



Laboratoire de RMN
Département de Chimie Organique

FACULTE DES SCIENCES

**Contributions à la stratégie de développement
d'agents de contraste spécifiques de
l'angiogenèse et de l'apoptose**

Directeur : Pr. Robert N. Muller
Laboratoire de Résonance
Magnétique Nucléaire
Département de Chimie
Organique

Mémoire présenté par
Catherine Laumonier
pour l'obtention du grade légal de
Licencié en Sciences Biologiques
Juin 2001

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, Département de Chimie Organique, sous la direction des Professeurs R. N. Muller et L. Vander Elst, et avec la collaboration active de J. Segers.

Je remercie le Dr D. Nonclercq pour son aide lors des expérimentations histologiques, Mr J-J. Goval pour l'acquisition des images de microscopie confocale, le Prof. A. Belayew pour ses nombreux conseils ainsi que le Dr L. Devy pour m'avoir initiée à la technique du modèle de l'aorte.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le contexte du développement d'agents de contraste spécifiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Il se compose de deux parties: l'adaptation pour l'IRM d'un modèle d'angiogenèse, le modèle de l'aorte, et la sélection de vecteurs par la technique du phage display dans le but d'obtenir un agent de contraste spécifique du phénomène d'apoptose.

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux à partir de la vascularisation préexistante. Elle intervient dans de nombreuses pathologies, permettant notamment la croissance tumorale et la dissémination des cellules cancéreuses pour former des métastases.

Le modèle de l'aorte, culture de cellules endothéliales activées formant des néovaisseaux à partir d'un segment d'aorte, a été adapté pour l'étude IRM. La présence des vaisseaux a été confirmée par microscopie optique et confocale. La résolution de l'IRM n'a pas permis de mettre en évidence les vaisseaux angiogéniques.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène également mis en cause dans de nombreuses pathologies. L'apoptose se caractérise par une série de modifications. Sa mise en évidence pourrait être réalisée grâce à des agents de contraste spécifiques. Des peptides de forte affinité pour les sites apoptotiques ont été sélectionnés par la technique du phage display. Six candidats ont ainsi été isolés. Le couplage de ce peptide à une entité magnétiquement active fournira un agent de contraste pour l'IRM dont la spécificité sera testée.

Mots clés : angiogenèse, modèle de l'aorte, apoptose, phage display, IRM, phosphatidylsérine.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	2
1 L'ANGIOGENÈSE	2
1.1 Introduction	2
1.2 Structure histologique des vaisseaux	3
1.2.1 L'intima	4
1.2.2 La média	5
1.2.3 L'adventice	5
1.2.4 Les capillaires et les veines	5
1.3 L'angiogenèse tumorale	6
1.4 Mécanismes de l'angiogenèse	9
1.4.1 Activation de l'angiogenèse	9
1.4.2 Les médiateurs positifs de l'angiogenèse	10
1.4.3 Les médiateurs négatifs de l'angiogenèse	13
2 L'APOPTOSE	14
2.1 Définition de l'apoptose	14
2.2 Étapes morphologiques de l'apoptose	15
2.3 Rôles de l'apoptose	16
2.4 Inducteurs de l'apoptose	17
2.5 Mécanismes moléculaires de l'apoptose	18
2.5.1 Les caspases	18
2.5.2 Les récepteurs de mort cellulaire	19
2.5.3 Les ligands de mort cellulaire	21
2.5.4 Les cascades inductrices d'apoptose	21
2.5.5 La famille Bcl-2	22
2.5.6 Rôle de la mitochondrie et du cytochrome c dans le phénomène de l'apoptose	23
2.5.7 Régulation génétique de l'apoptose	24
2.6 Les pathologies associées à l'apoptose	25
3 TECHNIQUE DU PHAGE DISPLAY	26
3.1 Principe du phage display	27
3.2 Le vecteur utilisé dans la technique du phage display	27
3.2.1 Qu'est ce qu'un phage ?	27
3.2.2 Les phages M13	28
3.3 Sélection des phages	30
4 RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE BIOMÉDICALE	32
4.1 Principe	32
4.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM)	33
4.3 Les agents de contraste	34
4.4 IRM et angiogenèse	35
II. BUT DU TRAVAIL	37
III. MATERIEL ET METHODES	38
1 MODÈLE DE L'AORTE DE RAT	38
1.1 Le prélèvement de l'aorte	38
1.2 Mise en culture des segments d'aorte	39

1.3	<i>Choix du marqueur des vaisseaux</i>	41
1.4	<i>Observation des vaisseaux angiogéniques</i>	41
2	PHAGE DISPLAY	42
2.1	<i>Amplification de la librairie de phages</i>	42
2.1.1	Infection	42
2.1.2	Récupération des phages	43
2.2	<i>Phage display in vitro</i>	43
2.2.1	Préparation des liposomes	45
2.2.2	Passage de la librairie de phages sur les liposomes	45
2.3	<i>Phage display ex vivo</i>	46
2.3.1	Perfusion du foie de souris	46
2.3.2	Elimination des phages qui présentent une affinité pour les structures hépatiques	48
2.3.3	Sélection des phages qui présentent une affinité pour les structures apoptotiques	49
2.4	<i>Dosage des phages par ELISA</i>	50
2.5	<i>Evaluation de l'affinité des phages envers PS</i>	50
2.6	<i>Détermination des phages de plus forte affinité pour la phosphatidylsérine</i>	51
2.7	<i>Confirmation de la présence d'apoptose par histologie</i>	51
2.7.1	Préparation des échantillons pour l'analyse histologique	52
2.7.2	Colorations histologiques	52
2.7.3	Méthode TUNEL	52
2.7.4	Calcul de l'indice apoptotique	54
	IV. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	55
1	MODÈLE DE L'AOORTE	55
1.1	<i>Microscopie optique</i>	55
1.2	<i>Imagerie par résonance magnétique</i>	57
1.3	<i>Microscopie confocale</i>	60
2	PHAGE DISPLAY	62
2.1	<i>Courbe de titration</i>	62
2.2	<i>Phage display in vitro</i>	64
2.3	<i>Phage display ex vivo</i>	65
2.3.1	Evaluation du déclenchement de l'apoptose dans les foies de souris	65
2.3.2	Dosage des phages interagissant exclusivement avec les structures apoptotiques	70
2.3.3	Identification des phages de plus forte affinité pour PS	73
	V. DISCUSSION	74
1	MODÈLE DE L'AOORTE	74
2	SÉLECTION DES PHAGES INTERAGISSANT AVEC LA PHOSPHATIDYLSÉRINE	76
	VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	78
	VII. BIBLIOGRAPHIE	79

AVANT- PROPOS

Le développement d'un cancer passe par plusieurs étapes. Très tôt, les cellules cancéreuses échappent au contrôle cellulaire et au mécanisme d'apoptose destinés à protéger l'organisme contre la prolifération de cellules au comportement aberrant. Lorsque la masse tumorale devient trop importante pour être oxygénée par simple diffusion, les cellules cancéreuses stimulent l'angiogenèse. La formation d'un nouveau réseau vasculaire offre à la tumeur la possibilité de croître, mais aussi de produire des métastases. L'agressivité d'une tumeur et, par conséquent, le pronostic médical peuvent être corrélés à l'importance de la microvascularisation. Le développement de techniques de visualisation et de quantification de l'angiogenèse est donc primordial non seulement pour le diagnostic et le pronostic, mais aussi pour le choix thérapeutique et son suivi. Longtemps, les seules méthodes d'évaluation du réseau vasculaire intra-tumoral ont été d'une part le dosage de molécules témoins dans les fluides corporels, et d'autre part les examens histologiques et immunochimiques sur biopsie. Le comptage microscopique des capillaires dans les tumeurs fournit une aide précieuse mais ne constitue pas une approche clinique idéale : invasive par définition, la méthode est aussi sujette à des erreurs liées à la localisation du prélèvement de l'échantillon au sein d'une tumeur souvent hétérogène. L'évaluation de l'activité angiogénique par imagerie apporterait une aide clinique précieuse pour autant que la méthode soit non invasive, quantitative et répétable à intervalles fréquents. A ce jour, seule la résonance magnétique nucléaire (RMN) présente ces caractéristiques. Ainsi, la RMN permettrait de suivre l'efficacité de la thérapie anti-tumorale basée sur l'inhibition de l'angiogenèse. Comme pour d'autres traitements, ceux de type anti-angiogénique provoquent l'apoptose des cellules tumorales (hypoxie). L'évaluation de la proportion de cellules tumorales apoptotiques par imagerie serait une autre approche pour évaluer l'efficacité d'une thérapie anti-cancéreuse. Cette dernière technique nécessite le développement d'agents de contraste spécifiques des deux phénomènes.

I.INTRODUCTION

1 L'ANGIOGENESE

1.1 Introduction

Le développement d'une tumeur, appelé carcinogenèse, se déroule selon la séquence suivante : masse cellulaire anormale, angiogenèse et métastases. Ces différentes étapes seront abordées tour à tour, afin de bien comprendre le rôle essentiel de l'angiogenèse au niveau de l'évolution d'un cancer.

La **carcinogenèse** est le processus conduisant à la formation du cancer, qui correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme échappant aux mécanismes de différenciation et de régulation de leur multiplication [1]. Ces cellules sont capables d'envahir et de détruire le tissu sain avoisinant, et de migrer à distance, via la circulation, pour former des métastases. La genèse du cancer se déroule schématiquement en trois étapes (*figure 1*) : tout d'abord, l'initiation, qui correspond à une lésion rapide de l'ADN suite à l'exposition à un carcinogène ; la promotion, qui est la deuxième étape, est l'exposition prolongée à un agent qui entretient et stabilise la lésion initiée et la dernière étape, la progression qui est l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de différenciation, l'invasion locale et métastatique.

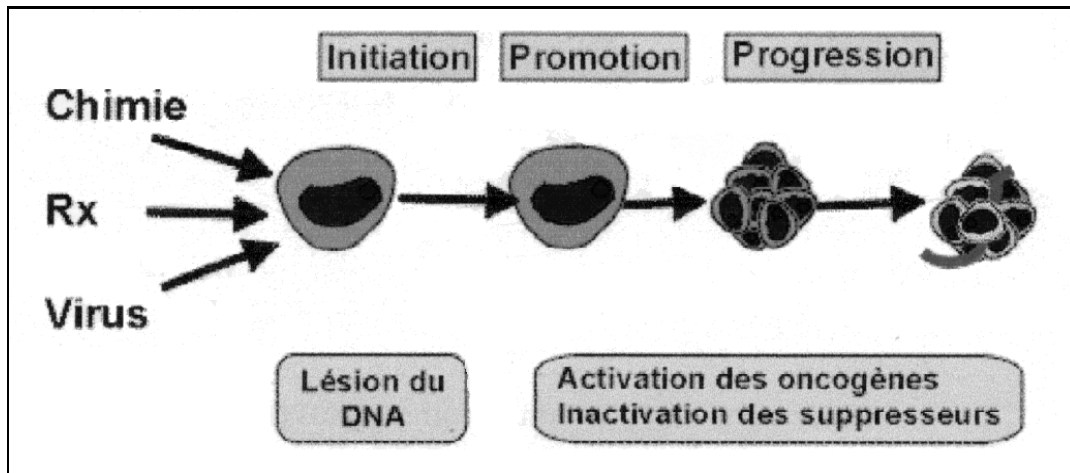


Fig.1. Schéma du processus de cancérisation (d'après réf. [2]).

La **vasculogénèse** est la formation de vaisseaux sanguins à partir de cellules précurseurs comme les hémangioblastes ou les angioblastes. L'**angiogénèse**, quant à elle, est la formation des vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. La vasculogénèse n'a lieu que pendant le développement embryonnaire, tandis que l'angiogénèse n'est activée pendant la vie postnatale et adulte qu'en réponse à des besoins physiologiques. Ainsi, l'angiogénèse intervient lors de la formation de l'os enchondral, au cours du cycle menstruel, ou lors de la réparation tissulaire. L'angiogénèse joue un rôle dans de nombreuses pathologies. Par exemple, lorsqu'une masse tumorale se forme, elle induit la formation de néovaisseaux destinés à l'irriguer.

1.2 Structure histologique des vaisseaux

Les vaisseaux présentent trois couches histologiques successives [3]. En partant de la lumière, on rencontre l'intima, la média et l'adventice (*figure 2*). Les différences qui existent entre les types de vaisseaux (artères, capillaires et veines) résident au niveau du diamètre mais également au niveau des proportions des divers constituants. La description histologique qui suit est réalisée en utilisant la structure des artères comme trame de fond. Les différences éventuelles sont reprises après cette description générale.

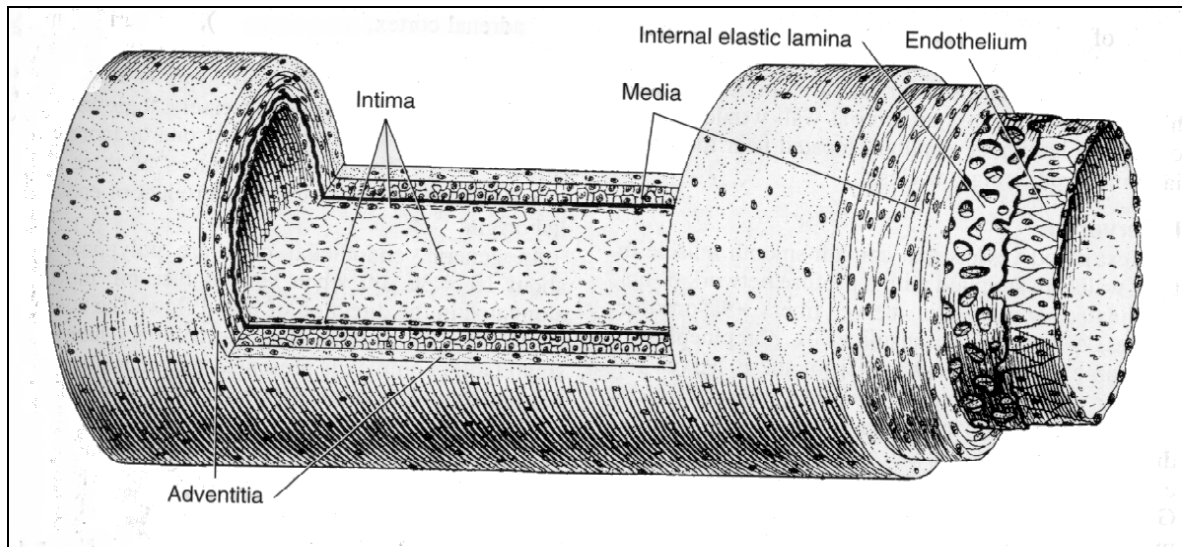


Fig.2. Structure d'un vaisseau (d'après réf. [3]) .

1.2.1 L'intima

L'intima est en contact direct avec le flux sanguin. Elle est composée de 3 couches : l'endothélium, la couche sous-endothéliale et la limitante élastique interne. L'**endothélium** est un épithélium monostratifié pavimenteux non fenestré dans la plupart des vaisseaux, seuls certains capillaires présentent des fenestrations. Ces cellules sont très cohérentes et présentent les trois types de jonctions (occludens, adhérens et GAP). Il n'y a pas de cellules souches, les cellules endothéliales sont remplacées par division des cellules voisines. Une cellule endothéliale a une durée de vie de +/- 1000 jours, l'endothélium est donc relativement quiescent. Les cellules endothéliales sont bordées et soutenues par une lame basale qui sépare l'endothélium de la couche suivante. La **couche sous-endothéliale** est une couche de conjonctif. La **limitante élastique interne** est un anneau épais d'élastine.

Les rôles de l'intima sont multiples. Elle est responsable de la modulation des échanges métaboliques entre le sang et les couches plus profondes (transcytose) et des échanges gazeux (diffusion). Elle sécrète les éléments de la lame basale (collagène III, collagène IV, laminine et GAG), des facteurs de croissance, des agents anticoagulants, des facteurs myorelaxants, un activateur de plasminogène (qui intervient dans la fibrinolyse), et divers enzymes. Elle est également responsable de la capture et de la fixation de calcium.

1.2.2 La média

La média est composée essentiellement de l'alternance de **lames élastiques** et de **fibres musculaires lisses**. Les lames élastiques sont constituées de fibres d'élastine spiralées dont le sens de la spirale alterne d'une couche à l'autre, afin de constituer un renfort mécanique. Ainsi, elles maintiennent la lumière ouverte, même en cas de forte diminution de la pression sanguine. En outre, les lames élastiques contrebalancent les effets brutaux d'élévation de pression dans les grosses artères lors de la systole ventriculaire. Les cellules musculaires lisses régulent le flux sanguin. Elles sont sous le contrôle du système nerveux végétatif et permettent des contractions toniques ou spasmodiques. Les contractions toniques permettent une adaptation fine du diamètre artériel et donc la régulation de la pression sanguine. Les contractions spasmodiques, très intenses et de courte durée réduisent ou arrêtent totalement le flux sanguin.

1.2.3 L'adventice

Cette dernière couche est composée en grande partie par du tissu conjonctif. Elle renferme également du tissu adipeux brun et de nombreuses cellules du système immunitaire. Elle est le siège du nervi vasorum et du vaso vasorum, respectivement responsables de l'innervation et de l'irrigation du vaisseau.

1.2.4 Les capillaires et les veines

Les capillaires présentent une structure beaucoup plus simple, ils ne sont composés que d'un endothélium et de péricytes qui sont des cellules qui entourent le cylindre formé par les cellules endothéliales. On rencontre trois types de capillaires : les capillaires continus, les capillaires fenestrés et les capillaires discontinus. Les capillaires discontinus sont constitués de cellules endothéliales non jointives, contrairement aux capillaires continus, et laissent passer très facilement des cellules dans la circulation. Les capillaires fenestrés, quant à eux, présentent des pores de 60 à 80 nm de diamètre. En comparaison avec les artères, dans les veines, la média est beaucoup plus réduite. De plus, la proportion d'élastine prend le dessus sur la quantité de muscle lisse. L'adventice quant à elle, gagne en épaisseur. Au niveau de certaines veines, l'endothélium forme des replis qui constituent les valvules empêchant le retour veineux.

1.3 L'angiogenèse tumorale

La première observation de l'activation de l'angiogenèse pendant la formation des tumeurs date d'une centaine d'années. L'hypothèse que les tumeurs produisent une substance « angiogénique » a été avancée dès 1968. En 1971, Folkman [4] propose que la croissance tumorale ainsi que le développement des métastases dépendent de l'angiogenèse. Contrairement à l'angiogenèse embryonnaire, l'angiogenèse tumorale se fait exclusivement par sprouting, c'est à dire par ramification des vaisseaux existants. Le sprouting comprend 3 étapes : l'initiation, la progression et la terminaison (*figure 3*). Durant l'initiation, les cellules endothéliales forment une sorte de bourgeon, les cellules de support les accompagnant durant leur progression. Pour permettre le passage du bourgeon, la matrice extracellulaire est dégradée par l'action de protéinases. La progression est l'élongation de ce bourgeon qui est permise par la prolifération des cellules endothéliales et par le recrutement de péricytes. La terminaison correspond à l'apparition de la matrice extracellulaire [5].

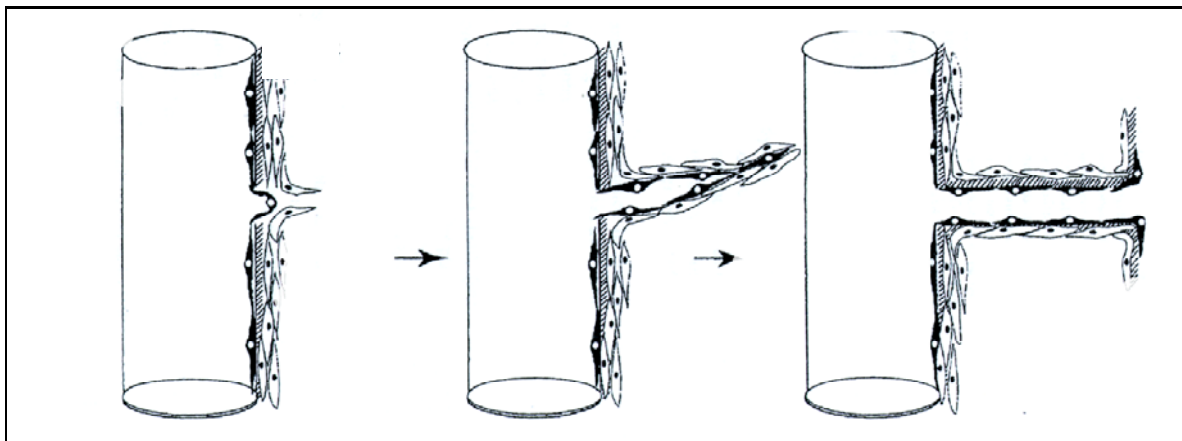


Fig.3. Angiogenèse tumorale (d'après réf. [6]).

Les vaisseaux tumoraux ont un rôle et une structure anormaux. A l'inverse des vaisseaux sains, la vascularisation tumorale est extrêmement désorganisée, les vaisseaux sont tortueux, dilatés, excessivement ramifiés et présentent des diamètres inégaux. En outre, les cellules musculaires lisses n'ont pas les mêmes propriétés contractiles que celles des vaisseaux sains. Tout ceci a un effet sur le flux sanguin tumoral : la circulation au sein des tumeurs est chaotique et variable [7]. Les conséquences de ce type de flux sanguin sont la formation de régions hypoxiques et acides dans la tumeur.

Les vaisseaux tumoraux sont fortement perméables. En effet, ils présentent des fenestrations ; les jonctions entre les cellules endothéliales sont moins abondantes et la membrane basale est discontinue, voire absente. De plus, les cellules endothéliales ont une forme anormale et envoient des projections dans la lumière des vaisseaux. L'endothélium des vaisseaux tumoraux exprime des molécules d'adhésion. Cette expression est modulée par des cytokines et des molécules angiogéniques sécrétées par les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire. Par exemple, le VEGF¹ et le TNF- α ² diminuent leur expression tandis que le bFGF³ et le TGF- β ¹⁴ activent leur expression.

L'angiogenèse est indispensable à la croissance tumorale. En effet, une tumeur est constituée de cellules dont la multiplication est devenue anarchique. Elles échappent aux mécanismes de différenciation et de régulation de leur division. Elles forment donc une masse au sein de l'organisme, qu'on appelle néoplasme. Celle-ci continue à croître jusqu'à une certaine taille. Si la masse tumorale devient trop importante, l'apport de nutriments et d'oxygène vers les régions centrales est de moins en moins efficace et ces régions deviennent nécrotiques. On peut donc affirmer que sans angiogenèse, les tumeurs ne peuvent croître au delà d'une taille définie par les capacités de diffusion et de progression des gaz et nutriments.

Une **métastase** est l'apparition d'une tumeur secondaire distante de la tumeur initiale. Il est évident que les vaisseaux angiogéniques, en irriguant les masses tumorales, augmentent la probabilité de migration des cellules tumorales, à travers l'entièreté de l'organisme via la circulation. Bien sûr, l'angiogenèse n'est pas seule responsable de l'invasion de l'organisme par une tumeur. Selon sa localisation, la tumeur peut passer d'un tissu à l'autre et se propager de proche en proche. Si le tissu voisin est un capillaire, il y a passage de cellules cancéreuses dans la circulation. Notons que ces cellules colonisatrices peuvent également emprunter le circuit lymphatique. Le pouvoir de produire des métastases et le pronostic sont corrélés au degré de vascularisation d'une tumeur: plus une tumeur est vascularisée, plus les chances de survie sont faibles [8].

¹ VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

² TNF- α (Facteur nécrosant tumoral)

³ bFGF (Facteur de croissance fibroblastique basique)

⁴ TGF- β 1 (Facteur de croissance tumoral β 1)

Les cellules tumorales ont un effet stimulateur sur les cellules endothéliales par le biais de médiateurs tel que le bFGF ou le VEGF, en induisant la néovascularisation (*figure 4*). Ces mêmes médiateurs stimulent de façon paracrine la croissance des cellules tumorales par l'intermédiaire de médiateurs tel que le bFGF ou le VEGF. L'endothélium vasculaire libère également des facteurs de croissance qui stimulent les cellules cancéreuses [9]. Par conséquent, la néovascularisation apporte non seulement les nutriments et l'oxygène, mais aussi les facteurs de croissance nécessaires aux cellules tumorales. Les cellules endothéliales en division fabriquent des facteurs comme le IGF-1⁵, le PDGF⁶, des cytokines et bien d'autres facteurs.

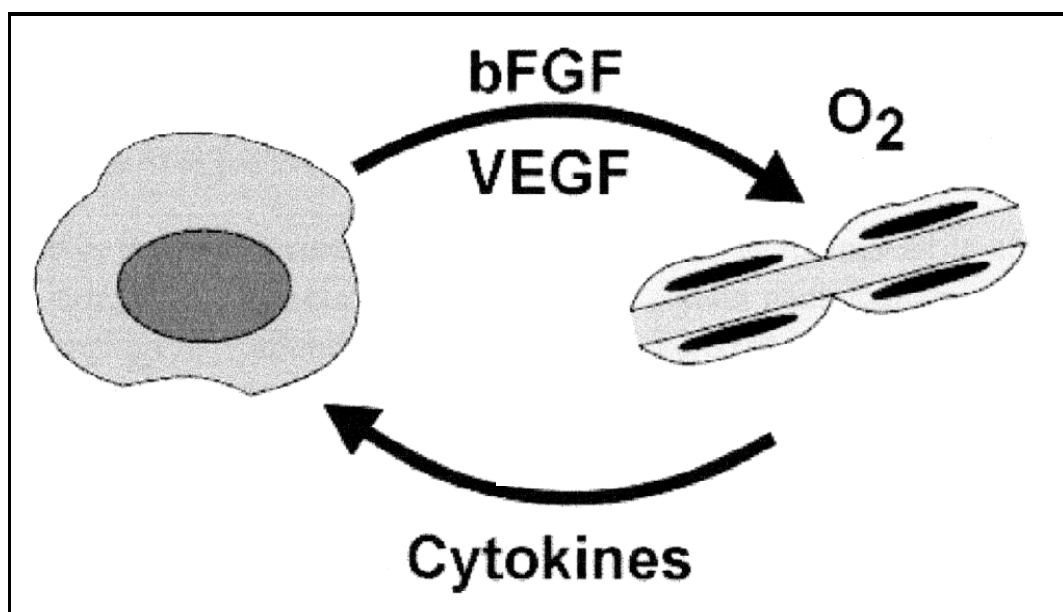


Fig.4. Effet paracrine de la néovascularisation (d'après réf. [2]).

Un des moyens de lutte contre le cancer est de faire régresser ou d'empêcher le développement de néovaisseaux. Si une tumeur n'est pas alimentée par des vaisseaux, elle ne se développera pas et ne disséminera pas des cellules cancéreuses dans le reste du corps via la circulation sanguine.

⁵ IGF-1 (Facteur de croissance proche de l'insuline de type 1)

⁶ PDGF (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)

1.4 Mécanismes de l'angiogenèse

1.4.1 Activation de l'angiogenèse

Les cellules tumorales éloignées de plus de 100 μm des vaisseaux sanguins (limite de diffusion de l'oxygène au travers des tissus) entrent en situation d'hypoxie (figure 5). En réaction à cette diminution d'approvisionnement en oxygène, les cellules tumorales passent en phénotype angiogénique. Les protéines HIF⁷, facteurs de transcription hétérodimériques formés de HIF α et HIF β , augmentent la transcription de quelques gènes qui codent pour des facteurs proangiogéniques, comme le VEGF [10].

