



Vasculature targeting for the treatment of cancer and inflammatory diseases : looking for ligands of E selection and endoglin

Aline Savarin

► To cite this version:

Aline Savarin. Vasculature targeting for the treatment of cancer and inflammatory diseases : looking for ligands of E selection and endoglin. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2005. English. NNT : 2005INAP0018 . pastel-00005017

HAL Id: pastel-00005017

<https://pastel.hal.science/pastel-00005017>

Submitted on 15 Apr 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Ecole doctorale ABIES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Présentée et soutenue publiquement par

Aline SAVARIN

Ingénieur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Le 14 juin 2005

Titre :

**Ciblage de l'endothélium tumoral et inflammatoire :
Recherche de ligands de la sélectine E et de l'endogline**

CONFIDENTIEL

Directeur de thèse

Dr. Daniel Scherman

JURY

M. Daniel Baty, rapporteur

M^{me} Virginie Escriou, examinateur

M. Olivier Feron, rapporteur

M^{me} Anne-Marie Fischer, examinateur

M. Claude Gaillardin, examinateur

M. Daniel Scherman, examinateur

Remerciements

Je remercie Daniel Scherman, le directeur de l'Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique pour m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein de son laboratoire de recherche. Mes remerciements s'adressent également à Virginie Escriou qui a encadré mon travail de thèse, pour ses conseils et son soutien. Je remercie Guy Chabot pour sa relecture critique.

Je tiens à remercier M. Daniel Baty, M. Oliver Feron et Mme Anne-Marie Fischer qui ont accepté de d'examiner mon travail, ainsi que M. Claude Gaillardin qui a aussi été le tuteur de ma thèse auprès de l'INA P-G.

Je remercie également très chaleureusement Mme Françoise Launay pour sa disponibilité et pour son implication dans la formation et l'insertion professionnelle des doctorants, ainsi que M. Eric Birlouez pour ses interventions constructives dans le cadre de l'école doctorale.

La première partie de ma thèse dépendait d'un gros travail de chimie pour la conception et la synthèse des différents mimes, c'est pourquoi je tiens à remercier les chimistes et tout particulièrement Christian Girard. Je remercie Pascal Bigey pour la découverte d'une BM pas comme les autres, Céline Largeau pour son aide en biologie cellulaire et sur les banques de phages et enfin Johanne Seguin pour la réalisation de la validation *in vivo* du modèle tumoral. Je remercie du fond du cœur Manon Cahart qui a réalisé un excellent travail, dans la bonne humeur, sur les clonages et les banques de phages pendant ses deux stages de BTS. Je remercie Stéphane Bonetto pour ses conseils sur la technologie des phages fd-tet.

De tout mon cœur, je remercie Cynthia Marie-Claire pour ses conseils et son soutien, Cindie Courtin, ma coéquipière des galères autoclave, Armand Blommaert et ses blagues incontournables, et bien sûr Carole Bloquel pour notre soutien mutuel au cours de ces 3 années de thèse, nos p'tits bars, nos rares footings and the cafetière ! Je remercie également les nouvelles arrivantes du bureau, Magali, Corinne et Gaëlle qui m'ont soutenue pendant la fin de ma thèse (merci les gants de boxe pour tenir les délais et les blagues belges). Je remercie toute la joyeuse équipe des chimistes, et notamment Michel Bessodes qui a essayé de m'initier à la synthèse peptidique. Tous mes remerciements enfin et surtout à Magdalena Ibanez-Ruiz pour son aide précieuse en biologie moléculaire et sa profonde amitié.

Je remercie nos anciennes collègues Fanny, Emma, Julie, Farida, et Brunilde pour leur amitié. Je tiens également à remercier Dominique, Segar, Evelyne, Kris, Dina, Lisa et Marie pour leur gentillesse et bonne humeur.

Je remercie enfin tous mes amis et ma famille pour m'avoir supportée ;-), encouragée et avoir cru en moi ! J'oubliais, un grand merci à M. Patrick Autrand qui m'a permis de finir ma thèse sur deux pieds !

Sommaires

Sommaire

<i>Liste des figures</i>	3
<i>Liste des tableaux</i>	5
<i>Liste des abréviations et symboles</i>	6
<i>Abréviations des acides aminés</i>	7
1. Introduction	9
1.1. Le cancer : épidémiologie, diagnostics et thérapies	11
1.2. Stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques et anti-vasculaires	19
1.3. Présentation des deux cibles d'intérêt : la sélectine E et l'endogline	25
1.4. Technologie de sélection avec des banques de peptides sur phages	33
1.5. Stratégies mises en œuvre dans notre étude	39
2. Matériel et Méthodes	41
2.1. Techniques de biologie moléculaire	43
2.2. Techniques de biologie cellulaire et de biochimie	46
2.3. Techniques de sélection avec des banques de peptides sur phages	53
2.4. Techniques de physico-chimie	59
3. Résultats	61
3.1. Ciblage de la sélectine E	63
3.1.1. Recherche de mimes du SLeX	63
3.1.2. Recherche de ligands peptidiques de l'endothélium activé	74
3.2. Ciblage de l'endogline	85
3.2.1. Stratégie adoptée	85
3.2.2. Clonage de l'endogline humaine	86
3.2.3. Recherche de ligands peptidiques de l'endogline	96
3.2.4. Conclusion	107
4. Discussion	109
4.1. Ciblage de l'endothélium activé des zones tumorales et inflammatoires : la sélectine E	111
4.2. Ciblage de l'endothélium angiogénique tumoral : l'endogline.....	114
4.3. Conclusion et perspectives	116
<i>Bibliographie</i>	123
<i>Publications</i>	131
1. Sialyl Lewis X Analogs Based on a Quinic Acid Scaffold as the Fucose Mimic	133
2. Coupling of importin beta binding peptide on plasmid DNA : transfection efficiency is increased by modification of lipoplex's physico-chemical properties.....	139
<i>Résumé</i>	151

Liste des figures

Figure 1 : Principales causes de décès en France en 2000.	11
Figure 2 : Incidence et mortalité des principaux cancers en 2000 en France.....	11
Figure 3 : Le cancer dans le monde : incidence, mortalité et prévalence.....	12
Figure 4 : Taux de survie dans les 5 ans, entre 1995 et 2000, sur la population américaine en fonction du type de cancer.	13
Figure 5 : Répartition des essais cliniques de phase I-II en oncologie par classe de traitement (sauf radiothérapie).	16
Figure 6 : Structure de la sélectine E.	25
Figure 7 : Rôle de la sélectine dans le mécanisme de « rolling » des leucocytes.	26
Figure 8 : Structure de l'endogline humaine.....	28
Figure 9 : Principe de la sélection avec une banque de peptides sur phages.....	33
Figure 10 : Représentation des protéines du manteau du phage M13.....	34
Figure 11 : Inhibition du développement de métastases par le ciblage de la Sélectine E surexprimée au niveau de l'endothélium activé des zones tumorales.	39
Figure 12 : Utilisations thérapeutiques possibles de ligands ciblant l'endothélium tumoral.	40
Figure 13 : Caractérisation des lipoplexes en fonction du rapport de charge lipide cationique / ADN.	51
Figure 14 : Formule du lipide cationique RPR 209120.	51
Figure 15 : Mise en évidence de la présence de SleX à la surface des cellules HL-60 par cytométrie en flux.	64
Figure 16 : Description du test d'adhésion permettant de mesurer l'affinité des mimes de SleX pour la SE.	64
Figure 17 : Influence de la concentration en sélectine E recombinante humaine et du nombre de cellules HL-60 introduites par puits sur le signal obtenu dans le test d'adhésion.....	65
Figure 18 : Effet de la présence d'un anticorps anti-SE (a), anti-SleX (b) ou d'un anticorps non spécifique anti-IgG humain (c) sur l'adhésion des cellules HL-60 à la SE recombinante humaine.	66
Figure 19 : Effet de la présence d'EDTA et de deux sucres, le saccharose et le galactose, sur la fixation des cellules HL-60 à la SE recombinante humaine.	66
Figure 20 : Analogue du SleX (ASleX) (a) et inhibition de la liaison des HL-60 par le ASleX en test d'adhésion sur la SE recombinante humaine (b)	67
Figure 21 : Expression de la sélectine E à la surface des HUVECs activées par l'interleukine-1-β.....	68
Figure 22 : Influence de l'ensemencement des HUVECs et du nombre de cellules HL-60 introduites par puits sur le signal obtenu dans le test d'adhésion.	68
Figure 23 : Groupements du SleX impliqués dans la liaison à la sélectine E.	69
Figure 24 : Mimes de Wong.	70
Figure 25 : Mimes dérivés du fucose (DE-1 et DE-2) et du mannose (AM-3 et AM-4).....	72
Figure 26 : Mimes dérivés de l'acide quinique.	73
Figure 27 : Peptide linéaire ou contraint en position N-ter de la protéine pIII du manteau du phage... ..	74
Figure 28 : Principe de la séparation des phages liés aux cellules des phages non liés par centrifugation à travers une phase organique de dibutylphthalate : cyclohexane 9 : 1 (V : V).	75
Figure 29 : Test Brasil avec le phage-SNLRTHP sur les HUVECs activées ou non.	78
Figure 30 : ELISA sur les HUVECs non activées (NA), activées (A) et sur cellules B16 et 3T3.	79
Figure 31 : Test ELISA sur sélectine E recombinante.	80
Figure 32 : Anticorps monoclonal 7A9 dirigé contre la sélectine E	81
Figure 33 : Alignement des peptides sélectionnés sur la séquence de PSGL-1 impliquée dans la liaison aux sélectines.....	81

Figure 34 : Alignement de cinq peptides sélectionnés sur les HUVECs activées avec le peptide CLVSVLDLEPLDAAWLC.	82
Figure 36 : Alignement avec la séquence de l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1 R6.5.	83
Figure 37 : Représentation des différents fragments obtenus par PCR et localisation des amorces utilisées pour le clonage du gène codant l'endogline humaine.	86
Figure 38 : Principe du « TA Cloning », Invitrogen.	87
Figure 39 : Reconstitution du gène de l'endogline par ligature du plasmide pCR2.1-A linéarisé avec XhoI avec l'insert C obtenu par digestion du plasmide pCR2.1-C avec cette même enzyme.	88
Figure 40 : Carte du plasmide pVAXII.	88
Figure 41 : Expression de l'endogline humaine à la surface des cellules 3T3 après transfection transitoire.	89
Figure 42 : Carte du plasmides pC1.	90
Figure 43 : Enrichissement de la population de cellules exprimant l'endogline après électroporation et sélection avec l'antibiotique.	90
Figure 44 : Expression de l'endogline à la surface de la population de cellules B16-EGh.	91
Figure 45 : Détection de la présence d'ARNm de l'endogline humaine dans les cellules 3T3-EGh (a) et B16-EGh (b).	91
Figure 46 : Vérification de la taille de l'endogline par Westernblot.	92
Figure 47 : Localisation des amorces 8 et 9 sur le gène de l'endogline de souris.	93
Figure 48 : RT-PCR avec les amorces de l'endogline de souris sur l'ARNm extrait de cellules 3T3 et B16.	94
Figure 49 : Expression de l'endogline humaine à la surface d'un clone 3T3.	95
Figure 50 : Carte du plasmide pC1-EGh-EGFP.	96
Figure 51 : Les différentes étapes de la sélection différentielle réalisée avec la banque de peptides linéaires de sept acides aminés sur phages, NEB, sur les cellules B16-EGh versus les cellules B16 sauvages.	97
Figure 52 : Evolution du rapport phages liés / phages total au cours de la sélection sur les cellules B16-EGh versus les cellules B16.	98
Figure 53 : Evolution de la population de phages au cours de la	99
Figure 54 : Evolution du rapport phages liés / phages total au cours de la sélection sur la protéine EGhr.	101
Figure 55 : Evolution de la population de phages au cours de la sélection a).	102
Figure 56 : Evolution de la population de phages au cours de la sélection b).	102
Figure 57 : Modèle d'interaction de l'endogline avec les membres de la famille du TGF- β [58].	104
Figure 58 : Alignement sur la séquence du TGF β I.	104
Figure 59 : Alignement sur la séquence du récepteur II au TGF β	105
Figure 60 : Structure 3D de la partie extracellulaire du récepteur au TGF β	106
Figure 61 : Test Elisa des phages peptides-sur l'endogline recombinante.	107
Figure 62 : Différences entre le test d'adhésion décrit par SA. DeFrees (utilisé dans notre étude) et le test décrit par G. Weitz-Schmidt utilisé par C-H Wong.	112

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des médicaments utilisés en chimiothérapie.	14
Tableau 2 : Différentes pathologies associées à une mauvaise régulation de l'angiogénèse.....	19
Tableau 3 : Facteurs impliqués dans le processus d'angiogénèse.....	20
Tableau 4 : Exemples de peptides ciblant décrits dans la littérature	24
Tableau 5 : Composition des tampons utilisés pour l'extraction manuelle d'ADN.	45
Tableau 6 : Lignées cellulaires utilisées.....	46
Tableau 7 : Les différents anticorps utilisés.	47
Tableau 8 : Inhibition à 50 mM et IC50 obtenue avec les mimes dérivés de l'acide quinique contre les cellules HL-60.	73
Tableau 9 : Plan de la.....	75
Tableau 10 : a) Evolution du rapport phages liés / phages total au cours de la sélection b) Séquence peptidique des 20 clones séquencés à partir des phages sélectionnés au 3ème passage.	76
Tableau 11 : a) Plan de sélection sur les HUVECs activées par l'interleukine 1- β contre les HUVECS non activées avec un passage sur la sélectine E intercalé au 3ème b) Séquence peptidique des 20 clones issus du 4ème passage.	77
Tableau 12 : Amorces utilisées pour le clonage de l'endogline humaine.	86
Tableau 13 : Peptides obtenus au cours de la sélection sur l'endogline humaine.	98
Tableau 14 : Plan de la sélection sur la protéine recombinante humaine	100
Tableau 15 : Séquence des peptides sélectionnés sur la protéine EGhr..	101
Tableau 16 : Motifs particuliers redondants au sein des peptides sélectionnés sur l'endogline humaine.....	103
Tableau 17 : Evaluation de la diversité des banques commerciales NEB.....	118

Liste des abréviations et symboles

Ac	anticorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ASleX	analogue du SleX (3'-N-acétylneuraminyl-3-fucosyl-lactose)
BCA	acide bicinchoninique
Bet	bromure d'éthidium
BRASIL	Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands
BSA	albumine de sérum bovin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CMC	concentration micellaire critique
CMV	cytomégalovirus
CPS	coups par seconde
Da	Dalton
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
DH5 α	<i>E. Coli</i> de génotype <i>supE44ΔlacU169(Φ80lacZΔM15)</i> <i>hsdR17recA1endA1gyrA96thi-1relA1</i>
dNTP	désoxynucléotides
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DOPE	dioleoylphosphatidyléthanolamine
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
EG	endogline
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
GFP	protéine fluorescente verte (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HEPES	acide hydroxyéthyl pipérazine éthane sulfonique
HRP	HorseRadish Peroxydase
IPTG	isopropylthio- β -galactoside
IC50	concentration pour laquelle 50% d'inhibition est obtenue
IgG	Immunoglobuline G
IL-1 β	interleukine-1- β
pb, kb	paires de bases, kilo paires de bases
PBS	solution saline tamponnée au phosphate (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	polyéthylène glycol
PFA	paraformaldéhyde
p/v	rapport poids / volume
RELIC	REceptor LIgand Contact
RT	transcription inverse (<i>Reverse Transcription</i>)
SDS	sodium dodécyl sulfate
SE	sélectine E
SP	Sélectine P
SleX/A	tétrasaccharide Sialyl Lewis X ou A
TBE	Tris Base /Acide borique / EDTA
TBS	solution de Tris-HCl / NaCl (<i>Tris Buffer Saline</i>)
ufp	unité formant plage de lyse
v/v	rapport volume / volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Abréviations des acides aminés

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide Aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide Glutamique	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

1. Introduction

1.1. Le cancer : épidémiologie, diagnostics et thérapies

1.1.1 Incidence, mortalité, survie

1.1.1.1. Le cancer en France

En France, le cancer représente la deuxième cause de décès chez l'homme, juste après les maladies cardio-vasculaires (cf. figure 1). Ainsi en 2000, 28% des décès recensés en France étaient liés à des cancers, ce qui correspond à 149 815 décès.

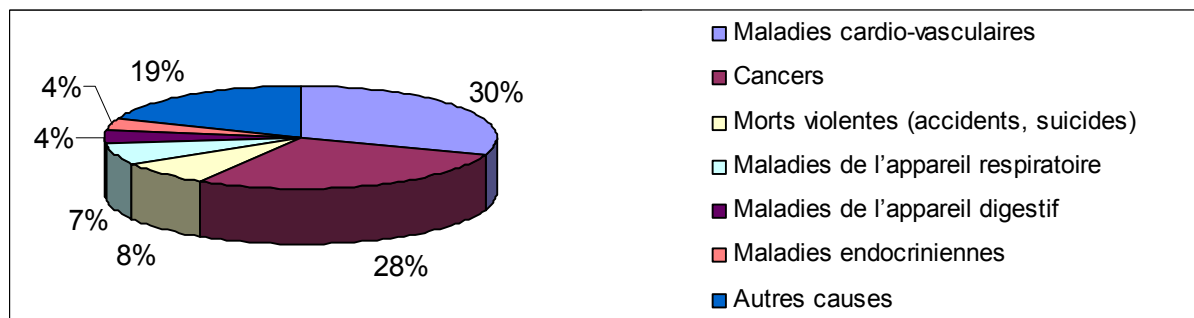


Figure 1 : Principales causes de décès en France en 2000. Source : INSEE <http://www.insee.fr/>.

Concernant l'incidence des différents types de cancer dans la population, le cancer le plus fréquent est le cancer du sein, suivi par le cancer de la prostate (les deux sexes confondus). En 3^{ème} position figure le cancer colorectal [1]. Cependant, la première cause de décès par cancer reste lié au cancer du poumon, suivi du cancer colorectal (cf. figure 2).

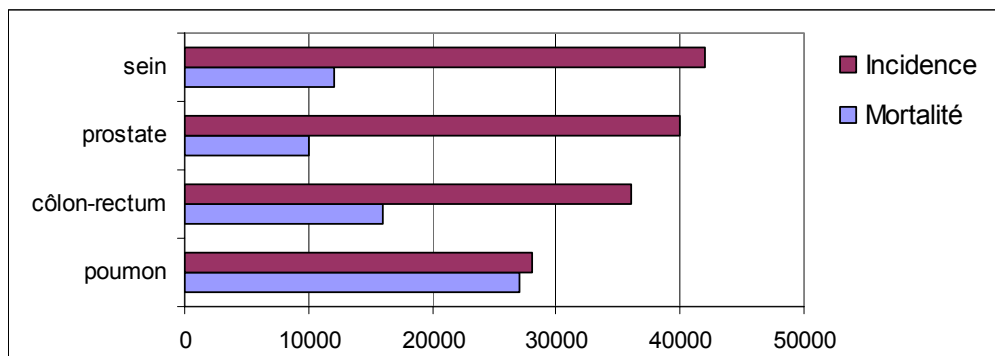


Figure 2 : Incidence et mortalité des principaux cancers en 2000 en France (nombre de cas, deux sexes confondus). Source : InVS [1].

L'incidence du cancer varie en fonction du type de cancer, mais également en fonction de l'âge. La population la plus exposée est celle des 35-64 ans.

1.1.1.2. Le cancer dans le monde

Les données de l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) [2] estiment à 2,89 millions le nombre de cancers diagnostiqués et à 1,71 millions le nombre de décès liés au cancer en 2004 en Europe. Le cancer du poumon est le plus fréquent (13,3% des cas), suivi du cancer colorectal (13,2%) et du cancer du sein (13%). Le cancer le plus meurtrier est le cancer du poumon (20%), suivi du cancer colorectal (11,9%), du cancer de l'estomac (8,1%) et du cancer du sein (7,6%).

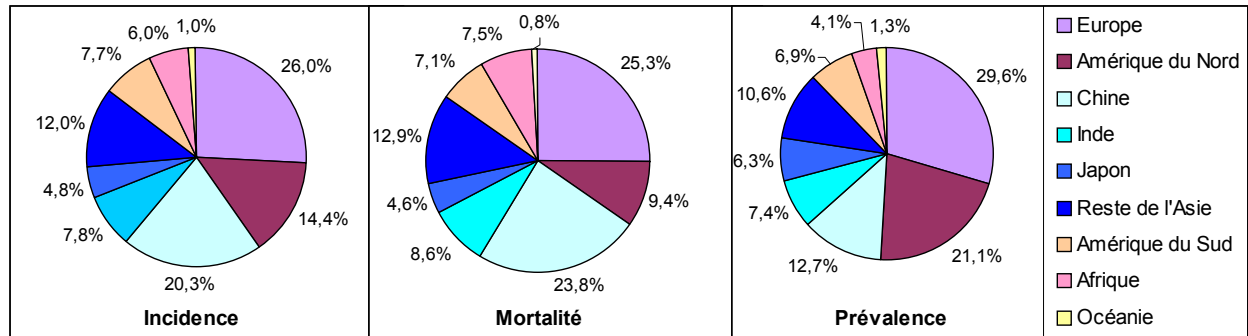


Figure 3 : Le cancer dans le monde : incidence, mortalité et prévalence. Les pourcentages correspondent à un nombre global de 10 862 000 nouveaux cas, à 6 724 000 décès par cancer et 24 570 000 personnes atteintes d'un cancer à travers le monde en 2002. *Source : IARC, 2002 [3].*

D'après les données 2002 de l'IARC [3] sur le cancer dans le monde, les régions les plus touchées en terme d'incidence, de mortalité et de prévalence sont l'Europe, l'Amérique du Nord et la Chine (*cf. figure 3*).

1.1.1.3. Taux de survie dans les cinq ans

Le taux de survie sur cinq ans varie énormément selon le type de cancer. En figure 4 est représenté le résultat d'une étude sur la population américaine entre 1995 et 2000. Pour chaque type de cancer figure le taux de survie dans les cinq ans des patients de race noire ou blanche. En moyenne, les patients atteints d'un cancer du pancréas, du foie, du poumon et de l'œsophage ont un pourcentage de survie sur cinq ans inférieur à 20%. Les patients blancs atteints d'un cancer de la vessie, de la maladie de Hodgkin, d'un cancer du corps utérin, du sein et du mélanome de la peau ont un taux de survie supérieur à 80%. Il en est de même pour les patients blancs et noirs atteints d'un cancer de la thyroïde, des testicules et de la prostate.

De manière générale, le taux de survie est meilleur dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, excepté pour l'Europe de l'Est [3].

En conclusion, le cancer reste un problème majeur de santé publique qui touche une grande partie de la population mondiale et dont la mortalité associée reste très importante. Malgré les progrès réalisés dans la recherche de médicaments anti-cancéreux, les thérapies ne sont pas suffisamment efficaces pour enrayer totalement la maladie. Dans les parties suivantes, nous allons nous intéresser aux moyens de diagnostic et de thérapie.

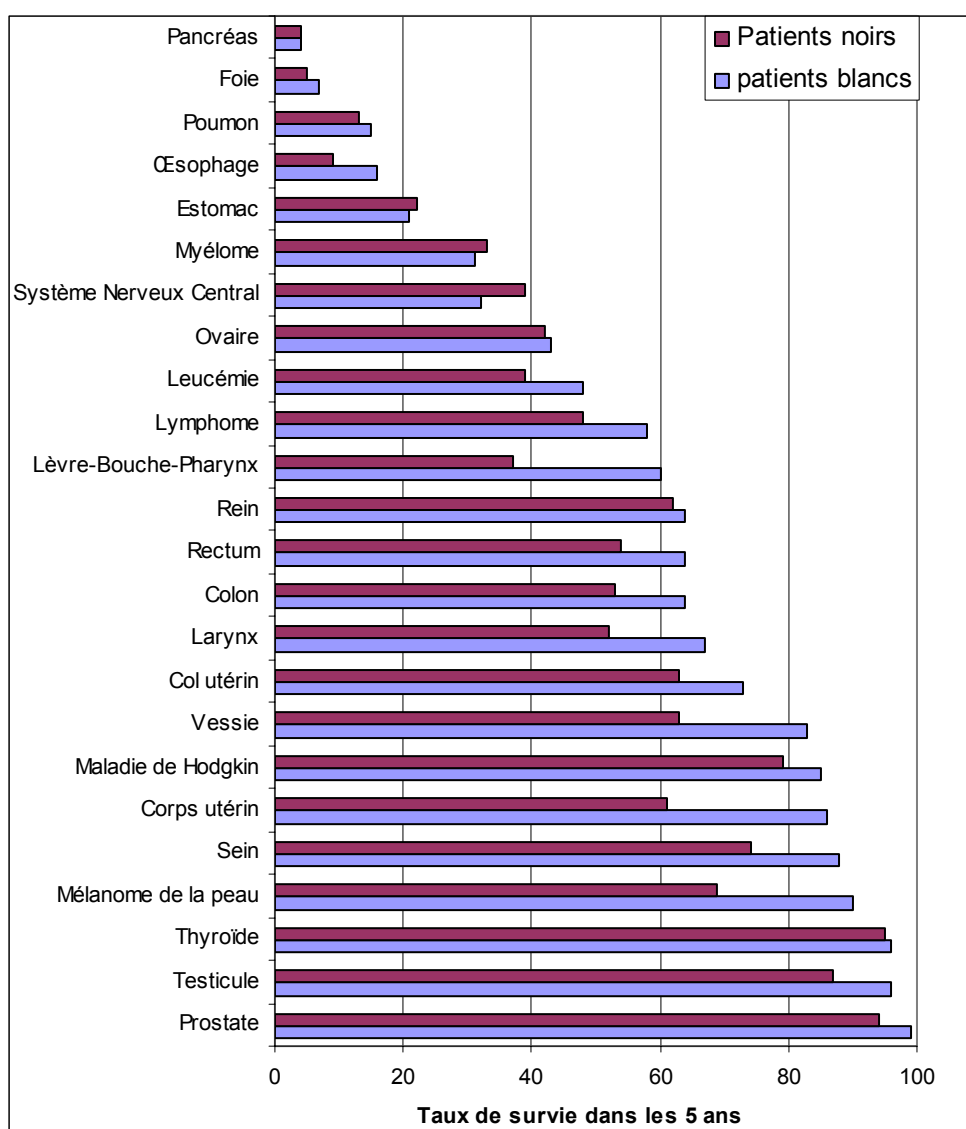


Figure 4 : Taux de survie dans les 5 ans, entre 1995 et 2000, sur la population américaine en fonction du type de cancer. Les pourcentages de survie sont donnés pour la population de patients noirs et blancs. *Source : SEER Cancer Statistics Review 1975-2001, National Cancer Institute.*

1.1.2. Diagnostic

Un diagnostic précoce est primordial pour augmenter les chances de guérison et intervenir avant le développement de métastases. Il s'agit principalement d'analyses cytologiques (à partir de frottis), d'analyses histologiques (à partir de biopsies ou d'examens endoscopiques) ou de la recherche de marqueurs biologiques. Actuellement, il existe peu de marqueurs spécifiques d'un type de cancer. Cependant, les marqueurs biologiques sont utiles pour orienter le diagnostic et suivre l'évolution de la maladie. Un taux élevé de phosphatases alcalines est par exemple fréquent dans les métastases hépatiques ou osseuses. De même, un taux élevé de PSA (*Prostate Specific Antigen*) est souvent rencontré dans le cancer de la prostate. Enfin, différentes techniques d'imagerie sont utilisées pour le

diagnostic et le pronostic des cancers : il s'agit des techniques de radiographie, échographie, scanner, RMN (*Résonance Magnétique Nucléaire*) et scintigraphie.

1.1.3. Les traitements

1.1.3.1. Les traitements actuels

Les traitements actuels reposent sur différentes approches thérapeutiques qui sont généralement associées :

- **la chirurgie** : ablation d'une tumeur primaire ou de métastases.

- **la chimiothérapie** : utilisation de médicaments cytotoxiques. Cependant, le manque de spécificité envers les cellules tumorales par rapport aux tissus sains est à l'origine de nombreux effets secondaires. Il existe des effets secondaires communs à la chimiothérapie : problèmes digestifs (nausées, vomissements, ulcérations digestives), problèmes hématologiques (neutro ou thrombopénie), stérilité ou ménopause précoces, alopecie. D'autres effets secondaires sont spécifiques aux types de médicaments qui présentent souvent une grande toxicité. Par exemple, le Cisplatine provoque une toxicité rénale et auditive élevée, accompagnée de neuropathies périphériques.

Classe	Mécanisme d'action	Exemples de médicaments
Agents alkylants	Inhibition de la duplication de l'ADN ou de la transcription par création de ponts entre les brins d'ADN	Cyclophosphamide : <i>Cytoxan</i> , <i>Neosar</i> Cisplatine : <i>Platinol</i> Chlorambucil : <i>Chloraminophène</i> Carmustine : <i>BiCNu</i>
Anti-métabolites	Inhibition de la synthèse de l'ADN par substitution des bases	Méthotrexate 5-Fluoro-uracile : <i>Adrucil</i> Hydroxy-urée : <i>Hydrea</i>
Anti-mitotiques	Inhibition de la polymérisation de la tubuline	Vincristine : <i>Oncovin</i> Vinblastine : <i>Velban</i>
	Inhibition de la dépolymérisation de la tubuline	Paclitaxel : <i>Taxol</i> Docetaxel : <i>Taxotère</i>
Antibiotiques	Inhibition de la duplication de l'ADN ou de sa transcription	Doxorubicine : <i>Doxil</i> , <i>Adriamycin</i> Bléomycine : <i>Blenoxane</i>
Asparaginase	Dégradation de l'asparagine dans les lymphocytes pauvres en asparagine synthétase, ce qui entraîne la mort cellulaire	Asparaginase : <i>Elspar</i>

Tableau 1 : Classification des médicaments utilisés en chimiothérapie. En italique figure le nom commercial du médicament.

Il existe cinq classes de médicaments regroupés selon leur mécanisme d'action : les agents alkylants, les anti-métabolites, les anti-mitotiques, les antibiotiques et l'asparaginase (*cf. tableau 1*). Le

phénomène de résistance des tumeurs est la principale cause d'échec de la chimiothérapie anti-cancéreuse.

- **la radiothérapie** : traitement local avec des rayons pour détruire les zones tumorales. Cependant, la radiothérapie provoque également des lésions sur les tissus sains. Les effets secondaires dépendent de la zone traitée, de l'importance de l'irradiation et de la sensibilité du patient.

- **l'immunothérapie** : stimulation du système immunitaire en vue d'une réponse immune contre les cellules tumorales. Il existe cinq types d'immunothérapie dont la plupart sont encore au stade de recherche.

1. Immunothérapie passive : l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales ou la vascularisation tumorale
2. Immunothérapie adoptive : injection de lymphocytes étrangers (par exemple dans le cas de leucémies aiguës)
3. Immunothérapie active : injection de cellules tumorales inactivées en vue de stimuler les défenses immunitaires de l'hôte
4. Immunothérapie active non spécifique : utilisation de médicaments à action immunostimulante.

- **l'hormonothérapie** : dans le cas des tumeurs hormono-dépendantes, comme le cancer du sein ou de la prostate, cette thérapie a pour objectif de réduire la croissance tumorale en jouant sur l'environnement hormonal.

1.1.3.2. Axes de recherches actuels

Les nouveaux axes de recherches anti-cancéreux concernent la thérapie génique, les anticorps monoclonaux, les vaccins et enfin les anti-angiogéniques et anti-vasculaires.

La thérapie génique

La thérapie génique consiste à utiliser l'ADN comme un médicament : le gène thérapeutique est transféré dans le noyau des cellules afin de le faire exprimer. Différents types de gènes sont étudiés en vue d'une action anti-cancéreuse :

- les gènes « suppresseur de tumeur », afin de restaurer l'activité apoptotique. Un essai clinique en phase III est en cours aux Etats-Unis pour un transfert du gène p53 avec un adénovirus dans les cellules tumorales (essai clinique US-412) ;
- les gènes codant des protéines inhibitrices d'un oncogène surexprimé au niveau d'une tumeur. Par exemple, un essai clinique en phase II est en cours aux Etats-Unis pour un transfert intra-tumoral par lipofection du gène E1A. Ce gène code une protéine inhibitrice de l'oncogène Her-2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) (essai clinique US-246) ;
- les gènes codant des protéines qui vont stimuler le système immunitaire [4] ;
- les gènes « suicide » pour induire l'apoptose des cellules tumorales. Plusieurs essais cliniques qui utilisent le gène de la thymidine kinase du virus de l'Herpes simplex (HSV-TK) sont en phase III [5].

Les essais cliniques en cours sont référencés sur le site Gene therapy Clinical Trials Worldwide (<http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical/>).

Les anticorps monoclonaux

Deux types d'approches sont explorés :

- le développement d'anticorps spécifiques des cellules tumorales qui, reconnus par les lymphocytes, déclenchent la destruction de ces cellules [6] ;
- l'utilisation d'anticorps couplés à une molécule cytotoxique, une toxine ou à un isotope radioactif [7].

Les vaccins

L'objectif de l'utilisation de vaccins en thérapie anti-tumorale est de restaurer une immunité envers les cellules tumorales qui échappent à la réponse immunitaire. Une des approches consiste en l'injection d'une protéine antigénique spécifique de la tumeur pour stimuler les lymphocytes T [8]. D'autres études utilisent les cellules dendritiques qui sont prélevées au patient pour être modifiées afin de présenter des antigènes tumoraux dans l'optique finale de les réinjecter au patient [9]. Il est également envisagé d'injecter des virus codant des antigènes tumoraux directement aux patients [10]. Des essais cliniques sont actuellement en cours.

Les anti-angiogéniques et anti-vasculaires

Les anti-angiogéniques et les anti-vasculaires ne sont pas dirigés contre les cellules tumorales, mais visent à détruire le réseau sanguin anormal qui alimente les tumeurs afin de les asphyxier. Nous développerons ces stratégies plus précisément dans la partie 2.

1.1.3.3. Répartition des essais cliniques

Il est intéressant de regarder l'importance de chaque thérapie qui arrive au stade des essais cliniques. En figure 5 est représentée la répartition des essais cliniques en phase I-II entre les différentes thérapies existantes, parmi 460 essais cliniques recensés entre 1991 et 2002. La chimiothérapie regroupe 48% des essais cliniques en phase I-II, suivie par les récepteurs ou transduction du signal (26%) et l'immunothérapie (13%). Actuellement, l'immunothérapie prend une place prépondérante dans les essais cliniques : une molécule sur deux testée en phase II est un anticorps monoclonal.

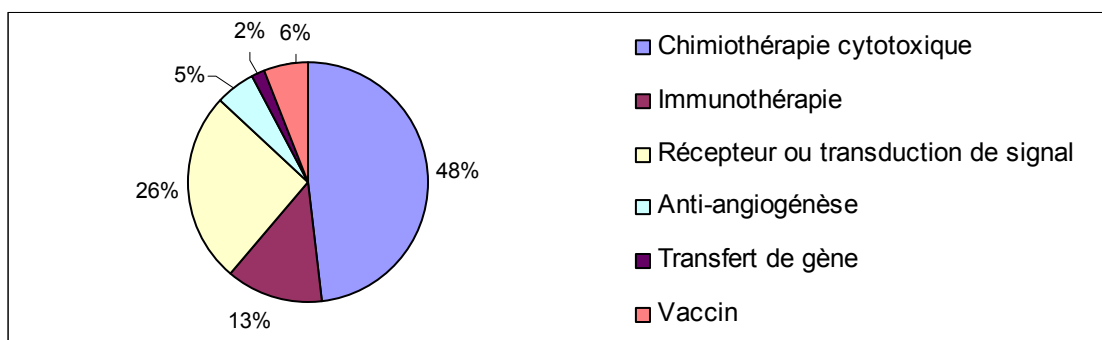


Figure 5 : Répartition des essais cliniques de phase I-II en oncologie par classe de traitement (sauf radiothérapie). Au total, 460 essais sponsorisés par le « Cancer Therapy Program » ont été recensés entre 1991 et 2002, ce qui correspond à un total de 11 935 patients participants. *Source : [11]*

1.1.4. Conclusion : nécessité de nouvelles stratégies thérapeutiques

Les thérapies anti-cancéreuses actuelles ont pour cible essentiellement les cellules tumorales. Cependant, les médicaments disponibles présentent une forte toxicité vis-à-vis des cellules non tumorales et une mauvaise efficacité pour détruire les cellules tumorales. Plusieurs raisons expliquent ce phénomène : parmi celles-ci, des études ont montré que les molécules thérapeutiques ne s'accumulent pas préférentiellement dans les tumeurs. En effet, la vascularisation irrégulière ne facilite pas la diffusion de ces molécules vers les tumeurs qui sont par ailleurs peu accessibles. D'autre part, les cellules tumorales présentent une instabilité génétique qui leur confère rapidement des propriétés de multi résistance aux médicaments. Il y a donc un réel besoin de médicaments plus spécifiques.

A cet effet, deux approches ont été récemment développées : les stratégies anti-angiogéniques qui visent à inhiber le processus d'angiogénèse et les stratégies anti-vasculaires dont l'objectif est la destruction sélective de la vascularisation tumorale.

1.2. Stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques et anti-vasculaires

1.2.1. Introduction

La croissance des tumeurs et le développement de métastases sont dépendants de l'approvisionnement sanguin. Il est admis que dès un volume de 1 mm^3 , une tumeur solide a besoin que se développe autour d'elle un réseau sanguin pour lui apporter les nutriments nécessaires et éliminer les déchets. C'est grâce à ce réseau que se répandent les cellules métastatiques. A la fois l'angiogénèse et la vasculogénèse sont impliqués dans la vascularisation tumorale. Le concept de ciblage des zones tumorales a été énoncé par P. Ehrlich au 19^{ème} siècle. En 1971, J. Folkman [12] est à l'origine du concept d'angiogénèse tumorale qui a suscité l'intérêt de nombreuses équipes durant les 30 dernières années. Les thérapies anti-angiogéniques et anti-vasculaires [13] sont proposées comme des adjuvants aux thérapies traditionnelles anti-cancéreuses.

1.2.2. Les stratégies anti-angiogéniques

1.2.2.1. L'angiogénèse

L'angiogénèse a été décrite pour la première fois par J. Hunter en 1787. L'angiogénèse [14] correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Elle est ainsi impliquée dans tous les processus physiologiques fondamentaux comme l'embryogenèse, la réparation des blessures, le cycle ovarien, etc. Cependant, l'angiogénèse joue également un rôle dans un certain nombre de pathologies (*cf. tableau 2*).

Angiogénèse excessive	Angiogénèse insuffisante
- Polyarthrite rhumatoïde - Cancer et métastases - Perte de la vision dans les rétinopathies diabétiques - Perte de vision liée à la dégénérescence de la macula chez les personnes âgées	- Complications dans la réparation des blessures - Arrêt cardiaque - Ischémie du myocarde

Tableau 2 : Différentes pathologies associées à une mauvaise régulation de l'angiogénèse.

L'angiogénèse est un processus hautement régulé qui intervient généralement au cours de l'augmentation de masse d'un tissu, lors de la diminution du taux d'oxygène dans les tissus et au cours de processus inflammatoires. Notamment, l'angiogénèse est souvent associée à l'expression de cytokines comme le $\text{TNF}\alpha$, le $\text{TGF}\beta$ et le VEGF (*cf. tableau 3*).

Facteurs induisant l'angiogénèse	Exemples
Cytokines	VEGF, angiotensine 1 et 2, TGF β , PDGF, TNF α
Protéines d'adhésion	Intégrines, VE-cadhérines
Force biomécanique	Flux turbulent

Tableau 3 : Facteurs impliqués dans le processus d'angiogénèse. VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor, TGF β : Transforming Growth Factor β , PDGF: Platelet Derived Growth Factor, TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

1.2.2.2. Les molécules anti-angiogéniques thérapeutiques

Les informations sur les molécules en essai clinique décrites dans cette partie proviennent des sites internet des industries pharmaceutiques qui les développent.

Les inhibiteurs naturels de l'angiogénèse

En thérapie anti-cancéreuse, des inhibiteurs naturels de l'angiogénèse sont utilisés, comme l'endostatine [15], la thrombospondine-1, l'angiotensine ou alors des mimes de ces molécules. Des molécules anti-angiogéniques ont également prouvé leur utilité thérapeutique, comme les interférons et les interleukines.

Les inhibiteurs des métalloprotéases matricielles (MMPs)

L'expression des MMPs est augmentée dans la plupart des cancers. Les MMPs sont des enzymes impliquées dans les phénomènes de remodelage des tissus, notamment dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles sont donc directement impliquées dans l'angiogénèse et la migration des cellules normales et tumorales. Plusieurs inhibiteurs des MMPs sont actuellement en essai clinique, comme le *Metastat*, par CollaGenex Pharmaceuticals (phase I/II) [16].

Ciblage du VEGF

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) joue un rôle important dans l'angiogénèse tumorale [17]. Le VEGF agit en se liant à ses récepteurs VEGF-R1 Et VEGF-R2 (ou KDR) dont la partie cytoplasmique possède une activité tyrosine kinase. Ainsi, il est possible d'interrompre l'action du VEGF à plusieurs niveaux.

La première cible envisageable est le VEGF lui-même. L'action du VEGF peut être bloquée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-VEGF. Ainsi, le Bevacizumab [18], anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF, a été récemment commercialisé sous le nom d'*Avastin* par Genentech de Roche.

Un aptamère anti-VEGF, appelé Macugen, est en cours d'essai clinique de phase II/III par Eyetech pour des applications contre la dégénérescence de la macula liée à l'âge et les rétinopathies diabétiques.

Les deuxièmes cibles potentielles sont les récepteurs au VEGF. Un inhibiteur oral des récepteurs au VEGF a ainsi été développé par Novartis. Il s'agit de la tyrosine kinase PTK787/ZK qui est actuellement en essais cliniques de phase III.

Enfin, la voie de transduction du signal peut être inhibée avec des molécules ciblant la voie des tyrosines kinases. Par exemple, AZD2171 [19] très actif en étude préclinique pour le traitement de tumeurs solides est actuellement en phase I d'étude clinique et ZD6474 [20] en phase clinique II. Ces deux molécules sont développées par Astra Zeneca.

Inhibition des interactions intercellulaires

Les intégrines sont des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans l'adhésion des leucocytes, mais également dans le développement des métastases. Des inhibiteurs des intégrines α_v ont été développés. Par exemple, l'anticorps monoclonal humanisé anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$, le *Vitaxin*, de Medimmune est en phase II d'essai clinique pour le traitement du cancer de la prostate et le mélanome. Des antagonistes des intégrines sont également en cours d'étude. Par exemple, la Thalidomide est en essai clinique de phase III.

Autres molécules développées

Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de Her1 ont été développés : par exemple, la molécule IRESSA développée par Astra Zeneca est en phase clinique II pour différentes applications anti-tumorales. On peut également citer des inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) comme le *Celebrex* et le *Dynastat* commercialisés par Pfizer. Ces derniers sont étudiés pour des applications anti-tumorales. En effet, Cox-2 est surexprimée par les cellules tumorales et son implication dans l'angiogénèse tumorale a été démontrée [21].

1.2.3. Le ciblage de la vascularisation tumorale

Le concept de ciblage de la vascularisation tumorale est lié à l'anti-angiogénèse, mais l'approche est différente, puisque l'objectif est de détruire une vascularisation déjà en place. Il repose sur la constatation que la vascularisation tumorale diffère structurellement et au niveau moléculaire de la vascularisation normale.

1.2.3.1. Description de la vascularisation tumorale

La vascularisation tumorale est formée par des mécanismes proches de l'angiogénèse physiologique. Les cellules tumorales envoient des signaux pour induire la formation de nouveaux vaisseaux. Ces vaisseaux sont caractérisés par un diamètre irrégulier et des formes tortueuses. Les vaisseaux tumoraux sont rendus perméables par la présence de jonctions et de fenêtres entre les cellules. La membrane basale est incomplète et il manque de nombreux péricytes fonctionnels. Les tumeurs montrent généralement des zones de nécrose et d'hypoxie. La plupart des molécules induisant l'angiogénèse tumorale sont celles qui sont impliquées dans l'angiogénèse physiologique : VEGF, FGF, Angiotensine-2, l'interleukine-8, MMP-2, etc.

Ces différences entre la vascularisation normale et tumorale ont permis d'identifier des cibles spécifiques [22]. En effet, à la fois les cellules endothéliales activées, les péricytes et la matrice extracellulaire expriment des molécules caractéristiques des vaisseaux tumoraux. Il s'agit généralement de protéines associées à l'angiogénèse.

1.2.3.2. Cibles de la vascularisation tumorale

L'objectif est d'amener un effecteur ou un agent cytotoxique spécifiquement au niveau de la vascularisation des tumeurs solides pour empêcher l'irrigation de la tumeur. Ainsi, les vaisseaux normaux ne sont pas touchés à partir du moment où des marqueurs strictement spécifiques des cellules endothéliales tumorales sont utilisés. Cependant, il est possible qu'il n'existe pas de marqueurs strictement spécifiques de la vascularisation tumorale, mais plusieurs candidats potentiels sont en cours d'étude.

