

THÈSE

Pour le

Doctorat De l'Université de BORDEAUX 2

Mention: Sciences, Technologie, Santé

Option: Biologie cellulaire et Physiopathologie

TITRE

Interrogation de la plaque d'athérome par phage-display *in vivo*: une approche pour un ciblage moléculaire à l'aide d'anticorps humains armés pour l'imagerie et la thérapie

Présentée et soutenue publiquement le

21/12/2010

par

Kamel DERAMCHIA

Composition du jury :

Pr. Xavier SANTARELLI, Professeur des Universités,

Dr. Martine CERUTTI, Directeur de Recherche CNRS,

Dr. Daniel BATY, Directeur de Recherche CNRS,

Pr. Jean-François TOUSSAINT, Professeur Hospitalo-Universitaire,

Pr. Pierre DOS SANTOS, Professeur Hospitalo-Universitaire,

Dr. Philippe MONDON, Directeur technique de la société MILLEGEN SA,

Pr. Jean-Michel FRANCONI, Professeur des Universités,

Dr. Gisèle CLOFENT-SANCHEZ, Directrice de thèse, CR1 CNRS.

Thèse préparée au sein de l'UMR5536 CNRS –Université Bordeaux 2.

“La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science.”

François Jacob, prix Nobel de physiologie ou médecine, 1965.

Remerciements

Cette thèse a nécessité de ma part un investissement total et sans le soutien d'un certain nombre de personnes, rien n'aurait été possible.

Je tiens tout particulièrement à remercier Mme Gisèle CLOFENT-SANCHEZ dont l'expertise scientifique et l'encadrement exemplaire ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci Gisèle, je n'aurais jamais trouvé meilleur encadrant de thèse que toi...

Un grand merci à Stéphane Bonetto, dont la rigueur scientifique et les performances sportives, nous ont permis de progresser sans cesse...Merci Stéphane car je n'ai jamais cessé d'apprendre à tes côtés.

Un grand merci à Mme Marie-Josée Jacobin-Valat dont la multidisciplinarité m'a été d'un grand secours...et à Jeanny Laroche-Traineau pour son implication dans ce manuscrit et ses justes remarques.

Je tiens bien sûr à remercier les membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail et ce, malgré leurs impératifs et le court délai qui leur est imparti.

Merci au Pr Jean-Michel FRANCONI qui m'a accueilli dans son laboratoire ainsi qu'au Pr Pierre DOS SANTOS de nous avoir alloué les vastes locaux de la Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale. Merci à Stéphane Sanchez dont les talents de chirurgien ont été indispensables à ce travail. Je souhaiterais également remercier le Pr Nicolas Grenier ainsi que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce projet, ou tout simplement remercier toutes les personnes qui ont fait de ces trois ans un moment inoubliable.

Enfin, mes pensées se dirigent vers vous mes chers parents adorés, qui avaient été présents à chaque moment de ma vie. Je ne pourrais vous exprimer ma reconnaissance et ma gratitude tellement celles-ci dépassent les limites de l'imaginable. Merci également à mon frère et ma sœur. Yacine, Dalila, vos encouragements m'ont été précieux. De même, je tiens à remercier ma grand-mère pour sa joie et sa bonne humeur...Merci mamie pour tes conseils avisés. A Patrick, Murielle et Cécile : merci de m'avoir fait profiter d'une ambiance familiale alors que j'étais loin des miens. A Maeva dont les couleurs m'éblouiront toujours...

Enfin, c'est à toi, Cindy, que je dédie ce travail. Depuis le début, tu n'as cessé de me soutenir, de m'encourager, de m'enquiquiner comme tu viens de le faire il y a moins d'une minute pour lire ce que je venais d'écrire... Merci à toi.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Abréviations | 9 |
| Liste des figures | 10 |
| <i>Avant propos</i> | 11 |
| Chapitre 1 : Introduction générale | 13 |
| <i>I) Les Artères</i> | 14 |
| 1.1. Généralités | 14 |
| 1.2. Les constituants de la paroi saine | 14 |
| 1.2.1. Intima | 14 |
| 1.2.2. Media | 14 |
| 1.2.3. Adventice | 14 |
| 1.3. Relation structure-fonction des artères | 14 |
| <i>II) La Plaque d'athérome</i> | 16 |
| 1.4. Définition | 16 |
| 1.5. Séquence de développement de la plaque | 16 |
| 1.6. Conséquences | 18 |
| 1.6.1. Infarctus du myocarde (IDM) | 18 |
| 1.6.2. Angine de poitrine (Angor) | 18 |
| 1.6.3. Accident vasculaire cérébral (AVC) | 18 |
| 1.6.4. Anévrisme | 18 |
| 1.7. Incidence | 18 |
| 1.8. Facteurs de risques | 19 |
| <i>III) Cellules et éléments impliqués dans la formation de la plaque d'athérome</i> | 19 |
| 1.9. Cellules de la paroi vasculaire | 19 |
| 1.9.1. Les cellules endothéliales vasculaires | 19 |
| 1.9.2. Les cellules musculaires lisses | 20 |
| 1.10. Eléments de la paroi vasculaire | 21 |
| 1.10.1. La Matrice Extracellulaire (MEC) | 21 |
| 1.10.1.1. Les collagènes | 21 |
| 1.10.1.2. Les fibres élastiques | 22 |
| 1.10.1.3. Les glycoprotéines de structure | 22 |
| 1.10.1.4. Les protéoglycanes | 23 |
| 1.11. Cellules circulantes du sang | 24 |
| 1.11.1. Les Monocytes et macrophages | 24 |
| 1.11.2. Les lymphocytes T | 24 |
| 1.11.3. Les cellules B | 25 |
| 1.11.4. Les plaquettes sanguines | 26 |
| <i>IV) Les lipides</i> | 27 |
| 1.12. Généralités | 27 |
| 1.13. Les Eicosanoïdes | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 1.13.1. La voie des cycloxygénases et ses dérivés prostanoides | 28 |
| 1.13.2. La voie de la lipoxigénase | 29 |
| 1.13.2.1. La 5-Lipoxigénase | 29 |
| 1.13.2.2. Les 12/15-Lipoxigénases | 29 |
| 1.13.3. Le PAF | 31 |
| 1.14. Le cholestérol | 31 |
| 1.15. Les Lipoprotéines | 31 |
| 1.16. Transport du cholestérol dans le sang | 32 |
| Chapitre 2 : Athérogénèse | 36 |
| 2.1. Initiation | 37 |
| 2.1.1. Recrutement des plaquettes | 38 |
| 2.1.2. Recrutement des monocytes | 40 |
| 2.1.3. Différenciation des macrophages | 41 |
| 2.1.4. Recrutements des Lymphocytes T | 41 |
| 2.2. Progression des lésions et leur complication | 42 |
| • Erosion de la plaque | 42 |
| • Perturbation au sein des microvaisseaux de la plaque | 43 |
| • Fissure de la chape fibreuse | 43 |
| • Lésions sténosantes | 44 |
| • Lésions non sténosantes | 44 |
| 2.3. Classification des plaques d'athéromes | 46 |
| 2.4. Conclusion | 47 |
| 2.5. Bibliographie | 48 |
| Chapitre 3 : Ciblage de plaque d'athérome pour l'imagerie et la thérapie | 52 |
| <i>1) Ciblage pour l'imagerie</i> | <i>53</i> |
| 3.1. Généralités | 53 |
| 3.2. Différentes méthodes d'imagerie | 54 |
| 3.3. Techniques d'imagerie invasive | 54 |
| 3.3.1. L'angiographie | 54 |
| 3.3.2. L'angioscopie | 55 |
| 3.3.3. L'échographie endovasculaire (IVUS) | 55 |
| 3.3.4. La thermographie | 55 |
| 3.4. Techniques d'imagerie non-invasive | 56 |
| 3.4.1. Echographie percutanée | 56 |
| 3.4.2. Echographie de contraste (ECUS) | 56 |
| 3.4.3. Imagerie par réflectance de fluorescence (FRI/NIRF) | 57 |
| 3.4.4. Le CT-Scan (Computed Tomography) | 57 |
| 3.4.5. Imagerie en médecine nucléaire | 57 |
| 3.4.6. Imagerie par résonance magnétique (IRM) | 58 |
| 3.5. Conclusion | 60 |
| 3.6. Ciblage de la plaque d'athérome instable | 61 |
| 3.6.1. Imagerie de l'endothélium activé | 61 |
| 3.6.1.1. Exemple du ciblage des VCAM-1 | 61 |
| 3.6.1.2. Ciblage d'autres marqueurs de l'activation endothéliale | 63 |
| 3.6.2. Imagerie des lipoprotéines | 64 |

| | |
|---|----|
| 3.6.3. Imagerie des cellules présentes dans la plaque (Monocytes/Macrophages) | 65 |
| 3.6.4. Imagerie des ROS | 68 |
| 3.6.5. Imagerie de l'apoptose | 69 |
| 3.6.6. Imagerie des métalloprotéinases (MMPs) | 70 |
| 3.6.7. Imagerie des marqueurs de l'angiogénèse | 72 |
| 3.6.8. Imagerie de l'activité plaquettaire et de la formation du thrombus | 74 |
| 3.7. Conclusion | 76 |
| 3.8. Cibles potentielles (tableau récapitulatif des cibles) | 77 |
| 3.9. Bibliographie | 80 |

II) Ciblage pour la thérapie 84

| | |
|---|----|
| 3.10. Généralités | 84 |
| 3.11. Ciblage du métabolisme des lipoprotéines | 84 |
| 3.12. Ciblage du métabolisme du cholestérol | 85 |
| 3.13. Ciblage du métabolisme des LDL | 87 |
| 3.14. Ciblage du métabolisme des HDL | 88 |
| 3.15. Ciblage de l'inflammation | 90 |
| 3.15.1. Ciblage des lipides biologiquement actifs | 90 |
| 3.15.1.1. La cycloxygénase et dérivés prostanoides | 90 |
| 3.15.1.2. La 5-Lipoxygénase et les leucotriènes | 91 |
| 3.15.2. Les phospholipides oxydés | 92 |
| 3.16. Ciblage des cellules impliquées dans l'athérogénèse | 93 |
| 3.16.1. Les cellules endothéliales | 93 |
| 3.16.2. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques | 94 |
| 3.17. Protéases et apoptose | 95 |
| 3.18. PPAR α : un récepteur nucléaire « magique » ? | 95 |
| 3.19. Conclusion | 97 |
| 3.20. Bibliographie | 98 |

Chapitre 4 : Ingénierie des anticorps et « Phage Display » : Emergence des anticorps humains dans les biopharmaceutiques

| | |
|---|---------|
| <i>I) Les Anticorps</i> | 102 |
| 4.1. Généralités | 102 |
| 4.2. Les immunoglobulines | 103 |
| 4.2.1. Structure protéique | 103 |
| 4.2.2. Structure génétique | 104 |
| 4.2.2.1. Locus IgH, IgK et IgL | 104 |
| 4.2.2.2. Réarrangement et mise en place de la diversité | 105 |
| 4.2.3. Format des anticorps | 106 |
| 4.3. Les anticorps et la thérapie | 107 |
| 4.3.1. Les anticorps chimériques | 107 |
| 4.3.2. Les anticorps humanisés | 108 |
| 4.3.3. Les anticorps recombinants humains | 108 |
| 4.4 Les anticorps utilisés en imagerie ou en thérapie | 109 |
| <i>II) La technologie du « Phage Display »</i> | 110 |
| 4.5. Introduction | 110 |
| 4.6. Principe | 111 |
| 4.7. Biologie du phage filamenteux | 111 |

| | |
|---|-----|
| 4.7.1. Structure du phage M13 | 111 |
| 4.7.2. Cycle d'amplification | 112 |
| 4.8. Les Protéines d'enveloppe pour l'expression de banques | 114 |
| 4.9. Les phagemides et phages auxiliaires | 114 |
| 4.10. Les banques d'anticorps | 116 |
| 4.10.1. Les banques combinatoires | 116 |
| 4.10.2. Les banques immunes | 116 |
| 4.10.3. Les banques naïves | 117 |
| 4.10.4. Les banques synthétiques ou semi-synthétiques | 117 |
| 4.11. Le Phage Display <i>in vitro</i> | 120 |
| 4.11.1. Sélection sur antigène isolé | 121 |
| 4.11.2. Sélection sur cellules | 121 |
| 4.11.3. Sélection sur sérum de patients | 121 |
| 4.12. Le Phage Display <i>in vivo</i> | 123 |
| 4.13. Conclusion | 124 |
| 4.14. Tableau des Anticorps soumis à l'AMM | 125 |
| 4.15. Bibliographie | 127 |

Chapitre 5 : Résultats

| | |
|--|-----|
| <i>I) Objectifs du projet de thèse</i> | 131 |
| <i>II) Phage display in vivo</i> | 132 |
| 5.1. Introduction | 132 |
| 5.2. Sélection <i>in vivo</i> de fragments d'anticorps | 133 |
| 5.2.1. Matériel biologique utilisé | 133 |
| 5.2.2. Modèles animaux | 134 |
| 5.2.2.1. Modèle de lapin athéroscléreuse | 134 |
| 5.2.2.2. Modèle de souris ApoE ^{-/-} | 134 |
| 5.2.3. Sélections <i>in vivo</i> réalisées | 135 |
| 5.2.4. Production de fragments scFv solubles | 136 |
| 5.2.5. Tests de réactivité | 136 |
| 5.2.5.1. HTRF (Homogeneous time resolved fluorescence) | 136 |
| 5.2.5.2. Immunohistochimie | 137 |
| <i>III) Sélection in vivo chez la souris : Article en cours de rédaction</i> | 140 |
| 5.3. Immunopurification | 185 |
| 5.3.1. Matériel et méthodes | 185 |
| 5.3.2. Résultats | 185 |
| <i>IV) Sélection in vivo chez le lapin : Etude en cours</i> | 188 |
| 5.4. Matériel et méthodes | 188 |
| 5.4.1. Intervention chirurgicale chez le lapin | 188 |
| 5.4.1.1. 1 ^{ère} intervention: La désendothélialisation | 188 |
| 5.4.1.2. 2 ^{ème} intervention: Angioplastie de l'aorte sous-rénale | 189 |
| 5.4.2. Banque combinatoire | 190 |
| 5.4.3. Sélection <i>in vivo</i> | 190 |
| 5.4.4. Production de banques secondaires de phages | 191 |

| | |
|--|---------|
| 5.4.5. Production de scFv solubles | 192 |
| 5.4.6. Purification des scFv solubles | 192 |
| 5.4.7. Extraction et biotinylation de protéines athéromateuses | 193 |
| 5.4.8. HTRF | 193 |
| 5.4.9. Immunohistochimie | 194 |
| 5.5. Résultats | 195 |
| 5.5.1. Sélection par Phage-Display <i>in vivo</i> | 195 |
| 5.5.2. Production de scFv sous format soluble et test par HTRF sandwich | 200 |
| 5.5.3. Interaction entre scFv solubles et l'extrait de protéines athéromateuses par HTRF direct | 200 |
| 5.5.4. Immunohistochimie et localisation <i>ex vivo</i> des scFv | 204 |
| 5.6. Discussion | 206 |
| 5.7. Conclusion et perspectives | 207 |
| <i>V) Imagerie par Résonance Magnétique de la P-sélectine exprimée dans les plaquettes humaines activées</i> | 209 |
| 5.8. Introduction | 209 |
| 5.9. Caractérisation de l'anticorps anti-P-sélectin (VH10) | 209 |
| 5.10. Synthèse des nanoparticules superparamagnétiques | 210 |
| 5.11. Test de réactivité sur plaquettes activées et imagerie non invasive <i>in vivo</i> | 211 |
| <i>VI) Article (publié dans NMR in Biomedicine)</i> | 213 |
| 5.12. Conclusions et perspectives | 226 |
| 6. Conclusion Générale | 227 |
| 7. Bibliographie | 228 |

Abréviations

AA: Acide arachidonique
ABCA/G: ATP binding cassette A/G
AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ACAT: Acyl coenzyme A-cholesterol acetyltransferase
Acm: Anticorps monoclonaux
AMM: autorisation de mise sur le marché
Fc: Fragment cristallisable
Fv: Fragment variable
CDR: Complementary determining regions
Cox: Cycloxygénase
CCL2: Chemokine ligand 2
CETP: Cholesterol ester transfer protein
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
EDHF: Endothelial Derived Hyperpolarising Factor
ED-B: Extradomaine B de la fibronectine
CAT: Chloramphenicol acetyltransferase
CML: Cellules musculaires lisses
¹⁸F-FDG: Fluoro-Deoxy-Glucose (18F)
FR: Framework
Fab: Fragment antigen-binding
GAG: Glycosaminoglycane
HPETE: Hydroxyperoxyeicosatetraenoic
HAM: Hypercholesterolemia-associated monocytosis
HPODE: Acide hydroperoxy-octadecadienoic
HAMA: Human anti-mouse antibody
HAHA: Human Anti-Humanized Antibody
HSP: Heat shock protein
HDL-C: Cholestérol associé aux HDL
HMG-CoA réductase : 3-hydroxy-3-méthyl glutaryl CoA réductase
Ig: Immunoglobuline
IDM: infarctus du myocarde
ICAM: Intercellular adhesion molecule
IP-10: Interferon gamma-induced protein (CXCL10)
I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha attractant
IBAT: Ileal sodium-dependant bile acid transporter
KLF-2: kruppel-like factor 2
LCAT: Lysolecithin cholesterol acetyltransferase
LTh: Lymphocyte T helper
LPL: Lipoprotéine lipase
LRP: LDL-like receptor
LO: Lipoxygénase
LXR: Liver X receptor
LDL: Low density Lipoprotein
LDL-C: Cholestérol associé aux LDL
LDLox: LDL oxydée
LDLR: Récepteur aux LDL

LTA: Leucotriènes
MEC: Matrice extracellulaire
MMP: Métalloprotéinases
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein1 (CCL2)
Mig: Monokine induced interferon gamma (CXCL9)
MPI: un inhibiteur des MMPs
MDA-LDL: Malondialdehyde-LDL
MTP: Microsomal triglycerid transfert protein
MSR-A: Macrophage Scavenger Receptor A
mPGES1: Prostaglandine E synthase1 (PTGES)
PAF: Platelets activating Factor
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PGI2: Prostacycline
PLA2: Phospholipase A2
PAI: Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1
PS: Phosphatidylsérines
PDGF: platelet-derived growth factor
PON: Paraxonase
PAF-AH: PAF-acétylhydrolase
PG: Prostaglandine (E, I, F, D..)
PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptors
POVPC: 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholine
PEIPC: 1-palmitoyl-2(5,6-epoxyisoprostane E2)-sn-glycero-3-phosphorylcholine
PGPC: 1-palmitoyl-2-glutaroyl-snglycero-3-phosphorylcholine
PTD: Phosphotyrosine domain
PF4: Platelet factor 4
Rag1/2: Recombination activating gene
RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted ou CCL5)
RE: Réticulum endoplasmique
ROS: Espèces réactives dérivées de l'oxygène
RTC: Reverse cholestérol efflux
SRS-A : Slow reacting substance of anaphylaxis
SREBP/ SCAP: Sterol regulatory element binding protein / SREBP cleavage-activating protein.
TXA2: Thromboxane A2
TGF- β : Transforming growth factor beta
TLR: Toll Like Receptor
USPIOs: Ultrasmall superparamagnetic iron oxide
USF1: Upstream stimulatory factor 1
VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1
VN: Vitronectine
VLA4: Very late antigen-4, $\alpha 4\beta 1$
VUSPIO: Versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide
SPIO: Small superparamagnetic iron oxide particles
scFv: Single chain fragment variable

Liste des figures

Chapitre 1

- 1.1. Artère de moyen et gros calibre avec ses trois tuniques. **P15**
- 1.2. Artère musculaire, artères élastiques, artériole et capillaire sanguin. **P16**
- 1.3. Genèse de la plaque d'athérome et ses complications majeures. **P17**
- 1.4. Rôle hypothétique des plaquettes dans la formation de cellules spumeuses. **P27**
- 1.5. Les voies métaboliques de l'acide arachidonique. **P28**
- 1.6. Formation de LDLox à partir de l'oxydation des phospholipides PAPC. **P30**
- 1.7. Structure générale d'une lipoprotéine plasmatique. **P32**
- 1.8. Transport du cholestérol dans le sang. **P35**

Chapitre 2

- 2.1. Interaction séquentielle entre les plaquettes et l'endothélium. **P39**
- 2.2. Adhérence ferme des plaquettes sur l'endothélium. **P39**
- 2.3. Modèle hypothétique de l'athérogénèse initiée par les plaquettes sanguines. **P40**
- 2.4. Rôle des lymphocytes dans l'athérogénèse. **P42**
- 2.5. Physiopathologie de la thrombose artérielle. **P44**
- 2.6. Différentes plaques vulnérables sujettes à rupture ou à érosion. **P45**
- 2.7. Les plaques d'athérome. **P46**
- 2.8. Evolution de la plaque d'athérome. **P47**

Chapitre 3

- 3.1. Relative spatial resolution of common imaging techniques, along with their sensitivity. **P60**
- 3.2. *In vivo* MR and optical imaging of VCAM-1 expression. **P62**
- 3.3. Dynamic PET imaging (VCAM-1). **P62**
- 3.4. Microbulles/VCAM-1. **P63**
- 3.5. ¹²⁵I-IK17 (Photomicrograph/autoradiograph). **P64**
- 3.6. Non-invasive *in vivo* imaging of macrophage CCR-2 receptors with [^{99m}Tc]-MCP-1. **P66**
- 3.7. Magnification and 3D view of the SPECT/CT (¹¹¹In-monocytes). **P66**
- 3.8. Administration USPIO (carotid). **P67**
- 3.9. Detection of macrophages with gadolinium-containing micelles targeting macrophage scavenger receptors and MRI. **P68**
- 3.10. MRI, Gd-DTPA-g-R826. **P69**
- 3.11. *In vivo* FMT, gelatinase activity (NIRF). **P71**
- 3.12. *In vivo* MR. MMP-targeted P947. **P72**
- 3.13. *In vivo* MR, peptidomimétique vitronectine. **P73**
- 3.14. ¹⁸F-galacto-RGD PET. **P73**
- 3.15. *Ex vivo* MRI, LIBS MPIO. **P75**

- 3.16. MR images of a rabbit carotid artery, MR images of a rabbit carotid artery. **P75, P76**
- 3.17. Les biomarqueurs pour l'imagerie moléculaire de l'athérosclérose. **P77**
- 3.18. Métabolisme du cholestérol et cibles moléculaires. **P86**
- 3.19. Voie de synthèse des isoprénoïdes. **P87**
- 3.20. Rôle des ABCs transporteurs dans le transport du cholestérol. **P90**
- 3.21. Modulation of lipid metabolism and inflammatory genes by PPAR α . **P97**

Chapitre 4

- 4.1. Structure d'une immunoglobuline. **P104**
- 4.2. Représentation schématique de l'organisation et du réarrangement des gènes d'immunoglobuline. **P105**
- 4.3. Différents formats d'anticorps. **P107**
- 4.4. Les anticorps chimériques. **P109**
- 4.5. Phage filamenteux, numérotation et produit des gènes codants. **P113**
- 4.6. Structure de la g3p ainsi que son fonctionnement. **P113**
- 4.7. Cycle d'amplification d'un phage filamenteux. **P113**
- 4.8. Vecteur phagemide (pCANTAB5E). **P115**
- 4.9. Principe de construction d'une banque de scFv. **P119**
- 4.10. Principe de construction d'une banque semi-synthétique de scFv. **P120**
- 4.11. Sélection par phage Display *in vitro*. **P122**
- 4.12. Principe du phage display *in vivo*. **P124**

Chapitre 5

- 5.1. : Schéma récapitulatif de la procédure de sélection des phages-scFv *in vivo*. **P135**
- 5.2. Principe du FRET en temps résolu (HTRF). **P138**
- 5.3. Criblage des scFv par HTRF. **P139**
- 5.4. Identification de la cible protéique du clone H2.1. **P187**
- 5.5. Préparation du modèle d'inflammation induite chez le lapin. **P189**
- 5.6. Sélection *in vivo* de phages-scFv. **P196**
- 5.7. Fréquence d'apparition d'acides aminés pour chaque position d'un CDR3-H à 10 résidus. **P197**
- 5.8. Exemple de consensus obtenu pour un CDR3-H à 10 résidus. **P197**
- 5.9. Exemple du clone F8.31 et A2.32. **P197**
- 5.10. Profil de purification du clone scFv (soluble) **B2.31. P202**
- 5.11. HTRF sandwich. **P203**
- 5.12. Direct HTRF. **P203**
- 5.13. Immunohistochimie sur coupes d'aorte de lapin à l'aide de scFv purifiés. **P205**
- 5.14. Réduction ménagée d'un anticorps à l'aide de MEA. **P210**
- 5.15. Préparation des VUSPIO. **P211**
- 5.16. : Test de réactivité sur plaquettes activées et imagerie non invasive *in vivo*. **P212**

Avant-propos

Mon travail de thèse fait partie d'un projet beaucoup plus vaste qui s'intègre dans la thématique de recherche que Mme Gisèle CLOFENT-SANCHEZ a mis en place au sein de l'UMR5536. Ce travail, dont l'élément principal est **la conception et la validation d'anticorps monoclonaux humains pour l'imagerie et la thérapie**, est un projet multidisciplinaire qui fait appel aux compétences scientifiques des physiciens, des biologistes ainsi que celle des chimistes pour l'élaboration de nouveaux biopharmaceutiques de l'athérosclérose. Ainsi, le travail que je décris dans cette thèse est un travail d'équipe et où rien n'aurait pu exister sans la contribution de chacun.

J'ai voulu à travers les quelques chapitres dont vous me faites l'honneur de lire et de juger, faire un tour d'horizon sur les connaissances accumulées ces dernières années sur ce sujet bien vaste qu'est l'athérosclérose. Après une brève **introduction** des différentes cellules et autres éléments impliqués dans la plaque d'athérome, j'ai voulu raconter l'histoire de l'**athérogénèse**, ce processus qui amène à la formation de plaques d'athérome instables, responsables des cardiopathies ischémiques et des accidents vasculaires cérébraux dont nous pourrions tous être victimes. De tels accidents sont très invalidants lorsqu'ils ne sont pas mortels et doivent faire l'objet d'une surveillance accrue dans nos pays industrialisés. A ce jour, il n'existe aucune technique non invasive et sans danger permettant de détecter une plaque d'athérome vulnérable à fort risque de rupture. C'est dans ce cadre que la recherche internationale s'est mobilisée pour le ciblage de **biomarqueurs** présents à la surface des plaques d'athéromes. Dans ce contexte, **l'imagerie non invasive de l'athérosclérose**, pour laquelle j'accorde tout un chapitre, est un domaine de recherche en pleine expansion. Au cours de cette recherche bibliographique, il m'est également apparu indispensable de rapporter les différentes stratégies utilisées, en cours d'élaboration ou en prévision pour le **traitement de l'athérosclérose**. De telles molécules thérapeutiques pourront être acheminées jusqu'à leur cible à l'aide d'agents ciblant tels que les **anticorps**. En parallèle, l'avènement de la biologie moléculaire et de la technologie de l'ADN recombinant ont permis l'élaboration de méthodologies ultraperformantes telle que le **phage display**, pour la sélection d'anticorps humains, dont l'utilisation réduit fortement l'immunogénicité qui était observée lors de l'utilisation d'anticorps murins. Après avoir abordé tous ces aspects, je vous exposerai enfin le travail dans lequel je me suis investi ces trois dernières années.

La première partie de la thèse concerne **le ciblage de la plaque d'athérome par phage display *in vivo*** par des phages-scFvs issus de banques combinatoires d'anticorps humains. L'objectif étant l'identification *in vivo* de **couples anticorps humains/biomarqueurs de l'athérosclérose**.

La deuxième partie est dédiée au ciblage moléculaire par IRM. L'objectif étant d'établir une preuve de concept de la faisabilité de l'approche en construisant **un agent de contraste ciblant la P-sélectine** chez un modèle de souris d'athérosclérose.

Cette thèse a donné lieu à 2 articles, un en cours de rédaction et le second récemment accepté dans le journal à lecture internationale, NMR in Biomedicine.

Introduction Générale

Chapitre 1 : Introduction générale

1) Les Artères

1.1. Généralités

Les artères sont des vaisseaux qui distribuent le sang du cœur vers les organes périphériques. Seules les artères de gros et moyen calibre sont susceptibles de développer des lésions athéroscléreuses. Cependant il existe parmi ces artères des variations de structure, de propriétés mécaniques et de susceptibilité au développement de l'athérome. Elles obéissent toutes, à l'exception des capillaires, à un modèle commun d'organisation structurale. Leur paroi est constituée de trois tuniques qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : l'intima, la média et l'adventice (**figure1.1**).

1.2. Les constituants de la paroi saine

1.2.1. L'intima

Elle constitue la tunique la plus interne de l'artère, elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées formant ainsi une barrière sélective et étanche. La couche sous-endothéliale ou lame basale sur laquelle repose les cellules endothéliales est d'épaisseur variable et de nature conjonctive. Elle est constituée de fibroblastes et de constituants de la matrice extracellulaire. Cette couche est séparée de la média par la limitante élastique interne.

1.2.2. La média

Elle est principalement constituée de cellules musculaires lisses (CML) entourées de fibres élastiques et de collagènes qu'elle synthétise. Elle est quelquefois séparée de l'adventice par la limitante élastique externe.

1.2.3. L'adventice

Cette tunique ancre le vaisseau sanguin dans les tissus voisins. C'est un tissu lâche composé de fibres de collagène, de fibres élastiques, de CML et de fibroblastes dans lesquels vont cheminer les *vasa-vasorum* irriguant la partie externe de la média.

1.3. Relation structure-fonction des artères

Selon la localisation et la fonction des artères, on observe des différences variables au sein de ces trois tuniques. Par exemple, l'aorte, artère de gros calibre, est constituée d'une multitude de fibres élastiques disposées les unes contre les autres. Cette propriété d'élasticité lui permet de supporter les fortes augmentations de pression lors de l'éjection systolique du cœur (**Figure 1.2A**). Au

contraire, l'artère fémorale possède moins de fibres élastiques mais plus de cellules musculaires lisses qui s'enchevêtrent entre elles. Cette disposition confère à ce type d'artère une propriété de contractilité rapide et efficace lors de l'arrêt des saignements (hémostase) en se resserrant pour réduire le flux et limiter les fuites sanguines (**Figure 1.2B**).

Les artérioles sont de petites artères qui transportent le sang dans les capillaires. Situées près des artères desquelles elles émergent, elles sont dotées d'une intima semblable à celle des artères, d'une média composée de muscle lisse avec très peu de fibres élastiques et d'une adventice riche en collagène. Elles jouent un rôle important dans la régulation du flux sanguin des territoires qu'elles irriguent (**Figure 1.2C**). Enfin, les capillaires ne sont composés que d'une seule couche de cellules endothéliales et ne possèdent ni média, ni adventice. Leur rôle principal est de permettre l'échange de nutriments et de déchets entre le sang et les cellules. Dans certaines régions de l'organisme, plusieurs capillaires s'unissent pour former une veinule (**Figure 1.2D**).

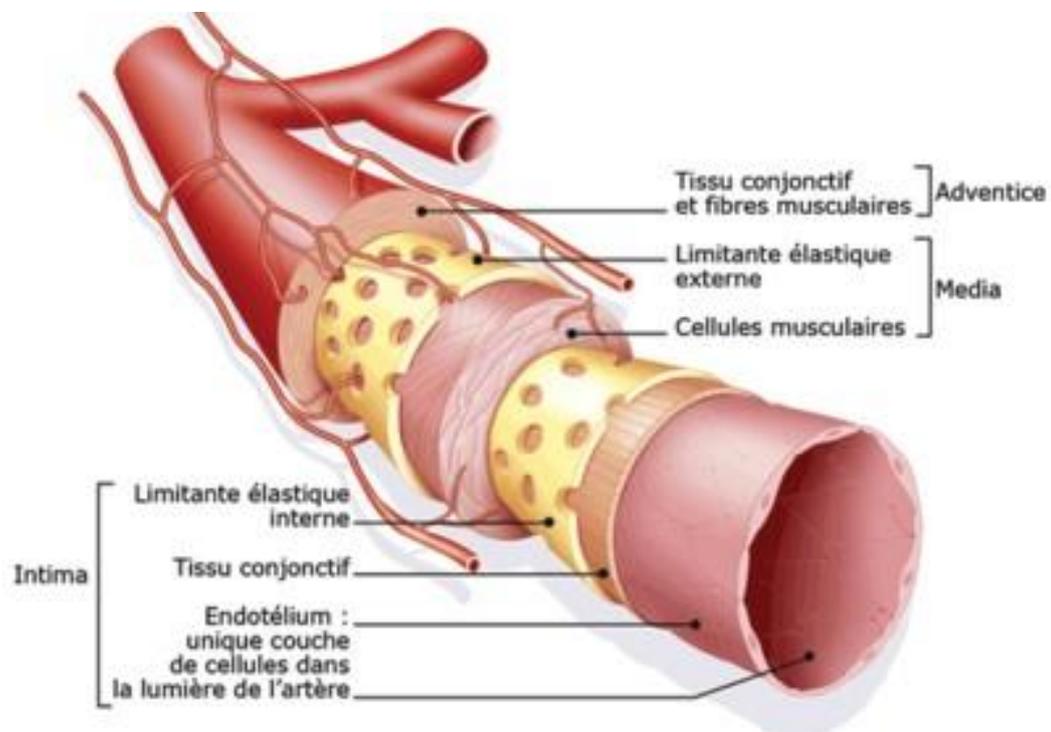


Figure 1.1 : Artère de moyen et gros calibre avec ses trois tuniques : intima, média et adventice (d'après le site internet de Sanofi-aventis France).

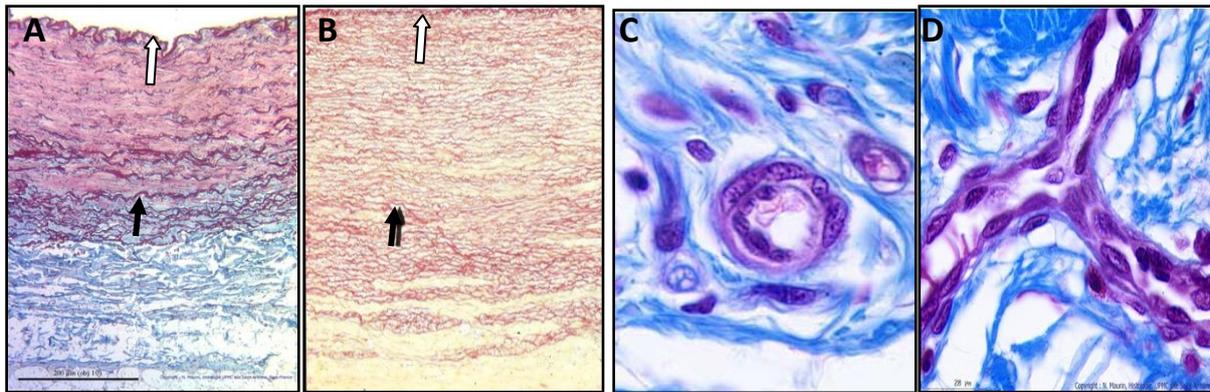


Figure 1.2 : Artère musculaire (x250) colorée au trichrome de Masson-Orcéine (coloration spécifiques des fibres élastiques) (A). Artère élastique. La paroi est constituée d'une cinquantaine de lames élastiques parallèles. Elles se caractérisent toutes par un trajet sinueux (B). Artériole colorée au trichrome de Masson modifié Goldner (x1000) (C). Capillaire sanguin coloré au Trichrome de Masson modifié Goldner (x1000) (D). Flèches pleines : fibre élastique de la média. Flèches blanches : monocouche de cellules endothéliales de l'intima. (D'après le site internet de l'université Pierre et Marie Curie, Paris).