Les monocytes, les macrophages, les plaquettes et d'autres cellules sanguines libèrent une grande quantité de molécules angiogéniques incluant le VEGF, bFGF, PDGF, et bien d'autres encore. Ces cellules sanguines libèrent des protéinases qui dégradent la barrière anatomique pour migrer au travers des cellules endothéliales et libérer leurs facteurs de croissance dans la matrice extracellulaire [11].

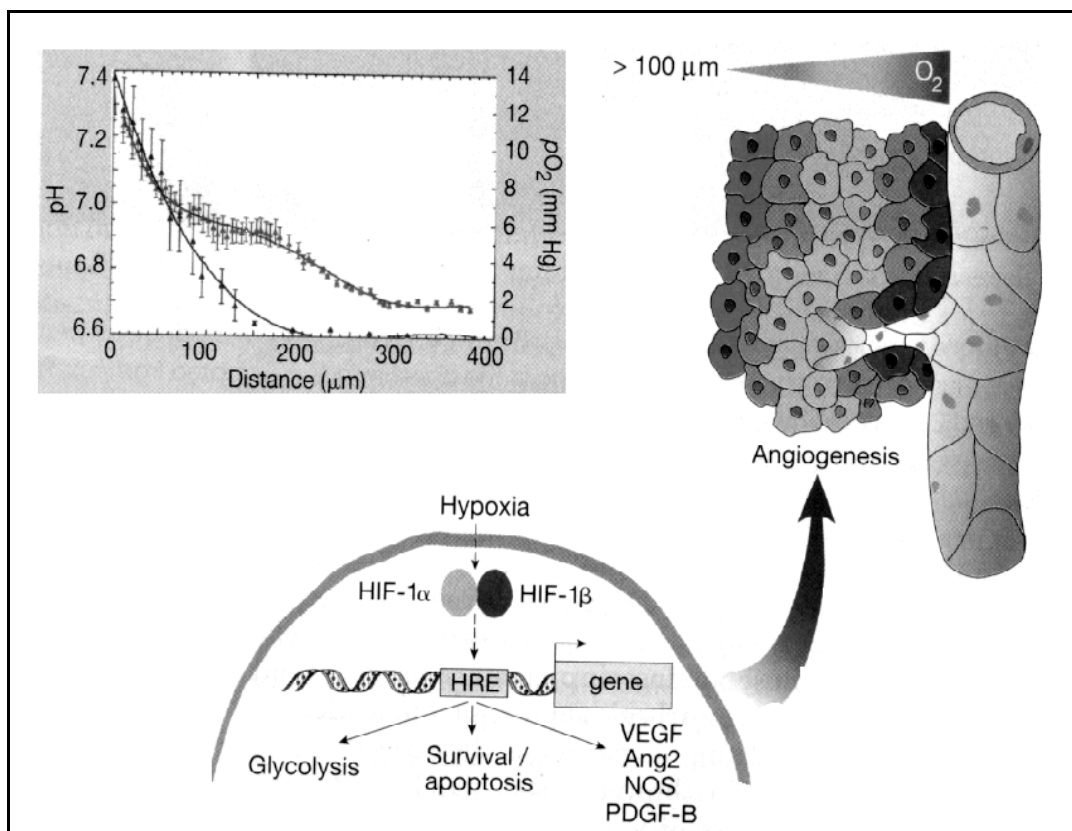


Fig.5. Rôle de l'hypoxie dans l'angiogenèse (d'après réf. [10]).

⁷ HIF (Hypoxia inducible factor)

1.4.2 Les médiateurs positifs de l'angiogenèse

Le VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

Le VEGF, aussi appelé VPF (Facteur de perméabilité vasculaire), est sécrété par les cellules tumorales, mais aussi par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses [12]. Les seules cellules à posséder un récepteur spécifique au VEGF sont les cellules endothéliales et certaines cellules tumorales. Le VEGF existe sous 4 isoformes (121, 165, 189, et 206 aa) [13]. Une fois sécrétées, les deux formes les plus lourdes (189 et 206 aa) sont séquestrées par les protéoglycanes (sulfate d'héparine) composant la matrice extracellulaire. Ces isoformes sont libérées par la plasmine qui dégrade le sulfate d'héparine. Il existe 3 types de récepteurs spécifiques pour le VEGF. Les récepteurs KDR⁸ et Flt-1⁹ sont tout deux des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il existe également un récepteur soluble au VEGF, le Flt-4 [14]. Les fonctions principales du VEGF sont la stimulation de la mitose des cellules endothéliales ainsi que l'augmentation de la perméabilité des capillaires. Il est important de noter que le VEGF induit l'expression du PA¹⁰ ainsi que du PAI-1¹¹ dans les cellules endothéliales en culture. Le VEGF favorise l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1¹² et ICAM-1¹³ au niveau de l'endothélium. L'expression du VEGF est induite par une faible pression partielle en oxygène, par le TGFβ, des interleukines, des prostaglandines et le VEGF lui-même en action paracrine. L'expression des récepteurs au VEGF est induite par l'hypoxie et par le VEGF, tandis que le TGFβ et le TNFα répriment leur expression.

Le bFGF (Facteur de croissance fibroblastique basique)

Le facteur de croissance fibroblastique est exprimé et excrété par de nombreuses tumeurs. Ce facteur de croissance se lie facilement aux protéoglycanes péri-cellulaires. Le bFGF est un puissant agent mitogène et chimioattractif pour les cellules endothéliales, les péricytes, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Les fibroblastes entourent la tumeur pour former un tissu de soutien. C'est la stroma-réaction.

⁸ KDR Récepteur à domaine tyrosine kinase

⁹ Flt (Fms like tyrosine kinase)

¹⁰ PA (Activateur de plasminogène)

¹¹ PAI-1 (Inhibiteur du plasminogène)

¹² VCAM-1 (Molécule d'adhésion de cellules vasculaires)

¹³ ICAM (Molécule d'adhésion intercellulaire)

Le PDGF (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)

Le PDGF (libéré par les plaquettes et par l'endothélium) et son récepteur (PDGFR) participent au recrutement des cellules musculaires lisses. Ils possèdent une action indirecte en stimulant la sécrétion de VEGF et de FGF par ces cellules ainsi que par les fibroblastes. Ils agissent également directement envers l'angiogenèse, en augmentant la prolifération des cellules endothéliales.

Le TGF- β 1 (Facteur de croissance transformant)

Ce facteur de croissance est responsable de la migration, de la prolifération et de la différenciation de diverses cellules. Il stimule la production de matrice extracellulaire. Le TGF- β 1 transforme les fibroblastes en myofibroblastes, il est donc important lors de l'étape de maturation des vaisseaux.

Le HGF (Facteur de croissance hépatocytaire)

Ce facteur est exprimé par les fibroblastes, il est mitogène pour de nombreuses cellules. Il entre dans l'arsenal des facteurs indispensables à l'angiogenèse.

Les héparinases

L'héparine et le sulfate d'héparine constituent des éléments régulateurs importants de l'angiogenèse. Les protéoglycanes de la matrice extracellulaire comportent de nombreux radicaux sulfate d'héparine qui séquestrent les FGFs et les formes les plus longues de VEGF. En temps normal, le FGF est présent en grande quantité dans l'espace péri-cellulaire, mais celui-ci est rendu inactif par sa séquestration. Suite à un traumatisme local, une irradiation, un choc thermique, ou une nécrose tumorale, il y a sécrétion d'héparinases qui libèrent le FGF. Celui-ci peut alors accomplir son rôle de cicatrisation, de réparation tissulaire ou de poursuite de la prolifération tumorale [12]. La membrane cellulaire présente des protéoglycanes transmembranaires ou associés à la membrane, qui possèdent de nombreuses chaînes de sulfate d'héparine (*figure 6*). Ceux-ci se conduisent comme des récepteurs de faible affinité au FGF et facilitent son interaction avec les récepteurs cellulaires de haute affinité. Les cellules tumorales ainsi que les cellules inflammatoires sécrètent des héparinases. Ces héparinases sont par exemple la plasmine et la thrombine. On comprend

alors l'intérêt de l'activateur de plasminogène et de son inhibiteur dans la régulation de l'angiogenèse.

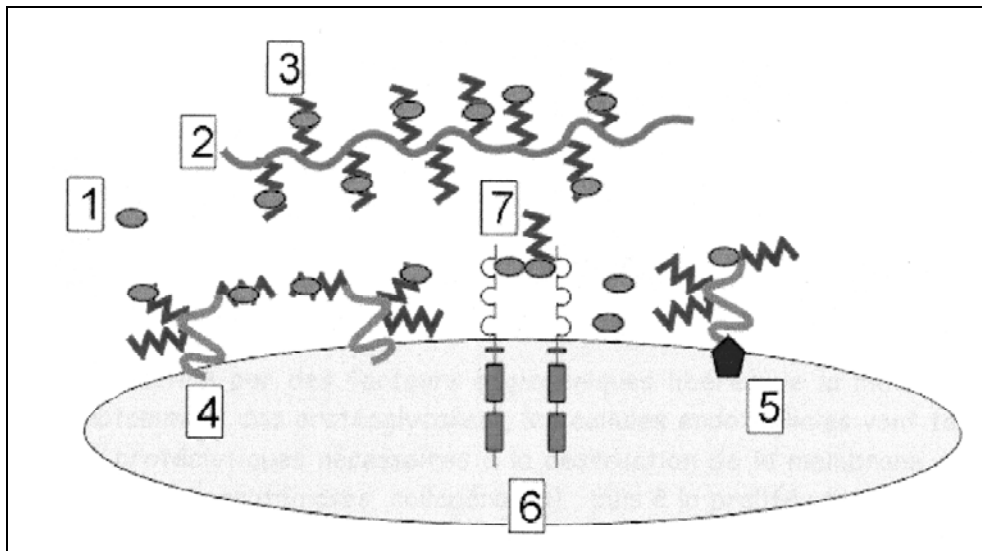


Fig.6. Schéma du rôle de sulfate d'héparine dans la régulation de la disponibilité du bFGF. [1] bFGF, [2] protéoglycanes, [3] sulfate d'héparine, [4,5] protéoglycanes transmembranaires, [6] dimère de récepteurs de haute affinité, [7] stimulation du bFGF (d'après réf. [2]).

Les angiopoïétines

Les angiopoïétines se lient sur des récepteurs Ties qui sont de type tyrosine kinase. Ceux-ci sont spécifiquement exprimés sur l'endothélium vasculaire. Cette famille de facteurs de croissance comprend 4 membres, dont Ang 1¹⁴, qui se lie préférentiellement à Tie 2 [13]. Tout comme le VEGF, l'Ang 1 favorise la formation des vaisseaux. Toutefois, le VEGF a plutôt tendance à augmenter le nombre de vaisseaux, tandis que l'Ang 1 augmente leur taille. L'action de l'Ang 1 sur la perméabilité vasculaire est opposée à celle du VEGF. En effet, l'Ang 1 favorise les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules de support (péricytes et cellules musculaires lisses), ainsi qu'avec la matrice extracellulaire. Son activité principale durant l'angiogenèse est donc de stabiliser les néovaisseaux. L'Ang 2¹⁵ a la même affinité pour Tie 2 que l'Ang 1. Elle possède une action antagoniste sur les cellules endothéliales en empêchant la fixation de l'Ang 1 sur son récepteur. L'Ang 2 a donc un effet déstabilisateur sur les vaisseaux, mais cette action semble favoriser la formation de néovaisseaux par sprouting. En effet, en déstabilisant le vaisseau il permet à celui-ci, en présence de VEGF, de former une ramification.

¹⁴ Ang 1 (Angiopoïétine 1)

¹⁵ Ang 2 (Angiopoïétine 2)

Les molécules d'adhésion

Un certain nombre de molécules d'adhésion sont synthétisées au cours de la construction des néovaisseaux [14]. Les sélectines E et P sont indispensables à la formation des capillaires. Elles stimuleraient le chimiotactisme des cellules endothéliales *in vitro*. Elles n'ont apparemment pas de rôle dans la prolifération des cellules vasculaires. Les immunoglobulines ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1 jouent un rôle dans l'adhésion intercellulaire. ICAM-2 est exprimé par les cellules endothéliales au repos. ICAM-2 et VCAM-1, associés aux intégrines, permettent la mobilité des cellules endothéliales. Les intégrines, et principalement $\alpha_v \beta_3$, jouent un rôle majeur dans la cohésion des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire. $\alpha_v \beta_3$ est exclusivement exprimée au niveau de l'endothélium activé, c'est à dire au niveau des cellules endothéliales en division.

1.4.3 Les médiateurs négatifs de l'angiogenèse

Dans les conditions physiologiques, de très nombreux facteurs négatifs limitent l'expression des facteurs angiogéniques à des situations particulières (embryogenèse, inflammation, cicatrisation, menstruation). Ainsi, la balance molécules activatrices – molécules inhibitrices de l'angiogenèse penche largement en faveur des dernières.

L'interféron α (IFN α) et l'interféron β (IFN β) diminuent la synthèse de ARNm du FGF des cellules tumorales. Ces deux interférons inhibent, *in vitro*, la migration des cellules endothéliales et *in vivo* l'angiogenèse. Les interleukines IL-4, IL-12 et IL-18 jouent un rôle similaire [15].

La majorité des inhibiteurs de l'angiogenèse sont associés à l'héparine, comme par exemple, le facteur plaquettaire 4 (PF4), la thrombospondine ou des facteurs stéroïdiens. Le PF4 inhibe la liaison du bFGF et du VEGF à leur récepteur [15].

Le TNF- α (Facteur nécrosant tumoral) diminue la croissance cellulaire. L'angiostatine tend à supprimer l'angiogenèse tumorale. L'endostatine réduit la survie des cellules endothéliales et leur migration. La vasostatine inhibe la croissance endothéliale et la prolactine inhibe le bFGF et le VEGF.

2 L' APOPTOSE

2.1 Définition de l'apoptose

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Ainsi au cours des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'un œuf, et aussi lorsque l'embryogenèse est terminée, il est en permanence nécessaire d'éliminer les cellules superflues (cellules dont le rôle est terminé, cellules qui sont en fin de vie) ou potentiellement dangereuses (cellules cancéreuses). Ce phénomène d'élimination sélective des cellules est médié par un processus appelé **APOPTOSE** (le nom apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles en automne; *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute).

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr [16] pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique. L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. En effet, l'analyse comparative des protéines qui jouent un rôle critique dans l'apoptose a montré qu'elles présentent des domaines conservés au cours de l'évolution. Ainsi le processus de mort cellulaire programmée est commun à l'ensemble du règne animal, mais aussi à celui des plantes et des champignons. L'apparition de l'apoptose coïnciderait avec l'apparition de la vie pluricellulaire, la capacité que les cellules ont à entrer en apoptose étant une condition indispensable au développement d'un organisme pluricellulaire.

Une dérégulation de la mort cellulaire programmée peut-être à l'origine de nombreuses pathologies. Certaines sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancer et maladies auto-immunitaires) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (SIDA, maladies neurodégénératives, ischémie reperfusion, ...). Il n'est pas étonnant que de nombreuses malformations congénitales soient inhérentes au défaut de mort cellulaire, chaque étape de celle-ci étant régulée génétiquement.

2.2 Etapes morphologiques de l'apoptose

Au cours de l'apoptose, les cellules mettent en place un mécanisme de suicide qui se traduit par de nombreux changements morphologiques. L'apoptose est considérée comme une mort cellulaire "ordonnée", procédant par différentes phases. Tout d'abord, les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules (perte des contacts entre les cellules). L'un des points morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme, ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire (*figure 7*). La chromatine se condense avant d'être dégradée en un profil caractéristique dit en "barreaux d'échelle", qui correspond à la fragmentation de la chromatine au niveau des domaines internucléosomiaux. La mitochondrie de la cellule apoptotique va elle aussi subir plusieurs modifications majeures: relarguage du cytochrome c dans le cytoplasme, ouverture des pores spécialisés. La membrane plasmique se désorganise et exprime des signaux pro-phagocytaires, comme le changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire. La membrane plasmique va bourgeonner pour former des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Ceux-ci vont rapidement être éliminés par les cellules adjacentes. Il n'y a donc pas d'inflammation lorsque l'apoptose a été activée. La mort cellulaire programmée est un processus rapide (quelques heures) et discret qui affecte en général des cellules isolées dans un tissu. C'est un phénomène difficile à observer car il ne rompt pas l'architecture tissulaire, les cellules adjacentes occupant rapidement l'espace vide, ce qui ne laisse aucune cicatrice.

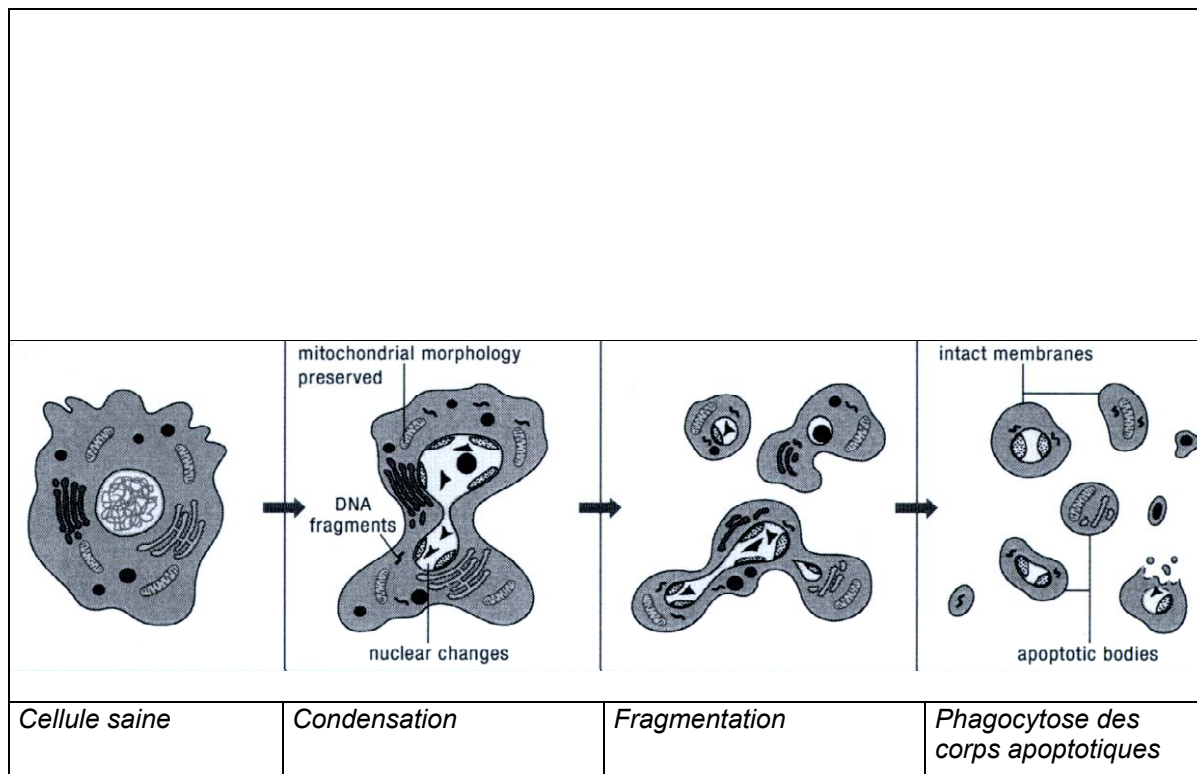


Fig.7. Illustration des étapes morphologiques de l'apoptose.

2.3 Rôles de l'apoptose

L'un des premiers rôles décrit fut celui de la disparition de la queue lors de la métamorphose du têtard. Les cellules constituant la queue meurent les unes après les autres, selon un ordre précis et programmé. L'apoptose permet de résorber des structures au cours du développement embryonnaire, comme par exemple la délétion des espaces interdigitaux (Figure 8) [17].

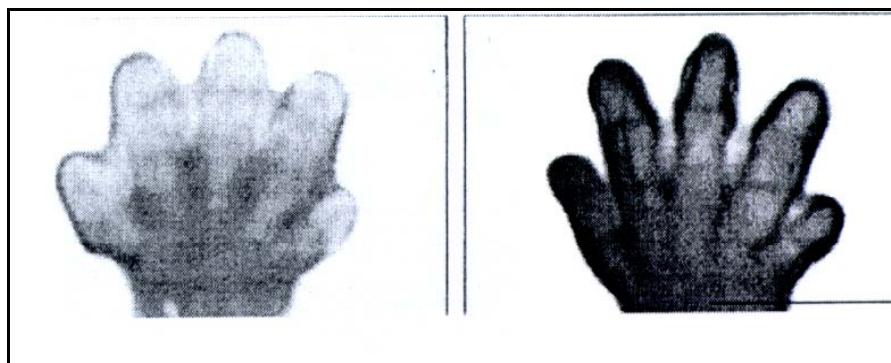


Fig.8. Modelage des doigts par apoptose (d'après réf. [18]).

L'apoptose présente d'autres rôles dans le développement embryonnaire, comme par exemple au niveau de l'atrésie folliculaire, ou encore l'élimination d'environ 85% des neurones dans le cerveau de l'embryon en développement (*figure 9*). Les neurones non connectés ou connectés à un endroit non approprié ne reçoivent plus le signal nécessaire à leur survie et entrent en apoptose. C'est ainsi que la correspondance exacte entre le nombre de neurones et de cellules cibles est garantie [19].

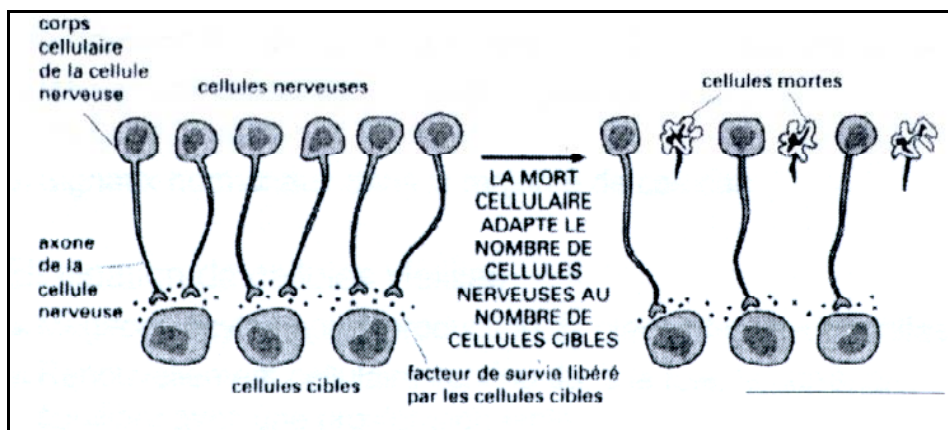


Fig.9. Sélection des neurones dans le système nerveux en formation (d'après réf. [18]).

On sait aussi que plus de 95% des cellules du système immunitaire disparaissent par apoptose lors de la sélection opérée au niveau du thymus. Enfin, l'apoptose protège l'organisme en éliminant la très grande majorité des cellules infectées, endommagées ou potentiellement cancéreuses ou tout simplement en éliminant les cellules vieillissantes.

2.4 Inducteurs de l'apoptose

Parmi ces inducteurs, on trouve les rayonnements électromagnétiques γ , X et UV, mais aussi les chocs thermiques et le stress oxydatif. Certaines drogues influençant l'apoptose sont utilisées en chimiothérapie. Une augmentation ou une diminution d'hormones et de facteurs de croissance peut induire la mort cellulaire programmée. C'est également le cas pour la perte d'attachement à la matrice extracellulaire. Toute modification du patrimoine génétique ou événement pouvant y mener (infection virale) sont également des circonstances pro-apoptotiques.

En ce qui concerne les messagers spécifiques, il en existe peu, la majorité étant impliquée également dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

Seules les cytokines pro-apoptotiques, les ligands anti-Fas, ne sont impliquées que dans l'induction de l'apoptose.

D'autres éléments stimulent l'apoptose, mais ne sont pas indispensables : calcium, cAMP, radicaux libres et NO.

La décision d'entrer en apoptose dépend de l'intégration de nombreux signaux extracellulaires et de cascades intracellulaires. Le contexte interne de la cellule (type cellulaire, état de maturité) est très important pour cette prise de décision. L'ensemble de ces messages converge vers une même cascade qui permet le contrôle des étapes finales de l'apoptose.

2.5 Mécanismes moléculaires de l'apoptose

2.5.1 Les caspases

Les éléments principaux de la cascade de mort cellulaire programmée sont les caspases [20]. Les caspases sont des protéases cytoplasmiques qui clivent différentes protéines cellulaires en aval d'un aspartate. Leur site actif est une cystéine, c'est pour cette raison qu'on les nomme caspases pour « Cysteinyl aspartate – specific proteinases ». Cette famille de protéines comprend actuellement 13 membres. Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs dimériques inactifs qui sont ensuite maturés par autoprotéolyse ou par une protéolyse médiée par d'autres caspases. Deux grandes et deux petites sous-unités s'assemblent ensuite pour former des protéines matures tétramériques (*figure 10*). Les caspases ont une structure très conservée comprenant un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité. Les prodomaines sont variables à la fois dans leur taille et dans leur séquence. Ainsi les prodomaines des caspases 8 et 10

contiennent des « Domaines Effecteurs de Mort Cellulaire » ou **DEDs**¹⁶ qui sont des structures permettant la liaison de la caspase aux molécules adaptatrices **FADD**¹⁷. Certaines autres caspases (caspases 1, 2, 4 et 9) possèdent un domaine de recrutement des caspases appelé **CARD**¹⁸. Ces CARDS jouent un rôle dans les interactions entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices.

Parmi les principaux substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose, on trouve aussi bien des protéines cytoplasmiques que nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN et de nombreuses protéines kinases. Ces protéines cibles sont souvent impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression de certains gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération,...

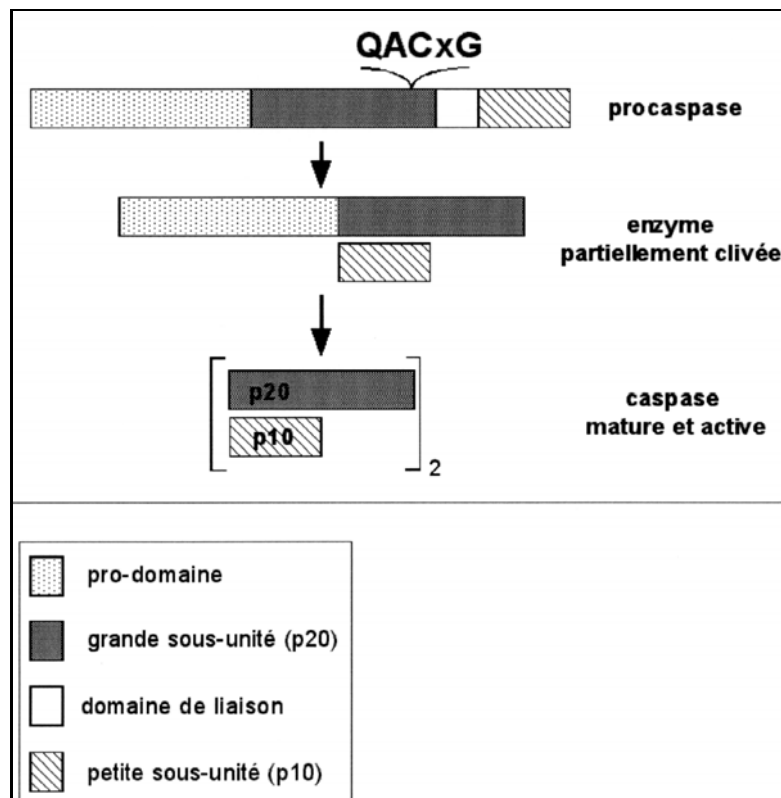


Fig.10. Maturation des caspases (d'après réf. [21]).