Les cibles potentielles sont principalement :

- des marqueurs de l'activation et de la prolifération des cellules endothéliales. Par exemple l'aminopeptidase N est un marqueur des vaisseaux angiogéniques [23]
- des marqueurs de stress hypoxique : HIF-1 α et β (*Hypoxia Inducible Factor 1*) [24]
- des récepteurs de facteur de croissance : le récepteur au VEGF, le récepteur au FGF [25]
- des antigènes des cellules endothéliales : endosialine [26], endogline, intégrines [27]
- des protéines exprimées à la surface de la membrane basale nouvellement formée ou en remodelage : fragment du plasminogène, fibronectine, laminine, collagène de type IV [28].

La méthode SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) a été utilisée par l'équipe de Saint-Croix [29] pour identifier d'autres TEMs (*Tumor Endothelial Markers*). Des ligands de ces marqueurs de la vascularisation tumorale sont alors recherchés afin de les coupler à des molécules effectrices. La possibilité de cibler des médicaments toxiques vers la zone à traiter a été démontrée en 1993 chez la souris par l'équipe de F.J. Burrows [30].

1.2.3.3. Les anti-vasculaires

Les anti-vasculaires [31] sont des molécules de faible poids moléculaire sélectivement toxiques pour la vascularisation tumorale. Les anti-vasculaires créent des dommages à la vascularisation tumorale qui aboutissent à une occlusion des vaisseaux sanguins et à une nette diminution de la circulation sanguine dans la tumeur. Des zones de nécroses apparaissent alors dans cette dernière.

On distingue deux classes d'anti-vasculaires : les flavonoïdes et les agents de liaison à la tubuline. L'activité anti-tumorale des flavonoïdes semble faire intervenir le TNF α . Parmi les flavonoïdes en cours d'étude, on peut citer l'acide flavone acétique et ses analogues et le DMXAA. Les agents de liaison à la tubuline agissent en empêchant la polymérisation ou la dépolymérisation de la tubuline. Les combrétastatines sont très intéressantes par rapport aux anti-mitotiques actuels, car elles présentent l'avantage de ne pas provoquer de neuropathie périphérique ou de neurotoxicité.

Les anti-vasculaires induisent des effets anti-tumoraux à une faible dose ce qui les rend beaucoup moins toxiques que les traitements de chimiothérapie classique.

1.2.3.4. Avantages du ciblage de la vascularisation par rapport aux stratégies classiques

Les avantages des thérapies anti-vasculaires sont les suivants :

- l'accessibilité de l'endothélium vasculaire *via* la circulation sanguine ;
- la stabilité génétique des cellules endothéliales (absence possible des problèmes de résistance rencontrés avec les cellules tumorales) ;
- la limitation de la toxicité et des effets secondaires dans les tissus normaux si les cibles choisies sont spécifiquement exprimées sur les cellules endothéliales en prolifération ;
- un seul vaisseau sanguin va permettre de toucher plusieurs millions de cellules tumorales ;
- évite le problème d'hétérogénéité de l'antigène tumoral ;
- une application possible à plusieurs types de tumeurs solides.

En contrepartie, ces thérapies présentent plusieurs désavantages, notamment :

- la possibilité d'interférence avec l'angiogénèse physiologique (réparation des blessures, cycle reproductif chez la femme) ;
- implique des traitements à long terme, puisque les cellules tumorales ne constituent pas la cible directe ;
- le risque d'immunogénicité lorsqu'il s'agit d'anticorps.

1.2.4. Recherche de peptides pour le ciblage de la vascularisation tumorale

L'utilisation de peptides pour le ciblage de la vascularisation tumorale présente plusieurs avantages, notamment par rapport à l'utilisation d'anticorps : un risque immunogène plus faible, une synthèse à grande échelle plus facile et moins coûteuse, une meilleure stabilité et une meilleure pénétration dans les organes et tumeurs [32]. Actuellement, plusieurs peptides spécifiques de la vascularisation tumorale ont été identifiés [33].

Utilisation des peptides seuls

Les peptides sélectionnés pour leur liaison à la vascularisation sont testés *in vivo* et permettent souvent une régression de la tumeur et une inhibition des métastases [34]. Cependant, pour permettre d'améliorer leur temps de circulation et leur affinité par une stratégie de multivalence, les peptides sont greffés sur des polymères comme le PEG (*Poly-éthylène-glycol*). Ainsi, les peptides peuvent être présentés à la surface de liposomes, ce qui peut par contre les rendre immunogènes [35, 36].

Couplage du peptide à un médicament

Les peptides ciblant la vascularisation tumorale peuvent être couplés à des molécules effectrices pour induire une action thérapeutique. Ainsi, le peptide RGD-4C [37] qui cible les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ et le peptide CNGRC [23] qui cible l'aminopeptidase N ont permis le ciblage de la doxorubicine, diminuant ainsi les effets secondaires dans le cœur et le foie qui sont les sites principaux de la toxicité

de la doxorubicine [38]. D'autre part, le couplage de la doxorubicine à ces peptides a montré une action thérapeutique plus efficace que la doxorubicine seule.

Le peptide peut également être couplé à des molécules radioactives pour de l'imagerie tumorale.

Couplage du peptide à un peptide pro-apoptotique

Il est également possible de coupler un peptide ciblant la vascularisation tumorale à un autre peptide possédant une activité pro-apoptotique. Par exemple, le peptide (KLAKLAK)₂ [39] constitué d'acides aminés D se lie spécifiquement aux membranes bactériennes, mais pas aux membranes eucaryotes. Par contre, si ce peptide entre dans les cellules eucaryotes, il détruit la membrane des mitochondries et induit l'apoptose. Le peptide SMSIAPRL ciblant la prostate couplé à ce peptide pro-apoptotique a permis la destruction ciblée de ce tissu chez la souris [40].

Utilisation en tête de ciblage pour la thérapie génique

Les peptides peuvent être couplés à des lipides cationiques pour réaliser un transfert de gène ciblé. En effet, les complexes ADN / lipides cationiques formulés en liposome, en partie du fait de leur charge, sont rapidement éliminés de la circulation sanguine. Afin d'améliorer leur temps de circulation, des stratégies de pegylation ont permis de les rendre furtifs par masquage de leurs charges de surface. Afin de rediriger les lipoplexes vers les zones cibles, la stratégie est d'ajouter des têtes de ciblage sur les lipides-PEG [41].

Dans le tableau 4 figurent quelques exemples de peptides permettant le ciblage de la vascularisation tumorale.

Ligand peptidique	Cible cellulaire	référence
SMSIARL	Cellules de la prostate de souris	[40]
CDCRGDCFC (RGD4C)	Intégrines $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$	[37]
CNGRC	Aminopeptidase N	[23]
CTTHWGFTLC	MMP-2 et MMP-9	[41]

Tableau 4 : Exemples de peptides ciblant décrits dans la littérature

Notre étude s'inscrit dans les stratégies de ciblage de la vascularisation tumorale : deux protéines surexprimées au niveau de l'endothélium tumoral ont été identifiées comme cible d'après les données de la littérature. Il s'agit de la sélectine E et de l'endogline dont nous allons présenter les caractéristiques et les potentialités thérapeutiques dans la partie suivante.

1.3. Présentation des deux cibles d'intérêt : la sélectine E et l'endogline

1.3.1. La sélectine E

Les sélectines sont une famille de trois glycoprotéines impliquées dans les phénomènes d'adhésion des leucocytes avec l'endothélium et les plaquettes : la sélectine E, la sélectine P et la sélectine L. Plus précisément, elles sont impliquées dans le recrutement des leucocytes dans les tissus inflammatoires. Les ligands des sélectines sont des glyco-conjugués [42].

1.3.1.1. Structure et fonction de la sélectine E

Structure et localisation de la sélectine E

La sélectine E est une glycoprotéine membranaire de 115 kDa qui est exclusivement exprimée à la surface des cellules endothéliales. Elle n'est pas exprimée de manière constitutive, mais lors d'inflammations chroniques ou aiguës et notamment pendant l'angiogénèse.

La partie extracellulaire des sélectines est constituée d'un domaine N-terminal de type lectine-C, suivi d'un motif de type EGF (*Epidermal Growth Factor*) et de six motifs consensus similaires à ceux trouvés dans les protéines de régulation du complément (appelés SCR pour *Short Consensus Repeats*). Les sélectines possèdent un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (*cf. figure 6*).

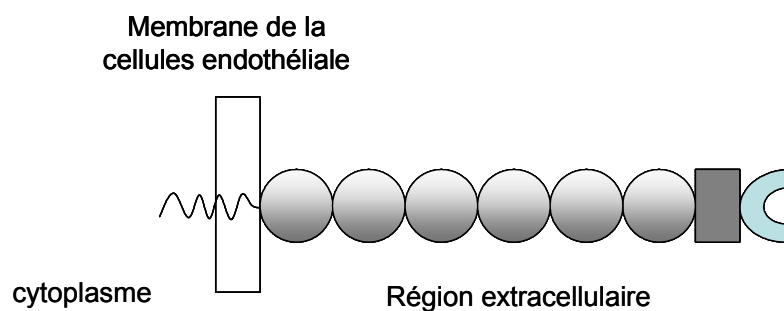


Figure 6 : Structure de la sélectine E. La sélectine E comporte une courte queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire, six SCR (*rond*), un domaine de type EGF (*rectangle*) et se termine en N-terminal par un domaine de type lectine-C.

Le recrutement des leucocytes vers les sites d'inflammation ou d'invasion par des micro-organismes nécessite la présence des épitopes spécifiques de la sélectine impliquée à la surface des cellules endothéliales. Des ligands naturels de la sélectine E sont le tétrasaccharide Sialyl Lewis X (*SLeX*) et le tétrasaccharide Sialyl Lewis A (*SLeA*). La sélectine E reconnaît avec une meilleure affinité les dérivés

du SleA/X dans lesquels le groupe hydroxyle en position 3 du galactose comporte un sulphate au lieu d'un sialyl [42].

Fonction de la sélectine E

La sélectine E intervient dans la reconnaissance des leucocytes aux premiers stades de l'inflammation [43]. Ce processus se fait dans des conditions de flux sanguin rapide. Par l'association avec ses ligands, la sélectine E est capable d'arrêter rapidement des leucocytes libres dans la circulation : c'est le phénomène de « rolling » des leucocytes le long de l'endothélium inflammatoire (*cf. figure 7*). Il s'agit de la première étape d'une cascade d'événements aboutissant à l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium *via* les intégrines, puis de leur extravasation qui leur permet d'atteindre le site de l'inflammation.

La transcription de la sélectine E est induite par le lipopolysaccharide et des cytokines comme le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) et l'interleukine-1- β .

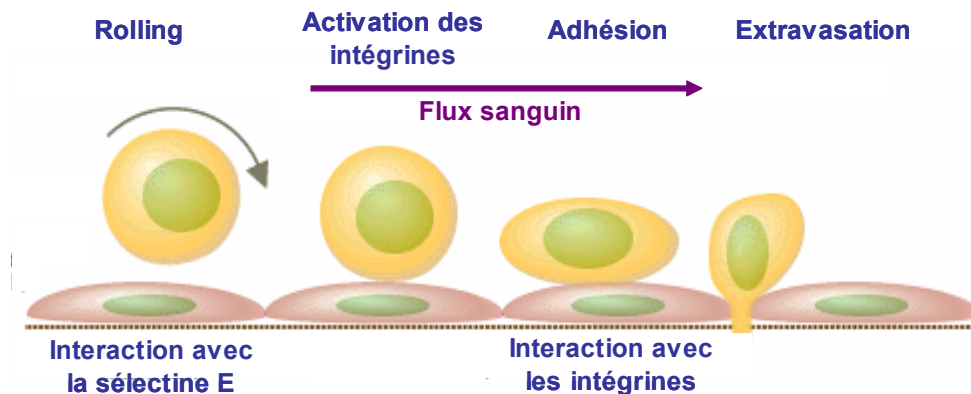


Figure 7 : Rôle de la sélectine dans le mécanisme de « rolling » des leucocytes. L'interaction des leucocytes avec la sélectine E exprimée à la surface de la cellule endothéliale permet de les freiner par un mécanisme de « rolling ». L'activation d'autres molécules d'adhésion cellulaire comme les intégrines permet leur interaction avec les leucocytes qui, arrêtés, peuvent gagner le site de l'inflammation par extravasation entre les cellules endothéliales.

1.3.1.2. Implications des sélectines dans les pathologies

Maladies inflammatoires aiguës et chroniques

Un recrutement excessif des leucocytes est impliqué dans des maladies comme la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme, le diabète, les psoriasis et dans les chocs septiques.

Dans plusieurs modèles expérimentaux, l'inhibition du « rolling » des leucocytes, en bloquant les effets de la sélectine E, affecte l'accumulation des leucocytes. L'inhibition de l'activité des sélectines pourrait constituer un traitement pour les maladies inflammatoires. La liaison de la sélectine E au SleX étant faible, le SleX lui-même ne constituait pas un bon candidat. Mais des analogues du SleX possédant une meilleure affinité ont été recherchés. D'autre part, des anticorps monoclonaux dirigés

contre les sélectines ont été utilisés dans des essais cliniques pour les inhiber. Cependant, malgré des essais précliniques prometteurs, les résultats obtenus avec des inhibiteurs des trois sélectines ont donné au mieux une réduction du processus inflammatoire. Un essai encourageant en phase II est mené par Encysive pour le traitement de l'asthme et du psoriasis avec un mime du SleX, le *Bimosiamose*. D'autres molécules non glycosylées pouvant être administrées oralement sont en études pré-cliniques.

Le cancer et le développement de métastases

L'importance des sucres dans le développement du cancer a été révélée par l'observation d'une glycosylation anormale des cellules tumorales qui expriment à leur surface le SleX et/ou le SleA. Dans les années 1990, le SleX et le SleA ont été définis comme des ligands de la sélectine E, d'où l'hypothèse que la sélectine E, en permettant l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium, était impliquée dans le développement des métastases. Le SleX et le SleA sont alors devenus des marqueurs tumoraux avec des applications possibles dans le diagnostic et le suivi des tumeurs après traitement [44].

L'expression de la sélectine E à la surface des cellules endothéliales tumorales est induite par les cellules cancéreuses elles-mêmes [45]. Les patients atteints d'un cancer présentent des taux élevés de sélectine E dans le sérum et son expression est inversement corrélée à la distance qui la sépare de la tumeur [46]. Les cellules cancéreuses induisent l'expression de la sélectine E par deux mécanismes :

- mécanisme direct : par la production d'interleukine-1- β ;
- mécanisme indirect : production d'un facteur humoral non identifié qui stimule la production d'interleukine-1- β par les leucocytes mononucléaires. Le mécanisme indirect est le plus fréquent.

Les opérations chirurgicales, la chimiothérapie et la radiothérapie induisent également l'expression de la sélectine E vasculaire, alors que les glucocorticoïdes ont un effet supprimeur de son expression.

L'implication des sélectines P et L dans le développement des cancers a également été décrite. La sélectine P est stockée dans les granules Weibel-Palade des cellules endothéliales et les granules α des plaquettes. La stimulation des cellules induit la translocation de ces granules à la surface des cellules. Les ligands de la sélectine P sont portés par un cœur protéique spécifique : PSGL-1. Mais la plupart des cellules cancéreuses n'expriment pas PSGL-1, d'où l'idée que la sélectine P joue un rôle moins important dans l'adhésion des cellules cancéreuses. Cependant, des souris déficientes pour la sélectine P ne développent plus de métastases [47].

La sélectine L est exprimée de manière constitutive à la surface des leucocytes. La déficience de sélectine L chez des souris abolit la formation de métastases [48]. Un ligand spécifique de la sélectine L est le Sialyl 6-sulfo Lewis X qui est exprimé préférentiellement à la surface des cellules épithéliales, mais pas sur les cellules cancéreuses. Par contre, l'expression de ce ligand tend à diminuer en présence de tumeur. La sélectine L exprimée par des cellules malignes d'origine leucocytaire ou de lymphomes jouerait un rôle dans la formation des métastases.

1.3.1.3. Utilisation de la sélectine E dans le traitement du cancer

L'utilisation de la sélectine E dans le traitement du cancer a fait l'objet de plusieurs approches thérapeutiques :

1. l'utilisation d'anticorps anti-SleX/A a permis l'inhibition de métastases de cancers gastrique et pancréatique chez la souris *nude* [49, 50] ;
2. des mimes du SleX/A ont été testés, par exemple, un mime du SleA obtenu par sélection de banques de peptides sur phages a permis d'inhiber la colonisation de cellules tumorales de poumon exprimant le SleA [51] ;
3. l'utilisation d'ADNc anti-sens, par exemple, un anti-sens du gène de la fucosyl transférase III/VI, en empêchant la synthèse du SleX, a permis de supprimer la colonisation de cellules du cancer du colon [52] ;
4. les molécules classiques comme les inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) permettent de diminuer l'expression du SleA et suppriment les métastases dans le foie de cellules cancéreuses du colon [53].

Les stratégies anti-angiogéniques ont suscité un tel enthousiasme que l'étude des phénomènes d'adhésion tumorale est restée en arrière-plan. Cependant, les études sur la sélectine E et son rôle dans le développement des métastases ont montré l'intérêt de son utilisation comme cible thérapeutique.

1.3.2. L'endogline

1.3.2.1. Présentation de l'endogline

Structure de l'endogline

L'endogline humaine ou CD105 [54] est une glycoprotéine transmembranaire homodimérique de 180 kDa découverte en 1985 par le groupe de Letarte [55] (*cf. figure 8*). Les parties intracellulaire et extracellulaire possèdent 71% de similarité avec le bétaglycane, appelé également récepteur III du TGF β (TGF β RIII). Les régions les plus conservées de l'endogline entre les espèces sont la partie intracellulaire et le domaine transmembranaire (95 % d'identité).

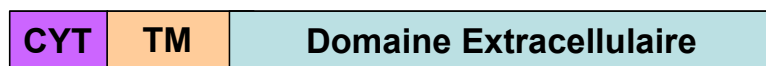


Figure 8 : Structure de l'endogline humaine. CYT : domaine cytoplasmique (15 acides aminés), TM : domaine transmembranaire (25 acides aminés), Domaine extracellulaire (586 acides aminés).

L'endogline humaine est phosphorylée de manière constitutive dans les cellules endothéliales. La phosphorylation se retrouve essentiellement au niveau des sérines et des thréonines. La liaison du TGF β à l'endogline entraîne une régulation négative de sa phosphorylation.

Localisation de l'endogline

Des études utilisant des anticorps dirigés contre l'endogline ont montré qu'elle est exprimée essentiellement à la surface des cellules endothéliales vasculaires dans les tissus angiogéniques, à la surface des cellules endothéliales microvasculaires et des syncytiotrophoblastes du placenta à terme. D'autres cellules expriment l'endogline à leur surface, dans une moindre mesure : VSMCs (*Vascular Smooth Muscular Cells*), fibroblastes, macrophages, cellules leucémiques et précurseurs érythroïdes. L'endogline est d'autre part surexprimée à la surface des cellules de l'endothélium angiogénique des zones tumorales et inflammatoires. D'ailleurs, le promoteur de l'endogline est actif spécifiquement dans les cellules endothéliales [56].

1.3.2.2. Rôle de l'endogline dans la transduction du signal du TGF β

La plupart des fonctions de l'endogline sont associées à la voie du TGF β . Ce dernier est une cytokine pléiotropique qui agit à travers ses récepteurs sérines-thréonines kinases : les récepteurs I et II du TGF β . La liaison d'un ligand aux domaines externes des deux récepteurs entraîne leur association et le récepteur RII phosphoryle le RI. Le RI est alors activé et interagit avec d'autres molécules en aval, et notamment avec les protéines Smad [57].

L'endogline fait partie du complexe des récepteurs au TGF β [58-60], mais il peut être indépendant à la surface cellulaire. L'endogline se lie au TGF β 1 et 3 avec une forte affinité, de l'ordre de 50 nM, mais les domaines de liaison ne sont pas encore connus. L'endogline interagit également avec les récepteurs I et II du TGF β [59]. La liaison au TGF β 1 entraîne une diminution du taux de phosphorylation de l'endogline humaine. *In vitro*, l'endogline supprime la signalisation du TGF β dans plusieurs cellules. Seulement un faible pourcentage de l'endogline membranaire se lie au TGF β : il s'agit probablement de l'endogline liée aux récepteurs du TGF β . D'autre part, la surexpression de l'endogline affecte la morphologie des cellules et l'adhésion en l'absence de TGF β , ce qui laisse penser à une autre fonction de l'endogline indépendante de la voie de signalisation du TGF β .

Les mécanismes d'action de l'endogline ne sont pas encore bien connus. Bernabeu et son équipe [59] ont établi un modèle d'action de l'endogline dans le complexe des récepteurs au TGF β . L'endogline s'associe au récepteur II au niveau de sa partie intracellulaire et extracellulaire ce qui entraîne sa phosphorylation. Cette association entraîne la phosphorylation du RI qui phosphoryle les protéines Smad. L'endogline est également phosphorylée par le RI avec lequel elle s'associe au niveau de sa région intra et extracellulaire.

Finalement, l'endogline module la fonction du TGF β *via* les récepteurs I et II au TGF β et modifie la phosphorylation des protéines Smad. Le niveau d'expression de l'endogline régule l'expression des différents composants de la matrice extracellulaire, dont la fibronectine, le collagène, PAI-1 et le lumican. L'endogline joue un rôle crucial dans la transmigration des cellules.

1.3.2.3. Fonctions de l'endogline

Même si sa fonction n'est pas très claire, l'endogline est impliquée dans les processus suivants :

1. l'angiogénèse : l'endogline est surexprimée à la surface des cellules endothéliales soumises à une angiogénèse d'origine tumorale ou induite par l'hypoxie [54]. Par exemple, le turn-over de l'endogline dans les cellules endothéliales autour des zones tumorales est 20 à 2000 fois plus rapide que dans

les tissus normaux [61]. L'expression de l'endogline est corrélée avec l'activation et la prolifération des cellules endothéliales tumorales [62] ;

2. la protection des cellules contre les effets inhibiteurs du TGF β 1 [63, 64] ;

3. le développement du système vasculaire : des souris invalidées pour le gène de l'endogline souffrent de multiples problèmes vasculaires et cardiaques qui entraînent leur mort au stade embryonnaire précoce. A partir du 9^{ème} jour embryonnaire, le plexus vasculaire primitif du sac jaune n'est pas capable de former de vaisseaux matures, ce qui aboutit à une dilatation des vaisseaux, des ruptures et hémorragies. L'endogline est donc nécessaire à la formation des vaisseaux sanguins matures dans la vascularisation extra-embryonnaire [65] ;

4. la protection contre l'apoptose [66].

1.3.2.4. Implications de l'endogline dans des pathologies

La télangiectasie hémorragique héréditaire de type I (HHT1)

La télangiectasie hémorragique héréditaire (*HHT*) est une maladie autosomale dominante caractérisée par une dysplasie vasculaire multisystémique et des hémorragies récurrentes. La HHT de type 2 résulte d'une mutation dans le gène de ALK1 et la HHT de type 1 de mutations dans le gène de l'endogline (essentiellement dans la partie extracellulaire) qui aboutissent à des formes tronquées de la protéine [67]. Des souris exprimant un seul allèle de l'endogline développent des signes externes de maladies similaires à HHT1.

L'angiogénèse tumorale

L'observation d'une forte régulation positive de l'endogline dans l'endothélium des tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux a conduit à l'hypothèse que l'endogline est associée à l'angiogénèse tumorale. L'utilisation de différents anticorps dirigés contre l'endogline a montré une surexpression au niveau de l'endothélium tumoral du colon, sein, cerveau, poumon, prostate et cou. Des approches anti-sens visant à éteindre le gène codant l'endogline humaine ont montré une inhibition marquée de l'angiogénèse *in vitro* [64]. L'endogline est donc un composant pro-angiogénique dans les cellules endothéliales.

1.3.2.5. Importance du ciblage de l'endogline à des fins thérapeutiques [68]

Utilisation de l'endogline pour le pronostic tumoral

De nombreuses études ont identifié l'endogline comme un outil potentiel dans le diagnostic, le suivi de la progression de la maladie et la prédiction des réponses aux traitements en clinique.

Endogline sécrétée et métastases

Une étude de Takahashi et son équipe a montré une corrélation entre le taux d'endogline soluble dans le sérum et les métastases chez des patients atteints de tumeurs colorectales ou du sein [69]. Or les métastases constituant la cause majeure de mort par cancer, leur détection précoce est fondamentale. De manière intéressante, la chimiothérapie diminue le taux d'endogline soluble dans le sérum. D'autres études ont montré que le taux d'expression d'endogline soluble dans le cas de cancer

su sein [70] et du poumon [71] est corrélé à un pronostic défavorable. Ces résultats montrent que le taux d'endogline circulant permet de détecter les patients ayant une maladie à un stade avancé et de prédire les risques de métastases.

Endogline et évaluation de la MVD

La densité des microvaisseaux (*MVD*) est un indicateur de pronostic indépendant du type de tumeurs malignes. Une *MVD* élevée est corrélée à des taux de survie faible [72]. Mais certaines études contredisent ce résultat.

Les divergences observées entre ces études sont dues aux variations dans les méthodes de coloration des tissus avec les anticorps, ainsi que dans les méthodes de comptage des microvaisseaux. Par exemple, les anticorps anti-vWF (*von Willebrand Factor*) colorent les cellules endothéliales des gros vaisseaux, mais pas de tous les petits vaisseaux. La *MVD* dans les tumeurs est alors sous-estimée. Des essais sont en cours pour standardiser les procédures de coloration et le décompte des microvaisseaux. Les anticorps anti-endogline [71] montrent une meilleure spécificité pour la vascularisation tumorale en comparaison avec des marqueurs classiques de l'endothélium. D'autres études ont confirmé ce résultat, mais tous les anticorps anti-endogline n'ont pas non plus la même spécificité [73].

Utilisation d'anticorps anti-endogline pour l'imagerie tumorale

Les intérêts de l'imagerie consistent à pouvoir suivre, à travers une méthode non invasive, l'évolution de la maladie et évaluer l'efficacité de médicaments en essais cliniques. La surexpression de l'endogline dans l'endothélium en prolifération et sa localisation à la face luminale des vaisseaux en font une cible idéale pour la détection de tumeurs avec un anticorps. Les premières études ont été réalisées avec des anticorps radiomarqués dirigés contre l'endogline (dans un modèle de tumeur B16 chez la souris [74] et dans un modèle spontané d'adénocarcinome mammaire chez le chien [75]) et ont permis de réaliser une immunoscintigraphie des tumeurs. Ces essais ont montré que l'endogline est une bonne cible pour l'imagerie et qu'elle pourrait être utilisée dans le cadre d'autres maladies angiogéniques.

Thérapies anti-angiogéniques

Utilisation d'anticorps dirigés contre l'endogline

L'endogline est une cible idéale pour l'immunothérapie. Cependant, les anticorps anti-endogline ne réagissent pas avec la vascularisation dans les xénogreffes humaines. L'équipe de Seon a développé des anticorps anti-endogline humaine qui réagissent faiblement avec l'endogline de souris. Ils ont ainsi pu montrer la destruction des tumeurs du sein humain dans la souris SCID avec des anticorps couplés à la ricine [76], ainsi qu'avec des anticorps radiomarqués [77]. Une synergie d'action a été observée entre les anticorps anti-endogline nus et une chimiothérapie classique avec le cyclophosphamide dans des modèles tumoraux chez la souris SCID [78].

Un anticorps bispécifique dirigé contre l'endogline et contre CD3, un récepteur des lymphocytes T, a été utilisé afin de recruter des lymphocytes T cytotoxiques au niveau des cellules endothéliales exprimant l'endogline : cette stratégie s'est avérée efficace pour supprimer les cellules endothéliales tumorales [6].

Le ciblage de cellules endothéliales exprimant l'endogline a été réalisé *in vitro* en couplant un fragment scFv ciblant l'endogline à des liposomes. Ces immunoliposomes chargés avec de la doxorubicine ont montré une cytotoxicité marquée envers les cellules endothéliales *in vitro* [79].

Vaccins

L'équipe de Tan [80] a publié en 2004 des études prometteuses sur l'utilisation de l'endogline pour des vaccins. Le domaine extracellulaire de l'endogline de porc a été utilisé comme vaccin chez la souris, afin de développer une réponse immunitaire contre l'endogline de souris de l'hôte. Les résultats ont montré une immunité anti-tumorale à la fois en tant que vaccin préventif et en tant que molécule thérapeutique, dans plusieurs modèles tumoraux de souris. De manière très intéressante, les anticorps développés réagissaient également avec l'endogline humaine. Ce type de vaccin a ensuite été étudié en association [80] avec un traitement de chimiothérapie, le cisplatine, et un effet synergique de ces deux thérapies a été observé dans plusieurs modèles tumoraux chez la souris.

Thérapie génique

Un vecteur contenant un promoteur de l'endogline humaine a été utilisé avec succès pour une expression ciblée dans les cellules endothéliales humaines *in vitro* [56].

Un adénovirus à réplication conditionnelle (CRAD) a été ciblé avec succès vers les cellules endothéliales en division en utilisant les éléments de régulation de Flk-1 et de l'endogline [81].

Un adénovirus couplé au niveau de la capside à un anticorps bispécifique dirigé contre l'endogline humaine et le domaine adénovirus *fiber knob* a permis de réaliser une transfection ciblée vers les cellules endothéliales en prolifération [82]. L'endogline constitue donc une cible intéressante pour le transfert de gène ciblé dans les cellules endothéliales.

En conclusion, l'endogline constitue une cible intéressante pour le ciblage de la vascularisation tumorale dont la faisabilité a été démontrée. Dans notre étude, nous avons utilisé la technologie de sélection avec des banques de peptides sur phages pour rechercher des ligands peptidiques de l'endogline et de la sélectine E.

1.4. Technologie de sélection avec des banques de peptides sur phages

1.4.1. Introduction

La technique de sélection avec des banques de phages est un outil puissant qui a trouvé des applications dans de nombreux domaines : immunologie [83], biologie cellulaire, recherche de médicaments, pharmacologie [84] et même dans les sciences végétales [85]. Par cette technique, des peptides [86], protéines ou des fragments d'anticorps [87, 88] peuvent être exprimés à la surface de phages.

L'utilisation de banques de peptides sur phages permet de sélectionner des phages se liant à la cible d'intérêt par un motif peptidique particulier (*cf. figure 9*). Plusieurs séries d'incubation avec la cible, lavages, élimination et amplification permettent d'enrichir la population en phages comportant des séquences positives de liaison à la cible. Le séquençage de l'ADN des phages sélectionnés est alors réalisé et les séquences sont analysées.

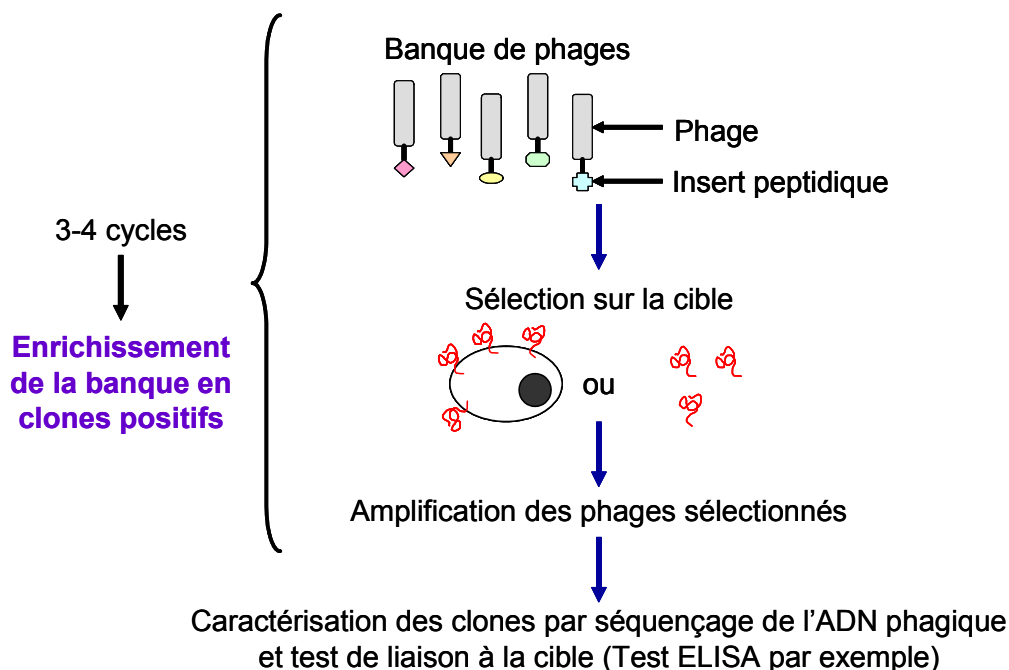


Figure 9 : Principe de la sélection avec une banque de peptides sur phages

L'intérêt de la sélection avec une banque de peptides sur phages par rapport aux autres méthodes de criblage à haut débit, comme le criblage de banques de molécules chimiques, réside essentiellement dans les points suivants : une très grande diversité de motifs peptidiques représentés à la surface des phages, une technologie très flexible, une sélection possible à la fois *in vitro* et *in vivo*.

1.4.2. Applications de la sélection avec des banques de peptides sur phages

La sélection avec des banques de peptides sur phages peut servir pour différentes applications, notamment :

- informations sur le site de liaison entre deux protéines [89] ;
- cartographie des sites de reconnaissance d'anticorps [90-92] ;
- recherche de ligands ciblant un type cellulaire [80, 93, 94] ;
- recherche d'agonistes ou d'antagonistes de molécules [80, 95-97] ;
- inhibiteurs ou modulateurs de l'activité d'enzymes [98, 99].

1.4.3. Les phages utilisés comme vecteurs pour la sélection

Différents types de phages sont utilisés : les phages filamenteux (M13 et leurs dérivés fd et fl), les phages lambda et T7. Les phages filamenteux sont d'excellents vecteurs de clonage par rapport à la taille possible de l'ADN inséré. Cependant, leur propagation fait intervenir un mécanisme non lytique au cours duquel seules les protéines capables de résister à l'export à travers la membrane interne des bactéries peuvent être exprimées. Cet inconvénient n'existe pas dans le cas des phages lambda et T7 pour lesquels l'assemblage de la capside se fait dans le cytoplasme de la bactérie, avant la lyse. Les phages lambda tolèrent l'expression de très grandes protéines à forte densité.

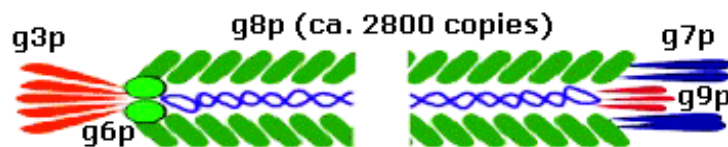


Figure 10 : Représentation des protéines du manteau du phage M13. D'un côté du phage se trouvent 5 copies des protéines g3p et g6p et de l'autre 5 copies des protéines g7p et g9p.

Dans notre étude, les bactériophages filamenteux de *E. Coli* ont été utilisés. Les bactéries mâles possèdent un pilus F par lequel se fait l'infection. Le génome du phage est constitué d'un ADN circulaire simple brin d'environ 6500 nucléotides qui est empaqueté par des protéines de structure en particules de 65Å de diamètre et 1 µm environ de longueur. La structure 3D de certaines protéines du manteau des phages filamenteux a été obtenue par diffraction aux rayons X [100].

Les protéines du manteau g3p et g8p sont les deux protéines essentiellement utilisées dans les banques de peptides sur phages pour l'insertion du motif peptidique (cf. figure 10) :

L'utilisation de la protéine g3p (gène III) permet d'obtenir de 3 à 5 copies par virion qui présentent une bonne stabilité protéolytique. Les peptides sont généralement fusionnés en N-ter.

La protéine g8p (gène VIII), la protéine majeure du manteau, présente environ 2800 copies à la surface du phage. La fusion à cette protéine entraîne des perturbations à la surface du phage en fonction de la longueur et de la nature de l'insert. Les phagémides permettent de contourner ce problème : dans ce système, une co-infection du phage d'intérêt avec un « phage helper » qui fournit les protéines du manteau sauvage est réalisée. Ainsi, dans un même virion se trouvent la protéine de

fusion couplée à une protéine de l'enveloppe et la protéine du phage sauvage. Ce système permet de diminuer le nombre de protéines de fusion et donc le risque de déstabilisation de la structure du phage.

En 2001, de nouveaux variants des protéines du manteau ainsi que des protéines du manteau totalement artificielles [101] ont fait leur apparition. Dans certains systèmes, un codon stop amber peut être ajouté entre les séquences de la protéine du manteau et la protéine aléatoire : on obtient une version soluble de la protéine. Des peptides tags (myc ou his) peuvent également être incorporés pour faciliter la purification et détection des phages sélectionnés.

1.4.4. Nature de la cible

La sélection peut être réalisée sur des cibles de différente nature :

- **protéine** : la protéine cible peut être simplement adsorbée sur le plastique dans des puits ou des tubes. Le problème de l'adsorption passive de la protéine sur le plastique réside dans le fait que les sites intéressants peuvent ne plus être exposés. La protéine peut également être couplée de manière covalente sur des billes acryliques ou magnétiques. D'autres stratégies utilisent des molécules intermédiaires : l'avidine ou la streptavidine sont immobilisées sur le plastique par adsorption non spécifique et la molécule cible biotinylée est fixée sur ces dernières. La protéine peut également être criblée en solution : soit la molécule est marquée par un épitope puis capturée avec un anticorps, soit elle est biotinylée puis capturée avec de la streptavidine.

- **cellules** : la sélection est réalisée sur les cellules exprimant la cible. Les cellules peuvent être adhérentes [102, 103] ou en suspension [104].

- **organe** : la banque de phage est injectée en *iv* dans l'animal étudié. Les organes cibles sont ensuite prélevés et les phages qui s'y trouvent sont amplifiés [40, 105, 106].

1.4.5. Différentes banques de peptides sur phage

1.4.5.1. Taille de la banque

Les banques contiennent généralement des peptides constitués de 5 à 20 acides aminés. La fusion à la protéine g8p limite la taille de la banque à une dizaine de résidus, sauf si le système phagémide est utilisé. La protéine g3p peut supporter de grands inserts peptidiques (supérieurs à dix acides aminés), mais plus l'insert est grand, moins la banque a de chance d'être complète.

Lors de la construction de la banque, les phages sont transformés par électroporation avec les formes répliquatives contenant les différentes combinaisons. Par les techniques classiques, 10^7 à 10^9 transformants sont obtenus. L'obtention de 10^{11} transformants semble être la limite supérieure et dans ce cas, toutes les combinaisons de peptides sont représentées si la taille de l'insert est au maximum de 8 acides aminés ($20^8 = 2,5 \cdot 10^{10}$ peptides possibles).

Malgré ces limites théoriques, des banques de très grande taille de la forme X^{20} ou des formes plus complexes intercalant des acides aminés fixés à l'intérieur ont été utilisées avec succès [107].

1.4.5.2. Forme de la banque

Les banques disponibles sont dites linéaires quand l'insert peptidique est libre à l'extrémité de la protéine du manteau du phage et contraintes lorsque deux résidus cystéine encadrent l'insert peptidique. Les caractéristiques de ces deux formes de banques sont les suivantes :

Les banques linéaires

Les banques linéaires ont été utilisées les premières pour tester le principe de sélection avec une banque de peptides sur phages et pour mettre au point les procédures de sélection. Ces banques contiennent des inserts peptidiques de 6 à 15 acides aminés et sont facilement construites et tolérées par le phage.

Des peptides possédant une affinité pour leur cible de l'ordre du nanomolaire ont été sélectionnés avec succès à partir de banques linéaires [95]. Mais les peptides sélectionnés ont le plus souvent une affinité de l'ordre du micromolaire pour leur cible. Les banques linéaires sont appropriées pour la recherche de substrats de protéases ou d'autres enzymes car les sites actifs des enzymes sont généralement en forme de poche de petite taille, avec peu de contacts entre l'enzyme et le substrat.

Les banques contraintes

L'introduction de deux cystéines de part et d'autre du peptide permet d'avoir une structure secondaire par formation d'un pont disulfure. La cyclisation semble également protéger le peptide de la protéolyse. Les peptides contraints sont considérés comme possédant une meilleure affinité que leurs homologues linéaires. Cependant, les peptides contraints ne sont pas spécialement sélectionnés dans les banques linéaires sensées les contenir. En fait, la représentation de ces peptides contraints dans la banque est extrêmement faible : un peptide de la forme CXYC, où X et Y sont deux acides aminés quelconques, est représenté 1 fois sur $20^4 = 160\,000$ dans une banque linéaire de 4 acides aminés, contre une fois sur $20^2 = 400$ dans la banque contrainte.

L'emplacement optimal des cystéines dans l'insert peptidique n'est pas évident. Il est généralement admis qu'une dizaine d'acides aminés entre les deux résidus cystéine permet un bon repliement spatial du peptide.

1.4.6. Diversité de la banque

La diversité de la banque de départ est très importante : la banque doit être la plus complète possible afin que le motif peptidique recherché ait une chance d'être représenté. Les sources de biais proviennent d'une part de la construction de la banque, d'autre part de son utilisation : par exemple des séquences incompatibles avec la propagation du phage, un avantage de croissance de certains clones, la sensibilité plus ou moins forte à la protéolyse.

Lors de la construction de la banque, les inserts de nucléotides initiaux sont effectivement des séquences aléatoires, mais plusieurs biais vont être générés [108]. Le premier biais se produit lors de l'électroporation : 10^6 à 10^9 transformants sont obtenus, alors que par exemple une banque de 12 acides aminés contient théoriquement $4 \cdot 10^{15}$ séquences différentes. Le deuxième biais provient des étapes biologiques : selon la séquence de l'insert peptidique, sa présence peut apporter un avantage ou un désavantage de croissance au phage.

En conséquence, il se peut que la meilleure séquence possible pour la liaison à la cible ne se trouve pas dans la banque. Mais lors de la sélection, un groupe de séquences proches de la séquence optimale pourra être isolé. Il s'agit généralement d'homologues fonctionnels de la séquence recherchée.

1.4.7. Recherche de ligands par évolution convergente ou directe

L'évolution convergente [109] explique le phénomène de sélection de peptides par affinité pour une cible à partir d'une population initiale très diversifiée. Les peptides isolés peuvent présenter une homologie de séquence avec les ligands naturels de la cible. D'autre part, les séquences peptidiques des phages sélectionnés peuvent servir à identifier des ligands naturels inconnus par alignement sur les banques de séquence des différents organismes.

De courts motifs peptidiques suffisent à mimer les interactions de molécules beaucoup plus grosses et complexes. En effet, souvent, seul un petit nombre de résidus est impliqué dans la liaison. Les résidus consensus entre les différents peptides sélectionnés sont souvent les résidus clés de l'interaction. Ceci est particulièrement vrai pour les banques linéaires.

L'évolution directe consiste à améliorer l'affinité ou la spécificité d'un peptide en créant une variation aléatoire de séquence à partir d'un motif initial. Ainsi, les produits de l'évolution convergente peuvent servir de point de départ pour créer de nouvelles banques avec des variations autour de la séquence sélectionnée [110]. Pour introduire ce type de variations, plusieurs stratégies sont possibles, dont les PCR aléatoires ou l'amplification des phages dans des souches mutagènes de bactéries.

La technologie de sélection avec des banques de peptides sur phages nous a paru intéressante pour notre étude. Nous avons en effet montré l'intérêt de la recherche de peptides pour cibler la vascularisation tumorale. Des ligands peptidiques des deux cibles choisies, la sélectine E et l'endogline, seront donc recherchés par sélection avec des banques de peptides sur phages.

1.5. Stratégies mises en œuvre dans notre étude

L'objectif de cette thèse était de trouver des ligands de deux glycoprotéines membranaires surexprimées à la surface de l'endothélium tumoral, la sélectine E et l'endogline, afin de réaliser un ciblage de la vascularisation tumorale.

Ciblage de la sélectine E et inhibition du développement de métastases

Les molécules recherchées, des mimes du ligand naturel de la sélectine E ou des ligands peptidiques, vont se fixer sur la sélectine E et empêcher l'adhésion des cellules tumorales exprimant le SleX ou le SleA. Les cellules tumorales, entraînées par le flux sanguin ne s'arrêtent pas et leur migration entre les cellules endothéliales est inhibée (cf. figure 11). Cette stratégie permet de contrer le développement de métastases.