II) La Plaque d'athérome

1.4. Définition

L'athérosclérose se définit comme une maladie inflammatoire chronique qui atteint les vaisseaux de moyens et gros calibres. Elle se caractérise par un épaississement de l'intima, faisant suite à une accumulation de lipides (triglycérides et cholestérol), de glucides complexes et de débris sanguins. Enfin, l'athérosclérose se distingue du terme artériosclérose qui signifie vieillissement des artères.

1.5. Séquence de développement de la plaque

D'après Stary et al, le processus de formation de la plaque d'athérome est très précoce. Il pourrait débuter dès la vie fœtale où il y aurait un début d'accumulation de cellules riches en lipides (cellules spumeuses) dans les artères. Ce même auteur décrit également la présence, chez le jeune adulte, de formations surélevées, linéaires, parallèles et de couleur jaunâtre qu'il a qualifié de stries lipidiques. Elles se distinguent en microscopie par la présence de macrophages, de cellules spumeuses disposées en couches allongées, quelques CML gorgées de lipides, des Lymphocytes T et des gouttelettes lipidiques [Stary et al., 1994] [Stary et al., 2000]. Même si ces stries lipidiques sont résorbables, elles constituent la première étape de la formation de la plaque d'athérome. Sous certaines conditions (hypercholestérolémie, mauvaise hygiène de vie...), ces stries lipidiques peuvent évoluer en lésion précoce avec le développement d'un cœur lipidique contenu dans une chape fibreuse sécrétée par les cellules de la matrice extracellulaire (MEC). A ce stade de la maladie, l'artère

est capable de « réagir » et de compenser la réduction de la lumière par une dilatation externe (remodelage vasculaire externe) (**Figure 1.3**).

Ces lésions précoces peuvent également se compliquer. Les leucocytes qui y sont présents peuvent sécréter des métalloprotéinases (**MMP**) qui vont dégrader les constituants de la chape fibreuse. Celle-ci s'affine et se fissure exhibant les constituants de la MEC thrombogènes au sang circulant. Un thrombus se forme et peut obstruer totalement l'artère amenant à l'ischémie des territoires qu'elle irrigue. Le thrombus peut se résorber sous l'effet d'une thrombolyse endogène ou thérapeutique. Cependant la thrombine et le **PDGF** (Platelet Derived Growth Factor) générés au moment de la coagulation vont stimuler la prolifération et la migration des CML alors que le **TGF- β** présent localement stimule la production de collagène. Cette prolifération des cellules de la MEC, épaisse la chape fibreuse qui, par voie de conséquence, réduit la lumière vasculaire (remodelage vasculaire interne) entraînant des dyspnées d'effort avec risque d'angor [Libby, 2002] (**figure1.3**).

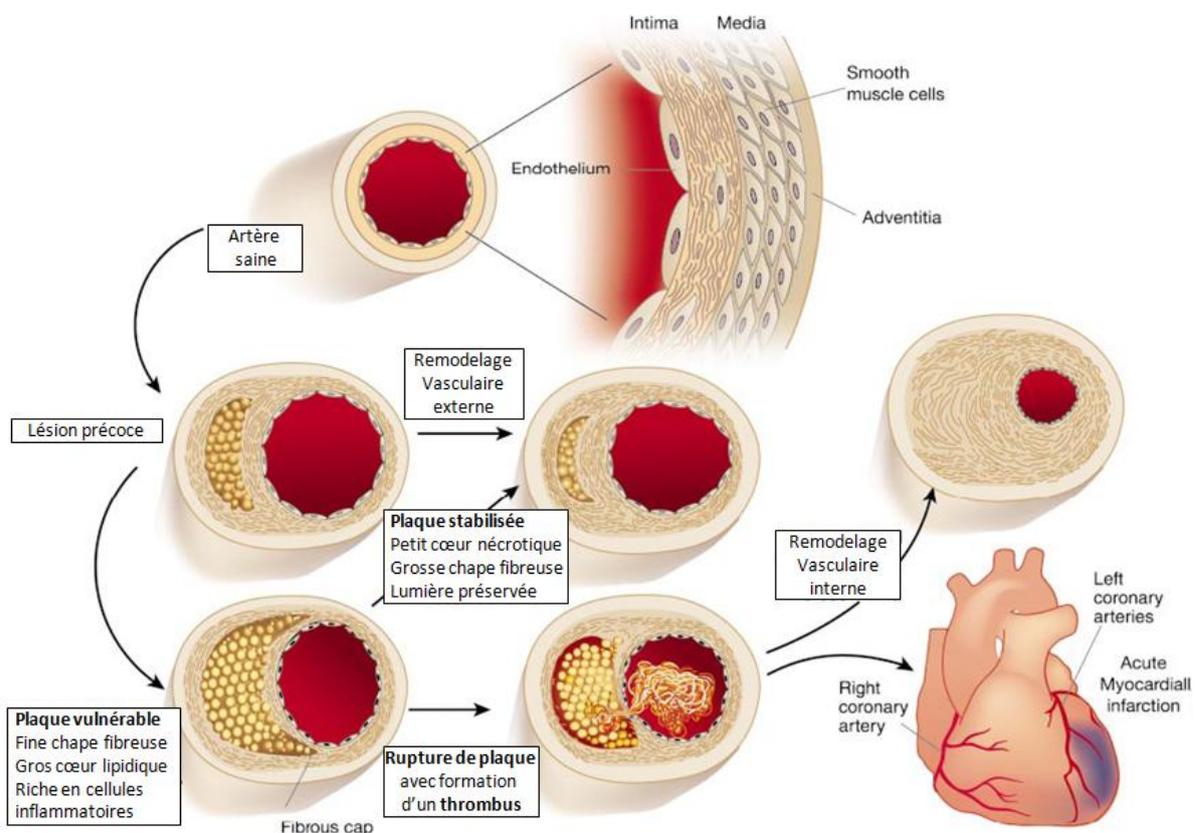


Figure 1.3: Genèse de la plaque d'athérome et ses complications majeures [Libby et al., 2002].

1.6. Conséquences

1.6.1. Infarctus du myocarde (IDM)

C'est la nécrose du myocarde due à un défaut d'irrigation d'une artère coronaire obstruée. Elle se manifeste par une douleur thoracique rétrosternale souvent diffuse avec irradiation bilatérale et symétrique. Elle résiste à la trinitrine (puissant vasodilatateur) mais est soulagée par les opiacés.

1.6.2. Angine de poitrine (Angor)

Ce sont des douleurs thoraciques en rapport avec des troubles de la circulation coronariennes. Le plus souvent, il s'agit d'une diminution du débit sanguin due à une diminution du calibre des artères coronaires atteintes de remodelage vasculaire interne. La douleur est rétrosternale localisée, irradie au bras gauche et apparaît à l'effort. La trinitrine fait céder la douleur en moins d'une minute en agissant sur la relaxation des CML.

1.6.3. Accident Vasculaire Cérébral (AVC)

Les plaques d'athérome touchent le plus souvent les carotides mais aussi les artères cérébrales. Cette affection se caractérise par des symptômes neurologiques (apraxie, aphasie...) et moteurs (hémiparésie, hémiplégie...). Le traitement dépend de la sévérité de l'affection : de la thrombolyse à l'endarterectomie.

1.6.4. Anévrisme

C'est une dilatation localisée de la paroi d'une artère aboutissant à la formation d'une poche de taille variable, communiquant avec l'artère au moyen d'une zone rétrécie. Ce rétrécissement est souvent le résultat de la modification structurale de l'artère par la présence d'une plaque d'athérome.

1.7. Incidence

Les maladies cardiovasculaires sont à l'origine du décès de près de 19 millions de personnes par an ce qui les place au premier rang de mortalité dans les pays industrialisés et en voie de développement. En France, près d'1 français sur 4 (28%) meurt chaque année des complications liées à un AVC ou un infarctus du myocarde. L'incidence des manifestations cliniques varie selon les régions de France. Elle est plus élevée dans le nord du pays que dans le sud.

1.8. Facteurs de risque

Les nombreuses études épidémiologiques menées ces dernières années ont révélé des facteurs de risques multiples agissant le plus souvent en synergie et responsables de l'athérosclérose (Tableau 1). Parmi les facteurs de risques cités ci-dessous, le taux élevé de cholestérol sérique (en particulier les LDL et les LDL ayant subi des modifications oxydatives) est certainement le plus important puisqu'il peut être à lui seul responsable du développement des lésions chez l'homme et sur les modèles animaux [Glass et al., 2001] (**Tableau 1.1**).

| FACTEURS AVEC UNE COMPOSANTE GÉNÉTIQUE SIGNIFICATIVE |
|---|
| Taux élevé de LDL et VLDL |
| Taux faible de HDL |
| Taux élevé de lipoprotéines |
| Hypertension artérielle |
| Diabète |
| Sexe masculin |
| Taux élevé d'homocystéine |
| Taux élevé de facteurs hémostatiques (fibrinogène, réactivité plaquettaire) |
| syndrome métabolique (ex : insulino-résistance) |
| FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX |
| Tabagisme |
| manque d'exercice |
| régime riche en graisse |
| agents infectieux (<i>Chlamidia Pneumoniae</i>) |

Tableau 1.1: Facteurs génétiques et environnementaux associés à l'athérosclérose et aux maladies coronariennes (D'après le document de thèse de Rémy Robert, université Bordeaux 2).

III) Cellules et éléments impliqués dans la formation de la plaque d'athérome

1.9. Cellules de la paroi vasculaire

1.9.1. Les cellules endothéliales vasculaires

Longtemps considéré comme une simple barrière, l'endothélium vasculaire est aujourd'hui connu pour être impliqué dans l'hémostase mais aussi dans la régulation du fonctionnement des tissus sous-jacents. Ainsi, la cellule endothéliale est génératrice de monoxyde d'azote (**NO**) impliqué dans la relaxation des CMLs sous-jacentes et dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. L'endothélium génère également d'autres substances telles que les dérivés de l'acide arachidonique

dont la prostacycline (**PGI₂**), qui tout comme le NO, inhibe localement la contraction des CMLs et l'agrégation plaquettaire. On peut également citer d'autres facteurs vasodilatateurs tels que l'**EDHF** (Endothelial Derived Hyperpolarising Factor) mais aussi vasoconstricteurs comme l'Endothéline ou l'angiotensine II. En réalité l'endothélium exprime l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II qui peut à son tour activer localement l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) et engendrer ces effets vasoconstricteurs.

L'endothélium est directement soumis aux forces mécaniques générées par le fluide en écoulement permanent. Des forces dites de cisaillements s'exercent sur les cellules endothéliales et modifient leur forme et leur orientation. Des expériences d'écoulement sur un lit de cellules endothéliales en culture ont montré que l'activité métabolique et le taux de prolifération de ces cellules sont modifiés [Malek et Izumo., 1996]. ces contraintes pourraient modifier le flux de calcium pénétrant dans la cellule de la paroi vasculaire et provoquer une libération de substances vasoactives par la cellule. Ce phénomène est à l'origine d'une vasodilatation dite flux dépendante et dont les acteurs ne sont pas encore tout à fait connus.

L'endothélium exprime à sa surface des molécules permettant le recrutement des cellules inflammatoires. Deux classes principales de récepteurs sont exprimées : Les sélectines (P et E) et des récepteurs faisant partie de la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1, ICAM-2 et les VCAM-1). Ces molécules permettent aux leucocytes de traverser l'endothélium et d'amorcer le processus inflammatoire qui sera détaillé ultérieurement. (**Voir section 2.1.**).

Les cellules endothéliales sont donc plus qu'une barrière séparant le sang des tissus. Outre leurs effets régulateurs de la contractilité vasculaire, elles contribuent au contrôle de l'hémostase et au recrutement des cellules inflammatoires. De ce fait, on peut imaginer qu'une modification pathologique de l'endothélium peut avoir un impact important sur l'homéostasie et entraîner des troubles conséquents.

1.9.2. Les cellules musculaires lisses (CML)

Les CML sont des cellules allongées (25-50µm de diamètre au repos), mononuclées et délimitées par une lame basale externe. Elles se disposent en faisceaux s'imbriquant les unes aux autres en quinconce et entrent en contact entre elles à l'aide de jonctions cellulaires de type *macula adherens* et desmosomes.

Elles peuvent produire, tout comme les fibroblastes, les constituants de la matrice extracellulaire. Les fibres de collagène ou d'élastine sont responsables de l'élasticité et de la résistance de l'artère alors

que la laminine (protéine d'ancrage) est responsable de la cohésion tissulaire. Tout comme dans le muscle squelettique, la contraction du muscle lisse est due à la présence d'actine et de filaments de myosine. Un dysfonctionnement dans la régulation de la tonicité vasculaire, due à des anomalies de concentration intracellulaire en calcium, engendre une contraction exagérée des CML et aboutit à l'hypertension artérielle.

1.10. Eléments de la paroi vasculaire.

1.10.1. La Matrice Extracellulaire (MEC)

La MEC est l'assemblage de macromolécules présentes dans l'espace extracellulaire. Elle entoure les cellules qui la synthétisent et détermine en retour leur phénotype. Dans les vaisseaux, elle a un rôle de soutien, d'élasticité et de résistance à l'étirement. Les macromolécules composant la MEC sont regroupées en 4 catégories : les collagènes, les fibres élastiques, les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes.

1.10.1.1. Les collagènes

Ce sont les protéines les plus représentées dans la paroi vasculaire (entre 20 à 40% en poids sec). Elles forment une famille d'une vingtaine de membres distincts, regroupés en 2 sous familles :

- Les collagènes de type fibrillaire : Ce sont les types I, II et III. Après leur sécrétion dans la MEC, ils s'assemblent en formant un polymère ordonné, les fibrilles de collagène. Ces dernières s'agrègent et forment les fibres de collagène.
- Les collagènes de type non fibrillaire : Ce sont les types IV, VIII et X. Le type IV est essentiellement retrouvé dans la lame basale où il forme un réseau en multicouches.

Le taux de collagène au sein de la plaque d'athérome augmente au fur et à mesure de la progression de la maladie, pour atteindre jusqu'à 60% du volume de la plaque [Stary et al., 2000]. Les collagènes de type I et III sont retrouvés dans toutes les plaques d'athérome [Katsuda et Kaji, 2003]. En revanche, le collagène de type IV, qui en temps normal, n'est présent que dans la lame basale, entoure les CML de la media au cours de la progression de la maladie [Stary et al., 2000]. Comme nous le verrons plus tard, le collagène a un rôle important dans la liaison aux LDLox (Oxidized light density lipoprotein). Enfin, le collagène a un rôle de renfort et de stabilisation en

opposition à l'action des enzymes libérées par les CML et les macrophages présents au sein de la plaque [Katsuda et Kaji, 2003].

1.10.1.2. Les fibres élastiques

La fonction élastique des vaisseaux est assurée par la présence de fibres élastiques disposées en structures concentriques et fenêtrées. Elles sont composées d'élastine et de glycoprotéines à structure microfibrillaire telles que la fibrilline 1 et 2 et les MAGP (microfibrillar-associated glycoprotein).

L'élastine est une protéine fibrillaire insoluble synthétisée sous forme de précurseur soluble, la tropoélastine. Les molécules d'élastines sont sécrétées dans l'espace extracellulaire et y forment des filaments et des feuilletés dans lesquels elles sont repliées par de très nombreuses liaisons transversales assurées par la présence de fibrillines et de MAGP. Une invalidation du gène unique de l'élastine chez la souris aboutit à une prolifération excessive des CML jusqu'à l'occlusion totale des artères [Urban et al., 2001]. Chez l'homme, l'homozygotie du gène entraîne une sténose supra-vasculaire aortique isolée ou associée au syndrome de Williams-Beuren (dû à une microdélétion de plus de 17 gènes comportant celui de l'élastine) [Meng et al., 1998].

Un autre rôle important des fibres élastiques est la fenestration présente dans les limitantes élastiques. Elles permettent le passage de substances nutritives diffusant à travers les lames, de la lumière vasculaire vers la media. Elles permettent également d'établir des contacts cellules-cellules ou cellules-MEC entre l'intima et la media. Une étude a montré qu'une augmentation du diamètre artériel induite par le flux sanguin entraînait un élargissement des fenestrations [Rossi et al., 2007].

Au cours de l'athérosclérose ou du vieillissement de l'artère, la quantité de calcium (Ca^{++}) liée aux fibres élastiques augmente. Il s'ensuit une rigidification de l'artère altérant ses fonctions contractiles et toniques [Katsuda et Kaji, 2003].

1.10.1.3. Les glycoprotéines de structure

Ce sont des protéines responsables de l'interaction entre la MEC et les membranes cellulaires. Les principales glycoprotéines retrouvées dans la paroi vasculaire sont : La Fibronectine, la Vitronectine, la Laminine, la Thrombospondine et la Tenascine. Elles ont des

séquences peptidiques qui leur permettent de s'auto-associer, de s'associer à d'autres protéines de la MEC ou de s'associer aux récepteurs cellulaires tels que les intégrines. Des études immunohistochimiques ont montré des dépôts plus importants de **vitronectine (VN)** au sein des lésions athéroscléreuses [Guettier C et al., 1987]. De plus, notre laboratoire a sélectionné, grâce à la technique du phage display *in vivo*, un anticorps dirigé contre cette même protéine dans un modèle animal d'athérosclérose [Robert et al., 2006].

La VN existe sous 2 formes, une forme soluble retrouvée dans le plasma et l'autre liée aux autres protéines de la MEC. Bien qu'elle soit majoritairement synthétisée dans le foie, elle a été retrouvée dans les granules de sécrétion α des plaquettes sanguines. De nombreux rapports ont décrit l'accumulation de formes modifiées de vitronectine au sein des plaques d'athérome [Mori, 1996] colocalisées avec les récepteurs $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ [Dufourcq et al., 1998]. Autant son rôle dans l'initiation de la migration des CML est bien établi [Dufourcq et al., 2002], autant il est controversé dans la régulation de l'agrégation plaquettaire. Des études menées chez des souris $VN^{-/-}$ ont suggéré que la VN inhibait la réponse thrombotique *in vivo* [Fay et al., 1999]. Cependant, d'autres études ont montré qu'elle avait un effet prothrombotique en inhibant le principal inhibiteur de la fibrinolyse (**PAI-1**) avec lequel elle interagit [Eitzman et al., 2000]. Afin d'expliquer ces contradictions, Reheman et al. ont réalisé des travaux qui ont permis d'assigner à la VN 2 rôles distincts selon qu'elle soit plasmatique (rôle d'inhibition de l'agrégation plaquettaire) ou liée à la MEC (rôle activateur de l'agrégation plaquettaire) [Reheman et al., 2005].

1.10.1.4. Les protéoglycanes

A l'exception de l'acide hyaluronique, elles sont formées de longues chaînes de Glycosaminoglycanes (**GAG**) liées de façon covalente à un noyau protéique. Leur structure à la fois protéique et glucidique explique leurs grandes capacités à interagir avec les protéines matricielles et cellulaires. Ainsi, on peut aisément expliquer les propriétés physiologiques de la paroi artérielle en terme de viscoélasticité et de résistance aux contraintes mécaniques. Des études de marquage immunohistochimique de différents protéoglycanes durant le processus d'athérogénèse ont montré qu'il existait une distribution différente de ses composés, selon le stade de progression de la maladie. Par exemple, les hyaluronans et les versicans sont présents au stade précoce de la maladie alors que les biglycans et les decorines le sont dans un stade plus avancé [Lévesque et al., 1994][Riessen et al., 1994][Kolodgie et al., 2002].

1.11. Cellules circulantes du sang

1.11.1. Les monocytes et macrophages

Selon le niveau d'expression des récepteurs aux chémokines **CX3CR1** et des molécules de surface **Ly-6C** et **Ly-6G**, on distingue 2 populations de monocytes. Initialement ces populations ont été différenciées par leur niveau de marquage à un anticorps ciblant l'antigène de différenciation myéloïde **Gr-1** [Geissmann et al., 2003]. Fonctionnellement, ces 2 populations se caractérisent par leur capacité à coloniser des zones inflammatoires (phénotype $\text{Ly-6C}^{\text{high}} \text{CX3CR1}^{\text{low}} \text{Gr-1}^{\text{high}}$) ou à servir de précurseur aux macrophages résidents ou aux cellules dendritiques (phénotype $\text{Ly-6C}^{\text{low}} \text{CX3CR1}^{\text{high}} \text{Gr-1}^{\text{low}}$) [Mestas et Ley, 2008]. De récentes études expérimentales ont montré que seules les Ly-6C^{hi} pouvaient coloniser la plaque d'athérome où elles se différencient ensuite en macrophages [Swirski et al., 2007]. De plus, il a été rapporté dans cette même étude que des souris mises sous régime hypercholestérolémiant montrent 2 fois plus de cellules Ly-6C^{hi} dans le sang et la rate, suggérant un mécanisme de différenciation spécifique des monocytes appelé hypercholesterolemia-associated monocytosis (**HAM**).

1.11.2. Les lymphocytes T

Afin d'étudier le rôle des Lymphocytes T dans l'athérosclérose, Robertson et al ont croisé des souris immunodéficientes $\text{Rag1}^{-/-} \text{Rag2}^{-/-}$ (gènes de recombinaison) scid/scid avec des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ ou $\text{LDLR}^{-/-}$ et ont étudié le développement de la maladie en les comparant avec des souris $\text{ApoE}^{-/-}$. Les souris immunodéficientes, ne présentant pas de Lymphocytes T, développent moins de plaques d'athérome que les souris immunocompétentes [Robertson et al., 2006]. En injectant aux souris immunodéficientes une population de Lymphocytes T CD4^+ , Zou et al ont montré que les souris développaient à nouveau la maladie indiquant ainsi que les lymphocytes CD4^+ ont un effet pro-athérogénique. [Zhou et al., 2000].

Parmi les CD4^+ , on distingue les **LTh1** et **LTh2**, provenant d'une même cellule T naïve ou T0 . Les **Th1** sont les plus représentés dans la plaque d'athérome. Ils sont activés par l'IL-2 et sécrètent de l'IFN γ et de l'IL-12 qui ont un effet pro-athérogénique en activant l'endothélium vasculaire et les macrophages [Hansson et Libby, 2006]. La délétion du gène codant pour IFN γ ou son récepteur chez la souris montre une réduction importante de l'athérosclérose alors que l'administration d'IFN γ recombinant accélère l'apparition de la maladie [Tenger et al., 2005]. De même pour l'IL-12, son administration augmente la maladie avec une augmentation concomitante de l'expression d'IFN γ [Lee et al., 1999]. Enfin, en absence du facteur de transcription **T-bet** responsable de la

différenciation des Th1, la progression de la maladie est plus lente [Buono et al., 2005]. Contrairement à la voie des Th1, les Th2 sont considérés comme anti-athérogéniques. Activés par l'IL-4, ils sécrètent entre autre de l'IL-5, cytokine considérée comme protectrice contre le développement de l'athérosclérose. Des souris $LDLR^{-/-} IL5^{-/-}$ montrent clairement une aggravation de la maladie [Binder et al., 2004].

Les Lymphocytes **Treg** sont un autre type de cellules CD4⁺ retrouvées sur le site des lésions athéroscléreuses [Veillard et al., 2004]. Ces cellules sécrètent du TGFβ dont on a montré les propriétés anti-athérogéniques. En effet, des souris doubles mutantes $ApoE^{-/-}$ et $TGF\beta^{-/-}$ [Grainger et al., 2000] ou simples mutantes $TGF\beta R^{-/-}$ [Lutgens et al., 2002] développent sensiblement plus de plaques d'athérome. Les Treg sécrètent également de l'IL-10. Des souris $IL-10^{-/-}$ ont un taux très faible de collagène dans leur plaque dû à une activité importante des protéases. [Caligiuri et al., 2003].

Une autre voie rapportée dans la littérature est celle de **l'axe IL-23-IL17**. Bien que plusieurs données s'accordent à dire que cette voie est pro-athérogène, quelques études rapportent des résultats contraires [Chen et al., 2010][Hansson, 2009][Taleb et al., 2010].

1.11.3. Les cellules B

Il y a très peu de Lymphocytes B dans la plaque d'athérome [Robertson et al., 2006] mais de grandes quantités ont été décrites dans la région périadventicielle des artères, riche en infiltrats lymphoïdes [Grabner et al., 2009]. Plusieurs études étayaient l'hypothèse d'une activité anti-athéromateuse de l'immunité humorale. L'injection intraveineuse de préparations d'Immunoglobuline inhibe le développement des plaques chez des souris $ApoE^{-/-}$ [Nicoletti et al., 1998]. Une splénectomie réalisée chez ces mêmes souris aboutit à une augmentation des lésions alors que le transfert de cellules B l'améliore [Caligiuri et al., 2002]. Une autre étude réalisée sur des souris doubles KO $LDLR^{-/-} Rag1^{-/-}$ décrit un effet protecteur durant la phase d'initiation de la maladie uniquement [Li et al., 2001]. Ces effets seraient en partie dus à la production par les cellules B d'anticorps dirigés contre les LDLox [Schiopu et al., 2004]. Récemment, Aït-oufella et al ont rapporté des résultats en contradiction avec ceux décrits dans la littérature. Ils décrivent que la déplétion des cellules B à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope **CD20**, réduit significativement l'athérosclérose chez plusieurs modèles murins de la maladie. Bien que cette déplétion préserve la production naturelle et protectrice d'IgM anti-LDLox, elle réduit significativement les taux d'IgG anti LDLox et de Lymphocytes T infiltrés dans la plaque. Cet effet est également couplé à une réduction

importante du taux d'IFN γ mais augmente significativement celui de l'IL-17 dont l'action, serait athéroprotectrice [Aït-oufella et al., 2010].

1.11.4. Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sont l'un des premiers acteurs de l'athérogénèse. Massberg et al ont été les premiers à démontrer qu'*in vivo*, les plaquettes pouvaient se lier à l'endothélium d'artères carotidiennes de souris ApoE^{-/-}, avant même l'apparition de plaques d'athérome [Massberg et al., 2002]. Ensuite Burger et Wagner ont montré que cette adhésion se faisait via la P-selectine [Burger et wagner., 2003]. Enfin, Huo et al ont démontré qu'il y avait exacerbation de la maladie lorsqu'ils transfusaient de façon répétée des souris ApoE^{-/-} avec des populations de plaquettes activées [Huo et al., 2003]. Toutes ces études ont posé les jalons d'un nouveau paradigme selon lequel les plaquettes n'étaient pas seulement un acteur tardif de l'athérogénèse (athérombose) mais qu'elles agissaient aussi comme un élément initiateur de la pathologie. La plaquette jouerait également un rôle clé dans l'internalisation des LDL au sein de la plaque d'athérome. Dès le début des années 1980, Koller et al, avaient montré la capacité des plaquettes à lier et internaliser des LDL grâce à des récepteurs différents des récepteurs aux LDL classiques (LDLR) [Koller et al., 1982]. Dans une revue récente, Siegel-Axel et al identifient ces récepteurs comme étant les récepteurs scavenger, notamment de la classe B (CD36, SR-BI, SR-BII et CLA-1) et de la classe E (LOX-1) [Siegel-Axel et al., 2007]. Les récepteurs scavenger de type A, présents cette fois-ci à la surface des macrophages, sont responsables, entre autre, de la phagocytose des plaquettes sénescents [Brown et al., 2000]. Siegel-Axel et al proposent, que les macrophages pourraient utiliser cette voie pour phagocyter les plaquettes ayant internalisé des LDL [Siegel-Axel et al., 2007]. Ce processus constituerait une voie parmi les nombreuses qui permettent la formation de cellules spumeuses au sein de la plaque (**Figure 1.4**).

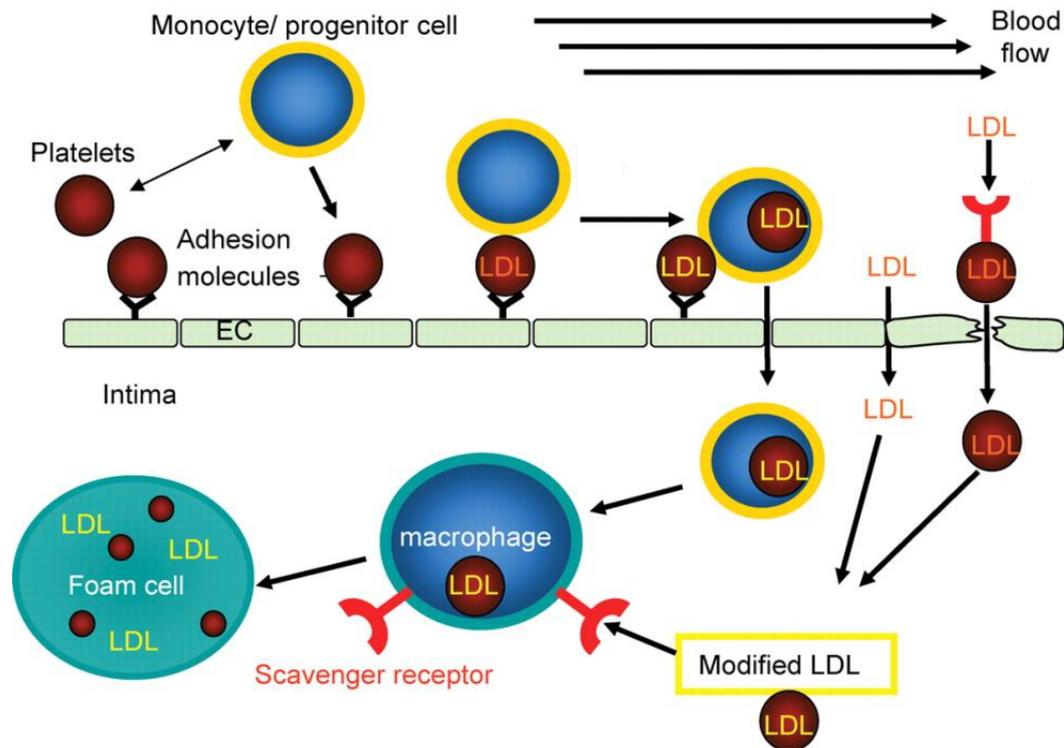


Figure 1.4 : Rôle hypothétique des plaquettes dans la formation de cellules spumeuses. Les plaquettes lient les LDL dans le sang, s'activent puis adhèrent à l'endothélium vasculaire (surtout au niveau des bifurcations). L'adhérence des plaquettes altère le fonctionnement normal de l'endothélium qui en sécrétant des chemokines, recrute des monocytes. Ces derniers sont capables de phagocyter les plaquettes gorgées de LDL et de migrer vers l'intima de la paroi vasculaire où elles se développent en macrophages. Les LDL natifs (Orange) sont modifiés en LDLox (jaune) par les cellules endothéliales et les CML dans l'intima mais aussi par les plaquettes et les monocytes en dehors de la paroi vasculaire. Les plaquettes et les macrophages expriment des récepteurs scavenger qui peuvent lier les LDLox. Dans les sites lésionnels, les LDLox diffusent passivement à travers l'endothélium mais peuvent également être transportés par les plaquettes après avoir été internalisés à l'aide des récepteurs scavenger. Toutes ces voies amènent à la formation de cellules spumeuses (ici foam cell). [Siegel-Axel et al., 2007].

IV) Les lipides

1.12. Généralités

Les lipides sont essentiels à toutes les cellules du vivant, ils sont la source principale d'énergie et constituent les membranes cellulaires. La biosynthèse se fait dans le cytoplasme à partir d'un malonyl-CoA et aboutit à la formation du palmitate (C16 :0) qui est le précurseur de toute une série de lipides à longue chaîne carbonée. Parmi ces lipides, on peut citer l'acide arachidonique (oméga 6), principal précurseur des lipides dits « régulateurs » ou Eicosanoïdes.

1.13. Les Eicosanoïdes

Les constituants majeurs de la membrane plasmique sont les phospholipides. Les phospholipases cellulaires, et tout particulièrement la phospholipase A2 (**PLA2**), sont activées durant l'inflammation et dégradent les phospholipides en acide arachidonique (**AA**). AA a une courte demi-vie et peut être métabolisé de deux façons : par la voie de la cycloxygénase (**Cox**) ou de la lipoxygénase (**LO**). La voie des Cox produit des prostaglandines, principalement des prostacyclines et thromboxanes alors que la voie des lipoxygénases produit principalement des leucotriènes (**Figure 1.5**).

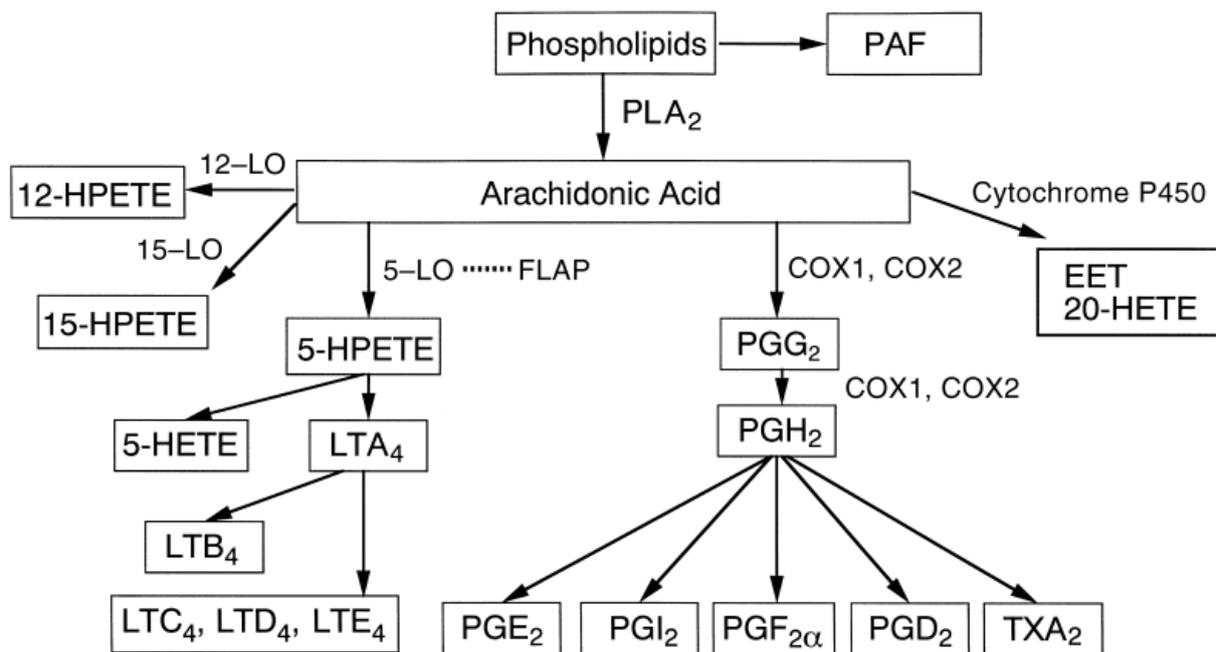


Figure 1.5 : Les voies métaboliques de l'acide arachidonique. Pour les abréviations, se référer au texte ou à l'index des abréviations page 8.

1.13.1. La voie des cycloxygénases et ses dérivés prostanoides

Les Cox sont localisées principalement le long du réticulum endoplasmique (RE) et de l'enveloppe péri-nucléaire de l'ensemble des cellules de l'organisme. Leur hétérogénéité a été décrite en 1991 avec la distinction de la Cox-1, enzyme constitutive et la Cox-2, enzyme inductible. Le gène de la Cox-2 est stimulé par de nombreux médiateurs inflammatoires comme le TNF α ou l'IL-1. De manière simple, une stimulation entraîne l'activation de la voie des MAP-Kinases qui à son tour, stimule la PLA2 pour la production d'AA. Cet AA est à son tour pris en charge par les Cox (-1 et-2) dans tous les tissus ou uniquement par la Cox-2 dans les zones d'inflammation [Seibert et al.,

1997][Jackson et al., 2000]. Ainsi la Cox-2 est schématiquement impliquée dans les processus pathologiques (inflammation et certains cancers) alors que la Cox-1 serait prédominante dans les régulations physiologiques (sécrétion gastrique, agrégation plaquettaire...). Ceci explique pourquoi la recherche d'inhibiteurs sélectifs des Cox-2 est importante pour éviter les effets secondaires dus à l'inhibition concomitante des Cox-1 par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (**AINS**). (**cf chapitre ciblage thérapeutique**).