2.5.2 Les récepteurs de mort cellulaire

¹⁶ DED (Death Effector Domain)

¹⁷ FADD (Fas Associated Death Domain)

¹⁸ CARD (Caspase Recruitment Domain)

Il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée: les récepteurs de mort [22]. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases. Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du TNF (TNF-R). Les TNF-R peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort. La mort induite par les membres de la famille du TNF-R conduit à l'activation des caspases et en est dépendante. Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires qui possèdent dans leur domaine extracellulaire de une à six régions riches en cystéines, impliquées dans la liaison du ligand. Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire (**DD**¹⁹).

Le récepteur Fas est le récepteur de ligand Fas (FasL) (*figure 11*). Il représente le prototype des récepteurs de mort. Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. La stimulation de Fas par son ligand physiologique ou par un anticorps anti-Fas va induire son oligomérisation et le recrutement, par l'intermédiaire de son domaine de mort cellulaire, d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique. L'apoptose, médiée par Fas et TNF-R1, n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteurs de la synthèse d'ARNm ou de protéines. De plus, des cellules anucléées peuvent enclencher un programme de mort cellulaire après stimulation du récepteur Fas. Ces résultats suggèrent que les différents protagonistes, nécessaires à l'induction de l'apoptose, sont constitutivement présents et que l'activation du récepteur par son ligand ne fait qu'induire l'association des protéines préexistantes nécessaires à la transmission du signal apoptotique.

¹⁹ DD (Death Domain)

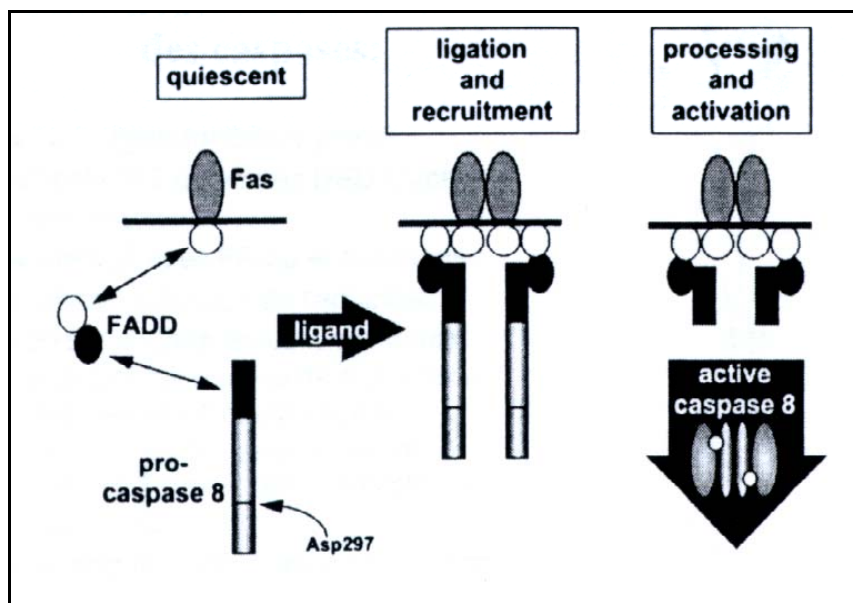


Fig.11. Activation des récepteurs FAS (d'après réf. [21]).

2.5.3 Les ligands de mort cellulaire

La famille des ligands des TNFR comprend une quinzaine de membres dont TNF et Fas-L [24]. Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires qui présentent leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé d'environ 150 acides aminés et possède 20 à 25 % d'homologie avec les autres membres de la famille du TNF. Certaines de ces protéines, telles que Fas-L et TNF, existent également sous forme soluble. La forme soluble est obtenue par protéolyse induite par une famille de métalloprotéases membranaires. S'il semble bien établi, dans le cas de Fas-L, que la trimérisation des formes membranaires soit responsable de l'oligomérisation et de l'activation du récepteur Fas, le rôle des formes solubles n'est pas encore bien déterminé.

2.5.4 Les cascades inductrices d'apoptose

Une fois stimulé par son ligand spécifique, Fas trimérise et recrute une protéine adaptatrice FADD. FADD présente la particularité de posséder, en plus de son DD, un domaine effecteur de mort cellulaire (**DED**). Dans certaines conditions, TNF-RI recrute également FADD. Ce couplage est cependant indirect et se fait par l'intermédiaire d'une protéine comportant un DD : **TRADD**²⁰. En définitive, FADD représente le point de

²⁰ TRADD (TNFR Associated Protein with DD)

convergence des voies de signalisation induites par Fas ou TNF-R1. Par la suite, FADD peut recruter la caspase 8 ou la caspase 10 par l'intermédiaire de ses DEDs et ainsi initier la cascade apoptotique (*figure 12*).

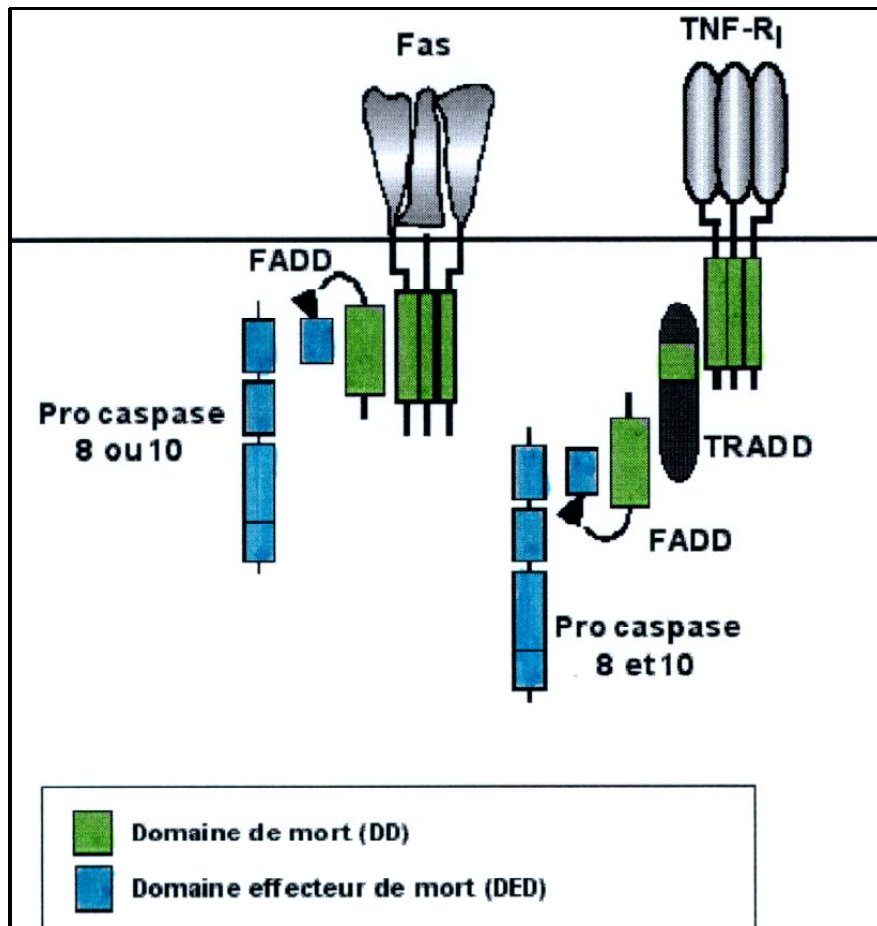


Fig.12. Activation des caspases par les récepteurs de mort cellulaire (d'après réf. [21]).

2.5.5 La famille Bcl-2

On peut classer les membres de la famille bcl-2 en deux sous-familles, des membres **anti-apoptotiques** tel que bcl-2 et des membres **pro-apoptotiques** comme bax [22].

Pratiquement tous les membres de la famille bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet d'être localisés dans la membrane mitochondriale, le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire externe. Certains membres de la famille semblent avoir la capacité de former des pores. Ainsi, la structure tridimensionnelle de bcl-xl s'est révélée être similaire à celle du domaine formant des pores de certaines toxines

bactériennes telles que la toxine diphtérique et les colicines. En fait, il a été montré que les molécules anti-apoptotiques bcl-xl et bcl-2 et la protéine pro-apoptotique bax pouvaient former des canaux ioniques en s'insérant dans des membranes lipidiques.

L'activité de ces protéines peut être régulée par dimérisation et par phosphorylation. Une caractéristique importante des membres de la famille bcl-2 est de pouvoir former des homo ou des hétérodimères. En fait, il semblerait que la balance entre la vie et la mort cellulaire soit influencée par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés. Ainsi par exemple, lorsque bax est préférentiellement exprimé, des homodimères bax-bax se formeront et conduiront à la mort cellulaire. En revanche, si c'est bcl-2 qui est majoritairement exprimé, alors il y aura formation de dimères bcl-2-bcl-2 et donc survie cellulaire. En plus des niveaux d'expression respectifs de chaque membre et de leur capacité à former des dimères, l'action de cette famille de protéines peut être également modulée par des modifications post-traductionnelles. En définitive, les membres de la famille bcl-2 exercent deux fonctions essentielles : ils participent d'une part à la formation de pores régulant le passage d'ions et de certaines substances activatrices de l'apoptose et d'autre part, modulent la fonction des molécules régulatrices de l'apoptose par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine.

2.5.6 Rôle de la mitochondrie et du cytochrome c dans le phénomène de l'apoptose

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose [22]. En effet, l'apoptose provoque l'ouverture de pores, ce qui augmente la perméabilité des mitochondries et la libération de molécules apoptogènes telles que le **cytochrome c**, les caspases 2, 3 et 9 ainsi que le facteur **AIF**²¹ (*figure 13*). Cette phase de libération est sous le contrôle de membres de la famille bcl-2. Ainsi, bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome alors que bax peut l'induire.

²¹ AIF (Apoptosis Inducing Factor)

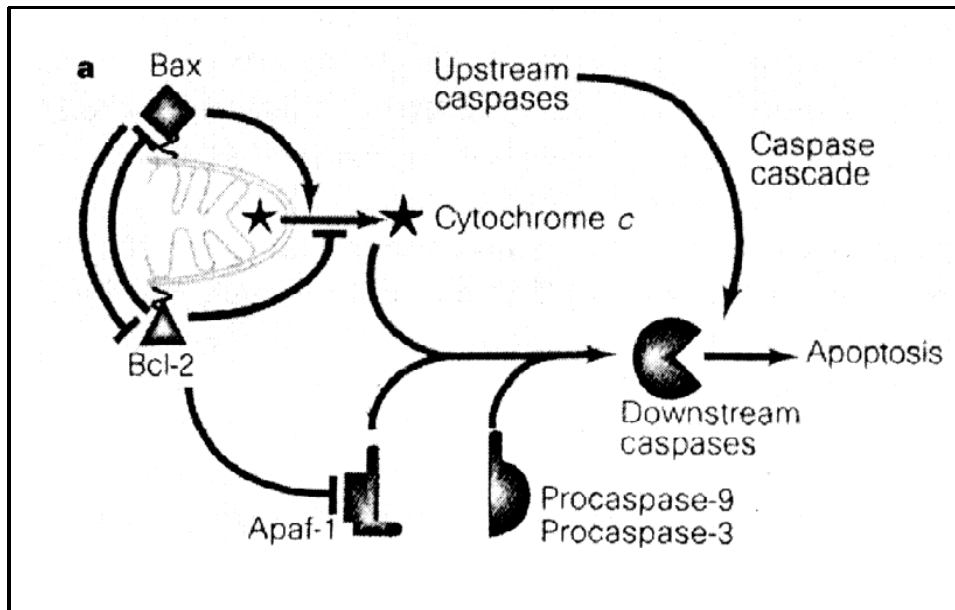


Fig.13. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose (d'après réf. [18]).

Un nouveau membre pro-apoptotique appelé bid, permet de faire le lien entre les récepteurs de mort et la libération du cytochrome c. Son clivage par la caspase 8 produit un fragment C-terminal qui permet la libération du cytochrome c. Puisque l'activation de la caspase 8 par les récepteurs de mort aboutit à l'initiation de la cascade apoptotique, l'implication de la mitochondrie dans l'apoptose par l'intermédiaire de bid et du cytochrome c est un système d'amplification du signal apoptotique.

Le facteur AIF est l'une des molécules pro-apoptotiques libérées par la mitochondrie. AIF est localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial, et a une double fonction: oxydoréductase et facteur apoptogène. Pour que cette dernière activité s'exerce, AIF est transloqué de la mitochondrie vers le cytosol puis vers le noyau. La voie AIF est indépendante des caspases et ne nécessite aucun intermédiaire pour provoquer la dégradation du noyau.

2.5.7 Régulation génétique de l'apoptose

La majeure partie des connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient de travaux menés sur le nématode *Cænorhabditis elegans*. Parmi les gènes de *Cænorhabditis elegans*, 3 furent identifiés comme des

régulateurs clés de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques ; il s'agit de ced-3, ced-4 et ced-9 (ced pour *Cænorhabditis elegans* death). Les ced-3 et ced-4 sont requis pour la mort cellulaire. Ced-9, pour sa part, a une fonction antagoniste de ced-3 et ced-4 en ce sens qu'il est capable de promouvoir la survie. Ainsi une perte partielle de fonction de ced-9 induit une mort cellulaire exacerbée, alors qu'un gain de fonction de ced-9 conduit à un excès cellulaire. Ced-3 correspond à l'enzyme de conversion de l'IL-1b²² qui code pour une protéase à cystéine. Ced-4 code pour une protéine ayant des homologues avec la protéine humaine Apaf-1. Enfin, ced-9 code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique bcl-2 préalablement identifiée chez l'homme.

Le gène p53 est un gène suppresseur de tumeur [24]. Sa mutation est celle qui est la plus communément retrouvée dans les tumeurs humaines. Ce gène code pour un activateur transcriptionnel qui agit sur les gènes de la réparation de l'ADN ou qui régulent la stabilité du génome. Normalement p53 est exprimé à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire et agit comme un "check-point" pendant lequel la cellule vérifie ses capacités à poursuivre une division normale. Si tel n'est pas le cas, p53 est surexprimé et la cellule entame un processus d'apoptose. Une mutation entraînant la perte de la fonction de p53 provoque la disparition de cette voie d'entrée vers l'apoptose. P53 exerce donc une forte influence sur l'initiation de l'apoptose, mais uniquement lorsque celle-ci est induite par des agents entraînant une cassure sur un brin d'ADN. On peut supposer que l'apoptose initiée par p53, qui accompagne une lésion de l'ADN, est un mécanisme de défense qui protège l'organisme de la propagation des cellules mutées. De récentes découvertes suggèrent que p53 agit sur l'équilibre entre bcl-2 et bax en activant la transcription de bax et en déprimant celle de bcl-2.

2.6 Les pathologies associées à l'apoptose

Dans les pathologies associées à l'apoptose on trouve soit un excès, soit un défaut d'apoptose [25]. Si l'apoptose est inhibée, on assiste au développement de divers cancers. Le gène p53, muté dans 50% des cancers, a un taux d'expression normalement très faible. Lorsque l'ADN de la cellule se trouve être endommagé, on assiste à une augmentation du taux de p53 et l'arrêt de la division en phase G1. A ce niveau, soit l'ADN est réparé, soit la cellule entre en apoptose. Si les deux exemplaires du gène p53 sont mutés, et si l'ADN subit une lésion, plus rien n'arrête la division cellulaire. Le défaut survenu au sein de l'ADN est

²² IL-1b (Interleukine-1b)

alors transmis au cours des mitoses successives. D'autres mutations au niveau des gènes régulateurs de l'apoptose peuvent également aboutir au même phénomène. Parmi les conséquences d'un défaut d'apoptose, on trouve aussi des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux. En effet, si les lymphocytes autoréactifs ne sont pas correctement éliminés au niveau du thymus, ils occasionnent ce genre de pathologies. Beaucoup de virus possèdent des gènes inhibiteurs d'apoptose. Ces gènes codent par exemple pour des inhibiteurs de caspases, de p53, ou pour des protéines anti-apoptotiques comme bcl-2.

Parmi les pathologies induites par un excès d'apoptose, on trouve des maladies virales (SIDA, hépatite), certaines formes de diabète et d'anémie. Cet excès de mort cellulaire est également incriminé dans le phénomène de rejet de greffes. Beaucoup de maladies neurodégénératives sont associées à la mauvaise régulation de l'apoptose (Alzheimer et Parkinson). Les crises d'épilepsie pourraient également trouver une origine dans l'excès d'apoptose. Enfin, les ischémies-reperfusions peuvent être à la base du déclenchement de l'apoptose. C'est ainsi que les dommages qui surviennent après une crise cardiaque sont principalement dus à la reperfusion qui suit l'ischémie.

3 TECHNIQUE DU PHAGE DISPLAY

3.1 Principe du phage display

Le phage display permet de sélectionner un phage interagissant spécifiquement avec une structure que l'on désire étudier. Le principe est de partir avec une population de phages, tous différents les uns des autres par la structure d'un peptide exprimé à leur surface. Ces phages sont ensuite sélectionnés, par exemple en fonction de leur affinité avec une cible (un récepteur par exemple). C'est la sélection d'affinité.

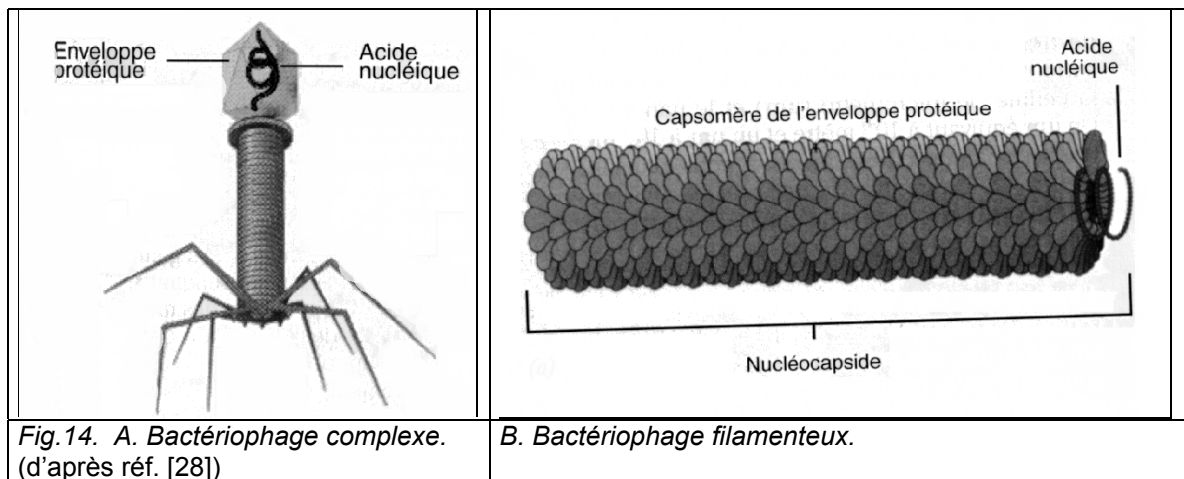
Le phage display est une méthode qui date d'une dizaine d'années et qui présente de multiples avantages [26,27]. Tout d'abord, la possibilité de disposer d'un grand nombre de séquences peptidiques différentes est un atout majeur. Le fait de pouvoir stocker les phages à titrage élevé (10^{14} particules/ml) et de les conserver durant de longues périodes (plusieurs années) à 4 °C rend leur utilisation possible dans bien des applications. Enfin, l'utilisation de peptides, plutôt que d'anticorps ou de fragments d'anticorps pour la reconnaissance d'une structure, est elle aussi avantageuse. En effet, les peptides sont plus diffusibles et moins immunogènes.

3.2 Le vecteur utilisé dans la technique du phage display

3.2.1 Qu'est ce qu'un phage ?

Considéré comme vivant par les uns (car il renferme du matériel génétique) et comme inerte par les autres (car il est incapable de se multiplier seul), le phage (ou bactériophage) est un parasite bactérien obligatoire. Il possède une structure très simple en comparaison avec celle des organismes vivants, car il n'est constitué que de protéines et de molécules porteuses de l'information génétique (ADN ou ARN).

Il existe différentes catégories de bactériophages : les phages filamenteux (ex. M13) et les phages complexes (ex. T4) (*figure 14*). Les phages filamenteux sont, comme l'indique leur nom, allongés. Leur ADN est entouré par des protéines organisées en hélice. Les phages complexes sont constitués de deux régions, une région icosaédrique contenant le matériel génétique et une région en hélice. Ces phages sont plus sophistiqués car ils possèdent une série de dispositifs de fixation et d'injection du patrimoine génétique dans la bactérie.



3.2.2 Les phages M13

Le vecteur utilisé dans la méthode de phage display est le phage filamenteux M13 [29]. Lors de son cycle de vie, il utilise *Escherichia coli* (*E. coli*) comme hôte. Il infecte ces bactéries par l'intermédiaire du pilus F.

Ces phages mesurent 930 nm de long et 6,5 nm de large. Leur information génétique est portée par un ADN simple brin de 6400 pb (paire de base) qui comprend deux régions intergéniques et 9 gènes codant pour 10 protéines (PI à PX). Cet ADN est contenu dans une enveloppe composée principalement de la protéine PVIII présente en 2800 copies et formant une structure hélicoïdale. L'enveloppe est également formée de PIII, PVI, PVII et PIX. La région qui quitte en premier lieu la bactérie, appelée région proximale, présente 5 copies des protéines PVII et PIX qui sont responsables de l'assemblage du virion. La région distale possède 5 copies de PIII et PVI ; ces structures interviennent lors de l'interaction du phage avec le pilus F. En effet, c'est l'extrémité N-terminale de PIII qui interagit avec ce pilus.

Lors de l'interaction avec les pili ceux-ci se rétractent par un mécanisme encore inconnu et les phages se retrouvent coincés dans la membrane interne de la bactérie. L'ADNss²³ est libéré dans le cytoplasme où il est transcrit et traduit par la machinerie enzymatique de la bactérie, ce qui a pour but de produire les protéines qui formeront l'enveloppe du phage mais aussi les protéines qui interviendront lors de l'assemblage du virion.

²³ ADNss (ADN simple brin)

Ce même ADN, après avoir été copié, est compacté grâce à l'assemblage avec des dimères de PV (*figure 15*). Les autres protéines (PI, PVII et PIX) sont transloquées vers la membrane interne où elles forment un complexe avec la thyrodoxine (protéine de la bactérie). Ceci attache l'ADNss à la membrane interne et initie l'assemblage du phage ainsi que son passage au travers de la membrane interne. Tout au long de ce processus, PVIII remplace PV, et il se termine par l'assemblage de PVI et PIII. PIV forme des canaux dans la membrane externe pour permettre le passage des virions. Il est important de signaler que le phage M13 n'est pas lytique, c'est à dire qu'il ne détruit pas la bactérie. Celle-ci libère des virions en permanence. En conséquence, le cycle de vie des phages M13 est utilisé pour les amplifier.

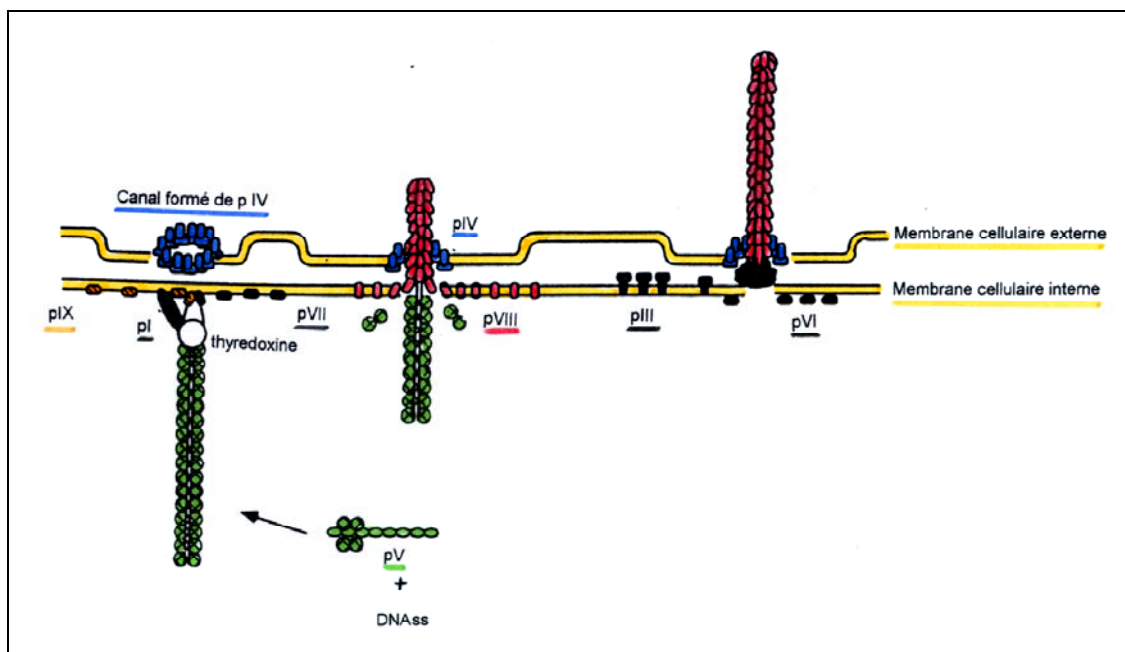


Fig.15. Assemblage du phage M13 (d'après réf. [29]).

Dans la technique du phage display, les phages M13 sont modifiés génétiquement. Premièrement, le gène de résistance à un antibiotique, ici la tétracycline, peut être inséré dans le génome du phage. La croissance des bactéries dans un milieu contenant de la tétracycline permet dès lors de sélectionner les bactéries infectées. Il est également indispensable d'insérer la séquence qui code pour le peptide qui individualisera les phages. La protéine de fusion ainsi formée doit exposer la séquence d'intérêt vers l'extérieur du virion. De plus, il est important que la taille de l'insert ne perturbe pas la fonction de la protéine. C'est pour ces raisons que la séquence est insérée au niveau du gène codant pour PIII.

Les séquences nucléotidiques qui codent pour les peptides sont synthétisées chimiquement à partir d'un mélange équimolaire des 4 nucléotides A, C, T et G [30]. Cette méthode permet statistiquement d'obtenir toutes les séquences peptidiques possibles. Dans ce cas, la librairie est dite aléatoire. Une librairie typique contient un billion de clones, ce qui est suffisant pour représenter 6 millions d'hexapeptides possibles.

3.3 Sélection des phages

Il est possible de sélectionner des phages d'intérêt (*figure 16*) [31]. Dans le cas de la sélection d'affinité, les phages vont être sélectionnés en fonction de leur interaction avec une cible. Notons que les phages peuvent aussi être sélectionnés selon d'autres caractéristiques, mais ceci sort du cadre de ce mémoire.