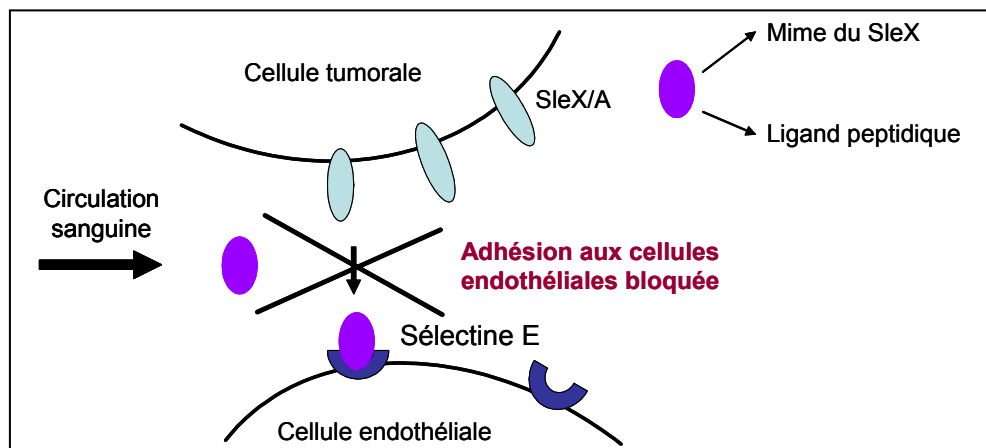


Figure 11 : Inhibition du développement de métastases par le ciblage de la Sélectine E surexprimée au niveau de l'endothélium activé des zones tumorales.

Ciblage de la sélectine E et de l'endogline pour la destruction de la vascularisation tumorale

Les ligands peptidiques de l'endogline et de la sélectine E recherchés par sélection de banques de peptides sur phages ainsi que les mimes du SleX permettront de cibler vers la vascularisation tumorale des molécules cytotoxiques ou des vecteurs de transfert de gène afin de détruire la vascularisation et la tumeur qui en dépendait. Les ligands couplés, par exemple, à une molécule radiomarquée pourront également servir à faire de l'imagerie tumorale (cf. figure 12).

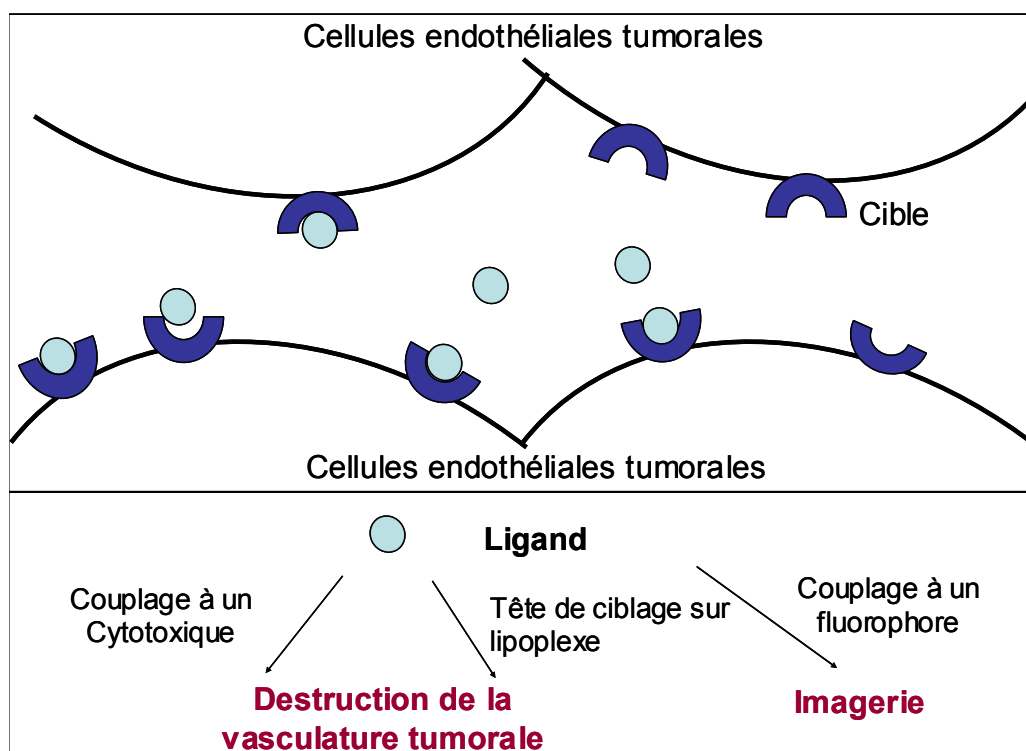


Figure 12 : Utilisations thérapeutiques possibles de ligands ciblant l'endothélium tumoral.

Nous nous intéresserons à la recherche de ligands de la sélectine E dans une première partie (*cf.* 3.1) et à la recherche de ligands de l'endogline dans une deuxième partie (*cf.* 3.2).

2. Matériel et méthodes

2.1. Techniques de biologie moléculaire

2.1.1. Etude de l'ADN

2.1.1.1. Extraction phénol/chloroforme

L'extraction au phénol/chloroforme permet de purifier l'ADN en éliminant les protéines et les solvants organiques. Les protéines sont dénaturées par le phénol et se retrouvent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse.

Pratiquement, on ajoute au volume V de la solution d'ADN le même volume d'une solution de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25 :4 :1). Le mélange est vortexé, puis centrifugé pendant 2 min à 10 000 g. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est récupérée dans un nouveau tube.

2.1.1.2. Précipitation de l'ADN à l'éthanol

L'ADN est précipité à l'éthanol pour pouvoir concentrer l'échantillon, changer de tampon et/ou enlever quelques impuretés. A cet effet, 2,5 V d'éthanol absolu froid et V/10 d'acétate de sodium 3M pH 3,9 sont ajoutés au volume V de solution d'ADN. Après 15 min à -20°C, les tubes sont centrifugés à 10 000 g à 4°C pendant 10 min. Le culot d'ADN est rincé dans de l'éthanol à 70%, puis séché avant d'être repris dans de l'eau.

2.1.1.3. Dosage de l'ADN par mesure UV

Les noyaux aromatiques de la molécule d'ADN absorbent à 260 nm. On estime que la concentration de l'ADN double brin est reliée à l'absorbance mesurée à 260 nm selon la formule suivante :

$$[\text{ADN en } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260\text{nm}} \times 0,05 \times \text{facteur dilution}$$

Le rapport $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ donne une idée de la pureté de l'ADN : un ADN pur a un rapport d'environ 1,8. Un rapport plus faible indique que l'ADN est contaminé par des protéines (les protéines absorbent à 280 nm).

2.1.1.4. Electrophorèse

L'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN selon leur taille. Les gels utilisés pour les plasmides sont à 1% d'agarose (p/v) dans du tampon TBE (Tris Base 50 mM, Acide Borique 50 mM, EDTA 1 mM pH 8,3), *Invitrogen*. Avant d'être déposés, V/3 de tampon de charge (40% saccharose (p/v), 0,1 M EDTA pH 8, 0,1% SDS (p/v) et 0,05% de bleu de bromophénol (p/v)) est ajouté aux échantillons. Le gel est placé dans la cuve à électrophorèse remplie avec du tampon TBE et on applique un champ de 70 à 90 V.

A la fin de la migration, l'ADN est coloré dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du TBE pendant quelques min. L'ADN est alors révélé sur une plaque UV, par fluorescence du Bet intercalé entre les bases d'ADN.

2.1.2. Plasmides

Les plasmides utilisés sont :

- le plasmide *pCR2.1*, *Invitrogen* : il est utilisé pour le clonage transitoire par la méthode du TA cloning. Il possède les gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, ainsi qu'un site de clonage multiple.

- le plasmide *pVAXII* : il provient du plasmide *pVAXI*, *Clontech* dont le promoteur CMV a été remplacé par le promoteur CMV- β pour une expression plus efficace du transgène. Il est utilisé pour une expression transitoire du gène d'intérêt dans des cellules eucaryotes. Il possède le gène de résistance à la kanamycine sous promoteur procaryote.

- le plasmide *pc1* : issu du plasmide *pEGFP C-1*, *Clontech*, par élimination de la partie codant l'EGFP. Il est utilisé pour une transfection stable dans des cellules eucaryotes grâce à la présence du gène de résistance à la Néomycine sous contrôle d'un promoteur eucaryote. Ce plasmide confère également la résistance à la kanamycine.

Les antibiotiques sont utilisés aux conditions classiques : 100 μg / ml pour l'ampicilline et 50 μg / ml pour la kanamycine.

2.1.3. Bactéries compétentes

Les bactéries utilisées sont les bactéries *E. Coli* DH5 α , *Invitrogen*. La préparation des bactéries compétentes se fait en conditions strictement stériles. A partir d'une culture de bactéries réalisée sur la nuit dans 3 ml de milieu LB, une dilution au 100^{ème} est réalisée dans 100 ml de milieu LB dans un flacon de culture de 250 ml. La culture de bactéries est placée sous agitation 250 rpm dans un incubateur à 37°C. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,5, les bactéries sont mises en incubation dans la glace pendant 15 min, puis centrifugées 20 min à 3000 g à 4°C. Le culot de cellules est repris dans 50 ml d'une solution de CaCl_2 à 0,1 M et la suspension de bactéries est laissée sur la glace pendant 20 min. La suspension de bactéries est ensuite centrifugée pendant 20 min à 3000 g à 4°C. Le culot de bactéries est repris dans 1 ml de CaCl_2 à 0,1 M avant de rajouter 325 μl de glycérol. Les bactéries sont ensuite aliquotées par 50 μl dans des tubes stériles et stockées à -80°C.

2.1.4. Extraction d'ARN par la méthode au Trizol

L'ARN étant très sensible à la dégradation par les RNases, les manipulations sont réalisées avec des gants et les pipettes et la paillasse sont nettoyées à l'éthanol et tout le matériel consommable est stérilisé.

L'ARN est extrait à partir de culots de cellules obtenus après 10 min de centrifugation à 600 g, 4°C. Les culots de cellules sont remis en suspension dans 50 μl d'eau stérilisée, avant d'ajouter 750 μl de réactif Trizol (*Life technologies*). Le mélange est mis en incubation pendant 5 min à température ambiante, puis 200 μl de chloroforme sont ajoutés. Après 5 min d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé 15 min à 10 000 g à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube contenant 500 μl d'isopropanol. Après avoir mélangé à la main, on laisse précipiter l'ARN pendant 10 min à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 10 000 g

et à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est rincé avec 500 µl d'éthanol à 75%. Après 5 min de centrifugation à 10 000 g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 30 µl d'eau stérilisée.

L'état de l'ARN est vérifié par migration sur un gel d'agarose à 1% (dépôt de 5 µl de l'échantillon d'ARN et migration pendant 20 min à 90 V). Un ARN non dégradé est présent sous la forme de trois bandes très nettes correspondant aux ARN 5s, 18s et 25s.

2.1.5. RT-PCR

La transcription inverse (RT) est réalisée sur environ 10 µg d'ARN avec 1 µl de l'amorce en 3' à 0,1 µg / µl. Après 10 min d'incubation à 70°C, le tube est immédiatement placé sur la glace et on ajoute 4 µl du tampon "first strand buffer", 2 µl de DTT à 0,1M et 4 µl de dNTP à 2,5 mM, *Invitrogen*. Le mélange est centrifugé 10 secondes à 5000 g avant d'être mis en incubation 2 min à 42°C. 1 µl de l'enzyme Superscript II RT, *Invitrogen* est alors ajouté et le mélange est mis en incubation 1h à 42°C. L'enzyme est inactivée à 70°C pendant 15 min. En général, 2 µl de la RT sont utilisés pour réaliser la PCR.

La polymérase utilisée pour les clonages est l'ampliTaq, *TaKaRa*. Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% et la migration est réalisée à 70V. L'ADN est révélé dans un bain de bromure d'éthidium. Si nécessaire, la bande de PCR correspondant au fragment de la taille recherchée est extraite du gel en utilisant le kit « Agarose Gel DNA Extraction », *Roche*.

2.1.6. Extraction d'ADN

Les préparations d'ADN sont réalisées à partir de cultures de bactéries. Pour obtenir de grandes quantités de plasmides ou des préparations pures pour le séquençage, les kits de mini et midiPreps de *QIAGEN* sont utilisés. Pour des préparations de petites quantités d'ADN en routine, l'extraction d'ADN est réalisée manuellement :

Après une culture sur la nuit d'une colonie dans 3-5 ml de milieu, les cultures sont centrifugées pendant 2 min à 10 000 g. Les culots sont remis en suspension dans 100 µl de tampon 1 (*cf. tableau 5*). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 200 µl de tampon 2 et 3 µl d'une solution de RNase A à 25 mg/ml, *Sigma*, sont ajoutés. On mélange par retournement, et le mélange est mis en incubation pendant 20 min à température ambiante. 150 µl de tampon 3 sont ajoutés, les tubes mélangés par retournement et placés pendant 10 min à 4°C. Après 10 min de centrifugation à 10 000 g à température ambiante, le surnageant contenant l'ADN est récupéré et on réalise une extraction phénol/chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol de l'ADN.

Tampon 1	Glucose 50 mM, TrisHCl 25 mM pH8, EDTA 10 mM pH 8
Tampon 2	NaOH 0,2 M, SDS 1%
Tampon 3	60 ml de potassium acétate 5M, 11,5 ml d'acide acétique glacial et 28 ml d'eau

Tableau 5 : Composition des tampons utilisés pour l'extraction manuelle d'ADN.

2.1.7. Séquençage de l'ADN

Le séquençage est réalisé au niveau de la plateforme de séquençage de l'Institut Cochin, Paris, qui est équipée d'un séquenceur capillaire ABI3100, *Applied Biosystem*. Les séquences obtenues sont analysées à l'aide des logiciels Chromas (version 1.55, *Technelysium*) et Vector NTI suite 7.

2.2. Techniques de biologie cellulaire et de biochimie

2.2.1. Entretien des lignées cellulaires

2.2.1.1. Culture des lignées

Les expérimentations sont menées sur différentes lignées cellulaires, humaines ou de souris, dont les caractéristiques sont reportées dans le tableau 6. Les HUVECs sont cultivées sur un tapis recouvert de gélatine et au besoin, elles sont activées en présence de 5 ng/ml d'interleukine-1- β humaine, *R&D Systems*, diluée dans du milieu de culture.

Espèce	Lignée	Origine	Désignation	Milieu de culture
Humaine	HUVECs	PromoCell C-12200	Lignée primaire de cellules endothéliales	Endothelial Cell Growth Medium, <i>PromoCell</i> avec 2% (v/v) de SVF, de l'hydrocortisone (0,2 μ g/ml), du sulfate de gentamicine (50 μ g/ml), de l'amphotéricine B (50 ng/ml), du rouge de phénol (0,62 ng/ml) et différents facteurs de croissance : de l'épiderme rh (5 ng/ml), de l'endothélium vasculaire (0,5 ng/ml) et des fibroblastes basiques rh (10 ng/ml), <i>PromoCell</i>
	HL-60	ATCC CCL-240	Promyéloblastes	RPMI 1640 avec 10% (v/v) de SVF, 50 U/ml de pénicilline, 50 μ g/ml de streptomycine et de la L-Glutamine (2 mM), <i>GibcoBRL</i>
Souris	B16-F0	ATCC CRL – 6322	Mélanome de la peau	DMEM avec 10% de SVF (v/v), 50 U/ml pénicilline, 50 μ g/ml streptomycine et L-Glutamine (2 mM), <i>GibcoBRL</i>
	NIH/3T3	ATCC CRL-1658	Fibroblastes embryonnaires	DMEM avec 10% de SV (v/v), 50 U/m de pénicilline, 50 μ g/ml de streptomycine et de la L-Glutamine (2 mM), <i>GibcoBRL</i>

Tableau 6 : Lignées cellulaires utilisées. HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells, ATCC : American Type Culture Collection, SVF : Sérum de Veau Foetal, SV : Sérum de veau, U : unité, rh : recombinant humain.

Les milieux et additifs sont maintenus stériles et sont stockés à 4°C. Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture de 75 cm² dans des incubateurs à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules sont réensemencées lorsque le tapis cellulaire a atteint 80% de confluence (tous les 3-4 jours). Les HUVECs sont alors décollées de leur support en utilisant le Detachkit, *PromoCell* et les autres cellules avec une solution de trypsine 0,05% - EDTA 0,53 mM, *GibcoBRL*. Les cellules HL-60 ne sont pas

adhérentes : une fraction de la suspension homogénéisée de cellules est ajoutée dans un flacon contenant du milieu frais.

2.2.1.2. Congélation et décongélation des lignées

Après décollement, les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 600 g, puis remises en suspension dans du milieu de culture complet additionné de 10% de sérum et 10% de DMSO. La concentration est de $1 \text{ à } 4.10^6$ cellules / tube de congélation (dans 1 ml final). La congélation se fait par étape dans un appareil NICOOL LM10 (*CFPO, tour Winterthur*) : 25 min à vitesse 3, puis 10 min à vitesse 10. Les tubes sont alors stockés dans l'azote liquide pour plusieurs années.

La décongélation des cellules doit être rapide : le tube sortant de l'azote liquide est directement placé dans un bain-marie à 37°C, jusqu'à ce que le culot cellulaire se décolle du tube. Le contenu du tube est alors versé dans un flacon de culture contenant 25 ml de milieu complet équilibré à 37°C et 5% CO₂.

2.2.2. Caractérisation des récepteurs membranaires

2.2.2.1. Immunofluorescence

Les cellules sontensemencées 24h avant le test sur des lamelles en verre dans des plaques 12 puits. Le test d'immunofluorescence est réalisé à température ambiante et la solution de blocage utilisé est une solution de PBS, BSA 0,2% (p/v). Les cellules sont fixées dans 1 ml de PFA 3% (p/v) en PBS pendant 20 min. Après 4 lavages avec 1 ml de PBS, les sites non spécifiques sont bloqués avec 1 ml de la solution de blocage pendant 20 min.

L'anticorps primaire Ac1 (*cf. tableau 7*) dirigé contre la cible étudiée est ajouté sur les cellules, pendant 1 h. Après 4 lavages avec 1 ml de la solution de blocage, l'anticorps secondaire Ac2 couplé à un fluorophore et dirigé contre l'Ac1 est ajouté sur les cellules. Après 1 h d'incubation à l'obscurité, les cellules sont lavées 4 fois avec 1 ml de PBS. Les dilutions des anticorps, réalisées dans la solution de blocage, dépendent des anticorps utilisés.

Cible	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
SE humaine	Ac monoclonal de souris anti-SEh, <i>Sigma</i> , utilisé à 2 µg/ml	Ac anti-IgG de souris couplé à FITC, <i>Sigma</i>
SLeX	Ac monoclonal de souris anti-SLeX, <i>Kamiya Biomed Company</i> , utilisé à 1 µg/ml	Ac anti-IgM de souris couplé à FITC, <i>Sigma</i>
EG humaine	Ac de souris anti-CD105h, <i>Abcys</i> , utilisé à 1µg/ml	Ac anti-IgG de souris couplé à FITC, <i>Sigma</i>
EG Souris	Ac de rat anti-CD105s, <i>Abcys</i> , utilisé à 2,5 µg/ml	Ac de chèvre anti-IgG de rat couplé à FITC, <i>Abcys</i> , utilisé à 1µg/ml

Tableau 7 : Les différents anticorps utilisés.

Le noyau des cellules est coloré en présence de 0,1 µg/ml de Dapi, *Sigma*, dilué dans du PBS, pendant 15 min. Les cellules sont lavées 2 fois avec 1 ml de PBS, puis 1 ml d'eau avant de monter les lamelles sur des lames avec du Mowiol. La présence de la cible est révélée par la fluorescence observée au microscope à fluorescence Zeiss Axiophot. Des photos sont prises avec une caméra CCD (*Hamamatsu*) et sont traitées avec le logiciel d'images Samba (*Unilog*). Les témoins classiquement réalisés sont : T1 sans anticorps, T2 où les cellules sont uniquement mises en présence de Ac2.

2.2.2.2. Cytométrie en flux

Après 10 min de centrifugation à 500 g, les cellules HL-60 (au minimum $2,5 \cdot 10^6$ cellules par essai) sont lavées dans 5 ml de milieu RPMI. Après une deuxième centrifugation, le culot de cellules est repris à une concentration de 10^4 cellules/µl dans une solution de PBS, SVF 1%. A 250 µl de cette suspension de cellules est ajouté l'Ac1, un anticorps monoclonal de souris anti-SleX à une concentration finale de 1 µg/ml. Après 1 h à température ambiante sous rotation, les cellules sont lavées 2 fois en centrifugeant 10 min à 500 g et sont remises en suspension dans 5 ml de PBS, SVF 1%. Les culots sont finalement remis en suspension dans 250 µl de PBS, SVF 1%. L'anticorps de chèvre Ac2, anti-IgM de souris conjugué à la fluorescéine (FITC), *Sigma*, est ajouté à une concentration finale de 0,2 µg/ml. Après 1 h sous rotation à température ambiante, les cellules sont lavées 3 fois dans 5 ml de PBS, SVF 1%. Le culot est remis en suspension dans 500 µl de PBS et les cellules sont fixées dans 500 µl de PFA 3% (p/v) dans du PBS, pendant 20 min à l'obscurité. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 1 semaine à 4°C avant d'être analysés au cytomètre de flux FACSCalibur, *BD Biosciences*. On réalise 2 témoins négatifs : T1 où aucun anticorps n'est ajouté et T2 où les cellules sont uniquement mises en présence de Ac2.

2.2.2.3. Westernblot

Préparation des protéines

Les cellules à confluence dans un flacon de culture sont rincées avec 2 ml de PBS, puis récupérées par « grattage » dans 2 ml de PBS. Le mélange homogénéisé avec une pipette est centrifugé pendant 5 min à 2000 g. Le culot cellulaire est repris dans 2 ml de PBS. Les cellules sont lysées avec un potter manuel en verre de 2 ml. Le mélange est repris dans un volume final de 5 ml en PBS, puis centrifugé dans une ultracentrifugeuse pendant 30 min à 32500 rpm à 4°C. Le culot est repris dans 200 µl d'une solution de PBS contenant 1% de Triton X-100. Le mélange est passé au potter manuel, vortexé, puis mis en incubation pendant 1h dans la glace avant d'être centrifugé pendant 15 min à 12000 g et 4°C. Le surnageant contenant les protéines est stocké à -80°C.

Les protéines sont dosées avec le kit BCA Protein Assay, *Pierce*. Une fois le réactif ajouté, la plaque est agitée quelques secondes, puis est mise en incubation pendant 30 min à 37 °C. La plaque est placée dans le spectrofluorimètre Victor² et l'absorbance est mesurée à 570 nm pendant 1s.

Electrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose

Les protéines contenues dans le tampon de charge CM 1X sont déposées dans les puits d'un gel Bis-Tris à 10 % d'acrylamide. La migration est effectuée en tampon MOPS 1X sous une tension de 150 V. Les protéines du gel sont alors transférées pendant 2 heures à 25V sur une membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert suivant : 100ml TGS 10X, 200ml méthanol, 700ml H₂O.

Les protéines restant sur le gel sont détectées par coloration au bleu de Coomassie (0,1% (p/v) bleu de Coomassie R-250 dans une solution contenant 20% de méthanol et 0,5% d'acide acétique) pendant 45 minutes, puis décoloration pendant 2h (solution d'éthanol 30% et acide acétique 5%). Les gels sont ensuite placés dans l'assouplissant pendant 1h (solution d'acide acétique 7%, méthanol 5% et glycérol 1%).

Détection de l'endogline par immunomarquage

La membrane est bloquée pendant 30 minutes sous agitation douce dans 5 ml de tampon de blocage (solution de PBS contenant 0,05% de Tween 20 et 3% de BSA). La membrane est ensuite mise en incubation pendant 1h, sous agitation, avec l'anticorps Acl dirigé contre l'endogline humaine, après dilution au 100^{ème} dans le tampon de blocage. La membrane est lavée une fois rapidement et une fois pendant 15 minutes dans le tampon de blocage (un témoin négatif sans anticorps I est effectué).

La membrane est ensuite mise en incubation avec l'anticorps AclI dirigé contre Acl et biotinylé, après dilution au 200^{ème} dans le tampon de blocage, pendant 1h sous agitation douce. Après un lavage rapide et un lavage de 15 minutes dans le tampon de blocage, la streptavidine peroxydase est ajoutée diluée au 400^{ème} en PBS, pendant 30 minutes. Après deux lavages rapides en PBS et un lavage de 15 minutes dans l'eau, la membrane est révélée avec le substrat DAB, *Sigma* : 2 pastilles dissoutes dans 5 ml d'eau distillée. La membrane est alors rincée avec de l'eau distillée, puis une solution d'EDTA 500mM, et à nouveau avec de l'eau distillée.

2.2.3. Test d'adhésion

2.2.3.1. Adhésion sur la sélectine E recombinante humaine

Le protocole est similaire à celui décrit par De Frees en 1995 [111]. Le test d'adhésion est réalisé à température ambiante. Les puits d'une plaque 96 puits Immulon 2, *Dynatech* sont recouverts avec 50 µl d'une solution de SE recombinante humaine, *R&D Systems*, à 3 µg/ml, dans du tampon DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, *GibcoBRL*). Après 3 h d'incubation, la SE non fixée est éliminée par 3 lavages avec 100 µl d'une solution de DPBS, BSA 1% (p/v), *Sigma*.

Les sites de liaison non spécifiques sont saturés avec 200 µl/puits de la solution précédente pendant 1h. La solution de blocage est enlevée. L'inhibiteur et les cellules sont mis en compétition pendant 15 min en ajoutant dans chaque puits : 40 µl de la solution d'inhibiteurs dilués dans une solution de Hank's (*GibcoBRL*), HEPES 20 mM pH 7,2 - 7,4, D-glucose 0,2% (p/v), BSA 1%, en même temps que 20 µl de milieu RPMI contenant 10⁵ cellules HL-60. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec une solution de Hank's, HEPES 20 mM pH 7,2 - 7,4, D-glucose 0,2% (p/v), CaCl₂ 1 mM, BSA 1% (p/v). Les cellules sont lysées dans 50 µl d'une solution d'acide citrique 20 mM, phosphate de sodium dibasique 51 mM, Nonidet P-40 0,1% (p/v), pendant 5 min sous agitation. 50 µl de substrat constitué d'une solution d'acide citrique 24 mM, phosphate de sodium dibasique 51 mM, phénylène diamine

0,1% (p/v) et peroxyde d'hydrogène 0,03% (v/v), *Sigma*, sont alors ajoutés. La réaction est stoppée au bout d'une heure avec une solution d'acide sulfurique 18 M. L'absorbance est lue à 490 nm sur un spectrofluorimètre BioKinetics reader EL340, *Bio-Tek Instruments*.

Chaque condition est réalisée en triple. Un témoin positif ne contenant pas d'inhibiteur permet de définir la valeur correspondant à 100% de cellules fixées à la SE et un témoin négatif constitué de puits sans cellules non recouverts de SE donne le bruit de fond du substrat.

2.2.3.2. Adhésion sur les HUVECs

Les HUVECs sontensemencées à raison de 10^4 cellules par puits d'une plaque de 96 puits gélatinés stérile. Après 4 h d'activation en présence d'interleukine-1- β (cf. 1.1.1.), les cellules sont lavées délicatement avec 100 μ l de milieu RPMI. 40 μ l de la solution d'inhibiteurs dilués dans la solution de Hank's, *GibcoBRL*, HEPES 20 mM pH 7,2 - 7,4, D-glucose 0,2% (p/v), BSA 1% sont ajoutés dans les puits en même temps que 10^5 cellules HL-60 contenues dans 20 μ l de milieu RPMI. Après 15 min à température ambiante, les puits sont lavés, les cellules lysées et l'absorbance lue à 492 nm, comme détaillé en 1.3.1. Un troisième témoin négatif comportant des HUVECs non activées est réalisé.

2.2.4. Test de transfert de gène

2.2.4.1. Transfection transitoire avec un lipide cationique

Principe

Les liposomes contenant un lipide cationique forment avec l'ADN des complexes appelés lipoplexes. Les complexes obtenus peuvent adopter trois états colloïdaux qui dépendent du rapport de charge +/-, les charges positives étant apportées par le lipide et les charges négatives par l'ADN.

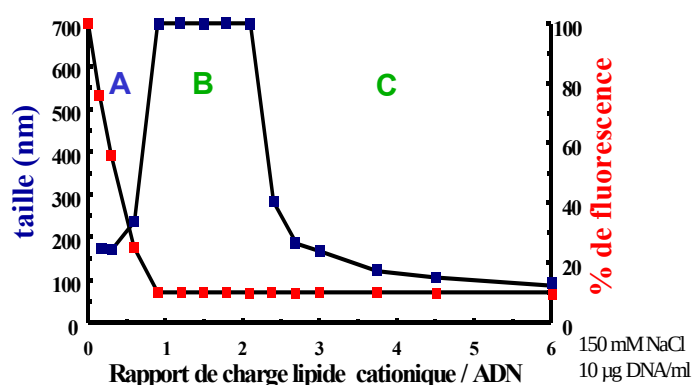
La délimitation des trois zones d'un lipide cationique particulier correspondant à ces trois états et les caractéristiques des lipoplexes sont indiquées en *figure 13*.

En zone A, les complexes, chargés négativement, sont de petite taille du fait de répulsions électrostatiques : l'ADN n'est pas totalement compacté et la charge négative du lipoplexe empêche toute interaction avec la membrane plasmique. Ceci explique leur faible efficacité en transfert de gène.

En zone B, les particules sont globalement neutres et s'agrègent pour former de grosses particules dans lesquelles l'ADN est compacté. Malgré leur efficacité en transfert de gène sur cellules *in vitro*, la taille des particules est trop importante pour une utilisation *in vivo*.

La zone C est la zone la plus favorable au transfert de gènes *in vivo* : les particules, chargées positivement, peuvent interagir avec la membrane plasmique. L'ADN est totalement compacté et leur petite taille autorise leur utilisation en transfert de gène *in vivo*.

a)



b)

Zone	Charge des lipoplexes	Caractéristiques des lipoplexes	Compaction de l'ADN	Efficacité du transfert de gène sur cellules	
				+ sérum	- sérum
A	-	Suspension colloïdale stable	-	-	-
B	Neutre	Particules de grosse taille	+	++	++
C	+	Particules de petite taille	+	-	+ / ++

Figure 13 : Caractérisation des lipoplexes en fonction du rapport de charge lipidique cationique / ADN. a) Taille des lipoplexes (en bleu) et compaction de l'ADN (en rouge) en fonction du rapport de charge lipidique / ADN. b) Caractéristiques des 3 zones. Le lipide cationique couramment utilisé et synthétisé au laboratoire est le RPR 209120.

Le lipide cationique RPR 209120 (cf. structure en figure 14) est généralement utilisé dans un rapport de 6 nmol de lipide / µg d'ADN, ce qui correspond à des lipoplexes de zone C lorsqu'ils sont formés dans une solution de NaCl 150 mM.

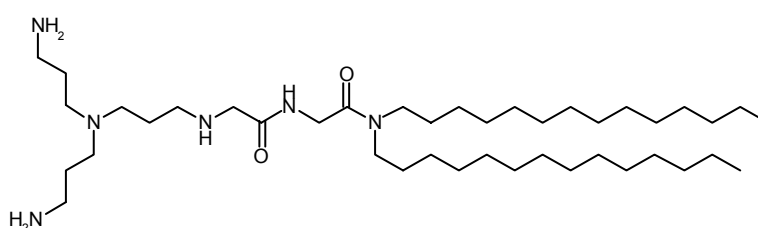


Figure 14 : Formule du lipide cationique RPR 209120. Le lipide cationique RPR 209120 est un lipide globulaire avec une polyamine en tête cationique, un résidu de glycine comme espaceur et une double chaîne carbonée de 14 carbones.

Transfection

Les cellules sontensemencées 24 h avant la transfection dans les puits de plaque 12 ou 24 puits. Au moment de la transfection, les cellules doivent être à environ 75% de confluence.

Les liposomes sont mélangés au plasmide volume à volume, après dilution dans une solution de NaCl 150 mM. On laisse les lipoplexes se former pendant 10 min à température ambiante avant de les diluer au 10^{ème} dans du milieu de culture, avec ou sans sérum. Le mélange est ajouté aux cellules (1 ml par puits) et la plaque est placée dans l'étuve à 37°C et 5% de CO₂. Après 24h ou 48 h de transfection, soit les cellules sont observées en microscopie à fluorescence, soit l'efficacité de transfection est quantifiée par mesure de l'expression du gène rapporteur.

Quantification de l'expression du gène rapporteur luciférase

Après 24h ou 48h, les puits sont lavés 2 fois avec 500 µl de PBS. Les cellules sont lysées dans 200 µl de Cell Culture Lysis Reagent, *Promega*, pendant 15 min. Les puits sont ensuite «grattés» avec une micro-pipette et le lysat récupéré est centrifugé 5 min à 12 000 g.

Pour le dosage de la luciférase, 10 µl de chaque échantillon sont placés dans un puits d'une plaque blanche 96 puits. La plaque est analysée dans un luminomètre à injection automatique (*Victor*², *PerkinElmer*) : 50 µl de substrat (luciférine de scarabée préparée à partir du Luciferase Assay Buffer et du Luciferase Assay Substrate, *Promega*) sont injectés par puits et la luminescence produite par l'oxydation de la luciférine par la luciférase est mesurée pendant 1 seconde après injection.

La quantité de protéines qui reflète la quantité de cellules, est également dosée pour normaliser les résultats. 10 µl de chaque échantillon, ainsi que 10 µl de chaque point d'une gamme de BSA préparée dans du tampon de lyse sont introduits dans les puits d'une plaque transparente 96 puits. 10 µl de iodo-acétamide 0,1 M, Tris-HCl 0,1 mM pH 8,4 sont ajoutés dans les puits pour inactiver le DTT contenu dans le tampon de lyse qui interfère avec le dosage. La plaque est mise en incubation 1 h à 37 °C. Ensuite, un dosage des protéines est effectué avec le kit BCA Protein Assay, *Pierce*. Une fois le réactif ajouté, la plaque est agitée quelques secondes, puis est mise en incubation 30 min à 37 °C. La plaque est placée dans le spectrofluorimètre Victor² et l'absorbance est mesurée à 570 nm pendant 1s.

A partir des valeurs de la gamme, on peut établir une relation linéaire de la forme [protéines en ng /µl]= f (absorbance) et en déduire la concentration en protéines des échantillons. Les résultats de transfection sont exprimés en CPS (coups par seconde)/µg de protéines.

2.2.4.1. Electroporation pour une transfection stable

Electroporation

L'électroporation est réalisée avec le système Gene Pulser II Electroporation System de *Bio-Rad*. Entre 10 et 50 µg de plasmide linéarisé avec l'enzyme *Dralll* sont placés au fond de la cuvette d'électroporation. Un million de cellules contenues dans 800 µl de milieu complet sont ensuite déposées. Après 5 min d'incubation à température ambiante, la cuvette est placée dans l'électroporateur et un champ compris entre 200 et 300 V, d'une capacitance de 950 µF est appliqué. 800 µl de milieu complet sont ajoutés. Des dilutions aux 125^{ème}, 625^{ème}, 1250^{ème} et 2500^{ème} sont réalisées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. Après 24h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, l'antibiotique est ajouté dans le milieu : pour un plasmide possédant un gène de résistance à la néomycine, 2 mg/ml de généticine pour les cellules B16 et 0,3 mg/ml pour les cellules 3T3 sont ajoutés dans le milieu.

Sélection des clones

Quand des clones apparaissent au fond des boîtes de Pétri, 30 à 40 clones isolés sont prélevés et ensemencés dans les puits de plaques 24 puits, en présence d'antibiotique. Lorsque les cellules sont à au moins 50% de confluence, les cellules de chaque clone sont ensemencées dans les puits d'une plaque 24 puits pour le maintien en culture et sur lamelle de verre dans les puits d'une plaque 12 puits afin de les caractériser par immunofluorescence. Les clones exprimant fortement la protéine d'intérêt sont alors ensemencés dans des flasques de 25 cm², puis 75 cm² afin d'être congelés.

2.3. Techniques de sélection avec des banques de peptides sur phages

2.3.1. Matériel

2.3.1.1. Banques de peptides sur phages

Les banques de peptide sur phages utilisés sont Ph.D.-7 et Ph.D.-C7C (Phage Display Peptide Library Kit) commercialisées par *New England Biolabs*. Il s'agit respectivement d'une banque linéaire et une banque contrainte de sept acides aminés reliés par un court espaceur (trois résidus glycine et un résidu sérine) à la protéine pIII du manteau du bactériophage filamenteux M13. La souche bactérienne utilisée pour la propagation du phage est la souche d'*E. Coli* ER2738 qui porte l'épisme F+ nécessaire à l'infection par le phage M13.

Le milieu de culture utilisé pour les bactéries de la souche ER2738 est le milieu LB Broth Base (Lennox L Broth Base), *Invitrogen*. Les bactéries sont étalées sur des boîtes LB Agar (Lennox L Agar), *Invitrogen* avec 20 mg / l de tétracycline pour maintenir le facteur F+. La tétracycline est préparée sous forme d'une solution à 20 mg/ml dans de l'éthanol, puis est stockée à l'obscurité à -20°C. Les boîtes de Pétri utilisées pour étaler les bactéries infectées par les phages sont constituées de LB Agar (Lennox L Agar), *Invitrogen* avec 0,05 g/l d'IPTG, *Invitrogen* et 0,04 g/l de XGal, *Invitrogen* (dissous dans du DMF). Toutes les boîtes de Pétri sont stockées à 4°C.

Le milieu servant à étaler les bactéries infectées par les phages est appelé Agarose Top. Il est constitué de LB Broth Base (Lennox L Broth Base), *Invitrogen*, supplémenté de 5 g / l de NaCl, 1 g / l de MgCl₂.6H₂O et 7 g/l d'agarose. Avant utilisation, le milieu est fondu au bain marie dans un micro-ondes.

Les phages sont précipités dans une solution de PEG-8000 à 20% (p/v) / NaCl 2,5M. Les dilutions des phages sont réalisées dans une solution de TBS : 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl. Après stérilisation, toutes ces solutions sont stockées à température ambiante.

2.3.1.2. Cibles

Protéine recombinante EGh

La protéine recombinante commerciale (référence 1097-EN-25, *R&D Systems*) utilisée correspond à la région extracellulaire de l'endogline humaine (acides aminés 1 à 587) qui a été obtenue par expression de la séquence codante de la région correspondante dans la lignée cellulaire de souris NSO. La protéine EGhr est stockée à -20°C dans une solution de PBS / BSA 0,1% filtrée à une concentration de 10 µg/ml.

Lignées cellulaires

Les cellules primaires HUVECs exprimant l'endogline de manière constitutive ainsi que les lignées stables B16-EGh sont utilisées pour la sélection positive sur cellules. Pour l'expression de la sélectine E, les HUVECs sont activées en présence de 5 ng/ml d'interleukine-1-β, *R&D Systems*, diluée dans du milieu de culture.

Les lignées cellulaires B16 et 3T3 sont utilisées dans certaines expériences pour la sélection négative sur cellules n'exprimant pas la cible.

2.3.2. Méthodes de sélection

Titration des solutions de phages

La souche bactérienne ER2738 est conservée dans du glycérol à -80°C. Les bactéries sont étalées par stries sur une boîte LB-tet avec une anse stérile et stockées pendant 15 jours à 4°C. Les cultures de bactéries sont réalisées à partir de colonies de la boîte.

Une culture de bactéries est réalisée à partir d'une colonie dans 10 ml de milieu LB, à 37°C et sous agitation, jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,5. Pour chaque dilution à titrer, 200 µl de la culture de bactéries sont ajoutés dans des tubes. L'Agarose top est fondu au bain-marie, puis aliquoté par 3ml dans des tubes de culture qui sont placés dans un bain-marie à 45°C.

Des dilutions au 10^{ème} des phages sont réalisées dans du milieu LB. Pour les éluats non amplifiés, des dilutions de 10¹ à 10⁴ sont réalisées et de 10⁸ à 10¹¹ pour la banque de départ ou des phages amplifiés et purifiés. 10 µl de chaque dilution de phages sont ajoutés aux 200 µl de bactéries. Le mélange est vortexé rapidement, puis laissé 1 à 5 min à température ambiante. Les solutions de cellules infectées sont ensuite ajoutées aux 3 ml de Top Agar, les tubes sont vortexés rapidement. Le mélange est immédiatement versé sur des boîtes LB / IPTG / Xgal préchauffées à 37°C et étalé en inclinant la boîte. On laisse refroidir 5 min avant de placer les boîtes à l'envers dans une étuve à 37°C sur la nuit. Le lendemain, le nombre de plages de lyse bleues est dénombré sur chaque boîte et la concentration en ufp (unité formant plage de lyse) est obtenue en multipliant par le facteur de dilution.

Sélection sur cible protéique (selon le protocole de NEB)

La sélection sur protéine est réalisée sur des microplaques Immulon 96 puits. Les puits de la microplaque sont recouverts avec la protéine EGh recombinante diluée dans 100 µl d'une solution de NaHCO_3 0,1M pH 8,6 pendant 16h à 4°C. La concentration en protéine est diminuée au cours de la sélection, de 20 nM à 5 nM, pour améliorer la spécificité.

Les puits sont alors lavés 2 fois avec 200 µl d'une solution de NaHCO_3 0,1M pH 8,6. Les sites de liaison non spécifiques sont bloqués avec une solution de TBS / BSA 1%, pendant 1h à température ambiante. Les puits sont lavés 6 fois avec 200 µl d'une solution TBS / Tween. Les phages sont alors ajoutés dans les puits, à raison de $2 \cdot 10^{11}$ pfu dans 100 µl d'une solution de TBS / Tween. Après incubation à température ambiante avec la cible, les puits sont lavés 6 fois avec 150 µl d'une solution de TBS / Tween pour éliminer les phages non liés. La concentration en Tween et les durées d'incubation varient au cours de la sélection pour augmenter la stringence, respectivement entre 0,1 et 0,5% de Tween et des durées de 2h à 10 min.

Les phages liés à la protéine cible sont élués avec 100 µl d'une solution de glycine-HCl 0,2M pH 2,2 / BSA 0,1% pendant 10 min maximum. La solution est neutralisée en ajoutant 15 µl d'une solution de TrisHCl 1M pH 9,1. L'éluat récupéré est alors dosé et le reste de l'éluat est amplifié en vue des passages suivants.

Sélection sur cellules selon la technique BRASIL

La méthode de sélection BRASIL a été décrite par R.J. Giordano [112]. Cette technique est basée sur une unique étape de séparation des cellules et des phages par centrifugation différentielle à travers une phase organique non-miscible (dibutylphthalate : cyclohexane 9:1 [v:v]). Cette technique est en effet plus rapide et d'après les résultats décrits, elle est également plus sensible et spécifique que les autres techniques existant pour une sélection sur cellules adhérentes. Une série de sélection négative sur les cellules n'exprimant pas la cible, sélection positive sur les cellules cibles et amplification des phages liés fortement est réalisée trois à quatre fois afin d'enrichir la population de phages en séquences positives. Les cellules sont en suspension pendant l'incubation avec les phages.

Les cellules sont décollées dans 2 ml de PBS / EDTA 5 mM stérile, puis centrifugées 10 min à 600 g et 4°C. Elles sont lavées dans 2 ml du milieu DMEM froid supplémenté avec 1 % de BSA et centrifugées à nouveau 10 min. Les cellules sont remises en suspension dans le même milieu à une concentration de 10^7 cellules / ml.

Pour la sélection négative, 100 µl de la suspension de cellules (10^6 cellules) sont mises en incubation avec $2 \cdot 10^{11}$ ufp de phages pendant 2 h dans de la glace. Le mélange cellules / phages est ensuite transféré au-dessus de 200 µl d'un mélange de dibutylphthalate : cyclohexane (9 : 1 [v :v]) dans un tube de 500 µl. Le tout est centrifugé 10 min à 10 000 g. Le surnageant qui contient la fraction de phages non liés aux cellules est transféré dans un autre tube pour la sélection positive.

Lors de la sélection positive, 100 µl de la suspension de cellules (10^6 cellules) sont ajoutés au surnageant de phages et on laisse en incubation pendant 4h sur la glace. La suspension cellules / phages est transférée au-dessus de 200 µl d'un mélange de dibutylphthalate : cyclohexane (9 : 1 [v :v]) dans un tube de 500 µl. Après 10 min de centrifugation à 10 000 g, le tube est congelé dans un mélange éthanol / carboglace et le bas du tube est découpé au cutter afin de récupérer uniquement le culot de cellules avec la fraction de phages liés. Le culot de cellules / phages est repris dans 200 µl de

TBS et est transféré dans un nouveau tube. Il constitue l'éluat avant amplification. L'éluat est titré et amplifié selon le protocole suivant.

Amplification des phages

L'éluat non amplifié est ajouté dans 20 à 50 ml de milieu LB ensemencé avec une dilution au 100^{ème} d'une culture de bactéries sur la nuit. Après 5h d'agitation à 37°C, la culture est centrifugée pendant 10 min à 6000g et 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Après 10 min de centrifugation, 80% de la phase supérieure du surnageant sont récupérés et V/6 de solution de PEG / NaCl sont ajoutés. Après avoir mélangé doucement le tube, les phages sont mis à précipiter sur la nuit à 4°C.

Les tubes sont alors centrifugés 30 min à 6 000 g et 4°C. Le surnageant est éliminé. On centrifuge brièvement à nouveau et on élimine le surnageant. Le précipité blanc de phages est remis en suspension dans 1ml de TBS et transféré dans un tube. Après 5 min de centrifugation à 10 000g à température ambiante, le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Les phages sont précipités pendant 1h à 4°C, après avoir ajouté 1/6ème du volume d'une solution de PEG/NaCl, pendant 1 h sur la glace. Après 10 min de centrifugation à 10 000 g et 4°C, le surnageant est enlevé. On centrifuge brièvement à nouveau et le reste de surnageant est éliminé.