Les prostaglandines (PG) sont une famille de molécules lipidiques solubles à activité hormone-like, produites par différents types cellulaires dans l'organisme suite à l'action des Cox. Par exemple, les monocytes et macrophages produisent aussi bien les PGE2 que les PGD2 alors que les neutrophiles ne produisent que les PGE2, et les mastocytes les PGD2. Les PGE2 favorisent la perméabilité vasculaire et sont pyrogènes alors que la PGI2 ou prostacycline peut être produite par l'endothélium vasculaire et agir comme vasodilatateur local. A contrario, TXA2 ou thromboxane A2 est un puissant vasoconstricteur produit par les monocytes, macrophages et plaquettes sanguines.

1.13.2. La voie de la lipoxygénase

1.13.2.1. La 5-Lipoxygénase

Plusieurs LO métabolisent l'acide arachidonique. Les leucotriènes (**LT**) sont issus de l'activité de la 5-lipoxygénase (**5-LO**). Ils sont produits essentiellement par les mastocytes et les divers leucocytes sanguins, d'où leur dénomination. L'intérêt des leucotriènes paraît donc limité aux phénomènes inflammatoires. La 5-LO est cytosolique et migre vers l'enveloppe nucléaire au contact de la 5-LO activating protein (**FLAP**) avec lequel elle co-localise. Le complexe 5-Lo/FLAP prend en charge l'acide arachidonique et le métabolise en 5-HETE puis en LTA4 (**figure 1.5**). Les LTA4 sont ensuite rapidement métabolisés, d'une part en LTB4, et d'autre part en LTC4 qui subit alors des modifications pour donner LTD4, LTE4 et LTF4. Ces dernières molécules, appelées initialement SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) ont un rôle dans la contraction des muscles lisses bronchiques et l'exsudation plasmatique des veinules postcapillaires durant l'inflammation.

1.13.2.2. Les 12/15-Lipoxygénases

Les 12/15 lipoxygénases (12/15-LO) métabolisent également l'AA en deux molécules qui sont le 12-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque (12-HPETE) et 15-HPETE (**Figure 1.5**). Ces 2

dérivés ont la capacité d'oxyder les acides gras estérifiés, notamment ceux présents dans les particules LDL (Light density lipoprotein) [Huo et al., 2004][Leitinger, 2003]. La 15-LO peut également induire l'acide hydroperoxy-octadecadienoic (HPODE) depuis l'acide linoléique [Leitinger, 2003] (**Figure 1.6**). L'inhibition pharmacologique de la 15-LO résulte en une atténuation de l'athérosclérose chez le lapin soumis à un régime gras [Huo et al., 2004]. De même, des souris ApoE^{-/-}, LDLR^{-/-} ou apobec1^{-/-} (enzyme responsable de l'editing de l'apoB) et LDLR^{-/-} déficientes en 15-LO voient l'apparition et la progression de la maladie significativement retardés [Cyrus et al., 1999]. Les parois vasculaires humaines contiennent également la 12-LO et la transfection à l'aide d'oligonucléotides anti-sens de 12-LO diminue l'activité chemoattractive des monocytes induite à l'aide de LDL oxydées (**LDLox**) [Navab et al., 2000]. HPODE et HPETE ont été montrés comme responsables de la formation de phospholipides oxydés (**POVPC, PEIPC et PGPC**) à partir de phospholipides non oxydés **PAPC** présents dans la particule de LDL [Navab et al., 2000] (**Figure 1.6**). Comme nous le verrons plus tard, ces LDLox sont capables d'initier la maladie par induction au sein de la cellule endothéliale, de gènes pro-inflammatoires tels que MCP-1 et IL-8 [Cushing et al., 1990]. De plus les LDLox peuvent lier les récepteurs scavenger CD36 présents à la surface des macrophages, contrairement aux LDL natifs [Podrez et al., 2002].

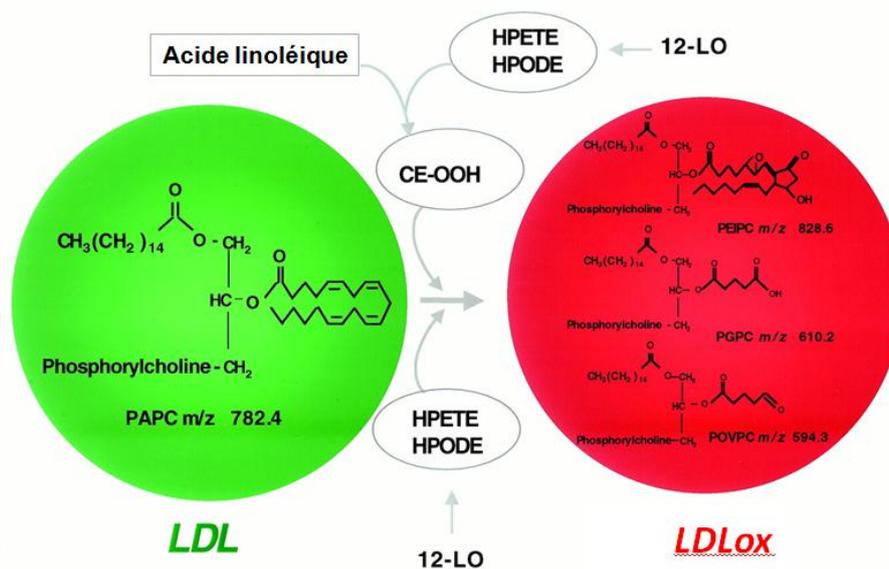


Figure 1.6 : Formation de LDLox à partir de l'oxydation des phospholipides PAPC. PAPC est représenté dans les molécules de LDL natifs. La voie de la 12-LO génère de l'HPETE et de l'HPODE qui peuvent directement s'associer avec les LDL ou interagir avec l'acide linoléique pour la formation de molécules pro-oxydatives (CE-OOH). CE-OOH peut alors oxyder PAPC et donner PEIPC, PGPC et POVPC qui forment la molécule de LDLox. PAPC : 1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine, PEIPC : 1-palmitoyl-2(5,6-epoxyisoprostané E2)-sn-glycero-3-phosphorylcholine, POVPC : 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholine, HPETE : hydroxyperoxyeicosatétraénoïque, HPODE : acide hydroperoxy-octadécadiénoïque, CE-OOH : cholesteryl linoléate hydroperoxyde. Les ratios de masses ioniques (m/z) sont donnés à titre indicatif [Navab et al., 2001].

1.13.3. Le PAF (facteur d'activation plaquettaire)

Certaines PLA2 génèrent un médiateur inflammatoire, le facteur d'activation plaquettaire ou **PAF**, à partir d'un glycérophospholipide, le 1-o-alkyl-phospholipide (qui est un analogue de la phosphatidylcholine). Le PAF, médiateur lipidique agit sur plusieurs cellules, notamment les plaquettes sanguines où il joue un rôle dans l'agrégation.

1.14. Le cholestérol

De nos jours, le cholestérol est sans nul doute, le lipide le plus médiatisé. Bien que sa réputation soit ternie par son implication dans les maladies cardiovasculaires, il n'en demeure pas moins qu'il reste essentiel pour le bon fonctionnement de notre organisme. Il est présent dans les membranes cellulaires où il réduit la fluidité de la bicouche lipidique. Il est également le précurseur de plusieurs molécules telles que les hormones stéroïdes, la vitamine D ou les acides biliaires. Son origine est double, il peut provenir de l'alimentation ou être synthétisé par l'organisme, principalement par le foie. L'alimentation procure entre 200 et 500mg de cholestérol. Il peut également être absorbé de la bile par l'intestin (800-1200mg/j) ou provenir de la desquamation des cellules épithéliales intestinales (300mg/j). Son excrétion de l'organisme se fait sous forme d'acides biliaires, de cholestérol libre non réabsorbé dans l'intestin ou de sébum. La perte fécale quotidienne est de 550mg depuis la bile et 250mg depuis les acides biliaires alors que les pertes liées au sébum s'élèvent à 100mg. Un total de 900mg devra alors être dérivé de l'alimentation ou être synthétisé chaque jour [Levy et al., 2007].

Le cholestérol circule sous forme complexé aux lipoprotéines. Sa concentration chez l'homme est aux alentours de 100 à 300mg/dl (2.5-7.5 mmol/l). Dans plusieurs pays asiatiques, cette concentration est inférieure à 200mg/dl (5 mmol/l) alors qu'en Europe ou aux Etats-Unis, elle est généralement au-delà de cette valeur [Mackay et Mensah, 2004]. A la naissance, les taux de cholestérol sériques sont stables pour toutes les populations, qui est d'environ de 80mg/dl (2mmol) [Bansal et al., 2005]. Pour des raisons d'hydrophobicité, le cholestérol ne peut circuler dans le sang sous forme libre, il doit être complexé à des lipoprotéines formant ainsi un complexe macromoléculaire capable de migrer entre les tissus. Les principales lipoprotéines sont les chylomicrons, les VLDL, LDL et HDL.

1.15. Les Lipoprotéines

Le transport des lipides dans le sang est rendu possible grâce aux lipoprotéines. Ce sont des complexes macromoléculaires composés de protéines, les apolipoprotéines (apo) et de lipides (phospholipides, cholestérol, ester de cholestérol et triglycérides) (**Figure 1.7**).

Les lipoprotéines sont classées selon le type d'apo qu'elles renferment et de leur mobilité électrophorétique. Ainsi, on distingue au moins 8 classes chez l'homme et qui sont représentées dans le tableau suivant (**Tableau 2.2**).

| Type de lipoprotéines | Mobilité électrophorétique | Densité (g/ml) | Taille (nm) | Proportion EC/TG | Principales apolipoprotéines |
|-----------------------|----------------------------|----------------|-------------|------------------|------------------------------|
| Chylomicrons | Pas de migration | 0,93 | 75-1 200 | 1/19,1 | B48, E, C, AI |
| VLDL | préβ | 0,93-1,006 | 30-80 | 1/3,3 | B100, E, C |
| IDL | préβ lent | 1,006-1,019 | 27-5 | 1/3,5 | B100, E |
| LDL | β | 1,019-1,063 | 18-27 | 1/0,23 | B100 |
| HDL2 | α | 1,063-1,125 | 9-12 | 1/0,22 | AI, AII, C |
| HDL3 | α | 1,125-1,210 | 07-9 | 1/0,19 | AI, AII, C |
| préβHDL | préβ | 1,210-1,250 | <7 | nd | AI |
| | | | (disques) | | |
| Lp(a) | | 1,040-1,115 | 25 | | B100, (a) |

Tableau 2.2: Caractéristiques physicochimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines (Toussaint, 2003). EC: ester de cholestérol, TG : triglycéride.

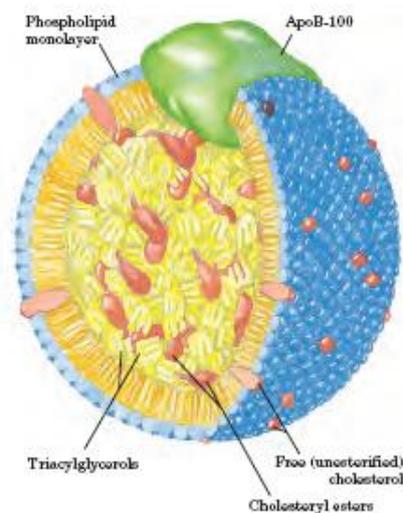


Figure 1.7 : Structure générale d'une lipoprotéine plasmatique. Les lipoprotéines transportent dans le sang les graisses liposolubles pour les faire parvenir aux organes cibles. Le noyau de la lipoprotéine contient des triglycérides, du cholestérol estérifié et non estérifié. L'enveloppe externe se compose de phospholipides et d'apolipoprotéines. (d'après Lehninger's Principles of Biochemistry 4th Edition - D L Nelson, Cox Lehninger - W H Freeman 2004)

1.16. Transport du cholestérol dans le sang

Les chylomicrons sont synthétisés dans les cellules épithéliales qui bordent l'intestin grêle. Ce sont des lipoprotéines de grande taille, riches en triglycérides et cholestérol. Les triglycérides sont les principaux composés lipidiques de l'alimentation. Dans les entérocytes, les triglycérides sont resynthétisés et complexés à l'apoB48, un processus dépendant des **MTP** (Microsomal triglycerid

transfert protein) pour la formation des chylomicrons [Olofsson et al., 2000]. Le cholestérol alimentaire est également absorbé par les entérocytes ; il est rapidement estérifié par l'enzyme **ACAT** (Acyl coenzyme A-cholesterol acetyl-transferase) puis complexé aux triglycérides pour former le cœur du chylomicron. Dans la circulation sanguine, les chylomicrons rentrent en contact avec les **LPL** (lipoprotéine lipase) grâce à l'apoC-II. Ces enzymes, synthétisées par les tissus périphériques, restent fixées aux cellules endothéliales, flottant librement dans la lumière des capillaires irrigant ces tissus. Les acides gras libérés lors de l'hydrolyse des triglycérides pénètrent dans les tissus sous-jacents où ils sont utilisés comme substrats énergétiques. Les chylomicrons rémanents, c'est-à-dire, débarrassés de leurs triglycérides peuvent être soit internalisés par les tissus périphériques ou alors, dégradés par le foie qui les capture grâce aux **LDLR** (LDL receptor) et **LRP** (LDL-like receptor) [Cooper et al., 1997] dont le ligand est l'apoE que portent ces molécules rémanentes. En marge de ce processus, les apoA-I des chylomicrons peuvent se dissocier et rejoindre les préβHDL, précurseurs des HDL (**Figure 1.8**).

Le foie exporte également les triglycérides et le cholestérol vers les tissus périphériques à l'aide des VLDL (Very light density lipoprotein) en les complexant à l'apoB100 via les MTP du réticulum endoplasmique. La dégradation des VLDL est identique à celle des chylomicrons, dépendante des lipoprotéines lipases. Celles-ci sont activées par les apoC-II présentes à la surface des VLDL et l'hydrolyse des triglycérides assure un apport régulier d'acides gras aux tissus adipeux et musculaires. Dans la circulation, les VLDL sont avides d'ester de cholestérol qu'ils peuvent capter des HDL grâce à l'enzyme **CETP** présente dans le plasma humain. La relative résistance des rongeurs à l'athérosclérose peut s'expliquer par l'absence de la CETP dans leur plasma. Cependant l'émergence de modèles de souris transgéniques dans les laboratoires de recherche a permis de résoudre cette contrainte pour l'élaboration de modèles animaux de l'athérosclérose (**Figure 1.8**).

La majorité des VLDL rémanentes est dégradée par le foie. Cependant, la perte partielle des triglycérides forme des lipoprotéines à densité moyenne (IDL ou β-VLDL), qui peuvent à leur tour, soit être redistribuées dans les organes périphériques, soit être dégradées par le foie à l'aide des mêmes récepteurs utilisés par les chylomicrons. Enfin une perte plus importante de triglycérides engendre la formation de lipoprotéines de faible densité (LDL). Les LDL sont de petite taille, riches en ester de cholestérol et capables de pénétrer les microvaisseaux pour la distribution du cholestérol au sein même des organes (exception faite du système nerveux central). Elles reconnaissent les LDLR (des tissus périphériques) ou les LDLR et LRP (du foie) grâce à l'apoB100. Le mécanisme d'incorporation cellulaire des LDL par les LDLR a été décrit pour la première fois par Goldstein et Brown qui leur a valu le prix Nobel en 1985. Les LDL se fixent à leur récepteur situé dans des puits recouverts de Clathrine puis internalisés dans des vésicules d'endocytose. Alors que les récepteurs sont recyclés et

réexprimés à la surface cellulaire, les vésicules riches en LDL sont fusionnées avec les lysosomes pour leur dégradation enzymatique [Goldstein et Brown, 1973]. Ce mécanisme assure, d'une part l'approvisionnement en cholestérol libre dans la cellule hôte, d'autre part il joue le rôle de senseur des concentrations intracellulaires en cholestérol. Ainsi, lorsque la concentration en cholestérol intracellulaire est faible, le complexe **SREBP/ SCAP** (sterol regulatory element binding protein / SREBP cleavage-activating protein), devient apparent à la surface du réticulum endoplasmique (RE). SREBP subit alors deux clivages protéolytiques réalisés par Site-1 protease (S1P) et Site-2 Protease (S2P). Le domaine cytosolique de SREBP est ensuite transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes codant entre autres pour le récepteur aux LDLs et pour l'**HMG-CoA réductase** (3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA réductase) qui intervient dans la biosynthèse du cholestérol. A contrario, lorsque la concentration de cholestérol intracellulaire est élevée, le complexe SREBP/SCAP est retenu sur la membrane du RE, ne permettant pas la transcription de ces mêmes gènes [Brown et al., 1999].

L'augmentation de l'activité métabolique de la paroi vasculaire atteinte d'athérosclérose engendre un stress oxydatif pouvant modifier la structure des lipides polyinsaturés. Les phospholipides, et plus précisément ceux qui constituent la particule de LDL peuvent s'oxyder et former des **LDLox** hautement athérogènes. L'apoB100 qui constitue les LDLox subit également un changement conformationnel qui amène la particule à ne plus reconnaître le récepteur natif LDLR mais d'autres récepteurs présents à la surface du macrophage, les récepteurs scavenger. Une des caractéristiques de ces récepteurs est qu'ils permettent une captation non régulée des LDLox contrairement aux LDLR. Il y a au moins 6 classes de récepteurs scavenger (de A à G) exprimés à la surface des macrophages. Des souris déficientes pour les récepteurs **SR-A (SR-A1 et SR-A2)**, **CD36**, **SR-BI**, **LOX-1** ou **CXCL16/SR-PSOX** ont toutes montré une modulation dans le développement de l'athérosclérose [Aslanian et Chao., 2006]. Cependant, malgré la baisse significative de cellules spumeuses dans les souris $SRA^{-/-}$, $CD36^{-/-}$ et $CXCL16^{-/-}$ *in vitro*, les études *in vivo* ont montré des résultats contrastés ce qui suggère que leur rôle dans la pathogénèse est plus compliqué que ce qu'il avait été envisagé [Aslanian et Chao., 2006].

Bien que les cellules périphériques arrivent parfaitement à acquérir du cholestérol et le métaboliser, elles sont en revanche incapables de le cataboliser. Le foie est le principal organe capable d'éliminer le cholestérol excédentaire. Le cholestérol est alors ramené au foie par une voie appelée voie réverse du transport de cholestérol, voie dont l'acteur principal est la lipoprotéine de haute densité (HDL). Ces HDL sont tout d'abord formées par la complexation du cholestérol et de phospholipides à l'apoA-I pour la formation de préβHDL. Ce processus est catalysé par le transporteur **ABCA1** (ATP binding cassette A1) au niveau des tissus périphériques (incluant les macrophages) et le foie [Fitzgerald et al.,

2010]. Ensuite l'enzyme **LCAT** (Lysolecithin cholesterol acetyltransferase) estérifie le cholestérol présent dans ces particules naissantes pour leur transformation en particule HDL discoïdales matures. **ABCG1** est un autre transporteur ABC capable de charger les HDL en cholestérol depuis les tissus périphériques et avec ABCA1, ils constituent la voie d'élimination du cholestérol par les macrophages de la paroi vasculaire. Le cholestérol contenu dans les HDL (HDL-C) peut être lié par les récepteurs scavenger **SR-B1** du foie pour sa dégradation et sa transformation en acide biliaire. Ces acides biliaires tout comme le cholestérol libre peuvent être alors excrétés dans le tractus digestif via les sécrétions biliaires en utilisant un hétérodimère d'ABC transporteurs **ABCG5/ABCG8**.

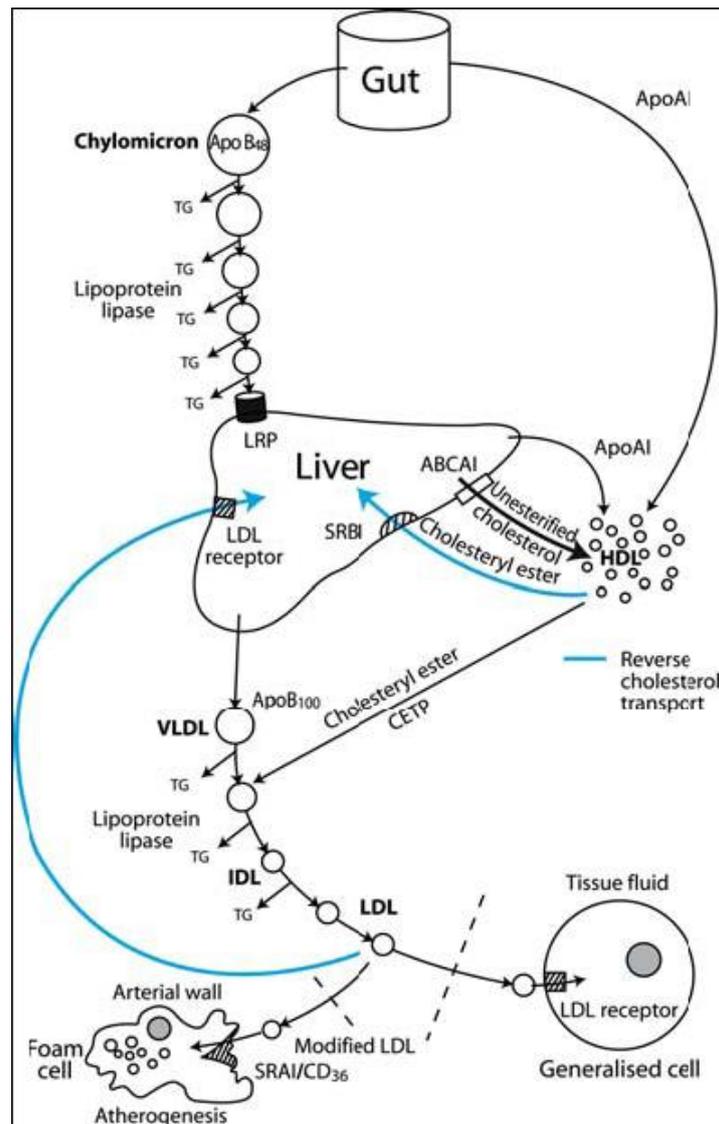


Figure 1.8 : Transport du cholestérol dans le sang. Pour plus de renseignements, se référer au texte [Charlton-Menys et Durrington, 2007].

Athérogénèse

Chapitre 2 : Athérogénèse

2.1. Initiation

Les cellules endothéliales sont constamment exposées à un ensemble de forces hémodynamiques générées par le flux sanguin. Sous l'effet de ces forces, l'endothélium subit de profonds remaniements structuraux. Ainsi, dans les zones tubulaires des artères où le flux est laminaire et uniforme, les cellules endothéliales sont ellipsoïdes et sont alignées dans la direction du flux [Lusis., 2000]. Au niveau des embranchements où le flux est perturbé, elles adoptent une forme plus polygonale sans orientation particulière. Ces régions, de par la disposition des cellules endothéliales, deviennent perméables aux LDL circulants. L'accumulation de ces LDL dans ces zones est d'autant plus importante que le taux de cholestérol sérique est élevé. En effet, les données recueillies depuis ces 2 dernières décennies relient de façon certaine l'hypercholestérolémie à l'athérosclérose [Steinberg, 2002].

L'oxydation des LDL apparaît comme la première étape de l'athérogénèse. Navab et al ont montré que des LDLox pouvaient induire l'expression de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, E-sélectine...) à la surface de l'endothélium [Navab et al., 2000]. Des souris double KO 12-15 lipooxygenase^{-/-} et ApoE^{-/-} montrent une diminution drastique des atteintes athéroscléreuses [Cyrus et al., 1999]. Ce résultat suggère que cette enzyme jouerait un rôle important dans l'apport de molécules d'oxygène réactif pour la formation de LDLox. Les lipoxygénases greffent une molécule d'oxygène dans les chaînes carbonées des acides gras polyinsaturés (par exemple, l'acide arachidonique). Cette voie métabolique produit des lipides, précurseurs de leucotriènes tels que l'HPETE ou l'HPODE qui peuvent, soit être transférés à la surface des membranes cellulaires ou dans l'espace sous endothélial. Quelque soit leur localisation, ils ont la capacité d'oxyder les LDL présents à leur contact.

Les LDLox présentent à leur surface l'apolipoprotéine B qui par son domaine N-terminal peut lier les protéoglycanes de la matrice [Glass et al., 1995], notamment les chondroïtine-sulfates [Galis et al., 1993]. Lorsque des mutations sont apportées au niveau de cette extrémité N-terminale, les souris développent sensiblement moins d'athérome [Skalen et al., 2002]. De plus, ces LDLox ne se lient pas aux récepteurs aux LDL classiques (LDLR) comme les LDL natives mais aux récepteurs scavenger présents à la surface des macrophages et des CML [Daugherty, 1995].

2.1.1. Recrutement des plaquettes

Sous l'effet de ces composés oxydés et du flux sanguin, la cellule endothéliale va exprimer un ensemble de molécules inflammatoires à sa surface et dans son environnement proche. Ceci aura pour conséquence le recrutement des cellules du sang [Cybulsky, 1991]. Il a été montré *in vivo* que les premiers éléments présents sur le site de l'inflammation étaient les plaquettes sanguines [Massberg, 2002] et que cette adhésion s'initiait via la P-sélectine endothéliale et ses ligands plaquettaires : la PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) et la GPIb α [Burger et wagner., 2003] [Johnson et al., 1997]. (**Figure 2.1**).

L'adhérence plus ferme des plaquettes, sous la dépendance des intégrines $\beta 3$ via le fibrinogène ($\alpha IIb\beta 3$ sur les plaquettes et $\alpha v\beta 3$ sur les cellules endothéliales), va entraîner leur activation et la libération sur le site des chemokines plaquettaires que sont RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted ou CCL5), le PF4 (platelet factor 4 ou CXCL4) et le CD40L plaquettaire, qui en se fixant sur CD40 au niveau des cellules endothéliales va aussi provoquer la libération de MCP-1, de l'IL-8 et de protéases telles que uPAR, et des MMP (Matrix MetalloProtease) [Huo et al., 2003], [Gawaz et al., 2005]. L'action combinée des LDLox et des plaquettes va donc stimuler la synthèse de cytokines inflammatoires par la cellule endothéliale comme l'IL-1 β et de facteurs de croissance comme le M-CSF. Le M-CSF a un effet sur le phénotype des cellules endothéliales en les rendant pro-athérogènes et favorise le trafic des leucocytes (**figure 2.2**). L'IL-1 β va activer le facteur de transcription NF κ B, responsable de la transcription d'un grand nombre de gènes de l'inflammation comme VCAM-1, ICAM-1 ou MCP-1 impliqués dans le recrutement des leucocytes circulants [Merhi-Soussi et al., 2005].

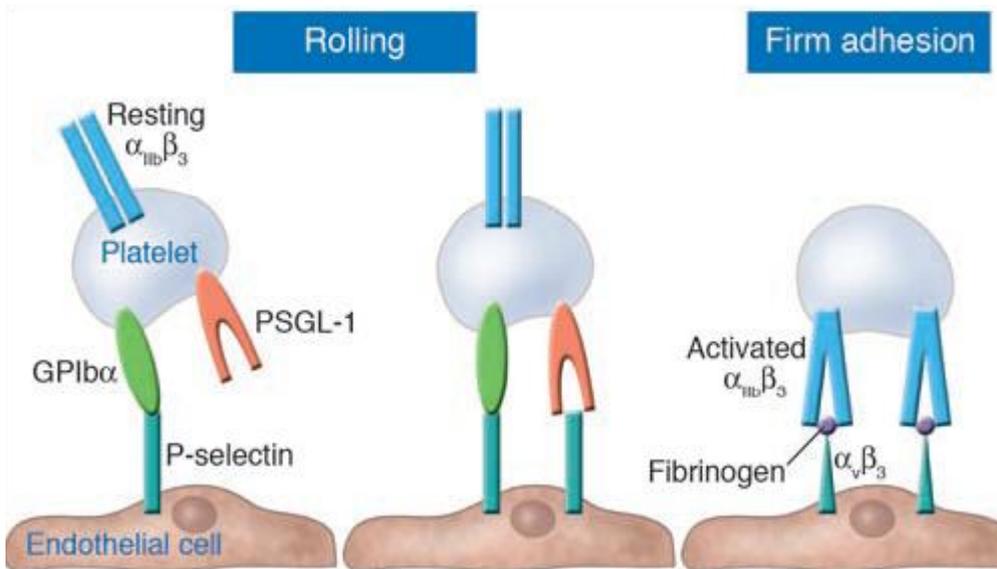


Figure 2.1 : Interaction séquentielle entre les plaquettes et l'endothélium. D'après [Gawaz et al., 2005].

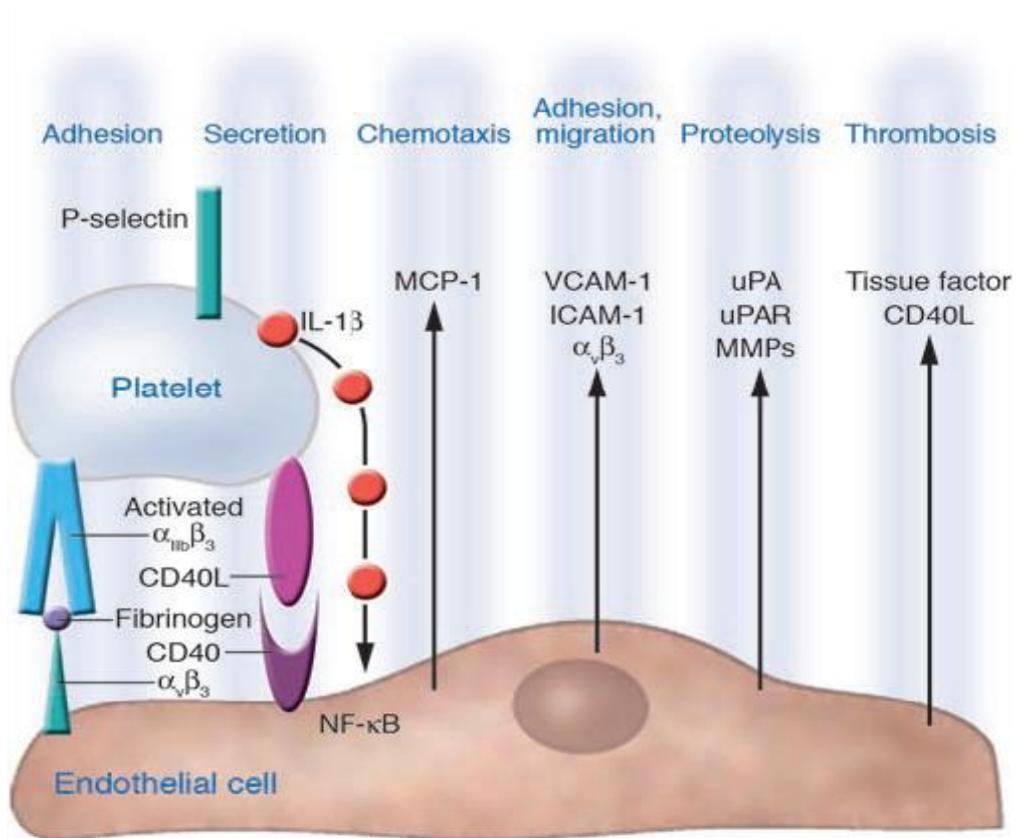


Figure 2.2 : Adhérence ferme des plaquettes sur l'endothélium, entraînant son activation. D'après [Gawaz et al., 2005].

2.1.2. Recrutement des monocytes

L'expression des molécules pro-inflammatoires va entraîner le recrutement des leucocytes (essentiellement des monocytes et des lymphocytes) sur le site. Les leucocytes roulant sur l'endothélium vont interagir avec les plaquettes déjà présentes, ou avec l'endothélium activé. Ce processus d'athérogénèse médiée par les plaquettes est schématisé dans la **figure 2.3**.

La première étape correspond à un contact réversible entre les molécules membranaires des trois types cellulaires. Il s'agit d'une interaction réversible entre sélectines (E-sélectine sur l'endothélium, L-sélectine sur les leucocytes et P-sélectine sur les plaquettes) et oligosaccharides (glyCAM-1 sur l'endothélium, sialyl Lewis et PSGL-1 sur les leucocytes). La deuxième étape est l'adhérence irréversible des leucocytes sur l'endothélium et sur les plaquettes. Il y a, à ce niveau, interaction entre les intégrines des leucocytes (LFA-1, Mac1, VLA-4) et leur ligands sur l'endothélium (ICAM-2, ICAM-1, VCAM-1). Il a été montré qu'*ex vivo*, des anticorps bloquant VLA-4 ou VCAM-1 sur des carotides de souris ApoE^{-/-} entraînait une inhibition de 75% du roulement des monocytes. [Ramos et al., 1999]. La troisième étape est la diapédèse des leucocytes, c'est-à-dire leur migration transendothéliale [Springer, 1994] Cette migration nécessite un gradient de chemoattractants. Plusieurs chemokines semblent être impliquées dans ce processus dont la MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) et son récepteur CCR2 [Libby, 2002]. Des études *in vivo* avec des souris CCR2R^{-/-} dans des souches développant la maladie montrent une protection contre la formation des lésions, accompagnée d'une baisse de l'accumulation des monocytes [Boring et al., 1998]. Une fois le monocyte dans l'intima, il acquiert les caractéristiques d'un macrophage résident (tissu).

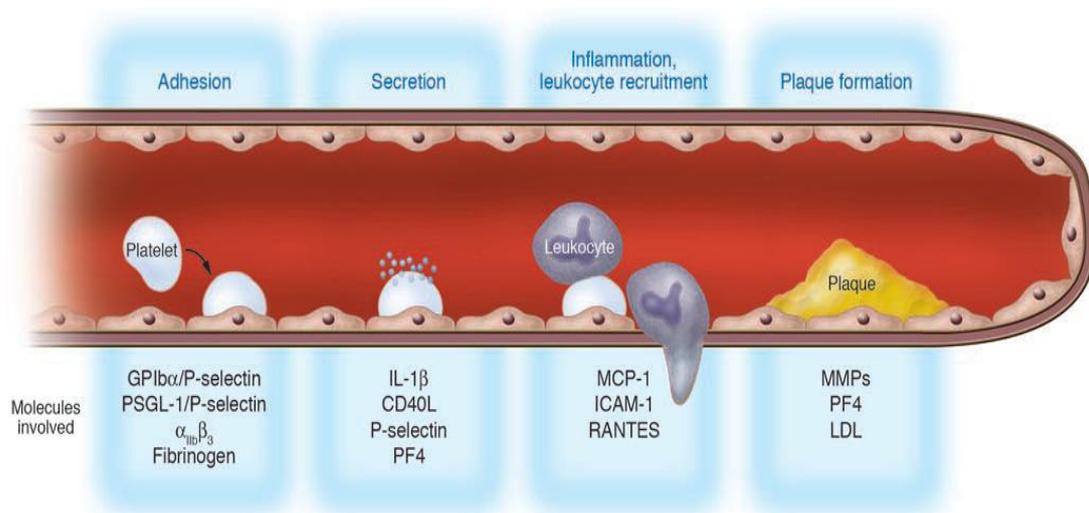


Figure 2.3 : Modèle hypothétique de l'athérogénèse initiée par les plaquettes sanguines. D'après [Gawaz et al., 2005].