Pour la mise en œuvre d'une sélection d'affinité, il faut disposer d'un support solide sur lequel la structure ciblée est présentée. Il existe différents types de support : des supports de surface (billes paramagnétiques, billes plastiques, liposomes, membrane de nitrocellulose,...), des supports en gel d'agarose perméable ou des cellules surexprimant la protéine en question. C'est en mettant en présence la cible immobilisée et la librairie qu'il est possible d'opérer une sélection. Par une série de rinçages, les phages non spécifiques (ceux qui ne se sont pas fixés au récepteur) sont éliminés.

Les phages d'intérêts sont donc détachés (élution) de la structure étudiée soit de manière non spécifique, en diminuant le pH, soit de façon spécifique. Dans ce cas, on joue sur les phénomènes de compétition entre un ligand connu et les phages fixés. Les phages récupérés, c'est à dire ceux qui interagissent avec la molécule d'intérêt, sont ensuite amplifiés dans *E. coli*. Les étapes sont recommencées plusieurs fois, ce qui permet d'obtenir des phages de plus en plus spécifiques pour la cible. Les différents phages sélectionnés sont alors testés de manière à définir le phage qui possède la plus haute affinité. La séquence du peptide le plus spécifique est finalement obtenue en séquençant le génome du phage.

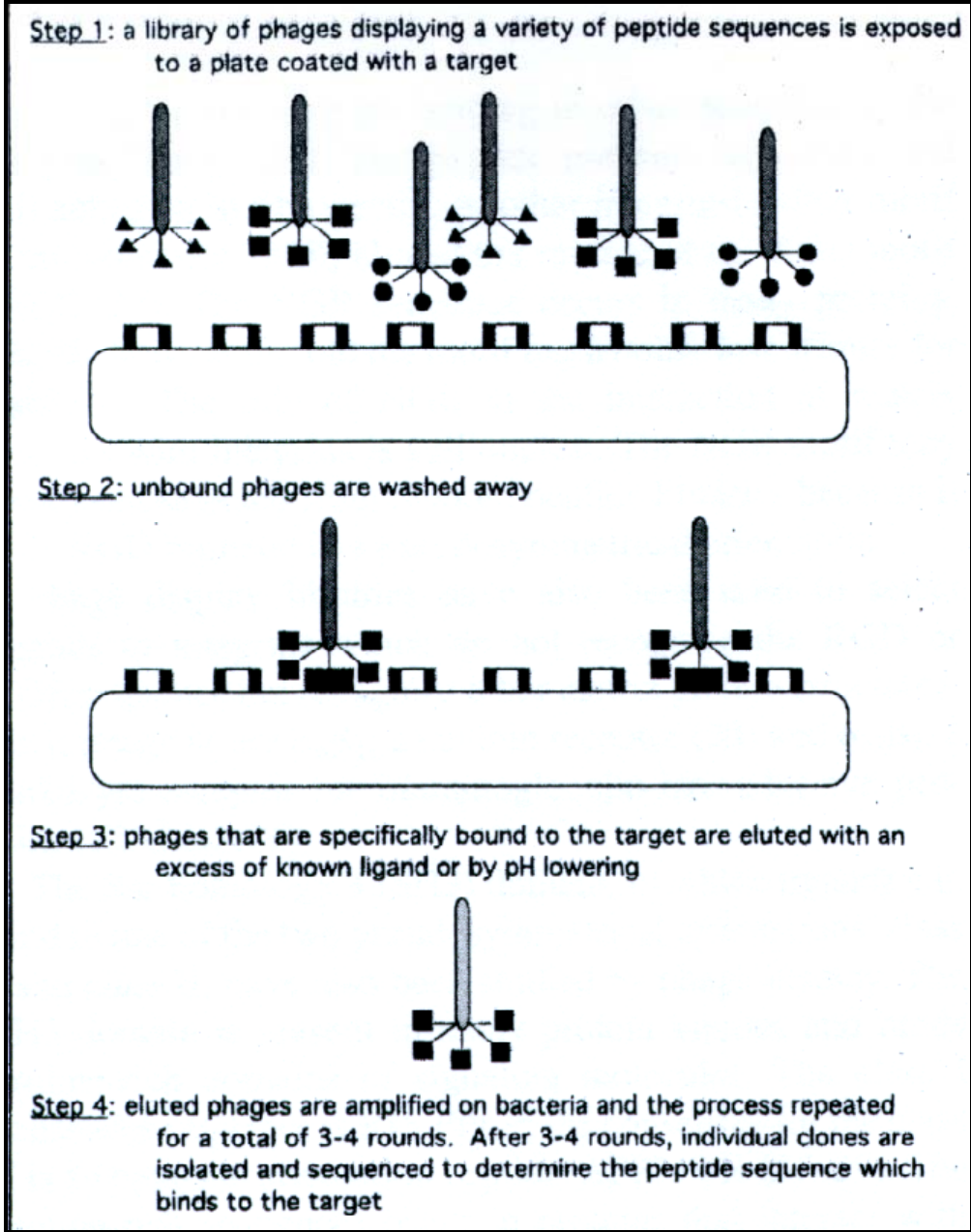


Fig.16. Sélection des phages (d'après réf. [31]).

4 RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE BIOMEDICALE

4.1 Principe

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) est basé sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques qui possèdent un nombre de spin I non nul (par exemple : ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ...)

Les noyaux de spin $\frac{1}{2}$ (^1H et ^{31}P) 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 dès qu'une onde électromagnétique de fréquence identique à celle de la fréquence de Larmor des noyaux leur transmet son énergie. Par la suite, le système retourne à l'état d'équilibre en émettant un signal RMN.

Il est plus commode d'aborder ce phénomène à l'échelle macroscopique (*figure 17*). La résultante de noyaux précessant autour de la direction du champ magnétique est équivalente à un moment magnétique, l'aimantation nette M_0 .

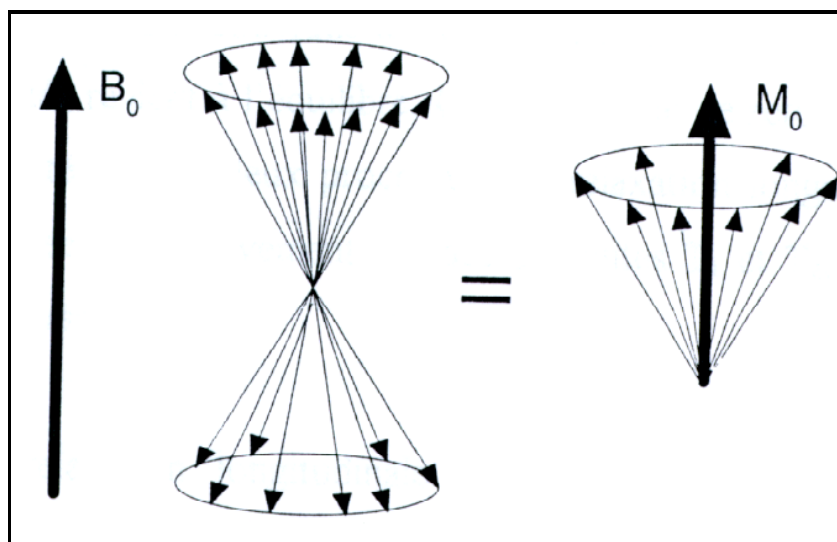


Fig.17. Orientations permises des vecteurs de moment angulaire d'un noyau de spin $\frac{1}{2}$. Aimantation macroscopique (d'après réf. [32]).

M_0 bascule lorsqu'il est soumis à une impulsion de radiofréquence (RF). L'angle de basculement est déterminé par la durée de l'impulsion. Le retour du vecteur macroscopique à l'état d'équilibre se fait en précession autour de B_0 à la fréquence de Larmor, ce qui crée un champ magnétique oscillant. Le signal décroissant qui provient de l'échantillon placé dans un champ magnétique suite à une impulsion RF est nommé signal de précession libre ou Free Induction Decay (FID). Après détection, le signal subit la transformation de Fourier (FT) et donne alors l'intensité du signal en fonction de la fréquence ; c'est ce qu'on appelle un spectre de RMN.

Le retour vers l'état d'équilibre se fait par des phénomènes de relaxation et est caractérisé par les constantes T_1 et T_2 , qui représentent respectivement le temps de relaxation longitudinale et le temps de relaxation transversale. Le temps de relaxation longitudinale (spin-reseau) T_1 caractérise l'évolution temporelle du vecteur M_0 vers la valeur d'équilibre le long de l'axe longitudinal (axe z). Le temps de relaxation transversale (spin-spin) T_2 caractérise la décroissance de la composante de l'aimantation dans le plan transverse (x - o - y).

4.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Les images obtenues par IRM sont composées de pixels (Picture Elements) qui représentent le contenu d'un Voxel (Volume Element). Afin de localiser les différentes parties d'un échantillon, on fait varier le champ magnétique de façon linéaire au travers l'espace. Les fréquences de résonance des différentes positions de l'échantillon varient donc, elles aussi, de façon linéaire. Si on combine des gradients de champ magnétique selon les 3 axes de l'espace, il est possible de localiser les noyaux dans l'échantillon.

Les expériences d'IRM peuvent porter sur une coupe sélectionnée d'un échantillon. On obtient alors une image en deux dimensions de la tranche choisie. L'excitation d'une seule tranche est permise grâce au gradient de champ. Seuls les noyaux soumis au champ magnétique correspondant à la fréquence appliquée sont excités (*figure 18*).

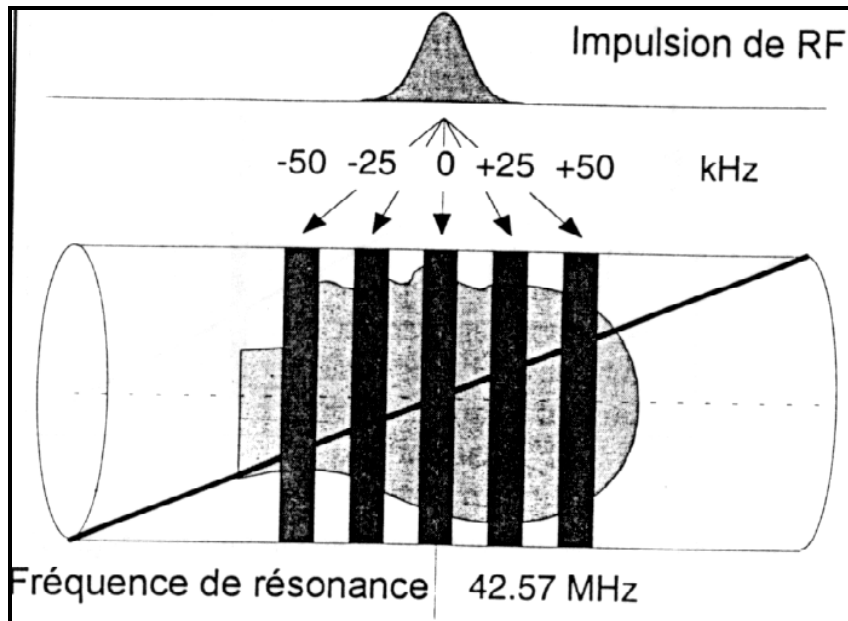


Fig.18. Déplacement de la position de coupe (d'après réf. [32]).

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 l'encodage spatial. Deux méthodes d'encodage sont combinées : l'encodage en phase et l'encodage en fréquence. Le gradient selon l'axe Y est le gradient d'encodage en phase et le gradient selon l'axe X l'encodage en fréquence. Ces deux gradients déphasent le spin et donnent des informations complémentaires sur la position des Voxels par rapport à la direction des gradients. Les encodages en phase et en fréquence sont réalisés respectivement avant et pendant la mesure du signal. Le temps d'acquisition de l'image d'une coupe est de l'ordre de la seconde et la résolution spatiale du cliché est inférieure au millimètre.

4.3 Les agents de contraste

La qualité des images obtenues par IRM est supérieure à celles obtenues par les méthodes classiques comme les rayons x ou l'échographie. Néanmoins, le contraste peut être amélioré grâce à l'intervention d'agents de contraste. Ces agents possèdent des propriétés magnétiques qui influencent localement la relaxation des protons de l'eau tissulaire. Un agent de contraste 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'agents positifs ou négatifs.

Les agents de contraste positifs contiennent un ion métallique paramagnétique dont les électrons non appariés interagissent avec les moments magnétiques des protons voisins dont ils accélèrent la relaxation. Un exemple d'un tel ion est le gadolinium (^{157}Gd) qui possède 7 électrons non appariés. Ces agents rehaussent le signal du tissu dans lequel ils s'accumulent, par accélération du processus de retour à l'équilibre de l'aimantation. L'ion métallique est toxique pour l'organisme, car il prend la place du calcium, important dans un grand nombre de processus physiologiques, sans pour autant en assurer les fonctions. Pour supprimer le caractère toxique de cet ion, celui-ci est chélaté, par exemple par l'acide diéthylénetriamine pentaacétique (DTPA).

Les agents de contraste négatifs 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 dispersés dans une matrice biocompatible comme le dextran. Ces agents produisent un large moment magnétique qui perturbe l'homogénéité du champ magnétique local. Leur taille varie de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres selon l'utilisation.

4.4 IRM et angiogenèse.

Les premières études par IRM de l'angiogenèse ont révélé l'importance de l'administration d'un agent de contraste pour la mise en évidence de l'hypervascularisation tumorale. Le réseau microvasculaire de la zone pathologique, plus dense, entraîne en effet l'accumulation accrue du produit de contraste par rapport au tissu sain. Un problème majeur est toutefois lié au fait qu'en raison de leur hydrophilie et de leur faible poids moléculaire, les substances de contraste utilisées actuellement s'extravasent indifféremment au travers des vaisseaux normaux et tumoraux.

Des agents de contraste, mieux confinés au système vasculaire intact, sont mieux adaptés à la caractérisation de l'hypervascularisation et de l'hyperperméabilité inhérentes à la microvasculature tumorale [33]. Un agent de contraste vasculaire efficace devrait répondre à plusieurs critères : une distribution restreinte au système circulatoire, une rétention vasculaire longue et un effet important sur l'image. De tels agents dont le poids moléculaire réel ou apparent est proche de celui des protéines du sang sont en cours de développement.

Récemment, un agent de contraste spécifique des cellules endothéliales angiogéniques (exprimant l'intégrine $\alpha_v \beta_3$) a été mis au point par conjugaison, par le biais de ponts avidines, d'un liposome paramagnétique marqué au gadolinium et de l'anticorps anti- $\alpha_v \beta_3$ [34]. Une approche similaire consiste à greffer à des nanoparticules de Gd, via des ponts streptavidine, un anticorps biotinylé dirigé contre $\alpha_v \beta_3$ [35]. Ce ciblage de l'agent de contraste permettrait de mesurer l'angiogenèse de façon non-invasive, quantitative et spécifique.

II. BUT DU TRAVAIL

La vascularisation d'une tumeur est un des facteurs déterminants de son agressivité. Le développement de techniques non invasives permettant l'évaluation de la vascularisation s'avère donc primordial. A priori, l'IRM donne l'opportunité de réaliser de tels examens qui peuvent être répétés à intervalles relativement courts, permettant ainsi un suivi des thérapies. D'autre part, les traitements anti-angiogéniques provoquent l'apoptose des cellules tumorales. L'efficacité d'une thérapie anti-cancéreuse pourrait être approchée par l'évaluation du degré d'apoptose d'une tumeur. Pour observer l'angiogenèse et l'apoptose par IRM, le développement d'agents de contraste spécifiques est indispensable.

Une partie de ce travail a pour objectif de sélectionner par phage display un peptide qui possède une haute affinité pour les structures apoptotiques, après élimination des phages qui interagissent avec les structures non-apoptotiques. Des phages de haute affinité pour la phosphatidylsérine, molécule qui apparaît sur la face externe de la membrane des cellules en apoptose, seront ensuite sélectionnés. Cette sélection sera menée sur base de la technique ELISA. Les phages identifiés permettront après séquençage d'obtenir des peptides qui seront couplés à une molécule para ou superparamagnétique, afin de constituer un agent de contraste spécifique de l'apoptose.

L'autre partie du mémoire porte sur la mise au point d'un modèle d'angiogenèse adapté aux études IRM afin de tester l'efficacité des agents de contraste spécifiques de l'angiogenèse. Des observations comparatives des néovaisseaux seront réalisées par microscopie optique, par microscopie confocale et par IRM.

III.MATERIEL ET METHODES

1 MODELE DE L'AORTE DE RAT

Le modèle de l'aorte est une mise en culture en trois dimensions qui permet d'obtenir des vaisseaux angiogéniques à partir d'un tronçon d'aorte. Il existe deux types de présentations de ce modèle : la présentation classique et la présentation en tube. La présentation classique, en boîte de Pétri, permet l'observation au microscope inversé. La présentation en tube est une adaptation de la première pour l'IRM. En effet, pour obtenir une bonne résolution, il faut que le champ de vue (field of view) soit adapté à la taille de l'échantillon. Le diamètre du résonateur utilisé étant de 10 ou 15 mm, il est indispensable de présenter le modèle dans un tube de diamètre inférieur à 10 mm. Dans les deux cas, cette manipulation se déroule en 2 étapes successives : prélèvement de l'aorte et mise en culture. Le prélèvement de l'aorte est identique dans les deux présentations du modèle, seule la mise en culture varie d'une méthode à l'autre.

1.1 Le prélèvement de l'aorte

Le prélèvement se pratique sur des rats mâles Wistar (*Rattus norvegicus*) de 150 g. Pour éviter toute interaction médicamenteuse avec l'endothélium vasculaire étudié, les rats ne sont pas anesthésiés et sont sacrifiés par dislocation cervicale.

La cage thoracique est ouverte, ce qui permet de dégager le bloc cœur-poumon. L'aorte est séparée de la colonne vertébrale par une incision qui part du diaphragme et qui longe la colonne vertébrale jusqu'au niveau du cœur. L'aorte est ensuite nettoyée aussi délicatement que possible en conditions stériles. Tout d'abord la lumière de l'aorte est rincée par injection de milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) à l'aide d'une seringue stérile. Cette étape est importante car il faut impérativement éviter que du sang coagule dans la lumière du vaisseau.

La dissection fine de l'aorte, qui s'effectue à l'aide d'une pince d'ophtalmologie, permet d'enlever le tissu fibroadipeux qui enrobe l'aorte ainsi que de sectionner ses collatérales. Au cours de ces manipulations, l'aorte est maintenue en permanence dans du milieu DMEM, afin qu'elle ne s'écrase.

Une fois débarrassée du sang et des tissus fibroadipeux, l'aorte est découpée en tronçons de +/- 1mm de longueur. Ces segments d'aorte sont stockés dans du DMEM à 4°C. Le milieu contenant les segments est agité afin de nettoyer une dernière fois les tronçons d'aorte ou de permettre l'incubation avec un marqueur ($MnCl_2$ et le Dil-Ac-LDL).

1.2 Mise en culture des segments d'aorte

La présentation classique

Les segments d'aorte sont placés dans une matrice de collagène (400 μ l), qui est contenue dans des anneaux d'agar 1,5% (diamètre interne de 8 mm et diamètre externe de 16 mm). Ces derniers sont déposés dans une boîte de culture contenant le milieu qui diffusera au travers des anneaux en agar pour atteindre l'aorte et les capillaires en développement (*figure 19*).

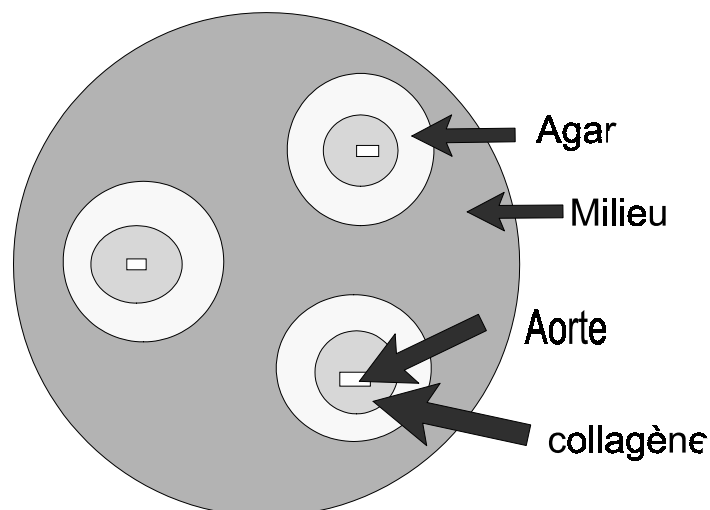


Fig.19. Modèle de l'aorte classique.

La préparation du collagène est une opération délicate car il faut éviter à tout prix qu'il polymérise avant d'être en contact avec le segment d'aorte. C'est pour cette raison que le collagène est fourni en solution acide, ce qui lui permet de rester liquide. Dès lors, toute la préparation de la solution de collagène (750 µl/ml de collagène R (Serva), 150 µl/ml de bicarbonate de sodium 186 mM et 100 µl/ml d'indicateur coloré (DMEM 10 x)) se base sur l'augmentation du pH vers la valeur de 7,4 et doit se faire à froid sous agitation constante. Une première couche de 200 µl de collagène est coulée dans le fond des puits. Sur cette première couche, un segment d'aorte est déposé sur sa longueur. Après polymérisation de la première couche, une seconde couche est déposée afin de recouvrir le tronçon d'aorte. Le milieu ajouté autour des puits est composé de MCDB 131 auquel on ajoute de la L-glutamine, du bicarbonate 92,5 mg/ml, des antibiotiques et un antimycotique. On dépose environ 30 ml de milieu par boîte. Les boîtes sont placées dans un incubateur (37°C, 5% CO₂) en attendant l'apparition des néovaisseaux qui se forment à partir des extrémités sectionnées.

La présentation en tube

Cette présentation (*figure 20*) dérive de la première, mais le collagène (600 µl) contenant le segment d'aorte est placé sur une couche d'agar 1,5% de 3 cm qui recouvre le fond du tube. Le collagène est ensuite recouvert par le milieu MCDB 131. Avant l'addition de collagène, les tubes contenant l'agar sont fermés avec des bouchons de gaze et d'ouate hydrophobe, l'ensemble étant autoclavé.

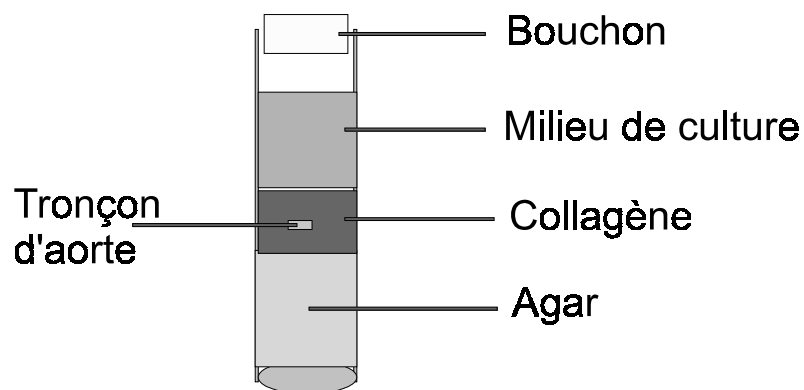


Fig.20. Modèle de l'aorte en tube.

1.3 Choix du marqueur des vaisseaux

Pour mettre en évidence les vaisseaux en microscopie confocale, le Dil-Ac-LDL a été sélectionné (Perchlorate de 1,1'-dioctadécyl - 3,3,3',3' - tétraméthylindo - carbocyanure, BTI). La cible du Dil-Ac-LDL est un récepteur situé exclusivement sur les macrophages et sur les cellules endothéliales. Il permet l'endocytose des particules Dil-Ac-LDL. Celles-ci sont dégradées dans les lysosomes et le Dil se retrouve dans les membranes intracellulaires. Les récepteurs, quant à eux, sont recyclés et retournent assurer leur fonction dans les membranes cytoplasmiques. Il est donc possible, par l'intermédiaire des mêmes récepteurs, d'accumuler du Dil dans la cellule. Le recyclage des récepteurs au LDL est assuré en 12 min. Ce marquage permettra de visualiser les cellules endothéliales, donc de mettre en évidence les vaisseaux angiogéniques ainsi que l'aorte.

Pour les observations IRM, le $MnCl_2$ a été utilisé. Le manganèse est connu pour modifier les temps de relaxation de l'eau et pour entrer spontanément dans les cellules musculaires lisses en empruntant les canaux calciques. Le $MnCl_2$ n'est donc pas utilisé pour mettre en évidence les vaisseaux angiogéniques, qui ne possèdent pas de cellules musculaires lisses, mais pour visualiser les différentes couches de l'aorte.

1.4 Observation des vaisseaux angiogéniques

Les tronçons d'aorte et leurs vaisseaux angiogéniques ont été observés à l'aide de trois techniques. Tout d'abord les aortes ont été observées avec les grossissements 40 x et 100 x par microscopie optique, à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase (Euromex).

Grâce à l'incorporation préalable du Dil-Ac-LDL dans les vaisseaux, ceux-ci ont pu être observés à l'aide d'un microscope confocal (Laser TCS 4D de Leica, Service de biologie et d'embryologie UMH, Prof. H. Alexandre). Le dil-Ac-LDL a une excitation maximale à 547 nm et une émission maximale à 565 nm. Pour cet examen microscopique, les échantillons ont dû être placés entre lames et lamelles.

L'observation IRM des échantillons a été réalisée à l'aide d'un imageur Avance 200 de 4,7 Tesla (Bruker), équipé d'une sonde de microimagerie et de résonateurs de 10 et 15 mm de diamètre. Le traitement des images est réalisé avec le logiciel Paravision. Les images ont été acquises en utilisant la séquence « multi-slice multi-echo » (MSME), avec les paramètres suivants : temps de répétition (TR) de 635 ms, temps d'écho (TE) de 10 à 30 ms, field of view (FOV) de 2,5 à 3 cm, nombre d'acquisitions (NA) de 22 à 40, matrice 512 x 512.

2 PHAGE DISPLAY

2.1 Amplification de la librairie de phages

Afin de réaliser plusieurs expériences de phage display, la librairie initiale doit être amplifiée. Au cours de l'amplification, il est impératif de ne pas diminuer sa diversité. C'est la raison pour laquelle les phages sont amplifiés dans un très grand volume de milieu de culture.

2.1.1 Infection

Dans 20 ml de milieu LB²⁴, on fait croître une pré-culture d'*Escherichia coli* TG1²⁵. Le lendemain, la culture est diluée 100 fois dans 500 ml de milieu 2TY (ICN) à 37°C. La croissance est réalisée jusqu'au moment où la culture atteint une DO₆₀₀ de 0,5 à 0,7. La culture est alors infectée avec 10¹¹ phages filamenteux M13 et agitée lentement à 80 rpm à 37°C pendant 30 min. La culture est diluée 5 fois dans le milieu 2TY contenant 0,2 µg/ml Tc²⁶ et agitée lentement à 37°C pendant 30 min. La Tc est ajoutée pour avoir une concentration finale de 10 µg/ml. On laisse croître à 37°C et 130 rpm pendant une nuit.

²⁴ LB (10 g/l de NaCl, 10 g/l de Tryptone, 5 g/l de Yeast extract, pH 7)

²⁵ (géotype : supE hsdD5 thi D(lac-proAB) F' [traD36 proAB+ lacIq lacZDM15]).