Les phages sont remis en suspension dans 200 µl d'une solution de TBS avec 0,02% de NaN₃. La solution est centrifugée 1 minute et le surnageant, qui constitue l'éluat amplifié, est transféré dans un nouveau tube. L'éluat est stocké à 4°C pendant plusieurs semaines ou à -20°C après avoir ajouté le même volume de glycérol.

Caractérisation des clones sélectionnés

Les plages de lyse utilisées pour préparer l'ADN à séquencer sont prélevées sur des boîtes de Pétri de moins de 18h ayant une centaine de clones. Des tubes de culture sont préparés avec 3 ml d'une dilution au 100^{ème} d'une culture sur la nuit (à partir d'une colonie dans 20 ml de LB-tetracycline). Les plages de lyse bleues sont ensemencées dans les tubes de culture. Après 4-5h à 37°C sous agitation, les cultures sont centrifugées deux fois pendant 5 min à 10 000 g pour éliminer le culot de bactéries. Le surnageant contenant les phages est divisé en deux tubes : la moitié est stockée à 4°C et l'autre moitié est utilisée pour préparer l'ADN à séquencer.

Concernant la préparation de l'ADN du phage, 200 µl de la solution de PEG/NaCl sont ajoutés aux 1,5 ml de surnageant. Le tube est inversé pour mélanger et on laisse précipiter les phages pendant 15 min à température ambiante. Après 5 min de centrifugation à 10 000 g à température ambiante, le surnageant est éliminé. Après avoir centrifugé brièvement, le reste du surnageant est éliminé et le précipité blanc de phages est remis en suspension dans 100 µl de TE auquel sont ajoutés 50 µl d'un mélange phénol/chloroforme. Le mélange est vortexé 20 secondes, puis laissé au repos 15 min à température ambiante. Cette étape est répétée une fois avant de centrifuger le mélange 3 min à 10 000 g. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube. L'ADN est précipité en ajoutant 10 µl d'une solution de NaAc 3M pH 5,5 et 250 µl d'éthanol à 100%. Après 15 min à -20°C, la solution d'ADN est centrifugée pendant 10 min à 10 000 g et 4°C. Le culot d'ADN est lavé avec 1 ml d'éthanol à 70% froid. Le culot sec est remis en suspension dans 50 µl d' H₂O.

La qualité de l'ADN du phage est vérifiée sur gel d'agarose à 1%. Environ 10 µl de la solution d'ADN sont utilisés pour le séquençage. L'amorce utilisée (2 pmol par ADN séquencé) pour le séquençage est la suivante : 5' CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG 3'.

2.3.3. Test d'affinité des peptides sélectionnés

2.3.3.1. Test d'immunofluorescence

Le jour précédent le test d'immunofluorescence, les cellules sont ensemencées sur des lamelles en verre au fond des puits d'une plaque 12 puits à raison de 150 000 cellules / puits gélatiné pour les HUVECs et 100 000 cellules / puits pour les cellules B16 et 3T3.

Concernant le test d'immunofluorescence, les cellules peuvent être fixées avant ou après l'incubation avec les phages.

Fixation des cellules après incubation avec les phages

Les cellules sont mises en incubation dans la glace pendant 15 min afin de limiter l'endocytose des phages pendant le test. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec 500 µl de DMEM froid. Pendant ce temps, les phages sont dilués à la concentration désirée dans 400 µl de DMEM froid additionné de 1% de BSA. Les phages sont alors mis en incubation avec les cellules pendant 2h sur la glace. Les phages non liés sont éliminés par 2 lavages avec 500 µl d'une solution de PBS / BSA 0,2% / Tween 0,1%, puis un lavage avec 500 µl de PBS.

Les cellules sont fixées avec 500 µl d'une solution de PFA 3% dans du PBS, pendant 20 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées avec 2 X 500 µl de PBS. Les sites non spécifiques sont saturés par incubation dans 500 µl d'une solution de PBS / BSA 0,2% pendant 20 min à température ambiante.

L'incubation des cellules avec le phage peut également être réalisée à 37°C pendant 30 min. Pour pouvoir détecter les phages internalisés dans les cellules avec les anticorps, il est alors nécessaire de perméabiliser les cellules avec une solution de PBS / Triton X-100 0,3% pendant 30 min à température ambiante, après la fixation au PFA.

Fixation des cellules avant incubation avec les phages

Les cellules sont lavées 2 fois avec 500 µl de PBS avant d'être fixées avec 500 µl de PFA 3% dans du PBS, pendant 20 min à température ambiante. Après 2 lavages avec 500 µl de PBS, les sites non spécifiques sont saturés avec 500 µl d'une solution de PBS / BSA 1% / Tween 0,2% (v/v). Les cellules sont ensuite mises en incubation avec les phages dilués dans une solution de PBS / BSA 1% / Tween 0,2% (v/v) pendant 30 min à 37°C. Les phages non liés sont éliminés par 2 lavages avec 500 µl d'une solution de PBS / BSA 1% / Tween 0,2% (v/v).

Marquage avec les anticorps

L'anticorps primaire anti-M13 (monoclonal de souris), *Amersham Pharmacia Biotech*, dilué au 500^{ème} dans la solution de PBS / BSA 0,2% est alors ajouté à raison de 400 µl par puits pendant 1h à température ambiante. Après 2 lavages avec 1 ml de solution de PBS / BSA 0,2%, l'anticorps secondaire anti-souris marqué avec RITC est dilué au 200^{ème} dans la solution de PBS / BSA 0,2% avant d'être ajouté dans les puits pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Après 2 lavages avec 1 ml de solution de PBS / BSA 0,2%, les noyaux sont colorés au DAPI par ajout de 1 ml par puits d'une solution à 0,1 µg/ml dans du PBS. Après 30 min à température ambiante et à l'obscurité, les cellules sont lavées 2 fois avec 1 ml de PBS, puis 1 ml d'eau.

Les lamelles sont montées sur des lames avec du Mowiol. Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence Zeiss Axiophot. Des photos sont prises avec une caméra CCD, *Hamamatsu* et sont traitées avec le logiciel d'images Samba.

2.3.3.2. Caractérisation des phages-peptides selon le protocole Brasil

Les phages - peptides sont sélectionnés de manière similaire au protocole de sélection : incubation des cellules avec les phages-peptides pendant 4h à 4°C, suivie d'une centrifugation différentielle à travers la phase organique de dibutylphthalate : cyclohexane et titrage des phages - peptides liés aux cellules.

Les cellules à tester sont décollées avec une solution de PBS / EDTA 5 mM. Après un lavage dans 1 ml du milieu froid contenant 1% de BSA, les cellules sont remises en suspension dans le même milieu à une concentration de 10^7 cellules / ml. Ensuite, $5 \cdot 10^5$ cellules sont mises en incubation avec des quantités croissantes de phages ($5 \cdot 10^7$, $5 \cdot 10^8$ ou $5 \cdot 10^9$ ufp de phages). Le mélange phages / cellules est laissé 4h sur la glace.

100 µl de la suspension cellules / phages sont ensuite déposés au-dessus de 200 µl du mélange dibutylphthalate : cyclohexane (9 : 1 [v :v]) dans un microtube de 500 µl. Après 10 min de centrifugation à 10 000 g, le tube est congelé dans un mélange éthanol / carboglace et le bas du tube est découpé au cutter. Le culot cellules / phages est remis en suspension dans 200 µl de TBS et transféré dans un nouveau tube. La quantité de phages récupérée est dosée.

2.3.3.3. Caractérisation des phages-peptides par test ELISA

Test ELISA sur cellules

Les cellules sontensemencées à 10^4 cellules par puits d'une microplaque 96 puits dans 100 µl de milieu. Le lendemain, après 3 lavages avec 200 µl de PBS, les cellules sont fixées dans 100 µl de PFA pendant 20 min à température ambiante. Après 3 lavages avec 200 µl de PBS, les sites non spécifiques sont bloqués en présence de 200 µl d'une solution de PBS / BSA 1% pendant 30 min à température ambiante. Les puits d'une 2^{ème} plaque dans laquelle seront réalisées les dilutions des phages sont également traités avec cette solution.

Les dilutions des phages sont réalisées dans 200 µl d'une solution de PBS / Tween 0,25% / BSA 1%. Les dilutions sont introduites dans les puits de la 2^{ème} microplaque, après avoir enlevé la solution de

blocage. Avec une pipette multicanaux, les dilutions de phages sont alors transférées dans les puits de la microplaque contenant les cellules, après avoir enlevé la solution de blocage. Après 1h d'incubation à température ambiante, les phages non liés aux cellules sont éliminés par 6 lavages avec 200 µl d'une solution de PBS / BSA 0,2% / Tween 0,05%.

L'anticorps primaire anti-M13 est ajouté dans les puits, dilué au 500^{ème} dans 200 µl d'une solution de PBS / BSA 0,2% / Tween 0,05%. Après 30 min d'incubation à 37°C, 5 lavages avec 200 µl d'une solution de PBS / BSA 0,2% / Tween 0,05% sont effectués. L'anticorps secondaire HRP anti-souris (*Amersham Bioscience*) est ensuite ajouté dans les puits, après une dilution au 2000^{ème}, dans 100 µl de PBS / BSA 0,2% / Tween 0,05%. Après 30 min d'incubation à 37°C et à l'obscurité, 6 lavages avec 200 µl d'une solution de PBS / Tween 0,05% sont effectués. Le substrat TMB (*Sigma*) est alors ajouté à raison de 100 µl de substrat / puits, pendant 20 à 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La réaction de coloration est stoppée avec 50 µl d'une solution de H₂SO₄ 2N par puits. L'absorbance est lue à 450 nm sur un spectrofluorimètre BioKinetics reader EL340, *Bio-Tek Instruments*.

Test ELISA sur protéine recombinante

Le test ELISA sur protéine est similaire : les puits d'une plaque 96 puits Immulon Dynatech sont recouverts avec 50 ng à 150 ng de protéine cible (selon la protéine étudiée) dans 100 µl d'une solution de PBS sur la nuit à 4°C. Les puits sont lavés avec 3 fois 200 µl de PBS / Tween 20 à 0,5 % avant d'être bloqués avec 200 µl d'une solution de PBS contenant 1% de BSA, pendant 2h à température ambiante. Une deuxième plaque où seront réalisées les dilutions de phages est bloquée de la même manière.

Les puits sont ensuite lavés avec 6 X 200 µl d'une solution de PBS / Tween 20 à 0,5 %. Les dilutions des phages sont réalisées dans 200 µl de PBS / Tween 0,5% par puits dans la 2^{ème} plaque. Les dilutions de phages sont alors transférées dans les puits recouverts de la protéine cible avec une pipette multicanaux. Après 1h d'incubation à température ambiante, les puits sont lavés avec 6 X 200 µl d'une solution de PBS / Tween 20 à 0,5%.

L'anticorps anti-M13 couplé à la HRP (*Amersham Biosciences*) est ajouté dans les puits après dilution au 5000^{ème} dans 200 µl d'une solution de PBS contenant 1% de BSA, pendant 1h à température ambiante. Les puits sont alors lavés avec 6 X 200 µl d'une solution de PBS contenant 1% de BSA. Le substrat TMB (*Sigma*) est alors ajouté à raison de 100 µl de substrat / puits, pendant 20 min à température ambiante et à l'obscurité. La réaction de coloration est stoppée avec 50 µl d'une solution de H₂SO₄ 2N par puits. L'absorbance est lue à 450 nm sur un spectrofluorimètre BioKinetics reader EL340, *Bio-Tek Instruments*.

2.4. Techniques de physico-chimie

2.4.1. Formulation des liposomes

Le lipide cationique utilisé dans la formulation des liposomes est le RPR209120 [113]. Selon le schéma classique des lipides cationiques, il comporte une tête cationique liée par un espaceur à la partie hydrophobe constituée de 2 chaînes carbonées. Un co-lipide neutre, la DOPE [114] (1,2-

Dioleoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine, *Avanti*), est ajouté pour formuler le lipide cationique en liposome. Selon les cas peuvent être introduits de la DOPE fluorescente rhodaminée (DOPE - Lissamine Rhodamine B sulfonyl, *Avanti*) pour un marquage du liposome, un groupement PEG (Polyéthylène-glycol) pour un masquage des charges du liposome et / ou un groupement PEG comportant une tête de ciblage. Les lipides PEG et PEG-tête de ciblage sont synthétisés par l'équipe de chimistes du laboratoire.

Les liposomes sont préparés dans des ballons en verre de 10 ml parfaitement propres et secs. La quantité de lipide cationique est calculée de façon à être dans un volume final d'environ 400 µl après hydratation du liposome. Le lipide cationique en poudre est mélangé au volume souhaité d'une solution de DOPE en chloroforme, et selon les cas à de la DOPE fluorescente, un lipide PEG et / ou un lipide PEG avec tête de ciblage. Le chloroforme est évaporé progressivement au moyen d'un évaporateur rotatif *Heidolph VV2011 et WB2001*, réglé à 200 tours/min, en diminuant la pression de 1000 à 5 mbar, puis en laissant tourner environ 30 min à 5 mbar. On aboutit à la formation d'un film lipidique homogène très fin dans le fond du ballon. Ce dernier est séché dans un dessiccateur (environ 14 h) pour éliminer toute trace de chloroforme. Le liposome se forme par réhydratation à température ambiante dans un volume calculé d'eau ppi (minimum 5 h). La taille des liposomes obtenus est mesurée à 90° dans un granulomètre N4+, *Coulter* (mesure pendant 3 min après 1 min d'équilibration). Une sonification du liposome est généralement nécessaire pour atteindre une population homogène entre 80 et 200 nm. Le sonificateur, *modèle G112SP Laboratory Supplies Co.*, est réglé à 115 V, 80 W, 50-60 Hz. Le liposome est conservé à 4°C.

2.4.2. Caractérisation des liposomes

Le liposome ainsi formé est caractérisé en formant des complexes avec le plasmide pXL3031 (*plasmide pCOR [115], construit et produit par Aventis*) à différents rapports de charge lipide cationique / ADN. Le liposome est dilué dans l'eau et l'ADN dans une solution de NaCl 300 mM. L'ADN et le liposome sont mélangés volume à volume.

Après 1h à température ambiante, la taille des complexes ainsi formés est mesurée avec le granulomètre. La compaction de l'ADN est évaluée, après ajout de Bet (concentration finale de 10 µg/ml), par une mesure de la fluorescence à 254 nm après excitation à 260 nm pendant 5 s au fluorimètre Fluoromax-2, *Jobin Yvon-Spex*. Le Bet ne pouvant pas s'intercaler entre les bases de l'ADN compacté, il ne fluoresce plus et une diminution de la fluorescence est observée.

3. Résultats

3.1. Ciblage de la sélectine E

Deux stratégies ont été mises en place pour la recherche de molécules ciblant l'endothélium activé des zones tumorales et inflammatoires.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés au ciblage de la sélectine E (SE). A cet effet, nous avons utilisé une méthode qui a été largement utilisée par les équipes s'intéressant au ciblage de la sélectine E, à savoir la recherche de mimes du ligand naturel, le Sialyl Lewis X (SLeX). Un test d'adhésion permettant de mesurer l'affinité d'une molécule par rapport au ligand naturel pour la liaison à la sélectine E a été mis au point et validé avant de tester différents mimes potentiels.

La deuxième approche a consisté à rechercher des ligands peptidiques de l'endothélium activé en utilisant le modèle des HUVECs activées et la technologie de sélection avec des banques de peptides sur phages.

3.1.1. Recherche de mimes du SLeX

De nombreux tests sont décrits dans la littérature pour tester des mimes du SLeX [116]. Le test d'adhésion choisi est inspiré de celui décrit par DeFrees en 1995 [111]. Ce test met en compétition pour la liaison à la sélectine E les mimes avec le SLeX exprimé à la surface des cellules HL-60. Dans un premier temps, nous avons mis au point et validé le test d'adhésion. Dans un deuxième temps, les différents mimes ont été testés.

3.1.1.1. Mise au point et validation du test d'adhésion sur sélectine E

Mise en évidence de la présence de SLeX à la surface des cellules HL60

Le test d'adhésion repose sur la présence du SLeX, de manière constitutive, à la surface des cellules HL-60. L'analyse des cellules HL-60 au cytomètre de flux après le 10^{ème} et le 30^{ème} passage, a permis de vérifier la présence du SLeX à leur surface (*cf. figure 15*) : un décalage de la fluorescence dans le vert d'environ un facteur 20 a été observé entre l'échantillon de cellules mises en incubation avec les anticorps Ac1 (dirigés contre le SLeX) et 2 (conjugués à FITC et dirigés contre Ac1) et l'échantillon sans anticorps.

D'autre part, le témoin négatif mis en présence uniquement de l'anticorps secondaire a permis de vérifier que celui-ci ne se fixait pas directement à la surface des cellules. Les cellules au 30^{ème} passage ont donné un deuxième pic, de plus faible intensité, qui correspond à une population de cellules non marquées : il est possible qu'au cours du temps, une fraction de la population n'exprime plus le SLeX à leur surface.

En conséquence, des cellules HL-60 qui sont à un nombre de passages inférieur à 30 ont été utilisées pour le test d'adhésion.

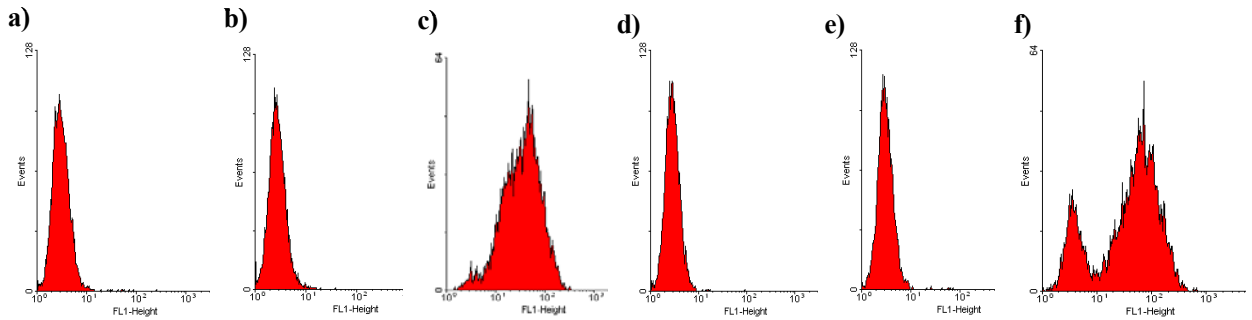


Figure 15 : Mise en évidence de la présence de SleX à la surface des cellules HL-60 par cytométrie en flux. Les cellules ont été mises en présence : **a, d** : aucun anticorps. **b, e** : anticorps Ac2 conjugué à FITC et dirigé contre l'anticorps anti-SleX Ac1. **c, f** : anticorps Ac1 et Ac2. Les cellules ont été analysées au cytomètre de flux FACSCalibur, BD Biosciences. Les graphiques donnent la taille de la population (en ordonnées) sur l'intensité de fluorescence observée dans le vert (en abscisse). **a, b, c**, : cellules HL-60 au 10^{ème} passage. **d, e, f** : cellules HL-60 au 30^{ème} passage.

Mise au point des conditions expérimentales

Le test d'adhésion (*cf. figure 16*) a été mis au point en utilisant de la SE recombinante humaine soluble et le SleX à la surface des cellules HL-60. Les puits d'une plaque 96 puits ont été recouverts avec la SE. Les cellules HL-60 ont été ajoutées dans les puits pendant 15 min à température ambiante. Plusieurs lavages ont permis d'éliminer les cellules non fixées. La myélopéroxydase étant présente en abondance dans les cellules HL-60, l'activité peroxydase a été utilisée pour évaluer la quantité de cellules fixées : après l'étape de lyse des cellules, le substrat de la peroxydase a été ajouté et son activité mesurée par lecture de l'absorbance à 490 nm.

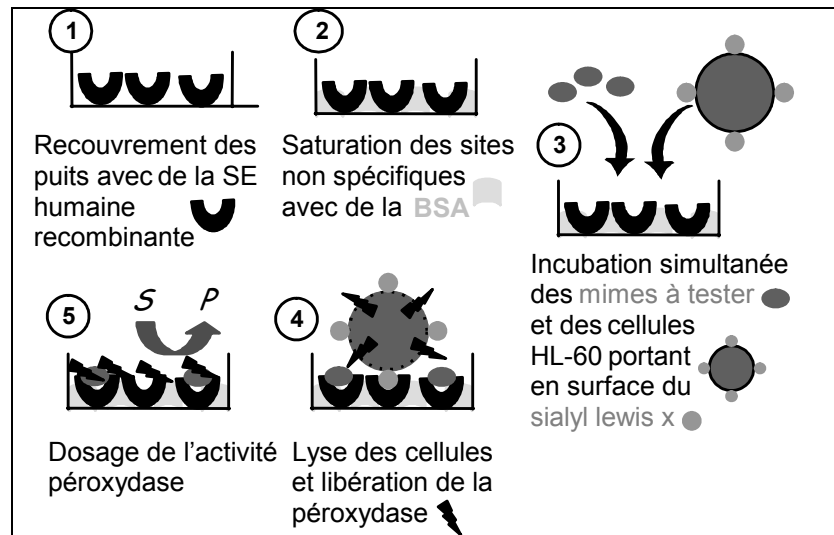


Figure 16 : Description du test d'adhésion permettant de mesurer l'affinité des mimes de SleX pour la SE.

1. Les puits ont été recouverts avec 150 ng de SE recombinante humaine (3h, à température ambiante). **2.** Après plusieurs lavages, les sites non spécifiques ont été saturés avec une solution saline contenant 1% de BSA. **3.** Les mimes à tester ont été mis en compétition avec les cellules HL-60 présentant le SleX en surface (15 min). **4.** Après plusieurs lavages, la lyse des cellules a été réalisée (5 min). **5.** L'activité de la peroxydase a été dosée 1h après ajout d'un substrat de cette enzyme, par lecture de l'absorbance à 490 nm.

Afin de déterminer les conditions pour lesquelles l'absorbance mesurée est optimale, le test a été réalisé à différentes concentrations en SE et en cellules HL-60 (*cf. figure 17*). L'augmentation de la concentration en SE s'est traduite par une forte augmentation de l'absorbance entre 0,75 et 3 µg/ml et plus faible entre 3 et 12 µg/ml. Le signal a augmenté également avec le nombre de cellules HL-60 introduites par puits, avec des variations moins importantes entre $5 \cdot 10^5$ et 10^6 cellules par puits.

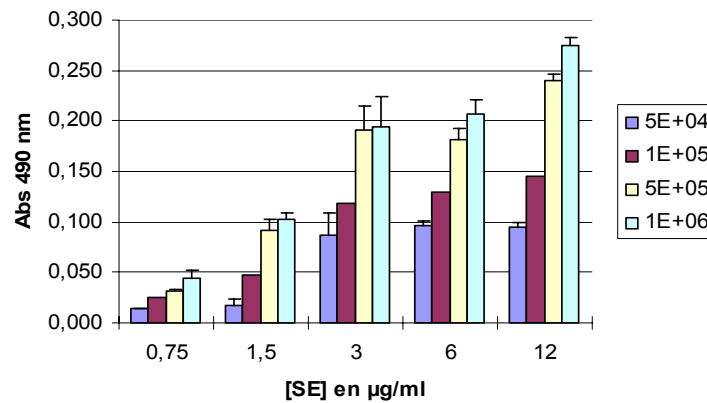


Figure 17 : Influence de la concentration en sélectine E recombinante humaine et du nombre de cellules HL-60 introduites par puits sur le signal obtenu dans le test d'adhésion. La concentration en SE varie de 0,75 à 12 µg/ml et le nombre de cellules HL-60 introduites était compris entre $5 \cdot 10^4$ et 10^6 cellules par puits. Après ajout du substrat, l'activité peroxydase reflétant la quantité de cellules HL-60 fixées à la SE a été évaluée par une mesure de l'absorbance à 490 nm.

Les concentrations en cellules HL-60 et en SE choisies pour le test sont celles qui ont donné un signal important avec le minimum de produit possible. En effet, la SE recombinante humaine est un produit relativement cher et le nombre de cellules introduites par puits est limité par la culture cellulaire. Ainsi, introduire 100 000 cellules par puits implique d'utiliser 9,6 millions de cellules pour remplir une plaque 96 puits. Sur ces considérations, les paramètres du test ont été fixés à 3 µg/ml de SE et 10^5 cellules HL-60 par puits.

Spécificité de la liaison SleX/SE impliquée dans le test d'adhésion

Le modèle utilisé pour tester l'affinité de mimes du SleX pour la SE était valable si la liaison des cellules HL-60 à la SE s'effectue effectivement au niveau du SleX, le ligand naturel de la SE. Le test d'adhésion a été réalisé en ajoutant en même temps que les cellules HL-60 des anticorps dirigés contre le SleX ou contre la SE. La spécificité de ces réactions a été contrôlée par l'utilisation d'un anticorps non spécifique IgG humain (*cf. figure 18*).

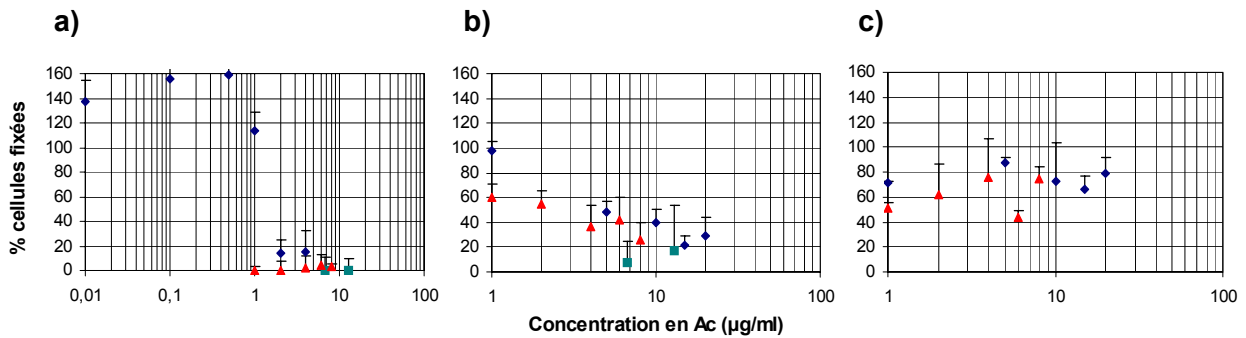


Figure 18 : Effet de la présence d'un anticorps anti-SE (a), anti-SleX (b) ou d'un anticorps non spécifique anti-IgG humain (c) sur l'adhésion des cellules HL-60 à la SE recombinante humaine. Les anticorps ont été ajoutés dans les puits à différentes concentrations, en même temps que les cellules HL-60. Le pourcentage de cellules fixées a été calculé par rapport à l'absorbance mesurée en l'absence d'anticorps. Les résultats de différentes expériences ont été reportés (chaque symbole correspond à une expérience pour laquelle est donnée la moyenne de trois puits). La présence des anticorps anti-SE et anti-SleX en quantité croissante a induit une diminution du pourcentage de cellules HL-60 fixées, alors que l'anticorps anti-humain n'a pas modifié leur fixation, quelque soit sa concentration.

Les anticorps anti-SE et anti-SleX inhibent la fixation des cellules HL-60 : leur nombre a diminué de 50% entre 1 et 2 µg/ml d'Ac anti-SE et entre 2 et 5 µg/ml d'Ac anti-SleX. L'ajout de quantités croissantes d'anticorps non spécifique a donné une fixation erratique des cellules entre 40 et 90%, ce qui traduit une fixation non spécifique de l'anticorps. La nécessité d'ajouter une quantité supérieure d'Ac anti-SleX par rapport à l'Ac anti-SE pour une même inhibition peut s'expliquer d'une part par une affinité des anticorps pour les sucres généralement plus faible que pour les protéines. Ensuite, le nombre de récepteurs de SleX à bloquer sur les cellules HL-60 est certainement supérieur à la quantité de SE recouvrant chaque puits.

D'autre part, la liaison entre la SE et le SleX nécessite la présence de calcium qui se lie au niveau des groupements hydroxyle 2 et 3 du fucose [117]. En ajoutant les cellules HL-60 en présence d'EDTA, un chélateur de calcium, une inhibition de l'interaction, totale aux alentours de 2-3 mM, a effectivement été observée (cf. figure 19).

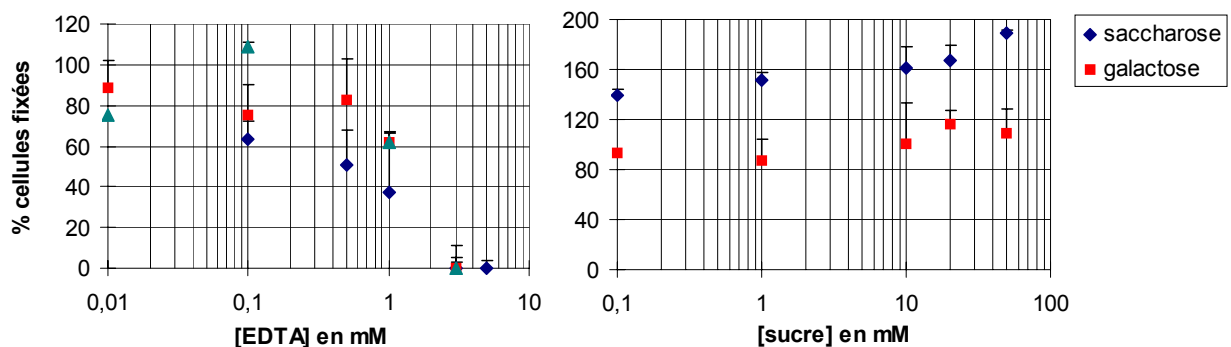


Figure 19 : Effet de la présence d'EDTA et de deux sucres, le saccharose et le galactose, sur la fixation des cellules HL-60 à la SE recombinante humaine. Le pourcentage de cellules fixées par rapport à un témoin dans lequel ont été ajoutées uniquement les cellules HL-60 est donné en fonction de la concentration en EDTA (trois expériences ont été représentées et chaque point correspond à la moyenne de trois puits) ou en sucre (la moyenne et l'écart-type P de trois expériences indépendantes sont données).

Enfin, le SleX commercial, *Sigma* et un analogue, le 3'-N-acétylneuraminyl-3-fucosyl-lactose (référence A-1314, *Sigma*, noté ASleX), ont été testés pour comparer l'IC₅₀ obtenue avec celles figurant dans la littérature. L'IC₅₀ est définie comme la concentration en inhibiteur pour laquelle 50% d'inhibition est observée. Cette valeur de référence permet de comparer l'efficacité des différents mimes entre eux. De manière surprenante, les résultats obtenus avec le SleX, contrairement à son analogue, ont été peu reproductibles, probablement à cause d'un problème de pureté du composé (*données non montrées*). Le ASleX diffère du ligand naturel uniquement par un groupement hydroxyle substitué au groupement N-acétyl en position 5 de la N-acétyl-glucosamine (*cf. figure 20 a*). Or ce groupement n'est pas impliqué dans la liaison à la SE [42].

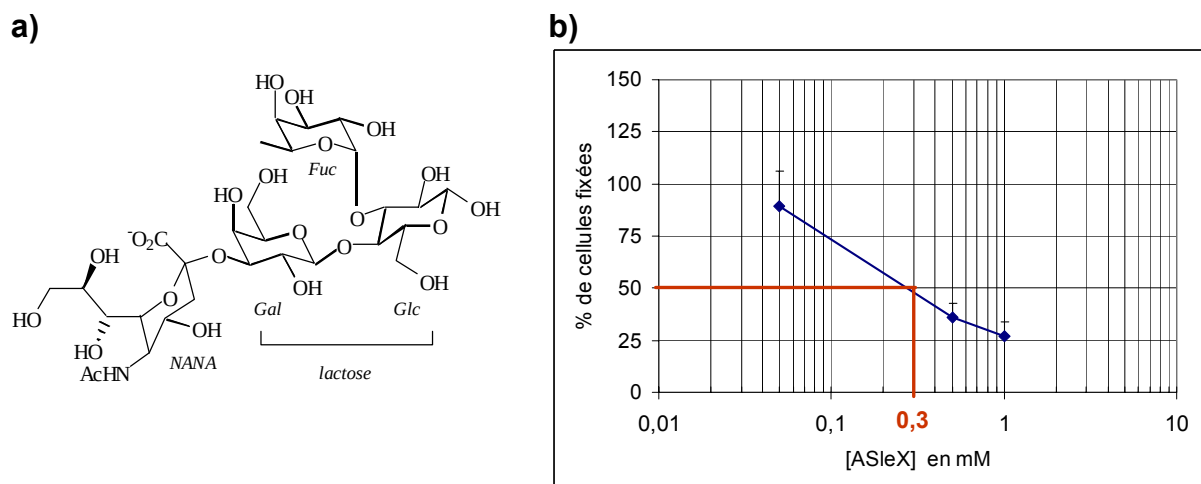


Figure 20 : Analogue du SleX (ASleX) (a) et inhibition de la liaison des HL-60 par le ASleX en test d'adhésion sur la SE recombinante humaine (b). *Fuc* : Fucose, *Glc* : N-acétyl-glucosamine, *Gal* : galactose, *NANA* : acide sialique. La seule différence entre le ASleX et le ligand naturel réside dans le groupement -OH en position 5 de la N-acétyl-glucosamine. Chaque point correspond à la moyenne de trois puits. L'IC₅₀ du ASleX déterminée sur le graphe est de 0,3 mM. Sur l'ensemble des tests réalisés avec ASleX, l'IC₅₀ moyenne est de 0,45 mM ($\pm 0,17$).

L'IC₅₀ moyenne mesurée pour le ASleX a été de 0,45 ($\pm 0,17$) mM (sur n=7 tests indépendants), soit du même ordre de grandeur que le SleX pour lequel l'IC₅₀ figurant dans la littérature est comprise entre 0,5 et 3 mM¹⁷ (*cf. figure 20 b*). Etant donnés ces résultats, l'analogue commercial du SleX a été utilisé comme référence dans le test des inhibiteurs : des mimes possédant une affinité supérieure ou égale à celui-ci ont été recherchés.

Pour vérifier la spécificité du SleX par rapport à d'autres sucres, le saccharose et le galactose (*cf. figure 19*) ont également été testés : aucune inhibition n'a été observée entre 0,1 et 50 mM.

Validation du test d'adhésion dans un contexte cellulaire

Le test d'adhésion est conçu pour sélectionner des mimes du SleX présentant une forte affinité pour la SE et qui serviront ensuite à cibler l'endothélium activé. Le test d'adhésion doit donc être représentatif de la réalité cellulaire : il fallait valider le test d'adhésion avec la SE cellulaire exprimée à la surface des cellules endothéliales activées.

Dans des travaux réalisés préalablement au laboratoire, l'expression de la SE exclusivement à la surface des HUVECs activées a été vérifiée par microscopie de fluorescence (*cf. figure 21*) et cytométrie de flux (*non montré*). Une cinétique d'activation par l'Interleukine-1- β a permis de déterminer la durée optimale d'activation par cette cytokine : environ 80% des HUVECs sont activées au bout de 4 h.

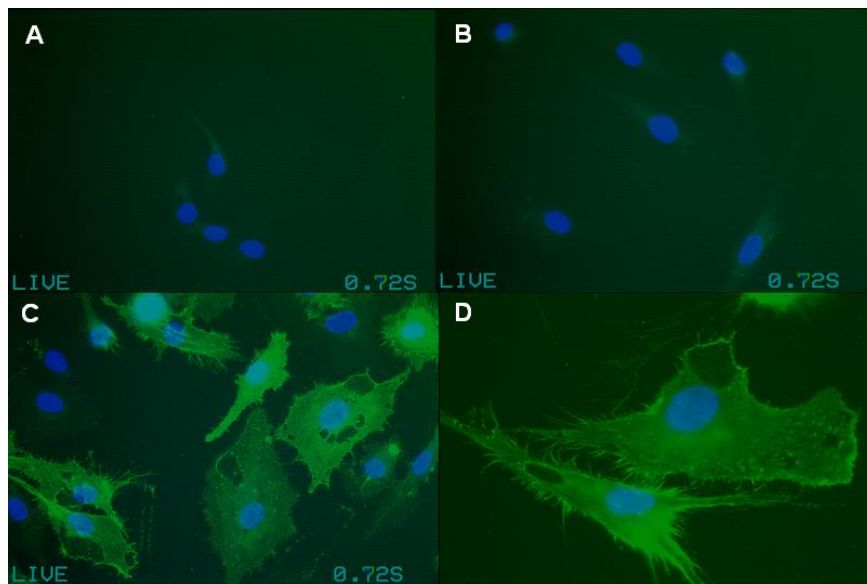


Figure 21 : Expression de la sélectine E à la surface des HUVECs activées par l'interleukine-1- β . A : HUVECs non activées avec Acl et AclI, B : HUVECs activées sans Acl et avec AclI, C et D : HUVECs activées, avec Acl et AclI. En D, cellules observées à un plus fort grossissement.

Le test d'adhésion a été réalisé à divers ensemencements d'HUVECs et avec différentes concentrations de cellules HL-60 (*cf. figure 22*).

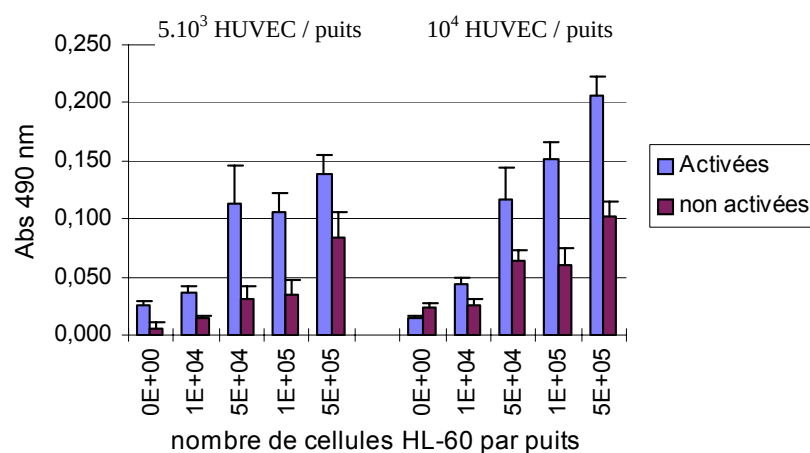


Figure 22 : Influence de l'ensemencement des HUVECs et du nombre de cellules HL-60 introduites par puits sur le signal obtenu dans le test d'adhésion. La SE est exprimée uniquement à la surface des HUVECs activées en présence d'interleukine-1- β (5 ng/ml) pendant 4 h. Après ajout du substrat, l'absorbance à 490 nm donne une mesure de l'activité peroxydase qui reflète le nombre de cellules HL-60 fixées à la SE exprimée par les HUVECs.

Chaque condition a été réalisée sur des HUVECs après ou sans activation. Un ensemencement de 10^4 HUVECs par puits a suffi à obtenir des cellules à confluence au moment du test. Le témoin négatif sans cellules HL-60 a donné le bruit de fond provenant des HUVECs. A 10^4 cellules HL-60 par puits, le signal était de l'ordre du bruit de fond. L'absorbance mesurée sur les cellules activées était nettement plus élevée à partir de $5 \cdot 10^4$ cellules HL-60 par puits. On a remarqué également une augmentation de l'absorbance pour les HUVECs non activées, mais celle-ci restait inférieure à celle obtenue avec les HUVECs activées et traduisait une augmentation de la fixation non spécifique des cellules HL-60 introduites en quantité croissante. Il n'y avait pas une nette différence du signal entre les deux ensemencements d'HUVECs, mais les écarts entre cellules activées et non activées étaient plus marqués avec 10^4 HUVECs par puits.

Les conditions optimales de ce test d'adhésion sur SE cellulaire ont ainsi été fixées à un ensemencement de 10^4 HUVECs et l'introduction de 10^5 cellules HL-60 par puits. Cette quantité de cellules HL-60 donne en effet des résultats intermédiaires et permet de se placer dans les mêmes conditions que le test sur SE recombinante humaine soluble.

Il reste à valider l'inhibition par le ASleX de la fixation des cellules HL-60 sur la sélectine E cellulaire : la spécificité de la liaison entre le SleX et la sélectine E doit se traduire par une absence d'inhibition sur les HUVECs non activées. Enfin, l'IC₅₀ obtenue doit être du même ordre de grandeur que pour le test précédent.

3.1.1.2. Etude de l'affinité pour la sélectine E des mimes de Wong, de dérivés du fucose, du mannose et de l'acide quinique

Différentes familles de mimes ont été synthétisées par l'équipe de chimistes du laboratoire ou d'autres laboratoires avec lesquels nous collaborons, afin de déterminer leur affinité pour la sélectine E avec le test d'adhésion sur SE recombinante. Les mimes ont généralement été conçus de façon à conserver dans une conformation adéquate les groupements du SleX impliqués dans la liaison à la sélectine E (cf. figure 23) : les hydroxyles 2, 3 et 4 du fucose (en bleu), les hydroxyles 4 et 6 du galactose (en vert) et le groupement carboxyle de l'acide sialique (en rouge) [118].

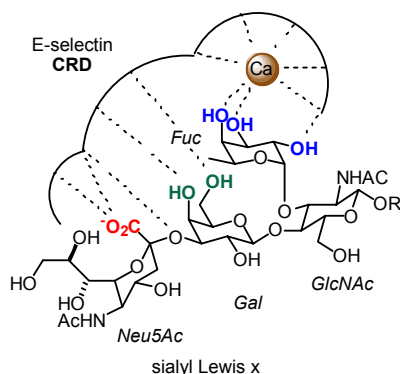


Figure 23 : Groupements du SleX impliqués dans la liaison à la sélectine E. *Fuc* : Fucose, *GlcNac* : N-acétylglucosamine, *Gal* : Galactose, *Neu5Ac* : acide N-acétylneuraminique ou acide sialique, CRD : *domaine de reconnaissance des sucres* (Carbohydrate Recognition Domain).

Mimes de Wong

Les mimes Wong2, Wong2~ et Wong1 supplémenté d'une chaîne carbonée à 16 carbones à la place de l'hydroxyle en position 6 du mannose ont été initialement décrits par l'équipe de Wong avec une excellente IC₅₀ (inférieure à 110 µM) en test d'adhésion [119]. Les mimes de cette famille sont basés sur le motif suivant : une queue peptidique liée à un mannose (*cf. figure 24*). Le mannose remplace le résidu fucose et permet de conserver les trois groupements hydroxyles importants dans l'orientation adéquate. La N-acétylglucosamine qui ne comporte aucun groupement essentiel pour la liaison est déléguée. Pour Wong2, l'acide sialique est réduit à l'essentiel, le groupement carboxyle, et le galactose est remplacé par un groupement carboxyle, dans l'optique d'une liaison avec les résidus lysine 111 et 113 de la SE. Wong1 comporte un acide benzoïque à la place de l'acide sialique.

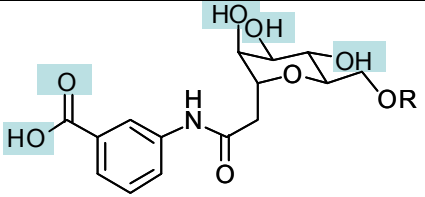
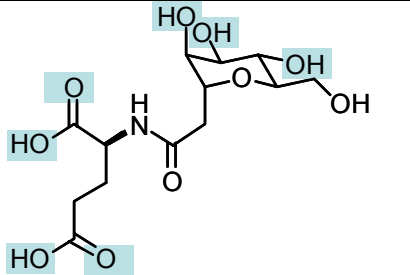
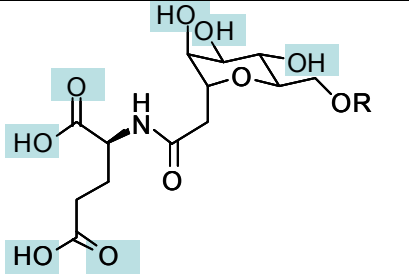
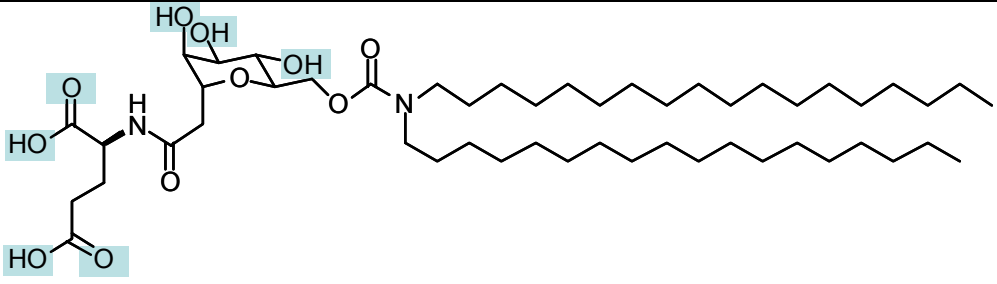
 Wong1 L : Absence de données E : 22 (±2) mM (R : H)	 Wong2 L : 0,100 mM E : 25 mM	 Wong2~ L : 0,04 mM (R : C₁₆H₃₃) E : 0,5 mM (R : C₁₆H₃₃)
 Wong2b L : Absence de données E : Absence d'inhibition		

Figure 24 : Mimes de Wong. Ces composés ont été synthétisés par les chimistes. L'IC₅₀ donnée dans la littérature (L) [119] et l'IC₅₀ expérimentale (E) figurent sous chaque formule.