2.1.3. Différenciation des macrophages

La cytokine M-CSF produite au niveau de l'intima va induire la différenciation des monocytes en macrophages. Cette étape, critique dans le développement de la future plaque est aussi associée à l'expression des récepteurs scavenger et de type Toll (Toll Like Receptor : TLR) à la surface des macrophages [Björkbacka et al., 2004]. Ces récepteurs, parmi lesquels SR-A, CD36 et TLR-4 sont impliqués dans l'internalisation d'un grand nombre de molécules et activent le facteur de transcription NFκB [Thurberg et al., 1998]. Les endotoxines bactériennes, les vésicules apoptotiques, et les LDLox sont captées et détruites par cette voie. Comme nous l'avons vu précédemment, cette voie d'absorption des LDLox, contrairement à celle des LDL natives par les LDLR ne bénéficie d'aucun rétrocontrôle métabolique [Daugherty, 1995]. Il n'y a donc pas de diminution de la synthèse du cholestérol intracellulaire, ni de diminution de l'expression des récepteurs scavenger à la surface cellulaire. Ce processus va conduire à une accumulation excessive de cholestérol dans les macrophages sous forme de gouttelettes lipidiques et à leur transformation en cellules dites spumeuses car l'apolipoprotéine E qui participe à l'efflux de cholestérol grâce aux HDL est dépassée. Les cellules spumeuses constituent, en quelques sortes, la signature des lésions athéroscléroseuses, et jouent un rôle primordial dans la progression des lésions. Dans l'intima, elles secrètent des cytokines pro-inflammatoires qui amplifient l'inflammation locale et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) issus du burst oxydatif. Les macrophages peuvent également synthétiser des MMPs qui peuvent dégrader la MEC et fragiliser la chape fibreuse. Par la suite, les modalités d'élimination des cellules spumeuses endommagées ou en apoptose va grandement déterminer l'évolution de la plaque vers une lésion fibreuse plutôt stable ou une lésion nécrotique plutôt instable.

2.1.4. Recrutement des lymphocytes T

Un autre phénomène crucial du développement de l'inflammation est le recrutement au sein de la lésion de cellules T. De la même façon que pour le recrutement des monocytes, c'est la VCAM-1 qui est responsable de l'adhérence de ces cellules sur l'endothélium. Ensuite, en réponse au gradient d'un trio de chemokines (l'IP-10, Mig et I-TAC), les lymphocytes pénètrent le sous endothélium pour y résider. Sous l'influence d'antigènes tels que les LDLox, les HSP (Heat shock protein) ou les peptides microbiens, les cellules T résidentes (essentiellement des Th1) s'activent et secrètent de l'IL-1, de l'IFNγ et du TNF qui vont grandement influencer le comportement des macrophages et CML (**Figure 2.4**).

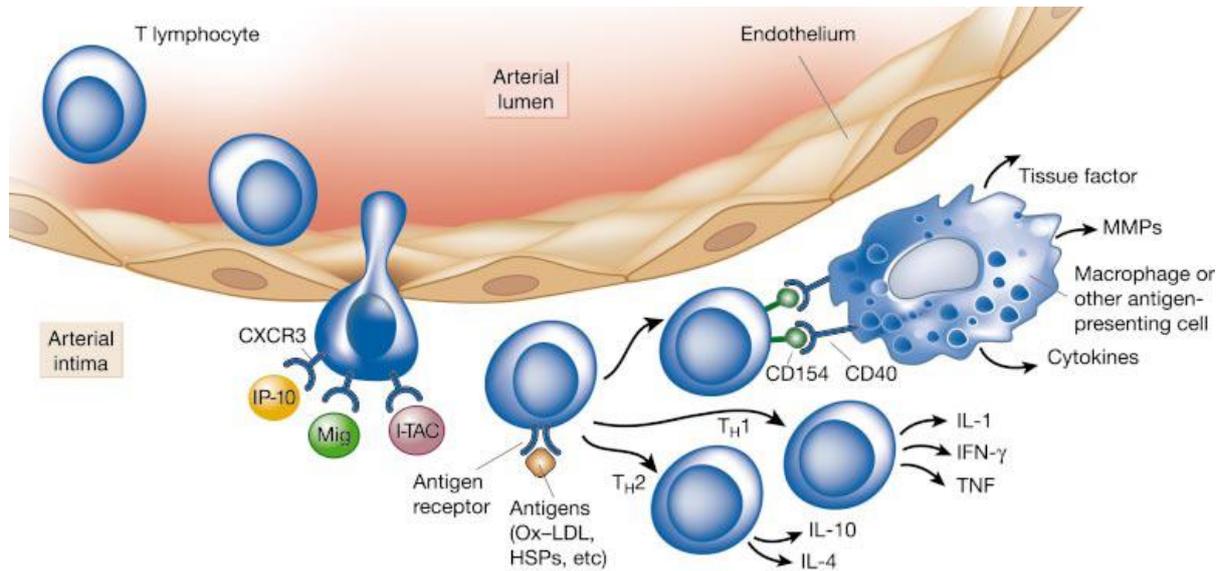


Figure 2.4 : Rôle des lymphocytes dans l'athérogénèse. D'après Libby 2002.

2.2. Progression des lésions et leur complication

La progression de la plaque et sa complication sont deux phénomènes étroitement liés (Libby, 2002). Lorsque les lymphocytes T résidents présentent l'antigène aux macrophages, il s'en suit une libération par ces derniers de facteurs de croissance (PDGF) qui va stimuler la migration des CML vers l'intima. Sous l'action des stimulations inflammatoires locales, ces CML vont synthétiser une matrice extracellulaire abondante qui va venir entourer et contenir le cœur lipidique riche en cellules spumeuses, en lipides, en cellules de l'immunité et autres débris cellulaires, fruits des phénomènes de nécrose et d'apoptose. Comme mentionné précédemment, il se forme un remodelage vasculaire externe où la lumière reste intacte. Les premières complications apparaissent lorsque l'équilibre entre les cytokines anti et pro-inflammatoires est rompue et que ces dernières prennent le dessus. Les lymphocytes T (Th1) secrètent alors du TNF β , de l'IFN γ et de l'IL-1 qui vont limiter la capacité des CML à produire des fibres de collagène et activer chez le macrophage la synthèse de MMPs, gélatinases, stromolysines... qui favorisent la dégradation de la chape fibreuse et donc déstabilise la plaque. La rupture de la plaque va toujours entraîner la formation d'un thrombus qui va évoluer différemment selon les cas considérés :

- **Erosion de la plaque** : la desquamation des cellules endothéliales forme des régions propices à la formation du thrombus plaquettaire. En effet, le contact des éléments thrombogènes de la matrice avec le sang circulant provoque l'activation et l'adhésion plaquettaire aboutissant à la formation d'un thrombus. Ces phénomènes d'érosion sont dans 75% des cas

asymptomatiques et sans conséquence. Le thrombus formé peut subir une thrombolyse et se résorber (**Figure 2.5A**).

- **Perturbation au sein des microvaisseaux de la plaque** : au sein de la plaque, il se forme de nouveaux vaisseaux particulièrement fragiles et qui présentent des risques hémorragiques élevés. Lors de la rupture de ces microvaisseaux, il se forme un thrombus intra-plaque qui peut être incorporé à la lésion préexistante, participant au processus complexe de sa croissance. La thrombine générée au cours de la formation de cette microhémorragie peut, en agissant sur la libération du PDGF des plaquettes, stimuler la migration et la prolifération des CML. Les plaquettes élaborent également du TGF- β qui stimule la synthèse de collagène par ces mêmes CML. Ainsi, une hémorragie intra-plaque peut être à l'origine d'un regain dans l'évolution de la plaque (**Figure 2.5B**).
- **Fissure de la chape fibreuse** : La chape fibreuse a pour rôle de contenir le cœur nécrotique de la lésion. Une fracture de cette chape met en contact les facteurs de coagulation présents dans le sang avec les constituants internes de la plaque thrombogénique. Bien que la rupture de la chape fibreuse représente 75% des IDM (infarctus du myocarde), dans la majorité des cas, elle ne donne lieu qu'à très peu de symptômes cliniques permettant de poser un diagnostic. Une rémission du thrombus peut avoir lieu grâce au relargage de PDGF et de médiateurs anti-inflammatoires tel que le TGF- β donnant lieu à la formation d'un tissu fibreux consolidateur de la plaque (**Figure 2.5C**).

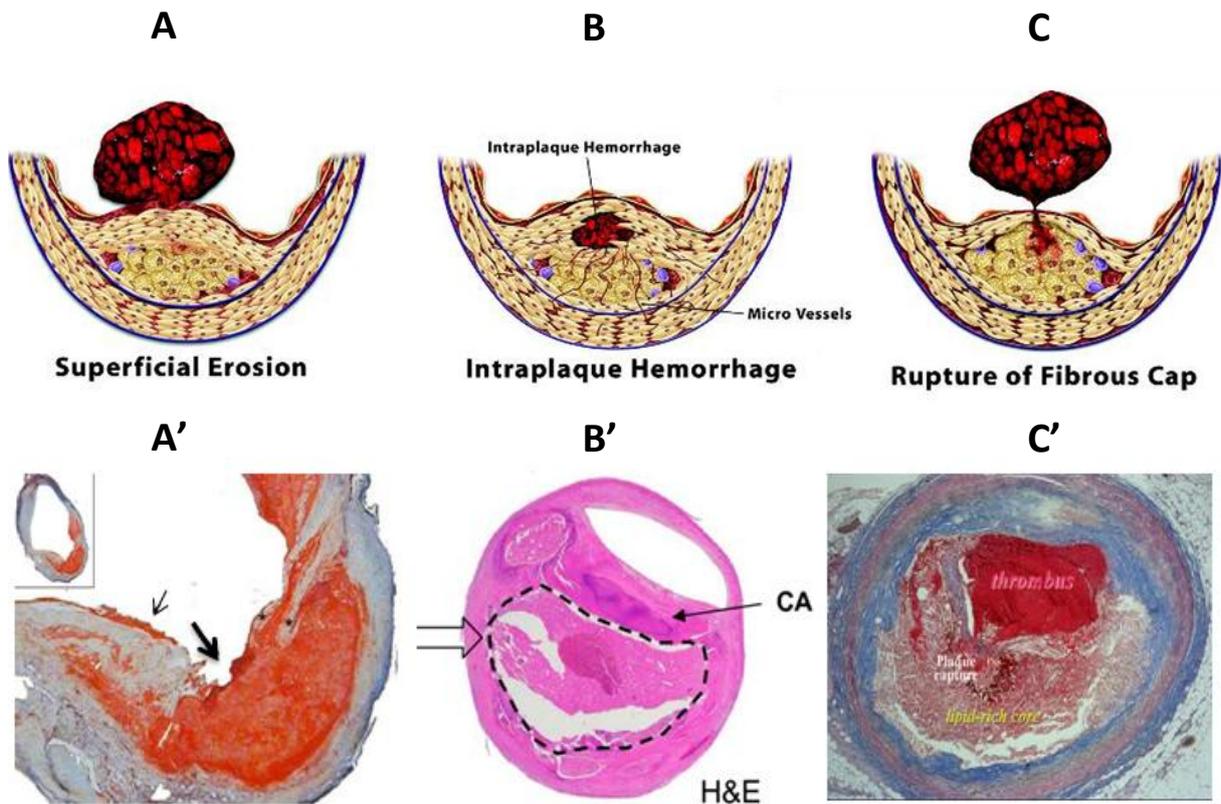


Figure 2.5 : Physiopathologie de la thrombose artérielle. **A et A'**) Erosion superficielle, la grande flèche montre une zone de rupture alors que la petite flèche montre la formation d'un thrombus suite à une érosion de l'endothélium (coloration au pentachrome, magnitude X100); **B et B'**) Hémorragie intra-plaque, les lignes entrecoupées délimitent le cœur lipidique hémorragique (CA= zone calcifiée, coloration H&E); **C et C'**) Rupture de plaque fibreuse avec formation d'un thrombus. D'après [Libby et Theroux, 2005] [Naghavi et al. 2003] [Dong et al., 2009].

Concrètement, les études anatomopathologiques de personnes décédées suite à un évènement coronarien aigu ont montré qu'il existait de 2 grandes variétés de plaques pouvant se thromboser :

- **Les lésions sténosantes** : bien visualisées par les approches angiographiques classiques, elles sont composées d'un cœur nécrotique réduit en taille, d'une chape fibreuse importante et d'une lumière vasculaire réduite. Ce type de plaque est à l'origine des ischémies rencontrées lors des épreuves d'effort. Ce type de lésion représente 30% des ruptures de plaque (**Figure 2.6**).
- **Lésion non sténosantes** : elles sont plus nombreuses que les précédentes. Elles se caractérisent par un large cœur nécrotique et une fine chape fibreuse pouvant se rompre à tout moment et se thromboser. Elles subissent également un remodelage externe

maintenant une lumière vasculaire intacte. Ceci rend l'angiographie entièrement inefficace pour leur détection. Ces lésions, qui comptent pour 70% des ruptures de plaques, ne présentent aucun symptôme avant l'accident cardiovasculaire (**Figure 2.6**) [Virmani et al., 2000].

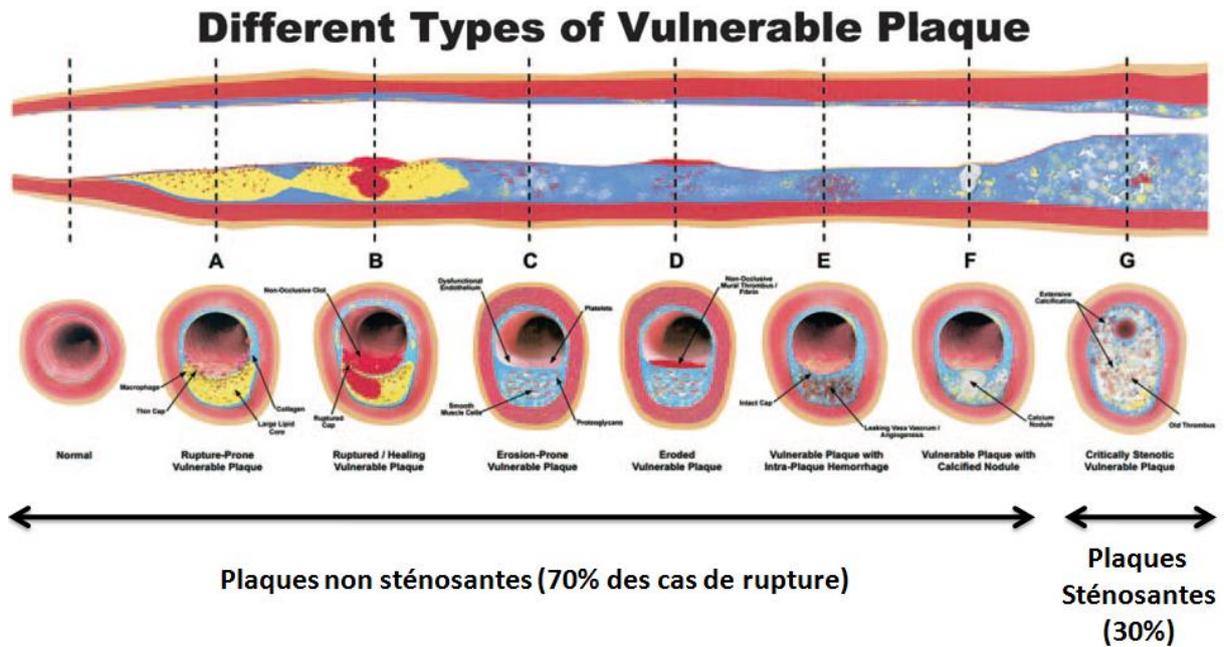


Figure 2.6 : Différentes plaques vulnérables sujettes à rupture ou à érosion. Plaque avec un large cœur lipidique et une fine chape fibreuse infiltrée par des macrophages (A). Plaque avec formation d'un thrombus non occlusif (B). Plaque sujette à érosion mais riche en matrice protéoglycane et en CML (C). Plaque érodée avec formation d'un thrombus non occlusif (D). Hémorragie intraplaque secondaire à une rupture d'un néovaisseau (E). Nodule calcique faisant protrusion dans la lumière vasculaire (F). Plaque sténosante avec calcification, vieux thrombus et une lumière réduite (G). D'après [Naghavi et al., 2003].

Les études épidémiologiques menées sur des patients ayant subi un ou plusieurs événements cardiovasculaires ont montré que le risque de rupture est plus accru aux stades A et B représentés sur la **figure 2.6**. Ce sont des artères ayant subi un remodelage vasculaire externe et présentent des plaques d'athéromes contenant un gros cœur lipidique et une fine chape fibreuse (**Figure 2.7**) [Naghavi et al. 2003]. C'est plaques sont asymptomatiques et de surcroît impossibles à détecter avec les techniques d'imagerie usuelles. Tout le déficit des prochaines décennies consistera à développer des outils de diagnostic pouvant détecter des éléments constitutifs de cette plaque instable afin de prévoir son comportement.

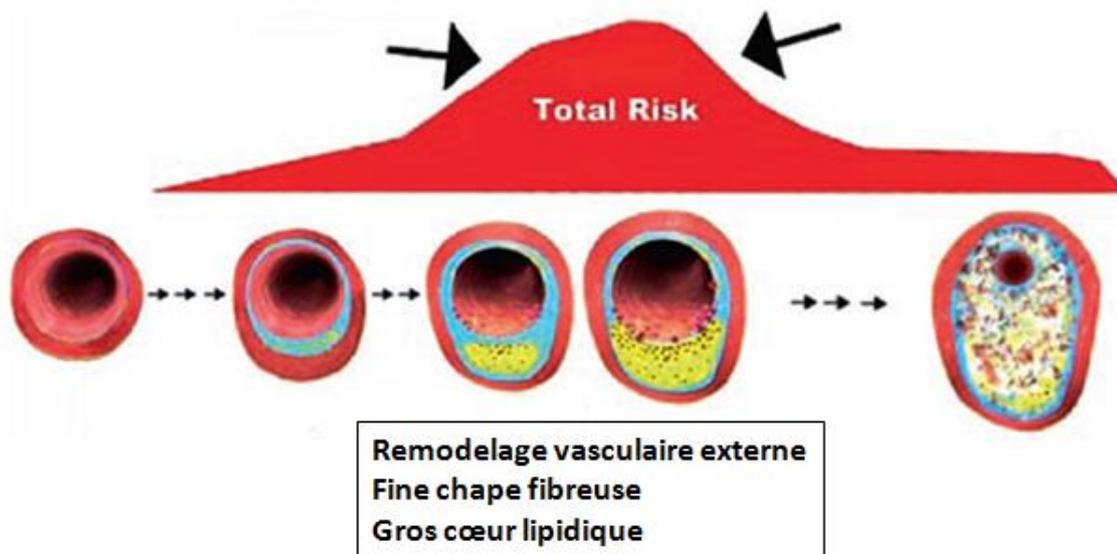


Figure 2.7 : Les plaques d'athérome [Naghavi, 2003].

2.3. Classification des plaques d'athéromes

Stary et al ont classé les plaques d'athéromes en 8 stades successifs d'évolution selon leurs caractéristiques anatomopathologiques [Stary et al., 2000]. La lésion de type I débute très tôt dans la vie de l'individu. Elle se caractérise par la présence de quelques amas de macrophages spumeux au sein de la paroi artérielle. Lorsque ces macrophages spumeux s'accumulent de manière plus importante, il se forme des stries lipidiques qui caractérisent la lésion de type II. Les lésions de type III encore appelées lésions pré-athéromateuses se distinguent par la présence de lipides extracellulaires. Ces 3 types de lésions sont dites précoces et la régression demeure encore possible. La lésion de type IV est la première des lésions avancées; on parle alors de stade athéromateux. Elle se caractérise par la formation d'un corps lipidique résultant d'une accumulation de lipides extracellulaires et de cellules spumeuses en nombre. Dans certains cas, cette lésion asymptomatique évolue directement en lésion de type VI, avec la formation d'un thrombus.

Les lésions de type V ou fibro-athéromateuses sont caractérisées par une chape fibro-muscleuse due à la prolifération de CML. Les lésions de type VI sont des lésions de type IV ou V avec rupture en surface et développement d'un thrombus. De ce fait, les plaques de type VI sont appelées « lésions complexes ». La lésion de type VII possède les mêmes caractéristiques que le type V avec en plus la présence de calcification alors que la lésion de type VIII se caractérise par la forte présence de CML et de fibres de collagène et par un faible voire inexistant corps lipidique. Ces deux types de plaques sont

plus ou moins sténosantes en fonction du calibre des artères où elles se développent. Elles sont aussi le résultat d'une régression ou d'un changement en lipide des lésions de type IV-VI (**Figure 2.8**).

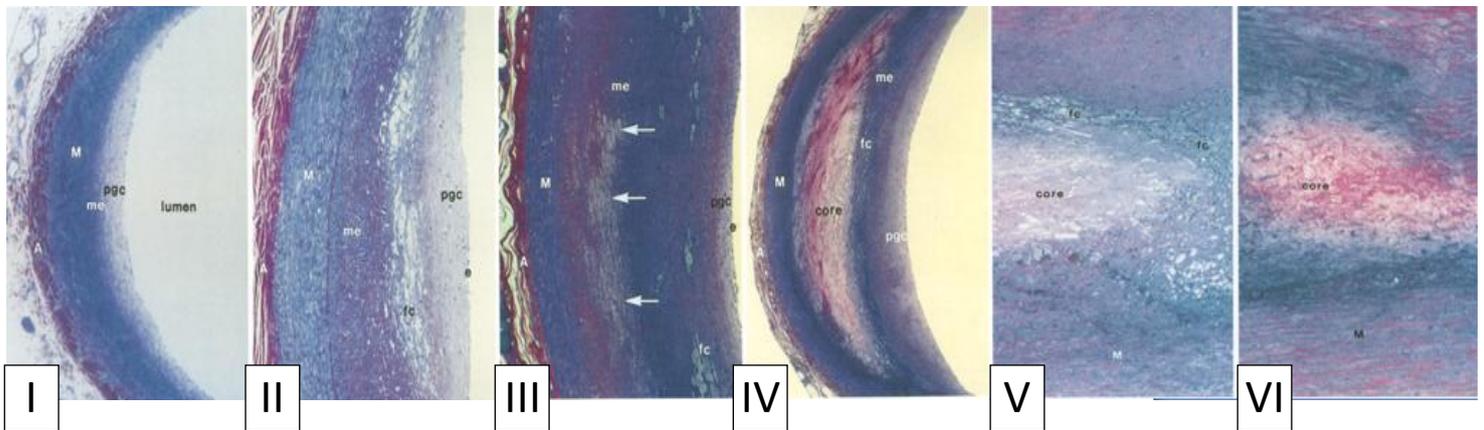
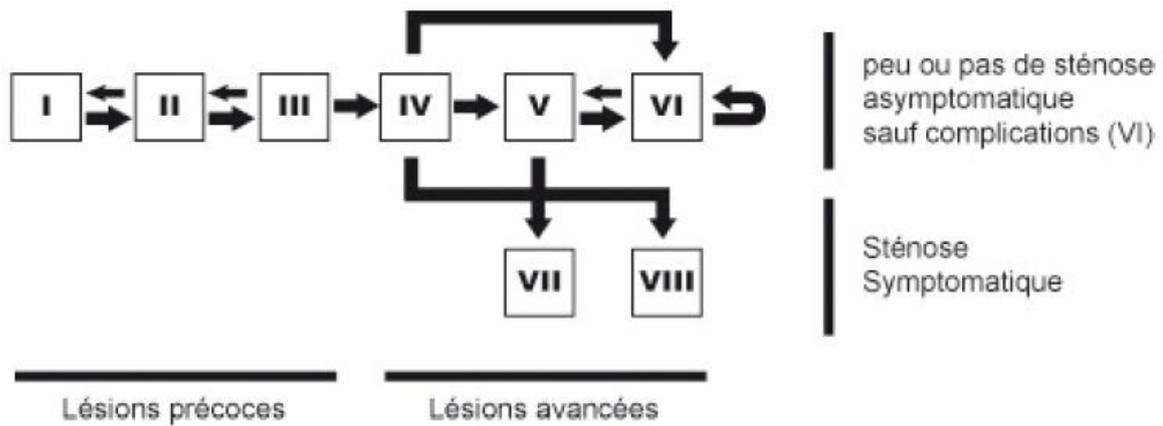


Figure 2.8 : Evolution de la plaque d'athérome (D'après Stary 2000). Type I et II : présence de macrophages et de cellules spumeuses. M (média), A (adventice). Type III : gouttelettes lipidiques (flèches blanches). Type IV : la fusion de gouttelettes lipidiques aboutit à la formation d'un large corps (core) lipidique. Les cellules spumeuses (Fc) sont contenues le cœur nécrotique pauvre en fibres de collagène. Type V : Le cœur lipidique contient des cristaux de cholestérol et est recouvert d'une capsule fibreuse contenant les cellules spumeuses (fc). Type VI : plaque complexe avec la présence d'un thrombus récent incluant une zone hémorragique. Type VII : équivalent du type V avec présence de calcification. Type VIII : plaque très fibreuse avec un faible corps lipidique. e : endothelial cell layer, pgc : proteoglycan layer.

2.4. Conclusion

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique qui aboutit à la formation de plaques d'athérome à risque de rupture. L'identification de patients présentant une plaque instable ou vulnérable, c'est à dire susceptible de se rompre, est un problème d'actualité. Le concept récent que ce risque soit lié au contenu de la plaque et non à sa taille se traduit par un nouvel impératif d'imagerie. De plus, les stratégies actuelles, qui visent avant tout à modifier les paramètres lipidiques plasmatiques, n'apportent pas de solution thérapeutique à l'ensemble des patients. C'est dans ce

contexte que mon projet de thèse a vu le jour : définir des agents ciblant de la plaque d'athérome instable, et les armer pour l'imagerie moléculaire ou à l'aide d'agents médicamenteux pour la thérapie.

2.5. Bibliographie

- Ait-Oufella, H., O. Herbin, et al. "B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice." J Exp Med **207**(8): 1579-87.
- Aslanian, A. M. and I. F. Charo (2006). "Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis." Circulation **114**(6): 583-90.
- Bansal, M. P. and S. Shalini (2005). "Effect of cholesterol and 7-beta hydroxycholesterol on glutathione status and nitric oxide production in murine peritoneal macrophages." Indian J Exp Biol **43**(6): 503-8.
- Binder, C. J., K. Hartvigsen, et al. (2004). "IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis." J Clin Invest **114**(3): 427-37.
- Bjorkbacka, H., K. A. Fitzgerald, et al. (2004). "The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades." Physiol Genomics **19**(3): 319-30.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1998). "Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-7.
- Brown, M. and J. Goldstein (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11041-8.
- Burger, P. C. and D. D. Wagner (2003). "Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development." Blood **101**(7): 2661-6.
- Caligiuri, G., A. Nicoletti, et al. (2002). "Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice." J Clin Invest **109**(6): 745-53.
- Charlton-Menys, V. and P. Durrington (2007). "Cholesterol metabolism and therapeutic molecules." Exp Physiol.
- Chen, S., T. Crother, et al. (2010). "Emerging Role of IL-17 in Atherosclerosis." J Innate Immun **2** 325-333.
- Cushing, S., J. Berliner, et al. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 5134-5138.
- Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-91.
- Cyrus, T., J. L. Witztum, et al. (1999). "Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice." J Clin Invest **103**(11): 1597-604.
- Daugherty, A. (1995). "Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins." Curr Opin Lipidol **6**(4): U106-12.
- Dong, L., W. Kerwin, et al. (2009). "Cardiovascular magnetic resonance in carotid atherosclerotic disease." J Cardiovasc Magn Reson. **11**: 1-15.
- Dufourcq, P., T. Couffignal, et al. (2002). "Vitronectin is up-regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation." Cardiovasc Res **53**(4): 952-62.
- Dufourcq, P., H. Louis, et al. (1998). "Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(2): 168-76.
- Eitzman, D. T., R. J. Westrick, et al. (2000). "Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice." Blood **95**(2): 577-80.

- Fay, W. P., A. C. Parker, et al. (1999). "Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice." Blood **93**(6): 1825-30.
- Fitzgerald, M., Z. Mujawar, et al. (2010). "ABC transporters, atherosclerosis and inflammation." Atherosclerosis. **211**(2): 361-70.
- Galis, Z., M. Alavi, et al. (1993). "Co-localization of aortic apolipoprotein B and chondroitin sulfate in an injury model of atherosclerosis." Am J Pathol **142**(5): 1432-8.
- Geissmann, F., S. Jung, et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
- Glass, G. and L. Witztum (2001). "Atherosclerosis: The Road Ahead." Cell **104**: 503-516.
- Goldstein, J. and M. Brown (1973). "Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol" Proc Natl Acad Sci U S A **70**(10): 2804-8.
- Grabner, R., K. Lotzer, et al. (2009). "Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice." J Exp Med **206**(1): 233-48.
- Grainger, D. J., D. E. Mosedale, et al. (2000). "Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions." J Cell Sci **113 (Pt 13)**: 2355-61.
- Guettier, C., M. Rouchon, et al. (1987). "Glomerular extracellular roughly granular material (ERGM). Its autofluorescent property and the question of its nuclear origin." Pathol Res Pract **182**(2): 244-7.
- Hansson, G. and P. Libby (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword " Nat Rev Immunol. **(7)**:. Epub **2006 Jun 16**.: 508-19.
- Hansson, G. K. (2009). "Inflammatory mechanisms in atherosclerosis." Journal of Thrombosis and Haemostasis **7 (Suppl. 1)**: 328-331.
- Huo, Y., A. Schober, et al. (2003). "Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E." Nat Med **9**(1): 61-7.
- Huo, Y., L. Zhao, et al. (2004). "Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **110**(14): 2024-31.
- Jackson, L. M. and C. J. Hawkey (2000). "COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs: do they really offer any advantages?" Drugs **59**(6): 1207-16.
- Johnson, R. C., S. M. Chapman, et al. (1997). "Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice." J Clin Invest **99**(5): 1037-43.
- Katsuda, S. and T. Kaji (2003). "Atherosclerosis and extracellular matrix." J Atheroscler Thromb **10**(5): 267-74.
- Koller, E., F. Koller, et al. (1982). "Specific binding sites on human blood platelets for plasma lipoproteins." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **363**(4): 395-405.
- Kolodgie, F. D., A. P. Burke, et al. (2002). "Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(10): 1642-8.
- Lee, T. S., H. C. Yen, et al. (1999). "The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 734-42.
- Leitinger, N. (2003). "Cholesteryl ester oxidation products in atherosclerosis." Mol Aspects Med **24**(4-5): 239-50.
- Levesque, H., N. Girard, et al. (1994). "Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls." Atherosclerosis **105**(1): 51-62.
- Levy, E., S. Spahis, et al. (2007). "Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond." Curr Opin Lipidol **18**(3): 310-8.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-74.
- Libby, P. and P. Theroux (2005). "Pathophysiology of coronary artery disease." Circulation **111**(25): 3481-8.

- Lutgens, E., M. Gijbels, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(6): 975-82.
- Mackay, J. and G. Mensah (2004). "The Atlas of Heart Disease and Stroke." 30-31. WHO, Geneva.
- Malek, A. M. and S. Izumo (1996). "Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress." J Cell Sci **109 (Pt 4)**: 713-26.
- Massberg, S., K. Brand, et al. (2002). "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation." J Exp Med **196**(7): 887-96.
- Meng, X., X. Lu, et al. (1998). "Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes." Hum Genet **103**(5): 590-9.
- Merhi-Soussi, F., B. R. Kwak, et al. (2005). "Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice." Cardiovasc Res **66**(3): 583-93.
- Mori, M., K. Iwasaki, et al. (1996). "Characterization of vitronectins in atherosclerotic lesions." J Atheroscler Thromb **3**(1): 25-31.
- Naghavi, M., P. Libby, et al. (2003). "From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I." Circulation **108**(14): 1664-72.
- Navab, M., S. Y. Hama, et al. (2000). "Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3." J Lipid Res **41**(9): 1495-508.
- Podrez, E. A., E. Poliakov, et al. (2002). "Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36." J Biol Chem **277**(41): 38503-16.
- Ramos, C. L., Y. Huo, et al. (1999). "Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice." Circ Res **84**(11): 1237-44.
- Reheman, A., P. Gross, et al. (2005). "Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation." J Thromb Haemost **3**(5): 875-83.
- Riessen, R., J. M. Isner, et al. (1994). "Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries." Am J Pathol **144**(5): 962-74.
- Robert, R., M. J. Jacobin-Valat, et al. (2006). "Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display." J Biol Chem **281**(52): 40135-43.
- Robertson, A. K. and G. K. Hansson (2006). "T cells in atherogenesis: for better or for worse?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(11): 2421-32.
- Rossi, G. P., T. M. Seccia, et al. (2007). "Homocysteine, left ventricular dysfunction and coronary artery disease: is there a link?" Clin Chem Lab Med **45**(12): 1645-51.
- Schiopu, A., J. Bengtsson, et al. (2004). "Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis." Circulation **110**(14): 2047-52.
- Seibert, K., Y. Zhang, et al. (1997). "Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues." Adv Exp Med Biol **400A**: 167-70.
- Siegel-Axel, D. I. and M. Gawaz (2007). "Platelets and endothelial cells." Semin Thromb Hemost **33**(2): 128-35.
- Skalen, K., M. Gustafsson, et al. (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." Nature **417**(6890): 750-4.
- Springer, T. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell. **76**(2): 301-14.
- Stary, H. C. (2000). "Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1177-8.

- Sary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **89**(5): 2462-78.
- Steinberg (2002). "Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime." Nat Med. ;**8**(11): 1211-7.
- Swirski, F. K., P. Libby, et al. (2007). "Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata." J Clin Invest **117**(1): 195-205.
- Taleb, S., A. Tedgui, et al. "Interleukin-17: friend or foe in atherosclerosis?" Curr Opin Lipidol **21**(5): 404-8.
- Tenger, C., A. Sundborger, et al. (2005). "IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(4): 791-6.
- Thurberg, B. L. and T. Collins (1998). "The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **9**(5): 387-96.
- Toussaint, J., M. Jacob, et al. (2003). "L'athérosclérose, physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques." 60.
- Urban, Z., J. Zhang, et al. (2001). "Supravalvular aortic stenosis: genetic and molecular dissection of a complex mutation in the elastin gene." Hum Genet **109**(5): 512-20.
- Veillard, N. R., S. Steffens, et al. (2004). "Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2339-44.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1262-75.
- Zhou, X., A. Nicoletti, et al. (2000). "Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice." Circulation **102**(24): 2919-22.

***Ciblage de plaque d'athérome pour
l'imagerie et la thérapie***

Chapitre 3 : Ciblage de plaque d'athérome pour l'imagerie et la thérapie

1) Ciblage pour l'imagerie

3.1. Généralités

Les maladies cardiovasculaires sont, chaque année, la cause de décès de près de 19 millions de personnes dans le monde. Un tiers de ces décès est imputable aux complications liées à l'athérosclérose. Cette maladie est asymptomatique jusqu'à la survenue de l'accident cardiovasculaire souvent fatal : Infarctus du myocarde (**IDM**) ou accident vasculaire cérébral (**AVC**). Comme nous l'avons vu précédemment, les risques thrombotiques liés à cette maladie ne sont pas dus au degré d'obstruction de l'artère mais plutôt à la composition de la plaque : les plaques présentant un large cœur lipidique et une fine chape fibreuse sont statistiquement plus enclines à la rupture ou à l'érosion. Or, à l'heure actuelle, il n'existe aucune technique qui permette la visualisation non-invasive de ce type de plaques d'athérome qualifiées d'instables ou vulnérables. Il est donc urgent de développer un moyen fiable et efficace de diagnostic des plaques susceptibles de se rompre. Les recherches académiques au cours de ces dernières années ont permis d'identifier des acteurs clés du processus d'athérogénèse, comme la dysfonction endothéliale, l'activation macrophagique, le transport lipidique, l'angiogénèse, la mort cellulaire, le remodelage vasculaire et l'agrégation plaquettaire [Davies et al., 2005][Libby et al., 2010]. Il découle de toutes ces études un panel de cibles potentielles pour l'imagerie comme les récepteurs des cellules endothéliales activées ($\alpha v\beta 3$, ICAM-1, VCAM-1, P-sélectine...), les LDLox, les métalloprotéases, les protéines de l'apoptose, les récepteurs des macrophages (CD36, CD68, SR-A ou CD204), les récepteurs des plaquettes activées ($\alpha IIb\beta 3$, P-sélectine) et la fibrine intervenant dans les thrombi plaquettaires...Une avancée certaine dans l'évaluation du risque lié à la plaque d'athérome serait de cibler les constituants cellulaires et moléculaires de la plaque par des bio-pharmaceutiques développés pour l'imagerie moléculaire. Ces bio-pharmaceutiques résultent du couplage entre des nanoparticules para ou superparamagnétiques ou traceurs radioactifs visualisables par des techniques d'imagerie et des peptides ou anticorps dirigés contre les bio-marqueurs présents en excès sur la plaque d'athérome instable.