²⁶ Tc (Chlorhydrate de tétracycline)

2.1.2 Récupération des phages

La culture est transférée dans un tube et centrifugée 20 min à 8000 rpm. Le surnageant est récupéré et une solution 1/5 V de PEG₆₀₀₀²⁷ 20% et NaCl 2,5 M est ajoutée. Le tout est incubé dans la glace au moins 1 heure. Cette étape permet la précipitation des phages. Le mélange est centrifugé 20 min à 6000 rpm et le surnageant est complètement éliminé. Le culot est repris dans 40 ml d'eau, puis centrifugé 20 min à 8000 rpm à 4 °C. Le surnageant contenant les phages est filtré stérilement au travers d'un filtre de 0,45 µm (Orange Scientific) dans un tube de 50 ml. 1/5 V PEG₆₀₀₀/NaCl sont ajoutés, l'ensemble est incubé dans la glace pendant au moins 30 min et centrifugé à 3200 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est complètement éliminé et le culot est repris dans 5 ml de TBS²⁸. La DO₂₆₀ est mesurée pour déterminer la concentration phagique selon l'équation 1.

$$\boxed{\text{Concentration phagique} = DO_{260} \times \text{dilution} \times 2,14 \cdot 10^{11}} \quad (1)$$

(d'après réf. [36]).

Du glycérol stérile est ajouté pour avoir une concentration finale de 5% et les différents lots sont conservés en aliquots contenant $2 \cdot 10^{12}$ phages/ml.

2.2 Phage display *in vitro*

Comme décrit au chapitre précédent, un des buts du phage display est de sélectionner des phages de forte affinité pour une structure donnée (*figure 21*). Dans notre cas il s'agit de la phosphatidylsérine (PS) qui est présentée aux phages sous forme de liposomes constitués à la fois de phosphatidylsérine et de phosphatidylcholine (PC). Cette composition mixte est justifiée par le fait que les liposomes constitués exclusivement de phosphatidylsérine ne sont pas stables. Ceci introduit la nécessité d'éliminer les phages qui interagissent avec la phosphatidylcholine.

²⁷ PEG₆₀₀₀ (Polyéthylène glycol)

²⁸ TBS (8,8 g/l de NaCl, 2,4 g/l de Tris HCl, pH 7,5).

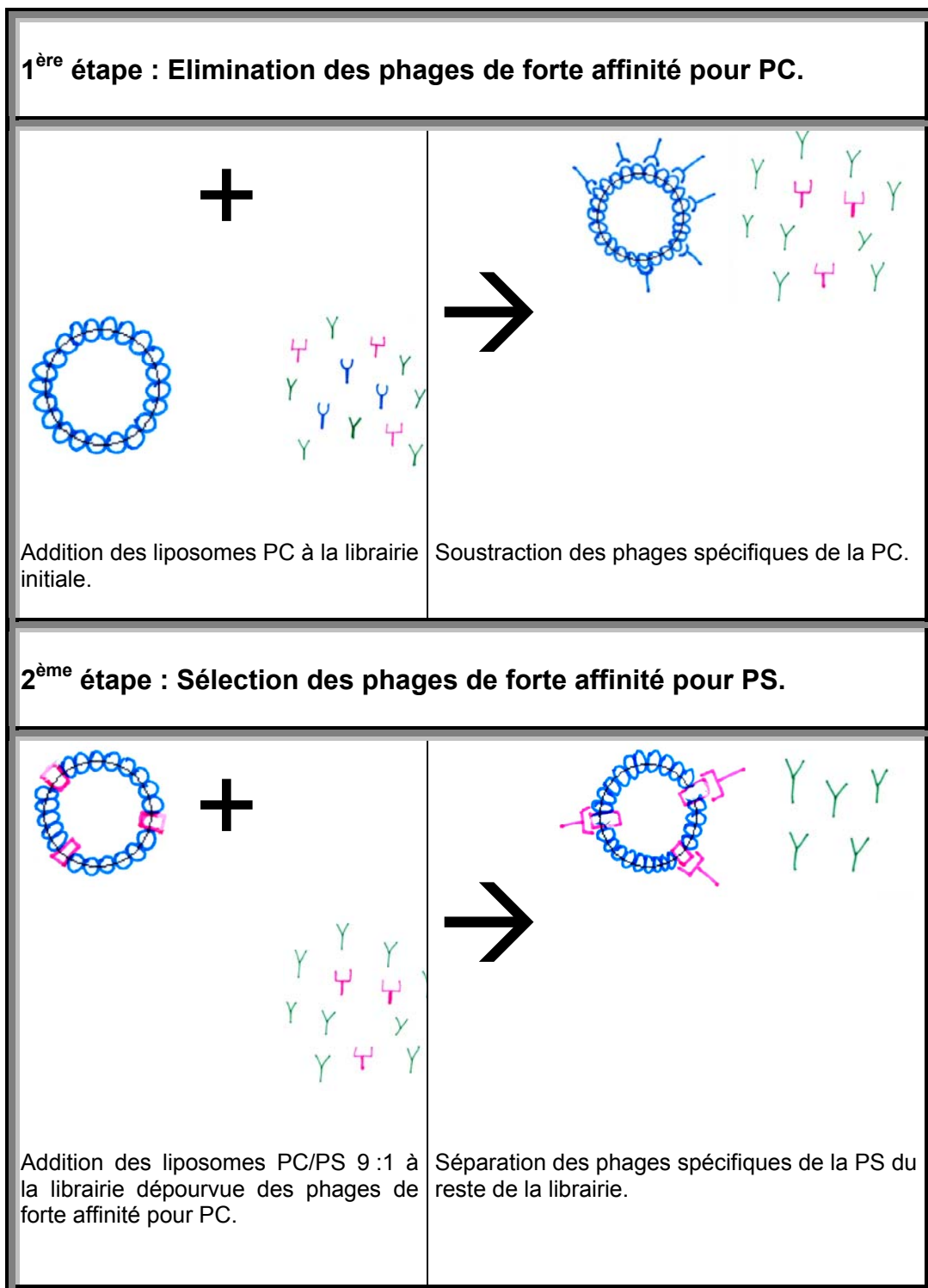


Fig.21. Principe du phage display *in vitro*.

2.2.1 Préparation des liposomes

250 mg de phospholipides sont dissous dans 5 ml de chloroforme. La solution est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif et 5 ml de TBS sont ajoutés. La suspension est agitée 1 h à 50°C et extrudée sur un filtre de 1 µm. Dans le cas des liposomes constitués exclusivement de phosphatidylcholine, c'est le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) qui a été utilisé. Pour les liposomes mixtes, c'est un mélange DPPC : DPSS (dipalmitoylphosphatidylsérine) 9 :1.

2.2.2 Passage de la librairie de phages sur les liposomes

Incubation des liposomes

La suspension de liposomes PC est centrifugée 10 min à 12000 rpm. On ajoute au culot $2 \cdot 10^{12}$ phages, 50 µl de TBS et le volume est complété avec du TBS pour obtenir 500 µl. Le mélange est incubé 2 h dans le rotateur à 4°C. La suspension de liposomes PC et de phages est centrifugée 10 min à 12000 rpm. Le surnageant, contenant des phages qui interagissent peu avec PC, est récupéré et transféré dans le tube contenant le culot de liposomes PS. Cette suspension est incubée à 4°C pendant la nuit.

Récupération de l'output

La suspension de liposomes PS et de phages est centrifugée pendant 10 min à 12000 rpm. Le culot est lavé 10 fois avec 500 µl de TBS + 0,1% de tween 20. 500 µl de glycine 0,1M (pH 2) sont ajoutés et le tout est incubé 15 min à T° ambiante dans le rotateur. Ceci permet le décrochage des phages de leur cible. Le surnageant (output²⁹) est récupéré et placé dans de la glace. La solution est neutralisée en ajoutant 125 µl de tris 1M (pH 8).

Amplification de l'output

10 ml de culture d'*Escherichia coli* TG1 dont la DO_{600} est de 0,6 sont ajoutés à 300 µl d'output et le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C, puis centrifugé 10 min à 2000 rpm à 37°C. Le culot est repris dans 1 ml de LB + Tc. 250 µl sont étalés par boîte et les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

Récupération des phages amplifiés

²⁹ output = phages qui interagissent avec la cible.

3 ml de LB sont ajoutés sur les boîtes pour suspendre les bactéries et les phages. On centrifuge la suspension pendant 20 min à 8000 rpm et à 4°C. 1/5 V PEG₆₀₀₀/NaCl sont ajoutés au surnageant et le mélange est incubé pendant 2 h dans la glace, puis centrifugé 20 min 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 sont à nouveau ajoutés, la préparation est incubée pendant 30 min à 4°C. On centrifuge 5 min à 13000 rpm et à 4°C puis le culot est remis en suspension dans 500 µl de TBS. La DO₂₆₀ est mesurée. Du glycérol est ajouté à l'output restant pour atteindre une concentration finale de 5%. Les phages sont ensuite conservés à -20°C.

L'ensemble de ces manipulations est effectué trois fois, en repartant des phages amplifiés de l'expérience précédente. De cette manière, on obtient des phages de plus en plus spécifiques pour la PS.

2.3 Phage display ex vivo

La détection de molécules apoptotiques sur les foies de souris par phage display *ex vivo* se déroule en deux étapes. Lors de la première phase, une population de phages qui ne reconnaît pas les structures hépatiques saines est sélectionnée. Des foies sains sont donc d'abord perfusés avec la librairie de phages. Les phages contenus dans le perfusat sont ensuite amplifiés et isolés pour être réintroduits à nouveau dans le circuit de perfusion d'un foie sain. Les phages récupérés dans le perfusat après 4 passages successifs au travers d'un foie sain ont donc très peu d'affinité pour les structures hépatiques saines. Dans la deuxième phase, les phages sélectionnés seront ceux qui présentent la plus grande affinité pour les foies apoptotiques. Le schéma expérimental est très proche de celui évoqué pour la première phase à l'exception des foies perfusés, qui sont dans ce cas apoptotiques, et des phages d'intérêt, présents dans le foie et plus dans le perfusat. Pour des raisons de commodité d'induction d'apoptose, nous avons choisi de travailler sur le foie de souris.

2.3.1 Perfusion du foie de souris

Chirurgie

L'animal est anesthésié par injection intrapéritonéale de Nembutal® (Sanofi Santé Animale Bruxelles, Belgique). Pour éviter toute coagulation, 25 µl d'un anticoagulant (héparine, Léo Pharmaceutical Product, Belgique) sont injectés dans la veine cave inférieure. Le cathéter est inséré dans la veine porte et ligaturé. Le cathéter est rapidement raccordé au circuit de perfusion et la veine cave est sectionnée afin d'éviter une surpression au niveau du foie. Le foie est ensuite isolé et placé dans le tube du circuit de perfusion.

Description du circuit de perfusion

La solution de perfusion est amenée au foie de souris (BALB/cByJlco de 5 à 6 semaines) à un débit physiologique de 15 ml/min par une pompe péristaltique. L'oxygénation du perfusat est assurée par du carbogène (95% O₂, 5% CO₂). Le foie est contenu dans un tube de 25 mm de diamètre. Le réservoir de la solution de perfusion ainsi que le tube contenant le foie perfusé sont placés dans un bain thermostatique à 37°C. Les foies sont perfusés avec le tampon de Krebs-Henseleit (K-H) de composition : NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄.7H₂O 1.2 mM, Na₂EDTA 0.5 mM, NaHCO₃ 25 mM et glucose 5.5 mM.

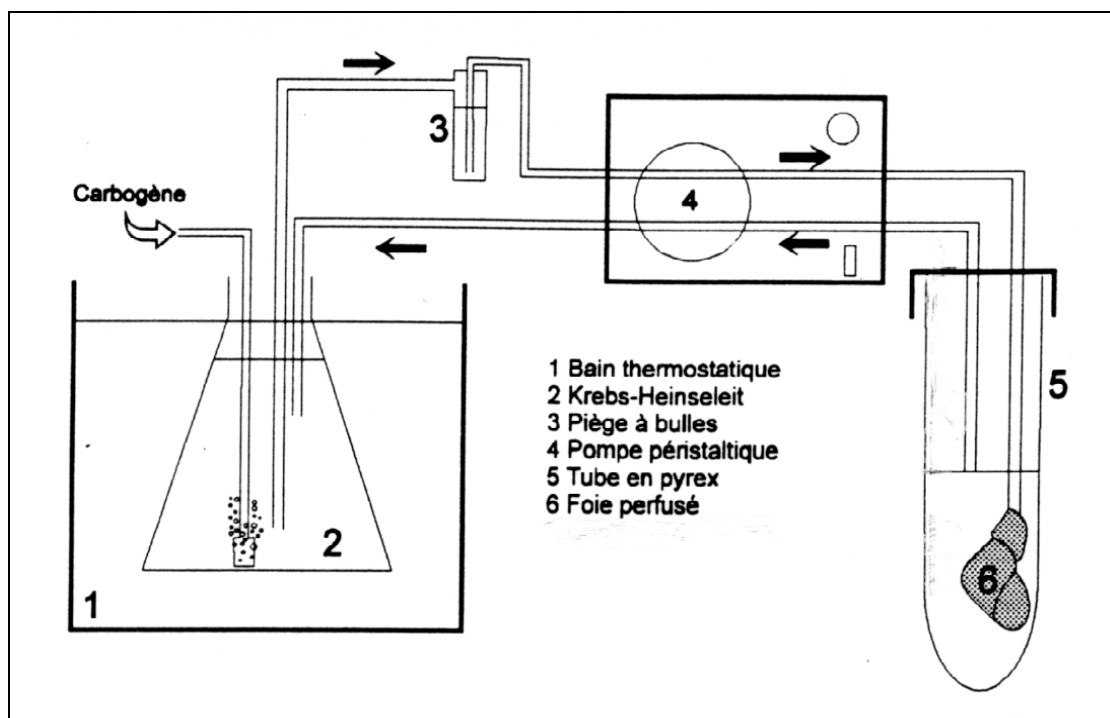


Fig.22. Circuit de perfusion.

2.3.2 Elimination des phages qui présentent une affinité pour les structures hépatiques

Incubation des phages avec le foie sain

Le foie sain est isolé et perfusé avec du K-H pendant quelques minutes afin de le rincer. Ensuite, il est perfusé 30 min avec la librairie de phages, en circuit fermé. Le perfusat et le foie sont récupérés puis le foie est homogénéisé à l'aide d'un ultraturax dans du tampon TBS.

Récupération des phages présents dans le foie en vue de leur dosage

Le broyat de foie est incubé pendant 30 min à température ambiante dans le rotateur et dans un volume égal de glycine 0,1M (pH 2). Ceci permet le décrochage des phages des structures hépatiques. En effet, le pH acide diminue la constante d'affinité entre le phage et la cible. La solution est neutralisée en ajoutant 1/8 V de tris 1M (pH 8). Afin d'éliminer les cellules hépatiques, la solution est centrifugée 30 min à 4500 rpm et le surnageant est récupéré.

Amplification des phages présents dans le perfusat.

Une quantité égale de culture de *E. coli* souche TG1 ($DO_{600} = 0,6$) est ajoutée au perfusat. Après 30 min d'incubation à 37°C, le mélange est centrifugé 10 min à 2000 rpm. Le culot est repris dans 1ml de LB + Tc afin de l'étaler à raison de 250 µl par boîte. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

Récupération des phages amplifiés.

Les phages amplifiés sont récupérés de la même manière que pour le phage display *in vitro*. Comme pour le phage display *in vitro*, l'ensemble de ces étapes est réalisé 3 fois afin d'obtenir des phages qui présentent très peu d'affinité pour les structures hépatiques.

2.3.3 Sélection des phages qui présentent une affinité pour les structures apoptotiques

Induction de l'apoptose et incubation des phages avec le foie apoptotique

La souris est injectée avec 10 µl d'anti-FAS (PharMingen International) par voie intraveineuse. L'anti-FAS va se fixer sur son récepteur (FAS) et déclencher l'apoptose. Deux heures après l'injection, le foie apoptotique est isolé et perfusé avec du Krebs pendant quelques minutes afin de rincer le foie. Ensuite, le foie est perfusé 30 min avec la librairie de phages sélectionnée dans la première phase, en circuit fermé. Le perfusat et le foie sont récupérés. Une partie du foie est prélevée afin de vérifier ultérieurement la présence d'apoptose par la méthode TUNEL, le reste du foie est homogénéisé dans du tampon TBS.

Récupération des phages présents dans le foie

Le broyat est incubé pendant 30 min à température ambiante dans le rotateur et dans un volume égal de glycine 0,1M (pH 2). La solution est neutralisée en ajoutant 1/8 V de tris 1M (pH8). La solution est centrifugée pendant 30 min à 4500 rpm et le surnageant est récupéré.

Amplification des phages présents dans le foie

Le protocole est exactement identique à celui décrit pour l'amplification des phages présents dans le perfusat.

2.4 Dosage des phages par ELISA

La technique ELISA a été utilisée pour le dosage des phages au cours des différents passages. Les plaques multipuits (Sarstedt) sont incubées une nuit à température ambiante avec les phages. Ceci permet l'adsorption des phages sur les plaques. Les plaques sont bloquées par incubation pendant 2 h à température ambiante avec un mélange PBS³⁰ et Gloria 4% (lait en poudre). Cette étape permet d'empêcher les interactions non spécifiques entre l'anticorps et la plaque. Ensuite, l'anticorps anti-phage (HRP³¹ anti-M13, ICN) dilué 5000x dans du mélange PBS et Gloria 4% est incubé pendant 1h30 à température ambiante. Finalement, 160 µl d'une solution contenant 10 ml acide citrique 0.1M (pH 2), 10 ml Na₂HPO₄ 71,6 g/l, 8 µl H₂O₂ et 200 µl OPD³² (ICN) sont ajoutés dans chaque puits. L'OPD prend une coloration jaune quand la peroxydase présente sur l'anticorps anti-phage a utilisé l'H₂O₂. Après 30 min, la réaction est stoppée par 50 µl d'H₂SO₄ 4M. Entre chaque étape, les plaques sont lavées avec du PBS additionné de 0,5% Tween 20 (ICN). Le dosage est ensuite effectué par mesure de la DO à 450 nm.

2.5 Evaluation de l'affinité des phages envers PS

Les plaques sont d'abord incubées avec la PS, ce qui permet son adsorption, puis bloquées avec un mélange PBS et Gloria 4%, et finalement incubées avec les phages. La suite du protocole (incubation avec l'anticorps anti-phage et les étapes suivantes) est identique à celle du dosage des phages.

³⁰ PBS (7 g/l de NaCl, 14,3 g Na₂HPO₄.12H₂O et 1.36 g/l de KH₂PO₄, solution amenée à pH 7,2-7,4 avec du NaOH)

³¹ HRP (Horseradish peroxydase)

³² OPD (Dihydrochlorate de O-phénylènediamine)

2.6 Détermination des phages de plus forte affinité pour la phosphatidylsérine

Il est nécessaire de déterminer les phages ayant la plus grande affinité pour la PS. Ceci est réalisé par microculture de colonies bactériennes individuelles. En effet, une bactérie est infectée par un seul phage ; on ne retrouve donc qu'un seul type de phage par colonie. L'affinité de chaque type de phage est ensuite déterminée par la technique ELISA.

Microculture des colonies individuelles

L'homogénat de foie apoptotique est dilué 10 à 10^5 fois. 100 μ l de chaque dilution sont infectés avec 900 μ l d'*E. coli* TG1 à une DO_{600} de 0,6 puis incubés pendant 30 min à 37°C. 100 μ l sont étalés sur des boîtes LB + Tc afin d'obtenir des colonies individuelles. L'incubation dure une nuit à 37°C. Dans une plaque de microculture, 100 μ l de 2TY + Tc sont déposés par puits. A l'aide de cure-dents stériles, des bactéries sont prélevées au sein de chaque colonie, déposées dans un puits différent et incubées une nuit à 37°C. Les bactéries vont libérer des phages. La plaque de microculture est dupliquée sur une boîte LB + Tc, ce qui permet par la suite de remettre en culture les colonies qui abritent les phages de plus forte affinité.

Screening des phages par ELISA

La plaque de microculture est centrifugée pendant 15 min à 1000 rpm et à 4°C. 50 μ l du surnageant sont prélevés et déposés dans les puits d'une plaque ELISA préalablement recouverte de PS et bloquée avec le mélange PBS Gloria 4 %. L'incubation dure 1h30 à 37°C. La suite de la manipulation a été décrite dans le paragraphe 2.4. Les plus grandes DO correspondent aux phages de plus forte affinité.

2.7 Confirmation de la présence d'apoptose par histologie

2.7.1 Préparation des échantillons pour l'analyse histologique

Les échantillons de foie prélevés sont plongés très rapidement dans le fixateur (paraformaldéhyde 4%), afin d'éviter l'autolyse de l'organe. Le volume de fixateur est au moins 20 fois supérieur à celui des échantillons. Le temps de séjour y est de 24 h.

Les échantillons sont ensuite déshydratés par plusieurs passages dans des bains d'éthanol de 70° à 95°, puis dans un bain de butanol. L'enrobage dans la paraffine est réalisé par trois immersions successives 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) et déposées sur une plaque chauffante à 37°C.

2.7.2 Colorations histologiques

Avant d'effectuer les colorations, les coupes sont déparaffinées et réhydratées. Ceci se fait par passages dans des bains de toluène (2 fois 10 min), des bains d'éthanol (3 fois quelques sec) et dans un bain d'eau courante (10 min).

Afin de colorer les noyaux, les coupes sont colorées par l'hématoxyline de Groat. Les échantillons sont ensuite traités au bleu luxol ou au trichrome de Masson (fuchsine, orange G molybdique, vert lumière acétique) afin de mettre en évidence le cytoplasme et les autres structures histologiques. Après coloration, les coupes subissent des bains successifs d'éthanol, de butanol et de toluène. Une lamelle préalablement enduite d'un baume synthétique est ensuite déposée sur l'échantillon.

2.7.3 Méthode TUNEL

L'apoptose est détectée par la méthode TUNEL (TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) mediated dUTP nick end labeling) [37]. La terminale transférase utilise un mélange de dATP et de dUTP biotinylé pour prolonger les extrémités libres des nombreux fragments d'ADN de 185 paires de bases caractéristiques des noyaux apoptotiques (*figure*

23). La révélation de ces noyaux est réalisée grâce à l'utilisation du complexe ABC constitué de streptavidine et de peroxydase biotinylée. Les sites libres du complexe ABC se fixent à la biotine couplée au dUTP. L'utilisation d'un substrat (DAB, diaminobenzidine) incolore qui par oxydation lors de la réduction de peroxyde d'hydrogène par la peroxydase devient brun-noir et insoluble dans l'eau permet le marquage des noyaux en apoptose.

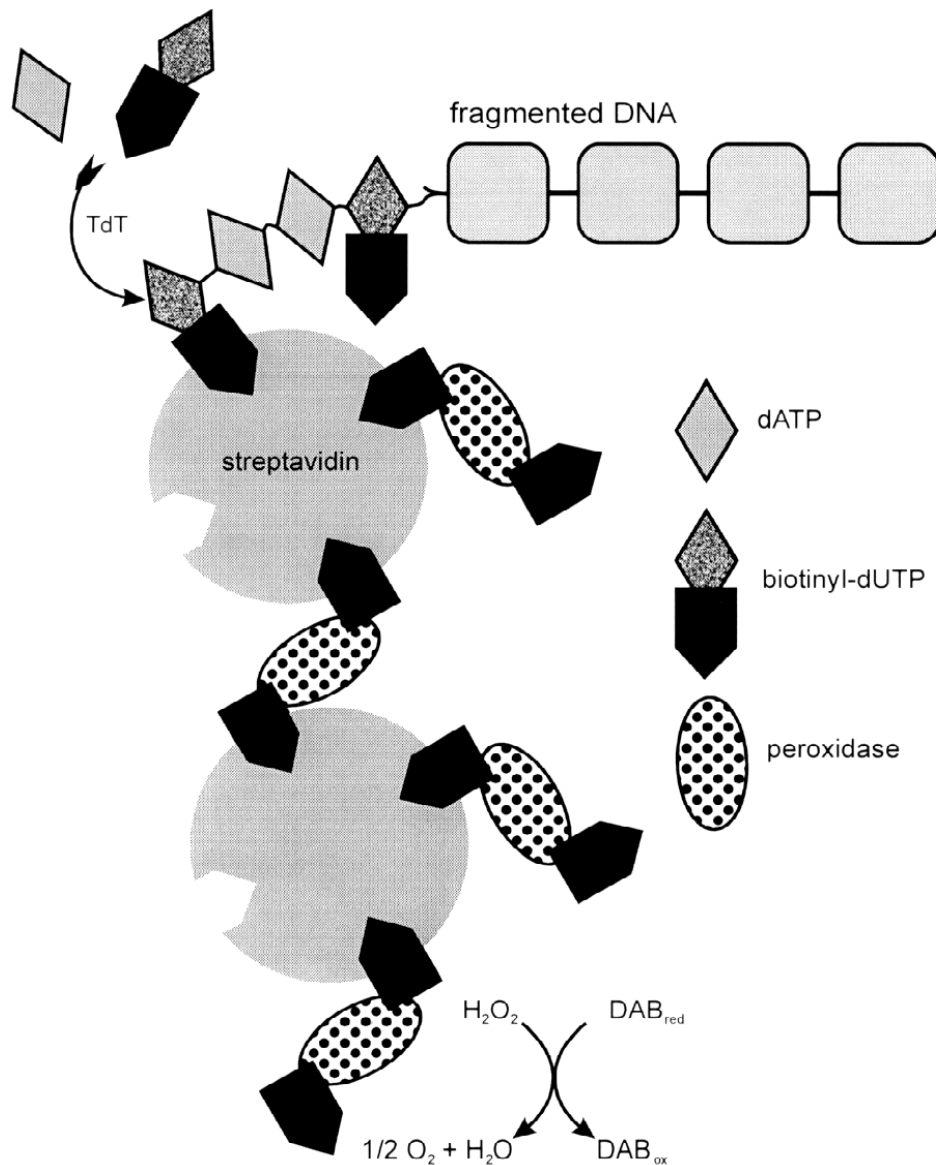


Fig.23. Détection de l'ADN fragmenté dans les cellules apoptotiques.

Le déparaffinage s'effectue de la même façon que pour la coloration classique. Afin de permettre une légère décondensation de l'ADN, les coupes séjournent 1 h dans l'eau à

60°C. Les coupes sont ensuite incubées 15 min à 37°C avec le tampon de réaction pour la TdT³³. Les coupes sont incubées pendant 2 h à 37°C avec la solution de réaction³⁴.

Après trois rinçages de 5 min dans du PBS, les coupes sont incubées 30 min 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 de DAB 0,02% en tampon PBS et H₂O₂ 0,01% filtrée préalablement sur un filtre de 0,22 µm. La réaction est stoppée par un bain d'eau distillée. Les coupes sont contre-colorées à l'hémalum et au bleu luxol, déshydratées dans des bains d'alcool puis de toluène et montées.

2.7.4 Calcul de l'indice apoptotique.

Le comptage des cellules apoptotiques a été réalisé au grossissement 40 X sur cinq champs sélectionnés de façon aléatoire au sein des coupes traitées par la méthode TUNEL. L'indice apoptotique est obtenu en divisant le nombre de cellules apoptotiques par le nombre total d'hépatocytes présents dans le même champ.

