeted ultrasound imaging using microbubbles. *Cardiology Clinics*, 22 (2) :283–298, 2004.

- [101] E.A. Schellenberger, D. Sosnovik, R. Weissleder, and L. Josephson. Magneto/optical annexin v, a multimodal protein. *Bioconjugate chemistry*, 15(5) :1062–1067, 2004.
- [102] E.A. Schellenberger, A. Bogdanov Jr., A. Petrovsky, V. Ntziachristos, R. Weissleder, and L. Josephson. Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy. *Neoplasia*, 5(3) :187–192, 2003.
- [103] M. F. Cordeiro, L. Guo, V. Luong, G. Harding, W. Wang, H. E. Jones, S. E. Moss, A. M. Sillito, and F. W. Fitzke. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in rétinale neurodegeneration. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (36) :13352–13356, 2004.
- [104] G. P. Smith. Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Nature*, 228 :1315–1317, 1985.
- [105] S. Cabilly. The basic structure of filamentous phage and its use in the display of combinatorial peptide libraries. *Methods in molecular biology*, 87 :129–136, 1998.
- [106] G. P. Smith and V. A. Petrenko. Phage display. *Chemical Revreview*, 97 :391–410, 1997.
- [107] J. B. Burritt, C. W. Bond, K. W. Doss, and A. J. Jesaitis. Filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Anal Biochemistry*, 238 :1–13, 1996.
- [108] C. Rader and C. F. Barbas III. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Current opinion in biotechnology*, 8 :503–508, 1997.
- [109] C. Rhyner, R. Kodzius, and R. Cramer. Direct selection of cDNAs from filamentous phage surface display libraries : potential and limitations. *Current pharmaceutical biotechnology*, 3 :13–21, 2002.
- [110] S. S. Sidhu, H. B. Lowman, B. C. Cunningham, and J. A. Wells. Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods in enzymology*, 217 :333–363, 2000.
- [111] M. Szardenings, S. Törnroth, F. Mutulis, R. Muceniece, K. Keinänen, A. Kuusinen, and J. E. S. Wikberg. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1. *The journal of biological chemistry*, 272 (44) :27943–27948, 1997.
- [112] E. J. Noronha, X. Wang, S. A. Desai, T. Kageshita, and S. Ferrone. Limited diversity of human scFv fragments isolated by panning a synthetic phage-display scFv with cultured human melanoma cells. *The journal of immunology*, 161 :2968–2976, 1998.
- [113] A. Odermatt, A. Audigé, C. Frick, B. Vogt, B. M. Frey, F. J. Frey, and L. Mazzucchelli. Identification of receptor ligands by screening phage display peptide libraries *ex vivo* on microdissected kidney tubules. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12 :308–316, 2001.

- [114] R Pasquaini, E. Koivunen, and E. Ruoslahti. αv integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature biotechnology*, 15 :542–546, 1997.
- [115] R Pasquaini. Vascular targeting with phage display libraries. *The quarterly journal of nuclear medicine*, 43 (2) :159–162, 1999.
- [116] D. Rajotte, W. Arap, M. Hagedorn, E. Koivunen, R. Pasqualini, and E. Ruoslahti. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. *The Journal of Clinical Investigation*, 102 :430–437, 1998.
- [117] A. Fernandez-Gacio, M. Uguen, and J. Fastrez. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends in biotechnology.*, 21 (9) :408–414, 2003.
- [118] E. Koivunen, W. Arap, D. Rajotte, J. Lahdenranta, and R. Pasqualini. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *The Journal of Nuclear Medicine*, 40 :883–888, 1999.
- [119] R Pasquaini and E. Ruoslahti. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 380 :364–380, 1996.
- [120] V. I. Romanov. Phage display selection and evaluation of cancer drug targets. *Current Cancer Drug Targets*, 3 :119–129, 2003.
- [121] J. K. Scott and G. P. Smith. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249 :386–390, 1990.
- [122] S. Hogan, K. Rookey, and R. Ladner. URSA : ultra rapid selection of antibodies from an antibody phage display library. *BioTechniques*, 38 :536–538, 2005.
- [123] *Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery*. A. J. Wiley and sons, 1998.
- [124] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment : RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249 :505–510, 1990.
- [125] D. Irvine, C. Tuerk, and L. Gold. SELEXION systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *Journal of Molecular Biology*, 222 :739–761, 1991.
- [126] G. F. Joyce. *in vitro* evolution of nucleic acids. *Current Opinion in structural biology*, 4 :331–336, 1994.
- [127] S. D. Jayasena. Aptamers : An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry*, 45 (9) :1628–1650, 1999.
- [128] M. Famulok, G. Mayer, and M. Blind. Nucleic acid aptamers - from selection *in vitro* to applications *in vivo*. *Accounts of chemical research*, 33 :591–599, 2000.
- [129] G. P. Smith. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/phagedisplaywebsiteindex.html>. *Université de Missouri*, Columbia :USA.