Dans cette partie, je présenterai une liste non exhaustive des méthodes d'imagerie utilisées en clinique à ce jour puis j'aborderai plus en détail l'imagerie par résonance magnétique (IRM), imagerie non invasive par excellence ainsi que l'état actuel des recherches dans le domaine de l'imagerie moléculaire. L'imagerie moléculaire présente l'intérêt, en ciblant de façon spécifique un biomarqueur

surexprimé au niveau de la plaque d'athérome, de pallier la faible sensibilité inhérente à cette technique d'imagerie.

3.2. Différentes méthodes d'imagerie

Depuis plusieurs décennies maintenant, diverses techniques d'imagerie ont vu le jour. Certaines sont invasives, c'est-à-dire qu'elles nécessitent l'introduction d'un cathéter dans l'organisme pour la visualisation « sur site » des zones à explorer. D'autres sont au contraire non-invasives et ne nécessitent donc aucune intrusion dans l'organisme si ce n'est un produit de contraste permettant de différencier les zones pathologiques des zones saines.

3.3. Techniques d'imagerie invasive

3.3.1. L'angiographie

Utilisée en routine dans le milieu hospitalier, cette technique permet de visualiser l'arbre artériel en temps réel. Elle consiste en l'injection d'un produit de contraste à l'aide d'un cathéter qu'on introduit sur le site d'intérêt. Cette cartographie de la lumière artérielle demeure le « gold standard » pour évaluer le degré de sténose d'une artère et représente l'examen de référence pour l'élaboration de bilans pré-chirurgicaux de pontages coronariens ou de sténoses carotidiennes. Cependant sa limite principale réside dans le fait qu'elle ne renseigne en aucun cas sur la composition de la plaque ou de son potentiel évolutif et de ce fait ne peut diagnostiquer la présence de plaques instables.

3.3.2. L'angioscopie

Cet examen permet d'obtenir en 3 dimensions et en couleur une image directe de la paroi vasculaire. Son principe repose sur l'introduction d'un cathéter présentant à son extrémité une sonde endoscopique souple munie d'une source lumineuse et d'une transmission par fibre optique. Elle est réalisée après administration d'un antiagrégant plaquettaire et d'héparine. Les images obtenues sont colorées et permettent de distinguer une plaque fibreuse (blanche) d'une lésion athérosclérotique contenant une plaque lipidique importante (jaune) ou d'un thrombus (rouge). Une étude réalisée sur une cohorte de 850 patients hospitalisés a clairement montré une corrélation entre la coloration jaune des plaques et leur susceptibilité à se rompre et à former un thrombus. [Ueda et al., 2004]. Une des difficultés majeures de ce type d'imagerie est l'obtention d'un arrêt du flux sanguin pour une bonne visualisation des parois. Ceci peut être réalisé par l'injection, sous pression, de sérum physiologique à l'aide d'une pompe ou en faisant appel à l'utilisation d'une sonde

à ballonnet occlusif. Ce dernier point représente l'une des limitations majeures de cette technique. Actuellement, même si l'angioscopie est utile lors de la préparation des veines autogènes pour la réalisation de pontages coronariens ou pour le contrôle des endartériectomies, elle ne donne pas accès aux critères importants de vulnérabilité d'une plaque tels que l'épaisseur de la chape fibreuse ou la taille du cœur lipidique [Yamamoto et al., 2009].

3.3.3. L'échographie endovasculaire (IVUS : Intravascular ultrasound)

L'IVUS est une technique basée sur l'introduction, à l'aide d'un guide, d'une sonde échographique à haute fréquence. Cette sonde émet des ultrasons à une fréquence plus élevée que l'échographie percutanée ce qui permet d'améliorer la qualité de l'image ainsi que sa résolution spatiale. Cependant cette augmentation de fréquence altère la pénétration des ultrasons dans les tissus ce qui a pour conséquence de réduire le champ visuel. A une fréquence de 30 MHz, la longueur d'onde émise est de 50 μm et donne une résolution spatiale de 150 μm ce qui permet de visualiser un épaississement faisant protrusion dans la lumière artérielle. Les lipides et les produits thrombotiques sont hypoéchogènes alors que les tissus plus durs tels que la chape fibreuse ou les calcifications sont hyperéchogènes. Ainsi, cette technique permet de distinguer une artère saine d'une artère atteinte d'athérosclérose. Son écueil principal est son caractère invasif qui ne lui permet pas d'être appliquée en routine [Lermusiaux et al., 2000].

3.3.4. La thermographie

Cette technique consiste à introduire, à l'aide d'un cathéter, une sonde thermique dans les vaisseaux sanguins. Ainsi, l'inflammation présente dans la plaque d'athérome, libère de la chaleur qui peut être détectée grâce à ce dispositif. Une étude réalisée sur une population de patients ayant subi récemment un IDM (Infarctus du Myocarde) a montré que la température des plaques rompues était supérieure aux artères présentant un angor stable [Stefanadis, 1999]. Ce même auteur, quelques années plus tard a apporté des modifications à sa première étude en précisant que la température relevée sur les angors était sous évaluée du fait d'une dissipation de chaleur due au flux sanguin [Stefanadis 2003]. Bien que la thermographie permette d'obtenir des informations fonctionnelles sur la plaque, elle n'apporte aucun renseignement morphologique. Cette limitation peut être résolue en combinant la thermographie à l'IVUS [Fayad et al., 2001]. Ces approches demeurent néanmoins des examens invasifs.

3.4. Techniques d'imagerie non-invasive

3.4.1. Echographie percutanée

Sur les artères, cette technique est applicable uniquement sur les gros vaisseaux non profonds. Les informations récoltées par la sonde d'échographie sont transformées en niveau de gris donnant lieu à des contrastes permettant de visualiser en temps réel la morphologie des organes. Cette approche permet ainsi de discerner :

- Un liseré interne hyperéchogène correspondant à l'interface entre le sang et l'intima, occasionné par la réflexion des ultrasons sur la surface de l'intima.
- Une couche intermédiaire hypoéchogène correspondant à l'intima et la media.
- Un liseré externe hyperéchogène correspondant à l'adventice.

Cet examen peut apporter de précieux renseignements concernant:

- La topographie, l'étendue et l'épaisseur maximale de la plaque.
- Son échogénéité comparativement à celle du liseré interne. La plaque peut être hypo ou anéchogène (nature lipidique ou cellulaire (cellules inflammatoires, spumeuses)), isoéchogène (nature fibrolipidique), échogène modérée et homogène (nature fibreuse) ou hyperéchogène (calcifiée ou zone fibreuse extrêmement dense) [Pourcelot et al., 1999].
- Son homogénéité. La présence de plages hypoéchogènes évoquant un hématome intraplaque, témoigne de son évolutivité [Pourcelot et al., 1999].
- La régularité des contours internes. Les plaques présentant des irrégularités comblées par du matériel hypoéchogène correspondent à des plaques ulcérées, à risque d'embolie.

3.4.2. Echographie de contraste (ECUS)

L'utilisation d'agents de contraste ultrasonores tels que des liposomes acoustiques peut grandement améliorer la sensibilité de l'échographie. Généralement, ces vésicules lipidiques présentent à leur surface des molécules de ciblage (peptides ou anticorps) et sont remplies d'un gaz inerte tel que le perfluorobutane.

3.4.3. Imagerie par réflectance de fluorescence (FRI/NIRF)

L'imagerie par réflectance de fluorescence (FRI) est une technique de diagnostic optique pour identifier, localiser et quantifier *in vivo* des sondes moléculaires fluorescentes. Elle repose sur la propriété des tissus biologiques à être transparents dans le rouge et le proche infrarouge jusqu'à quelques centimètres. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission doivent donc se trouver dans cette zone spectrale (entre 600 et 900 nm). Une fois la sonde liée à son ligand biologique, elle émet, suite à une excitation, de la fluorescence qui peut alors être détectée à l'aide d'une caméra adaptée. Lorsque les longueurs d'ondes sont dans le proche infrarouge, cette technique est appelée NIRF (Near InfraRed Fluorescence).

3.4.4. Le CT-Scan (Computed tomography)

Plus connue sous le nom de scanner à rayon X, cette technique, avec l'arrivée de machines toujours plus performantes (scanners à acquisition hélicoïdale) permet outre le fait d'apprécier le degré de sténose des artères, de différencier les composants de la plaque sur la base de leur densité exprimée en unités de hounsfield (nuance de gris). Néanmoins cette technique requiert l'injection de produits de contraste iodés pour différencier la lumière de la paroi des vaisseaux, et si cette technique n'est pas invasive, elle est ionisante. Aujourd'hui, le scanner couplé à des gamma-caméras (Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) ou Tomographie par émission de positon (PET ou TEP)) permet d'obtenir une image fonctionnelle et un repère anatomique des artères.

3.4.5. Imagerie en médecine nucléaire

Les techniques d'imagerie nucléaire telles que la TEP et la SPECT nécessitent l'introduction de marqueurs radioactifs dans la circulation qui sont des émetteurs γ tels que, l'iode 123 (^{123}I), le technétium 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ou l'indium 111 (^{111}In) pour le SPECT et des émetteurs de positons comme le ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N ou le ^{18}F pour la TEP. Ces marqueurs radioactifs peuvent être couplés à des vecteurs (anticorps, peptides...) pour former le traceur. Idéalement, le traceur doit être capté uniquement par les cellules ou les molécules de la plaque et non par les tissus environnants [Davies, 2005]. De plus il doit être rapidement éliminé de la circulation. De nombreux traceurs dirigés contre les LDLox, les macrophages, les CML, les récepteurs cellulaires ont été testés sur des modèles animaux avec plus ou moins de succès. Je détaillerai ces approches dans la partie « Ciblage moléculaire de la plaque d'athérome ».

3.4.6. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique qui fait appel aux propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques comme le proton (^1H), le carbone (^{13}C), le phosphore (^{31}P), le sodium (^{23}Na). Ces noyaux atomiques, dont le plus connu est celui de l'hydrogène, communément appelé proton (présent dans l'eau, principal constituant du corps) sont dotés d'un moment magnétique ou spin. Lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, les spins vont prendre une orientation parallèle ou antiparallèle. L'application d'une onde électromagnétique de fréquence adaptée (fréquence de résonance) peut faire basculer l'orientation de l'aimantation de ces spins, lesquels vont émettre des signaux électromagnétiques lorsqu'ils retrouvent leur état d'équilibre (phénomène de relaxation). Cette relaxation magnétique nucléaire est un phénomène complexe se caractérisant par une relaxation dans le plan longitudinal (constante de relaxation T1) et une relaxation dans le plan transverse (constante de relaxation T2). Dans les tissus biologiques, ces constantes varient selon la nature chimique et physique du milieu environnant le noyau étudié. L'imagerie en RMN ou imagerie par résonance magnétique (IRM) est devenue ces dernières années la modalité phare de l'imagerie non invasive par ses capacités d'imagerie anatomique de haute résolution, de caractérisation tissulaire et d'imagerie fonctionnelle. L'IRM utilise des gradients de champ magnétique dans les trois dimensions de l'espace. L'intensité des signaux magnétiques émis lors du retour à l'équilibre dans les plans transverses et longitudinaux va donc varier selon l'organisation physico-chimique de l'eau dans les tissus et se sont ces variations qui vont être détectées par des antennes et traitées par informatique afin de reconstruire une image. Depuis les premières images publiées en 1973 par Lauterburg (prix Nobel de médecine en 2003), l'IRM s'impose comme une technique de référence dans le diagnostic médical et ce grâce à sa bonne résolution, son caractère non-invasif et non-traumatique, et sa grande variété de contrastes (T1, T2, densité de protons...). De plus l'IRM est la technique la plus contrastée pour obtenir des clichés au cœur d'organes opaques ; ainsi toutes les artères peuvent être visualisées, qu'elles soient superficielles comme les carotides ou profondes comme les coronaires [Corti, 2006]. L'IRM permet d'obtenir des informations précises aussi bien sur l'anatomie des lésions athéroscléreuse que sur leur composition. Les plaques d'athérome évolutives sont constituées de différents types de lipides (phospholipides, triglycérides, cholestérol et esters de cholestérol) et de fibres (collagènes, élastines, glycoaminoglycanes, protéoglycanes) qui se présentent sous des formes physiques différentes, ce qui impacte l'intensité et la qualité du signal reçu. Grâce aux progrès dans les séquences d'imagerie (multiparamétriques, combinant les contrastes en T1, T2 et densité de protons) et la qualité des sondes de détection, on peut désormais quantifier, avec une résolution inférieure à 250 μm , l'épaisseur et le volume des composants principaux de la plaque, des calcifications, du thrombus

luminal ou de l'hémorragie intra-plaque dans les artères aortiques [Fayad et al., 2000b], carotidiennes [Yuan et al., 1998] et même coronaires [Fayad et al., 2000a], aussi bien sur l'homme que sur des modèles animaux [Fayad et al., 1998]. Les images *in vivo* ont pu être corrélées aux mesures *in vitro* après chirurgie ainsi qu'à l'histologie.

Encourageants, ces résultats demandent cependant d'autres travaux pour affiner la technique et pouvoir identifier avec certitude les différentes composantes de la plaque coronaire.

L'apport des produits de contraste en IRM élargit le panel déjà très riche des possibilités de contraste que propose l'IRM. Ces agents font appel aux propriétés paramagnétiques des chélates de gadolinium ou super-paramagnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer qui modulent les temps de relaxation transversale ou longitudinale des molécules d'eau avoisinantes. Par exemple, l'administration d'un chélate de gadolinium permet d'augmenter le signal des tissus inflammatoires et de délimiter la chape fibreuse et les ulcérations [Yuan et al., 2002][Kerwin et al., 2006]. Des composés superparamagnétiques, les SPIO ou USPIOs, small ou ultrasmall iron oxide particles, sont proposés comme marqueurs de l'activité macrophagique dans les plaques d'athérome, à la fois dans les modèles animaux expérimentaux et en clinique [Schmitz et al., 2006]. L'évaluation du contraste IRM généré par les USPIOs dans les athéromes carotidiens révèle une intensité de signal (hyposignal) optimum 24-36 h après l'administration de l'agent de contraste. En combinant différentes séquences d'imagerie permettant d'étudier les effets T2/T2* ainsi que les effets T1, on peut discriminer le fer intra et extracellulaire [Simon et al., 2006]. Des séquences d'imagerie sont également en développement afin de générer des signaux positifs (hypersignal) avec des particules d'oxyde de fer [Mani et al., 2006][Lipinski et al., 2008][Korosoglou et al., 2008]. ATHEROMA (Atorvastatin Therapy : Effects on Reduction of Macrophage activity) est la première étude clinique d'IRM à corréliser les effets de la thérapie par les statines à une réduction de l'inflammation de la plaque d'athérome carotidienne [Tang et al., 2009]. Le ferumoxtran-10 utilisé dans cette étude est encore sous investigation clinique et n'est pas encore approuvé par la Food and Drug Administration (FDA). Des améliorations dans l'interprétation des images et l'analyse des données sont nécessaires avant que cette méthodologie puisse être utilisée dans de larges essais cliniques multicentriques.

Aujourd'hui, un peu à l'instar des traceurs en imagerie nucléaire, l'idée est de coupler un vecteur à ces agents. L'arrivée de ces nouveaux produits de contraste va offrir d'ici peu de nouvelles opportunités de diagnostic des plaques instables.

3.5. Conclusion

La technique d'imagerie idéale serait non-invasive, de faible coût et résolutive. Elle pourrait différencier les structures caractérisant la plaque d'athérome et ainsi permettre le suivi de la progression ou la régression des lésions en réponse aux interventions chirurgicales ou médicamenteuses. Malheureusement, une technique alliant tous ces impératifs, n'est pas proposée en clinique [Rudd et al., 2009]. Néanmoins, plusieurs méthodes existent actuellement permettant d'obtenir des images de la paroi des vaisseaux avec pour chacune d'entre elle des caractéristiques propres. Par exemple, les techniques nucléaires (PET ou SPECT) ont une sensibilité de l'ordre du picomolaire contrairement à l'IRM ou le CT qui sont de l'ordre du micro et milimolaire respectivement. Plus la méthode est sensible et moins il est nécessaire d'injecter de produits de contraste. A contrario, les méthodes les plus sensibles sont celles qui ont la moins bonne résolution spatiale : 3 à 4 mm pour le PET, 10 à 15 mm pour le SPECT contre 25-100 μm pour l'IRM et 25-200 μm pour le CT (**Figure 3.1**). Il n'existe donc pas de technique idéale mais afin de contourner les limitations de chacune, les scientifiques ont couplé la grande sensibilité de l'imagerie nucléaire avec la forte résolution spatiale de l'IRM ou du CT pour l'élaboration de méthodes hybrides : SPECT/CT ou PET/MR.

Une autre façon de contourner la limitation de sensibilité de l'IRM est de développer l'IRM moléculaire.

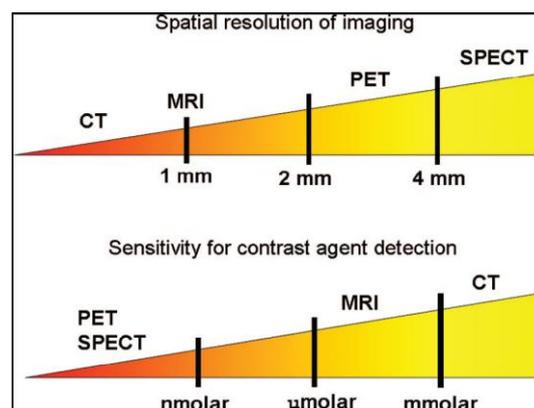


Figure 3.1: Illustration of the relative spatial resolution of common imaging techniques (top), along with their sensitivity values (bottom). D'après Rudd et al., 2009.

3.6. Ciblage moléculaire de la plaque d'athérome instable

Depuis quelques années maintenant, au-delà des progrès dans la conception de méthodes physiques toujours plus performantes, les techniques d'imagerie se sont dotées d'un nouvel outil biologique: le ciblage moléculaire. Cette mini-révolution dans le domaine du diagnostic médical a déjà permis d'appréhender avec une plus grande sensibilité, dans les modèles animaux étudiés, les caractéristiques absolues des tissus. Le transfert de ces méthodologies à l'homme devrait autoriser le ciblage et la visualisation de l'état pathologique d'un tissu et ainsi permettre au clinicien d'adapter son choix thérapeutique. Dans la partie qui suit, j'introduis succinctement, en apportant quelques exemples, les différents marqueurs qui ont été ciblés à ce jour pour l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome.

3.1.1. Imagerie de l'endothélium activé

L'endothélium consiste en une monocouche de cellules endothéliales tapissant le vaisseau sanguin. Dans les conditions normales, l'endothélium résiste aux forces qui s'exercent à sa surface en favorisant la production de molécules vasodilatatrices endogènes, la résistance à la formation d'un thrombus ou la fibrinolyse. Dans un état pathologique, la fonction endothéliale est altérée et un processus inflammatoire se met en place. Le recrutement des cellules inflammatoires au sein du sous endothélium nécessite la transmigration de ces cellules à travers l'endothélium. Ceci est rendu possible par l'expression à la surface de l'endothélium activé de marqueurs tels que les molécules d'adhésion comme VCAM-1, ICAM-1, les sélectines, P-sélectine ou E-sélectine et les intégrines comme l' $\alpha\beta3$.

3.6.1.1. Exemple du ciblage des VCAM-1

Aux stades précoces de la lésion athéroscléreuse, VCAM-1 est exprimé aussi bien à la surface de l'endothélium que dans les néo-vaisseaux. VCAM-1 peut également internaliser son ligand amenant ainsi à son accumulation au sein de l'endothélium activé et probablement dans les CML [Libby, 2009]. Plusieurs peptides ciblant cette molécule ont vu le jour et ont été testés *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Parmi ces études, citons celle de Nahrendorf et al., qui par phage-display *in vivo* ont pu identifier un peptide (**VINP-28**) homologue au ligand de la VCAM-1, l'intégrine VLA4 (Very late antigen-4, $\alpha4\beta1$). Ce peptide a été couplé à des nanoparticules superparamagnétiques (les particules CLIO) et fluorescentes puis utilisé pour la double visualisation par IRM et microscopie de l'endothélium activé sur des souris ApoE^{-/-} mises sous régime hypercholestérolémiant (**Figure 3.2**) [Nahrendorf et al., 2006].

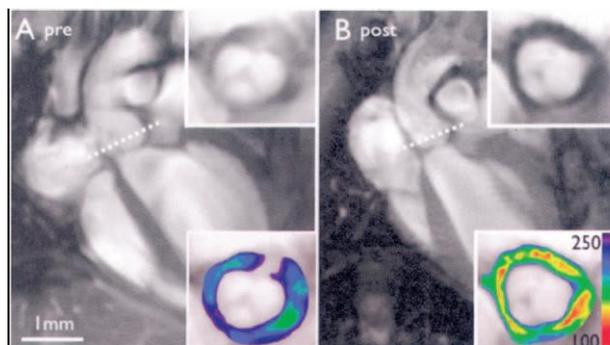


Figure 3.2: *In vivo* MR and optical imaging of VCAM-1 expression. A, MRI before injection of VINP-28. Dotted line depicts location of short-axis view (insets, lower panel with color coded signal intensity). B, Same mouse 48 hours after injection of VINP-28. A marked signal drop in the aortic root wall was noted (insets). The contrast-to-noise ratio (CNR) of the aortic wall was increased significantly after injection of the probe (mean_{SD}; **P*<0.05 before vs after injection). D'après Nahrendorf et al., 2006.

L'équipe de Nahrendorf s'est également intéressée à l'imagerie par PET-Scan en utilisant le traceur ¹⁸F-FDG (¹⁸F-fluorodéoxyglucose) qui a la capacité de s'accumuler dans les plaques athéromateuses. Le traceur ¹⁸F-FDG présente l'énorme avantage d'être utilisé en milieu hospitalier. Pour cela, cette équipe s'est focalisée sur le couplage d'un peptide tétramérique linéaire (TLP) reconnaissant les VCAM-1 et couplé au radioisotope ¹⁸F. Une heure après l'injection de ce complexe dans la circulation sanguine d'une souris sous régime hypercholestérolémiant, un fort signal focal est généré autour des zones inflammatoires. (**Figure 3.3**) [Nahrendorf et al., 2009].

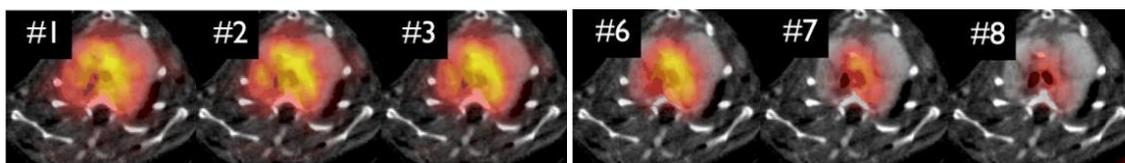


Figure 3.3: Dynamic PET imaging identified 60–120 minutes (images from 1 to 8) after injection as a suitable time window. Signal in the blood pool and the aortic root is shown over time in short axis PET-CT. D'après Nahrendorf et al., 2009.

Récemment, Kaufmann et al. ont montré que des vésicules lipidiques (microbulles) couplées à des anticorps anti-VCAM-1 (clone **MK 2.7**) pouvaient engendrer un signal perceptible en ECUS sur des aortes de souris ApoE^{-/-} mises sous régime hypercholestérolémiant (**Figure 3.4**) [Kaufmann et al., 2007].

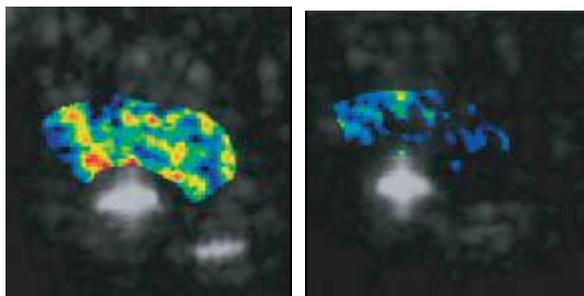


Figure 3.4: Images obtenues en échographie après injection de microbulles couplées avec des anticorps anti-VCAM-1 (à gauche) et de microbulles non spécifiques (à droite). D'après Kaufmann et al., 2007.

L'intégrine VCAM-1 est sans conteste l'antigène le plus ciblé dans le domaine de l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome.

3.6.1.2. Ciblage d'autres marqueurs de l'activation endothéliale

Des études ont également relatées le ciblage des sélectines, comme la **E-sélectine** pour laquelle deux stratégies ont été proposées : une en additionnant des AcM murins anti-E-sélectine à des particules de type CLIO [Kang et al., 2002] ou USPIO [Reynolds et al., 2005] ; l'autre en greffant à un complexe de gadolinium un mimétique du ligand de la E-sélectine [Boutry et al., 2005].

La **P-sélectine** est actuellement une cible prisée pour le ciblage de la plaque d'athérome car elle est exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales activées à différentes étapes de l'athérogénèse et aux étapes initiales de l'athérombose. Alsaïd et al ont créé un mimétique du ligand de la P-sélectine, le PSGL-1, associé à un complexe de gadolinium [Alsaïd et al., 2009] tandis que d'autres équipes ont choisi d'utiliser des anticorps monoclonaux couplés à des agents superparamagnétiques de type MPIO ou VUSPIO [McAteer et al., 2007][Jacobin-Valat et al., 2010] .

L'intégrine $\alpha v \beta 3$, exprimée par les cellules musculaires lisses de l'intima ou les cellules endothéliales des microvaisseaux angiogéniques de la plaque, est classiquement ciblée par les peptides type RGD ou peptidomimétiques. Ils sont associés à une plateforme de gadolinium pour la visualisation par IRM de l'angiogénèse de la plaque [Winter et al., 2003][Burtea et al., 2008]. Des nanoparticules incorporant des drogues anti-angiogéniques, comme la **fumagilline**, ont été développées pour une action thérapeutique combinée à l'imagerie [Winter et al., 2006].

3.6.2. Imagerie des lipoprotéines

Différentes études ont été menées pour visualiser l'accumulation directe des lipoprotéines dans les plaques d'athérome. Tout d'abord, les recherches se sont focalisées sur l'imagerie des **LDL natives** en les radiomarquant avec de ^{125}I , du $^{99\text{m}}\text{Tc}$, du ^{123}I et du ^{111}In [Hay et al., 1991], [Virgolini et al., 1991], [Pirich et al., 1995]. Le problème majeur de ces études est la perturbation des images *in vivo* du fait de la faible cinétique d'accumulation du traceur au niveau des lésions comparée à la forte activité dans la circulation sanguine. Sous certaines conditions, le cholestérol, les esters de cholestérol ou bien les phospholipides peuvent subir des oxydations amenant à la formation de dérivés oxydatifs à haut potentiel athérogénique [Palinski et al. 1995]. Ces dérivés, tels les **LDLox** ou les **MDA-LDL** (malondialdehyde-LDL) ont été désignés comme les premiers acteurs de l'athérogénèse de par leur action sur le processus inflammatoire au sein du sous endothélium. Les premières études se sont intéressées au radiomarquage des LDLox obtenues par oxydation *in vitro* (peroxyde d'hydrogène ou Cuivre) avec du $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Cette stratégie, plus concluante que les précédentes, a montré une meilleure accumulation tissulaire ainsi qu'une cinétique plus favorable comparée aux LDL natives. Plus récemment, Shaw et al. ont identifié par phage display *in vitro* un anticorps humain (**IK-17**) reconnaissant aussi bien les LDLox que les MDA-LDL. De plus, cet anticorps était capable d'inhiber la prise en charge par les macrophages des LDLox et des cellules apoptotiques lui conférant ainsi des propriétés uniques pour la thérapie. Cette étude a également montré que cet anticorps marqué à l'iode ^{125}I (^{125}I -IK-17) pouvait se lier aux zones pathologiques après injection du radiotracer dans une souris $\text{LDLR}^{-/}$ [Shaw et al., 2001] (**Figure 3.5**). Cependant, la faisabilité de l'imagerie *in vivo* des lésions athéroscléreuseuses n'a pas été démontrée.

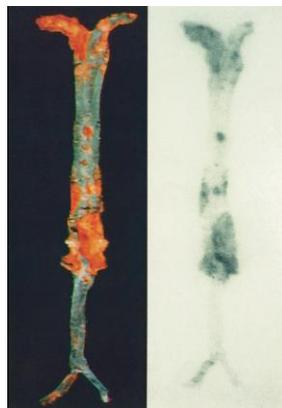


Figure 3.5: Photomicrograph of a Sudan-stained $\text{LDLR}^{-/}$ mouse aorta and the corresponding autoradiograph 8 hours after injection of 10 mCi ^{125}I -IK17. The Sudan-stained atherosclerotic lesions (left) are accurately reflected in their entirety in the autoradiograph (right). D'après Shaw et al., 2001.

Des stratégies alternatives ont été employées comme par exemple l'imagerie, grâce à un anticorps murin dirigé contre les épitopes du complexe lysine-MDA (**MDA-2**) présents dans les plaques. Tsimikas et al ont montré que l'anticorps radiomarqué à ^{125}I [Tsimikas et al., 1999] ou au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [Tsimikas et al., 2000] pouvait se lier aux zones pathologiques riches en lipides chez la souris $\text{LDLR}^{-/-}$. Récemment de nouvelles micelles couplées aux anticorps MDA2 et marquées au gadolinium pour une application en IRM ont été testées [Leug, MICAD : Molecular Imaging and contrast agent database]. [Brieley-Saebø et al., 2008].

Les LDLox exercent leurs effets en se fixant sur les récepteurs scavenger présents sur les macrophages et sur le récepteur aux LDL, LOX-1 (lectin-like oxidized-1) exprimé par l'endothélium vasculaire et les organes riches en vaisseaux. Les récepteurs LOX-1 ont été ciblés à l'aide d'un anticorps sur lequel a été greffé du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anti-LOX-1) [Ishino et al., 2008] ou de l' ^{111}In (^{111}In -liposome-LOX-1 antibody-Dil-fluo) ou encore du Gadolinium (Gd-liposome-LOX-1 antibody-Dil-Fluo) [Li et al., 2010].

Les lipoprotéines sont aussi des nanoparticules naturelles capables de délivrer *in situ* un agent d'imagerie. Les high-density lipoproteins (**HDL**) sont particulièrement intéressantes car leur petite taille leur permet de passer la barrière endothéliale et de pénétrer les tissus. Les HDL ont pu être ainsi utilisées en tant que vecteur d'imagerie de la plaque d'athérome dans des modèles animaux d'athérosclérose en les chargeant d'agents de contraste pour l'IRM, pour le CT-Scan ou de quantum dots pour l'imagerie optique [Skajaa et al., 2010].

3.6.3. Imagerie des cellules présentes dans la plaque (Monocytes/Macrophages)

Après l'activation de l'endothélium et l'expression de molécules de surface telles que les VCAM-1, les leucocytes pénètrent dans l'intima à l'aide de MCP-1, une chémokine produite par les cellules endothéliales, les CML et les macrophages. De nombreuses équipes se sont intéressées à ce marqueur surexprimé dans le sous endothélium. Un premier essai de marquage à ^{125}I (^{125}I -MCP-1) a montré une captation de ce traceur par les récepteurs CCR2 dans les zones désendothélialisées de l'aorte de lapin sous régime hypercholestérolémiant. Bien que cette captation ait été correctement corrélée au nombre de macrophages infiltrés, la qualité de l'image *in vivo* reste médiocre [Ohtsuki et al., 2001]. D'autres auteurs ont ensuite décrit le marquage de MCP-1 au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MCP-1). L'image *in vivo* et non invasive obtenue après injection de ce traceur a été très concluante et a parfaitement été corrélée avec la captation observée lors d'expérimentations *ex vivo* (**Figure 3.6**) [Hartung et al., 2007].

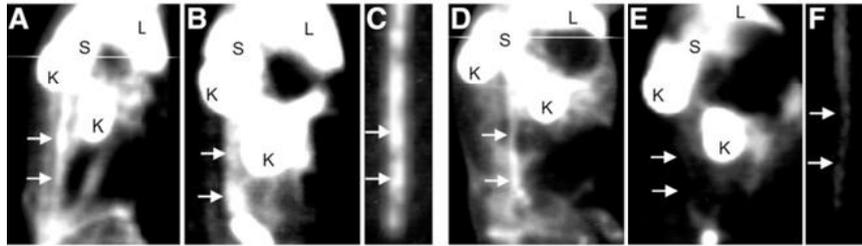


Figure 3.6: Non-invasive *in vivo* planar imaging of macrophage CCR-2 receptors with [^{99m}Tc]-MCP-1. Images were obtained in both New Zealand White (NZW) rabbits submitted to desendothelialization of the abdominal aorta and fed a high-cholesterol diet (atherosclerotic, [A-C]) and control, unmanipulated, NZW animals fed normal rabbit chow (non-atherosclerotic, [D-F]) rabbits. (A-C) Planar γ -images of atherosclerotic rabbit. (A) Image obtained immediately after intravenous [^{99m}Tc]-MCP-1 administration outlines aortic blood-pool activity (arrows). (B) At 3 hours after radiotracer administration, significant radiotracer accumulation is evident in abdominal aorta (arrows). (C) *Ex vivo* image of explanted aorta confirms *in vivo* evidence of [^{99m}Tc]-MCP-1 uptake (arrows). (D-F) Planar γ -images of control rabbit. (D) Aortic blood pool is seen at time of intravenous [^{99m}Tc]-MCP-1 injection (arrows). (E) Image shows lack of [^{99m}Tc]-MCP-1 uptake in region of abdominal aorta, as denoted by arrows in normal rabbit with no atherosclerotic lesions. (F) *Ex vivo* aortic image of control animal demonstrates absence of [^{99m}Tc]-MCP-1 uptake (arrows). L = liver; S = spleen; K = kidney. D'après Hartung et al., 2007.

Les monocytes ayant traversé l'endothélium résident dans l'intima et changent de phénotype pour devenir des macrophages résidents. L'équipe de Weissleder a souhaité suivre la cinétique de migration d'une population de monocytes marqués à ^{111}In et injectés à une souris $\text{ApoE}^{-/-}$ sous régime hypercholestérolémiant. Après 5 jours de migration, un signal focal au niveau de l'aorte ascendante a été enregistré (**Figure 3.7**). L'étude immunohistologique de la zone ciblée démontre la présence des monocytes initialement injectés [Kircher et al., 2007].

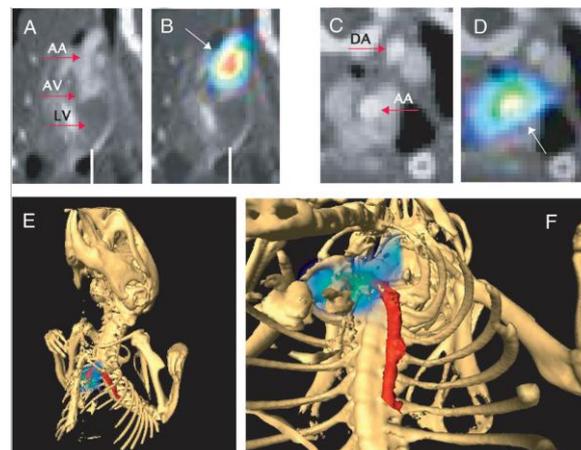


Figure 3.7: Magnification and 3D view of the SPECT/CT data are shown (monocytes transferred into $\text{ApoE}^{-/-}$ mouse). A and C depict CT data only; B and D, SPECT/CT overlay. A and B show sagittal views of the heart (LV indicates left ventricle; AV, aortic valve region) and ascending aorta (AA). Note the SPECT signal (white arrows) indicating monocyte recruitment to the ascending aorta in B. C and D depict axial views of ascending (AA) and descending (DA) aorta. Note the SPECT signal in D in the ascending aorta, correlating with the location in B. E and F, 3D rendering; bony structures rendered in white, aorta in red, and monocyte recruitment in blue/green scale. D'après Kircher et al., 2007.