³³ Tampon de réaction pour la TdT (0,321 g/l de Na-cacodylate, 0,03 g/l de Tris, 2,5 mg de BSA/l et 0,36 g de CoCl₂. 6H₂O)

³⁴ Solution de réaction (0,005 nmol/µl biotine-dUTP, 0,02 nmol/µl dATP et 0,5 U/µl TdT enzyme dilué dans le tampon TdT)

IV. RESULTATS EXPERIMENTAUX

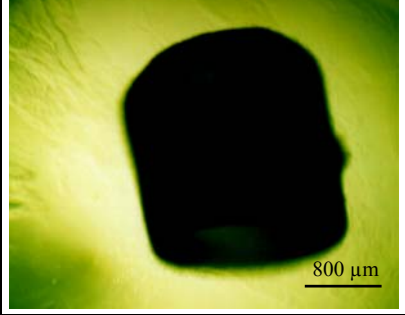
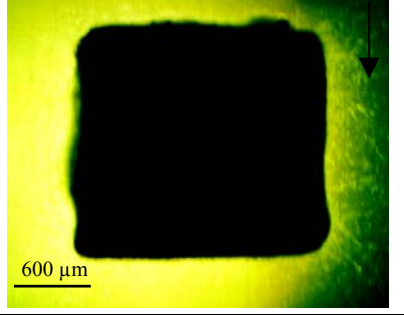
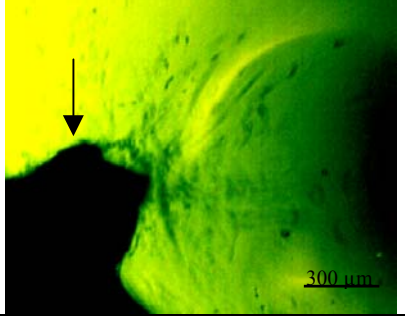
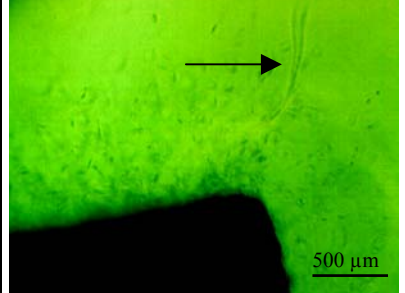
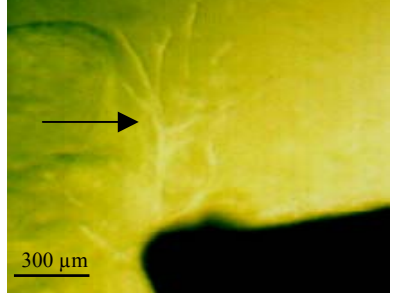
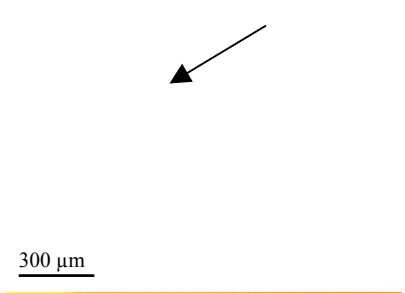
1 MODELE DE L'AORTE

1.1 Microscopie optique

Les différentes étapes de la croissance des néovaisseaux ont été observées durant une dizaine de jours (planche 1). Les différences de teintes et de tailles proviennent du traitement informatique des photos. La pellicule utilisée a une sensibilité de 200 ASA. Le segment d'aorte apparaît en noir sur les clichés.

Au jour 0, qui est le jour de mise en culture, seule l'aorte est présente (photo 1), les fibroblastes n'apparaissant que quelques jours plus tard (photo 2). Ces fibroblastes dégradent le collagène afin de permettre le passage des cellules endothéliales. Cette dégradation va aboutir à la formation de canaux creusés dans le collagène (photo 4). La densité de fibroblastes est plus importante au niveau des extrémités des tronçons (photo 4), ou au niveau des collatérales (photo 3). En effet, les lésions provoquées au niveau des extrémités ou des collatérales, lors du prélèvement de l'aorte, occasionnent la libération de nombreux facteurs de croissance. Ces facteurs permettent la migration fibroblastique, le recrutement et la stimulation des cellules endothéliales et la croissance des vaisseaux angiogéniques. C'est également pour cette raison que les néovaisseaux prennent toujours naissance à partir des extrémités (photo 6) ou des collatérales du segment d'aorte. Au jour 9, les cellules endothéliales ont migré pour former les néovaisseaux (photos 5 et suivantes). En se divisant, les cellules endothéliales permettent l'élongation du vaisseau angiogénique et la dichotomisation de celui-ci (photos 7 à 9). En se développant, les néovaisseaux forment un réseau autour des extrémités du segment.

La microscopie inversée permet de suivre aisément la formation des néovaisseaux. Au cours de ces examens, les conditions de stérilité sont conservées ce qui permet d'observer le même segment à intervalles réguliers.

		
<p>Photo 1 : Jour 0. Segment d'aorte. <i>Grossissement 40 x.</i></p>	<p>Photo 2 : Jour 3. Segment d'aorte et migration des fibroblastes. <i>Grossissement 40 x.</i></p>	<p>Photo 3 : Jour 3. Collatérale et migration des fibroblastes. <i>Grossissement 40 x.</i></p>
		
<p>Photo 4 : Jour 5. Néovaisseaux. <i>Grossissement 40 x.</i></p>	<p>Photo 5 : Jour 9 Néovaisseaux. <i>Grossissement 40 x.</i></p>	<p>Photo 6 : Jour 9. Néovaisseaux. <i>Grossissement 40 x.</i></p>

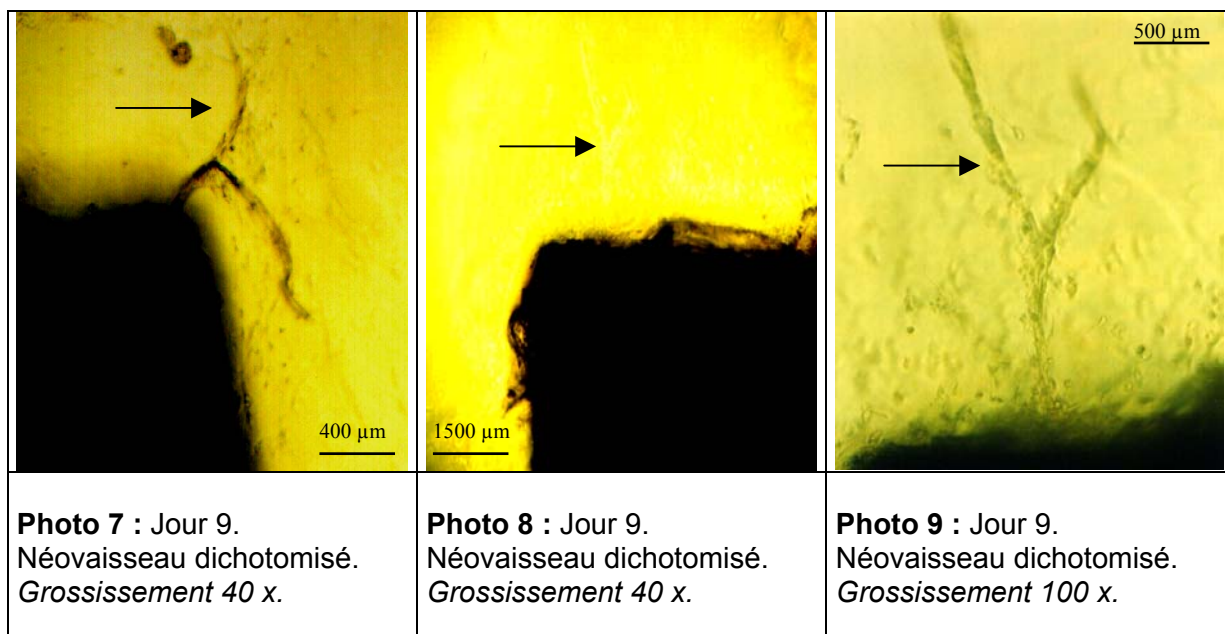


PLANCHE 1.

1.2 Imagerie par résonance magnétique

Le repérage de la position du segment d'aorte a été réalisé par la séquence MSME (multi-slice, multi-écho) avec les paramètres suivants : TR = 521.4 ms, TE = 6 ms, matrice 256 x 256, épaisseur de tranche = 1 mm, FOV = 3 cm et TA = 2 ' 13 ". Toutes les images reprises sur les planches 2 et 3 ont été acquises avec cette même séquence MSME.

L'IRM permet de visualiser la paroi de l'aorte. Sur les clichés celle-ci apparaît en blanc, tandis que le collagène est grisâtre. La résolution ne permet cependant pas d'observer les cellules endothéliales, les fibroblastes dans le collagène, ni les vaisseaux angiogéniques. Il est toutefois possible de tirer des informations anatomiques : les aortes incubées avec le $MnCl_2$ voient le centre de leur paroi apparaître noir (photos 3, 4, 7 et 8). Il semble que cette région corresponde à la média, dont les cellules musculaires lisses internalisent le $MnCl_2$. A forte concentration, le manganèse paramagnétique joue le rôle d'agent de contraste négatif en diminuant considérablement le temps de relaxation transversale des protons.

Sans agent de contraste spécifique des vaisseaux angiogéniques, l'IRM ne permet pas l'observation de ces vaisseaux et ne peut donc pas être appliquée à ce modèle pour évaluer le développement des vaisseaux angiogéniques. Néanmoins, l'adaptation du modèle de l'aorte à l'IRM (présentation en tube) offre la possibilité d'observations répétées en

maintenant les conditions de stérilité. Des essais en utilisant des agents de contraste spécifiques de l'angiogenèse sont envisagés pour l'avenir.

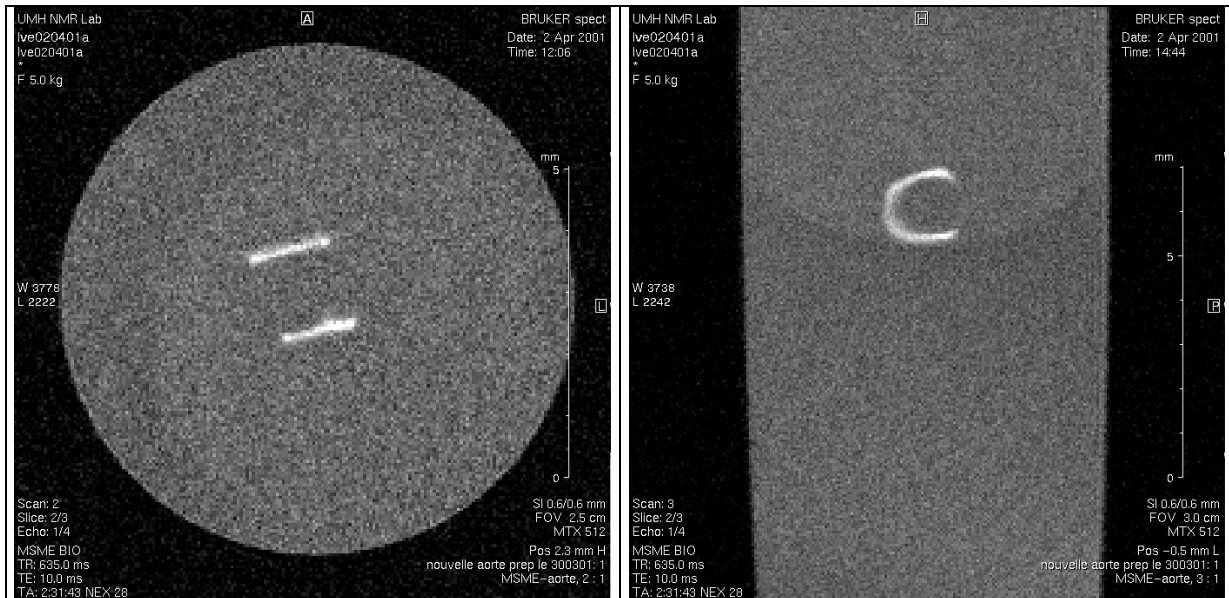


Image 1 : Coupe longitudinale dans un segment d'aorte, 3 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 10 ms, TR = 635 ms, FOV = 2,5 cm, NA = 28, TA= 2h 31' 43", matrice 512 x 512.

Image 2 : Coupe transversale dans un segment d'aorte, 3 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 10 ms, TR = 635 ms, FOV = 3 cm, NA = 28, TA= 2h 31' 43", matrice 512 x 512.

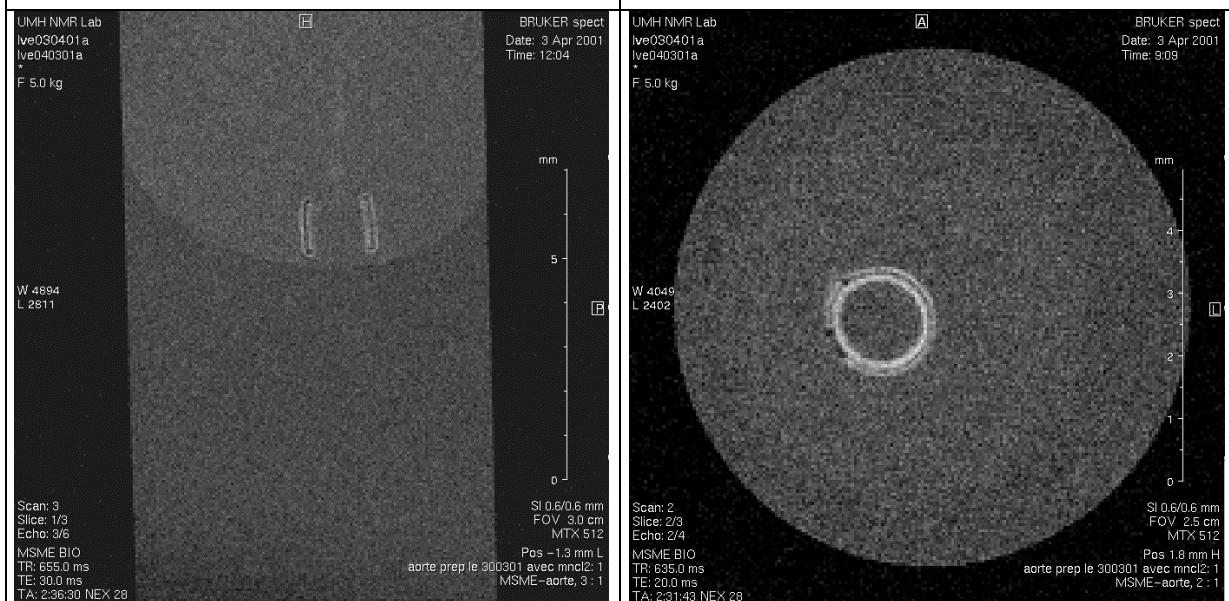


Image 3 : Coupe longitudinale dans un segment d'aorte incubé avec du $MnCl_2$, 4 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 30 ms, TR = 655 ms, FOV = 3 cm, NA = 28, TA = 2h 36' 30'', matrice 512 x 512.

Image 4 : Coupe transversale dans un segment d'aorte incubé avec du $MnCl_2$, 4 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 20 ms, TR = 635 ms, FOV = 2,5 cm, NA = 28, TA = 2h 36' 30'', matrice 512 x 512.

PLANCHE 2.

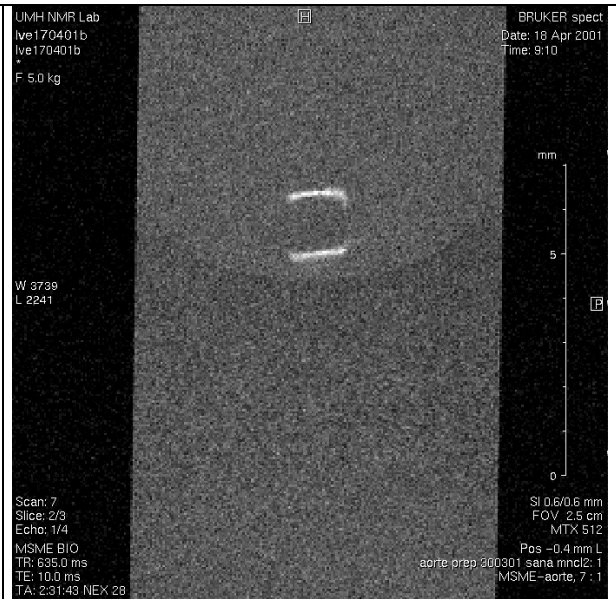
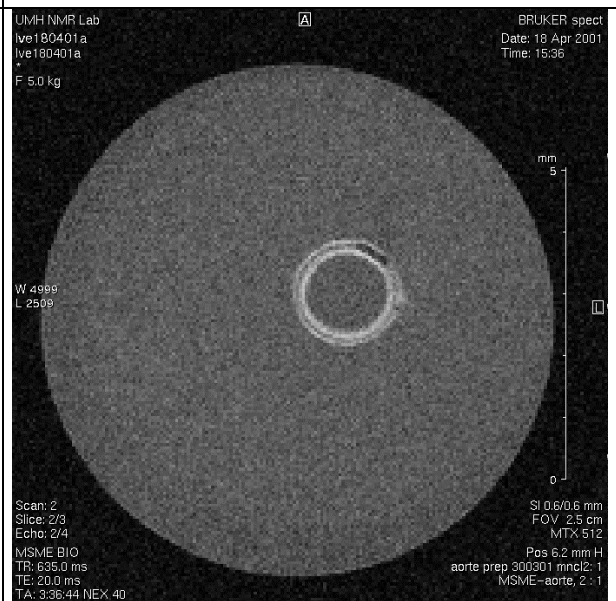


Image 5 : Coupe longitudinale dans un segment d'aorte, 15 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 10 ms, TR = 635 ms, FOV = 2,5 cm, NA = 22, TA = 4 h 55' 12'', matrice 512 x 512.

Image 6 : Coupe longitudinale dans un segment d'aorte, 15 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 10 ms, TR = 635 ms, FOV = 2,5 cm, NA = 28, TA = 2 h 31' 43'', matrice 512 x 512.



<p>Image 7 : Coupe longitudinale dans un segment d'aorte incubé avec du MnCl₂, 15 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 30 ms, TR = 635 ms, FOV = 2,5 cm, NA = 40, TA = 3h 36' 44", matrice 512 x 512</p>	<p>Image 8 : Coupe transversale dans un segment d'aorte incubé avec du MnCl₂, 15 jours après sa mise en culture. MSME, TE = 20 ms, TR = 635 ms, FOV = 2,5 cm, NA = 40, TA = 3h 36' 44", matrice 512 x 512.</p>
--	--

PLANCHE 3.

1.3 Microscopie confocale.

Les segments d'aorte ont été parallèlement étudiés par imagerie confocale. Pour cet examen microscopique, les échantillons incubés dans le Dil-ac-LDL ont été montés entre lame et lamelle. Contrairement à la microscopie inversée et à l'IRM, la microscopie confocale nécessite la destruction de l'échantillon. Dans ces conditions d'observation la stérilité n'est pas maintenue et la remise en culture pour un examen ultérieur n'est donc plus possible. Il est également important de signaler que les images obtenues sont déformées par rapport à la réalité, car l'aorte et les vaisseaux sont comprimés entre lame et lamelle. De plus, la distance focale du microscope confocal étant petite, l'objectif exerce lui aussi une pression sur l'échantillon. Cette technique d'imagerie a néanmoins permis de confirmer la présence de néovaisseaux issus du segment d'aorte mis en culture (planches 4 et 5). Le Dil-Ac-LDL qui est le marqueur utilisé, s'accumule dans les cellules endothéliales et dans les macrophages, mais dans le cas du modèle de l'aorte qui ne contient pas ce dernier type cellulaire, il ne met en évidence que les cellules endothéliales.

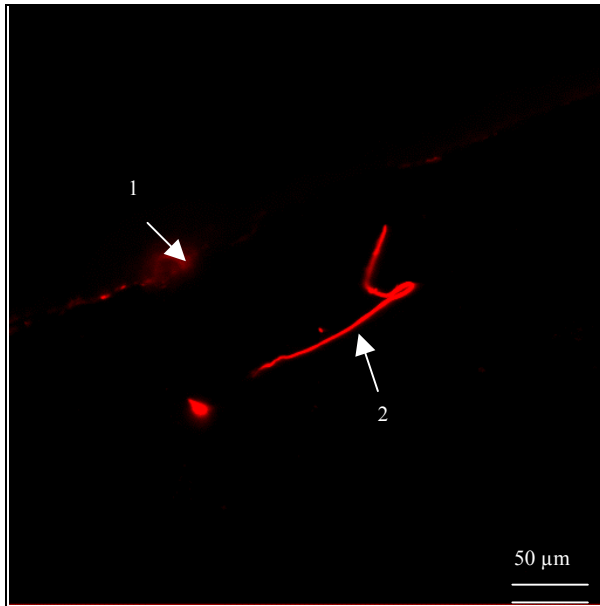


Photo 1: Jour 9. Bord de l'aorte (1), vaisseau angiogénique (2).
Grossissement 40 x.

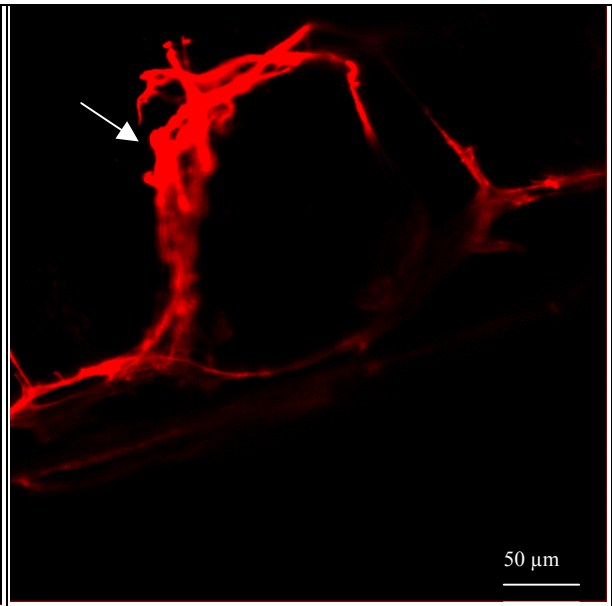


Photo 2: Jour 9. Collatérale (→).
Grossissement 40 x.

PLANCHE 4

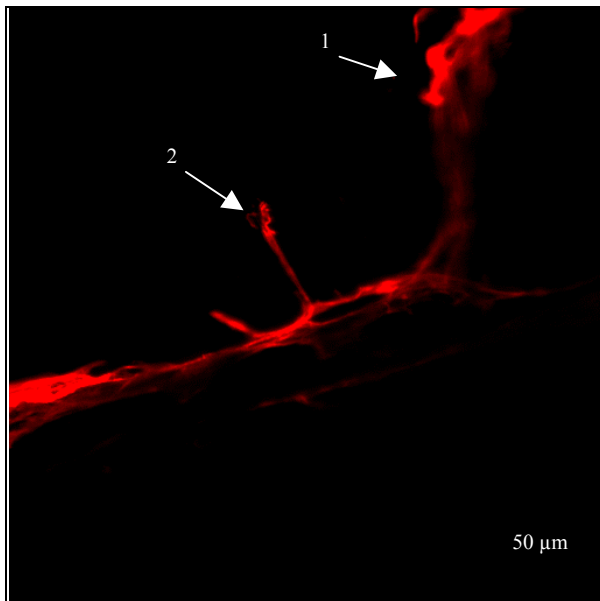


Photo 3: Jour 9. Collatérale (1), vaisseaux angiogéniques (2).
Grossissement 40 x.

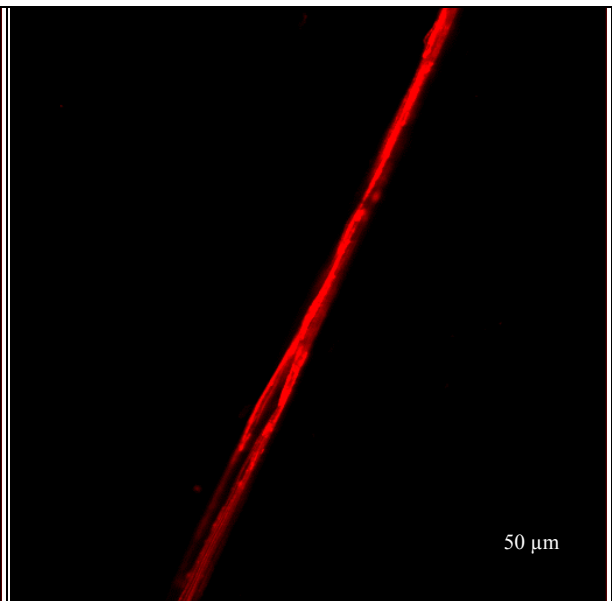


Photo 4: Jour 9. Vaisseau angiogénique dichotomisé.
Grossissement 40 x.

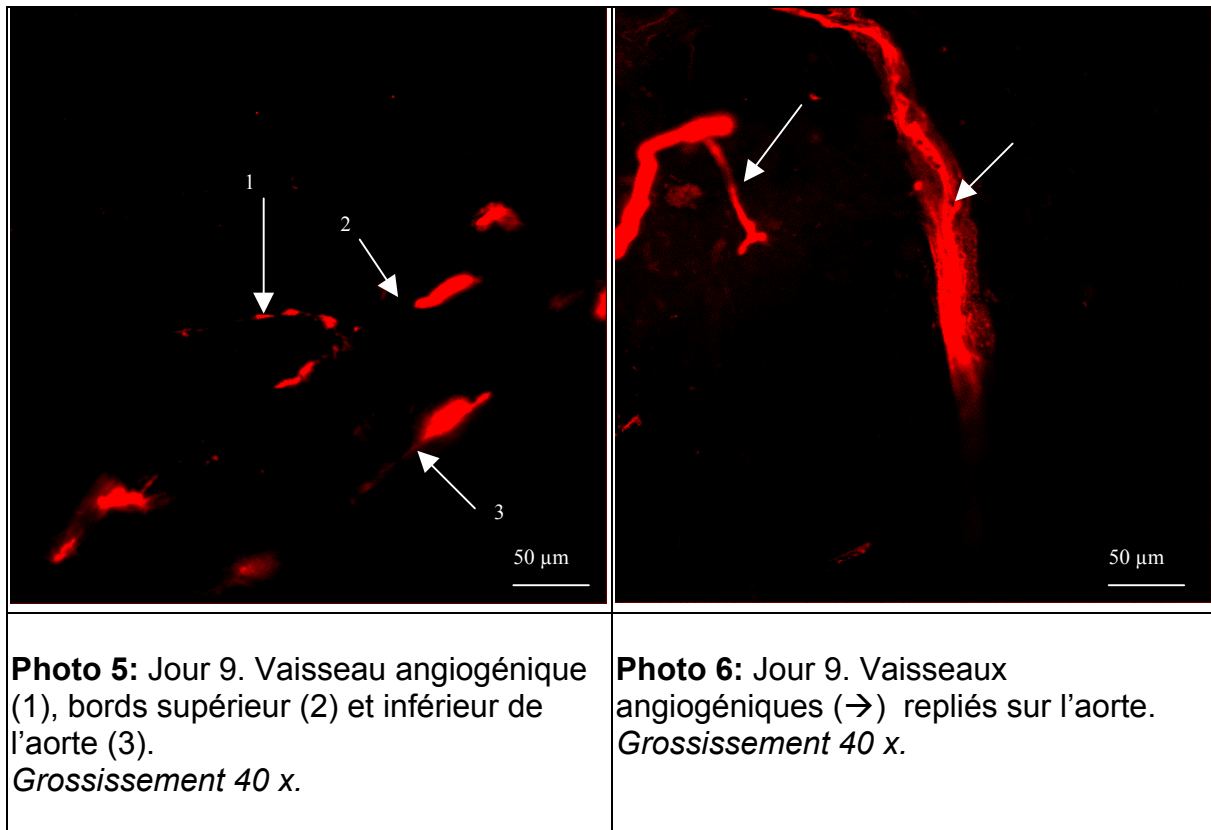


PLANCHE 5

2 PHAGE DISPLAY

Cette partie du travail consacrée à la sélection de phages possédant une grande affinité pour la phosphatidylsérine (PS) est la première étape d'un processus devant conduire à l'identification d'un peptide spécifique de la PS. Celui-ci sera ultérieurement couplé à un agent de contraste pour l'IRM. Dans cette perspective, la technique du phage display a été appliquée *in vitro* sur des liposomes exposant un mélange de phosphatidylcholine (PC) et de PS et *ex vivo* sur des foies de souris apoptotiques isolés et perfusés.