Nous avons évalué l'affinité de Wong1 et Wong2 en test d'adhésion : l'IC₅₀ obtenue pour Wong2 était largement supérieure à celle annoncée par Wong (un facteur 200) et Wong1 a donné une IC₅₀ du même ordre de grandeur que Wong2.

D'après les résultats de Wong, l'ajout d'une chaîne carbonée permet d'améliorer l'affinité de Wong2 pour la SE, en passant d'une IC₅₀ de 100 µM à 40 µM. L'amélioration de l'affinité serait liée à une interaction entre la chaîne carbonée et le domaine hydrophobe de la SE [120]. Cependant, pour Wong1, on ne dispose que de l'IC₅₀ du composé avec la chaîne carbonée (74 µM), ce qui ne permet pas de vérifier le résultat. En espérant améliorer l'affinité de Wong2 de la même façon que Wong, son analogue Wong2~ supplémenté d'une chaîne carbonée a été synthétisé par les chimistes. L'IC₅₀

obtenue, de 0,5 mM, est 50 fois inférieure à celle de Wong2. Elle reste supérieure à celle obtenue par Wong, mais permet d'envisager l'utilisation de Wong2~ comme tête de ciblage.

Il était cependant étonnant que dès une concentration de 1 mM, l'inhibition soit totale (*données non montrées*). Il fallait vérifier que l'inhibition observée résultait de la fixation préférentielle de Wong2~ sur la SE et non d'une lyse des cellules : la longue chaîne carbonée de Wong2~ pouvait lui conférer un rôle de détergent. Les cellules HL-60 ont été mises en présence du mime Wong2~ dans les mêmes conditions que lors du test d'adhésion, mais en suspension et en l'absence de SE. Après l'étape de lyse des cellules, le substrat a été ajouté et l'activité peroxydase correspondant à des cellules intactes après incubation avec Wong2~ a été mesurée. L'absorbance obtenue a été comparée à un témoin négatif où les cellules étaient uniquement en présence de tampon. Le témoin positif a consisté en l'utilisation du n-octylglucoside, un détergent (CMC de 14,5 à 25 mM). En présence de Wong2~ et du détergent en concentrations croissantes, le nombre de cellules intactes après incubation a diminué : 20% de cellules étaient intactes avec une solution de Wong2~ à 1 mM ou d'octylglucoside à 100 mM. Ainsi, Wong2~ n'inhibait pas la fixation des cellules, mais était responsable de leur lyse.

Le mime Wong2b a alors été conçu au sein de l'unité afin d'être formulé en liposome ou en micelle et permettre ainsi de présenter de nombreux mimes de SleX en surface des complexes pour cibler la sélectine E. En effet, l'affinité des mimes est généralement augmentée dans les stratégies de multivalence où la présentation de multimères de mimes permet d'augmenter considérablement l'affinité par rapport au mime utilisé sous forme de monomère [121-123]. Le mime Wong2b provient de Wong2 sur lequel deux chaînes carbonées à 18 carbones sont greffées en position 6 du mannose. Wong2b a été testé à la fois en micelle dans une solution saline et en liposome, selon la formulation suivante : EPC 5 mM / cholestérol 2 mM / Wong2b 0,7 mM. Le liposome témoin correspondant, sans Wong2b, a également été testé. Cependant, aucune de ces formulations n'a permis d'inhiber la fixation des cellules HL-60. En conclusion, aucun des mimes de la famille de Wong testés n'a présenté une affinité intéressante pour le ciblage de la SE.

Mimes dérivés du fucose et du mannose

Ces mimes (*cf. figure 25*) ont été synthétisés par Elsa Dechaux et Michel Azoulay de l'UMR 176 (CNRS / Institut Curie). Le fucose est conservé pour DE-1 et DE-2. Il est remplacé par un mannose pour AM-3 et AM-4, comme pour les mimes de Wong. Les mimes dérivés du mannose présentent deux groupements carboxyles à différentes longueurs, dans l'optique d'une liaison à l'arginine 97 de la SE comme dans la structure du SleX. Dans les mimes dérivés du fucose, l'acide carboxylique est remplacé par un groupe chargé négativement (OSO_3^-) et DE-1 a un groupement hydroxyle supplémentaire en position 2 du galactose qui pourrait se lier à la tyrosine 94 de la SE.

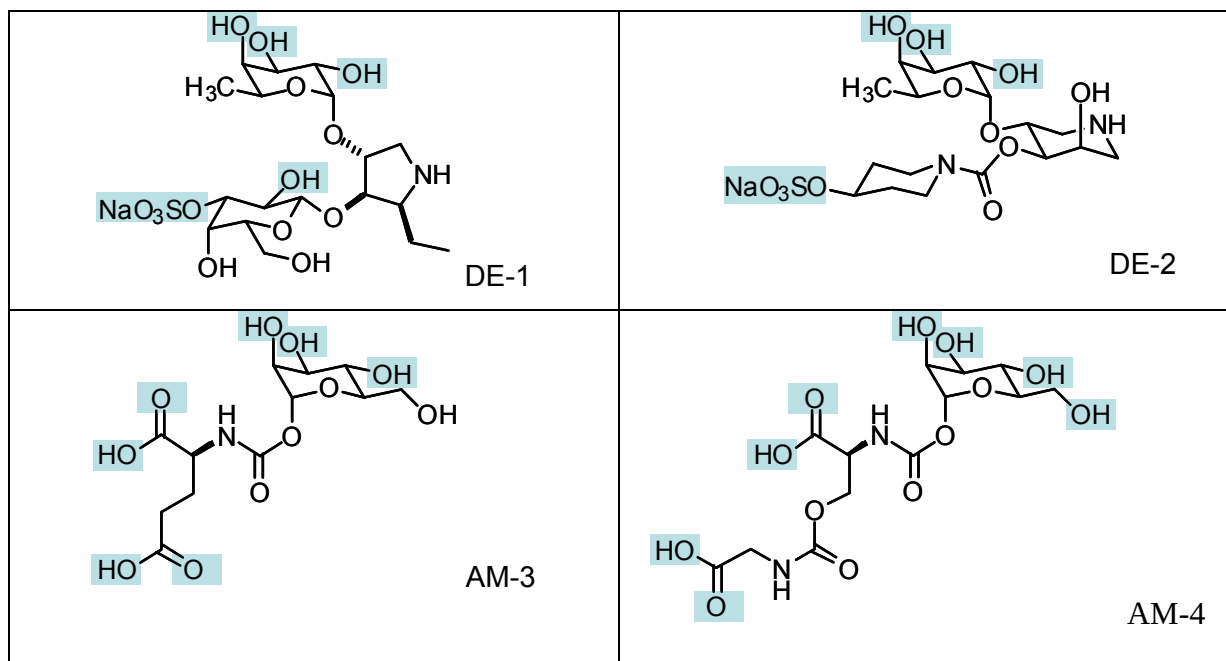


Figure 25 : Mimes dérivés du fucose (DE-1 et DE-2) et du mannose (AM-3 et AM-4). Ces mimes ont été synthétisés par Elsa Dechaux et Michel Azoulay de l'UMR 176. Ils ont été testés jusqu'à une concentration de 50 mM.

Les mimes ont été testés en adhésion sur sélectine E recombinante : l'IC-50 n'était pas atteinte pour les mimes dérivés du fucose et AM-3, même à une concentration en mime de 50 mM. Le mime AM-4 a donné une IC-50 de 10 mM, ce qui traduit une affinité relativement faible pour envisager un ciblage efficace de la sélectine E.

Mimes dérivés de l'acide quinique

Les dérivés des sucres ne constituent pas des candidats idéaux pour les médicaments. En effet, ils sont sensibles à l'hydrolyse et leur bio-disponibilité n'est pas optimale. En restant dans l'optique de la recherche de petites molécules, de nouveaux mimes, non glycosylés, ont été élaborés et ces structures plus simples ont donné des résultats aussi efficaces que les composés glycosylés [124]. Christian Girard, Jennifer Doulat et Stefanie Leue de l'équipe des chimistes ont ainsi synthétisé une famille de mimes dérivés de l'acide quinique (*cf. figure 26*). En effet, l'acide quinique possède trois groupements hydroxyles dans la même conformation que ceux du fucose dans la forme active du SleX. En greffant différents acides aminés ou d'autres groupes possédant un acide carboxylique en bout de chaîne, on cherche à mimer le groupement carboxyle de l'acide sialique.

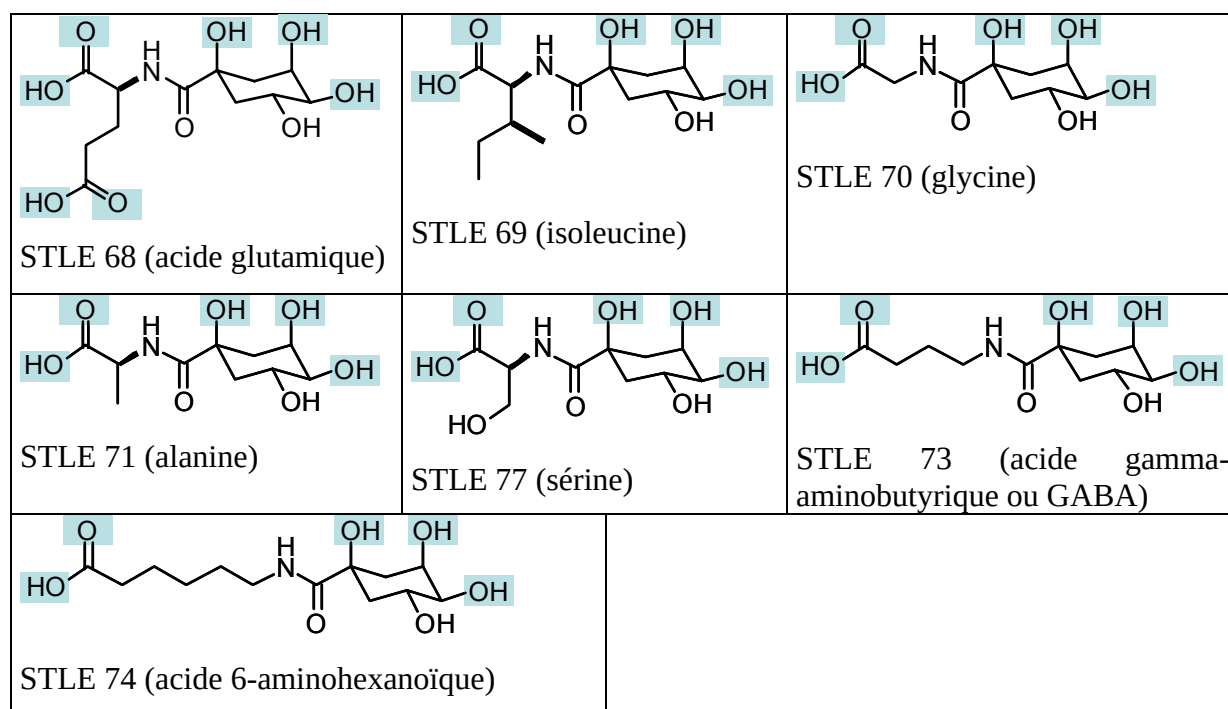


Figure 26 : Mimes dérivés de l'acide quinique. Ces mimes ont été synthétisés par Christian Girard, Jennifer Dourlat et Stefanie Leue. Entre parenthèses figure la nature de l'acide aminé ou autre acide greffé à l'acide quinique.

Mime	Inhibition à 50 mM (en %)	IC50 de l'inhibition
68	43 (±2)	> 50 mM
69	44 (±2)	> 50 mM
70	38 (±2)	> 50 mM
71	30 (±2)	> 50 mM
77	46 (±1)	> 50 mM
73	40 (±8)	> 50 mM
74	31 (±2)	> 50 mM

Tableau 8 : Inhibition à 50 mM et IC50 obtenue avec les mimes dérivés de l'acide quinique contre les cellules HL-60. L'acide quinique seul n'a pas montré d'inhibition jusqu'à des concentrations de 100 mM.

L'absence d'inhibition et d'effet lytique de l'acide quinique seul a été vérifiée au préalable. Les mimes ont alors été testés : leur affinité pour la sélectine E était modérée (*cf. tableau 8*). Les mimes étaient cependant capables d'empêcher la fixation du SLeX sur la sélectine E, alors que l'acide quinique seul n'avait pas d'effet. Même si ces composés ne sont pas exploitables pour du ciblage cellulaire, ces résultats valident la stratégie de mime et l'intérêt de la chaîne latérale. D'autres mimes basés sur ce modèle seront élaborés, car ces mimes peptidiques présentent l'énorme avantage d'une chimie beaucoup plus simple que celle des sucres.

3.1.2. Recherche de ligands peptidiques de l'endothélium activé

En restant dans l'optique de trouver des ligands de petite taille et non glycosylés pour cibler la sélectine E, la technique de sélection avec une banque de peptides sur phages a été utilisée afin de trouver des ligands peptidiques de l'endothélium activé. Le modèle cellulaire des HUVECs activées par l'interleukine 1- β , qui expriment fortement la sélectine E, a été utilisé pour la sélection positive et les HUVECs non activées pour la sélection négative.

3.1.2.1. Sélection avec la banque linéaire de 7 acides aminés, NEB

Descriptif des banques utilisées dans notre étude

La technologie de sélection avec des banques de phages n'avait jamais été utilisée au laboratoire. Nous avons alors préféré partir d'une banque de phages commerciale déjà caractérisée, plutôt que de construire une banque.

La banque de peptides sur phages linéaire de sept acides aminés et la banque contrainte de même longueur, *NEB*, ont été utilisées. Dans la banque contrainte, le peptide peut adopter une structure secondaire par la formation d'un pont disulfure au niveau des deux résidus cystéines qui l'encadrent (*cf. figure 27*).

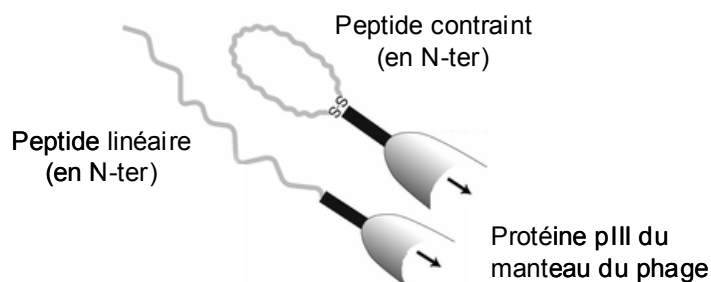


Figure 27 : Peptide linéaire ou contraint en position N-ter de la protéine pIII du manteau du phage. Dans la banque contrainte, le peptide aléatoire de 7 acides aminés est entouré de deux résidus cystéine qui permettent la formation d'un pont disulfure. Ceci permet au peptide d'adopter une structure secondaire en comparaison du peptide linéaire.

Principe de la sélection BRASIL

La méthode BRASIL [104] utilisée pour la sélection sur cellules est caractérisée par les points suivants :

- l'incubation des phages et des cellules est réalisée en suspension, ce qui permet d'utiliser des microtubes « low-binding » pour limiter la sélection de phages se liant au plastique ;
- la séparation des phages liés aux cellules est effectuée par une unique étape de centrifugation différentielle à travers une phase organique (*cf. figure 28*). Cette technique est décrite comme plus

efficace que les méthodes classiques de lavages et plus spécifique que les méthodes d'élution dans une solution de glycine à pH acide.

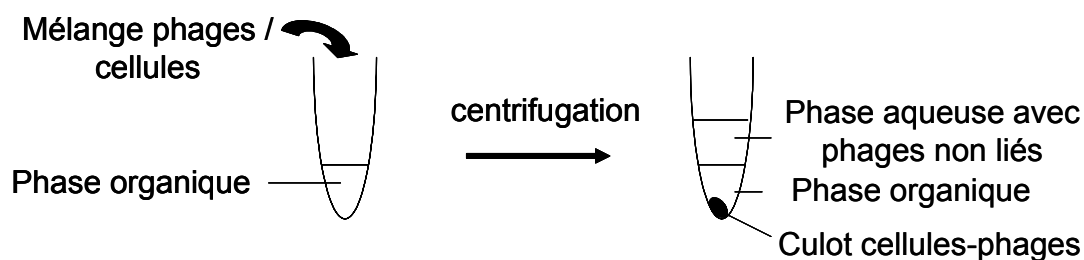


Figure 28 : Principe de la séparation des phages liés aux cellules des phages non liés par centrifugation à travers une phase organique de dibutylphthalate : cyclohexane 9 :1 (V : V). Les phages liés aux cellules forment un culot au fond du tube, dans la phase organique. Les phages non liés restent dans la phase aqueuse supérieure. Lors de la sélection négative, la phase supérieure est prélevée pour être mise en incubation avec les cellules cibles. Lors de la sélection positive, le tube est congelé dans un mélange de carboglace – éthanol et le bas du tube est coupé au cutter. Le culot de cellules est alors repris dans le tampon TBS.

Sélection sur HUVECs activées contre les HUVECs non activées

La banque commerciale linéaire de 7 acides aminés a été utilisée selon le protocole de sélection BRASIL [104]. Le plan de la sélection figure au tableau 9. Quatre passages ont été réalisés, avec à chaque fois une sélection négative sur cellules non activées suivi d'une sélection positive sur cellules activées. Le nombre de phages utilisés pour chaque passage était de 10^9 ufp au lieu de $2 \cdot 10^{11}$ ufp habituellement, car les HUVECs sont altérées en présence d'une quantité trop importante de phages [125].

Passage	Passage des HUVECs	Phages liés (en ufp)	Phages liés / phages total
1 ^{er}	p 4	$6 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-6}$
2 ^{ème}	p 3	$8 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^{-5}$
3 ^{ème}	p 4	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-3}$
4 ^{ème}	p 7	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-4}$

Tableau 9 : Plan de la sélection sur HUVECs activées par l'interleukine 1- β contre les HUVECS non activées, avec la banque linéaire de 7 acides aminés, NEB, selon le protocole BRASIL. A chaque passage, 10^9 ufp de phages ont été utilisés.

Une sélection efficace se traduit généralement par une augmentation de la quantité de phages liés à la cible au cours des passages, et donc, si la quantité de phages utilisée pour la sélection (phages total) est constante, par une augmentation du rapport phages liés / phages total.

D'après les résultats du tableau 10 a), le rapport phages liés / phages total a augmenté jusqu'au 3^{ème} passage, puis diminué au 4^{ème} passage. En conséquence, l'ADN de clones issus du 3^{ème} passage a été séquencé. Les séquences peptidiques obtenues figurent dans le tableau 10 b). Le peptide SNLRTHP est apparu 6 fois sur 20.

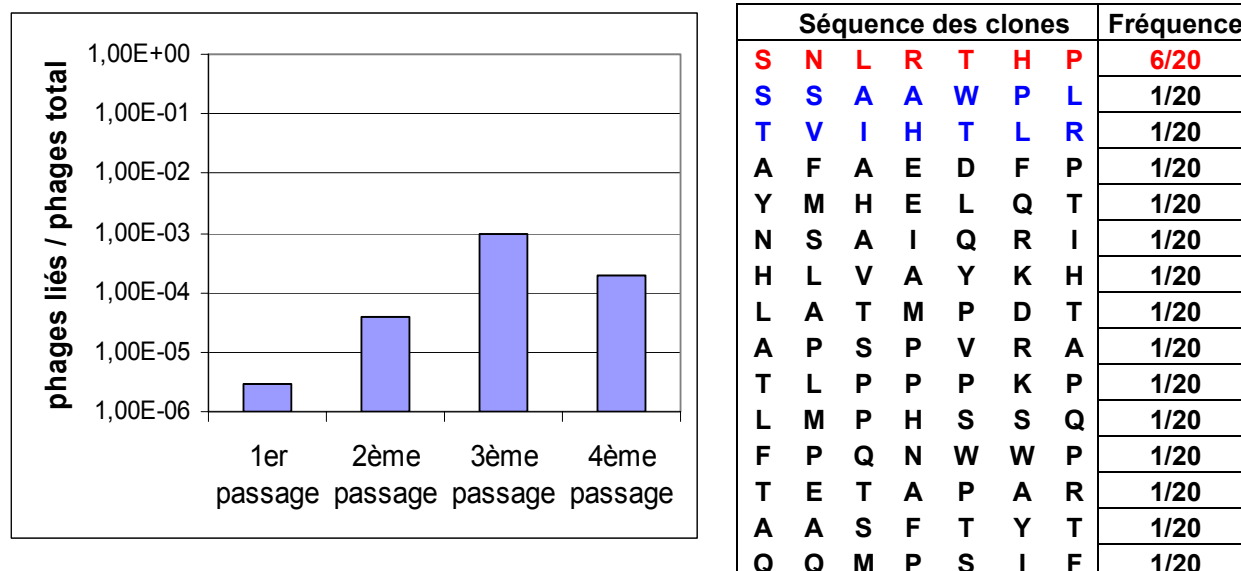


Tableau 10 : a) Evolution du rapport phages liés / phages total au cours de la sélection b) Séquence peptidique des 20 clones séquencés à partir des phages sélectionnés au 3^{ème} passage. En rouge, le peptide SNLRTHP apparaît 6 fois sur 20. Les peptides en bleu ont montré une correspondance avec un peptide sélectionné contre la sélectine P de souris décrit dans la littérature [126] (cf. 3.1.2.3.).

L'analyse de ces séquences avec le logiciel RELIC (*REceptor LIgand Contact*) [108] n'a pas permis de mettre en évidence de motif peptidique particulier. L'alignement de ces peptides avec des banques de protéines (*iPro*, *fasta*, *Swissprot*) n'a pas donné de résultats intéressants.

Les HUVECs activées surexpriment d'autres protéines, comme par exemple la sélectine P, VCAM-1 et ICAM-1 [127]. Afin de recentrer le processus de sélection sur la sélectine E, une étape de sélection sur la protéine recombinante a été introduite après les deux premiers passages sur cellules effectués précédemment (cf. tableau 11 a)). Lors du passage sur sélectine E, 1,5 µg de protéine recombinante ont été déposés au fond du puits, ce qui équivaut à une concentration de la protéine de 170 nM, et $2 \cdot 10^{11}$ ufp de phages issus du 2^{ème} passage ont été mis en incubation avec la protéine pendant 1h à température ambiante.

Le rapport phages liés / phages total obtenu après le passage sur SE est nettement plus faible que celui obtenu au 3^{ème} passage sur cellules ($2 \cdot 10^{-6}$ contre 10^{-3}). Cette diminution peut s'expliquer par le fait d'être passé d'une sélection sur cellules où de multiples sites d'interaction avec les phages sont possibles à une sélection sur une seule protéine : une partie des phages sélectionnés sur d'autres sites cellulaires que la sélectine E a été éliminée. Le point positif est la forte augmentation du rapport phages liés / phages total après le 4^{ème} passage réalisé sur cellules.

a)

Passage	Nature de la cible	Phages liés (en ufp)	Phages liés / phages total
3 ^{ème}	SErh	5.10 ⁵	2.10 ⁻⁶
4 ^{ème}	HUVECs p 10	3.10 ⁷	3.10 ⁻²

b)

Séquence des clones							Fréquence
S	N	L	R	T	H	P	17/20
L	D	P	V	F	M	R	1/20
S	L	P	I	G	R	L	1/20
K	T	Q	S	L	L	P	1/20

Tableau 11 : a) Plan de sélection sur les HUVECs activées par l'interleukine 1- β contre les HUVECS non activées avec un passage sur la sélectine E intercalé au 3^{ème} b) Séquence peptidique des 20 clones issus du 4^{ème} passage. Le peptide SNLRTHP en rouge est largement majoritaire (cf. test en 3.1.2.2.) Le peptide en bleu a montré une correspondance avec un peptide sélectionné contre la sélectine P de souris décrit dans la littérature (cf. 3.1.2.3.).

L'ADN de 20 clones issus du 4^{ème} passage a été séquencé et les résultats figurent dans le tableau 11 b). Il est intéressant de trouver à nouveau le peptide SNLRTHP qui est présent dans 17 clones sur 20. Si ce peptide se fixe réellement à la cible, il devait être majoritaire dans la population de phages issue du 3^{ème} passage et cela explique le fort rapport phages liés / phages total obtenu au 4^{ème} passage. Le phage-SNLRTHP a donc été amplifié afin d'évaluer sa spécificité de liaison sur les HUVECs activées et plus précisément sur la sélectine E.

3.1.2.2. Caractérisation de la liaison du phage-SNLRTHP – Méthode BRASIL et test ELISA

Deux tests ont été réalisés pour évaluer la spécificité de la liaison du phage-SNLRTHP sur les HUVECs activées par rapport aux cellules non activées : un test similaire à la méthode de sélection et un test ELISA. Le test ELISA a également été utilisé pour tester spécifiquement la liaison de ce peptide sur la sélectine E recombinante humaine.

Test sur cellules selon la méthode BRASIL

Dans un premier temps, un test similaire à la sélection BRASIL a été réalisé : 5.10^7 ou 5.10^8 ufp du phage-SNLRTHP ont été mis en présence de 400 000 HUVECs activées ou non activées. Après 4h d'incubation à 4°C, les phages liés aux cellules ont été récupérés par centrifugation à travers la phase organique, congélation du tube dans le mélange carboglace/éthanol et remise en suspension des culots de cellules-phages. Les phages-SNLRTHP liés aux cellules ont été titrés (cf. figure 29 a.).

D'après la figure 29 b., il y a une fixation plus importante de phages-SNLRTHP sur les cellules activées que sur les cellules non activées. La proportion de phages récupérés sur les cellules non activées reste très importante, mais le rapport phages liés / phages total est équivalent pour les deux valeurs de phages total utilisées. Ce bruit de fond peut s'expliquer par une fixation non spécifique du peptide sur d'autres sites de la surface des HUVECs.

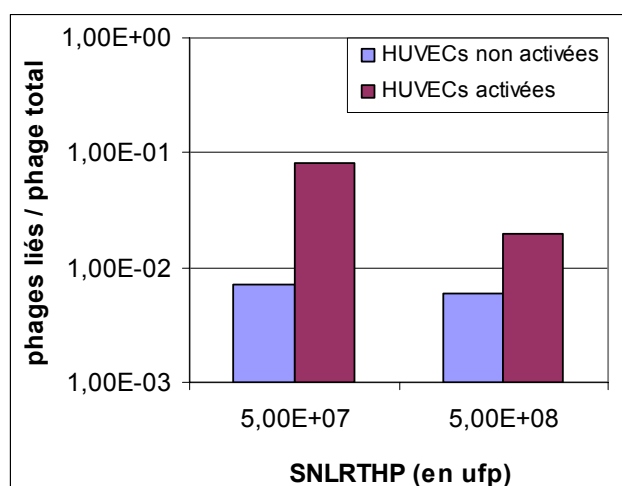
La différence de rapport phages liés / phages total sur les HUVECs activées entre les deux concentrations initiales de phages pourrait s'expliquer par le fait que tous les sites de fixation sur les cellules sont occupés. Mais pour le démontrer, il faudrait refaire cette expérience avec une gamme plus large de quantités de phages mis en incubation avec les HUVECs.

a)

Phages total (en ufp)	HUVECs activées	HUVECs non activées
5.10^7	3.10^6	4.10^5
5.10^8	8.10^6	4.10^6

Figure 29 : Test Brasil avec le phage-SNLRTHP sur les HUVECs activées ou non. a) Quantité de phages récupérée après incubation sur HUVECs activées ou non, à deux concentrations différentes de phages b) Rapport phages liés / phages total obtenu dans les différentes conditions

b)



Cependant, il s'agissait d'une expérience préliminaire qui n'a été effectuée qu'une fois. Il manque notamment un témoin avec le phage-SNLRTHP sur d'autres types cellulaires et avec un phage sauvage sur les HUVECs. Cependant, au moment de cette expérience, nous ne disposons pas de phages sans insert. D'autre part, ce test nécessite une grande quantité d'HUVECs. Or le coût des HUVECs est très important et on ne dispose pas de grandes quantités du fait de leur croissance lente et qui est limitée dans le temps à une dizaine de passages.

En conséquence, nous avons préféré mettre au point un test de liaison ELISA en plaque 96 puits pour utiliser moins de matériel cellulaire et avoir une méthode de quantification plus simple et précise.

Test ELISA sur cellules

Un test ELISA sur cellules a alors été mis en place afin de confirmer la fixation du phage-SNLRTHP sur les HUVECs activées. Le phage-SNLRTHP a été testé en plaque 96 puits sur des HUVECs activées ou non activées et des cellules B16 et 3T3. Le phage-SLPIGRL, sélectionné une fois au cours de la sélection avec passage sur SE recombinante, a également été testé pour comparer avec la fixation du phage-SNLRTHP. Des quantités croissantes de phages-peptide ont été mises en incubation avec les cellules pendant une heure à température ambiante.

D'après les résultats de la figure 30, le signal d'absorbance augmente dans toutes les conditions avec l'augmentation de la quantité de phages introduits : ceci implique que le signal détecté est bien fonction de la quantité de phages présente. Cependant, si on détecte la présence de phage-SNLRTHP sur les HUVECs activées, on n'a pas observé de différence avec le signal mesuré sur les HUVECs non activées. Enfin, le phage-SNLRTHP semble se fixer faiblement sur les cellules B16, mais beaucoup plus fortement sur les cellules 3T3 que sur les HUVECs. Il en est de même pour le phage-SLPIGRL. Enfin, le phage-SNLRTHP donne un signal plus fort que le phage-SLPIGRL sur les HUVECs.

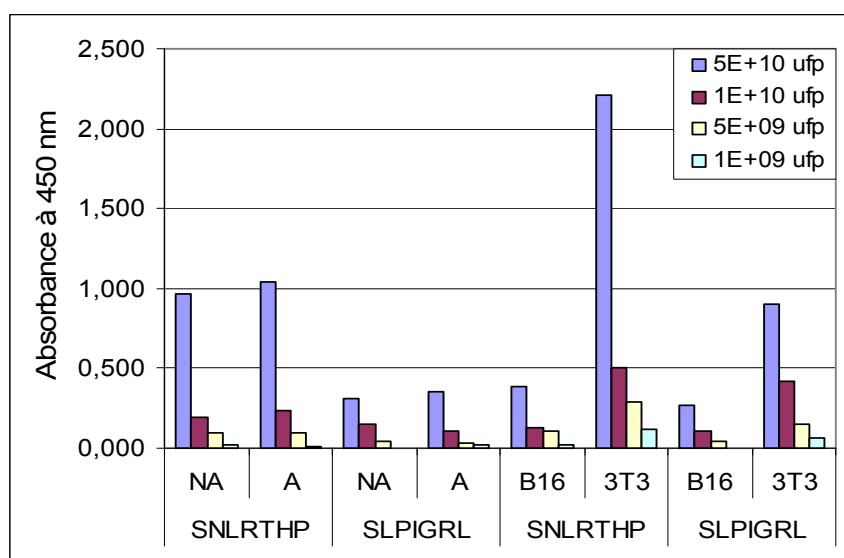


Figure 30 : ELISA sur les HUVECs non activées (NA), activées (A) et sur cellules B16 et 3T3. Des quantités croissantes de phage-SNLRTHP et phage-SLPIGRL ont été mises en incubation avec les cellules pendant une heure à température ambiante. Un anticorps primaire anti-M13 se fixant aux phages et un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire couplé à la HRP ont permis de détecter, après ajout du substrat, les phages liés aux cellules par lecture de l'absorbance à 450 nm. Le bruit de fond sur les cellules seules a été soustrait.

Ce test ELISA a été réalisé trois fois, en donnant des résultats similaires, excepté pour le phage-SLPIGRL dont le signal était plus proche de celui du phage-SNLRTHP. Il a été également vérifié que le signal résultait de la liaison des phages aux cellules et non au plastique, par incubation des phages dans des puits sans cellules. L'absorbance lue était alors de l'ordre du bruit de fond par rapport au signal en présence de cellules.

En conclusion, le phage-peptide SNLRTHP sélectionné à partir de la banque n'a pas montré une spécificité de liaison sur les HUVECs activées par rapport aux cellules non activées. Au contraire, ce peptide semble se lier de manière non spécifique à différents types cellulaires, notamment aux cellules 3T3. Il s'agit peut-être seulement d'une interaction de charge entre la membrane des cellules chargée négativement et les deux charges positives du peptide SNLRTHP (portées par l'arginine et l'histidine).

Test ELISA sur sélectine E recombinante

Afin d'éliminer le bruit de fond lié aux interactions non spécifiques des phages-peptides sur les nombreux sites de fixation cellulaires, les phages-peptides ont également été testés sur la sélectine E recombinante.

Les phages-SNLRTHP et -SLPIGRL ont été testés en ELISA sur la protéine SErh. Un phage ne possédant pas d'insert peptidique a également été ajouté en témoin négatif. Les puits ont été recouverts avec 150 ng de sélectine E par puits. Les phages-peptides ont été introduits dans les puits en quantité croissante, de $5 \cdot 10^9$ à $5 \cdot 10^{10}$ ufp.

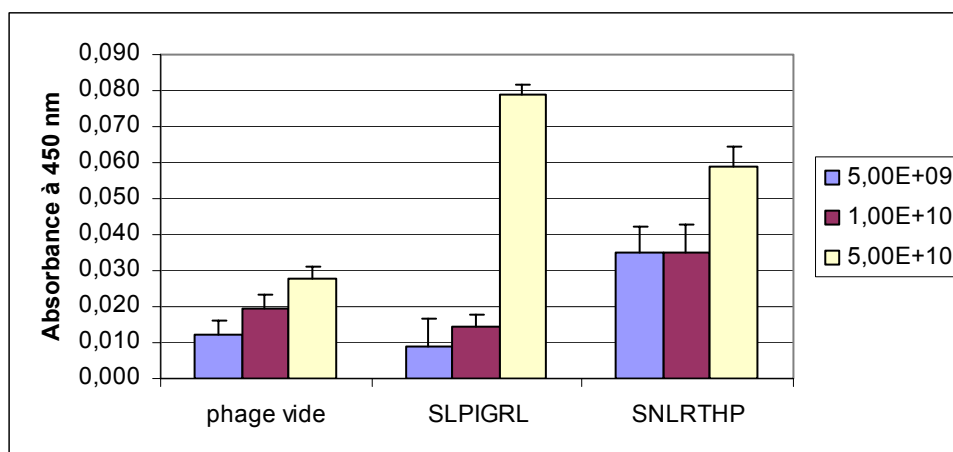


Figure 31 : Test ELISA sur sélectine E recombinante. Différentes quantités de phages ont été testées. Chaque point représente la moyenne de trois puits. Les phages-peptides ont été mis en incubation avec la sélectine E pendant une heure à température ambiante. Après plusieurs lavages, les phages fixés ont été révélés par l'utilisation d'un anticorps anti-M13 couplé à la HRP, ajout du substrat et lecture de l'absorbance à 450 nm. Les phages mis en incubation dans des puits sans sélectine E bloqués avec de la BSA ont donné des valeurs de l'ordre du bruit de fond.

D'après le graphique de la figure 31, le signal augmente avec la quantité de phages-peptides introduite. Le phage-SLPIGRL diffère du bruit de fond donné par le phage sans insert à partir de 5.10^{10} ufp, alors que le phage-SNLRTHP donne des valeurs supérieures dès 5.10^9 ufp. Le phage-SLPIGRL se fixerait mieux que le phage-SNLRTHP sur la sélectine E à partir de 5.10^{10} ufp. La présence du peptide SLPIGRL et surtout la présence du peptide SNLRTHP à la surface du phage permet d'augmenter de manière importante sa fixation sur la sélectine E par rapport au phage sans insert.

En conclusion, la liaison du phage-SNLRTHP sur les HUVECs activées ne semblait pas spécifique, mais sa liaison à la sélectine E recombinante donnait un signal nettement plus important que le phage sans insert en test ELISA. Un test de compétition du phage-SNLRTHP avec le peptide synthétique correspondant permettra d'évaluer sa spécificité pour la sélectine E. D'autre part, les peptides obtenus lors de la sélection ne montraient pas de motif consensus. Nous avons alors regardé si les peptides sélectionnés présentaient une homologie de séquence avec des molécules se fixant sur la sélectine E et sur d'autres protéines à la surface des HUVECs activées en réalisant des alignements de séquence.

3.1.2.3. Alignements des peptides sélectionnés sur des ligands des HUVECs activées

L'augmentation de l'expression de plusieurs protéines a été décrite à la surface des HUVECs activées par l'interleukine-1- β [127]. Il était intéressant d'aligner les séquences peptidiques obtenues au cours de la sélection sur les HUVECs activées avec des ligands de ces protéines pour voir si une région

particulière était mise en évidence. D'autre part, nous avons comparé les peptides obtenus avec les séquences de peptides se liant aux sélectines E et P décrits dans la littérature.

Les alignements sur les protéines ont été réalisés avec le programme MATCH et les alignements sur peptides avec le programme MOTIF du logiciel RELIC (*REceptor Ligand Contacts*) accessible gratuitement en ligne sur le site <http://relic.bio.anl.gov/> [108].

Alignements sur des ligands des sélectines E et P

Il n'était pas possible de réaliser des alignements des peptides avec les ligands des sélectines du fait de leur nature : il s'agit de sucres et le logiciel permet seulement de comparer des séquences peptidiques.

Cependant, la structure d'un anticorps dirigé contre la sélectine E était disponible et l'alignement de la séquence de cet anticorps avec les peptides sélectionnés a donné le résultat suivant (*cf. figure 32*).

```
divmtqspssltvtgkvtmtcksqsl1l2nsaqknyltwyqqkpgqsp 50
                        ktqsl1lp
```

Figure 32 : Anticorps monoclonal 7A9 dirigé contre la sélectine E .

Le peptide KTQSLLP s'aligne au niveau de la région variable CDRL-1 de la chaîne légère de l'anticorps anti-sélectine E 719 [128]. Le phage-KTQSLLP a donc été testé en ELISA sur la sélectine E : à 5.10^{10} ufp, le signal obtenu était légèrement supérieur à celui du phage sans insert (*cf. figure 35*).

D'autre part, PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*) est un ligand de la sélectine P qui se lie également à la sélectine E. L'alignement a été réalisé sur les 19 acides aminés de la partie N-terminale de PSGL-1 qui sont impliqués dans la liaison aux sélectines. Le reste de la liaison fait intervenir le SleX de PSGL-1. Quatre peptides s'alignent sur cette séquence (*cf. figure 33*).

```
Q  A  T  E  Y  E  Y  L  D  Y  D  F  L  P  E  T  E  P
                        L  A  T  M  P  D  T
                        T  E  T  A  P  A  R
L  D  P  V  F  M  R
                        T  L  P  P  P  K  P
```

Figure 33 : Alignement des peptides sélectionnés sur la séquence de PSGL-1 impliquée dans la liaison aux sélectines.

Le phage-LDPVFMR a donné un fort signal en test ELISA, à la fois sur les sélectines E et P, par rapport au phage sans insert (*cf. figure 35*). D'autre part, les premiers essais en test ELISA « rapide » des phages-TETAPAR et -TLPPPKP ont montré une meilleure fixation sur la sélectine E que sur la sélectine P par rapport au phage sans insert (*non montré*). Le test ELISA « rapide » utilise des phages-peptides amplifiés sur la nuit qui ont seulement été centrifugés pour éliminer le culot de bactéries. Les phages-TETAPAR et -TLPPPKP seront testés prochainement en test ELISA quantifié sur les sélectines E et P.

Comparaison des peptides sélectionnés avec les peptides décrits dans la littérature pour leur liaison aux sélectines E et P

Quelques équipes ont utilisé des banques de peptides sur phages pour trouver des ligands des sélectines E et P. L'idée était alors de comparer les peptides sélectionnés sur les HUVECs activées avec les séquences des peptides ciblant la sélectine E et P publiées.

Aucune homologie de séquence n'a été identifiée avec les peptides décrits pour leur liaison à la SE (peptide IELLQAR [51] et peptides décrits par Martens [129]). Par contre, 5 peptides issus de la sélection sur HUVECs s'alignaient avec le peptide de 15 acides aminés CLVSVLDLEPLDAAWLC décrit par l'équipe de Molenaar [126] (*cf. figure 34*). Ce peptide a été sélectionné au bout de 10 passages sur la partie extracellulaire de la sélectine P de souris avec une banque contrainte de 15 acides aminés. Il est intéressant de remarquer que seulement 10^{10} ufp de phages ont été utilisés à chaque passage pour la sélection, ce qui est très faible par rapport à la taille de la banque.

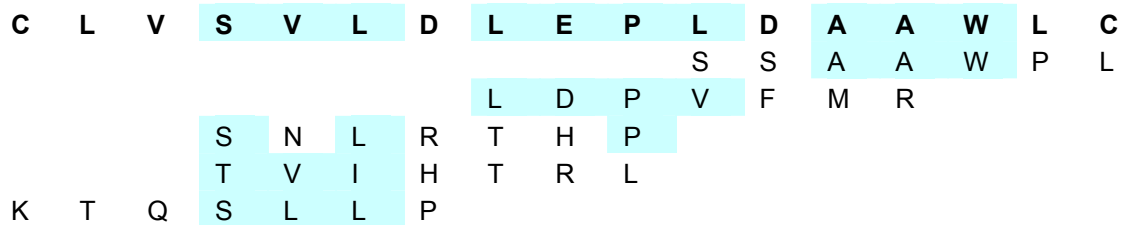


Figure 34 : Alignement de cinq peptides sélectionnés sur les HUVECs activées avec le peptide CLVSVDLEPLDAAWLC.

Les phages-peptides correspondant ont été amplifiés et testés en ELISA sur la sélectine P recombinante et pour pouvoir comparer, sur la sélectine E (*cf. figure 35*).

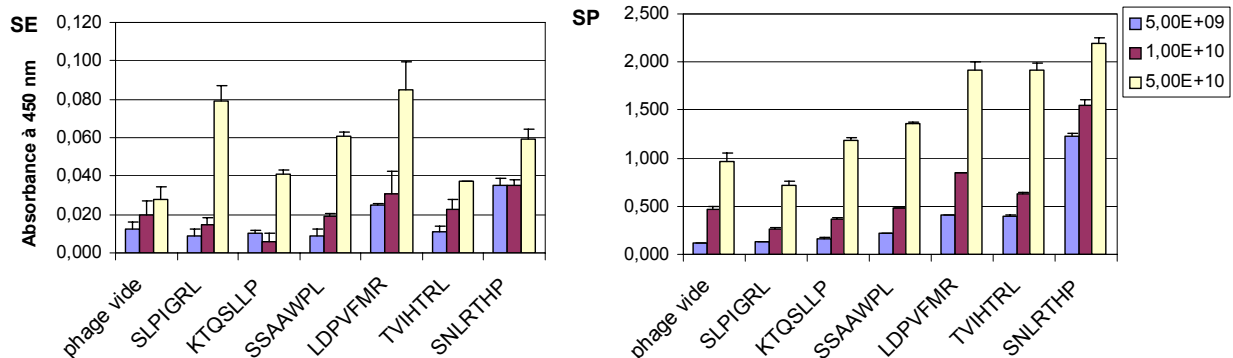


Figure 35 : Test ELISA des phages-peptides sur la sélectine P et E recombinante. Différentes quantités de phages ont été testées. Chaque point représente la moyenne de trois puits. Les phages-peptides ont été mis en incubation avec la sélectine E ou P pendant une heure à température ambiante. Après plusieurs lavages, les phages fixés ont été révélés par l'utilisation d'un anticorps anti-M13 couplé à la HRP, ajout du substrat et lecture de l'absorbance à 450 nm. L'utilisation d'un phage sans insert a permis de donner le bruit de fond. Les phages mis en incubation dans des puits sans sélectine E bloqués avec de la BSA ont donné des valeurs de l'ordre du bruit de fond.

Les graphes de la figure 35 montrent que les phages-peptides donnent un signal nettement plus fort sur la sélectine P, y compris le phage sans insert. Les phages-SLPIGRL, -LDPVFMR, -SSAWPL et -SNLRTHP donne un signal intéressant par rapport au phage sans insert sur la sélectine E. Sur la sélectine P, les phages les plus intéressants sont les phages-LDPVFMR, -TVIHTRL et -SNLRTHP. Il est intéressant de noter que le peptide LDPVFMR qui donne un signal intéressant sur la sélectine E et P s'aligne à la fois sur la partie peptidique de PSGL-1 impliqué dans la liaison aux sélectines et sur le peptide décrit par Molenaar.

Des expériences mettant en compétition les phages-peptides donnant le meilleur résultat sur la sélectine P et E avec les peptides synthétiques correspondants seront réalisées afin de confirmer ces résultats.

Les protéines VCAM-1 et ICAM-1

L'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 à la surface des HUVECs après activation avec l'interleukine-1- β a été décrite par Raab et coll. [127]. Ces protéines sont impliquées dans l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium inflammatoire.