Certains auteurs ont tiré profit de la propriété des macrophages à phagocyter des nanoparticules riches en structures polysaccharidiques (dextran). Deux études ont tout d'abord été réalisées en injectant dans la circulation sanguine de lapins mis sous régime [Ruehm et al., 2001] ou de lapins Watanabe [Schmitz et al., 2000] des nanoparticules superparamagnétiques de très petite taille (**USPIO**). Ces 2 études ont montré une captation de ces nanoparticules au sein des lésions riches en macrophages. Ainsi, au vu des résultats prometteurs de ces 2 précédentes études, Kooi et al. ont injecté des nanoparticules USPIO (Sinerem) à des patients en attente d'une endarteriectomie. Vingt-quatre heures après l'administration de l'agent de contraste, les images réalisées en T2* montrent un hyposignal dans une zone décrite ultérieurement par immunohistochimie comme une zone riche en macrophages ayant phagocyté des USPIO (**Figure 3.8**) [Kooi et al., 2003].

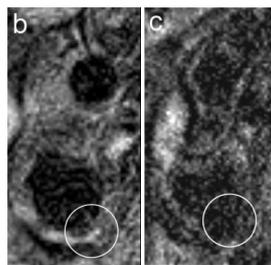


Figure 3.8: Corresponding *in vivo* MR images of the external (above) and internal (below) carotid artery. b, T2*-weighted gradient-echo MR image before administration of USPIOs; c, T2*-weighted gradient-echo MR image 24 hours after administration of USPIOs. A signal decrease can be observed on the postcontrast T2*w MR image (circle) in the part of the vessel wall that showed a large number of Fe-positive cells in the corresponding histological section. D'après Kooi et al., 2003

Les macrophages spumeux expriment à leur surface des récepteurs scavengers qui peuvent également être la cible d'un marquage pour l'imagerie moléculaire. Des équipes de recherche se sont intéressées au ciblage du récepteur scavenger **MSR-A** (Macrophage Scavenger Receptor A ou CD204) à l'aide d'immunomicelles portant un anticorps anti-CD204 couplé à des chélates de gadolinium et à un fluorophore (le nitro-benzoxadiazole (NBD)) (**Figure 3.9**) [Amirbekian et al., 2007] ou au ciblage du récepteur scavenger **MSR-B** (Macrophage Scavenger Receptor B ou CD36) [Lipinski et al., 2009].

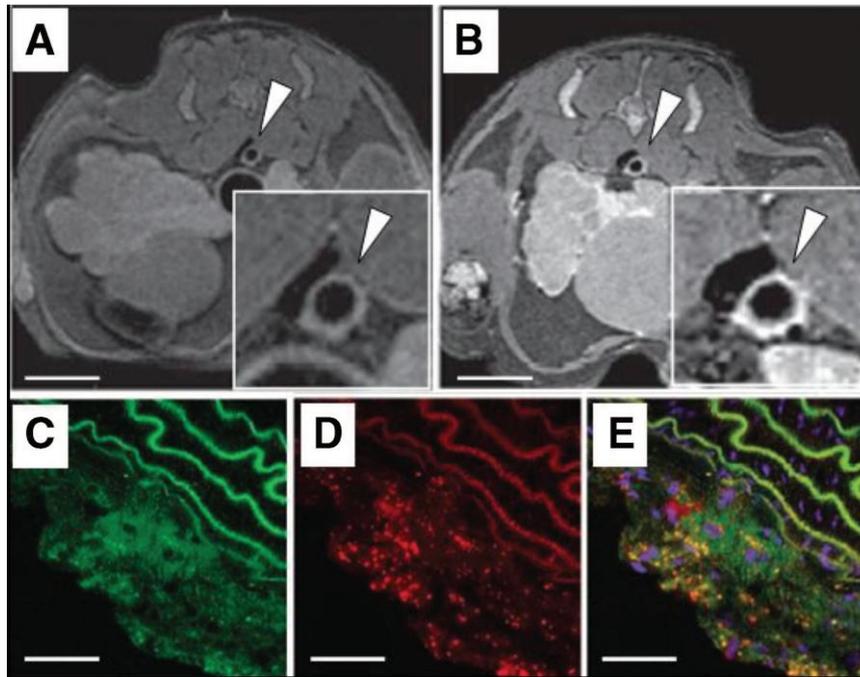


Figure 3.9: Detection of macrophages with gadolinium-containing micelles targeting macrophage scavenger receptors and MRI. MR axial views of an atherosclerotic plaque in the aorta of an atherosclerotic mice before (A) and 24 hours (B) after the intravenous injection of immuno-micelles targeting the macrophage scavenger receptors (Insets are magnification of the aorta; scale bar, 1 cm). A strong enhancement was detected with MRI in the aortic wall 24 hours after injection of immuno-micelles (B; white arrowhead). Confocal fluorescence microscopy of corresponding atherosclerotic plaque demonstrated colocalization between fluorescently labeled immunomicelles (C, green color) and anti-CD68 stained macrophages (D; red stain). Areas of yellow represent overlap of labeled immunomicelles and macrophage staining on the overlaid images (E). White scale bar, 250 μ m. D'après Amirbekian et al., 2007.

D'autres équipes, quant à elles, se sont intéressées à l'activité métabolique du macrophage et à sa capacité à capter du ^{18}F -FDG pour l'imagerie en PET. Ainsi, Rudd et al. ont montré que les plaques d'athérome symptomatiques au niveau des carotides accumulaient 30% plus de ^{18}F -FDG que des plaques asymptomatiques [Rudd et al., 2002].

3.6.4. Imagerie des ROS

Les macrophages activés, les CML ainsi que les cellules endothéliales peuvent produire des espèces réactives dérivées de l'oxygène (**ROS**) qui sont à l'origine de dommages cellulaires et d'apoptose. Ces ROS, présents dans les lésions inflammatoires en excès peuvent être ciblées pour l'imagerie moléculaire. Deux cibles ont été rapportées comme étant pertinentes pour la visualisation *in vivo* des plaques d'athérome ; ce sont les anions superoxydes produits par les NADPH oxydases et les acides hypochloreux générés par les myeloperoxydases. De nouvelles sondes fluorescentes n'interférant pas avec l'auto-fluorescence des tissus cibles ont été développées. Ces sondes (**SNAPP** pour l'acide hypochloreux par exemple) ont été capables de générer des images *in vivo*, à l'aide de l'imagerie optique par réflectance, des parois artérielles ayant subi des dommages oxydatifs [Shepherd et al., 2007].

3.6.5. Imagerie de l'apoptose

Les cœurs nécrotiques présents dans les lésions avancées d'athérosclérose sont le résultat d'une accumulation graduelle d'ester de cholestérol, de cristaux de cholestérol et de débris cellulaires provenant par exemple de cellules apoptotiques. L'apoptose est un phénomène naturel qui est essentiel au bon fonctionnement des tissus. L'apoptose des macrophages et des CML contribue à la progression de ce cœur nécrotique et de ce fait au risque de rupture de plaque. Une détection précoce de ce phénomène d'apoptose par des techniques d'imagerie serait un avantage pour les cliniciens afin d'engager rapidement un traitement adapté pour la régression ou la stabilisation de la plaque. Une caractéristique des cellules engagées dans le processus d'apoptose est l'exposition à la surface de leurs membranes cellulaires des **phosphatidylsérines (PS)**. Plusieurs équipes se sont intéressées au ciblage de ces PS en utilisant des ligands naturels que sont l'annexine V [Kolodgie et al., 2003][Kietseleer et al., 2004][Isobe et al., 2006][Burtea et al., 2009] et le **domaine C2 de la synaptotagmin I** [Jung et al., 2004]. Burtea et al ont identifié par phage display *in vitro* un peptide (**R826**) dirigé contre les PS qu'ils ont par la suite marqué à des nanoparticules paramagnétiques pour l'imagerie en IRM. Après 30 minutes d'injection, un hypersignal apparaît sur une coupe axiale de l'aorte abdominale (**Figure 3.10**). Ce résultat a été ensuite conforté par des techniques d'immunohistochimie [Burtea et al., 2009].

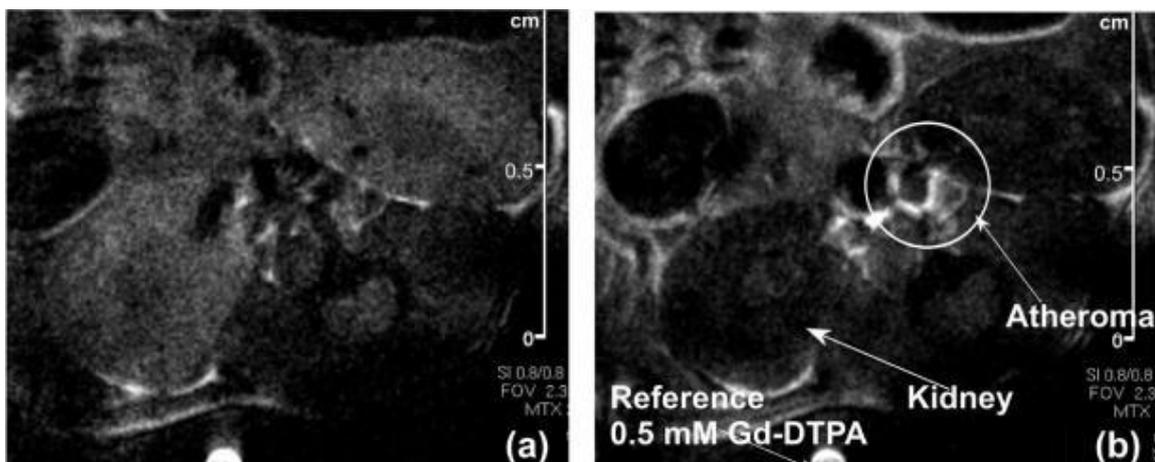


Figure 3.10: MRI RARE images (spatial resolution 90 μm) are shown in precontrast (a) and ~ 30 min post Gd-DTPA-g-R826 injection (b). D'après Burtea et al., 2009.

3.6.6. Imagerie des métalloprotéinases (MMPs)

La fragilisation de la chape fibreuse engendrée par l'activité intensive des MMPs est un indicateur d'instabilité de la plaque d'athérome [Galis et al., 2004]. La paroi du vaisseau procède à un remodelage positif de façon à préserver la lumière vasculaire. Le remodelage s'opère via une dégradation de la matrice extracellulaire sous l'action des MMPs. Les taux de MMP-1, MMP-3, MMP-8 et MMP-9 sont significativement augmentés dans les plaques athéromateuses instables comparés aux plaques fibreuses [Sluijter et al., 2006]. Il n'est, de ce fait, pas étonnant que plusieurs équipes se soient intéressées à quantifier cette activité protéasique. L'une des études pionnières a été réalisée par P.Libby et R.Weissleder qui ont pu cibler, imager et quantifier *in vivo* et de façon non invasive l'activité enzymatique des MMPs au sein des plaques d'athéromes par des expériences de zymographie *in situ*. Une sonde fluorescente contenant un substrat gélatineux (précédemment identifié par phage-display) est activée uniquement lors du clivage du substrat par les MMPs. Elle émet alors de la fluorescence qui peut être captée à l'aide d'un spectromètre optique NIRF (**Figure 3.11**) [Deguchi et al., 2006].

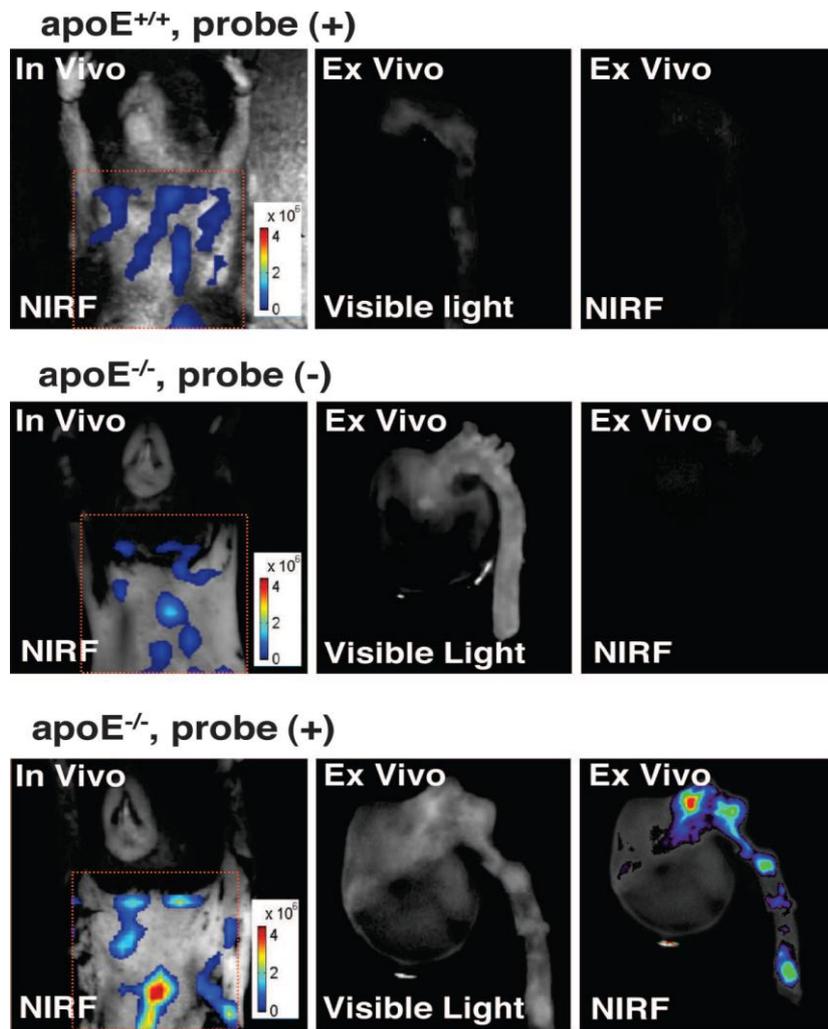


Figure 3.11: *In vivo* FMT (fluorescence molecular tomography) shows gelatinase activity in mouse atherosclerotic plaques. A tomographic image *in vivo* FMT superimposed by pseudocolor analysis detected low NIRF signals on apoE^{-/-} mice 24 hours after probe injection (top left). A rectangle indicates the area where NIRF signals were reconstructed. An *ex vivo* visible light image on the aorta excised after *in vivo* FMT session also showed apparently normal aorta (top middle). *Ex vivo* NIRF reflectance detected negligible signals on this normal aorta (top right). Cholesterol-fed apoE^{-/-} mice with no probe injection served as another control (middle), exhibiting negligible NIRF signals *in vivo* and *ex vivo*, whereas a visible light image showed atherosclerotic changes. However, atherosclerotic aortas from cholesterol-fed apoE^{-/-} mice after probe yielded substantially more intense NIRF signals (bottom) compared with 2 control aortas. *Ex vivo* NIRF reflectance also detected NIRF signals on the aortic root and arch of apoE^{-/-} mice. These results represent 3 independent experiments. D'après Deguchi et al., 2006.

Récemment, Fujimoto et al. ont utilisé un inhibiteur des MMPs (**MPI**) marqué au ^{99m}Tc (^{99m}Tc-MPI) chez des lapins ayant subi une angioplastie aortique, soumis à un régime hypercholestérolémiant et à un traitement aux statines. Les résultats de cette étude ont montré une parfaite corrélation entre l'imagerie *in vivo*, la présence de MMP (2 et 9) et des macrophages en immunohistochimie. De plus les aortes de lapins sous traitement aux statines ou à une interruption du régime, présentent une captation en ^{99m}Tc-MPI inférieure à celle des lapins ayant eu un régime ininterrompu [Fujimoto et al., 2008]. Le même type d'étude a également été réalisé chez des souris développant la maladie avec des résultats similaires [Ohshima et al., 2009].

D'autres plateformes ont été développées pour imager l'expression des MMPs en IRM, notamment le **P947** qui est un chélate de gadolinium couplé à un peptide spécifique des MMPs. L'injection de P947 à des souris ApoE autorise un rehaussement du signal IRM de 93% avec un rapport signal sur bruit de 17,7 comparé à 7,7 (**Figure 3.12**). Le P947 marqué à l'Europium montre une colocalisation avec les MMPs, essentiellement les MMPs 3 et les MMPs 9, en microscopie confocale [Amirbekian et al, 2009]

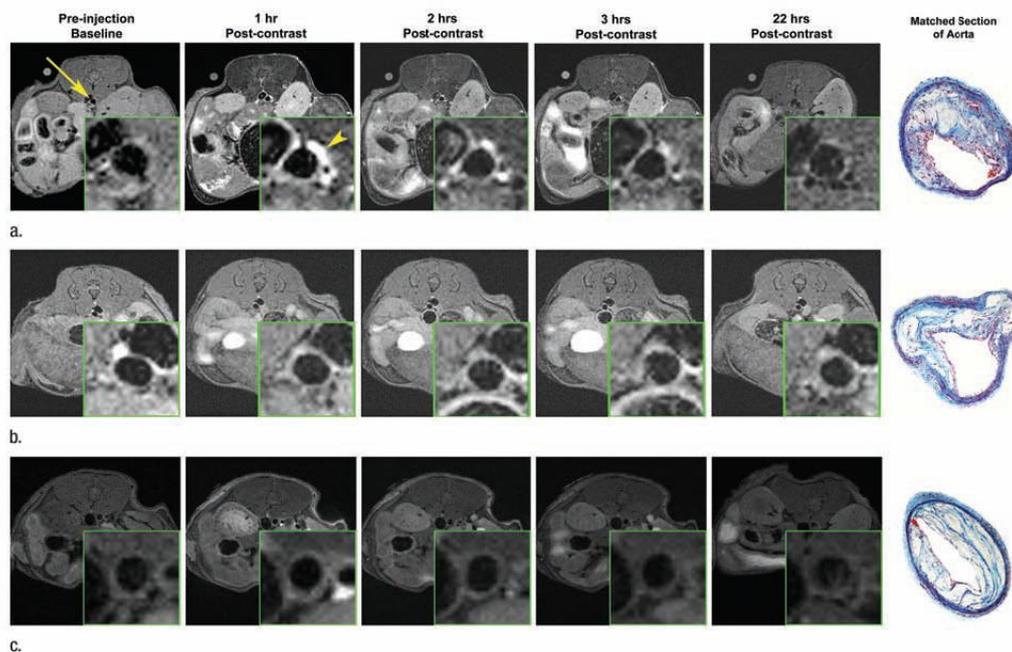


Figure 3.12: *In vivo* MR images acquired in atherosclerotic ApoE-deficient mice. (a) At baseline (before injection) and up to 22 hours after injection of MMP-targeted P947. (b) With untargeted P1135 (scrambled form of P947). (c) With standard nontargeted gadoterate meglumine. Insets are enlargements of aorta (arrow). Arrowhead points to MR inset of atherosclerotic aorta after injection with P947. (a– c) Farthest right images show hematoxylin-eosin-stained sections of aorta at identical anatomic level as MR images from same animal. D'après Amirbekian et al, 2009.

3.6.7. Imagerie des marqueurs de l'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus qui accompagne aussi bien la formation que la progression de la plaque d'athérome. La nature perméable de ces néovaisseaux les rend extrêmement fragiles et prompts à la rupture et à la formation de thrombi intra-plaque. Plusieurs marqueurs de l'angiogénèse ont été proposés pour l'imagerie moléculaire. Winter et al ont tout d'abord ciblé les intégrines $\alpha v \beta 3$, présentes à la surface des macrophages et des cellules endothéliales, à l'aide d'un peptidomimétique de la vitronectine couplé à un agent paramagnétique pour l'IRM. Trois groupes de lapins malades ont été utilisés : un groupe ayant reçu l'agent de contraste fonctionnalisé, le second avec seulement l'agent paramagnétique et le troisième ayant reçu, 2 heures avant l'injection de l'agent de contraste fonctionnalisé, le même agent ciblant mimétique sans agent de contraste. Les résultats ont montré qu'il y avait, chez les lapins injectés avec l'agent fonctionnalisé, une

augmentation de 47% du signal (hypersignal) par rapport aux témoins. De plus, les auteurs ont observé un blocage compétitif du signal obtenu chez les lapins du troisième groupe (**Figure 3.13**) [Winter et al., 2003]. Dernièrement, Laitinen et al. ont étudié la biodistribution d'une sonde spécifique de l' $\alpha v\beta 3$, ^{18}F -galacto-RGD, pour la détection de l'angiogénèse. Cette étude a montré qu'il était possible de détecter chez un modèle de souris d'athérosclérose, la présence de néovaisseaux formés au sein des artères atteintes (**Figure 3.14**) [Laitinen et al., 2009]. D'autres études ont ciblé l'extradomaine B de la fibronectine (**ED-B**) qui est un marqueur de l'angiogénèse également utilisé en cancérologie. Grâce à la technologie du phage-display, un anticorps humain (**L19**) dirigé contre ce domaine a été identifié puis marqué à l'iode 125 ou à une sonde fluorescente. Après injection et biodistribution de l'anticorps marqué, des séquences d'images par PET ou NIRF ont été réalisées et les résultats d'accumulation des marqueurs ont été corrélés avec des études immunohistologiques afin de montrer la spécificité du signal obtenu [Matter et al., 2004]. Cette même équipe a travaillé sur un nouveau traceur, le ^{125}I -G11 qui est un anticorps radiomarqué dirigé contre le domaine C de la **tenascine-C** surexprimée dans les plaques d'athérome et absente des tissus sains. Les auteurs ont montré la faisabilité du marquage ex vivo à l'aide de ce traceur [von Lukowicz et al., 2007].

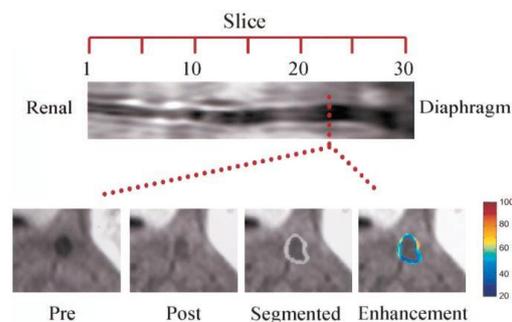


Figure 3.13: *In vivo* spin-echo image reformatted to display long axis of aorta from renal arteries to diaphragm of 1 cholesterol-fed rabbit (top) and at single transverse level (bottom) before (Pre) and after (Post) treatment, after semiautomated segmentation, and with color-coded signal enhancement (Enhancement) above baseline (inpercent). D'après Winter et al., 2003.

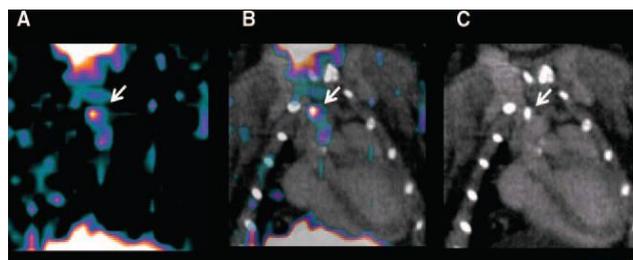


Figure 3.14: *In vivo* ^{18}F -galacto-RGD PET imaging showed focal increases (A, B) in the signal intensity colocalizing with calcified atherosclerotic aortic arch and aortic root as seen in contrast-enhanced CT angiography (C). Scale bar, 0.5 cm. D'après Laitinen et al., 2009.

3.6.8. Imagerie de l'activité plaquettaire et de la formation du thrombus

La formation d'un thrombus survenant après l'érosion ou la rupture d'une plaque d'athérome est l'évènement critique qui conduit à l'IDM ou aux AVC. Les plaquettes sont impliquées à tous les stades de la maladie. Dès les premières étapes de l'athérogénèse, elles s'activent au contact des éléments thrombogéniques du sous endothélium pour former un thrombus. Une étude menée par angiographie sur plusieurs patients a montré que la rupture de la plaque d'athérome et la formation du thrombus avaient lieu plusieurs jours, voire plusieurs mois, avant les premières manifestations cliniques [Rittersma et al., 2005].

Les premières études d'imagerie du thrombus remontent au début des années 80 où les équipes ont marqué des plaquettes à l'indium 111 afin de suivre leur biodistribution. Il a été montré qu'elles étaient capables de coloniser les plaques présentes dans les carotides et de ce fait d'apporter une information précieuse sur leur nature instable. Cependant le faible rapport signal sur bruit a vite découragé les adeptes de cette approche pour une application clinique [Signore et al. 2001]. En parallèle, plusieurs approches ont été développées, notamment le ciblage moléculaire de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ présente à la surface des plaquettes activées ainsi que le ciblage de la fibrine. Plusieurs peptides liant la protéine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ont été radiomarqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dont le $^{99\text{m}}\text{Tc-P280}$ (apcitide, Acutect) ou le $^{99\text{m}}\text{Tc-P748}$. La scintigraphie réalisée à l'aide du peptide $^{99\text{m}}\text{Tc-P280}$ a démontré de bonnes sensibilité et spécificité de ciblage [Taillefer et al., 2000] alors que le $^{99\text{m}}\text{Tc-P748}$ a montré une pharmacocinétique faible avec toutefois une bonne captation par les thrombi induits dans un modèle animal canin ou chez des patients atteints d'embolie pulmonaire [Lister-James et al., 1997]. D'autres équipes ont utilisé un mini-anticorps (format scFv) anti- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ couplé à des agents de contraste superparamagnétiques, les MPIO de taille micrométrique [Von Zur Muhlen et al., 2009]. L'anticorps utilisé présente la particularité de cibler les plaquettes dans leur conformation activée. Cet anticorps est spécifique d'un site néoformé suite à la fixation du ligand, en l'occurrence, le fibrinogène (**anticorps anti-LIBS** pour Ligand Induced Binding Site). L'anti-LIBS-MPIO a été testé sur une lésion provoquée de l'artère fémorale de souris. La fixation des MPIO, quantifiée par IRM, est quatre fois plus élevée suite à l'injection des anti-LIBS-MPIO par rapport aux MPIO contrôles (**Figure 3.15**).

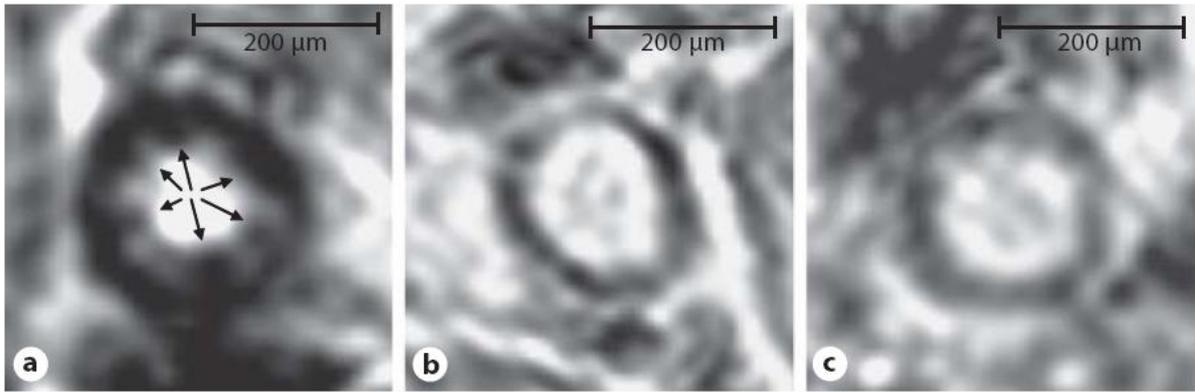


Figure 3.15: *Ex vivo* MRI at 11.7 Tesla. 3D gradient echo sequence (TR = 90 ms, TE = 4 ms, imaging time 7 h and resolution 25 µm isotropic). **a** The injured femoral artery exposed to LIBS-MPIO shows multiple, intensely-low-signal, lobulated areas at the interface between vessel wall and lumen (arrows). In the injured artery perfused with control-MPIO (**b**), there is a small amount of inherent signal heterogeneity, but this is clearly distinguished from the appearance of bound contrast (**a**). The same is true for the example of an uninjured artery without MPIO perfusion, which yields signal effects comparable to the injured vessel in **c**. D'après Von Zur Muhlen et al. 2009.

Enfin citons les travaux de Sirol et al. qui ont comparé en IRM, l'image d'un thrombus occlusif et non occlusif, avec et sans agent de contraste ciblant la fibrine. Les résultats de cette étude, qui a été menée sur un modèle animal de thrombose, ont montré que l'utilisation d'un peptide ciblant la fibrine (**EP-2104R**) favorisait l'imagerie du thrombus, qu'il soit occlusif ou non (**Figure 3.16a, 3.16b**) [Sirol et al., 2005].

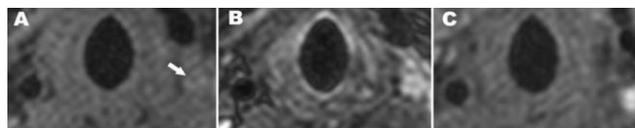


Figure 3.16a: Transverse MR images of a rabbit carotid artery, 1 week after thrombus induction, with a double-inversion recovery, turbo spin-echo sequence. T1 Weighted (A) and T2W (B) images were obtained without any injection of contrast agent. The white arrow indicates the location of the thrombus. C, The T1W images obtained 30 minutes after EP-2104R injection. D'après Sirol et al., 2005.

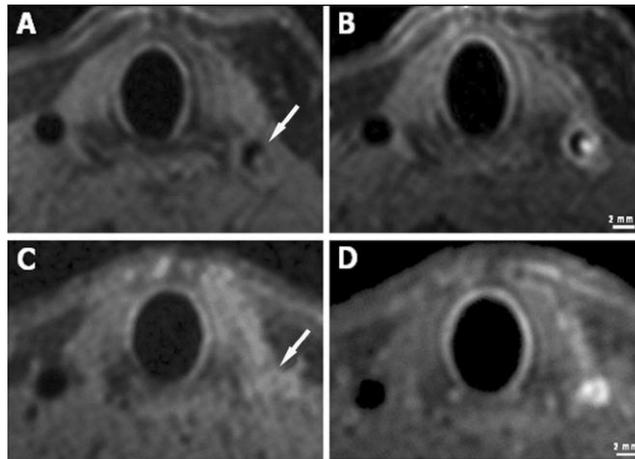


Figure 3.16b: Transverse T1W MR images of a 1-week-old thrombus, before (left, A and C) and after (right, B and D) EP-2104R injection. Note the benefit of using the fibrin-targeted MR contrast agent for thrombus detection. Accurate detection and localization of the thrombus were successful in both nonocclusive (upper row, A and B) and occlusive (lower row, C and D) thrombi. White arrows denote the thrombus location in the NCE MRI study. D'après Sirol et al., 2005.

3.7. Conclusion

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique dont l'issue est souvent fatale. Il a été admis que plus que la sténose de la plaque, c'est sa composition qui détermine le degré de dangerosité. Ainsi, une plaque non sténosante avec un gros cœur lipidique et une fine chape fibreuse a une probabilité plus accrue de se rompre qu'une plaque sténosante. Tout l'intérêt réside aujourd'hui à détecter ce type de plaques avant la survenue de l'accident aigu. Pour cela plusieurs équipes se sont intéressées au marquage de molécules surexprimées au sein de la plaque ou de détecter l'activité métabolique des macrophages, reflet de la présence de phénomènes inflammatoires. L'activation de l'endothélium représente la première étape de l'athérogénèse. Le ciblage de molécules de surface endothéliales telles que VCAM-1 ou P-sélectine a montré qu'il était possible de détecter des événements précoces de ce processus. La transmigration des leucocytes est rendue possible par la présence de MCP-1, molécule qui a été largement ciblée pour détecter les premiers signes de l'inflammation au sein de la paroi artérielle. L'inflammation est également détectée par l'augmentation de l'activité métabolique des macrophages, notamment par la prise en charge du ^{18}F -FDG au cours de la glycolyse. De plus, la sécrétion par les macrophages spumeux ou les CML de ROS a permis sur des modèles animaux de détecter en temps réel l'activité oxydative des cellules de l'inflammation grâce à des sondes fluorescentes. Le marquage de l'activité des métalloprotéases libérées localement par les macrophages spumeux peut apporter un renseignement fonctionnel sur l'état de la chape fibreuse. Enfin, l'angiogénèse est un phénomène

qui accompagne le développement de la plaque. Les néovaisseaux expriment à leur surface des marqueurs ($\alpha\beta3$) qui peuvent être ciblés pour l'imagerie également.

La découverte d'anticorps anti MDA-LDL dans le sérum humain a conduit à l'élaboration de stratégies permettant le ciblage des lipides (LDLox ou MDA-LDL). Ainsi, il a été montré qu'un couplage de ces anticorps à des traceurs radioactifs pouvait marquer les plaques riches en lipides et donc apporter un renseignement sur la densité du cœur lipidique. Sous l'action des enzymes de dégradation, de la présence de molécules oxydatives, les cœurs lipidiques deviennent un réservoir à cellules apoptotiques. Ces cellules présentent à leur surface des PS ou des ED-B qui peuvent également être ciblées. Les corps apoptotiques ont un pouvoir thrombogénique considérable, leur détection peut donc apporter un élément fonctionnel important sur l'état de la plaque et pouvoir anticiper une action préventive. La **Figure 3.17** et le **Tableau 3.1** résument parfaitement tous les biomarqueurs ciblés actuellement en imagerie moléculaire de la plaque d'athérome.

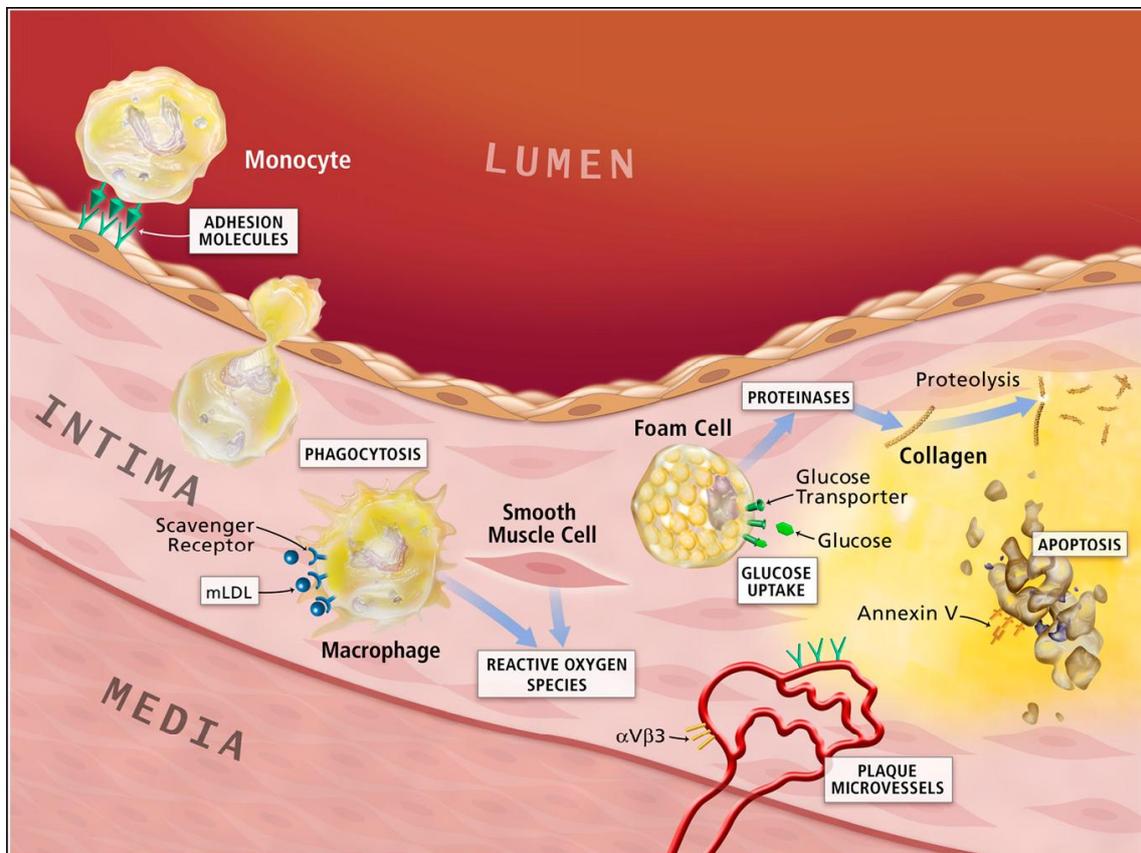


Figure 3.17: Les biomarqueurs pour l'imagerie moléculaire de l'athérosclérose.