2.1 Courbe de titration

Le dosage des phages étant réalisé par la technique ELISA, l'établissement d'une courbe de calibration est indispensable à l'interprétation des mesures de DO. Cette courbe a été obtenue par mesure de la DO_{450} pour une série d'échantillons contenant un nombre

connu de phages. Les valeurs de DO_{450} en fonction du logarithme du nombre de phages ont ensuite été portées en graphique (figure 24).

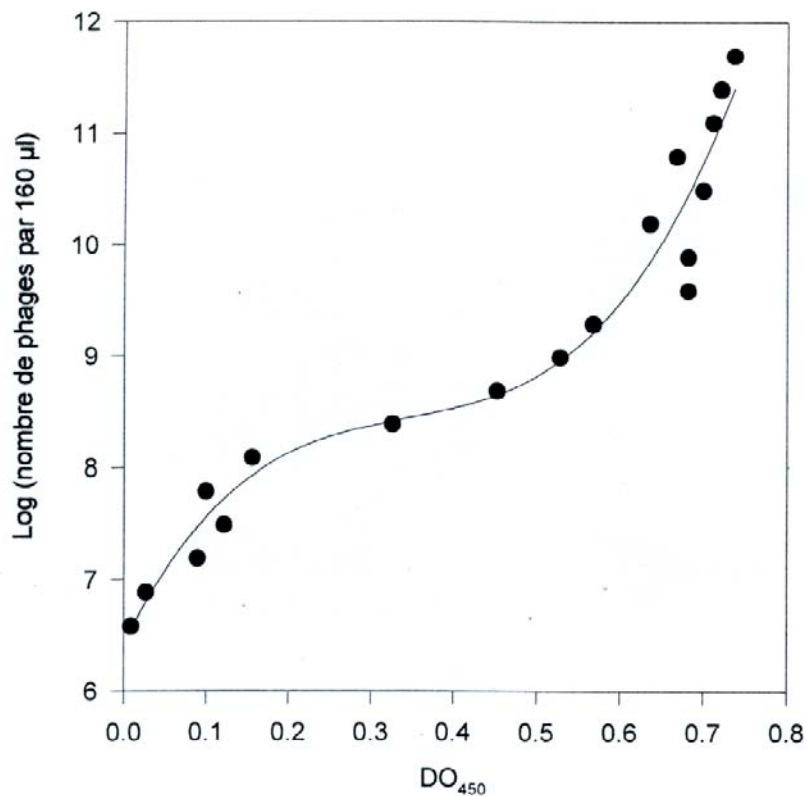


Fig.24. Evolution de la DO_{450} en fonction du nombre par puits (dans 160 μ l).

L'extrapolation de la courbe de titration permet de déterminer le nombre de phages présents dans un échantillon. Pour cela une équation d'ordre 3 (équation 2) peut être employée pour obtenir le logarithme du nombre de phages à partir de la DO_{450} .

$$y = b_0 + b_1 \cdot x + b_2 \cdot x^2 + b_3 \cdot x^3 \quad (2)$$

Où, $b_0 = 6.42$
 $b_1 = 14.86$
 $b_2 = -39.42$
 $b_3 = 38.59$
 $x = DO_{450}$
 $y = \log \text{ nombre de phages}$

2.2 Phage display *in vitro*

La phosphatidylsérine est un marqueur important de l'apoptose. Les cellules possèdent des translocases qui en temps normal confinent la PS sur la face interne de la membrane cytoplasmique. Durant le phénomène d'apoptose ces translocases sont inactivées et la PS est externalisée. Au sein d'un tissu, l'exposition de la PS permet de signaler aux macrophages la présence de cellules en apoptose.

Quatre étapes de sélection de la librairie initiale (L6) pour la PS incluse dans les liposomes ont été effectuées. L'évolution de la spécificité des phages au cours des quatre passages a été évaluée par la technique ELISA en calculant la proportion de phages interagissant avec PS, contenus dans chaque nouvelle librairie. Cette proportion (Π) est le rapport entre le nombre de phages interagissant avec PS (N) et le nombre de phages déposés dans un puits (N_i). Elle reflète l'affinité globale des différentes librairies pour PS.

$$\Pi = \frac{N}{N_i} \quad (5)$$

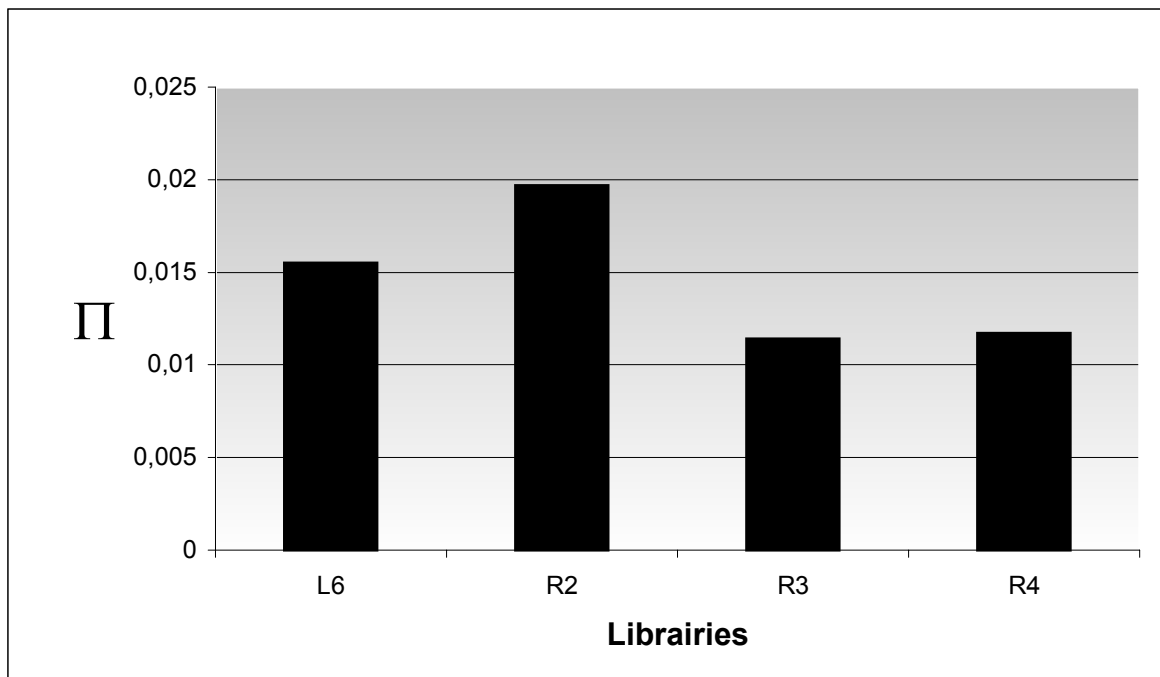


Fig.25. Evolution de l'affinité globale des librairies pour PS.

Les résultats obtenus par cette méthode sont repris dans la figure 25. On constate une légère augmentation du nombre de phages qui interagissent avec PS entre la librairie L6 et la librairie obtenue lors de la seconde étape de sélection, mais cette augmentation n'est pas significative. L'affinité globale pour PS des librairies obtenues au cours des différents passages ne varie pas de façon significative. Cependant étant donné que les phages sont directement sélectionnés contre PS, l'augmentation de Π par rapport à L6 aurait dû être beaucoup plus conséquente. L'utilisation des liposomes comme support de PS n'est donc pas optimale. Plusieurs étapes du protocole sont incriminées : dégradation des liposomes lors des rinçages et difficulté de séparation des phages liés aux liposomes et des phages libres par centrifugation.

Bien que l'augmentation de l'affinité globale des librairies pour PS n'ait pas été satisfaisante, on a tenté de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre la PS et les phages par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus n'ont pas été concluants. Nous n'avons donc pas la certitude d'avoir obtenu des phages spécifiques de PS.

2.3 Phage display ex vivo

Le modèle de foie isolé et perfusé étant bien maîtrisé au laboratoire, nous avons opté pour le foie apoptotique de souris comme support de PS. Ceci a comporté trois grandes étapes : obtention de phages interagissant peu avec le foie sain, obtention de phages interagissant avec les structures apoptotiques et enfin sélection des phages interagissant avec PS.

2.3.1 Evaluation du déclenchement de l'apoptose dans les foies de souris

L'induction de l'apoptose par l'anti-FAS a été contrôlée par des colorations histologiques classiques (photos 1 à 6 des planches 6 et 7) et par la méthode TUNEL (photos 7 à 10 de la planche 8). Les colorations classiques utilisées sont l'hématoxyline, le bleu luxol et la méthode trichrome de Masson. Les coupes étudiées par la méthode TUNEL sont contre-colorées à l'hémalum.

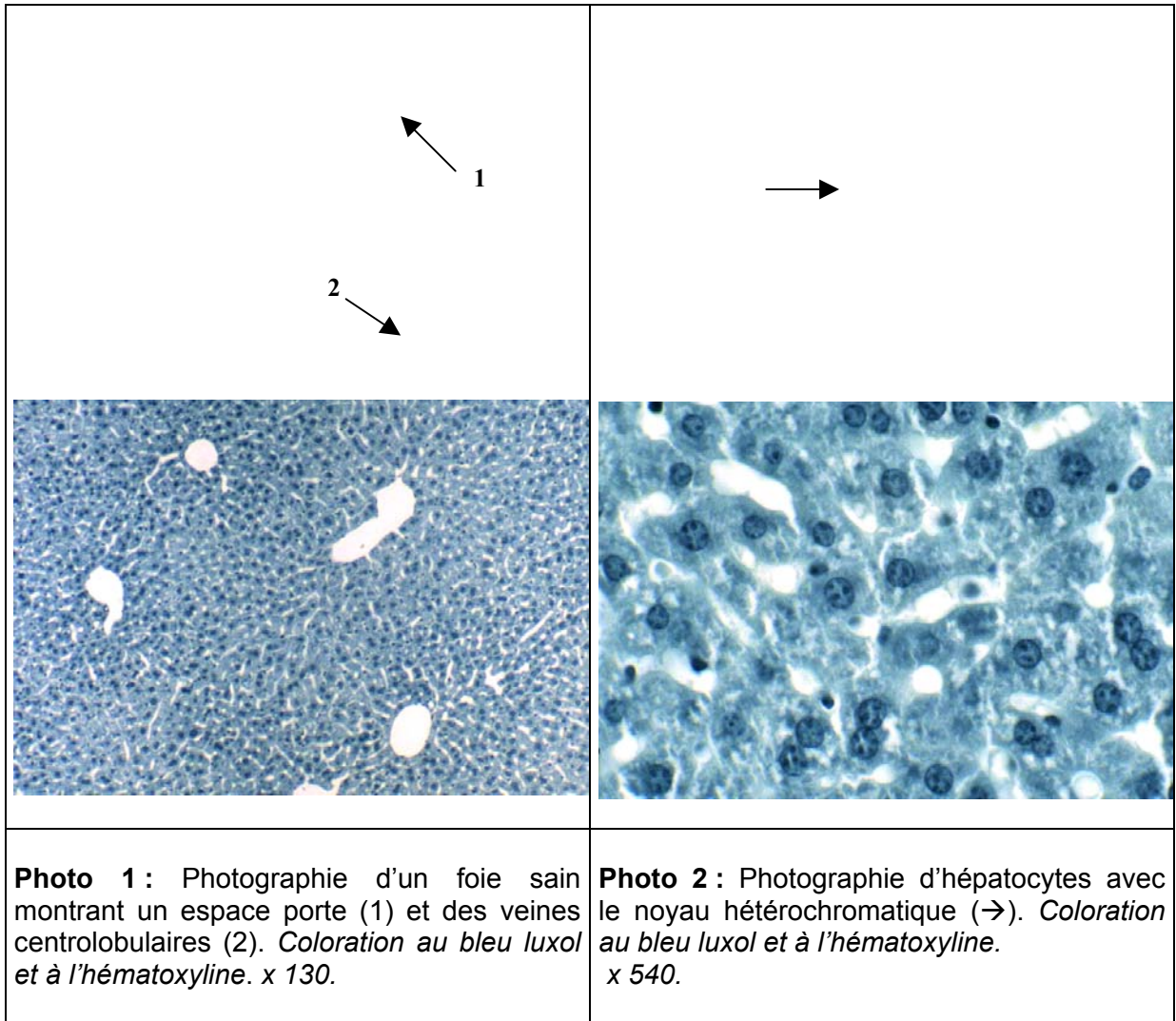
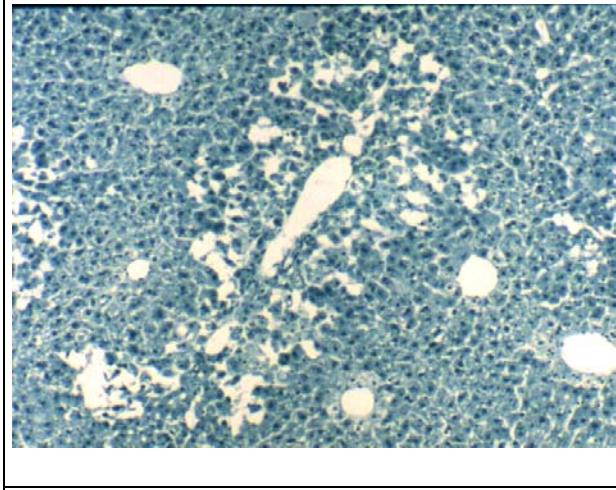
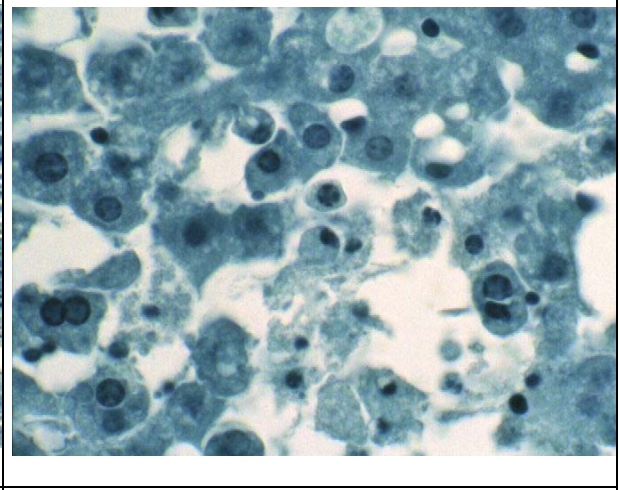


PLANCHE 6

Les photos 1 et 2 sont des coupes réalisées dans un foie sain. Il n'y a pas de cellules apoptotiques détectables. Les photos 3 à 6 correspondent à des coupes dans des foies apoptotiques (traités par anti-Fas), colorées grâce à des colorants classiques. L'apoptose est surtout induite dans les hépatocytes proches des espaces porte où le tissu est fortement désorganisé (photos 3 et 5). Les hépatocytes apoptotiques sont reconnus par des modifications de coloration du cytoplasme (photo 6) et par leur noyau morphologiquement modifié qui présente une margination de la chromatine (photo 4).

<p style="text-align: center;">→</p>	<p style="text-align: center;">1 → 2 ↙</p>
	
<p>Photo 3 : Photographie d'un foie traité par anti-Fas montrant la désorganisation tissulaire autour d'un espace porte (→). Coloration au bleu luxol et à l'hématoxyline. x 130.</p>	<p>Photo 4 : Photographie d'hépatocytes à différents stades d'apoptose : margination de la chromatine (1), noyau condensé (2). Coloration au bleu luxol et à l'hématoxyline. x 540.</p>

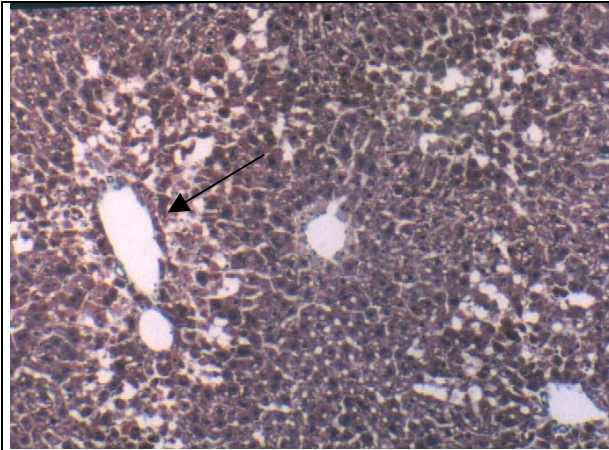


Photo 5 : Photographie d'un foie traité par anti-Fas montrant la désorganisation tissulaire autour d'un espace porte (→). Coloration au trichrome de Masson et à l'hématoxyline. x 130.

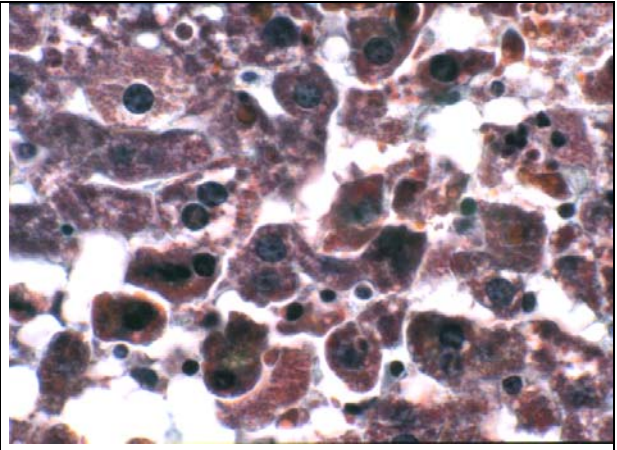
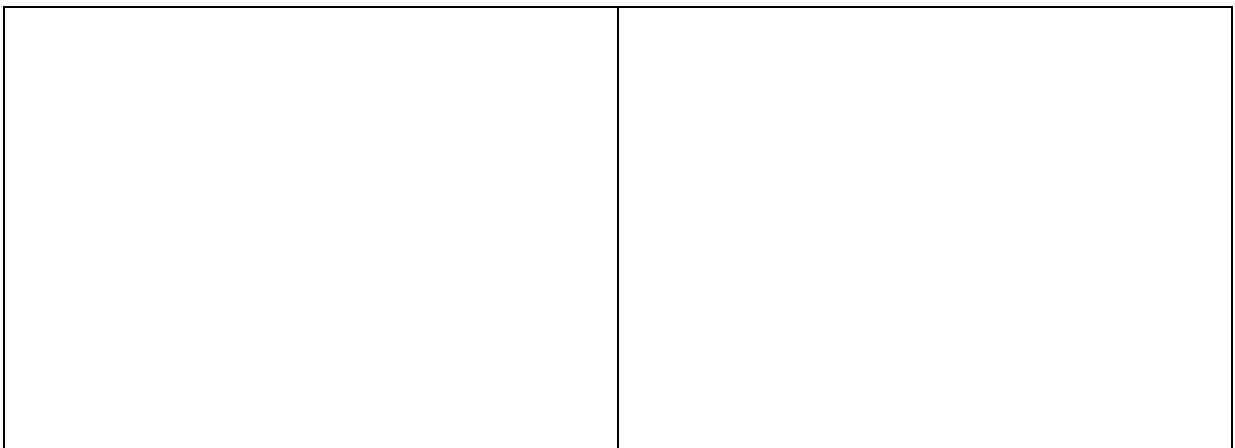


Photo 6 : Photographie d'hépatocytes à différents stades d'apoptose : noyaux condensés et coloration du cytoplasme modifiée (zones orangées). Coloration au trichrome de Masson et à l'hématoxyline. x 540.

PLANCHE 7

La méthode TUNEL, colorant les noyaux en brun du fait de la précipitation du DAB, confirme la présence d'hépatocytes apoptotiques. Les photos 8 et 9 montrent à nouveau des zones apoptotiques autour des espaces porte. C'est en fait à ce niveau que le sang pénètre dans les lobules hépatiques ; anti-Fas est donc délivré en premier lieu aux hépatocytes bordant ces espaces.



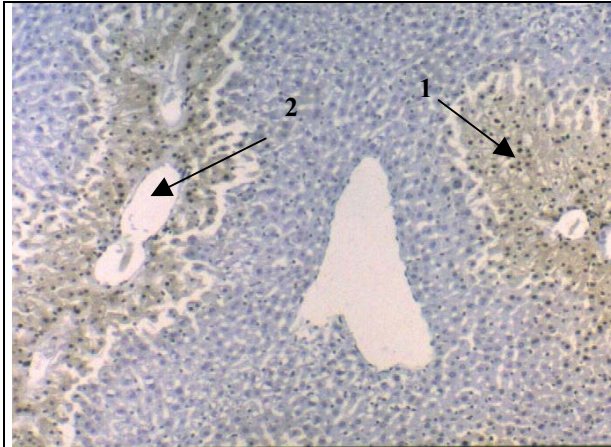


Photo 7 : Photographie d'un foie traité par anti-Fas montrant les zones apoptotiques par la méthode TUNEL. Les zones apoptotiques (1) se situent autour des espaces porte (2). Contre-coloration à l'hémalun. x 130.

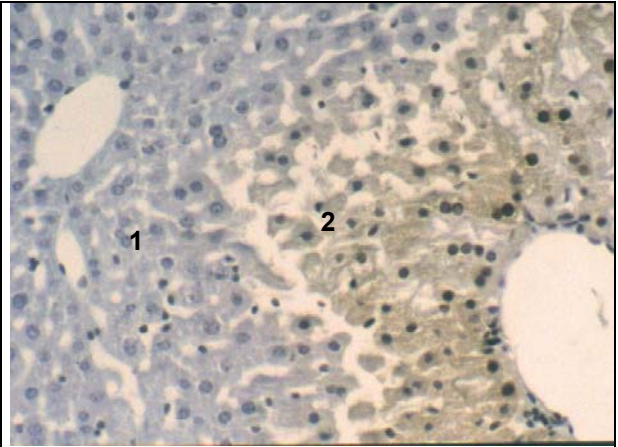


Photo 8 : Photographie montrant des hépatocytes sains (1) et apoptotiques (2), à noyau noir. Les cellules apoptotiques sont mises en évidence par la méthode TUNEL. Contre-coloration à l'hémalun. x 200.

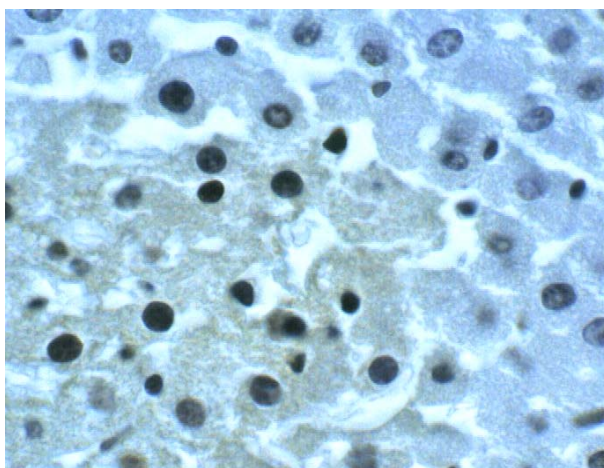


Photo 9 : Photographie illustrant des hépatocytes apoptotiques. Les cellules apoptotiques sont mises en évidence par la

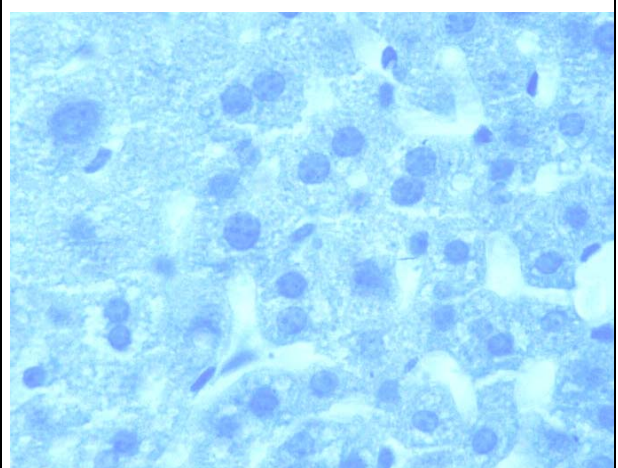


Photo 10 : Photographie illustrant des hépatocytes sains. Traitement de la coupe de foie sain par la méthode TUNEL. Les noyaux

méthode TUNEL. Les noyaux des cellules apoptotiques apparaissent noirs. Contre-coloration à l'hémalun. x 540.

des hépatocytes ne présentent pas une teinte foncée. Contre-coloration à l'hémalun. x 540.

PLANCHE 8

Les coupes histologiques ont permis de calculer l'indice apoptotique, qui est le rapport du nombre de cellules apoptotiques au nombre total de cellules. Les valeurs sont reprises dans le graphique ci-dessous (*figure 26*) et démontrent que les foies traités par anti-Fas présentent un haut degré d'apoptose. Ces foies peuvent donc être utilisés pour la sélection des phages spécifiques de structures apoptotiques.

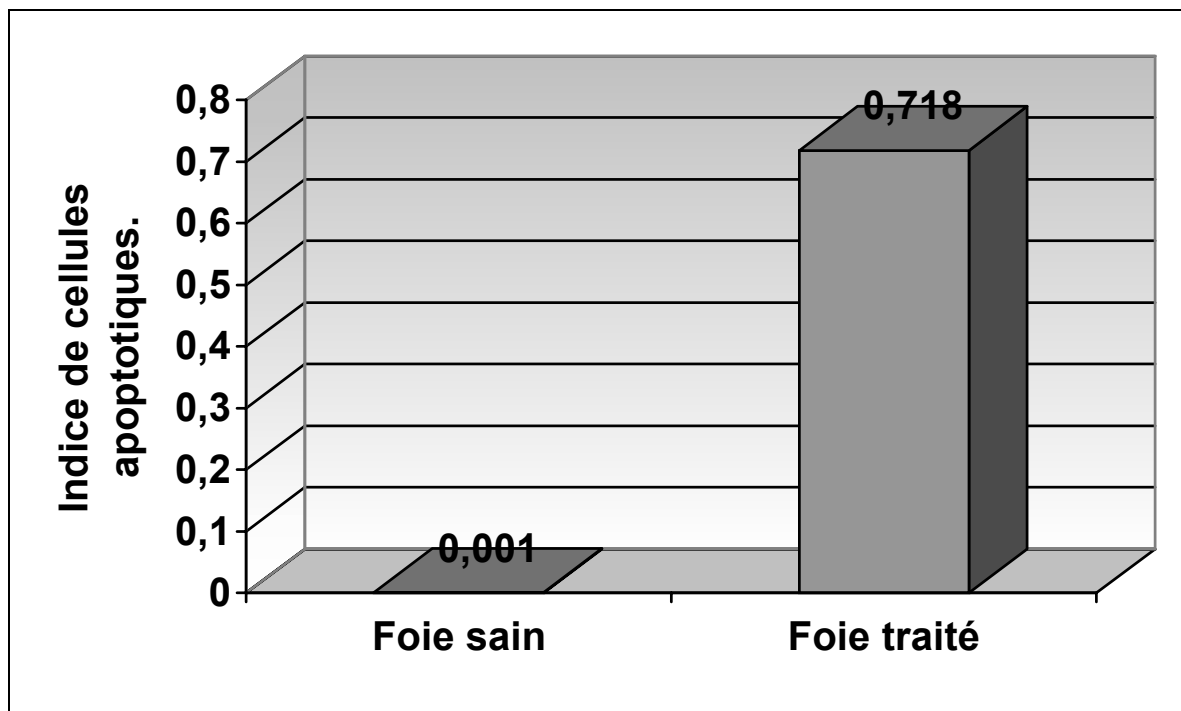


Fig.26. Indice apoptotique.