En ce qui concerne ICAM-1, les peptides ont été alignés sur la séquence de l'anticorps R6.5 anti-ICAM-1 (*cf. figure 36*).

dvvm tqsplslpvs lgdqasiscrs sqslvhs ngnnylhwylqksggap
 qnpltli sslvlsa
 slpigr l ktqsl lp
 ktqsl lp

Figure 36 : Alignement avec la séquence de l'anticorps monoclonal anti-ICAM-1 R6.5.

Les peptides QNPLTLI et SSLVLSA ont été sélectionnés dans une étude préliminaire consistant en une sélection sur des HUVECs contre des cellules 3T3 et B16. D'après la structure de cet anticorps anti-ICAM-1 [130], la région où s'alignent les peptides est située au niveau du domaine variable de la chaîne légère. Plus précisément, les acides aminés SQSLVHS (en bleu) se situent au niveau du CDRL1. Les peptides QNPLTLI, SLPIGRL, KTQSLLP et notamment les peptides SSLVLSA et KTQSLLP pourraient se lier à ICAM-1.

Cependant, le test ELISA sur les cellules (*cf. figure 30*) n'a pas montré une affinité particulière du phage-SLPIGRL pour les HUVECs activées.

En ce qui concerne VCAM-1, certains peptides s'alignaient sur la séquence de l'anticorps anti-VCAM-1, mais le manque de données sur la structure de l'anticorps anti-VCAM-1 n'a pas permis de vérifier qu'il s'agit des régions variables d'interaction avec la cible.

L'interleukine-1- β

Nous avons également aligné les peptides avec la séquence de l'interleukine-1- β humaine. En effet, comme les HUVECs ont été activées avec cette cytokine, ses récepteurs sont largement présents à la surface des cellules. Il est donc possible que certains phages-peptide se soient liés spécifiquement à

ces récepteurs, au niveau du site d'interaction avec l'interleukine-1- β . Cependant, cette analyse n'a pas donné de résultat positif.

3.1.2.4. Conclusion

Le phage-SNLRTHP, majoritaire après la sélection des phages sur les HUVECs activées, n'a pas montré une fixation spécifique sur les HUVECs activées par rapport aux HUVECs non activées, et il se fixait également sur d'autres types cellulaires.

Cependant, l'étude de la liaison de différents phages-peptides par test ELISA a montré une fixation intéressante de certains d'entre eux sur la sélectine E et/ou P par rapport au phage sans insert. Afin de valider la potentialité de ciblage des sélectines avec ces peptides, les peptides synthétiques correspondants vont être synthétisés et testés en compétition avec les phages-peptides et le ASleX. La sélectine P est une cible très intéressante dans le traitement de l'inflammation et plusieurs études ont montré qu'il pourrait s'agir d'une cible potentielle pour des thérapies anti-cancéreuses [45].

L'objectif initial était de sélectionner des phages-peptides se fixant à la sélectine E. Le mode de récupération des phages liés aux cellules ne favorise pas une sélection spécifique. L'utilisation du ligand naturel de la sélectine E pour décrocher les phages liés aux cellules n'est pas envisageable du fait de la faible affinité du SleX pour la sélectine E. La sélectine E étant une protéine rapidement internalisée [131], un moyen d'améliorer le processus d'élution serait de sélectionner uniquement les phages internalisés par les cellules.

3.2. Ciblage de l'endogline

3.2.1. Stratégie adoptée

L'endogline humaine a été choisie comme cible pour rechercher des ligands de l'endothélium tumoral. La recherche de ligands peptidiques par sélection avec une banque de peptides sur phages est intéressante car il n'est pas nécessaire de connaître la biologie de la cible. Il faut seulement disposer de la protéine cible. Au début du projet, il n'existait pas de protéine recombinante commerciale de l'endogline. Deux alternatives étaient alors possibles : a) réaliser une préparation de la protéine recombinante ou b) utiliser directement des cellules exprimant la cible pour la sélection.

a) Préparation de protéine recombinante

L'endogline est une protéine membranaire. La préparation de protéine recombinante implique donc de cloner uniquement la partie extracellulaire de la protéine. D'autre part, l'endogline étant une protéine glycosylée, il est nécessaire de l'exprimer dans des cellules eucaryotes. La protéine doit ensuite être extraite des cellules et purifiée.

b) Utilisation de la protéine exprimée à la surface des cellules

De manière générale, la recherche de ligands ciblant un type cellulaire avec une banque de peptides sur phages implique d'utiliser des lignées « négatives » judicieusement choisies [103, 132] pour réaliser une sélection négative au cours de laquelle les phages se liant aux cellules négatives sont éliminés. Ainsi, le bruit de fond lié aux phages qui se fixent sur des sites non spécifiques du type cellulaire choisi est diminué.

Par ailleurs, si comme dans notre cas, on veut sélectionner des peptides liés spécifiquement à une protéine cellulaire, il est nécessaire que cette protéine soit surexprimée à la surface de la lignée cible et il est fortement conseillé de disposer d'une lignée possédant exactement les mêmes caractéristiques, exceptée la protéine cible, pour réaliser une sélection négative.

L'endogline est exprimée dans peu de lignées cellulaires (*cf. introduction 3.2.*). Au laboratoire, nous disposons de la lignée primaire HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelium Cells*) qui exprime de manière constitutive l'endogline à sa surface, mais nous n'avons pas de lignées intéressantes pour réaliser une sélection négative efficace.

En conclusion, dans les deux cas, il était nécessaire de réaliser le clonage de l'endogline humaine. La stratégie choisie a été de cloner le gène codant l'endogline humaine en entier, de l'exprimer dans une lignée cellulaire et d'utiliser cette lignée pour la sélection avec la banque de peptides sur phages. Ainsi, la lignée sauvage sera utilisée pour réaliser la sélection négative et comme témoin négatif pour tester les ligands sélectionnés.

3.2.2. Clonage de l'endogline humaine

3.2.2.1. Clonage du gène codant l'endogline humaine dans le vecteur transitoire pCR2.1

L'ARNm de l'endogline humaine a été extrait à partir d'HUVECs à passage 4 par la méthode au Trizol. La transcription inverse a été effectuée avec l'amorce 5 (cf. tableau 12 et figure 37). Les amorces de PCR ont été définies d'après la séquence de l'ADNc complet correspondant au gène de l'endogline humaine de référence NM000118 sur Pubmed.

N° amorce	Séquence de l'amorce	Position sur la séquence de l'endogline (NM00018)
1	CGT GGA CAG CAT GGA CCG CG	341-360
2	GTG GCA TCC TTC GTG GAG CT	1281-1300
3	AGC TCC ACG AAG GAT GCC AC	1300-1281
4	TCA GAG GCT TCA CTG GGC TC	2277-2258
5	TCC TGC CAG GGC CCC TCA AT	2300-2281
6	CTG GAA GCC AGC CAG GAC ATG	900-920
7	GGA CCA CTG GAG AAT ACT CC	1165-1184

Tableau 12 : Amorces utilisées pour le clonage de l'endogline humaine. Les amorces ont été synthétisées par *Invitrogen*. L'amorce 5 a été utilisée pour la réaction de transcription inverse, le couple d'amorces 1-3 pour la PCR du fragment A, le couple d'amorces 2-4 pour la PCR du fragment B, le couple d'amorces 5- 6 pour la PCR du fragment C et l'amorce 7 pour compléter la PCR de séquençage.

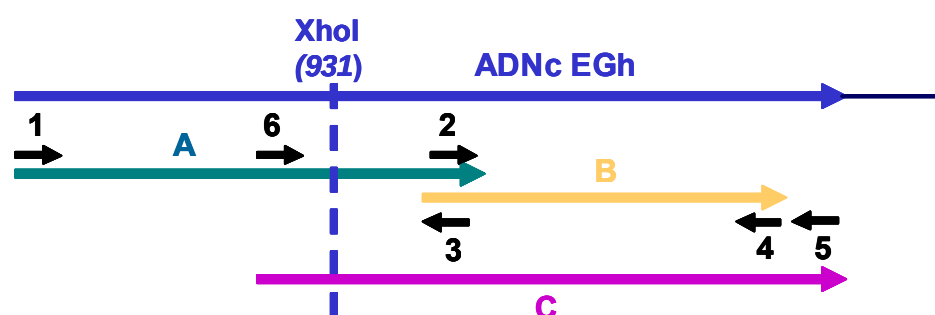


Figure 37 : Représentation des différents fragments obtenus par PCR et localisation des amorces utilisées pour le clonage du gène codant l'endogline humaine (entre les paires de base 351 et 2228). La flèche indique le sens 5'-3' de l'ADN. Les tailles des fragments sont les suivantes : 960 pb pour A, 1 kb pour B et 1,4 kb pour C. L'enzyme *XhoI* coupe en un site unique sur la partie de l'endogline amplifiée (base 931) et a été utilisée pour relier les fragments A et C amplifiés séparément par PCR.

Les réactions de PCR ont été réalisées avec l'ADN polymérase Taq TaKaRa (*TaKaRa Bio*). Cette enzyme laisse des bases A (*Adénosine*) libres aux extrémités 3' du fragment amplifié, ce qui permet

d'utiliser le kit TA Cloning, *Invitrogen* pour un clonage transitoire rapide dans le vecteur pCR2.1 (cf. figure 38).

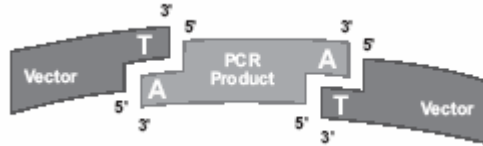


Figure 38 : Principe du « TA Cloning », *Invitrogen*. Le vecteur pCR2.1 possède deux extrémités T (*Thymidine*) libres en 3' et le fragment de PCR des extrémités A (*Adénosine*) libre en utilisant une ADN polymérase qui ne possède pas d'activité exonucléase. Le fragment de PCR est alors facilement inséré dans le vecteur pCR2.1.

Les différentes conditions de PCR testées pour obtenir l'endogline avec les couples d'amorces 1-5 ou 1-4 n'ont pas abouti : la migration sur gel a montré la présence de bandes non spécifiques.

Deux fragments indépendants ont alors été amplifiés en utilisant les couples d'amorces 1-3 et 2-4 (cf. figure 37). Les conditions de PCR ont été les suivantes :

- fragment A : dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation à 58 °C pendant 40 secondes, élongation à 72°C pendant 1 minute 30 (30 cycles)
- fragment B : dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation à 60 °C pendant 40 secondes, élongation à 72°C pendant 1 minute 30 (30 cycles).

Les fragments A et B ainsi obtenus ont servi de matrice pour amplifier le gène entier avec les amorces des extrémités 1 et 4. Différentes conditions de PCR ont été essayées sans réussir à éliminer les bandes non spécifiques.

Finalement, l'amorce 6 a été définie afin d'amplifier un fragment C qui contient un site de restriction unique pour *XhoI*. Ainsi, le gène entier a été reconstitué en assemblant les deux fragments A et C par digestion enzymatique.

Le fragment C a été obtenu avec les amorces 5 et 6 avec les conditions de PCR suivantes : 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, hybridation à 62 °C pendant 40 secondes et élongation à 72 °C pendant 2 minutes. Les fragments A et C obtenus par PCR ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 selon le manuel d'utilisation d'*Invitrogen*, afin d'obtenir respectivement les plasmides pCR2.1-A et pCR2.1-C.

Le gène codant l'endogline a été reconstitué de la manière suivante (cf. figure 39) : le fragment C obtenu par digestion de pCR2.1-C avec l'enzyme *XhoI* a été inséré dans le plasmide pCR2.1-A linéarisé avec la même enzyme pour obtenir le plasmide pCR2.1-EGh.

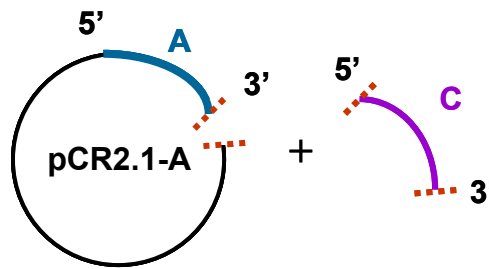


Figure 39 : Reconstitution du gène de l'endogline par ligature du plasmide pCR2.1-A linéarisé avec *XhoI* avec l'insert C obtenu par digestion du plasmide pCR2.1-C avec cette même enzyme. En pointillé rouge : les extrémités compatibles (suite à la digestion *XhoI*).

Le séquençage de l'endogline avec les amorces 1, 2, 3, 4 et 7 a montré une seule mutation ponctuelle à la base 961, qui change une Valine en Alanine. Cette mutation se situe au milieu de la partie extracellulaire, au niveau de l'acide aminé 204. Etant donné que la valine ne diffère de l'alanine que par deux groupements méthyle, nous avons supposé que la structure et l'activité de la protéine ne seraient pas altérées.

3.2.2.2. Clonage du gène codant l'endogline humaine dans un vecteur d'expression eucaryote

Clonage dans le vecteur d'expression eucaryote pVAXII

L'endogline humaine a été clonée dans le vecteur d'expression eucaryote pVAXII pour permettre son expression dans des cellules eucaryotes après transfection (*cf. figure 40*). Le vecteur pVAXII provient du vecteur pVAXI, *Invitrogen* dont le promoteur CMV a été remplacé par le CMV β du vecteur pCMV β , *Clontech* pour permettre une meilleure expression du transgène (*résultats du laboratoire non montrés*).

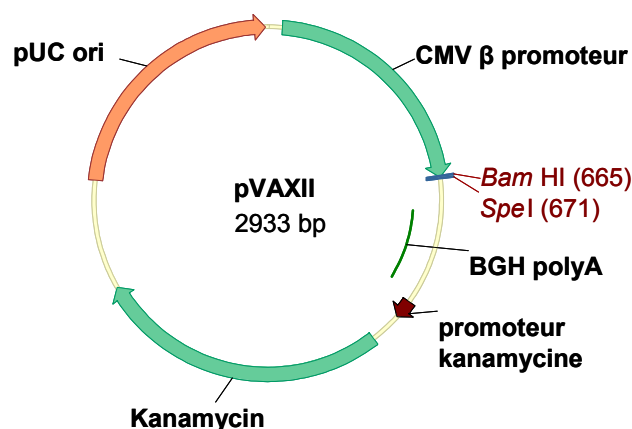


Figure 40 : Carte du plasmide pVAXII

Le gène codant l'endogline a été obtenu par digestion du plasmide pCR2.1-EGh avec les enzymes *Bam*HI et *Xba*I, puis insertion dans le vecteur pVAXII linéarisé avec *Bam*HI et *Spe*I. Le plasmide ainsi obtenu, pVAXII-EGh, a été introduit dans des cellules 3T3 par transfection et l'expression de l'endogline a été détectée par immunofluorescence (cf. figure 41).

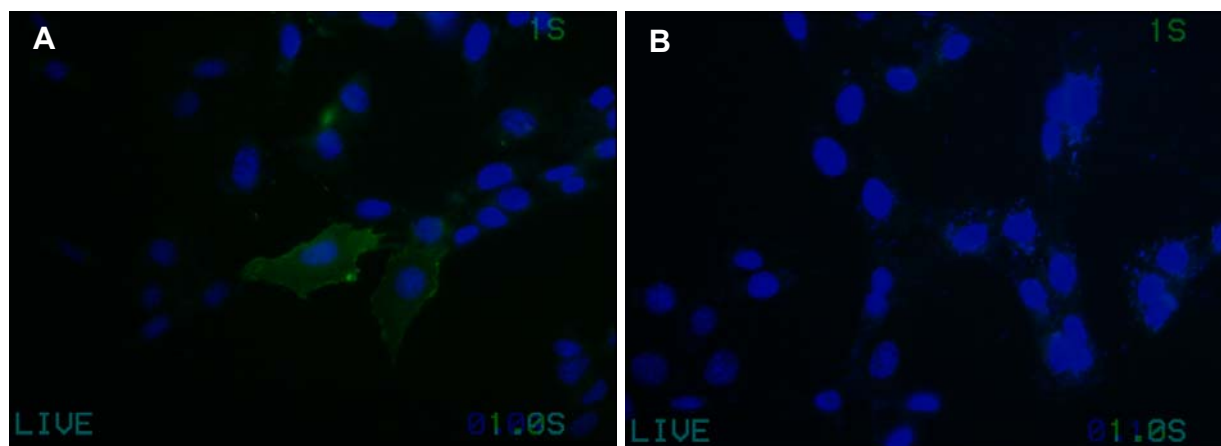


Figure 41 : Expression de l'endogline humaine à la surface des cellules 3T3 après transfection transitoire.

La transfection a été réalisée avec 1 µg d'ADN par puits et 4 nmol de lipide RPR209120, pendant 24h. A : transfection avec le plasmide pVAXII-EGh. B : transfection avec le plasmide pVAXII vide. L'expression de l'endogline est révélée dans le vert par l'utilisation d'un anticorps II anti-IgG de souris couplé à FITC et dirigé contre l'anticorps I de souris anti-endogline humaine. Les noyaux ont été colorés au dapi (fluorescence bleue).

L'efficacité de la transfection sur 24h de cellules 3T3 avec le plasmide pVAXII-EGh était de l'ordre de 3%. Des essais de transfection sur 48h n'ont pas amélioré l'efficacité de la transfection. Or, d'après la bibliographie [133], il est important d'avoir une surexpression de la protéine cible pour réaliser une sélection différentielle sur cellules.

La transfection simple du plasmide ne permettant pas d'obtenir une telle population de cellules, nous avons décidé de réaliser une lignée enrichie en cellules exprimant fortement l'endogline par sélection des cellules ayant intégré le plasmide avec un antibiotique. Le vecteur pVAXII n'a pas de promoteur eucaryote permettant l'expression de son gène de résistance à la néomycine pour sélectionner les clones positifs. Le gène codant l'endogline a donc été transféré dans le vecteur pC1.

Clonage dans le vecteur d'expression eucaryote pC1

Le vecteur d'expression eucaryote pC1 choisi contient un gène de résistance à la néomycine sous promoteur eucaryote pour la sélection des cellules ayant intégré le plasmide (cf. figure 42). Brièvement, ce vecteur provient du plasmide pEGFP-C1, *Clontech*, dont la partie EGFP a été éliminée.

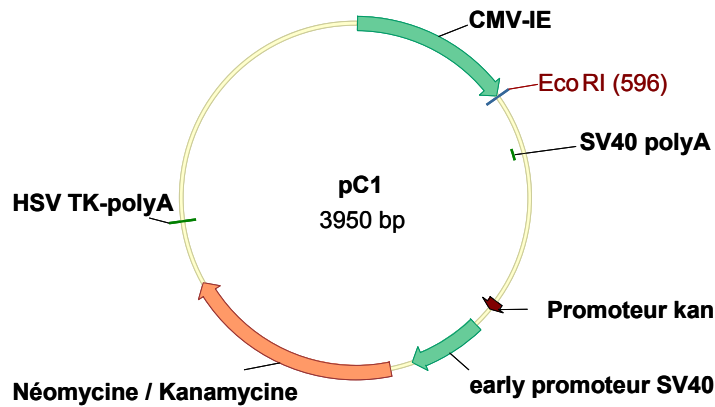


Figure 42 : Carte du plasmides pC1

L'insert codant l'endogline a été obtenu par digestion du plasmide pVAXII-EGh avec *EcoRI* et a été introduit dans le vecteur pC1 linéarisé avec la même enzyme. L'expression du plasmide pc1-EGh ainsi obtenu a été testée en transfection transitoire sur des cellules 3T3. L'expression de l'endogline a été détectée par immunofluorescence sur environ 3% des cellules transfectées (*photos non montrées*).

3.2.2.3. Enrichissement de la population en cellules exprimant l'endogline humaine par sélection avec un antibiotique

Electroporation de cellules B16 et 3T3

Comme le taux d'expression de l'endogline obtenue par transfection transitoire était insuffisant, nous avons décidé d'enrichir la population en cellules exprimant l'endogline par sélection des clones ayant intégré le plasmide pC1-EGh avec un antibiotique, la généticine.

Les cellules 3T3 et B16 ont été transfectées par électroporation avec 10 µg de plasmide pC1-EGh linéarisé avec l'enzyme *DraIII* en utilisant les conditions habituellement employées au laboratoire : un million de cellules ont été électroporées à une tension de 200 V et une capacitance de 950 µF. Les cellules ont ensuite été réparties en deux flacons de culture. Après 24h d'incubation à 37°C, la généticine a été ajoutée à raison de 0,6 mg/ml de milieu pour les cellules 3T3 et de 2 mg/ml pour les cellules B16 (*cf. figure 43*).

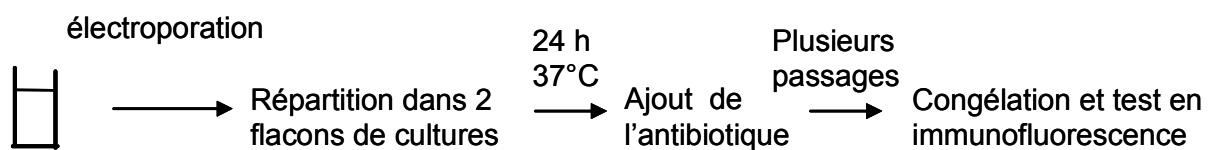


Figure 43 : Enrichissement de la population de cellules exprimant l'endogline après électroporation et sélection avec l'antibiotique.

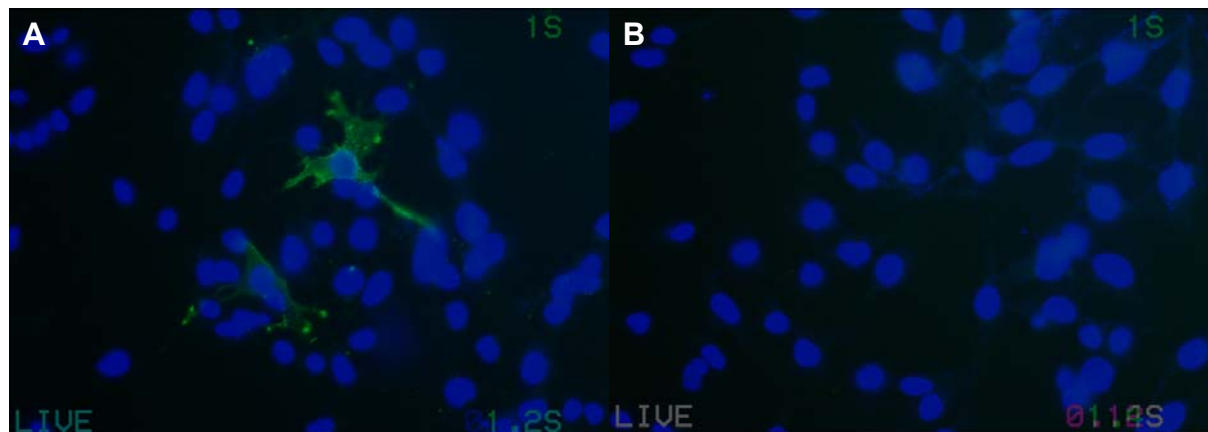


Figure 44 : Expression de l'endogline à la surface de la population de cellules B16-EGh. A : cellules B16-EGh. B : lignée sauvage B16. L'expression de l'endogline est révélée en fluorescence dans le vert par l'utilisation d'un anticorps Acl dirigé contre l'endogline et un anticorps AclI dirigé contre Acl et couplé à FITC. Les noyaux colorés au dapi fluorescent dans le bleu.

Le test d'immunofluorescence a montré l'obtention d'une population hétérogène de cellules exprimant l'endogline (environ 5% des cellules) à différents taux, à la fois sur les cellules B16 (*cf. figure 44*) et 3T3 (*non montré*). Ces populations enrichies en cellules exprimant l'endogline seront appelées par la suite B16-EGh et 3T3-EGh.

Caractérisation des lignées cellulaires 3T3-EGh et B16-EGh

L'expression membranaire de l'endogline humaine a été mise en évidence par immunofluorescence dans la partie précédente sur les populations B16-EGh et 3T3-EGh. La présence de l'ARNm correspondant à la transcription du gène codant l'endogline a également été vérifiée par RT-PCR sur l'ARN extrait des cellules des populations B16-EGh et 3T3-EGh (*cf. figure 45*).

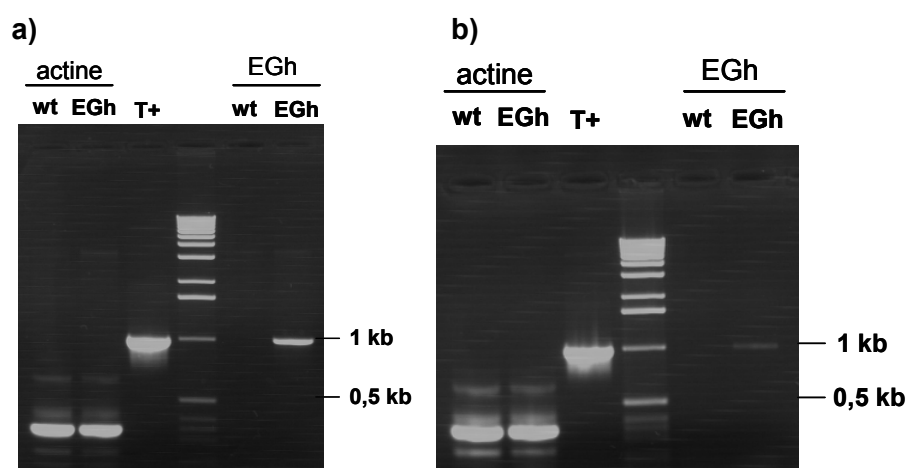


Figure 45 : Détection de la présence d'ARNm de l'endogline humaine dans les cellules 3T3-EGh (a) et B16-EGh (b). wt : lignée sauvage, EGh : lignée EGh, T+ : PCR sur le plasmide pc1-EGh. L'efficacité de la transcription inverse a été vérifiée par PCR avec les amorces spécifiques de l'actine. La détection de l'ARNm codant l'endogline a été réalisée par PCR avec le couple d'amorces 1-3.

Un Western blot a permis de vérifier la taille de l'endogline exprimée à la surface des cellules B16 après transfection avec le plasmide pc1-EGh. En témoins positifs, la protéine recombinante EGh, *R&D Systems*, a été déposée, ainsi que les protéines membranaires de cellules EAhy 926 qui expriment de manière constitutive l'endogline à leur surface (*non montré*). La lignée EAhy 926 [134] provient en effet de la fusion de cellules A549 avec des HUVECs.

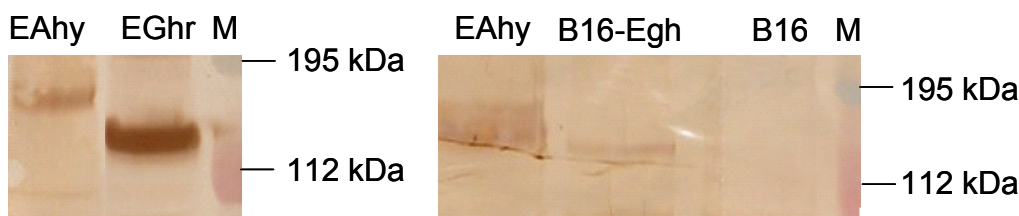


Figure 46 : Vérification de la taille de l'endogline par Westernblot. 20 µg de protéines extraites des cellules EAhy 926 (*EAhy*), des cellules B16 transfectées avec pC1-EGh (*B16-EGh*) et de B16 non transfectées (*B16*) ont été déposés et 150 ng de la protéine recombinante commerciale (*EGhr*). M : marqueur de taille. L'endogline a été détectée par l'utilisation d'un anticorps Acl dirigé contre l'endogline humaine, un anticorps AclI dirigé contre Acl et biotinylé. La membrane a été révélée avec de la streptavidine peroxydase après ajout de son substrat. Le témoin sans Acl ne montrait aucune bande correspondant à la taille de l'endogline.

Sous forme dimérique, l'endogline humaine a une taille de 180 kDa. La figure 46 met en évidence la présence d'endogline sous forme dimérique dans les cellules EAhy926. La taille de la protéine recombinante est légèrement plus petite, car il s'agit seulement de la partie extracellulaire (la taille attendue était de 160 kDa). L'endogline est détectée dans les protéines membranaires des cellules B16 transfectées, mais pas dans le témoin constitué par les cellules non traitées. D'autre part, l'endogline migre sensiblement au même niveau que les cellules EAhy926.

La forme monomère de l'endogline n'a pas été détectée, ni pour les protéines cellulaires, ni pour la protéine recombinante qui est présente à un rapport monomère/dimère égal d'après le fournisseur. D'autre part, en conditions dénaturantes, l'endogline n'était plus détectée en Westernblot. Il est probable que l'anticorps I utilisé soit spécifique d'un épitope de l'endogline sous sa forme dimérique.

En conclusion, le plasmide pC1-EGh permet l'expression membranaire de l'endogline humaine qui peut adopter sa forme dimérique.

La population B16-EGh a été utilisée pour la recherche de ligands peptidiques de l'endogline en utilisant une banque de peptides sur phages (*cf.* 2.3.). Cependant, nous avons pensé que pour une sélection différentielle sur cellules, de meilleurs résultats seraient obtenus avec un clone où toutes les cellules surexpriment l'endogline humaine. Nous avons donc décidé de réaliser en parallèle une lignée stable exprimant l'endogline humaine.

3.2.2.4. Etablissement d'une lignée stable 3T3 exprimant l'endogline humaine

Choix de la lignée cellulaire 3T3

Pour l'établissement de la lignée stable, il était important de choisir une lignée cellulaire n'exprimant pas la protéine homologue de souris. En effet, l'endogline humaine et de souris partagent environ 70% d'identité dans la partie extracellulaire. La présence simultanée de ces deux protéines pourrait poser un problème lors de la sélection différentielle avec la banque de peptides sur phages. Or, nous avons observé la présence d'endogline de souris à la surface des cellules B16 par immunofluorescence avec un anticorps Acl dirigé contre l'endogline de souris et un anticorps AclI dirigé contre Acl et couplé à FITC (*non montré*).

Afin de vérifier si la lignée NIH-3T3 était utilisable, une RT-PCR a été effectuée sur l'ARNm extrait de ces cellules, en employant un couple d'amorces spécifiques de l'endogline de souris, définies d'après la séquence n° X77952 sur Pubmed (*cf. figure 47*) :

- amorce 8 (1126-1145 : GGT CCT CCA TAT GTC TCC TC)
- amorce 9 (2329-2310 : GGC ACT ACG CCA TGC TGC TG).

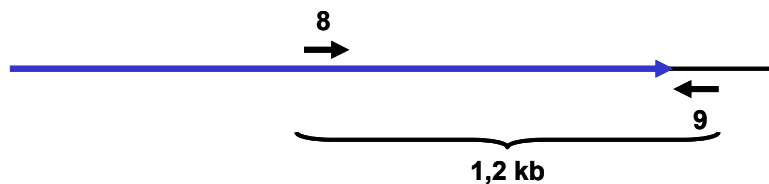


Figure 47 : Localisation des amorces 8 et 9 sur le gène de l'endogline de souris représenté par la flèche bleue (la flèche indique le sens 5'-3'). Le gène codant l'endogline de souris a une taille de 2 kb. Le fragment d'ADN amplifié par PCR avec ce couple d'amorces a une taille de 1,2 kb.

La transcription inverse a été réalisée avec l'amorce 9 et la PCR avec le couple d'amorces 8 et 9 en utilisant les conditions de PCR suivantes : 30 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 59°C pendant 40 secondes et 72°C pendant 1 minute 30.

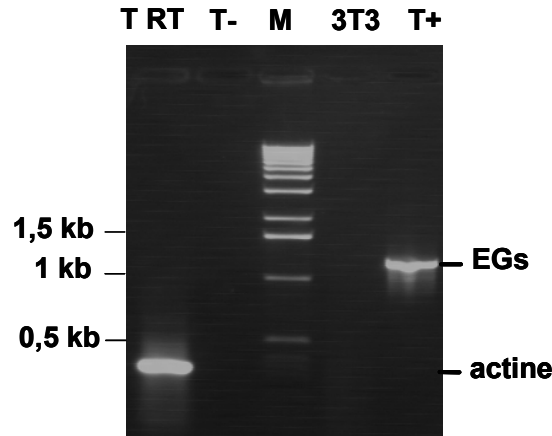


Figure 48 : RT-PCR avec les amorces de l'endogline de souris sur l'ARNm extrait de cellules 3T3 et B16. Cellules 3T3 (3T3), cellules B16 (T+), témoin de transcription inverse sur l'ARNm extrait des cellules 3T3 avec les amorces de l'actine (T RT), PCR sur de l'eau (T-).

La photo du gel (*cf. figure 48*) a montré pour les cellules 3T3 l'absence d'amplification d'une bande de 1,2 kb correspondant à la taille du fragment de l'endogline de souris détectée sur les cellules B16. D'après ce résultat, les cellules 3T3 convenaient pour l'expression de l'endogline humaine.

Réalisation de la lignée stable dans les cellules 3T3

La simple sélection avec un antibiotique n'a pas permis d'obtenir une population de cellules exprimant fortement et de manière homogène l'endogline humaine (*cf. 3.2.2.3.*). A cet effet, des cellules 3T3 ont été électroporées avec le plasmide pC1-EGh linéarisé et des clones individuels ont été isolés après sélection en présence de généticine.

Différentes conditions d'électroporation et de concentrations en antibiotique ont été testées. Après électroporation, plusieurs dilutions de cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri dans du milieu de culture sans antibiotique. L'antibiotique a été ajouté le jour suivant. Lorsque les clones apparaissaient, 30 à 40 clones isolés étaient prélevés etensemencés dans les puits d'une plaque 24 puits. Les clones ont ensuite testés en immunofluorescence.

L'observation des clones par immunofluorescence a montré des populations hétérogènes dont la majorité des clones exprimaient faiblement l'endogline et quelques cellules très fortement (*cf. figure 49*). L'obtention d'un clone à partir d'un sous-clonage de ces populations hétérogènes n'a pas réussi.

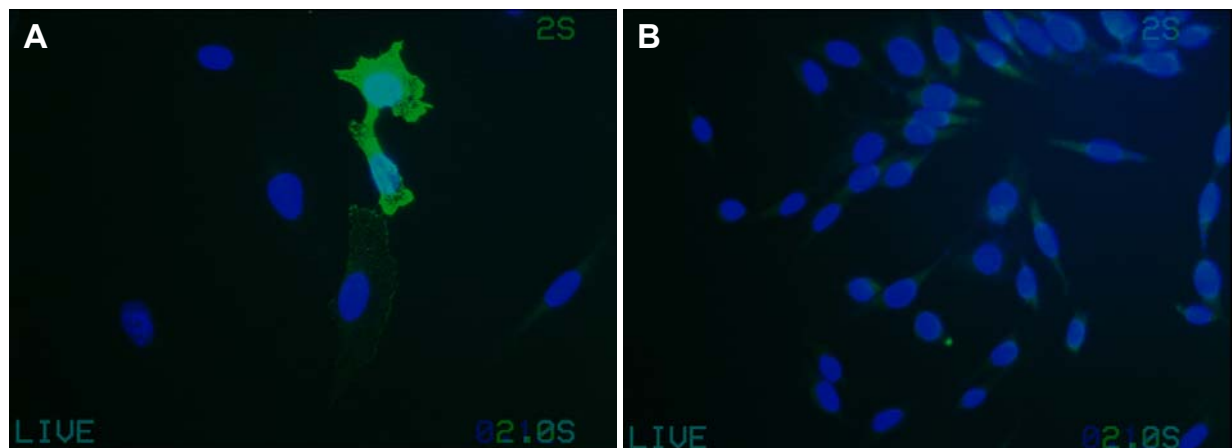


Figure 49 : Expression de l'endogline humaine à la surface d'un clone 3T3. A : clone 3T3-EGh, B : cellules 3T3 de la lignée sauvage. L'expression de l'endogline est révélée en fluorescence dans le vert par l'utilisation d'un anticorps Acl dirigé contre l'endogline et un anticorps AclI dirigé contre Acl et couplé à FITC. Les noyaux colorés au dapi fluorescent dans le bleu.

Par cette méthode, une seule sélection est réellement réalisée par l'utilisation de l'antibiotique. Or, les clones peuvent être résistants à la généticine sans exprimer l'endogline si l'intégration du plasmide linéarisé n'a pas été complète. Le test en immunofluorescence permet seulement de cribler les clones positifs, mais nécessite de tester un grand nombre de clones, ce qui rend le processus long, onéreux et peu efficace. Afin d'ajouter une deuxième étape de sélection, nous avons décidé de cloner l'endogline humaine en protéine de fusion avec l'EGFP. Le gène codant l'EGFP est placé en C-terminal de l'endogline afin que la partie extracellulaire de l'endogline soit libre pour la sélection avec la banque de phages (*cf. figure 50*).

Brièvement, le gène codant l'EGFP a été obtenu par PCR sur le plasmide pEGFP-N1, *Clontech*, avec les amorces 10 et 11 suivantes :

10 : TCG CAC **ACG CGT** ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG

11 : TAT GCA **CGC GTA** GAT ACA TTG ATG AGT TTG G.

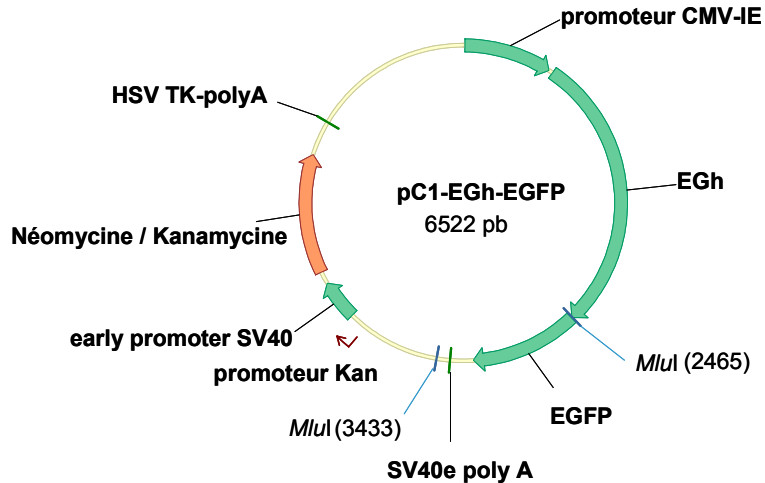


Figure 50 : Carte du plasmide pC1-EGh-EGFP.

Les amorces ont été définies de façon à ajouter deux sites de restriction *MluI* (en bleu) encadrant le fragment de PCR et pour amplifier à la fois le gène codant l'EGFP et le signal SV40E polyA. Les conditions de PCR ont été les suivantes : 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation à 58°C pendant 40 secondes et élongation à 72°C pendant 1 minute. Le fragment de 985 pb obtenu par PCR a été cloné de manière transitoire dans le vecteur pCR2.1. Ainsi, le gène codant l'EGFP et le poly A ont été insérés dans le plasmide pC1-EGh linéarisé avec *MluI* (le poly A de pC1-EGh était perdu par la digestion *MluI*).

Grâce à ce plasmide codant l'endogline humaine en protéine de fusion avec l'EGFP, la sélection sera améliorée par une première sélection avec un antibiotique et une deuxième sélection des clones positifs dans la boîte de Pétri par observation au microscope à fluorescence. La lignée stable est en cours de réalisation.

3.2.3. Recherche de ligands peptidiques de l'endogline humaine par sélection avec des banques de peptides sur phage

La recherche de ligands peptidiques ciblant l'endogline a été réalisée dans un premier temps sur la protéine exprimée à la surface des cellules B16-EGh (cf. 3.2.3.1.), puis sur la protéine recombinante lorsqu'elle a été commercialisée (cf. 3.2.3.2.).

3.2.3.1. Sélection sur l'endogline cellulaire avec la méthode BRASIL

Sélection sur les cellules B16-EGh contre les cellules sauvages

La recherche de ligands peptidiques de l'endogline humaine a été réalisée sur la population de cellules B16-EGh (cf. 3.2.2.3.). La lignée sauvage B16 a été utilisée pour réaliser une sélection négative à chaque passage, afin d'éliminer les phages se liant aux cellules B16 sur d'autres sites que

l'endogline. La banque linéaire de 7 acides aminés a été utilisée pour la sélection selon la méthode BRASIL (cf. 3.1.2.1.).

A chaque passage, 2.10^{11} ufp de phages ont été utilisés pour l'incubation avec les cellules B16, pendant 2h à 4°C. Après centrifugation à travers la phase organique, la phase aqueuse contenant les phages non liés aux cellules B16 a été transférée dans un tube contenant les cellules B16-EGh. Après 4h d'incubation à 4°C et centrifugation à travers la phase organique, le culot de phages-cellules a été remis en suspension. Les phages sélectionnés ont été amplifiés, dosés et utilisés pour les passages suivants (cf. figure 51).

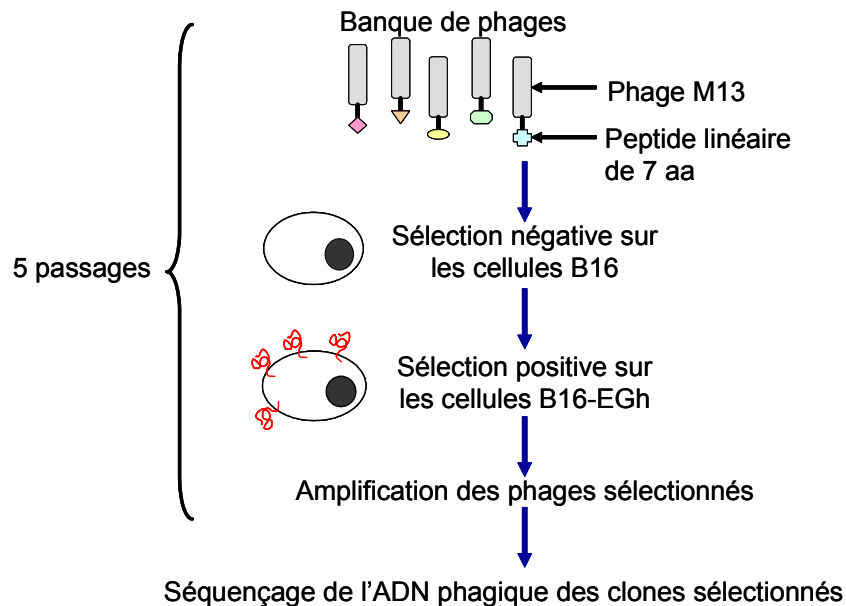


Figure 51 : Les différentes étapes de la sélection différentielle réalisée avec la banque de peptides linéaires de sept acides aminés sur phages, *NEB*, sur les cellules B16-EGh versus les cellules B16 sauvages.

A chaque passage, les phages sélectionnés ont été dosés afin de calculer le rapport phages liés / phages total donnant une idée de l'évolution de la sélection. Comme l'indique la figure 52, le rapport phages liés / phages total a augmenté légèrement jusqu'au 3^{ème} passage, puis est resté relativement constant pendant les passages suivants.

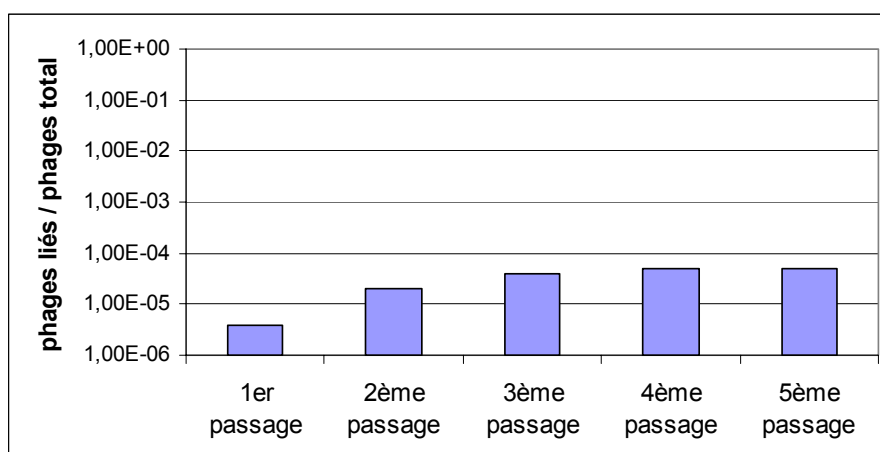


Figure 52 : Evolution du rapport phages liés / phages total au cours de la sélection sur les cellules B16-EGh versus les cellules B16.

L'ADN de clones issus du 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} passage a été séquencé et les peptides correspondants (cf. tableau 13) ont été analysés.

	3ème	4ème	5ème		3ème	4ème	5ème
T P A Q R P S	1/7			H A I Y P R H		1/19	
D S V L R P R	1/7			T F P L P G T		1/19	
S P G Y S A L	1/7			S L Q E T L P		1/19	
K F P M P Q Y	1/7			W A F P Y T P			1/18
T T P A A S S	1/7			G Q D L R E P			1/18
I L P V D R S	1/7			G T T Y H P P			1/18
G T G G F Q F	1/7			A R A L P P P			1/18
Q P W P T S I		2/19		S T A Q P M P			1/18
W P T L Q W A		1/19	1/18	S P T Q P K S			1/18
L P V R P W T		5/19	2/18	N L Q E F L F			2/18
V P Q I T H P		1/19		I S I P R T M			1/18
S T F R H P R		1/19		Q V Q T H H K			1/18
H W G M W S Y		1/19		V A I K Q H P			1/18
M N S G A V S		1/19		E A K G L I P			1/18
Q P F S M S Y		1/19		W H A V P K P			1/18
F A S S V P R		1/19		Q K P L L F T			1/18
M P G P R T P		1/19		V V P K P X T			1/18
G L Q N S L P		1/19					

Tableau 13 : Peptides obtenus au cours de la sélection sur l'endogline humaine. La fréquence de chaque peptide et le passage dont il est issu sont indiqués.