- [130] New England Biolabs. <http://www.neb.com/nebecomm/manualfiles/manuale8120.pdf>. Beverly, MA :USA.
- [131] X.-W. Zhang and B. Xu. Differential regulation of P53, c-Myc, Bcl-2, Bax and AFP protein expression, and caspase activity during 10-hydroxycamptothecin-induced apoptosis in Hep G2 cells. *Anti-Cancer Drugs*, 11 :747–756, 2000.
- [132] J. Ogasawara, R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda, and S. Nagata. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364 :806–809, 1993.
- [133] K. A. Kukanskis, Z. Siddiquee, R. V. Shohet, and H. R. Garner. Mix of sequencing technologies for sequence closure : An example. *BioTechniques*, 28 :630–634, 2000.
- [134] A. Ikai. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, 88 (6) :1895–1898, 1980.
- [135] ExPASy Proteomics tools. <http://www.exapsy.org/tools/pi-tool.html>.
- [136] J. Aoki, Y. Nagai, H. Hosono, K. Inoue, and H. Arai. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A₁. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1582 :26–32, 2002.
- [137] P. Williamson and R. A. Schlegel. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585 :53–63, 2002.
- [138] A. Srivastava, M. A. Quinn-Allan, S. W. Kim, W. H. Kane, and B. R. Lentz. Soluble phosphatidylserine binds to a single identified site in the C2 domain of human factor v_a. *Biochemistry*, 40 :8246–8255, 2001.
- [139] D. A. Lewis, K. D. Moore, and T. L. Ortel. Factor viii Arg₂₃₀₄ → his binds to phosphatidylserine and is a functional cofactor in the factor x-ase complex. *Thrombosis and Haemostasis*, 85 :260–264, 2001.
- [140] A. Srivastava, J. Wang, R. Majumder, A. R. Rezaie, J. Stenflo, C. T. Esmon, and B. R. Lentz. Localization of phosphatidylserine binding sites to structural domains of factor x_a. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (3) :1855–1863, 2002.
- [141] M. M. Mogensen, A. Malik, M. Piel, V. Bouckson-Castaing, and M. Bornens. Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites : the role of ninein. *Journal of Cell Science*, 113 :3013–3023, 2000.
- [142] J. Segers. *Applications de la technique du phage display à l'imagerie moléculaire par IRM*. PhD thesis, Université de Mons-Hainaut, Belgique, 2004.
- [143] AMBER Assisted Model Building with Energy Refinement. <http://amber.ch.ic.ac.uk/>.
- [144] CHARMM Chemistry at Harvard macromolecular Mechanics. <http://www.accelrys.com/insight/charmm.html>.