3.8. Cibles potentielles (tableau récapitulatif des cibles)

| Biologie | Molécule/structure/activité ciblée | Molécule ciblante | Nature du ciblant | Traceur ou NP | Imagerie in vivo | Technique d'imagerie | Référence bibliographique |
|-----------------------------|------------------------------------|--|----------------------|---|------------------|----------------------|----------------------------|
| Activation endothéliale | VCAM-1 | VINP-28 | Peptide | superparamagnétique | + | IRM | Nahrendorf et al., 2006 |
| | | TLP | Peptide | ^{18}F (^{18}F -4V) | + | PET/CT | Nahrendorf et al., 2009 |
| | | TLP | Peptide | ^{111}In (^{111}In -TLP) | - (ex vivo) | Autoradiographie | Nahrendorf et al., 2009 |
| | | MLP | Peptide | ^{111}In (^{111}In -MLP) | - (ex vivo) | Autoradiographie | Nahrendorf et al., 2009 |
| | | MCP | Peptide | ^{111}In (^{111}In -MCP) | - (ex vivo) | Autoradiographie | Nahrendorf et al., 2009 |
| | | VNP | Peptide | superparamagnétique | + | IRM | Kelly et al., 2004 |
| | | MPIO-M/K2 | Anticorps | MPIO | - (ex vivo) | IRM | McAteer et al., 2008 |
| | | Microbulles-MK2.7 | Anticorps | microbulles | + | ECUS | Kaufmann et al., 2007 |
| | | CLIO-Cy5.5-MK2.7 | Anticorps | sonde supermagnet-optique | + | IRM/Fluorescence | Tsourkas et al., 2005 |
| | | Gd-DOTA-R832 | Anticorps | Gd-DOTA | + | IRM | Burtea et al., 2009 |
| | P-Sélectine | MPIO-RB40.34 | Anticorps | MPIO | - (ex vivo) | IRM | McAteer et al., 2008 |
| | | Microbulles-RB40.34 | Anticorps | Microbulles | - (ex vivo) | ECUS | Lindner et al., 2001 |
| | | VH10-VUSPIO | Anticorps | VUSPIO | + | IRM | Jacobin-valat et al., 2010 |
| | E-Sélectine | CLIO-Fab'2(CD62E) | Anticorps | CLIO | - (in vitro) | IRM | Kang et al., 2002 |
| | Cœur nécrotique | ^{125}I -LDL | lipoprotéine | ^{125}I | + | Scintigraphie | Lees et al., 1983 |
| | Cœur nécrotique | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -LDL | lipoprotéine | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ | + | Scintigraphie | Lee et al., 1988 |
| | Cœur nécrotique | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -LDLox | lipoprotéine | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ | + | Scintigraphie | Iuliano et al., 1996 |
| Détection des lipoprotéines | Lysine-MDA | ^{125}I -MDA-2 | Anticorps | ^{125}I | - (ex vivo) | Autoradiographie | Torzewski et al., 2004 |
| | Lysine-MDA | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDA-2 | Anticorps | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ | + | Scintigraphie | Tsimikas et al., 1999 |
| | LDLox et MDA-LDL | ^{125}I -IK17 | Anticorps | ^{125}I | - (ex vivo) | Autoradiographie | Shaw et al., 2001 |
| | LDLox et MDA-LDL | micelle-Gd-MDA2 | Anticorps | Gd | | IRM | Leung K 2010 |
| Macrophages/ Monocytes | CCR2 | ^{125}I -MCP-1 | Peptide | ^{125}I | - (ex vivo) | Autoradiographie | Ohtsuki et al., 2001 |
| | CCR2 | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MCP-1 | Peptide | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ | + | SPECT (γ caméra) | Hartung et al., 2007 |
| | inflammation | ^{111}In -monocytes | cellule | ^{111}In | + | SPECT/CT | Kircher et al., 2007 |
| | Scavenger classe E (LOX1) | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anti-LOX-1 | Anticorps | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ | + | SPECT/CT | Ishino et al., 2008 |
| | Scavenger classe E (LOX1) | ^{111}In -liposome-LOX-1 antibody-Dil-F | Anticorps | ^{111}In /Fluorescence | + | SPECT/CT | Dayuan li & al., 2010 |
| | Scavenger classe E (LOX1) | Gd-liposome-LOX-1 antibody-Dil-F | Anticorps | Gd/Fluorescence | + | IRM | Dayuan li & al., 2010 |
| | CD204 (MSR A) | Immunomicelle-antiCD204-Gd | Anticorps | Gd/Fluorescence | + | IRM | Amirbekian et al., 2007 |
| | CD36 (MSR B) | (Gd)-lipid-based nanoparticles | Anticorps | Gd/Fluorescence | - (ex vivo) | IRM | Lipinski et al., 2009 |
| Métabolisme | N/A | Glucide | ^{18}F -FDG | in vivo | PET/CT | Rudd et al., 2002 | |

| Biologie | Molécule/structure/activité ciblée | Molécule ciblante | Nature du ciblant | Traceur ou NP | Imagerie in vivo | Technique d'imagerie | Référence bibliographique |
|-----------------------------------|--|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|------------------|----------------------|-----------------------------|
| Apoptose | Phosphatidylsérine | Annexine V | Peptide | ^{99m} Tc | - (ex vivo) | Autoradiographie | Kolodgie et al., 2003 |
| | | ^{99m} Tc-Annexine V | Peptide | ^{99m} Tc | + | SPECT/CT | Kietselaer et al., 2004 |
| | | ^{99m} Tc-Annexine A5 | Peptide | ^{99m} Tc | + | SPECT/CT | Isobe et al., 2006 |
| | | R826-Gd-DTPA | Peptide | Gd-DTPA | + | IRM | Burtea et al., 2009 |
| | | C2A (synaptotagmin I)-Gd-DTPA | Peptide | Gd-DTPA | - (in vitro) | IRM | Jung et al., 2004 |
| | | C2A (synaptotagmin I)-SPIO | Peptide | SPIO (superparamagnétique) | - (in vitro) | IRM | Jung et al., 2004 |
| | | Gd-DTPA-g-R826 | Anticorps | Gd-DTPA (paramagnétique) | + | IRM | Burtea et al., 2009 |
| MMP | MMP2 et MMP9 MMP2 et MMP9 MMP3 et MMP9 | Sonde-gélatinase | Peptide | sonde fluorescente | + | NIRF | Jun-o Deguchi et al., 2006 |
| | | MPI_RP805 | Peptide | ^{99m} Tc-MPI | + | SPECT/CT | Fujimoto et al., 2008 |
| | | P947 | Peptide synthétique | Gd-Peptidyl-Hydroxamic-Acid | + | IRM | Amirbekian et al, 2009 |
| Angiogénèse | αvβ3 αvβ3 ExtradomaineB- fibronectine (ED-B) ExtradomaineB- fibronectine (ED-B) Tenascin-C | Gd-DTPA-BOA-peptide | Peptidomimétique | Gd-DTPA-BOA | + | IRM | Winter et al., 2003 |
| | | ¹⁸ F-galacto-RGD | Peptide RGD | ¹⁸ F | + | PET/CT | Laitinen et al., 2009 |
| | | ¹¹¹ In-SIP(L19) | Anticorps | ¹¹¹ In-SIP(L19) | - | Autoradiographie | Matter et al., 2004 |
| | | Cy7-NHS-SIP(L19) | Anticorps | Cy7-NHS-SIP(L19) | + | NIRF | Matter et al., 2004 |
| | | ¹²⁵ I-G11 | Anticorps | ¹²⁵ I | - (ex vivo) | Autoradiographie | Von Lukowicz et al., 2007 |
| Activité plaquettaire et thrombus | α2bβ3 α2bβ3 α2bβ3/Fibrinogène Fibrine | ^{99m} Tc-P280 | Peptide | ^{99m} Tc | + | Scintigraphie | Taillefer et al., 2000 |
| | | ^{99m} Tc-P748 | Pptide | ^{99m} Tc | + | Scintigraphie | Lister-James et al., 1997 |
| | | Anti-LIBS-MPIO | Anticorps | MPIO (superparamagnétique) | - (ex vivo) | IRM | Von Zur Muhlen et al., 2009 |
| | | EP-2104R | Peptide | Gd-DTPA | + | IRM | Sirol et al., 2005 |

Tableau 3.1: Principales études dans le domaine de l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome, NP : nanoparticule.

3.9. Bibliographie

- Alsaid, H., G. De Souza, et al. (2009). "Biomimetic MRI Contrast Agent for Imaging of Inflammation in Atherosclerotic Plaque of ApoE^{-/-} Mice: A Pilot Study." Invest Radiol.
- Amirbekian, V., J. G. Aguinaldo, et al. (2009). "Atherosclerosis and matrix metalloproteinases: experimental molecular MR imaging in vivo." Radiology **251**(2): 429-38.
- Amirbekian, V., M. J. Lipinski, et al. (2007). "Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 961-6.
- Boutry, S., C. Burtea, et al. (2005). "Magnetic resonance imaging of inflammation with a specific selectin-targeted contrast agent." Magn Reson Med **53**(4): 800-7.
- Briley-Saebo, K. C., P. X. Shaw, et al. (2008). "Targeted molecular probes for imaging atherosclerotic lesions with magnetic resonance using antibodies that recognize oxidation-specific epitopes." Circulation **117**(25): 3206-15.
- Burtea, C., S. Laurent, et al. (2009). "Peptidic targeting of phosphatidylserine for the MRI detection of apoptosis in atherosclerotic plaques." Mol Pharm **6**(6): 1903-19.
- Corti, R. (2006). "Noninvasive imaging of atherosclerotic vessels by MRI for clinical assessment of the effectiveness of therapy." Pharmacol Ther **110**(1): 57-70.
- Davies, J. R., J. F. Rudd, et al. (2005). "Targeting the vulnerable plaque: the evolving role of nuclear imaging." J Nucl Cardiol **12**(2): 234-46.
- Deguchi, J. O., M. Aikawa, et al. (2006). "Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo." Circulation **114**(1): 55-62.
- Fayad, Z. A. and V. Fuster (2001). "Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque." Circ Res **89**(4): 305-16.
- Fayad, Z. A., V. Fuster, et al. (2000). "Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging." Circulation **102**(5): 506-10.
- Fayad, Z. A., T. Nahar, et al. (2000). "In vivo magnetic resonance evaluation of atherosclerotic plaques in the human thoracic aorta: a comparison with transesophageal echocardiography." Circulation **101**(21): 2503-9.
- Fujimoto, S., D. Hartung, et al. (2008). "Molecular imaging of matrix metalloproteinase in atherosclerotic lesions: resolution with dietary modification and statin therapy." J Am Coll Cardiol **52**(23): 1847-57.
- Galis, Z. S. (2004). "Vulnerable plaque: the devil is in the details." Circulation **110**(3): 244-6.
- Hartung, D., A. Petrov, et al. (2007). "Radiolabeled Monocyte Chemotactic Protein 1 for the detection of inflammation in experimental atherosclerosis." J Nucl Med **48**(11): 1816-21.
- Hay, R. V., R. M. Fleming, et al. (1991). "Nuclear imaging analysis of human low-density lipoprotein biodistribution in rabbits and monkeys." J Nucl Med **32**(6): 1239-45.
- Ishino, S., T. Mukai, et al. (2008). "Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with 99mTc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque." J Nucl Med **49**(10): 1677-85.
- Isobe, S., S. Tsimikas, et al. (2006). "Noninvasive imaging of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient and low-density-lipoprotein receptor-deficient mice with annexin A5." J Nucl Med **47**(9): 1497-505.
- Jung, H. I., M. I. Kettunen, et al. (2004). "Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin I." Bioconjug Chem **15**(5): 983-7.
- Kang, H. W., L. Josephson, et al. (2002). "Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture." Bioconjug Chem **13**(1): 122-7.

- Kaufmann, B. A., J. M. Sanders, et al. (2007). "Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1." Circulation **116**(3): 276-84.
- Kerwin, W. S., K. D. O'Brien, et al. (2006). "Inflammation in carotid atherosclerotic plaque: a dynamic contrast-enhanced MR imaging study." Radiology **241**(2): 459-68.
- Kietselaer, B. L., C. P. Reutelingsperger, et al. (2004). "Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis." N Engl J Med **350**(14): 1472-3.
- Kircher, M. F., J. Grimm, et al. (2008). "Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions." Circulation **117**(3): 388-95.
- Kolodgie, F. D., A. Petrov, et al. (2003). "Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque." Circulation **108**(25): 3134-9.
- Kooi, M. E., V. C. Cappendijk, et al. (2003). "Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging." Circulation **107**(19): 2453-8.
- Korosoglou, G., R. G. Weiss, et al. (2008). "Noninvasive detection of macrophage-rich atherosclerotic plaque in hyperlipidemic rabbits using "positive contrast" magnetic resonance imaging." J Am Coll Cardiol **52**(6): 483-91.
- Laitinen, I., A. Saraste, et al. (2009). "Evaluation of alphavbeta3 integrin-targeted positron emission tomography tracer 18F-galacto-RGD for imaging of vascular inflammation in atherosclerotic mice." Circ Cardiovasc Imaging **2**(4): 331-8.
- Lermusiaux, P., R. Martinez, et al. (2000). "[Intravascular ultrasound: limitation and prospects]." J Mal Vasc **25**(4): 229-36.
- Li, D., A. R. Patel, et al. "Molecular imaging of atherosclerotic plaques targeted to oxidized LDL receptor LOX-1 by SPECT/CT and magnetic resonance." Circ Cardiovasc Imaging **3**(4): 464-72.
- Libby, P., M. DiCarli, et al. (2010). "The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets." J Nucl Med **51** Suppl 1: 33S-37S.
- Libby, P., P. M. Ridker, et al. (2009). "Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice." J Am Coll Cardiol **54**(23): 2129-38.
- Lipinski, M. J., K. C. Briley-Saebo, et al. (2008). ""Positive contrast" inversion-recovery with ON[corrected]-resonant water suppression magnetic resonance imaging: a change for the better?" J Am Coll Cardiol **52**(6): 492-4.
- Lipinski, M. J., J. C. Frias, et al. (2009). "Macrophage-specific lipid-based nanoparticles improve cardiac magnetic resonance detection and characterization of human atherosclerosis." JACC Cardiovasc Imaging **2**(5): 637-47.
- Mani, V., K. C. Briley-Saebo, et al. (2006). "Feasibility of in vivo identification of endogenous ferritin with positive contrast MRI in rabbit carotid crush injury using GRASP." Magn Reson Med **56**(5): 1096-106.
- Matter, C. M., P. K. Schuler, et al. (2004). "Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin." Circ Res **95**(12): 1225-33.
- McAteer, M. A., N. R. Sibson, et al. (2007). "In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide." Nat Med **13**(10): 1253-8.
- Naghavi, M., P. Libby, et al. (2003). "From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II." Circulation **108**(15): 1772-8.
- Nahrendorf, M., F. A. Jaffer, et al. (2006). "Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis." Circulation **114**(14): 1504-11.
- Nahrendorf, M., E. Keliher, et al. (2009). "18F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis." JACC Cardiovasc Imaging **2**(10): 1213-22.

- Ohshima, S., A. Petrov, et al. (2009). "Molecular imaging of matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic plaques of mice deficient in apolipoprotein e or low-density-lipoprotein receptor." J Nucl Med **50**(4): 612-7.
- Ohtsuki, K., M. Hayase, et al. (2001). "Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions: an autoradiographic study." Circulation **104**(2): 203-8.
- Palinski, W., E. Miller, et al. (1995). "Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 821-5.
- Pirich, C. and H. Sinzinger (1995). "Evidence for lipid regression in humans in vivo performed by 123iodine-low-density lipoprotein scintiscanning." Ann N Y Acad Sci **748**: 613-21.
- Pourcelot, L., F. Tranquart, et al. (1999). "Ultrasound characterization and quantification of carotid atherosclerosis lesions." Minerva Cardioangiol **47**(1-2): 15-24.
- Rittersma, S. Z., A. C. van der Wal, et al. (2005). "Plaque instability frequently occurs days or weeks before occlusive coronary thrombosis: a pathological thrombectomy study in primary percutaneous coronary intervention." Circulation **111**(9): 1160-5.
- Rudd, J. H., F. Hyafil, et al. (2009). "Inflammation imaging in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(7): 1009-16.
- Rudd, J. H., E. A. Warburton, et al. (2002). "Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography." Circulation **105**(23): 2708-11.
- Ruehm, S. G., C. Corot, et al. (2001). "Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits." Circulation **103**(3): 415-22.
- Schmitz, S. A., S. E. Coupland, et al. (2000). "Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits." Invest Radiol **35**(8): 460-71.
- Shaw, P. X., S. Horkko, et al. (2001). "Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(8): 1333-9.
- Shepherd, J., S. A. Hilderbrand, et al. (2007). "A fluorescent probe for the detection of myeloperoxidase activity in atherosclerosis-associated macrophages." Chem Biol **14**(11): 1221-31.
- Signore, A., A. Annovazzi, et al. (2001). "Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy." Eur J Nucl Med **28**(10): 1555-65.
- Simon, G. H., J. Bauer, et al. (2006). "T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning." Eur Radiol **16**(3): 738-45.
- Sirol, M., V. Fuster, et al. (2005). "Chronic thrombus detection with in vivo magnetic resonance imaging and a fibrin-targeted contrast agent." Circulation **112**(11): 1594-600.
- Skajaa, T., Y. Zhao, et al. "Quantum Dot and Cy5.5 Labeled Nanoparticles to Investigate Lipoprotein Biointeractions via Forster Resonance Energy Transfer." Nano Lett.
- Sluijter, J. P., W. P. Pulskens, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms." Stroke **37**(1): 235-9.
- Stefanadis, C., L. Diamantopoulos, et al. (1999). "Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo: A new method of detection by application of a special thermography catheter." Circulation **99**(15): 1965-71.

- Taillefer, R., S. Edell, et al. (2000). "Acute thromboscintigraphy with (99m)Tc-apcitide: results of the phase 3 multicenter clinical trial comparing 99mTc-apcitide scintigraphy with contrast venography for imaging acute DVT. Multicenter Trial Investigators." J Nucl Med **41**(7): 1214-23.
- Tang, T. Y., S. P. Howarth, et al. (2009). "The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease." J Am Coll Cardiol **53**(22): 2039-50.
- Torzewski, M., P. X. Shaw, et al. (2004). "Reduced in vivo aortic uptake of radiolabeled oxidation-specific antibodies reflects changes in plaque composition consistent with plaque stabilization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2307-12.
- Tsimikas, S., W. Palinski, et al. (1999). "Radiolabeled MDA2, an oxidation-specific, monoclonal antibody, identifies native atherosclerotic lesions in vivo." J Nucl Cardiol **6**(1 Pt 1): 41-53.
- Tsimikas, S., B. P. Shortal, et al. (2000). "In vivo uptake of radiolabeled MDA2, an oxidation-specific monoclonal antibody, provides an accurate measure of atherosclerotic lesions rich in oxidized LDL and is highly sensitive to their regression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(3): 689-97.
- Tsourkas, A., V. R. Shinde-Patil, et al. (2005). "In vivo imaging of activated endothelium using an anti-VCAM-1 magneto-optical probe." Bioconjug Chem **16**(3): 576-81.
- Ueda, Y., T. Ohtani, et al. (2004). "Assessment of plaque vulnerability by angioscopic classification of plaque color." Am Heart J **148**(2): 333-5.
- Virgolini, I., P. Angelberger, et al. (1991). "Low density lipoprotein labelling characterizes experimentally induced atherosclerotic lesions in rabbits in vivo as to presence of foam cells and endothelial coverage." Eur J Nucl Med **18**(12): 944-7.
- von Lukowicz, T., M. Silacci, et al. (2007). "Human antibody against C domain of tenascin-C visualizes murine atherosclerotic plaques ex vivo." J Nucl Med **48**(4): 582-7.
- von zur Muhlen, C., K. Peter, et al. (2009). "Visualization of activated platelets by targeted magnetic resonance imaging utilizing conformation-specific antibodies against glycoprotein IIb/IIIa." J Vasc Res **46**(1): 6-14.
- Winter, P. M., A. M. Morawski, et al. (2003). "Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles." Circulation **108**(18): 2270-4.
- Winter, P. M., A. M. Neubauer, et al. (2006). "Endothelial alpha(v)beta3 integrin-targeted fumagillin nanoparticles inhibit angiogenesis in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(9): 2103-9.
- Yamamoto, M., K. Okamoto, et al. (2009). "Relationship between neointimal coverage of sirolimus-eluting stents and lesion characteristics: a study with serial coronary angiography." Am Heart J **158**(1): 99-104.
- Yuan, C., K. W. Beach, et al. (1998). "Measurement of atherosclerotic carotid plaque size in vivo using high resolution magnetic resonance imaging." Circulation **98**(24): 2666-71.
- Yuan, C., W. S. Kerwin, et al. (2002). "Contrast-enhanced high resolution MRI for atherosclerotic carotid artery tissue characterization." J Magn Reson Imaging **15**(1): 62-7.

II) Ciblage pour la thérapie

3.10. Généralités

L'hypercholestérolémie est le premier facteur de risque de l'athérosclérose. C'est une affection due à un trouble métabolique dont l'origine peut être multiple. Dans les formes monogéniques tel que l'hypercholestérolémie familiale, c'est une mutation du récepteur aux LDL qui est à l'origine de l'augmentation des taux de cholestérol associé aux LDL (**LDL-C**). Bien que la prévalence de cette affection soit faible, c'est son caractère héréditaire qui a conduit les chercheurs à comprendre la raison pour laquelle ces patients étaient plus enclins aux troubles cardiovasculaires. C'est tout d'abord Brown & Goldstein qui en 1973 ont découvert que des fibroblastes en culture, issus de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, n'étaient pas capables de lier les LDL présents dans le milieu. Ils découvrirent également que ce défaut de liaison était à l'origine de l'activité non contrôlée de l'enzyme responsable de la biosynthèse du cholestérol, l'**HMG-CoA réductase** [Goldstein et Brown, 1973][Goldstein et Brown, 1974]. Cette donnée a été ensuite reprise par Akira Endo, un chercheur japonais qui a, grâce à une pugnacité remarquable, découvert une molécule issue de *Penicillium citrinum* qui pouvait inhiber l'activité spécifique de l'HMG-CoA réductase. De là est née la mévastatine, première molécule pouvant réduire les taux de LDL-C et de ce fait prévenir les maladies cardiovasculaires. Aujourd'hui, l'efficacité des statines (en chef de file la simvastatin des laboratoires Merck, Zocor®) n'est plus à prouver ; elles sont capables de réduire jusqu'à 30% les taux de LDL-C plasmatiques et de sauver pratiquement autant de vies humaines. En cas d'élévation franche des triglycérides dans le sang, il est possible, sous certaines conditions, d'associer aux statines d'autres classes médicamenteuses comme les fibrates ou les résines.

Malgré ces avancées cruciales, c'est encore plus de 19 millions de personnes qui décèdent chaque année dans le monde suite aux complications de l'athérosclérose. Il est donc plus que nécessaire de développer de nouvelles molécules pouvant cibler spécifiquement la plaque d'athérome instable afin de la stabiliser et d'éviter sa rupture.

3.11. Ciblage du métabolisme des lipoprotéines

Les Lipoprotéines transportent les lipides (dont le cholestérol) entre les organes via le sang. L'incidence des accidents cardiovasculaires est directement liée au taux plasmatique de LDL-C et inversement liée au taux de HDL-C* (cholestérol associé aux HDL). De plus comme nous l'avons vu dans le chapitre de

l'athérogénèse, le métabolisme lipidique est fortement lié à l'initiation et la progression de la maladie. Ainsi, agir sur ce métabolisme peut être une piste sérieuse dans sa prévention ou son traitement.

3.12. Ciblage du métabolisme du cholestérol

L'origine du cholestérol est double, il peut soit être absorbé de l'alimentation et/ou réabsorbé par les entérocytes au cours de la voie entéro-hépatique (1) soit être synthétisé par le foie (2). Dans tous les cas, il est rapidement estérifié par l'enzyme **ACAT2** et incorporé dans les chylomicrons (dans les entérocytes) ou les VLDL (dans les hépatocytes) par les **MTP** (microsomal transfer protein). L'inhibition de ces deux enzymes pourrait réduire considérablement les taux de LDL-C dans le sang. De plus, l'**ACAT1** participe à la formation des cellules spumeuses dans la paroi vasculaire et constitue de fait une cible alternative (**Figure 3.18**).

Les acides biliaires sont réabsorbés dans l'iléon grâce aux transporteurs **IBAT** (ileal sodium-dependant bile acid transporter) localisés dans les membranes apicales des entérocytes. Ce transporteur est une cible intéressante, car son inhibition permettrait d'augmenter l'élimination des acides biliaires de l'organisme (**Figure 3.18**).

Le ciblage des **LPL** endothéliales (lipoprotéine lipase) serait une autre alternative thérapeutique. Cette enzyme présente à la surface des parois vasculaires a la capacité d'hydrolyser les triglycérides des chylomicrons et VLDL. Cette action conduit à la formation de molécules rémanentes et de particules IDL et LDL (**Figure 3.18**).

Les statines en tant qu'inhibiteurs de l'**HMG-CoA réductase** sont des inhibiteurs de la biosynthèse de produits stéroïdiens comme le cholestérol mais aussi de produits non stéroïdiens tels que l'Hème A, l'ubiquinone. Au contraire, l'inhibition de la **squalène synthase** permettrait d'inhiber spécifiquement la synthèse du cholestérol sans affecter les autres voies métaboliques (**Figure 3.19**) [Ugawa et al., 2000].

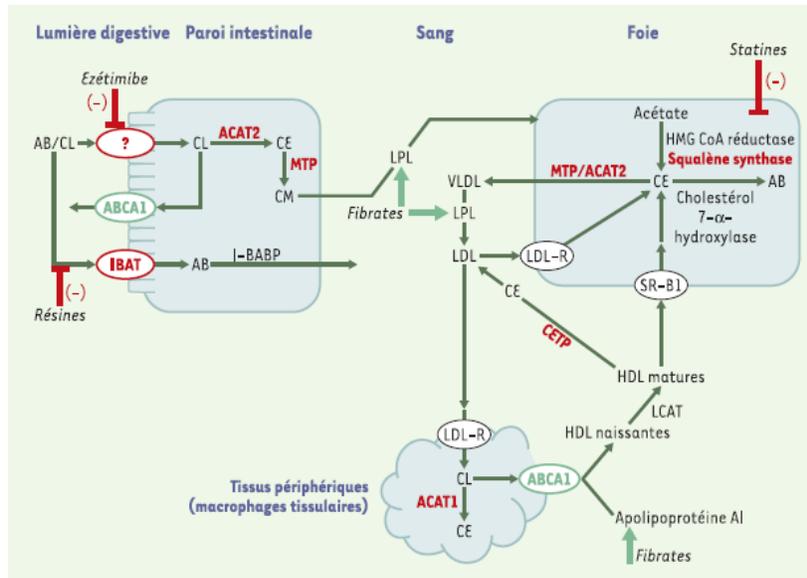


Figure 3.18 : Métabolisme du cholestérol et cibles moléculaires des médicaments contre l'athérosclérose (existants ou en développement). AB : Acides biliaires, CL : Cholestérol libre, CE : Cholestérol estérifié, ACAT : Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase, CM : Chylomicrons, MTP : Microsomal transfer protein, ABCA1 : adenosine triphosphate-binding cassette A1, LPL : lipoprotéine lipase, CETP : Cholesterol ester transfer protein, SR-B1 : Scavenger receptor class B type 1, IBAT : ileal sodium-dependent bile acid transporter, I-BABP : ileal bile acidbinding protein. Les principaux médicaments contre l'athérosclérose sont les statines (inhibiteurs d'HMG CoA réductase), les fibrates (baisse des triglycérides plasmatiques), et les résines (inhibiteurs de réabsorption des acides biliaires). D'après Morozova et Suc-Royer, 2004.

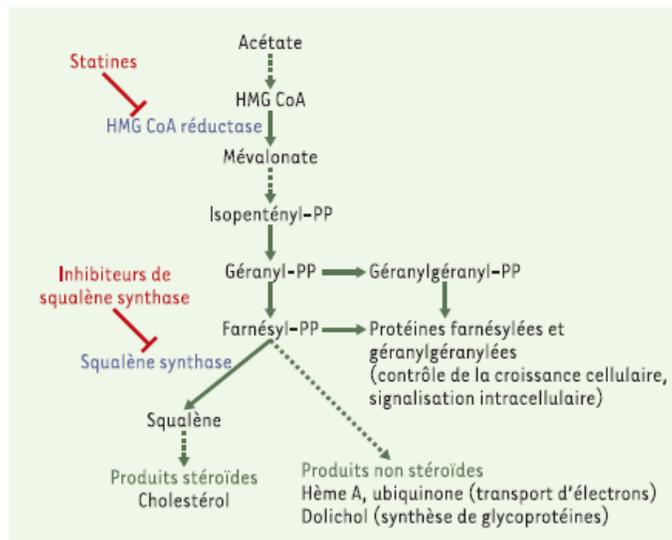


Figure 3.19 : Voie de synthèse des isoprénoïdes. Le point de départ de cette voie est l'acétate qui est converti grâce à plusieurs enzymes, dont la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) réductase, en farnésyl-pyrophosphate. Ce dernier est le point d'embranchement vers la synthèse de produits stéroïdes (cholestérol) ou de produits non stéroïdes (ubiquinone, dolichols, hème A...). La squalène synthase catalyse la première étape de la voie de synthèse spécifique des stéroïdes. PP: pyrophosphate. D'après Morozova et Suc-Royer, 2004.

3.13. Ciblage du métabolisme des LDL

Les LDL sont des lipoprotéines riches en apolipoprotéines B (apoB) et transportent le cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Une mutation de l'enzyme microsomale **MTP** responsable du transfert de cholestérol via l'apoB100 (abétalipoprotéïnémie) entraîne une réduction importante du taux de LDL dans le sang et par conséquent une diminution des affections cardiovasculaires chez ces patients. L'inhibition de cette enzyme diminuerait les taux de LDL-C dans le sang et permettrait au cholestérol présent dans le foie d'être métabolisé en acide biliaire pour son élimination sans réabsorption entéro-hépatique. Le ciblage direct de l'apoB100 a été également envisagé, soit par des approches anti-sens [Kastelein et al., 2006] soit par les techniques d'ingénierie des anticorps humains [Schiopu et al., 2004].

Dans certaines affections comme le diabète de type II (non insulino-dépendant) ou dans certaines hyperlipidémies familiales, le foie sécrète de grandes quantités de VLDL amenant à des risques accrus d'accidents cardio-vasculaires. Des chercheurs de l'université d'Helsinki ont pu déterminer l'implication d'un facteur de transcription **USF1** (Upstream stimulatory factor 1) intervenant dans la régulation de plusieurs gènes des métabolismes lipidiques et glucidiques [Komulainen et al., 2006]. Bien que très peu d'éléments soient disponibles sur le rôle exact de ce facteur de transcription, son ciblage pourrait éclaircir son mode d'action et de ce fait permettre de l'envisager comme potentielle cible thérapeutique.

Un autre élément important dans la régulation des taux de LDL-C plasmatiques est la présence de LDLR fonctionnels à la surface des hépatocytes. La mutation génétique causant l'hypercholestérolémie familiale autosomale récessive a pour base une altération du système de recyclage des LDLR, qui aboutit à une baisse du niveau d'expression de ces récepteurs à la surface hépatique, et donc à un défaut de clairance des LDL-C du sang [Garcia et al., 2001]. En réalité cette mutation touche une protéine adaptatrice possédant un domaine **PTD** (phosphotyrosine domain) capable d'interagir avec une séquence consensus **NPXY** présente dans la partie intra-cytoplasmique de plusieurs protéines, notamment des LDLR [Blaikie et al., 1994]. Une des voies thérapeutiques envisagées, serait d'activer ce système de recyclage pour la diminution des taux de LDL-C sanguins.

3.14. Ciblage du métabolisme des HDL

Les HDL sont des lipoprotéines riches en ApoA-I. Des perfusions répétées de cette apolipoprotéine chez la souris réduisent sensiblement l'athérosclérose. Bien que certaines études réalisées sur de faibles effectifs humains aient montré un effet protecteur des ApoA-I, « l'hypothèse HDL » qui consiste à penser que l'augmentation dans le sang des HDL aurait des effets thérapeutiques bénéfiques reste difficile à prouver chez l'homme du fait de rares cas cliniques déclarés. Parmi ces rares cas, citons celui d'une population japonaise possédant de forts taux de HDL-C plasmatiques. Les études menées sur cette population ont montré qu'ils portaient une mutation sur le locus du gène de la **CETP** (cholesterol ester transfer protein). Cette enzyme facilite le transfert des esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et les LDL favorisant une baisse des concentrations de HDL-C. Cet effet proathérogénique pourrait être contrecarré en l'inhibant. L'une des aventures les plus malheureuses de l'industrie pharmaceutique concerne un de ces inhibiteurs, le **torcetrapib**. Cette molécule, prometteuse sur les modèles animaux, a été stoppée lors de la phase III des essais cliniques chez l'homme et a abouti à la perte de près de 20 milliards de dollars pour la société. Le torcetrapib augmentait la pression artérielle ainsi que les concentrations d'aldostérone sanguine par une voie indépendante de celle de l'inhibition de la CETP. Il y a 6 mois, la société Japan-tobacco s'est associée avec Roche pour la mise sur le marché d'un nouvel inhibiteur de la CETP, le **Dalcetrapib** [Adis R & D profile, 2010].

A l'inverse des LDLR, il existe des récepteurs capables d'exporter et d'incorporer le cholestérol à l'apoA-I pour la production de HDL. Il s'agit des récepteurs **ABCA1**, dont la mutation engendre une maladie génétique rare qui porte le nom de la maladie de Tangier. Au cours de cette maladie, il y a peu ou pas de HDL-C plasmatiques et une accumulation de HDL dans les tissus, notamment dans le foie, les entérocytes ou dans les macrophages qui deviennent très rapidement spumeux. Cette découverte a permis de décrire un mécanisme d'efflux du cholestérol appelé le **RTC** (reverse cholestérol efflux) qui aurait pour effet la mobilisation rapide de HDL-C pour l'excrétion dans les fèces (effet anti-athérogène) (**Figure 3.20**). Bien que ABCA1 soit déterminant pour l'efflux du cholestérol, contrairement aux attentes, ce transporteur ne joue pas de rôle dans l'excrétion du cholestérol dans la bile et donc dans son élimination de l'organisme. Les analyses réalisées chez d'autres patients souffrant d'une maladie génétique rare, la xanthostérolémie, ont montré la présence de taux anormalement élevés de stérols issus de végétaux ou de cholestérol dans leurs tissus. Cette maladie a été ensuite attribuée à une mutation présente sur un hétérodimère d'ABC transporteurs, **ABCG5/ABCG8** essentiel pour l'élimination du cholestérol et autres stérols dans la bile (**Figure 3.20**). Qu'il s'agisse des récepteurs ABCA1 ou ABCG5/ABCG8, ils sont tous

deux transcrits suite à l'activation des facteurs nucléaires **LXR** (Liver X receptor) par les oxystérols (dérivés oxydatifs du cholestérol) [Venkateswaran et al., 2000a]. De manière tout à fait intéressante, un autre locus lié aux ABC transporteurs de classe G nécessite également l'activation de la voie des LXR ; il s'agit du locus codant pour le récepteur **ABCG1** [Venkateswaran et al., 2000b]. Klucken et al. ont montré que la suppression de ce récepteur résultait en une baisse significative de l'efflux d'HDL dans les macrophages [Klucken et al., 2000]. Plusieurs agonistes synthétiques des LXR ont vu le jour. Ces derniers induisent la transcription de ces ABC récepteurs mais également de plusieurs autres molécules impliquées dans la régulation du trafic des lipides, notamment le gène de l'apoE dans les macrophages et les adipocytes [Laffitte et al., 2001]. Même si ces agonistes augmentent le taux de HDL et réduisent l'athérosclérose [Joseph et al., 2002], ils augmentent considérablement la biosynthèse des lipides provoquant des stéatoses hépatiques, particulièrement dans le modèle de souris obèse db/db [Chisholm et al., 2003]. Récemment ont été décrits de nouveaux agonistes partiels pouvant sélectivement activer ABCA1 et ABCG1 et non la synthèse des lipides. Parmi eux, le **LXR-623** dont les paramètres pharmacocinétiques et dynamiques ont été testés chez des individus sains [Katz et al., 2009] et l'efficacité prouvée sur un modèle animal [Peng et al., 2008].