2.3.2 Dosage des phages interagissant exclusivement avec les structures apoptotiques

Au cours des passages de la librairie de phages dans les foies sains, l'affinité des phages pour le foie diminue. Ceci est reflété par l'augmentation du rapport entre le nombre de phages obtenus dans le perfusât et le nombre de phages injectés dans le circuit de perfusion. Une librairie contenant des phages peu spécifiques pour le foie a ainsi été obtenue.

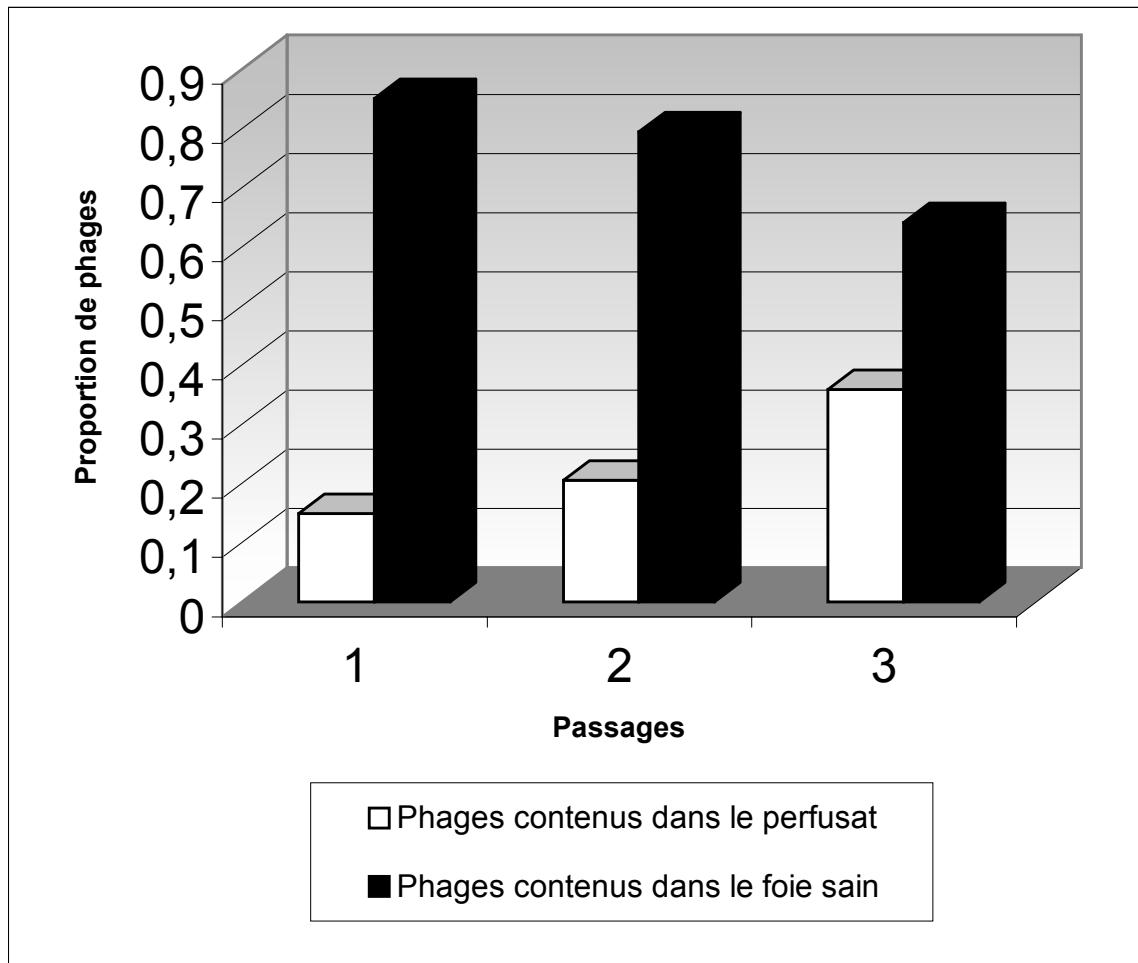


Fig.27. Evolution de la proportion de phages présents dans le perfusat et le foie sain.

Les valeurs utilisées dans ce graphique sont les moyennes de N (calculées grâce à l'équation 3). La valeur obtenue par l'équation (2) est en fait le nombre de phages présents dans un puits. Le nombre de phages présents dans le foie ou le perfusat est calculé grâce à l'équation suivante :

$$N = (Y / v) \cdot V \quad (3)$$

Où, N = nombre de phages présents dans le foie ou le perfusat

Y = nombre de phages dans un puits

v = volume prélevé pour le remplissage des puits exprimé en ml

V = volume de perfusat ou volume de l'homogénat de foie exprimé en ml

A partir de la librairie constituée de phages manifestant une faible affinité pour le foie sain, trois passages ont été effectués sur des foies apoptotiques. Ces passages ont permis d'obtenir une librairie comportant des phages spécifiques des structures apoptotiques. Ceci est démontré par le fait que ces phages, perfusés dans un foie sain, se retrouvent en grande majorité dans le perfusat. La figure 28 schématise les proportions relatives de phages dans le foie et le perfusat.

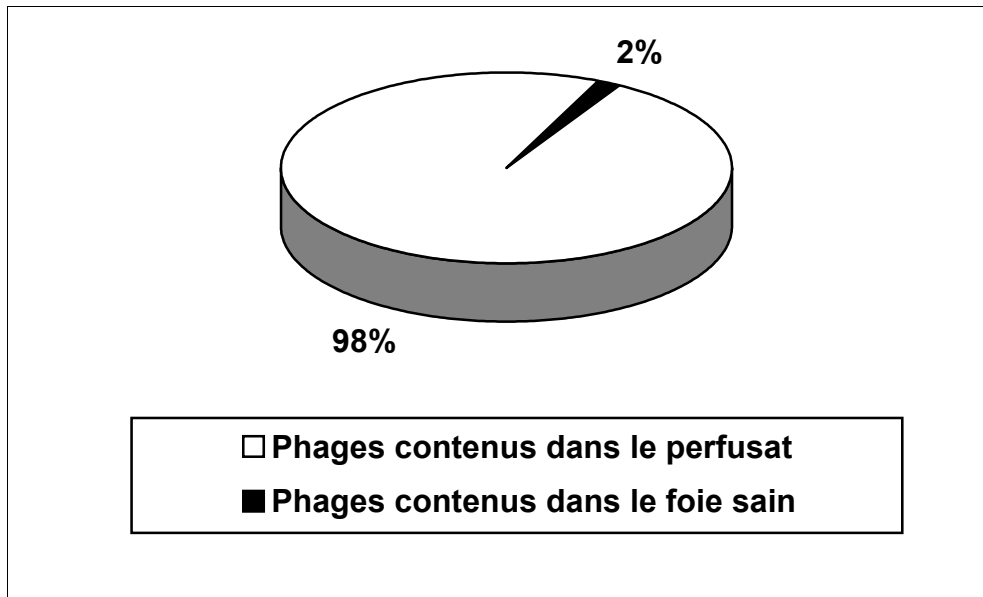


Fig.28. Proportion de phages sélectionnés pour des structures apoptotiques retrouvés dans le foie sain et le perfusat.

Ces différents résultats montrent que la librairie finale obtenue comporte des phages de faible affinité pour les structures hépatiques saines, mais qui devraient avoir une forte affinité pour les structures apoptotiques.

2.3.3 Identification des phages de plus forte affinité pour PS

Parmi les phages sélectionnés sur les foies apoptotiques, certains ont une plus forte affinité pour la PS. Afin de les identifier, les colonies d'*E. coli* infectées par des phages obtenus lors du dernier passage sur foie apoptotique ont été mises en culture dans des microplaques. Les colonies vont donc produire des phages. Au sein de chaque puits, les phages produits sont identiques, mais les phages diffèrent d'un puits à l'autre de par le peptide qu'ils expriment. L'affinité pour PS des phages issus de chaque puits est testée par ELISA. C'est ainsi que 112 types de phages ont été examinés. Les valeurs de DO des différents puits sont reprises dans le tableau 1.

Tableau 1 : Valeurs des DO mesurées pour les 112 types de phages

0.062	0.055	0.075	0.073	0.078	0.070	0.060	0.058
0.074	0.055	0.102	0.080	0.097	0.107	0.057	0.065
0.075	0.096	0.091	0.087	0.082	0.102	0.061	0.063
0.088	0.099	0.104	0.079	0.088	0.096	0.070	0.065
0.087	0.096	0.101	0.037	0.097	0.124	0.064	0.065
0.088	0.107	0.084	0.104	0.121	0.134	0.072	0.069
0.097	0.108	0.100	0.100	0.119	0.141	0.077	0.081
0.046	0.071	0.064	0.072	0.057	0.077	0.077	0.076
0.082	0.061	0.066	0.065	0.061	0.069	0.079	0.078
0.060	0.071	0.068	0.068	0.074	0.076	0.086	0.069
0.062	0.068	0.064	0.068	0.070	0.084	0.099	0.068
0.055	0.069	0.077	0.073	0.067	0.073	0.100	0.065
0.068	0.076	0.079	0.071	0.076	0.097	0.122	0.072
0.079	0.079	0.076	0.087	0.073	0.085	0.082	0.092

Blanc = DO ne se détachant pas ou très peu du bruit de fond, gris foncé = DO double du bruit de fond et gris clair = DO intermédiaire.

Les phages ayant les DO les plus élevées sont ceux qui présentent la plus forte affinité pour PS. Les 6 cases en gris foncé correspondent donc à 6 candidats pour le séquençage.

V. DISCUSSION

Au cours de la réalisation de ce mémoire, nous avons approché deux aspects distincts de la stratégie de développement d'un agent de contraste spécifique pour l'IRM. D'une part nous avons mis au point un modèle adapté à l'étude de l'angiogenèse tumorale par IRM, et d'autre part, nous avons utilisé la méthode du phage display pour obtenir un agent de contraste spécifique de l'apoptose.

1 MODELE DE L'AORTE

La disposition géométrique des différents éléments du modèle de l'aorte a été adaptée à l'IRM. En raison de leur taille micrométrique et de leur densité faible, les néovaisseaux n'ont pas pu être détectés par IRM, qui s'est avérée moins performante que des méthodes de microscopie optique. Néanmoins, l'IRM conserve l'avantage d'une méthode non invasive et non destructive. Comme l'indique la littérature, l'utilisation d'agents spécifiques des cellules endothéliales activées, par exemple en ciblant $\alpha_v \beta_3$, pourrait combler les lacunes de la technique. Ce modèle reste très pertinent pour les tests *in vitro* de l'effet de diverses molécules sur l'angiogenèse.

Contrairement à l'IRM, la microscopie confocale ne permet pas de maintenir l'intégrité de l'échantillon. Cependant, elle confirme la présence de néovaisseaux après 9 jours de mise en culture. Pour cela, l'incubation du Dil-Ac-LDL a été nécessaire et différentes stratégies d'incorporation des marqueurs ont été envisagées, certaines se réalisant avant la fixation dans le collagène, d'autres après. Avant de fixer l'aorte dans le collagène, il est possible de la perfuser ou de réaliser une incubation en laissant simplement tremper les segments d'aorte dans le milieu DMEM contenant le marqueur. Dans ces deux méthodes, les vaisseaux angiogéniques ne sont pas mis directement en contact avec le marqueur. Dans un premier temps, ce dernier entre dans les cellules endothéliales du tronçon d'aorte. Lorsque ces cellules se divisent, elles emportent une partie des marqueurs. L'avantage de la perfusion est d'augmenter la probabilité de fixation du marqueur au récepteur. En effet, la

perfusion permet d'augmenter le nombre de passages au travers du vaisseau. Après avoir fixé l'aorte dans le collagène, il est envisageable d'ajouter le marqueur au milieu de culture ou au collagène. L'avantage est de mettre en contact directement le marqueur avec les vaisseaux angiogéniques. Ce sont les seules méthodes qui permettent d'ajouter le marqueur après que les vaisseaux angiogéniques ont poussé. L'inconvénient est de ne pas pouvoir éliminer l'excès de marqueur. C'est la perfusion qui se rapproche le plus des conditions *in vivo*, mais cette opération n'est pas parfaitement stérile et demande une plus grande quantité de marqueurs. Les conditions de stérilité étant essentielles à l'obtention de résultats, c'est l'incubation dans le milieu qui a été sélectionnée dans la suite des manipulations.

Tableau 2 : Comparaison des possibilités et avantages que présentent les différentes méthodes d'incorporation du marqueur aux cellules endothéliales

	Possibilité d'ajout après apparition des néovaisseaux	Possibilité de rinçage	Respect de la stérilité
Perfusion	N	O	N
Trempage	N	O	O
Addition de collagène	O	N	O
Addition de milieu	O	N	O

La microscopie inversée, quant à elle, permet de suivre quotidiennement l'évolution du développement des vaisseaux. Parmi les trois méthodes d'imagerie utilisées et en fonction du matériel disponible, c'est la microscopie optique qui donne le meilleur résultat en ce qui concerne la visualisation des vaisseaux angiogéniques.

En ce qui concerne l'étude IRM de l'angiogenèse, d'autres modèles apparaissent beaucoup plus adaptés, par exemple celui des tumeurs sous-cutanées qui présentent une densité vasculaire plus importante. La densité des néovaisseaux, leur régression éventuelle et l'évaluation de leur perméabilité sont des paramètres tout à fait accessibles par IRM combinée à l'utilisation d'agents de contraste.

2 SELECTION DES PHAGES INTERAGISSANT AVEC LA PHOSPHATIDYLSERINE

La deuxième partie de ce travail consistait à obtenir un peptide ciblant la phosphatidylsérine dans le but de synthétiser un agent de contraste spécifique de l'apoptose. La phosphatidylsérine est présente au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique des cellules saines mais est transloquée dans le feuillet externe des cellules apoptotiques. Ce phénomène est dû à l'inhibition des translocases responsables de l'internalisation de PS et à l'activation des floppases (externalisation de PS). La phosphatidylsérine constitue donc un bon marqueur de l'apoptose.

Le ciblage de la phosphatidylsérine a été réalisé par deux variantes du phage display ; le phage display *in vitro* et *ex vivo*. C'est la première fois que le phage display est utilisé pour la mise au point d'un agent de contraste. Chacune de ces deux méthodes présente un certain nombre d'avantages mais aussi d'inconvénients.

Contrairement au phage display *ex vivo*, le phage display *in vitro* permet la sélection des phages sur base de leur interaction directe avec la molécule cible. De ce fait, les phages obtenus ont une très forte affinité pour leur cible, mais cela n'exclut pas que ces mêmes phages gardent une affinité non négligeable pour d'autres molécules. Un avantage appréciable du phage display *in vitro* est de permettre l'utilisation de volumes réduits et de concentrations phagiques élevées, ce qui facilite les différentes manipulations, principalement les dosages. Le phage display *in vitro* nécessite l'immobilisation de la cible sur un système qui permet de séparer les phages interagissant des phages non spécifiques. Par exemple, en ce qui concerne le ciblage de protéines, celles-ci sont liées de façon covalente à des billes superparamagnétiques, les phages interagissant avec les protéines sont alors facilement isolés du reste de la solution par séparation magnétique. Dans notre cas, le moyen utilisé a été l'incorporation de phosphatidylsérine dans des membranes liposomales. L'inconvénient majeur de ce support est la difficulté de séparation par centrifugation. Aussi pour limiter les interactions peu spécifiques, du détergent (Tween 20)

est utilisé au cours de multiples rinçages mais ce détergent déstabilise fortement les liposomes. Les expériences n'ont pas permis d'augmenter l'affinité des bibliothèques pour la phosphatidylsérine. On tentera l'incorporation de PS à la membrane de magnétoliposomes dont la récupération pouvant être effectuée comme décrit ci dessus [38].

Le phage display a également été effectué sur foie perfusé. A la différence du phage display *in vitro*, cette technique ne sélectionne pas directement les phages interagissant avec la PS, mais ceux ayant de l'affinité pour un ensemble de structures apoptotiques. Parmi les phages sélectionnés, certains interagissent avec PS. Contrairement au phage display *in vitro*, cette variante du phage display permet une élimination plus importante des phages qui possèdent une affinité pour d'autres structures que celles apoptotiques. Cependant l'un des problèmes de cette méthode qualifiée de phage display *ex vivo* est de manipuler de grands volumes. Ceci pose des problèmes lors du dosage des phages et de leur récupération.

Six candidats au séquençage ont été sélectionnés. Leur séquence peptidique permettra de construire la molécule qui, après couplage à une entité magnétiquement active, servira d'agent de contraste pour l'IRM. Cependant, pour influencer le signal RMN, l'agent de contraste doit être injecté à une concentration de l'ordre de la millimole par litre. Obtenir par synthèse chimique une telle quantité de peptide pourrait s'avérer onéreux, ce qui rendrait cet agent difficilement réalisable de par son coût. Par contre l'utilisation de ces peptides pour la synthèse d'agents de contraste destinés à l'imagerie nucléaire est clairement envisageable, car les concentrations utilisées dans cette technique sont de l'ordre de la nanomole par litre.

VI.CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le modèle de l'angiogenèse de l'aorte a été adapté pour son suivi par IRM. Les tests effectués montrent que son utilisation pour le suivi de l'angiogenèse est à ce stade peu prometteuse. En effet, la complexité de mise en œuvre du modèle, la difficulté d'incorporer les agents de contraste ainsi que la densité vasculaire relativement faible ne le rendent pas très efficace. Les modèles présentant une densité vasculaire élevée semblent plus adéquats, par exemple le modèle des tumeurs sous-cutanées. De plus, ce genre de modèle permet de travailler dans des conditions se rapprochant davantage de la réalité physiologique.

Pour la première fois la méthode du phage display a été employée en vue de l'élaboration d'un agent de contraste. Potentiellement, la technique peut être utilisée pour cibler une multitude de structures. Son association à une technique d'imagerie en étend donc les capacités. Dans notre cas, le phage display a été associé à l'IRM, mais d'autres techniques d'imagerie sollicitant l'utilisation d'une sonde, par exemple la médecine nucléaire, peuvent a priori en bénéficier.

Ce travail a permis de mettre en œuvre la technique du phage display et de la mener jusqu'à l'étape du séquençage. A cet égard, notre travail a contribué à l'implémentation, tant expérimentale que matérielle, de cette méthode tant au laboratoire qu'à l'université. Il constitue donc une étude pilote pour de nombreux travaux à venir.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. L. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, Le cancer, dans : Biologie moléculaire de la cellule, Chap. 26, 3^{ème} Edition, Edition en français par C. François, DeBoeck Université, pp. 1247-1294.
- [2] Site internet : www.bacless.fr/cours/fondamentale.
- [3] L. C. Junqueiro, J. Carneiro, R. O. Kelley, The circulatory system, dans : Basic histology, D. A. Barnes, A. M Suver, J Roche, Eds, 9^{ème} Edition, Appleton & Lange, Stanford, Connecticut, pp. 201-217.
- [4] J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy et G. Williams , Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis, *J. Exp. Med.*, **133** (2), 275-88, 1971.
- [5] P. Carmeliet , Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nature*, **3**, 389-395, 2000.
- [6] P. Carmeliet et D. Collen , Role of vascular endothelial growth factor et vascular endothelial growth factor receptors in vascular development, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 133-158, 1999.
- [7] D. O. Bates, D. Lodwick et B. Williams , Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability , *Microcirculation*, **6**, 83-96, 1999.
- [8] D. Weinstat-Saslow et P.S. Steeg , Angiogenesis and colonisation in the tumor metastatic process: basic and applied advances, *FASEB J.*, **8**, 401-406, 1994.
- [9] R. F. Nicosia et S. Villaschi , Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall, *Int. rev. cyto.*, **185**, 1-31, 1999.
- [10] P. Carmeliet et R. K.Jain , Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*, **407**, 249-257, 2000.
- [11] L. Liaw et H. C. Crawford , Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**, 805-812, 1999.
- [12] N. Ferrara , Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis, *Kidney Int.*, **56**, 794-814, 1999.
- [13] G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand et J. Holash Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature*, **407**, 242-248, 2000.

- [14] A. E. Koch, M. M. Halloran, C. J. Haskell, M. R. Shah et P. J. Polverini, Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1, *Nature*, **376**, 517-519, 1995.
- [15] F. J. Giordano, Angiogenesis : Mécanismes, modulation, and targeted imaging, *J. Nuclear Cardiology*, **6** (6), 664-671, 1999.
- [16] J. F. Kerr, A. H. Wyllie et A. R. Currie, Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue, *Br. J. Cancer*, **26** (4), 239-257, 1972.
- [17] P. Meier, A. Finch et G. Evan, Apoptosis in development, *Nature*, **407**, 796-801, 2000.
- [18] M. Parmentier, Cours de complément de biologie moléculaire, 2^{ème} licence biologie, UMH.
- [19] J. Yuan et B. Yankner, Apoptosis in the nervous system, *Nature*, **407**, 802-809, 2000.
- [20] M. O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, **407**, 770-776, 2000.
- [21] J-E. Ricci, Les mécanismes moléculaires de l'apoptose, Site internet : www.123bio.net/revues/jericci/iapoptose.html.
- [22] E. Ségal-Bendirdjian, Mort cellulaire: Signalisation et exécution de l'apoptose, *Hématologie*, **5** (5), 376-387, 1999.
- [23] F. Rieux-Laucat, Signalisation de l'apoptose par Fas, *Hématologie*, **6** (2), 136-142, 2000.
- [24] T. Rich, R. L. Allen et A. H. Wyllie, Defying death after DNA damage, *Nature*, **407**, 777-783, 2000.
- [25] U. Thatte et S. Dahanukar, Apoptosis : Clinical relevance and pharmacological manipulation, *Drugs*, **54** (4), 511-532, 1997.
- [26] G. P. Smith et V. Petrenko, Phage display, *Chem. Rev.*, **97**, 391-410, 1997.
- [27] J. K. Scott et G. P. Smith, Searching for peptide ligands with an epitope library, *Science*, **249**, 386-390, 1990.
- [28] G. Karp, Biologie cellulaire et moléculaire, concepts et expériences, Edition en français par J. Bouharmon et J-C. Wissocg, DeBoeck Université, 1993.
- [29] S. Cabilly, The basic structure of filamentous phage and its use in the display of combinatorial peptide libraries, *Methods in molecular biology*, **87**, Combinatorial peptide library protocols, 129-136.
- [30] S. Cabilly, Construction and use of a 20-mer phage display epitope library, *Methods in molecular biology*, **87**, Combinatorial peptide library protocols, 137-154.
- [31] E. Koivunen, W. Arap, D. Rajotte, J. Lahdenranta et R. Pasqualini, Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries, *J. Nucl. Med.*, **40** (5), 883-888, 1999.

- [32] R. A. Jones, J. Kvaerness, P. A. Rinck, T. E. Southon, P. D. Francisco, R. N. Muller, S. B. Petersen, *Magnetic resonance in medicine*, 3^{ème} edition, P. A. Rinck, Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993.
- [33] R. Brasch, C. Pham, D. Shames, T. Roberts, K. Vandijke, N. Vanbruggen, J. Mann, S. Ostrowitzki et O. Melnyk, Assessing tumor angiogenesis using macromolecular MR imaging contrast media, *JMRI*, **7** (1), 68-74, 1997.
- [34] D. A. Sipkins, D. A. Cheresh, M. R. Kazemi, L. M. Nevin, M. D. Bednarski et KC Li, Detection of tumor angiogenesis in vivo by $\alpha_v\beta_3$ -targeted magnetic resonance imaging, *Nat. Med.*, **4** (5), 623-626, 1998.
- [35] S. A. Anderson, R. K. Rader, W. F. Westlin, C. Null, D. Jackson, G. M. Lanza, S. A. Wickline, et J. J. Kotyk, Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with $\alpha_v\beta_3$ -targeted nanoparticles, *Magn. Reson. Med.*, **44**, 433-439, 2000.
- [36] A. Viaene, *Manual on phage display technology*, KULAK, 1998.
- [37] D. Nonclercq, J. Zanen, G. Toubeau, G. Laurent et J-A. Heuson-Stiennon, Apoptosis and cell proliferation in the seminal vesicles and coagulating glands of male Syrian hamsters exposed to diethylstilboestrol (DES), *Reprod. Fertil. Dev.*, **11**, 111-122, 1999.
- [38] M. De Cuyper, M. Joniau, Magnetoliposomes: Formation and structural characterizations, *Eur. Biophys. J.*, **15**, 311-319, 1988.

Table des abréviations

A	Adénine	IL	Interleukine
ADN	Acide désoxyribonucléique	IRM	Imagerie de résonance magnétique
ADNss	ADN simple brin	KDR	Récepteur à domaine tyrosine kinase
Ang	Angiopoïétine	K-H	Krebs Henseleit
ARN	Acide ribonucléique	LDL	Lipoprotéine de faible densité
AIF	Facteur inducteur d'apoptose	MSME	Multi-slice multi-echo
bFGF	Facteur de croissance fibroblastique basique	NA	Nombre d'acquisition
C	Cytosine	NO	Monoxyde d'azote
cAMP	Adénosine-3'-5'monophosphate cyclique	OPD	Dihydrochlorate de o-phénylènediamine
CARD	Caspase recrutement domaine	PA	Activateur du plasminogène
DAB	Diaminobenzidine	PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
dATP	Désoxyadénoside triphosphate	PC	Phosphatidylcholine
DD	Death domain	PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
DED	Death effector domain	PDGFR	Récepteur du PDGF
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	PF	Facteur plaquettaire
DO	Densité optique	PS	Phosphatidylsérine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
DPPS	Dipalmitoylphosphatidylsérine	SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
dUTP	Désoxyuridine triphosphate	T	Thymine
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	TA	Temps d'accumulation
FasL	Fas ligand	Tc	Tétracycline
FID	Free induction decay	TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
Flt	Tyrosine kinase like	TGF-β	Facteur de croissance transformant
FOV	Field of view	TNF-α	Facteur nécrosant tumoral
FT	Transformée de Fourier	TNF-R	Récepteur de TNF
G	Guanine	TE	Temps d'écho
GAG	Glycosaminoglycan	TR	Temps de répétition
HIF	Facteur inductible par hypoxie	VCAM	Molécule d'adhésion de cellules vasculaire
HRP	Horseradish peroxydase	VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire		
IFN	Interféron		
IGF	Facteur de croissance proche de l'insuline		