- [145] Allinger's Molecular Mechanics. <http://europa.chem.uga.edu/>.
- [146] E. Lindahl, B. Hess, and D. Van der Spoel. Gromacs 3.0 : A package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modelling*, 7 :306–317, 2001 - <http://www.gromacs.org>.
- [147] H. J. C. Berendsen, D. Van der Spoel, and R. Van Drunen. Gromacs 3.0 : A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91 :43–56, 1995.
- [148] COMPASS Condensed phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies. <http://www.accelrys.com/insight/compass/overview.html>.
- [149] OPLS Optimized Potentials for Liquid State. <http://zarbi.chem.yale.edu/>.
- [150] D. Seveno. *Dynamic wetting of fibers*. PhD thesis, Faculté Polytechnique de Mons, Belgique, 2004.
- [151] E. Lindahl. *Computational modeling of biological membrane and interface dynamics*. PhD thesis, Royal Institute of Technology, Stockholm, 2001.
- [152] M. Hyvonen. *Molecular Dynamics Simulation on phospholipid membranes*. PhD thesis, University of Oulu, Finlande, 2001.
- [153] L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, and K. Schulten. Namd2 : greater scalability for parallel molecular dynamics. *Journal of Computational Physics*, 151 :283–312, 1999 - <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd>.
- [154] TINKER Software Tools for Molecular Design. <http://dasher.wustl.edu/tinker/>.
- [155] Warren L. Delano. The pymol molecular graphics system. delano scientific llc, san carlos, ca, usa. <http://www.pymol.org>.
- [156] S. A. Pandit, D. Bostick, and M. L. Berkowitz. Mixed bilayer containing dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylserine : lipid complexation, ion binding and electrostatics. *Biophysical Journal*, 85 :3120–3131, 2003.
- [157] S. A. Pandit and M. L. Berkowitz. Molecular modeling simulation of dipalmitoylphosphatidylserine bilayer with na^+ counterions. *Biophysical Journal*, 82 :1818–1827, 2002.
- [158] M. F. Lensink, B. Christiaens, J. Vanderkerckhove, A. Prochiantz, and M. Rosse-
nen. Penetratin-membrane association W48/R52/W56 shield the peptide from the aqueous phase. *Biophysical Journal*, 88 :939–952, 2005.
- [159] J. A. Sanchez-Alcazar, J. G. Ault, A. Khodjakov, and E. Schneider. Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin induced apoptosis in jurkat cells. *Cell death and Differentiation*, 7 (11) :1090–1100, 2000.

- [160] L. Vander Elst, S. Laurent, and R. N. Muller. Multinuclear magnetic resonance characterization of paramagnetic contrast agent. The manifold effects of concentration and counterions. *Investigative Radiology*, 33 (11) :828–834, 1998.
- [161] S. Laurent, L. Vander Elst, F. Copoix, and R.N. Muller. Stability of MRI paramagnetic contrast media. a proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Investigate Radiology*, 36 :115–122, 2001.
- [162] S. Laurent, L. Vander Elst, S. Houzé, N. Guérit, and R. N. Muller. Synthesis and characterization of various benzyl diethylenetriaminepentaacetic acids (dtpa) and their paramagnetic complexes, potential contrast agents for magnetic resonance imaging. *Helvetica Chimica Acta*, 83 :394–406, 2000.
- [163] B. Van Beers, C. Sempoux, R. Materne, M. Delos, and A. M. Smith. Biodistribution of ultrasmall iron oxide particles in the rat liver. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 13 :594–599, 2001.
- [164] D. Pouliquen, J.J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, and P. Jallet. Iron oxide nanoparticles for use as MRI contrast agent : pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic Resonance Imaging*, 9 :275–283, 1991.
- [165] R.-L. Hong, C.-J. Huang, Y.-L. Tseng, V. F. Pang, S.-T. Chen, J.-J. Liu, and F.-H. Chang. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice : Is surface coating with polyethylene glycol beneficial?. *Clinical Cancer Research*, 5 :3645–3652, 1999.
- [166] Y. Nishimura, Y. Hirabayashi, Y. Matsuzaki, P. Musette, A. Ishii, H. Nakauchi, T. Inoue, and S. Yonehara. *In vivo* analysis of fas antigen-mediated apoptosis : effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver. *International Immunology*, 9 (2) :307–316, 1997.