La majorité des peptides n'était représentée qu'une ou deux fois, excepté le peptide LPVRPWT. Cependant, ce peptide apparaît 5 fois sur 19 fois au cours du 4^{ème} passage, mais seulement 2 fois sur 18 au cours du 5^{ème} passage.

Analyse des peptides sélectionnés

L'évolution de la population de peptides au cours de la sélection a été étudiée avec le programme INFO (cf. figure 53). Les peptides issus du 3^{ème} passage montrent des séquences pauvres en information. Au cours du 4^{ème} et 5^{ème} passage, la courbe se décale vers la droite, laissant penser à une sélection positive des peptides se liant à la cible.

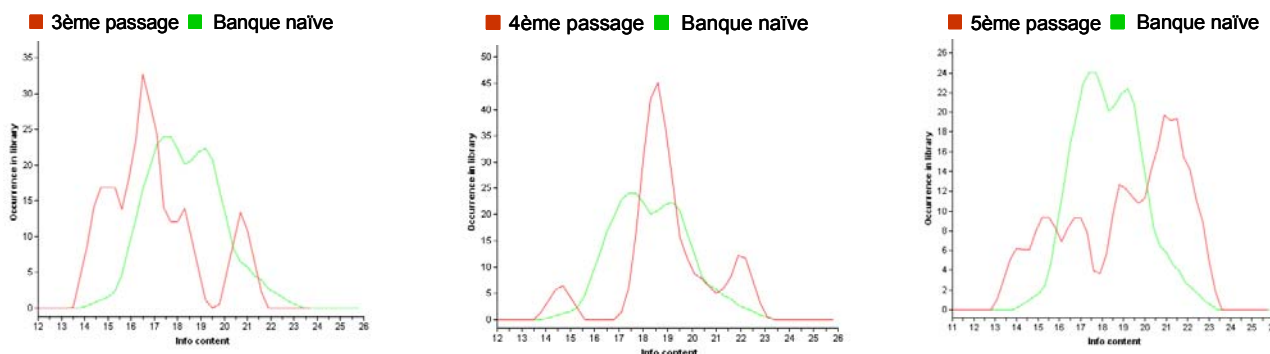


Figure 53 : Evolution de la population de phages au cours de la sélection a). La courbe en vert représente la répartition de 70 peptides sélectionnés au hasard dans la banque commerciale initiale (données de *NEB*) et la courbe en rouge les peptides séquencés à l'issue du 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} passage. L'ordonnée nous donne une estimation de la fréquence de chaque peptide dans la banque associée en abscisse à l'information portée par le peptide. L'information est égale à $-\ln(p)$ où p est la probabilité de sélectionner ce peptide par le fait du hasard. Cette probabilité est calculée en multipliant la fréquence de chaque acide aminé pour chaque position, ces fréquences étant calculées par le logiciel à partir des séquences de la banque naïve. Plus cette probabilité est faible, plus l'information associée, $-\ln(p)$ est élevée.

Les peptides ont été analysés avec le programme AnPep écrit par V. Savarin en Java Script. Ce programme permet de rechercher des motifs particuliers de la longueur désirée, avec des acides aminés consécutifs ou non et permettant les substitutions conservatives d'acides aminés. Aucun motif particulier évident n'est apparu. De la même façon, les alignements des peptides avec des banques de protéines (*iPro*, *infobiogen*) n'ont pas donné de résultats intéressants.

En conclusion, il serait peut-être intéressant de réaliser d'autres passages de sélection et regarder si le rapport phages liés / phages total augmente. En effet, dans certaines publications, les auteurs effectuent jusqu'à 10 passages avant de sélectionner des peptides intéressants [126, 135].

Le manque d'efficacité du processus de sélection peut s'expliquer de deux manières : les motifs peptidiques recherchés ne sont pas représentés dans la banque utilisée et/ou les cellules B16-EGh ne surexpriment pas suffisamment l'endogline humaine par rapport à la lignée sauvage qui exprime par ailleurs l'endogline de souris. Entre temps, la partie extracellulaire de l'endogline humaine a été commercialisée par *R&D Systems*. Nous avons préféré continuer par une sélection sur protéines qui semble plus efficace d'après les données de la littérature.

3.2.3.3. Sélection sur protéine recombinante avec la banque de phages

Principe de la sélection sur protéine en plaque 96 puits

Un puits d'une plaque 96 puits est recouvert d'endogline par incubation de la protéine sur la nuit à 4°C. Les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution de BSA avant d'ajouter les phages. Après incubation, les puits sont lavés dans un tampon contenant un détergent, le Tween 20, afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Les phages fixés à la cible sont alors élués dans une solution de glycine à pH 2,2, puis amplifiés et dosés afin d'être utilisés pour le passage suivant.

Sélection sur la protéine recombinante EGhr

La banque contrainte de sept acides aminés a été utilisée pour sélectionner un ligand peptidique de l'endogline recombinante humaine. La forme commerciale de l'endogline est constituée des acides aminés 1 à 587 (partie extracellulaire). La protéine, glycosylée grâce à son expression dans une lignée cellulaire de souris, est présente à la fois sous forme de monomère et de dimère.

Deux expériences de sélection indépendantes ont été réalisées avec une quantité de phages de $2 \cdot 10^{11}$ ufp à chaque passage (cf. *tableau 14*). Les conditions ont été choisies d'après les données de la littérature afin d'optimiser le processus de sélection : au cours des passages, la durée d'incubation du phage avec les peptides ainsi que la concentration en protéine cible sont diminuées et la concentration en Tween 20 dans les tampons de lavage est augmentée. Les sélections ont été réalisées à température ambiante.

	Passage	Concentration en EGhr	Concentration en Tween 20	Durée d'incubation
a)	1 ^{er}	15 nM (200 ng)	0,1%	1h
	2 ^{ème}	13 nM (150 ng)	0,3%	40 min
	3 ^{ème}	8 nM (100 ng)	0,5 %	20 min
b)	1 ^{er}	13 nM (150 ng)	0,1%	2h
	2 ^{ème}	6 nM (75 ng)	0,3%	45 min
	3 ^{ème}	3 nM (40 ng)	0,5 %	20 min
	4 ^{ème}	3 nM (40 ng)	0,5 %	20 min

Tableau 14 : Plan de la sélection sur la protéine recombinante humaine. La stringence de la sélection est augmentée par la diminution de la concentration en protéine au fond du puits, l'augmentation de la concentration en détergent (Tween 20) dans les tampons de dilution du phage et de lavage, et par la diminution de la durée d'incubation des phages avec la cible. La quantité de phages a été fixée à $2 \cdot 10^{11}$ ufp par passage.

Dans les deux cas, le rapport phages liés / phages total a augmenté au cours de la sélection (cf. *figure 54*). L'ADN de clones issus du 2^{ème} et 3^{ème} passage a été séquencé pour chaque expérience (cf. *tableau 15*). A part le peptide SKNHPSI apparu 2 fois au 2^{ème} passage de la sélection a), aucun peptide n'était redondant. Par contre, à chaque fois, des phages ne possédant pas d'insert ont été sélectionnés. Ces phages ne sont pas des phages sauvages puisqu'ils exprimaient le gène de la galactosidase et donnaient des plages de lyse bleues sur des boîtes de Pétri LB agar additionnées d'IPTG et XGal. Ces phages sans insert proviennent donc de la banque initiale. L'absence de l'insert peptidique leur confère certainement un avantage de croissance qui leur permet d'être amplifiés au cours de la sélection.

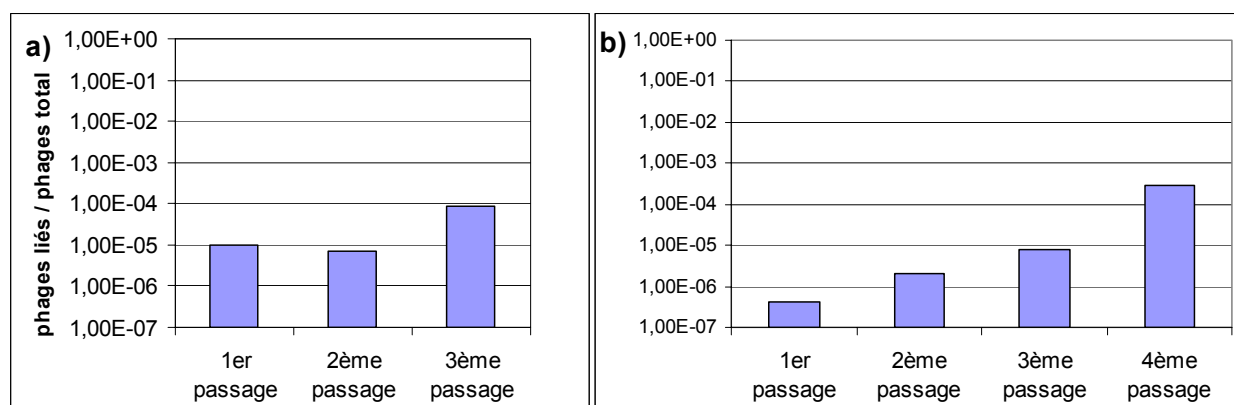


Figure 54 : Evolution du rapport phages liés / phages total au cours de la sélection sur la protéine EGhr.

a)	2ème	3ème
M N H Y S H S	1/25	
M T R L P K A	1/25	
M G P L T T L	1/25	
P R L N H E N	1/25	
K T I H R T D	1/25	
T P S L N A F	1/25	
T T D S H G V	1/25	
H T P N E P Q	1/25	
L Q I M A A Y	1/25	
T S S Q A R L	1/25	
S A P W A A L	1/25	
K G L S T E Y	1/25	
H P F A S N A	1/25	
Q S R I S G T	1/25	
I S H M N F W	1/25	
Q P P P A L T	1/25	
S K N H P S I	2/25	
P S L H P L T	1/25	
D S M H M Y T	1/25	
H L H R Q V P	1/25	
N S P Y P N T		1/20
S S Q L T R Q		1/20
N P Y V N S I		1/20
H F S R L Q D		1/20
G I Y P F R T		1/20
M N W H T R E		1/20
Q S S H A P R		1/20
F L H D V H A		1/20
T N K Q N I M		1/20
L S A Q T Y K		1/20
T H Q T D D Y		1/20
I K Q H Q T E		1/20
Y S P N R H L		1/20

b)	2ème
S A P T A P N	1/25
P A S N Y A T	1/25
L H K F I N S	1/25
H L K P S D D	1/25
T P L L G T K	1/25
M N T S R F P	1/25
Q D Q M M A L	1/25
L P P F T L S	1/25
N S A S N L M	1/25
T D T Q N A A	1/25
L Q K H P G R	1/25
Q N S Y P R S	1/25
L L K G I Q Q	1/25
P T P Y T Y Q	1/25
H H K L P R L	1/25
S E S S L R N	1/25
T N I H T P T	1/25
S S G P K T A	1/25
S P T T S R A	1/25
K P S T T A S	1/25
H T T L K S H	1/25
P D L H I N L	1/25
Y Q Y T N R S	1/25
L T R T Q M Q	1/25
K P T T Q L Q	1/25

	3ème
L G H H N R M	1/25
L G P I P H R	1/25
N E K P S K H	1/25
T K A P T H Q	1/25
K E A I M S M	1/25
W N S K A Q M	1/25
P Q Q A T K Y	1/25
M S P S A L Y	1/25
S G L K A A I	1/25
P N N S S H K	1/25
K P S P H T T	1/25
F P P N S P H	1/25
P G I P N G R	1/25
M L H K D R Q	1/25
N A G A I T F	1/25
Q S L Q N A L	1/25
T P T P T T Q	1/25
P L L V T T M	1/25
N T N H S G T	1/25
L P A L H Q A	1/25

Tableau 15 : Séquence des peptides sélectionnés sur la protéine EGhr. Les séquences obtenues lors de la sélection a) et b) sont indiquées dans le tableau. On note que pour la sélection a), 4 clones du 2ème passage et 7 clones du 3ème passage n'avaient pas d'insert. Pour la sélection b), 5 clones du 3ème passage n'avaient pas d'insert.

L'ADN du 4^{ème} passage de la sélection b) est en cours de séquençage. Si aucun peptide n'est redondant dans le 4^{ème} passage, il sera sûrement intéressant de réaliser un 5^{ème} passage sur la sélection b).

Analyse des peptides sélectionnés

Dans un premier temps, l'analyse de l'information apportée par chaque peptide a été effectuée avec le programme INFO du logiciel RELIC. Cette information donne une estimation de la probabilité que le peptide a été effectivement sélectionné pour ses qualités de liaison à la cible.

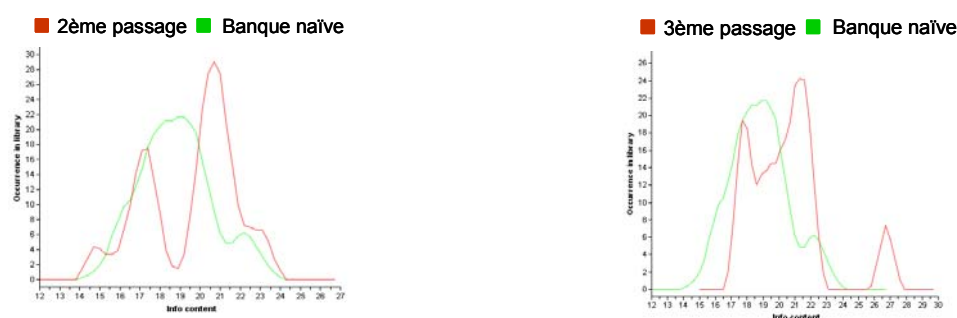


Figure 55 : Evolution de la population de phages au cours de la sélection a). La courbe en vert représente la répartition de 70 peptides sélectionnés au hasard dans la banque commerciale initiale (*données de NEB*) et la courbe en rouge les peptides séquencés à l'issue du 2^{ème} et 3^{ème} passage.

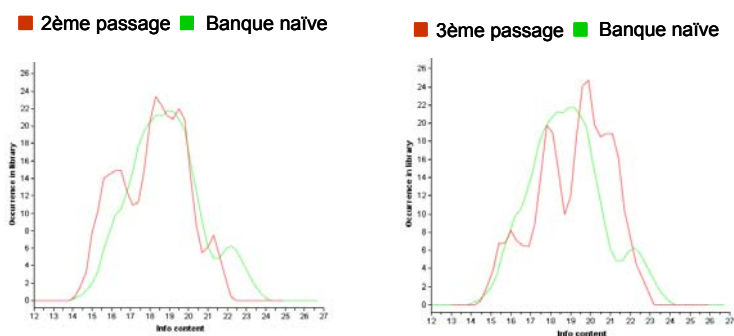


Figure 56 : Evolution de la population de phages au cours de la sélection b). La courbe en vert représente la répartition de 70 peptides sélectionnés au hasard dans la banque commerciale initiale (*données de NEB*) et la courbe en rouge les peptides séquencés à l'issue du 2^{ème} et 3^{ème} passage.

Les courbes des figures 55 montrent que, au cours de la sélection a), la population s'enrichit en peptides possédant de l'information. Pour la sélection b), la courbe se décale progressivement vers la droite du 2^{ème} au 3^{ème} passage. C'est pourquoi un 4^{ème} passage a été réalisé dont nous n'avons pas encore les résultats.

Les peptides ont été analysés avec le programme AnPep. Plusieurs motifs ont pu être identifiés (cf. tableau 16).

<table> <tr><th></th><th></th><th></th><th>K</th><th>P</th><th>S</th><th></th><th></th><th></th><th></th></tr> <tr><td></td><td>H</td><td>L</td><td>K</td><td>P</td><td>S</td><td>D</td><td>D</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td>N</td><td>E</td><td>K</td><td>P</td><td>S</td><td>K</td><td>H</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>K</td><td>P</td><td>S</td><td>P</td><td>H</td><td>T</td><td>T</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>K</td><td>P</td><td>S</td><td>T</td><td>T</td><td>A</td><td>S</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>K</td><td>P</td><td>T</td><td>T</td><td>Q</td><td>L</td><td>Q</td></tr> <tr><td>T</td><td>P</td><td>A</td><td>Q</td><td>R</td><td>P</td><td>S</td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>													K	P	S						H	L	K	P	S	D	D				N	E	K	P	S	K	H						K	P	S	P	H	T	T				K	P	S	T	T	A	S				K	P	T	T	Q	L	Q	T	P	A	Q	R	P	S																																	
			K	P	S																																																																																																								
	H	L	K	P	S	D	D																																																																																																						
	N	E	K	P	S	K	H																																																																																																						
			K	P	S	P	H	T	T																																																																																																				
			K	P	S	T	T	A	S																																																																																																				
			K	P	T	T	Q	L	Q																																																																																																				
T	P	A	Q	R	P	S																																																																																																							
<table> <tr><th></th><th></th><th></th><th>P</th><th>X</th><th>P</th><th>X</th><th>T</th><th></th><th></th></tr> <tr><td>N</td><td>S</td><td>P</td><td>Y</td><td>P</td><td>N</td><td>T</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td>K</td><td>P</td><td>S</td><td>P</td><td>H</td><td>T</td><td>T</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>P</td><td>T</td><td>P</td><td>Y</td><td>T</td><td>Y</td><td>Q</td><td></td></tr> <tr><td></td><td>T</td><td>P</td><td>T</td><td>P</td><td>T</td><td>T</td><td>Q</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td>M</td><td>P</td><td>G</td><td>P</td><td>R</td><td>T</td><td>P</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>T</td><td>F</td><td>P</td><td>L</td><td>P</td><td>G</td><td>T</td><td></td></tr> </table>													P	X	P	X	T			N	S	P	Y	P	N	T					K	P	S	P	H	T	T					P	T	P	Y	T	Y	Q			T	P	T	P	T	T	Q				M	P	G	P	R	T	P					T	F	P	L	P	G	T																															
			P	X	P	X	T																																																																																																						
N	S	P	Y	P	N	T																																																																																																							
	K	P	S	P	H	T	T																																																																																																						
		P	T	P	Y	T	Y	Q																																																																																																					
	T	P	T	P	T	T	Q																																																																																																						
	M	P	G	P	R	T	P																																																																																																						
		T	F	P	L	P	G	T																																																																																																					
<table> <tr><th></th><th></th><th></th><th>L</th><th>Q</th><th>N/E</th><th>X</th><th>L</th><th></th><th></th></tr> <tr><td>L</td><td>L</td><td>K</td><td>G</td><td>I</td><td>Q</td><td>Q</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>G</td><td>L</td><td>Q</td><td>N</td><td>S</td><td>L</td><td>P</td></tr> <tr><td></td><td>Q</td><td></td><td>S</td><td>L</td><td>Q</td><td>N</td><td>A</td><td>L</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>S</td><td>L</td><td>Q</td><td>E</td><td>T</td><td>L</td><td>P</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>N</td><td>L</td><td>Q</td><td>E</td><td>F</td><td>L</td><td>F</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>N</td><td>L</td><td>Q</td><td>E</td><td>F</td><td>L</td><td>F</td></tr> </table>													L	Q	N/E	X	L			L	L	K	G	I	Q	Q							G	L	Q	N	S	L	P		Q		S	L	Q	N	A	L					S	L	Q	E	T	L	P				N	L	Q	E	F	L	F				N	L	Q	E	F	L	F																														
			L	Q	N/E	X	L																																																																																																						
L	L	K	G	I	Q	Q																																																																																																							
			G	L	Q	N	S	L	P																																																																																																				
	Q		S	L	Q	N	A	L																																																																																																					
			S	L	Q	E	T	L	P																																																																																																				
			N	L	Q	E	F	L	F																																																																																																				
			N	L	Q	E	F	L	F																																																																																																				
<table> <tr><th></th><th></th><th></th><th>P</th><th>S/T</th><th>S/T</th><th>Q</th><th></th><th></th><th></th></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>S</td><td>S</td><td>Q</td><td>L</td><td>T</td><td>R</td></tr> <tr><td></td><td>S</td><td>A</td><td>P</td><td>T</td><td>A</td><td>P</td><td>N</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T</td><td>K</td><td>A</td><td>P</td><td>T</td><td>H</td><td>Q</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>W</td><td>P</td><td>T</td><td>L</td><td>Q</td><td>W</td><td>A</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>L</td><td>T</td><td>R</td><td>T</td><td>Q</td><td>M</td><td>Q</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>K</td><td>P</td><td>T</td><td>T</td><td>Q</td><td>L</td><td>Q</td><td></td></tr> <tr><td>T</td><td>P</td><td>T</td><td>P</td><td>T</td><td>T</td><td>Q</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>S</td><td>P</td><td>T</td><td>T</td><td>S</td><td>R</td><td>A</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>K</td><td>P</td><td>S</td><td>T</td><td>T</td><td>A</td><td>S</td><td></td></tr> </table>													P	S/T	S/T	Q								S	S	Q	L	T	R		S	A	P	T	A	P	N			T	K	A	P	T	H	Q						W	P	T	L	Q	W	A				L	T	R	T	Q	M	Q				K	P	T	T	Q	L	Q		T	P	T	P	T	T	Q						S	P	T	T	S	R	A				K	P	S	T	T	A	S	
			P	S/T	S/T	Q																																																																																																							
				S	S	Q	L	T	R																																																																																																				
	S	A	P	T	A	P	N																																																																																																						
T	K	A	P	T	H	Q																																																																																																							
		W	P	T	L	Q	W	A																																																																																																					
		L	T	R	T	Q	M	Q																																																																																																					
		K	P	T	T	Q	L	Q																																																																																																					
T	P	T	P	T	T	Q																																																																																																							
		S	P	T	T	S	R	A																																																																																																					
		K	P	S	T	T	A	S																																																																																																					
<table> <tr><th></th><th></th><th></th><th>P</th><th>Y/F</th><th>S/T</th><th>M/L</th><th>S</th><th></th><th></th></tr> <tr><td>W</td><td>A</td><td>F</td><td>P</td><td>Y</td><td>T</td><td>P</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td>P</td><td>T</td><td>P</td><td>Y</td><td>T</td><td>Y</td><td>Q</td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>Q</td><td>P</td><td>F</td><td>S</td><td>M</td><td>S</td><td>Y</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td>L</td><td>P</td><td>P</td><td>F</td><td>T</td><td>L</td><td>S</td><td></td></tr> </table>													P	Y/F	S/T	M/L	S			W	A	F	P	Y	T	P					P	T	P	Y	T	Y	Q					Q	P	F	S	M	S	Y				L	P	P	F	T	L	S																																																			
			P	Y/F	S/T	M/L	S																																																																																																						
W	A	F	P	Y	T	P																																																																																																							
	P	T	P	Y	T	Y	Q																																																																																																						
		Q	P	F	S	M	S	Y																																																																																																					
		L	P	P	F	T	L	S																																																																																																					
<table> <tr><th></th><th></th><th></th><th>P</th><th>L</th><th>L/X</th><th>X</th><th>T</th><th></th><th></th></tr> <tr><td></td><td></td><td>T</td><td>P</td><td>L</td><td>L</td><td>G</td><td>T</td><td>K</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td>P</td><td>L</td><td>L</td><td>V</td><td>T</td><td>T</td><td>M</td></tr> <tr><td>T</td><td>F</td><td></td><td>P</td><td>L</td><td>P</td><td>G</td><td>T</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Q</td><td>K</td><td></td><td>P</td><td>L</td><td>L</td><td>F</td><td>T</td><td></td><td></td></tr> </table>													P	L	L/X	X	T					T	P	L	L	G	T	K					P	L	L	V	T	T	M	T	F		P	L	P	G	T			Q	K		P	L	L	F	T																																																				
			P	L	L/X	X	T																																																																																																						
		T	P	L	L	G	T	K																																																																																																					
			P	L	L	V	T	T	M																																																																																																				
T	F		P	L	P	G	T																																																																																																						
Q	K		P	L	L	F	T																																																																																																						

Tableau 16 : Motifs particuliers redondants au sein des peptides sélectionnés sur l'endogline humaine.
En orange sont représentées les substitutions conservatives des acides aminés sur fond bleu. Les acides aminés différents qui s'alignent au même endroit ont été surlignés en violet.

Un motif KPS est retrouvé sur 6 peptides, le motif PXPXT sur 6 peptides, LQN/EXL sur 6 peptides, PS/TS/TQ sur 9 peptides, PY/FS/TM/LS sur 4 peptides et enfin PLL/XXT sur 4 peptides. Ces motifs ont été analysés sur le site Infobiogen. Le motif KPS est retrouvé sur la séquence de ALK-1 (Activin A Receptor-like 1). Il s'agit d'un récepteur de type I impliqué dans la voie du TGFβ. Les autres motifs n'ont pas montré d'alignement sur des protéines intéressantes.

Des tests ELISA « rapides » ont été réalisés avec les phages amplifiés sur la nuit dans des tubes de 1,5 ml et utilisés tels quels, après élimination des bactéries par centrifugation. Les phages portant le motif KPS n'ont pas donné un signal meilleur que le phage sans insert, à part le phage-HLKPSDD qui semblait se fixer légèrement mieux.

3.2.3.4. Alignement des peptides sélectionnés pour la liaison à l'endogline avec les ligands connus de l'endogline

Les peptides sélectionnés au cours de la sélection avec la banque de peptides sur phages ont été analysés avec le logiciel d'analyse de peptides RELIC[108] (*REceptor Ligand Contacts*) accessible gratuitement en ligne (<http://relc.bio.anl.gov/>), en utilisant le programme MATCH.

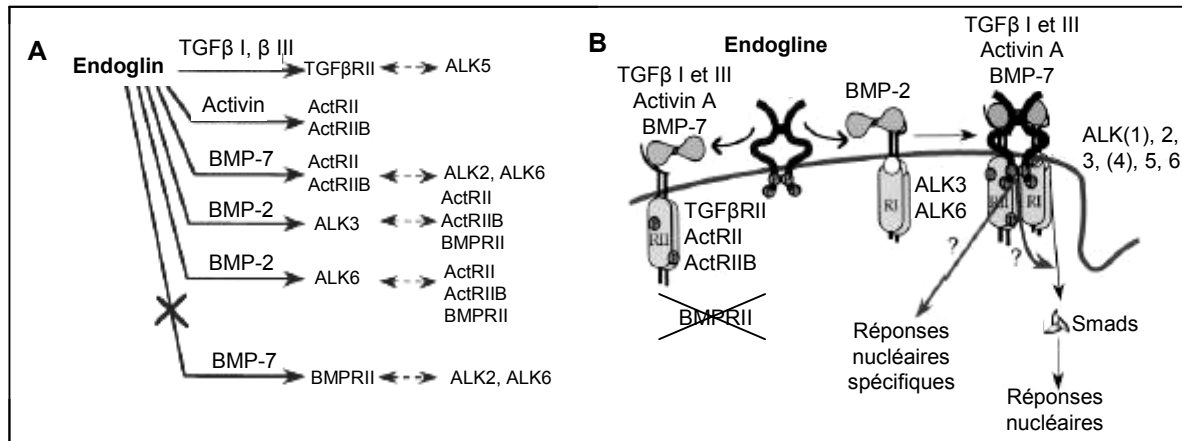


Figure 57 : Modèle d'interaction de l'endogline avec les membres de la famille du TGF-β [58]. A : Récapitulatif des ligands de l'endogline (au-dessus des flèches), les récepteurs de ces ligands et les partenaires respectifs présents dans les complexes. B : Mécanismes possibles d'interaction de l'endogline avec ses multiples partenaires.

En figure 57 A sont répertoriés les différents ligands connus de l'endogline sur lesquels ont été effectués les alignements des peptides. L'endogline se lie au TGFβ I, au TGFβ III, à l'activine-A, BMP-2 et BMP-7. Cependant, l'endogline a besoin de la co-expression de leur récepteur kinase respectif pour se lier. Le schéma B de la figure 57 montre que l'endogline se lie aux deux récepteurs de type I et II correspondant à la voie impliquée : par exemple, pour le TGFβ I et III, il s'agit du récepteur au TGFβ II et du récepteur au TGFβ (appelé également ALK5).

Seuls les alignements pour lesquels les peptides se retrouvent à des régions décrites impliquées dans des interactions avec l'endogline ont été représentés, à savoir TGFβ I et le récepteur II au TGFβ.

TGF βI

Cinq peptides s'alignent de manière significative sur la séquence du TGFβ I (*cf. figure 58*). SPGYSAL, TTPAASS et FASSVPR sont issus de la sélection sur les cellules B16-EGh et KGLSTHEY et PSLHPLT de la sélection sur la protéine recombinante.

```

iwsldtqyskvlalynqhnpgasapccvpqaleplpivyyvgrkpkveq 100
kglstey          spgysal          pslhplt
                tt      paass
                  fassvpr
  
```

Figure 58 : Alignement sur la séquence du TGFβ I.

L'alignement principal se situe entre les résidus 67 et 77 du TGF β 1. D'après la structure obtenue par cristallographie [136], les résidus 69-72 sont inclus dans un β turn de type 2 et les résidus 73 à 76 dans une boucle. Cette région comprise entre les résidus 69 et 72 est considérée comme jouer un rôle important dans la liaison de cette protéine à des récepteurs. En effet, les études de mutagenèse [137] de Qian et col. de 1994 ont montré que les résidus 69 à 72 étaient impliqués dans la liaison aux récepteurs dans certains systèmes : la délétion de ces résidus entraînait une forte diminution de l'activité d'inhibition de croissance du TGF β 1 sur les cellules colorectales LS513.

La comparaison des structures 3D du TGF β 1 et du TGF β 2 [136] a confirmé l'importance de cette région ainsi que des résidus 45 à 47 et de la partie C terminale de la protéine dans la liaison aux récepteurs. Cette région n'est cependant pas impliquée dans la liaison à haute affinité du récepteur au TGF β de type II.

Les phages-FASSVPR, -SPGYAL et -TPAASS ont été testés en immunofluorescence sur des cellules B16 transfectées avec le plasmide pC1-EGh et sur des cellules B16 non transfectées. 10^{10} et 10^{11} ufp de phage-peptide ont été mis en incubation pendant 1h à température ambiante sur les cellules préalablement fixées au PFA. Un anticorps Acl dirigé contre le phage M13 et un anticorps AclI dirigé contre Acl et marqué à la rhodamine ont permis de détecter la présence des phages-peptides. Cependant, pour les phages-TPAASS et -SPGYAL, il n'y avait pas de différence entre les cellules transfectées ou non. Pour le phage-FASSVPR, il semblerait que les phages étaient surtout localisés sur le contour cellulaire.

Afin de pouvoir conclure, ces peptides ont été testés en ELISA « rapide » sur la protéine recombinante. Les phages-FASSVPR et -SPGYAL ont donné un signal intéressant. Ils ont été amplifiés pour être testés en ELISA quantifié (cf. figure 61).

Le récepteur II du TGF β

vt d **nagavkfpq** lckfcdvrfstcdnqkscmsncsitsic **ekp** qevcvav 50
nagaitf **nekpskh**
 hhklprl
 m **nsgavs**

Figure 59 : Alignement sur la séquence du récepteur II au TGF β .

Les peptides NAGAITF, HHKLPR, MNSGAVS et NEKPSKH s'alignent sur une région accessible de la partie extracellulaire du récepteur II au TGF β (cf. figure 59 et 60). Ces peptides ont été testés en ELISA « rapide ». Les phages-HHKLPR et -NAGAITF ont donné un signal légèrement meilleur que le phage sans insert. Ils ont été amplifiés pour être testés en ELISA quantifié.

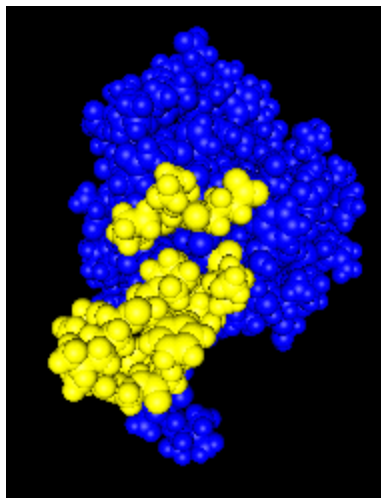


Figure 60 : Structure 3D de la partie extracellulaire du récepteur au TGF β . En jaune sont indiqués les acides aminés sur lesquels s'alignent les peptides.

Test ELISA sur l'endogline recombinante

Plusieurs phages-peptides d'intérêt ont été amplifiés et testés en ELISA sur l'endogline humaine :

- les phages-FASSVPR et –SPGYAL qui s'alignent sur le TGF β I et qui ont donné un signal important par rapport au phage sans insert en test ELISA « rapide » ;
- le phage-HHKLPRL qui s'aligne sur la séquence du récepteur II au TGF β et donnait un signal intéressant en test ELISA « rapide » ;
- le phage-HLKPSDD qui contient le motif KPS et donnait le meilleur signal par rapport aux autres peptides KPS en test ELISA « rapide » ;
- le phage-QSRISGT qui est apparu 20 fois sur 20 dans les clones séquencés d'un 3^{ème} passage sur l'endogline recombinante lors de la sélection a) (*non montré*) et le phage-SKNHPSI qui est apparu deux fois lors du séquençage du 2^{ème} passage de cette même sélection.

Deux quantités de phages-peptides ont été testées : $5 \cdot 10^9$ et 10^{10} ufp. Le graphe de la figure 61 montre qu'à 10^{10} ufp de phages, les phages-peptides qui s'alignaient sur des ligands de l'endogline et le phage qui contient le motif KPS ont donné un très fort signal par rapport au phage sans insert. D'autre part, le phage-QSRISGT n'a donné aucun signal et le phage-SKNHPSI montrait une fixation légèrement supérieure au phage sans insert.

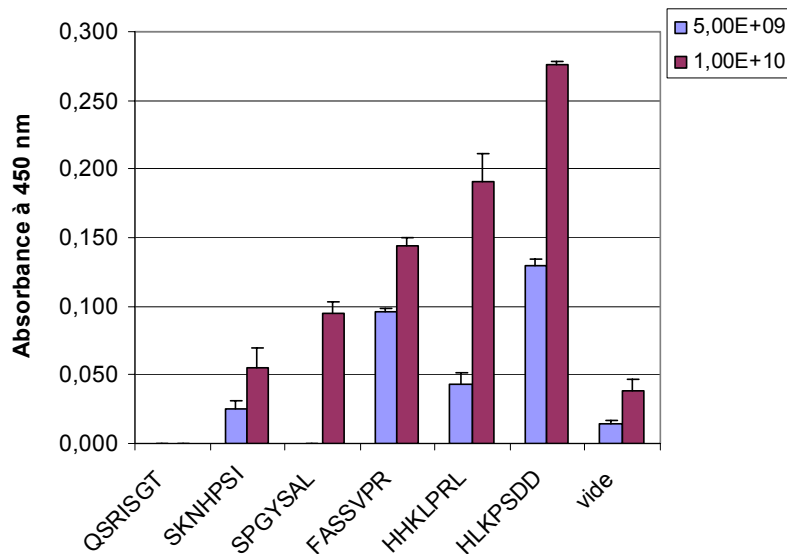


Figure 61 : Test Elisa des phages peptides-sur l'endogline recombinante. Deux quantités de phages ont été testées. Chaque point représente la moyenne de trois puits. Les phages-peptides ont été mis en incubation avec la cible pendant une heure à température ambiante. Après plusieurs lavages, les phage fixés ont été révélés par l'utilisation de l'anticorps anti-M13 couplé à la HRP, ajout du substrat et lecture de l'absorbance à 450 nm. L'utilisation d'un phage sans insert a permis de donner le bruit de fond. Les phages mis en incubation dans des puits sans endogline bloqués avec de la BSA ont donnée des valeurs de l'ordre du bruit de fond.

La spécificité de la liaison des phages-SPGY5AL, -FASSVPR, -HHKLPR L et -HLKPSDD va être caractérisée prochainement.

3.2.4. Conclusion

Le gène codant l'endogline humaine a été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote. Une transfection simple n'a pas permis d'obtenir une expression suffisante pour réaliser une sélection sur cellules avec une banque de peptides sur phages. Nous avons obtenu une population B16-EGh enrichie en cellules exprimant l'endogline par sélection des cellules exprimant l'endogline avec un antibiotique. Le gène codant la protéine de fusion EGFP-EGh va permettre de faciliter l'obtention d'une lignée stable 3T3-EGh -EGFP.

La population B16-EGh a été utilisée pour réaliser une sélection sur l'endogline cellulaire avec une banque linéaire de peptides sur phages. Les peptides sélectionnés ne présentaient pas de motif consensus, ni un peptide redondant. Pour améliorer la spécificité de la sélection, une banque contrainte de peptides sur phages a été utilisée sur la protéine recombinante. Quelques motifs particuliers ont alors pu être identifiés. Par ailleurs, les peptides s'alignant sur la séquence du TGFβ I et du récepteur II au TGFβ, ainsi qu'un peptide contenant le motif KPS ont montré une liaison très supérieure à celle du phage sans insert sur l'endogline en test ELISA. La liaison à l'endogline des peptides correspondant va être caractérisée prochainement.

4. Discussion

Mon travail de thèse a porté sur le ciblage de la vascularisation tumorale : des molécules ciblant l'endothélium tumoral ont été recherchées dans le but d'amener des molécules thérapeutiques spécifiquement vers l'endothélium tumoral afin de le détruire et d'atteindre la tumeur qui en dépendait. D'après les données de la littérature, deux cibles ont été identifiées pour notre étude : la sélectine E et l'endogline.

Le ciblage de la sélectine E a consisté en la synthèse de plusieurs familles de mimes du SleX qui ont été testés dans un test d'adhésion cellulaire. Des ligands peptidiques de la sélectine E ont également été recherchés par sélection avec une banque de peptides sur phages.

Le clonage de l'endogline et son expression dans une lignée cellulaire ont été réalisés afin de rechercher des ligands peptidiques de l'endogline par sélection avec une banque de phages. L'établissement d'une lignée stable exprimant fortement l'endogline humaine a cependant posé plusieurs problèmes et la sélection avec la banque de peptides a été réalisée également sur la protéine recombinante commerciale.

4.1. Ciblage de l'endothélium activé des zones tumorales et inflammatoires : la sélectine E

4.1.1. Recherche de mimes du ligand naturel, le SleX

L'objectif était de synthétiser des mimes du SleX qui possèdent une affinité au moins égale à celui-ci dans la liaison à la sélectine E. En s'appuyant sur les groupes clés de l'interaction entre le SleX et la sélectine E [118], des mimes de structure plus simple et plus facilement synthétisables que le SleX ont été élaborés. Ces mimes devaient en outre présenter une bonne stabilité et une affinité supérieure ou égale au ligand naturel. L'objectif final est de les utiliser pour inhiber la formation de métastases ou pour réaliser un transfert d'un gène thérapeutique ciblé par greffage sur des vecteurs lipidiques.

A cet effet, un test d'adhésion mettant en compétition des molécules avec le ligand naturel exprimé à la surface des cellules HL-60 pour la liaison à la sélectine E a été mis au point. Ce test a permis de mesurer l'affinité de plusieurs familles de mimes pour la sélectine E. Ces mimes correspondent à différentes stratégies de ciblage : mimes de Wong décrits comme d'excellents ligands [119], mimes dérivés du mannose et du fucose en s'appuyant sur les substitutions de groupe classiquement utilisées [116] et mimes dérivés de l'acide quinique, dans la recherche de mimes de petite taille non glycosylés [124]. La valeur d'IC₅₀, reflétant l'affinité de ces mimes, a été déterminée en test d'adhésion et aucun des mimes testés, excepté Wong2~, n'a donné une IC₅₀ permettant d'envisager leur utilisation comme tête de ciblage en test *in vitro*. De plus, l'apparente inhibition de fixation des cellules HL-60 par Wong2~ s'est avérée être le résultat d'un effet détergent sur les cellules, à relier à la présence d'une longue chaîne carbonée.

L'absence de résultats positifs pour les mimes de Wong était surprenante, puisque ces mimes ont été synthétisés suite aux publications de cette équipe [119]. Les écarts importants observés entre nos valeurs d'IC₅₀ et celles publiées peuvent s'expliquer par des différences dans le test d'adhésion utilisé (*cf. figure 62*). Ainsi, C-H Wong et coll. utilisent une protéine de fusion comportant le domaine extracellulaire de la sélectine E avec une partie constante κ d'immunoglobuline de souris, cette dernière servant à la fixation de la sélectine sur le support [122]. Ensuite, le ligand de référence utilisé dans les travaux de C-H Wong est un polymère qui alterne des molécules de SleA avec des

molécules de biotine utilisées pour la révélation. Le SleA est un ligand de la sélectine E qui diffère du SleX par une liaison $\beta 3$ au lieu de $\beta 4$ entre le galactose et la N-acétylglucosamine et une liaison $\alpha 4$ au lieu de $\alpha 3$ entre cette dernière et le fucose. L'IC₅₀ du SleX obtenu avec le test d'adhésion de G. Weitz-Schmidt est égal à 550 μ M [122].

Le test d'adhésion de C-H Wong est de ce fait plus éloigné du contexte cellulaire. De plus, n'utilisant pas de cellules, ce test ne permet pas de vérifier l'absence de toxicité des mimes, comme constaté avec le mime Wong2 supplémenté d'une chaîne carbonée. L'échec des deux autres stratégies reflète la difficulté de synthétiser les molécules adéquates mimant le SleX.

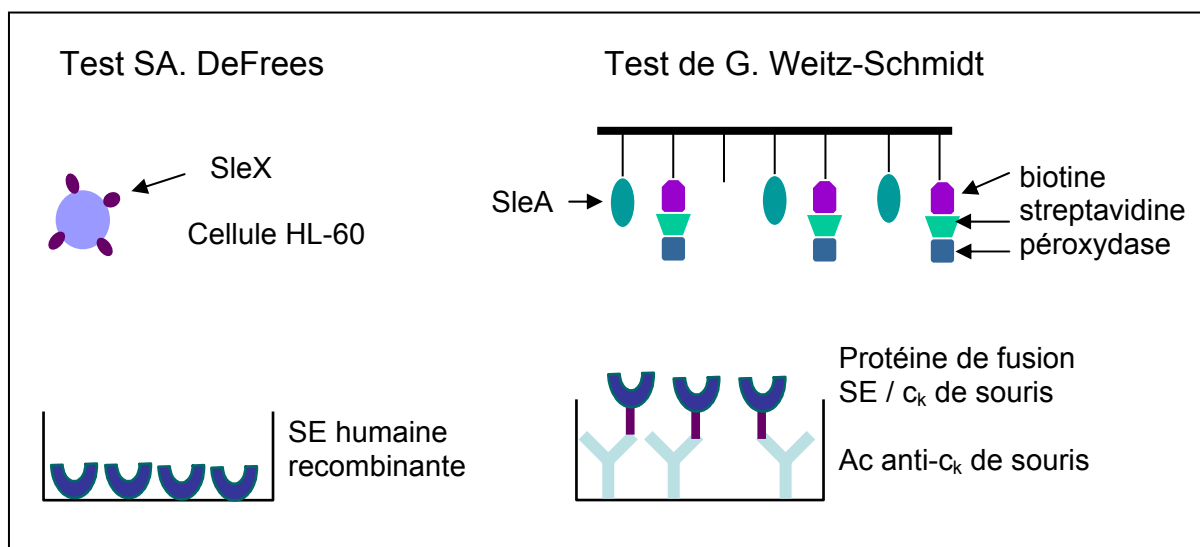


Figure 62 : Différences entre le test d'adhésion décrit par SA. DeFrees (utilisé dans notre étude) et le test décrit par G. Weitz-Schmidt utilisé par C-H Wong. Le test de SA. DeFrees est réalisé sur la protéine recombinante commerciale (partie extracellulaire) de la sélectine E qui est adsorbée directement à la surface des puits. Dans le test de G. Weitz-Schmidt, la partie extracellulaire de la sélectine E en protéine de fusion avec la partie constante c_k de la chaîne légère d'une immunoglobuline de souris est fixée au fond du puits par un anticorps anti-c_k de souris. La deuxième différence réside dans le ligand de la sélectine utilisé : dans le test de SA. DeFrees, il s'agit du SleX naturel exprimé à la surface des cellules HL-60 et dans le deuxième cas, il s'agit d'un polymère de SleA qui alterne des SleA avec des molécules de biotine. Avant le test d'adhésion, le polymère est mis en incubation avec une solution de streptavidine-péroxydase.

Malgré l'absence d'affinité des mimes testés, nous disposons d'un test d'adhésion fiable, reproductible et qui présente l'avantage d'être proche du modèle cellulaire pour mesurer l'affinité des mimes. Il reste à trouver un mime non toxique, possédant une bonne affinité pour la sélectine E, qui sera alors testé en transfection ciblée *in vitro* et *in vivo*. En cas de succès, la destruction de l'endothélium tumoral pourra être envisagée par introduction d'un gène pro-apoptotique en transfert de gène non viral ou simplement en apportant une molécule cytotoxique. La capacité du mime à inhiber la formation de métastases sera également testée.

4.1.2. Recherche de peptides ciblant la Sélectine E

La recherche de ligands peptidiques de la sélectine E par sélection avec des banques de peptides sur phages a intéressé plusieurs groupes. Martens [129] et son équipe ont décrit en 1995 plusieurs peptides se liant à la sélectine E. Parmi ces peptides, DITWDQLWDLMK inhibait l'adhésion des neutrophiles à la sélectine E *in vitro* et *in vivo*, mais ne semble pas avoir été utilisé par la suite. La sélection de ces peptides avait été réalisée sur la partie extracellulaire de la sélectine E recombinante avec une banque linéaire de 12 acides aminés. La fixation du peptide sur la sélectine E ne dépendait pas de la présence de calcium et il ne rentrait pas en compétition avec le SleX, suggérant une fixation sur un autre site de liaison de la sélectine E.

En 2000, Fukuda et son équipe ont décrit un peptide IELLQAR [138] qui inhibait la liaison du SleX, de son analogue le SleA et des cellules HL-60 sur la sélectine E. Ce peptide injecté *in vivo* inhibait la formation de tumeurs à partir de cellules B16 et à partir de cellules tumorales de poumon humain. En 2002, le même groupe a montré que ce peptide diminuait l'inflammation *in vivo* [139]. Il est intéressant de noter que ce peptide avait été sélectionné sur un anticorps anti-SleA.

La sélection sur la sélectine E cellulaire avec une banque de peptides sur phages n'avait pas été décrite. Nous avons choisi de chercher des ligands peptidiques de la sélectine E cellulaire en utilisant une banque linéaire de sept acides aminés. Il faut noter que, dans le modèle cellulaire utilisé, d'autres protéines sont également surexprimées à la surface des HUVECs activées. Néanmoins, il était intéressant de trouver un peptide ciblant l'endothélium activé, même si la liaison ne se faisait pas *via* la sélectine E.

Plusieurs phages-peptides ont montré une fixation intéressante sur la sélectine E par rapport au phage sans insert en test ELISA, et également sur la sélectine P. Or, l'activation des HUVECs avec l'interleukine-1- β active la translocation de la sélectine P stockée dans les granules de Weibel-Palade à la surface des cellules. La spécificité de liaison de ces peptides à la sélectine E et P va être étudiée prochainement, avec notamment l'utilisation de peptides synthétiques. Le ciblage de la sélectine P est très intéressant, même si son efficacité dans le ciblage tumoral est moins claire que pour la sélectine E.

Afin d'améliorer la spécificité de la sélection sur la sélectine E, nous avons introduit une étape de sélection sur la sélectine E recombinante entre les passages sur cellules, mais sans succès. Nous pourrions améliorer l'élution des phages liés à la cible en exploitant le fait que la sélectine E est rapidement internalisée après exposition à la surface des cellules [131] : après incubation à 37°C des phages avec les HUVECs activées, seuls les phages-peptides internalisés par les cellules sont récupérés [93, 110, 140].

De nombreuses équipes se sont intéressées à la recherche de molécules ciblant la sélectine E. Cependant, les résultats ont souvent été décevants. Classiquement, des mimes du SleX ou d'autres molécules inhibant la liaison du SleX à la sélectine E sont recherchés et quelques équipes ont essayé d'autres techniques comme la recherche de ligands peptidiques en utilisant des banques de phages. Des aptamères ciblant la sélectine L [141, 142] et le SleX [143] ont également été recherchés avec succès. Néanmoins, il reste encore de la place pour de nouveaux ligands plus spécifiques de la sélectine E et utilisables *in vivo* pour une action thérapeutique.

4.2. Ciblage de l'endothélium angiogénique tumoral : l'endogline

L'intérêt de l'endogline comme cible dans des thérapies anti-cancéreuses a été démontré par plusieurs équipes (*cf.* 1.3.2.4.). Dans notre étude, des banques de peptides sur phages ont été utilisées pour trouver des ligands peptidiques de l'endogline humaine. Les différentes sélections réalisées ont permis d'identifier des ligands potentiels de l'endogline dont il faudra vérifier l'affinité et la spécificité.

4.2.1. Etablissement d'une lignée stable exprimant l'endogline humaine

La recherche de ligands de l'endogline humaine avec une banque de peptides sur phages impliquait de disposer de la protéine. Nous avons choisi de cloner le gène codant l'endogline en entier et de réaliser une sélection sur cellules au lieu de n'exprimer que la partie extracellulaire et réaliser la sélection sur la protéine purifiée. La sélection sur l'endogline cellulaire nécessitait de réaliser une sélection différentielle avec des passages « négatifs » sur des cellules n'exprimant pas la cible et des passages positifs sur des cellules surexprimant la cible. Ainsi, une partie du bruit de fond lié aux phages se fixant sur d'autres sites cellulaires est éliminée.

Le gène codant l'endogline humaine a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pVAXII. Cependant, la transfection transitoire de ce plasmide avec des lipides cationiques formulés en liposome n'a pas donné un taux d'expression important (environ 3% des cellules exprimaient la cible). Afin d'enrichir la population en cellules exprimant la cible, le gène codant l'endogline humaine a été transféré dans le vecteur d'expression eucaryote pC1 possédant un gène de résistance à la néomycine sous promoteur eucaryote. Cette sélection avec un antibiotique après électroporation de cellules B16 et 3T3 avec le plasmide pC1-EGh a permis d'obtenir une population hétérogène de cellules exprimant l'endogline humaine à différents taux. La population de cellules B16-EGh a été utilisée pour un premier essai de sélection avec la banque de peptides sur phages linéaire.

Cependant, les conditions optimales étant de sélectionner sur une population homogène de cellules surexprimant l'endogline, différentes conditions ont été testées pour isoler un clone 3T3 exprimant très fortement l'endogline, mais sans succès. Pourtant, l'électroporation est en général une technique très efficace pour réaliser des lignées stables. Dans notre cas, la sélection par l'antibiotique était inefficace, car de nombreux clones résistants à la néomycine, mais n'exprimant pas l'endogline étaient sélectionnés. Le gène de l'endogline étant relativement grand (2,2 kb contre par exemple 800 pb pour le gène codant l'EGFP), il est possible que le plasmide ne s'intègre pas en entier.

Dans le laboratoire, nous avons déjà été confrontés à ce problème lors de l'établissement d'une lignée stable exprimant la GFP, la Dsred et la luciférase : pour les deux premiers gènes rapporteurs, la petite taille du plasmide correspondant (4,7 pour pEGFP-C1 et 4,1 kb pour pDsRed2-1) et le deuxième type de sélection des clones positifs en regardant la fluorescence respectivement dans le vert et dans le rouge ont permis de réaliser relativement rapidement la lignée stable. Pour le plasmide codant la luciférase (5,7 kb), nous avons rencontré les mêmes problèmes que pour le plasmide pc1-EGh (5,9 kb). La solution pour le plasmide codant la luciférase a alors été de sélectionner les clones positifs qui émettaient de la luminescence après ajout du substrat de la luciférase, la luciférine.

Dans notre cas, on ne disposait pas d'un tel système de deuxième sélection, ce qui rend le processus de sélection des clones positifs plus long et moins efficace, puisqu'il faut cribler un nombre beaucoup plus important de clones. La détection des clones était réalisée en immunofluorescence, ce qui implique de cultiver chaque clone en double, l'un pour le test en immunofluorescence, l'autre pour l'amplification en cas de clone positif. Les désavantages de cette technique sont la lourdeur de l'expérience, le temps et le coût, puisqu'une quantité importante d'anticorps était consommée.

Il était nécessaire d'avoir un deuxième système de sélection des clones positifs : une protéine de fusion comportant l'endogline avec la protéine fluorescente EGFP en C-terminal a été réalisée par clonage du gène codant l'EGFP dans le plasmide pC1-EGh. La lignée stable est en cours de réalisation. Son obtention devrait être facilitée par la double sélection : sélection des clones résistants à la néomycine et repiquage uniquement des clones qui émettent de la fluorescence dans le vert. Ainsi, pour une efficacité d'électroporation de 5%, les 5 clones exprimant l'EGFP seront directement détectés au microscope, alors que sans la protéine de fusion, on serait obligé de cribler 100 clones en immunofluorescence pour obtenir le même résultat.

Finalement, la sélection sur l'endogline avec la banque de peptides sur phages n'a pas été réalisée sur la lignée stable 3T3-EGh-EGFP. L'établissement de la lignée stable reste intéressant pour tester les phages-peptides d'intérêt dans un contexte cellulaire, avec la possibilité de réaliser une colocalisation des phages et de l'endogline. Par la suite, cette lignée stable permettra de disposer d'un bon modèle pour étudier *in vitro* le ciblage spécifique de molécules thérapeutiques vers l'endogline.

4.2.2. Recherche de ligands peptidiques de l'endogline

La recherche de ligands peptidiques de l'endogline par sélection d'une banque de peptides sur phages n'a pas permis, pour l'instant, de trouver des ligands spécifiques et présentant une bonne affinité pour la cible.

La sélection sur l'endogline a d'abord été réalisée sur une population hétérogène de cellules qui, en moyenne, n'exprimait pas fortement l'endogline humaine et qui d'autre part exprimait de manière constitutive l'endogline de souris. Ces conditions n'étaient pas optimales pour réaliser une sélection différentielle. Cependant, ce procédé pourra être amélioré en utilisant la lignée stable 3T3-EGh en cours, exprimant fortement l'endogline. Nous pourrions également envisager de réaliser une sélection positive en alternant deux lignées positives : par exemple, on pourrait imaginer une sélection positive sur les HUVECs suivi d'une sélection positive sur des cellules 3T3 transfectées par pC1-EGh. Il est important que les deux lignées positives soient éloignées pour éliminer efficacement les phages se liant sur d'autres sites cellulaires. Ainsi, l'équipe de R.J. Goodson a réalisé avec succès une sélection sur le récepteur de l'urokinase humaine sur deux lignées positives, - l'une de mammifère, l'autre d'insecte -, transfectées avec le gène codant ce récepteur [95].

Ensuite, la méthode de sélection BRASIL n'est peut être pas aussi sensible et spécifique que le prétendent les auteurs. L'article de Giordano et coll décrivant cette méthode en 2001 [104] n'a pas été suivi d'autres publications de sélection de banques de phages avec cette méthode. Dans le cas d'une sélection classique sur cellules adhérentes, l'élution pourrait être améliorée en décrochant les phages liés à l'endogline avec un de ses ligands, comme le TGFβ I.

D'après les résultats de la bibliographie, la sélection sur protéine recombinante semble plus efficace que sur cellules. Dans notre cas, la sélection sur la partie extracellulaire de l'endogline recombinante n'a pas été très concluante, malgré l'utilisation de conditions de plus en plus stringentes pour améliorer la spécificité de la sélection. Le fait que l'endogline recombinante ait été adsorbée sur le plastique présente le risque d'obtenir une mauvaise conformation de la protéine. Cependant, il est tout simplement possible que les deux banques utilisées ne possèdent pas une séquence spécifique de l'endogline. Une banque linéaire présentant des peptides de 10 acides aminés va être prochainement testée sur l'endogline recombinante [144].

En améliorant les conditions de la sélection, des ligands peptidiques de l'endogline devraient être identifiés. Après validation de leur spécificité en compétition avec les peptides synthétiques correspondants et détermination de leur IC50, ces peptides pourront dans un premier temps être testés en transfert de gène ciblé *in vitro* et *in vivo*, par couplage sur des lipides PEG. Par la suite, ces peptides pourront être modifiés afin d'améliorer leur stabilité, biodisponibilité et éventuellement spécificité.

4.3. Conclusion et perspectives

4.3.1. Outils pour l'analyse des peptides sélectionnés à partir d'une banque de peptides sur phages

Dans le cas d'une sélection réussie, le ou les peptides majoritaires montrent une grande spécificité pour la cible en test ELISA *in vitro*, puis par compétition avec des peptides synthétiques ou des ligands connus. Dans d'autres cas, un motif particulier est redondant et il est nécessaire de disposer d'un logiciel d'analyse qui repère des motifs dans une large population de peptides.

Dans notre cas, quelques motifs particuliers sont apparus lors de la sélection sur l'endogline, mais ils ne concernaient qu'un nombre limité de peptides. Il est alors utile d'avoir des moyens d'évaluer le processus de sélection. D'après les données de la bibliographie, l'évolution du rapport phages liés / phages total est un bon indice de l'efficacité de la sélection. Cependant, un rapport phages liés / phages total proche de 1 n'implique pas que le peptide redondant sera spécifique de la cible.

Le programme RELIC propose un deuxième outil qui permet de suivre l'évolution de la sélection : le programme INFO associe une valeur d'information à chaque peptide sélectionné. Plus cette information est grande, moins le peptide a de chance d'avoir été sélectionné du fait du hasard (par exemple grâce un avantage de croissance plutôt que par son affinité pour la cible). Cette information est en effet calculée à partir de la fréquence dans la banque initiale de chaque acide aminé à chaque position dans le peptide. Le logiciel trace une courbe qui associe l'information portée par un peptide en abscisse à son abondance dans la population de phages en ordonnée. Le décalage de la courbe obtenue à partir des peptides sélectionnés par rapport à celle réalisée avec des peptides de la banque initiale donne une idée de l'évolution positive ou négative de la sélection. Mais cela n'implique pas que le peptide possédant le maximum d'information sera le meilleur ligand.

Ensuite, au lieu de séquencer une grande quantité de peptides, une méthode intéressante est de tester en ELISA des clones prélevés de manière aléatoire à partir du 2^{ème} ou 3^{ème} passage. Seuls les clones qui donnent un signal fort sur la cible sont séquencés. Cette méthode permet d'éviter de séquencer des peptides qui ne sont pas intéressants [129, 144].

Enfin, même si l'objectif n'est pas de dresser une carte de l'interaction entre un ligand et sa cible, les peptides obtenus peuvent être alignés sur la séquence des ligands potentiels de la cible. La première difficulté est d'avoir une idée des ligands de la cible. D'autre part, il est nécessaire de connaître la structure 3D et/ou avoir des informations sur les lieux d'interactions entre le ligand et sa cible. En effet, si l'alignement se fait dans une région inaccessible de la protéine, cela invalide l'hypothèse d'interaction. Dans tous les cas, les peptides d'intérêt doivent être testés *in vitro*. Ainsi, si les peptides sélectionnés se situent au niveau du site d'interaction du ligand avec la cible, mais possèdent une mauvaise affinité pour celle-ci, le processus de sélection est néanmoins validé.

4.3.2. L'importance relative de la diversité de la banque

Définitions de la diversité

L'estimation de la diversité de la banque est un outil précieux pour connaître la qualité de notre banque de départ, pour comparer différentes banques entre elles et pour évaluer l'enrichissement d'une population de phages en séquences positives. Le problème est de réussir à mesurer la diversité de la banque, car pour une bonne mesure de la diversité, il faudrait séquencer des millions de peptides, ce qui n'est pas réalisable. Des outils statistiques ont été développés afin de pouvoir mesurer la diversité d'une banque à partir d'un nombre limité de séquences [145].

Deux approches sont possibles pour mesurer la diversité. On peut définir :

- **la diversité technique** qui mesure le pourcentage des différents membres possibles dans la population et permet de voir dans quelle mesure la banque est complète ;
- **la diversité fonctionnelle** [146] qui prend en compte également le nombre de copies. Intuitivement, si le nombre de copies est extrêmement différent entre les différents membres, la diversité est plus faible.

La diversité fonctionnelle semble mieux refléter la réalité : la diversité n'est pas une simple mesure du nombre de séquences peptidiques dans une population, mais elle dépend de l'abondance relative de chaque peptide au sein de la population.

Calculs de la diversité

L'approche statistique donnée par Makowski et son équipe [145] estime la diversité à :

$$d = 1 / (N \sum p_k^2) \quad (1)$$

où d est la diversité, N le nombre de peptides possibles, p_k la probabilité de sélection du $k^{\text{ème}}$ peptide.

Présentée ainsi, la diversité est impossible à calculer, sauf si on considère la probabilité q'un acide aminé soit à une position donnée comme indépendante des acides aminés présents aux autres positions. Dans ce cas,

$$p_k = \prod p_{ij} \quad (2)$$

où p_{ij} est la probabilité d'avoir l'acide aminé j (compris entre 1 et 20) à la $i^{\text{ème}}$ position (i compris entre 1 et M).

La probabilité p_{ij} peut être approximée par la fréquence f_{ij} de l'acide aminé dans la banque. Ainsi, pour une banque de peptides aléatoires comportant M acides aminés, la taille de la banque est 20^M et la diversité est égale à :

$$d = 1 / (20^M \prod_i (\sum_j f_{ij}^2)) \quad (3)$$

Cependant, si la diversité est calculée avec l'équation (3) en utilisant moins de 500 séquences peptidiques, la diversité est systématiquement sous-évaluée. L'erreur systématique peut être corrigée en considérant que la fréquence des acides aminés suit une loi de poisson. La diversité corrigée devient :

$$d_e = 1 / (20^M \prod_i (\sum_j (f_{ij}^2 - \sigma^2(f_{ij})))) \quad (4)$$

Grâce au logiciel RELIC, la diversité des banques que nous avons utilisées a été calculée en utilisant l'équation (4) et les séquences des 70 clones séquencés au hasard à partir de la banque linéaire naïve obtenues par NEB. La diversité de la banque contrainte a été calculée à partir des séquences données sur RELIC. Ces résultats figurent dans le tableau 17.

Banque NEB, 7 acides aminés	Diversité	Ecart-type	Nombre de séquences analysées
Linéaire	0,059457	0,028494	70
Contrainte	0,080646	0,032126	100

Tableau 17 : Evaluation de la diversité des banques commerciales NEB.

Conclusion sur la diversité des banques utilisées

Après calcul, les valeurs de diversité des banques utilisées paraissent faibles, 6 à 8% (*cf. tableau 17*). Cependant, en prenant l'exemple de la banque NEB linéaire de 7 acides aminés, la diversité est égale à 0,059, ce qui équivaut à une banque où 5,9 % des membres sont représentés en proportion égale, soit $7,6 \cdot 10^7$ membres sur une population totale de $20^7 = 1,28 \cdot 10^9$. Ainsi, bien que la banque ne soit pas complète, la population utilisée reste très complexe.

D'autre part, l'importance de la diversité est toute relative. Ainsi, même dans les meilleures conditions, une banque de 15 acides aminés peut difficilement être complète : pour que chaque peptide soit représenté une fois dans la banque, cela correspond à $20^{15} = 3,2 \cdot 10^{19}$ peptides. Outre le fait que, techniquement, une telle banque aussi complète n'est pas réalisable, la quantité de phages utilisée pour la sélection excède rarement 10^{11} ufp, quelque soit la taille de la banque. Or, par exemple, les

peptides comportant le motif EWVDV [135] sélectionnés avec succès sur la sélectine P humaine donnaient une IC₅₀ de 2 µM. Dans ce cas, une banque contrainte de 15 acides aminés avait été utilisée avec une quantité initiale de 10¹⁰ ufp de phages pour la sélection.

En conclusion, même s'il est important d'avoir la banque de peptides sur phages la plus complète possible afin que toutes les combinaisons soient représentées, privilégier une banque beaucoup moins complète mais de grande taille (jusqu'à 20 acides aminés) donne également d'excellents résultats.

4.3.3. Optimisation des peptides sélectionnés pour un ciblage de la vascularisation tumorale

Plusieurs phages peptides sélectionnés contre la sélectine E et l'endogline ont montré une affinité pour la cible en test ELISA par rapport au phage sans insert. Ces peptides vont être testés en compétition avec des peptides synthétiques pour évaluer leur spécificité pour la cible.

Leur interaction sera également caractérisée selon la cible : concernant les sélectines E et P, les peptides seront mis en compétition avec le ASleX et le SleX exprimé à la surface des cellules HL-60 et on regardera si le mécanisme est dépendant du calcium afin de déterminer si le peptide se fixe au niveau du site d'interaction des sélectines avec le SleX. Les peptides ciblant l'endogline pourront être testés en compétition avec ces ligands, notamment le TGFβ I et le récepteur II au TGFβ.

Parmi les peptides sélectionnés qui s'avèrent être de bons candidats, il faudra peut-être envisager d'améliorer leur affinité, spécificité et stabilité en vue d'une utilisation *in vivo*. Classiquement, des banques de peptides sont générées avec des variations autour d'un motif intéressant (évolution directe). Une autre stratégie consiste à utiliser la chimie combinatoire. Par exemple, le peptide EWVDV [147] sélectionné sur la sélectine P présentait une IC₅₀ de 2 µM. En réalisant un tétramère de ce peptide par couplage à la streptavidine, l'affinité obtenue était 500 fois supérieure. Cette stratégie démontrait l'efficacité de la multivalence, mais ne permettait pas une utilisation *in vivo* sous cette forme. Par chimie combinatoire, des dérivés contenant de l'acide gallique ont permis d'obtenir des affinités de l'ordre du nanomolaire.

Les peptides présentant une affinité et spécificité suffisantes pour la cible seront testés en transfection ciblée. Dans l'unité, nous travaillons sur la recherche de vecteurs permettant un transfert de gène ciblé vers les tumeurs. En effet, afin d'améliorer la biodisponibilité des lipoplexes (liposomes couplés à l'ADN) dans la circulation après injection *iv*, des lipides PEG sont ajoutés dans la formulation des lipoplexes pour masquer les charges de surface liées aux lipides cationiques. Des particules dites « furtives » sont ainsi obtenues. L'objectif est de greffer à la surface d'une partie des PEG des têtes de ciblage pour rediriger les lipoplexes vers la zone d'intérêt.

Dans un premier temps, les peptides ciblant les sélectines ou l'endogline seront greffés sur des lipides PEG et formulés en liposomes avec des lipides cationiques. Le ciblage, l'internalisation des lipoplexes et l'expression du gène rapporteur pourront être étudiés *in vitro* sur le modèle des HUVECs activées contre les HUVECs non activées pour les sélectines et sur la lignée stable 3T3-EGh-EGFP en cours contre les cellules 3T3 sauvages pour l'endogline.

Si un ciblage est observé, les lipoplexes seront alors testés *in vivo* sur un modèle de tumeur de souris 3LL (adénocarcinome de poumon de souris). Nous avons en effet mis en évidence dans ce modèle l'expression de l'endogline sur l'endothélium tumoral par immunofluorescence.

Nous pouvons également envisager de coupler deux peptides différents, dirigés contre la même cible ou contre les deux cibles différentes afin d'améliorer le ciblage. Il sera également possible de coupler le peptide ciblant directement à une molécule cytotoxique comme la doxorubicine et étudier la spécificité de la toxicité sur des cellules exprimant la cible par rapport à des cellules ne l'exprimant pas.

Enfin, d'autres ligands peptidiques de l'endogline humaine vont être recherchés avec une banque linéaire de 10 acides aminés en réalisant une sélection classique avec une élution non spécifique comme dans le présent travail. Nous envisageons également de réaliser une sélection avec une élution spécifique des phages liés à l'endogline par l'utilisation du TGF β I. Par cette dernière méthode, non seulement des ligands de l'endogline pourront être sélectionnés, mais ils permettront peut-être également d'identifier la région d'interaction du TGF β I avec l'endogline.

En conclusion, les stratégies anti-vasculaires constituent des approches prometteuses en thérapie anti-cancéreuse. Les peptides ciblant la vascularisation tumorale semblent suivre le chemin des anticorps monoclonaux dans la voie de molécules thérapeutiques d'avenir. D'autre part, la sélection de banques de peptides sur phages est un outil puissant, mais dont le succès n'est pas prévisible car de nombreux facteurs qui ne sont pas toujours maîtrisés entrent en compte.

Bibliographie

Bibliographie

1. Remontet, L., et al., *Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000*. 2003, INVS.
2. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Ann Oncol, 2005. **16**(3): p. 481-8.
3. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
4. Nabel, G.J., et al., *Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11307-11.
5. Rainov, N.G., *A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(17): p. 2389-401.
6. Korn, T., R. Muller, and R.E. Kontermann, *Bispecific single-chain diabody-mediated killing of endoglin-positive endothelial cells by cytotoxic T lymphocytes*. J Immunother, 2004. **27**(2): p. 99-106.
7. Payne, G., *Progress in immunoconjugate cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 207-12.
8. Peng, B.G., et al., *Tumor vaccine against recurrence of hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(5): p. 700-4.
9. Pedersen, A.E., et al., *Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination*. Scand J Immunol, 2005. **61**(2): p. 147-56.
10. Karcher, J., et al., *Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus-modified tumor cells*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 8057-61.
11. Horstmann, E., et al., *Risks and benefits of phase 1 oncology trials, 1991 through 2002*. N Engl J Med, 2005. **352**(9): p. 895-904.
12. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
13. Feron, O., *Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(10): p. 536-42.
14. Papetti, M. and I.M. Herman, *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(5): p. C947-70.
15. Thomas, J.P., et al., *Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors*. J Clin Oncol, 2003. **21**(2): p. 223-31.
16. Syed, S., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of Col-3 (Metastat), an oral tetracycline derivative with potent matrix metalloproteinase and antitumor properties*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(19): p. 6512-21.
17. Sivakumar, B., L.E. Harry, and E.M. Paleolog, *Modulating angiogenesis: more vs less*. Jama, 2004. **292**(8): p. 972-7.
18. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
19. Medinger, M. *Phase I Dose-Escalation Study of AZD2171 in Advanced Cancers With Liver metastases*. in *The 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*. 2004. New Orleans: PER.

20. Wedge, S.R., et al., *ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4645-55.
21. Ruegg, C., O. Dormond, and A. Mariotti, *Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1654**(1): p. 51-67.
22. Ruoslahti, E., *Drug targeting to specific vascular sites*. Drug Discov Today, 2002. **7**(22): p. 1138-43.
23. Pasqualini, R., et al., *Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis*. Cancer Res, 2000. **60**(3): p. 722-7.
24. Bos, R., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer*. Histopathology, 2005. **46**(1): p. 31-6.
25. Bikfalvi, A. and R. Bicknell, *Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(12): p. 576-82.
26. Rettig, W.J., et al., *Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10832-6.
27. Molema, G., D.K. Meijer, and L.F. de Leij, *Tumor vasculature targeted therapies: getting the players organized*. Biochem Pharmacol, 1998. **55**(12): p. 1939-45.
28. Ranney, D.F., *Biomimetic transport and rational drug delivery*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(2): p. 105-14.
29. St Croix, B., et al., *Genes expressed in human tumor endothelium*. Science, 2000. **289**(5482): p. 1197-202.
30. Burrows, F.J. and P.E. Thorpe, *Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8996-9000.
31. Siemann, D.W., D.J. Chaplin, and M.R. Horsman, *Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease*. Cancer, 2004. **100**(12): p. 2491-9.
32. Ladner, R.C., et al., *Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies*. Drug Discov Today, 2004. **9**(12): p. 525-9.
33. Aina, O.H., et al., *Therapeutic cancer targeting peptides*. Biopolymers, 2002. **66**(3): p. 184-99.
34. Hetian, L., et al., *A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43137-42.
35. Willis, M. and E. Forssen, *Ligand-targeted liposomes*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **29**(3): p. 249-271.
36. Zalipsky, S., et al., *Poly(ethylene glycol)-grafted liposomes with oligopeptide or oligosaccharide ligands appended to the termini of the polymer chains*. Bioconjug Chem, 1997. **8**(2): p. 111-8.
37. Pasqualini, R., E. Koivunen, and E. Ruoslahti, *Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(6): p. 542-6.
38. Arap, W., R. Pasqualini, and E. Ruoslahti, *Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model*. Science, 1998. **279**(5349): p. 377-80.
39. Ellerby, H.M., et al., *Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides*. Nat Med, 1999. **5**(9): p. 1032-8.
40. Arap, W., et al., *Targeting the prostate for destruction through a vascular address*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1527-31.
41. Koivunen, E., et al., *Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(8): p. 768-74.

42. Rosen, S.D. and C.R. Bertozzi, *The selectins and their ligands*. Current Opinion in Cell Biology, 1994. **6**(5): p. 663-73.
43. Ulbrich, H., E.E. Eriksson, and L. Lindbom, *Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease*. Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(12): p. 640-7.
44. Magnani, J.L., *The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex*. Arch Biochem Biophys, 2004. **426**(2): p. 122-31.
45. Kannagi, R., et al., *Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis*. Cancer Sci, 2004. **95**(5): p. 377-84.
46. Matsuura, N., et al., *Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases*. Jpn J Clin Oncol, 1997. **27**(3): p. 135-9.
47. Kim, Y.J., et al., *P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9325-30.
48. Borsig, L., et al., *Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2193-8.
49. Hosono, J., et al., *Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells*. J Surg Oncol, 1998. **67**(2): p. 77-84.
50. Nakashio, T., et al., *The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer*. Anticancer Res, 1997. **17**(1A): p. 293-9.
51. Fukuda, M.N., et al., *A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells*. Cancer Research, 2000. **60**(2): p. 450-6.
52. Weston, B.W., et al., *Expression of human alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells*. Cancer Res, 1999. **59**(9): p. 2127-35.
53. Kakiuchi, Y., et al., *Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis*. Cancer Res, 2002. **62**(5): p. 1567-72.
54. Dales, J.P., et al., *CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patients*. Am J Clin Pathol, 2003. **119**(3): p. 374-80.
55. Quackenbush, E.J. and M. Letarte, *Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies*. J Immunol, 1985. **134**(2): p. 1276-85.
56. Graulich, W., et al., *Cell type specificity of the human endoglin promoter*. Gene, 1999. **227**(1): p. 55-62.
57. Attisano, L. and J.L. Wrana, *Signal transduction by the TGF-beta superfamily*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1646-7.
58. Barbara, N.P., J.L. Wrana, and M. Letarte, *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 584-94.
59. Guerrero-Esteo, M., et al., *Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 29197-209.
60. Wong, S.H., et al., *Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5550-60.
61. Cheifetz, S., et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.

62. Miller, D.W., et al., *Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells*. Int J Cancer, 1999. **81**(4): p. 568-72.
63. Lastres, P., et al., *Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1*. J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1109-21.
64. Li, C., et al., *CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 55-64.
65. Jonker, L. and H.M. Arthur, *Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis*. Mech Dev, 2002. **110**(1-2): p. 193-6.
66. Guo, B., et al., *CD105 (endoglin), apoptosis, and stroke*. Stroke, 2004. **35**(5): p. e94-5.
67. Raab, U., et al., *Expression of normal and truncated forms of human endoglin*. Biochem J, 1999. **339** (Pt 3): p. 579-88.
68. Fonsatti, E., et al., *Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies*. J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 1-7.
69. Takahashi, N., et al., *Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 524-32.
70. Kumar, S., et al., *Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 856-61.
71. Tanaka, F., et al., *Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(11): p. 3410-5.
72. Li, C., et al., *Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis*. Br J Cancer, 2003. **88**(9): p. 1424-31.
73. Balza, E., et al., *Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels*. Int J Cancer, 2001. **94**(4): p. 579-85.
74. Bredow, S., et al., *Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin*. Eur J Cancer, 2000. **36**(5): p. 675-81.
75. Fonsatti, E., et al., *Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 2037-43.
76. Matsuno, F., et al., *Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(2): p. 371-82.
77. Tabata, M., et al., *Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies*. Int J Cancer, 1999. **82**(5): p. 737-42.
78. Takahashi, N., et al., *Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide*. Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7846-54.
79. Volkel, T., et al., *Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105)*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1663**(1-2): p. 158-66.
80. An, P., et al., *Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library*. Int J Cancer, 2004. **111**(2): p. 165-73.
81. Savontaus, M.J., et al., *Transcriptional targeting of conditionally replicating adenovirus to dividing endothelial cells*. Gene Therapy, 2002. **9**(14): p. 972-9.

82. Nettelbeck, D.M., et al., *Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105)*. Mol Ther, 2001. **3**(6): p. 882-91.
83. Chames, P. and D. Baty, *Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **189**(1): p. 1-8.
84. Cortese, R., et al., *Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage*. Curr Opin Biotechnol, 1995. **6**(1): p. 73-80.
85. Willats, W.G., *Phage display: practicalities and prospects*. Plant Mol Biol, 2002. **50**(6): p. 837-54.
86. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
87. Winter, G., et al., *Making antibodies by phage display technology*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 433-55.
88. Chames, P., S. Coulon, and D. Baty, *Improving the affinity and the fine specificity of an anti-cortisol antibody by parsimonious mutagenesis and phage display*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5421-9.
89. MacDonald, N.J., et al., *Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25190-6.
90. Coulon, S., et al., *Cyclic peptides selected by phage display mimic the natural epitope recognized by a monoclonal anti-colicin A antibody*. J Pept Sci, 2004. **10**(11): p. 648-58.
91. Birkenmeier, G., et al., *Epitope mapping by screening of phage display libraries of a monoclonal antibody directed against the receptor binding domain of human alpha2-macroglobulin*. FEBS Lett, 1997. **416**(2): p. 193-6.
92. Al-bukhari, T.A., P. Tighe, and I. Todd, *An immuno-precipitation assay for determining specific interactions between antibodies and phage selected from random peptide expression libraries*. J Immunol Methods, 2002. **264**(1-2): p. 163-71.
93. McGuire, M.J., et al., *A library-selected, Langerhans cell-targeting peptide enhances an immune response*. DNA Cell Biol, 2004. **23**(11): p. 742-52.
94. Mazzucchelli, L., et al., *Cell-specific peptide binding by human neutrophils*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1738-48.
95. Goodson, R.J., et al., *High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7129-33.
96. Cwirla, S.E., et al., *Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1696-9.
97. Hessling, J., M.J. Lohse, and K.N. Klotz, *Peptide G protein agonists from a phage display library*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(6): p. 961-7.
98. Huang, W., et al., *A broad-spectrum peptide inhibitor of beta-lactamase identified using phage display and peptide arrays*. Protein Eng, 2003. **16**(11): p. 853-60.
99. Giannattasio, R.B. and B. Weisblum, *Modulation of erm methyltransferase activity by peptides derived from phage display*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(7): p. 1961-3.
100. Papavoine, C.H., et al., *Solution structure of the M13 major coat protein in detergent micelles: a basis for a model of phage assembly involving specific residues*. J Mol Biol, 1998. **282**(2): p. 401-19.
101. Sidhu, S.S., *Engineering M13 for phage display*. Biomol Eng, 2001. **18**(2): p. 57-63.
102. Binetruy-Tournaire, R., et al., *Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis*. Embo J, 2000. **19**(7): p. 1525-33.

103. Nicklin, S.A., et al., *Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display*. Circulation, 2000. **102**(2): p. 231-7.
104. Giordano, R.J., et al., *Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands*. Nature Medicine, 2001. **7**(11): p. 1249-53.
105. Pasqualini, R. and E. Ruoslahti, *Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries*. Nature, 1996. **380**(6572): p. 364-6.
106. Schluesener, H.J. and T. Xianglin, *Selection of recombinant phages binding to pathological endothelial and tumor cells of rat glioblastoma by in-vivo display*. J Neurol Sci, 2004. **224**(1-2): p. 77-82.
107. Lowman, H.B., *Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997. **26**: p. 401-24.
108. Mandava, S., et al., *RELIC--a bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites*. Proteomics, 2004. **4**(5): p. 1439-60.
109. Kay, B.K., et al., *Convergent evolution with combinatorial peptides*. FEBS Lett, 2000. **480**(1): p. 55-62.
110. Barry, M.A., W.J. Dower, and S.A. Johnston, *Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 299-305.
111. DeFrees, S.A., et al., *Ligand Recognition by E-Selectin : Synthesis, Inhibitory Activity, and Conformational Analysis of Bivalent Sialyl Lewis X Analogs*. Journal of American Chemical Society, 1995. **117**(1): p. 66-79.
112. Giordano, R.J., et al., *Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1249-53.
113. Byk, G., et al., *Synthesis, activity, and structure--activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer*. J Med Chem, 1998. **41**(2): p. 229-35.
114. Farhood, H., N. Serbina, and L. Huang, *The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1235**(2): p. 289-95.
115. bigey, P., M. Carrière, and D. Scherman, eds. *Optimization of plasmid backbone for gene expression in mammalian cells*. Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, ed. E. Science. Vol. chap. 9. 2003. 349-357.
116. Simanek, E.E., et al., *Selectin-Carbohydrate Interactions: From Natural Ligands to Designed Mimics*. Chemical Reviews, 1998. **98**(2): p. 833-862.
117. Rossiter, H., R. Alon, and T.S. Kupper, *Selectins, T-cell rolling and inflammation*. Molecular Medicine Today, 1997. **3**(5): p. 214-22.
118. Tyrrell, D., et al., *Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(22): p. 10372-6.
119. Wong, C.-H., et al., *Small Molecules as Structural and Functional Mimics of Sialyl Lewis X Tetrasaccharide in Selectin Inhibition : A Remarkable Enhancement of Inhibition by Additional Negative Charge and/or Hydrophobic Group*. Journal of American Chemical Society, 1997. **119**(35): p. 8152-8158.
120. Tsujishita, H., et al., *Selectin-ligand interactions revealed by molecular dynamics simulation in solution*. J Med Chem, 1997. **40**(3): p. 362-9.
121. Kiessling, L.L. and N.L. Pohl, *Strength in numbers: non-natural polyvalent carbohydrate derivatives*. Chem Biol, 1996. **3**(2): p. 71-7.
122. Weitz-Schmidt, G., et al., *An E-selectin binding assay based on a polyacrylamide-type glycoconjugate*. Anal Biochem, 1996. **238**(2): p. 184-90.
123. Kretschmar, G., et al., *Oligosaccharide Recognition by Selectins: Synthesis and Biological Activity of Multivalent Sialyl Lewis-X Ligands*. Tetrahedron, 1995. **51**(47): p. 13015-13030.

124. De Vleeschauwer, M., et al., *Design and synthesis of a new sialyl Lewis X mimetic: how selective are the selectin receptors?* Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(9): p. 1109-12.
125. Work, L.M., et al., *Use of phage display to identify novel peptides for targeted gene therapy.* Methods Enzymol, 2002. **346**: p. 157-76.
126. Molenaar, T.J., et al., *P-selectin as a candidate target in atherosclerosis.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(5): p. 859-66.
127. Raab, M., et al., *Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application.* Clin Chim Acta, 2002. **321**(1-2): p. 11-6.
128. Rodriguez-Romero, A., et al., *Primary and tertiary structures of the Fab fragment of a monoclonal anti-E-selectin 7A9 antibody that inhibits neutrophil attachment to endothelial cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11770-5.
129. Martens, C.L., et al., *Peptides which bind to E-selectin and block neutrophil adhesion.* J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21129-36.
130. Jedrzejas, M.J., et al., *Structure of a monoclonal anti-ICAM-1 antibody R6.5 Fab fragment at 2.8 Å resolution.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995. **51**(Pt 3): p. 380-5.
131. von Asmuth, E.J., et al., *Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells.* European Journal of Immunology, 1992. **22**(10): p. 2519-26.
132. Hou, S.T., et al., *Identification of polypeptides with selective affinity to intact mouse cerebellar granule neurons from a random peptide-presenting phage library.* J Neurosci Methods, 2004. **138**(1-2): p. 39-44.
133. LeFranc, M., et al., *Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display*, in <http://imgt.cines.fr>, I. Education, Editor. 2003: Montpellier.
134. Edgell, C.J., C.C. McDonald, and J.B. Graham, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3734-7.
135. Molenaar, T.J., et al., *Specific inhibition of P-selectin-mediated cell adhesion by phage display-derived peptide antagonists.* Blood, 2002. **100**(10): p. 3570-7.
136. Hinck, A.P., et al., *Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2.* Biochemistry, 1996. **35**(26): p. 8517-34.
137. Qian, S.W., et al., *Characterization of mutated transforming growth factor-beta s which possess unique biological properties.* Biochemistry, 1994. **33**(40): p. 12298-304.
138. Fukuda, M.N., et al., *A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells.* Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 450-6.
139. Renkonen, R., et al., *A peptide mimic of selectin ligands abolishes in vivo inflammation but has no effect on the rat heart allograft survival1.* Transplantation, 2002. **74**(1): p. 2-6.
140. Oyama, T., et al., *Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents.* Cancer Lett, 2003. **202**(2): p. 219-30.
141. Ringquist, S. and D. Parma, *Anti-L-selectin oligonucleotide ligands recognize CD62L-positive leukocytes: binding affinity and specificity of univalent and bivalent ligands.* Cytometry, 1998. **33**(4): p. 394-405.
142. Hicke, B.J., et al., *DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice.* J Clin Invest, 1996. **98**(12): p. 2688-92.
143. Jeong, S., et al., *In vitro selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(1): p. 237-43.

144. Bonetto, S., I. Carlván, and D. Baty, *Isolation and characterization of antagonist and agonist peptides to the human melacortin 1 receptor*. Peptides, 2005: p. accepté.
145. Makowski, L. and A. Soares, *Estimating the diversity of peptide populations from limited sequence data*. Bioinformatics, 2003. **19**(4): p. 483-9.
146. Rodi, D.J., A.S. Soares, and L. Makowski, *Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries*. J Mol Biol, 2002. **322**(5): p. 1039-52.
147. Appeldoorn, C.C., et al., *Rational optimization of a short human P-selectin-binding peptide leads to nanomolar affinity antagonists*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10201-7.

Publications

Résumé

Résumé

Mon travail de thèse a porté sur le ciblage de la vascularisation tumorale : des molécules ciblant l'endothélium tumoral ont été recherchées dans le but d'amener des molécules thérapeutiques spécifiquement vers l'endothélium tumoral afin de le détruire et d'atteindre la tumeur qui en dépendait. D'après les données de la littérature, deux cibles ont été choisies pour notre étude : la sélectine E et l'endogline.

La sélectine E est une glycoprotéine surexprimée à la surface de l'endothélium activé des zones inflammatoires et tumorales. Classiquement, des antagonistes de son ligand naturel, le SleX, sont recherchés. En nous appuyant sur les groupements clés de l'interaction entre la sélectine E et le SleX, plusieurs familles de mimes du SleX ont été élaborées. La capacité de ces mimes à déplacer l'interaction du SleX exprimé à la surface des cellules HL-60 avec la sélectine E a été évaluée dans un test d'adhésion. Cependant, aucun des mimes testés n'a présenté une affinité suffisante pour envisager son utilisation comme tête de ciblage. Une deuxième stratégie a consisté à rechercher des ligands peptidiques de la sélectine E en criblant des HUVECs activées avec une banque de peptides sur phages. Plusieurs phages-peptides testés en ELISA ont montré une meilleure affinité pour la sélectine E et / ou avec la sélectine P par rapport au phage sans insert. Des tests de compétition avec des peptides synthétiques correspondants permettront d'évaluer leur spécificité pour la cible.

En ce qui concerne l'endogline, des ligands peptidiques ont été recherchés avec une banque de peptides sur phages. Dans un premier temps, le gène codant l'endogline humaine a été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote afin de réaliser la sélection sur la protéine cellulaire. Une sélection sur la protéine recombinante a été réalisée par la suite pour diminuer le bruit de fond lié aux cellules. Parmi les peptides obtenus, certains ont montré des homologies de séquence avec des ligands de l'endogline et le test de ces phages-peptides en ELISA sur la protéine recombinante a donné un fort signal par rapport au phage sans insert. Ces peptides seront caractérisés prochainement.

En conclusion, des ligands peptidiques des sélectines E et P et de l'endogline ont peut-être été identifiés. Ce travail a par ailleurs permis de mettre en place les outils nécessaires à l'utilisation de la technologie de sélection avec des banques de peptides sur phages dans les meilleures conditions possibles.

Summary

My work concerned tumor vasculature targeting. Compounds targeting the tumor endothelium were investigated in order to redirect drugs and induce, specifically, the destruction of the tumor endothelium and therefore the tumor. According to the literature, two targets have been identified for the present study: E selectin and endoglin.

E selectin is a glycoprotein surexpressed on endothelial cells during inflammation and angiogenesis. Classically, antagonists of its natural ligand, the SleX, are researched. Based on the key interaction groups between E selectin and SleX, three mimics' families have been designed. The ability of these analogs to block the interaction of the SleX expressed on HL-60 cells with the E selectin protein was evaluated in an adhesion assay. However, none of the analogs had a sufficient affinity for a use as a targeting agent. In a second strategy, a phage library was selected on activated HUVECs to find peptide ligands of the E selectin. Some of the selected phages-peptides showed a better affinity for E selectin and / or P selectin in an ELISA assay than the insert-less phage. Their specificity for the target will soon be evaluated in competition assays with the corresponding synthetic peptides.

In a second part, phage display was used to identify peptide ligands of the endoglin. First, the endoglin was cloned and expressed in mammalian cells in order to select the phage library on the cellular protein. Selection on the recombinant endoglin was also carried out to reduce the background linked to the cells. Some of the selected peptides showed sequence homologies with known endoglin ligands. The corresponding phages-peptides gave a strong signal in an ELISA assay on the recombinant protein by comparison with an insert-less peptide. Those peptides will be soon characterized.

In conclusion, potential peptide ligands of E and P selectin and of endoglin were identified. This work also led us to set up the phage display technology in the laboratory and to optimize the selection procedure.