Des peptides mimant l'ApoA-I ont également été synthétisés. Ces derniers peuvent induire l'efflux du cholestérol et de ce fait augmenter les taux de HDL-C plasmatique [Navab et al., 2006].

Les propriétés athéroprotectrices des HDL peuvent être attribuées à la présence d'une peroxydase, la Paraoxonase (**PON**). Des souris doubles mutantes $pon^{-/-} apoE^{-/-}$ montrent une oxydation accrue des lipoprotéines dans le sérum ainsi qu'une proportion de phospholipides oxydés plus élevée dans les LDL ou IDL comparé aux souris $apoE^{-/-}$ simple KO [Shih et al., 2000]. Les HDL peuvent également agir en prévenant l'oxydation des phospholipides présents directement dans les fractions LDL grâce à l'activité des LCAT (lecithin :cholesterol acyltransferase). Cette propriété d'inactivation de l'oxydation des LDL a également été attribuée à une autre enzyme, la **PAF-AH** (PAF-acétylhydrolase) qui est associée aux HDL mais aussi aux LDL dans le plasma [Navab et al., 2001]. L'activation de ces enzymes pourrait également être bénéfique.

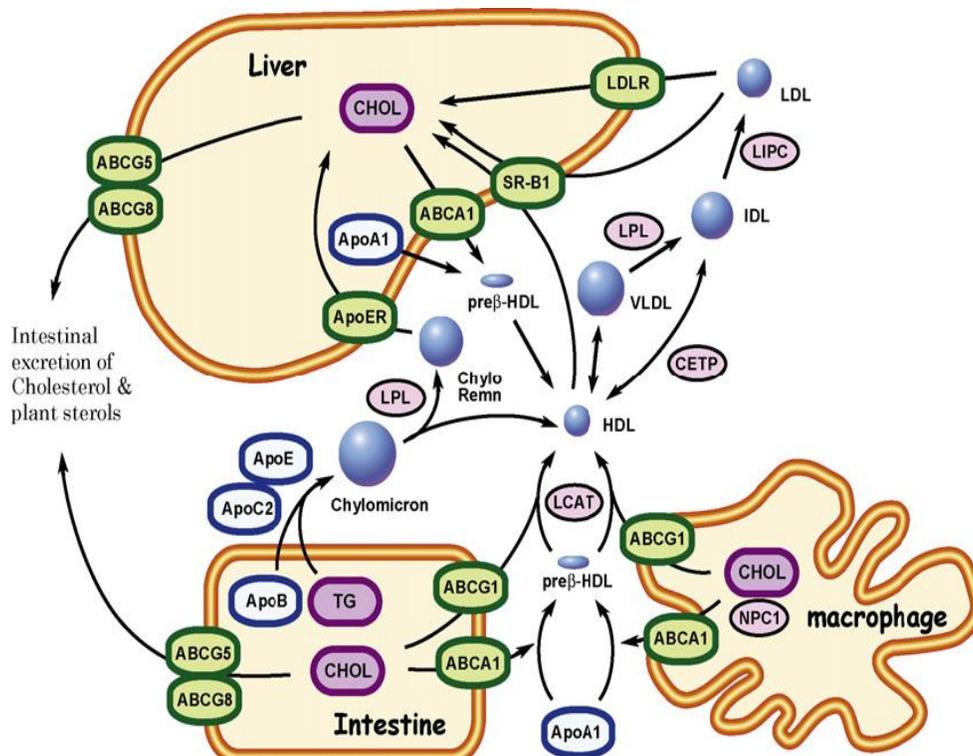


Figure 3.20 : Rôle des ABCs transporteurs dans le transport du cholestérol. D'après Fitzgerald et al., 2010.

3.15. Ciblage de l'inflammation

L'inflammation est une réponse physiologique à toute une série de stimuli, tels que les infections et les lésions tissulaires. A la suite de perturbations membranaires, les phospholipides de divers types cellulaires (par exemple les macrophages), sont dégradés en lipides biologiquement actifs. Ces lipides sont d'importants médiateurs de l'inflammation et contribuent activement au développement de l'athérosclérose.

3.15.1. Ciblage des lipides biologiquement actifs

3.15.1.1. La cyclooxygénase et dérivés prostanoides

L'acide arachidonique (AA) est un lipide provenant de la dégradation des glycérophospholipides par la phospholipase A2 (PLA2). La cyclooxygénase (Cox) est une enzyme

capable de prendre en charge l'AA pour la synthèse de dérivés prostanoidiques. La distinction entre les 2 isoformes des Cox (-1 et -2) est récente. L'aspirine est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) qui agit de façon non sélective sur les 2 isoformes. En revanche, son utilisation à faible dose journalière (75 à 300mg) permet de cibler la Cox-1 constitutive des plaquettes sanguines et de réduire les prostaglandines proathérogéniques, les thromboxanes A2 (**TXA2**). L'inhibition sélective de Cox-2 a un effet inverse. Elle augmente le risque d'athérombose. En réalité l'inhibition de Cox-2 inhibe la formation d'une autre prostaglandine, la prostacycline **PGI2** sans affecter la prostaglandine TXA2. Le ciblage thérapeutique de l'athérosclérose pourrait passer par l'utilisation d'un agoniste du récepteur de la prostacycline PGI2 ou d'un antagoniste du récepteur du thromboxane A2 TXA2, notamment le **S18886** dont les paramètres pharmacologiques sont actuellement à l'étude [Gaussem et al., 2005].

La prostaglandine E2 (**PGE2**) est générée par plusieurs enzymes dont la **PGE synthase1** (mPGES1 ou PTGES). Des expériences menées chez la souris montrent qu'il y a durant l'athérosclérose, une régulation positive du gène codant pour mPGES1, alors qu'une déficience de ce gène entraîne une baisse de la progression de la maladie avec une augmentation de la biosynthèse de PGI2 (mais pas de TXA2) [Wang et al., 2006]. Ainsi le ciblage de mPGES1 pourrait être une voie intéressante pour le traitement de l'athérosclérose. Une autre alternative serait de bloquer l'activité de PGE2 en l'empêchant de se lier à son récepteur. PGE2 peut activer 4 récepteurs : EP1, 2, 3 et 4. L'utilisation d'antagonistes **EP1** ou **EP3** pourrait avoir des effets protecteurs contre l'athérosclérose car ils sont tous deux présents à la surface des macrophages où ils ont un effet pro-inflammatoire lorsqu'ils sont activés.

3.15.1.2. La 5-Lipoxygénase et les leucotriènes

Les leucotriènes sont une autre famille de lipides biologiquement actifs dérivés de l'acide arachidonique. Les leucotriènes A4 (**LTA4**) sont générés par l'activation de la 5-lipoxygénase (5-LO) avec l'aide de la 5-LO activating protein (**FLAP**). La LTA4 peut être métabolisée par la LTA4 hydrolase en **LTB4** qui alors peut se lier et activer ses récepteurs **BLT1** et **BLT2**. Ces deux récepteurs sont exprimés sur les cellules vasculaires et les leucocytes. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs du LTB4 (BLT1 et 2) ou la délétion du gène codant pour ces récepteurs réduit le développement de l'athérosclérose chez la souris [Funk et al., 2005], indiquant ainsi que

l'inhibition de la voie 5-LO-LTB4 peut être une approche thérapeutique intéressante. Des études de génotypage des promoteurs du gène *ALOX5AP* (codant pour FLAP) montrent la présence d'un polymorphisme associé à l'apparition de plaques carotidiennes [Dwyer et al., 2004]. Actuellement, l'inhibition de FLAP est en essai clinique pour le traitement de l'athérosclérose (par ex. indole **MK-886** et **BAY X1005**, pour lesquels les essais de phase I et II ont été réalisés) [Evans et al., 2008].

3.15.2. Les phospholipides oxydés

Les acides gras insaturés sur la position sn-2 des phospholipides sont plus enclins à l'oxydation dans les parois vasculaires. Navab et al. ont montré que ces phospholipides oxydés ont une activité pro-inflammatoire et de ce fait sont hautement athérogènes [Navab et al., 2000]. L'identification des enzymes de la paroi vasculaire pouvant augmenter le stress oxydatif et donc la peroxydation des lipides paraît tout à fait primordial pour des applications thérapeutiques de l'athérosclérose. Parmi ces enzymes, citons les lipoxygénases, les NADPH oxydases et les myéloperoxydases qui sont actuellement des cibles à l'étude pour la thérapie. [Nicholls et al., 2009][Madamanchi et al., 2005].

La famille des **PLA2 sécrétées** (particulièrement les groupes IIa, V et X) a été impliquée dans l'athérogénèse [Webb et al., 2005]. Les PLA2 peuvent également s'associer aux LDL pour former des lipoprotéines hautement athérogènes, les **Lp-PLA2** [Macphee et al., 2006]. Ces molécules sont capables de cliver les phospholipides et les phospholipides oxydés pour libérer des molécules pro-inflammatoires telles que le PAF ou des lipides oxydés. L'inhibition de PLA2 sécrétée et de la Lp-PLA2 est en développement clinique [Macphee et al., 2006][Fujioka et al., 2009].

Les phospholipides oxydés peuvent entraîner une réponse immunitaire bénéfique. L'immunisation de modèles murins d'athérosclérose avec des LDLox améliore l'athérogénèse. De façon plus surprenante, des souris LDL^{-/-} immunisées avec *Streptococcus pneumonia*, montrent une production significative d'anticorps pouvant réduire la taille des plaques d'athérome [Binder et al., 2003]. Cette réponse bénéfique est dirigée par des anticorps présentant une homologie parfaite avec des auto-anticorps développés chez des souris athéromateuses d'isotype IgM: les **anticorps T15**. Ces anticorps sont des anticorps naturels, produits sans immunisation préalable, protecteurs dans l'invasion de différents pathogènes car spécifiques de la phosphorylcholine. Le clonotype T15 peut inhiber

l'accumulation des phospholipides modifiés dans les macrophages. Les études de cette équipe illustrent un phénomène important de l'immunité innée qui est le phénomène de « molecular mimicry » entre des pathogènes et des antigènes du soi altéré. Les LDLox sont un exemple d'épitopes altérés suite à un stress oxydatif, rencontré au cours de situations physiologiques comme l'apoptose ou pathologiques comme l'athérosclérose.

L'immunisation avec des LDLox entraîne la production de l'IL5 qui active les cellules B pour la sécrétion de T15 [Sempi, 2008]. Chez l'homme les concentrations de LDLox mesurées à l'aide de T15 sont corrélées à la présence de lipoprotéines(a) ou **Lp(a)** (un facteur de risque cardiovasculaire indépendant ayant une fonction inconnue) [Tsimikas et al., 2005][Bergmark et al., 2008].

3.16. Ciblage des cellules impliquées dans l'athérogénèse

L'inflammation, présente à tous les stades de la maladie, est initiée par l'expression à la surface endothéliale de plusieurs molécules d'adhérences, elles même induites par une modification du flux sanguin dans les artères. Le recrutement des cellules immunitaires est massif et contribue, de par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, au développement de la maladie.

3.16.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ont un rôle crucial dans le recrutement et la migration sous-endothéliale des leucocytes durant le développement de l'athérosclérose. Sous certaines conditions, ces cellules exposent plusieurs molécules d'adhérence de surface comme les **VCAM-1**, **ICAM** ou **P-sélectine**. De plus, l'expression du gène codant pour le **CD44**, exprimé par les cellules T mémoires, est augmentée durant l'athérogénèse et la délétion de ce gène entraîne une réduction du recrutement des monocytes dans la lésion [Cuff et al., 2001]. Il est à noter que l'anticorps humanisé anti-CD44, le **Bivatuzumab**, est utilisé dans le traitement des cancers tête et cou avec métastases.

De ce fait, le blocage d'une ou de plusieurs molécules de surface pourrait être une stratégie effective pour réduire la formation des lésions athéromateuses. Récemment un nouvel inhibiteur de l'expression de la P-sélectine a vu le jour, le **PSI-697**. Cette molécule d'origine chimique a montré une inhibition *in vitro* de l'association de la P-sélectine avec son ligand PSGL-1 de l'ordre du micromolaire. De plus des

expérimentations *in vivo* dans un modèle murin d'athérosclérose montre une réduction significative de l'inflammation et de la thrombose [Bedard et al., 2008].

Un autre rôle important des cellules endothéliales est leur capacité à détecter la moindre variation dans le changement de flux au sein des vaisseaux. Lorsque le flux est laminaire, les cellules endothéliales expriment un faible taux de molécules d'adhérence ; en revanche cette production est augmentée quand le flux devient turbulent. La compréhension de la signalisation intracellulaire ainsi que l'identification des récepteurs sensibles à ces changements est d'un grand intérêt. De nouvelles études ont montré que le **kruppel-like factor 2** (KLF-2) détient un rôle central dans le mécanisme de mécanotransduction du signal en régulant la réponse transcriptionnelle lors d'une modification de la dynamique du fluide. Un des effets pleïotropes des statines est d'induire l'expression du Kruppel-like factor 2 et de ses cibles dans les cellules endothéliales, révélant de fait l'intérêt de son ciblage [Parmar et al., 2006].

3.16.2. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques

Le recrutement des monocytes dans l'intima et leur différenciation en macrophages est un élément important du processus de développement de la lésion athéroscléreuse. Ce recrutement est rendu possible grâce à la libération locale de chémokines telle que CCL2 (MCP-1) qui interagissent avec les récepteurs CCR2 monocytaires.

Selon les marqueurs de surface qu'elles arborent, plusieurs populations de monocytes ont pu être identifiées. Des chercheurs ont montré que seuls les monocytes Ly-6C^{hi}, CX3CR1^{low}, Gr-1^{hi} et CCR2 pouvaient coloniser la plaque d'athérome où elles se différencient ensuite en macrophages chez la souris [Swirski et al., 2007][Tacke et al., 2007]. Une application thérapeutique pourrait donc être envisagée en inhibant sélectivement le recrutement d'une population de monocytes au sein de la paroi vasculaire tout en évitant les conséquences d'une inhibition totale de l'activité monocytaire.

Les récepteurs **TLR** (Toll-like receptors) présents à la surface des macrophages sont aussi bien impliqués dans la réponse immune microbienne que dans le développement de l'athérosclérose. L'activation de ces récepteurs entraîne une différenciation rapide des monocytes en macrophages et cellules dendritiques pour l'initiation de l'inflammation [Krutzik et al., 2005]. De plus, des souris hyperlipidémiques déficientes pour TLR2 [Mullick et al., 2005], TLR4 [Michelsen et al., 2004] ou pour l'adaptateur MyD88 [Bjorkbacka et al., 2004] ont des lésions plus restreintes que les souris témoins. De

façon intéressante, l'expression de TLR4 est augmentée par les LDLox, ce qui suggère un effet synergique entre l'hypercholestérolémie et l'infection microbienne [Liu et al., 2008]. De récentes recherches ont montré que l'activation des récepteurs LXR peut inhiber l'activité des TLR9 et ainsi ralentir la formation des cellules spumeuses [Sorrentino et al., 2010]. De ce fait, le ciblage direct des TLR ou indirect (via LXR) pourrait être une voie envisageable pour la thérapie de l'athérosclérose.

3.17. Protéases et apoptose

La rupture de la plaque est associée à la dégradation des composants de la matrice extracellulaire par des protéases tels que les MMPs dont l'expression est augmentée dans les régions enclines à la rupture. Les **MMP9**, produites par les macrophages, sont les plus représentées dans les plaques. Leur surexpression chez des souris ApoE^{-/-} entraîne inexorablement la rupture des plaques du tronc brachiocéphalique [Gough et al., 2006]. Les **cathepsines** sont une autre classe de protéases, également impliquées dans la rupture. Ce sont des enzymes lysosomiales actives à pH acide mais qui conservent la capacité de cliver l'élastine et le collagène à pH neutre. Des souris déficientes en cathepsine présentent une augmentation des composants de la matrice extracellulaire tout en réduisant la probabilité des plaques à la rupture [Liu et al., 2004]. L'inhibition de l'activité de ces enzymes pourrait ainsi renforcer la plaque et de fait réduire les risques de rupture.

La présence de cellules apoptotiques au sein des lésions augmente la probabilité de rupture de plaque. De même, il a été montré que l'augmentation du recrutement des leucocytes au sein des plaques était corrélée à l'augmentation du nombre de cellules nécrotiques ou en apoptose [Tabas, 2005]. Des études menées chez un modèle de souris d'athérosclérose, montrent que l'apoptose des macrophages est due au stress engendré par le peroxysome et la signalisation via plusieurs récepteurs incluant les récepteurs scavenger de classe A et TLR4 des macrophages. Cette voie d'induction de l'apoptose passerait par l'activation de Jun-amino-terminal-kinase (**JNK**) [Seimon et al., 2006] qui pourrait être une cible privilégiée dans le traitement de l'athérosclérose.

3.18. PPAR α : Un récepteur nucléaire « magique » ?

Les fibrates sont des agonistes des récepteurs **PPAR α** (Peroxisome proliferator-activated receptors). Ils sont couramment utilisés en clinique pour la diminution des taux de triglycérides sanguins et l'augmentation de concentrations de HDL. L'inactivation de ce gène chez la souris entraîne une altération des enzymes liées au métabolisme des acides gras et leur oxydation [Aoyama et al., 1998]. Des études ont montré qu'ils régulaient l'activité d'une enzyme de la β oxydation, l'acyl-CoA oxydase qui, au cours de son activité, génère du peroxyde d'hydrogène [Kersten et al., 1999].

Le rôle intégral des PPAR α dans l'oxydation des acides gras, suppose à ces récepteurs nucléaires un rôle dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines. Les souris PPAR $\alpha^{-/-}$ montrent de faibles concentrations de HDL-C sanguines mais de forts taux en triglycérides. Ainsi, PPAR α est aussi bien impliqué dans le métabolisme des HDL en induisant l'expression de l'apoA-I que dans celui des lipoprotéines riches en triglycérides, en induisant l'activité des LPL [Lee et al., 2003]. Ces diverses actions de PPAR α sont en parfaites adéquation avec les effets cliniques observés chez l'homme.

D'autres études montrent que PPAR α peut également avoir un rôle dans la régulation de l'inflammation [Plutzky, 2003]. En effet, l'administration de fibrate à des patients atteints d'hyperlipémie modérée diminue les concentrations plasmatiques d'IL-6, de fibrinogène et de CRP (C-reactive protein) [Delerive et al., 1999]. De plus, l'administration de fibrates chez des patients atteints d'hyperlipoprotéinémie de type IIb, diminue les taux plasmatiques de TNF α (tumor necrosis factor α) et d'IFN γ (interféron γ) [Madej et al., 1998]. L'administration des fibrates chez l'animal montre une réduction significative de l'expression des VCAM-1 [Marx et al., 1999] et de MCP-1 [Pasceri et al., 2001] avec une réduction des lésions athéroscléroses [Zadelaar et al., 2006] en agissant sur la répression de NF κ B [Delerive et al., 2000]. D'autres effets protecteurs des PPAR α ont également été décrits. Ainsi, l'activation de ces récepteurs peut réprimer le facteur tissulaire et ainsi réduire la thrombose [Marx et al., 2001] ou induire l'expression du gène ABCA1 pour l'efflux du cholestérol des macrophages [Chinetti et al., 2001].

Ce récepteur nucléaire apparaît comme le « centre névralgique » de plusieurs voies métaboliques impliquées dans l'athérogenèse, l'obésité et le diabète. L'ensemble de ces propriétés confère à PPAR α un intérêt thérapeutique particulièrement intéressant pour le traitement de l'athérosclérose (**Figure 3.21**).

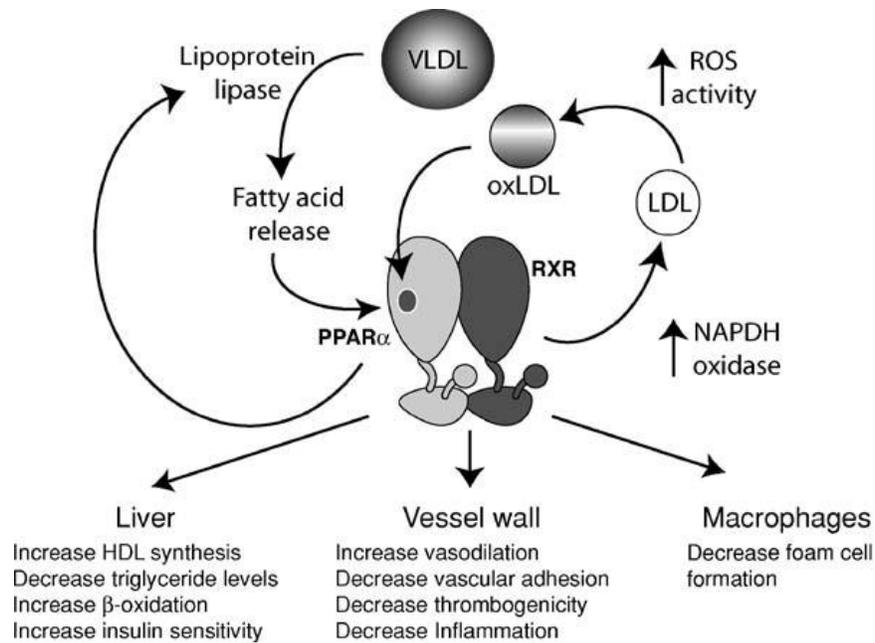


Figure 3.21: Modulation of lipid metabolism and inflammatory genes by PPAR α . Synthetic ligands, such as fibrates, can activate PPAR α . As for endogenous ligands, it is hypothesized that fatty acids released from triglyceride-rich lipoproteins, such as VLDL, can activate PPAR α , which would in turn increase LPL expression/activity and continue releasing more ligands from triglyceride-rich lipoproteins. Additionally, PPAR α can also generate its own ligand by increasing NADPH oxidase expression and LDL oxidation. When activated, PPAR α can exert its effects on different tissues affecting insulin sensitivity, lipoprotein synthesis and metabolism, β -oxidation, vasodilation, inflammation, and cholesterol efflux. D'après Li and Palinski, 2006.

3.19. Conclusion

Bien que de grands progrès aient été réalisés ces dernières années pour la prévention de l'athérosclérose, elle reste toujours la principale cause de mortalité dans nos sociétés. Les stratégies actuelles qui visent à modifier les taux de LDL-C, n'apportent pas de solution thérapeutique à l'ensemble des patients. Des études plus fines des mécanismes physiologiques impliqués sont donc à poursuivre pour proposer de nouvelles approches thérapeutiques. Des médicaments qui empêcheraient l'accumulation de cholestérol ou diminueraient l'inflammation directement au niveau de la paroi vasculaire pourraient réduire efficacement la progression de la pathologie. Par ailleurs, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques à l'aide de la technique du phage display *in vivo* pourrait apporter un nouveau souffle dans la discipline. De tels peptides ou anticorps pourraient agir directement sur les plaques d'athérome afin d'en réduire l'instabilité. Récemment un peptide agissant sur le récepteur de l'IL-4 [Hong et al., 2007] ou un anticorps agissant sur le récepteur de IL-1 β (Xoma, Berkeley, CA) ont été

sélectionnés par phage display, et sont en cours d'investigation pour leur capacité à réduire l'inflammation au sein des plaques d'athérome.

3.20. Bibliographie

- Aoyama, T., J. M. Peters, et al. (1998). "Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)." J Biol Chem **273**(10): 5678-84.
- Bedard, P. W., V. Clerin, et al. (2008). "Characterization of the novel P-selectin inhibitor PSI-697 [2-(4-chlorobenzyl)-3-hydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[h] quinoline-4-carboxylic acid] in vitro and in rodent models of vascular inflammation and thrombosis." J Pharmacol Exp Ther **324**(2): 497-506.
- Bergmark, C., A. Dewan, et al. (2008). "A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma." J Lipid Res **49**(10): 2230-9.
- Binder, C. J., S. Horkko, et al. (2003). "Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL." Nat Med **9**(6): 736-43.
- Bjorkbacka, H., V. V. Kunjathoor, et al. (2004). "Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways." Nat Med **10**(4): 416-21.
- Blaikie, P., D. Immanuel, et al. (1994). "A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors." J Biol Chem **269**(51): 32031-4.
- Brown, M. S., S. E. Dana, et al. (1973). "Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(7): 2162-6.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1974). "Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(3): 788-92.
- Chinetti, G., S. Lestavel, et al. (2001). "PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway." Nat Med **7**(1): 53-8.
- Chisholm, J. W., J. Hong, et al. (2003). "The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse." J Lipid Res **44**(11): 2039-48.
- Cuff, C. A., D. Kothapalli, et al. (2001). "The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation." J Clin Invest **108**(7): 1031-40.
- Delerive, P., P. Gervois, et al. (2000). "Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators." J Biol Chem **275**(47): 36703-7.
- Dwyer, J. H., H. Allayee, et al. (2004). "Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis." N Engl J Med **350**(1): 29-37.
- Evans, J. F., A. D. Ferguson, et al. (2008). "What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases." Trends Pharmacol Sci **29**(2): 72-8.
- Filardo, E. J., P. C. Brooks, et al. (1995). "Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo." J Cell Biol **130**(2): 441-50.
- Fitzgerald, M. L., Z. Mujawar, et al. "ABC transporters, atherosclerosis and inflammation." Atherosclerosis **211**(2): 361-70.

- Fujioka, D. and K. Kugiyama (2009). "Novel insights of secretory phospholipase a(2) action in cardiology." Trends Cardiovasc Med **19**(3): 100-3.
- Garcia, C. K., K. Wilund, et al. (2001). "Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein." Science **292**(5520): 1394-8.
- Gaussem, P., J. L. Reny, et al. (2005). "The specific thromboxane receptor antagonist S18886: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies." J Thromb Haemost **3**(7): 1437-45.
- Gough, P. J., I. G. Gomez, et al. (2006). "Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice." J Clin Invest **116**(1): 59-69.
- Joseph, S. B., E. McKilligin, et al. (2002). "Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7604-9.
- Kastelein, J. J., M. K. Wedel, et al. (2006). "Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B." Circulation **114**(16): 1729-35.
- Katz, A., C. Udata, et al. (2009). "Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants." J Clin Pharmacol **49**(6): 643-9.
- Kersten, S., B. Desvergne, et al. (2000). "Roles of PPARs in health and disease." Nature **405**(6785): 421-4.
- Klucken, J., C. Buchler, et al. (2000). "ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 817-22.
- Komulainen, K., M. Alanne, et al. (2006). "Risk alleles of USF1 gene predict cardiovascular disease of women in two prospective studies." PLoS Genet **2**(5): e69.
- Krutzik, S. R., B. Tan, et al. (2005). "TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells." Nat Med **11**(6): 653-60.
- Laffitte, B. A., J. J. Repa, et al. (2001). "LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 507-12.
- Lee, C. H., P. Olson, et al. (2003). "Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors." Endocrinology **144**(6): 2201-7.
- Li, A. C. and W. Palinski (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 1-39.
- Liu, J., G. K. Sukhova, et al. (2004). "Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1359-66.
- Liu, Y., H. Yu, et al. (2008). "TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target." Med Hypotheses **70**(2): 314-6.
- Macphee, C. H., J. Nelson, et al. (2006). "Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and its potential as a therapeutic target." Curr Opin Pharmacol **6**(2): 154-61.
- Madamanchi, N. R., A. Vendrov, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(1): 29-38.
- Madej, A., B. Okopien, et al. (1998). "Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb." Int J Clin Pharmacol Ther **36**(6): 345-9.
- Marx, N., N. Mackman, et al. (2001). "PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes." Circulation **103**(2): 213-9.
- Michelsen, K. S., T. M. Doherty, et al. (2004). "Role of Toll-like receptors in atherosclerosis." Circ Res **95**(12): e96-7.
- Morozova, S., I. Suc-Royer, et al. (2005). "[Cholesterol metabolism modulators in future drug therapy for atherosclerosis]." Med Sci (Paris) **21 Spec No**: 53-8.
- Mullick, A. E., P. S. Tobias, et al. (2005). "Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2." J Clin Invest **115**(11): 3149-56.

- Navab, M., G. M. Anantharamaiah, et al. (2006). "Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3**(10): 540-7.
- Navab, M., J. A. Berliner, et al. (2001). "HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(4): 481-8.
- Nicholls, S. J. and S. L. Hazen (2009). "Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis." J Lipid Res **50** Suppl: S346-51.
- Parmar, K. M., H. B. Larman, et al. (2006). "Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2." J Clin Invest **116**(1): 49-58.
- Pasceri, V., J. S. Cheng, et al. (2001). "Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs." Circulation **103**(21): 2531-4.
- Peng, D., R. A. Hiipakka, et al. (2008). "Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." J Pharmacol Exp Ther **327**(2): 332-42.
- Plutzky, J. (2003). "The potential role of peroxisome proliferator-activated receptors on inflammation in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis." Am J Cardiol **92**(4A): 34J-41J.
- Schiopu, A., J. Bengtsson, et al. (2004). "Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis." Circulation **110**(14): 2047-52.
- Seimon, T. A., A. Obstfeld, et al. (2006). "Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19794-9.
- Sorrentino, R., S. Morello, et al. "The activation of liver X receptors inhibits toll-like receptor-9-induced foam cell formation." J Cell Physiol **223**(1): 158-67.
- Staels, B., J. Dallongeville, et al. (1998). "Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism." Circulation **98**(19): 2088-93.
- Swirski, F. K., P. Libby, et al. (2007). "Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata." J Clin Invest **117**(1): 195-205.
- Tabas, I. (2005). "Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(11): 2255-64.
- Tacke, F., D. Alvarez, et al. (2007). "Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques." J Clin Invest **117**(1): 185-94.
- Tsimikas, S., E. S. Brilakis, et al. (2005). "Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease." N Engl J Med **353**(1): 46-57.
- Ugawa, T., H. Kakuta, et al. (2000). "YM-53601, a novel squalene synthase inhibitor, reduces plasma cholesterol and triglyceride levels in several animal species." Br J Pharmacol **131**(1): 63-70.
- Venkateswaran, A., B. A. Laffitte, et al. (2000). "Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12097-102.
- Venkateswaran, A., J. J. Repa, et al. (2000). "Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols." J Biol Chem **275**(19): 14700-7.
- Wang, M., A. M. Zukas, et al. (2006). "Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14507-12.
- Webb, N. R. (2005). "Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis." Curr Opin Lipidol **16**(3): 341-4.
- Zadelaar, A. S., L. S. Boesten, et al. (2006). "Dual PPARalpha/gamma agonist tesaglitazar reduces atherosclerosis in insulin-resistant and hypercholesterolemic ApoE*3Leiden mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(11): 2560-6.

Ingénierie des anticorps et « Phage Display » : Emergence des anticorps humains dans les biopharmaceutiques

Chapitre 4 : Ingénierie des anticorps et « Phage Display » : Emergence des anticorps humains dans les biopharmaceutiques

1) Les Anticorps

4.1. Généralités

Les anticorps monoclonaux (Acm) et leurs dérivés connaissent de nos jours un essor considérable dans les domaines de la biotechnologie et des biopharmaceutiques. En un peu plus de vingt ans, plus de 30 immunoglobulines (IgG) et dérivés ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM), dans des indications thérapeutiques très variées (oncologie, inflammation, auto-immunité, transplantation, angioplastie, hématologie, ophtalmologie, infections virales et allergie) [Beck et al. 2009].

Beaucoup d'entre eux ont bouleversé la prise en charge des patients atteints de ces pathologies quelquefois invalidantes. Il est à noter qu'un seul biomédicament a été proposé pour les pathologies cardiovasculaires, le Reopro, spécifique de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. A l'inverse de cette diversité dans les Acm en développement, le nombre de cibles validées est minime. Il en est de même pour le diagnostic non invasif de l'athérosclérose. La plupart des nano-objets ciblant sont élaborés contre des molécules classiquement données comme surexprimées dans les différentes phases de la pathologie, comme l'activation endothéliale, l'inflammation ou l'apoptose... Partir de données physiopathologiques bien établies et de cibles bien identifiées, et s'employer à développer les anticorps les plus adaptés, reste une approche sûre et qu'il faut poursuivre sans pour autant oublier que les données récoltées sur la plaque d'athérome restent minimes et qu'il faut encore s'employer à rechercher de nouveaux marqueurs plus pertinents que ceux déjà listés. C'est dans ce cadre que la recherche internationale évolue. Alors que certaines équipes se sont attelées à décrire un listing impressionnant de protéines constituant les plaques d'athérome sans pour autant en définir la pertinence [Bagnato et al. 2007], notre équipe a choisi de développer une approche innovante et originale qui consiste à mieux anticiper le choix des cibles potentielles par une approche de phage-display *in vivo*. La cible que l'on va identifier par cette technologie est désignée *in vivo* par le fragment d'anticorps lui-même qui prend en compte à la fois la liaison à l'antigène (spécificité, affinité, internalisation...) et la représentativité et accessibilité de la cible. La part d'innovation apportée par cette stratégie de criblage, déjà expérimentée par notre équipe sur un modèle animal d'athérosclérose [Robert et al. 2006], peut être encore renforcée en utilisant différents

répertoires d'anticorps susceptibles par exemple de reconnaître non seulement des cibles extracellulaires mais aussi intracellulaires (Cf partie Résultats).

Dans cette partie, je vais tout d'abord introduire les anticorps, puis j'aborderai la technologie du phage display et plus précisément sa composante *in vivo* ; son potentiel ainsi que son utilisation pour la découverte de nouveaux agents pour l'imagerie ou la thérapie.

4.2. Les Immuglobulines (Ig)

4.2.1. Structure protéique

Grâce à l'analyse par diffraction des rayons X de cristaux d'anticorps (Ac) libres ou complexés à leur antigène, la structure tridimensionnelle des Ig et les acides aminés impliqués dans ces interactions sont aujourd'hui élucidés (**Figure 4.1**). Les Ac ou Ig sont des glycoprotéines formées de deux catégories de chaînes polypeptidiques, les chaînes légères (L pour light) κ ou λ et les chaînes lourdes (H pour heavy) au nombre de neuf chez l'homme : μ ; δ ; $\gamma 1$; $\gamma 2$; $\gamma 3$; $\gamma 4$; $\alpha 1$; $\alpha 2$ et ξ . C'est le type de chaîne lourde qui définit la classe et la sous-classe de l'Ig.

Ces molécules sont symétriques, de structure $(H_2L_2)_n$, n variant de 1 (pour les IgM membranaires, IgD, IgG, IgE, IgA monomériques) à 2, 3 ou 4 (IgA dimériques ou polymériques) ou même 5 pour les IgM plasmatiques. L'élément de base de ces chaînes est le domaine immunoglobuline que l'on retrouve dans un grand nombre de protéines appartenant à la superfamille des Ig. Chaque domaine est formé d'une chaîne polypeptidique de 110 AA organisée en deux feuillets β plissés et stabilisés par un pont disulfure intra-chaîne nécessaire à leur repliement et donc à l'activité de l'anticorps. Les chaînes (L) κ et λ sont formées de deux domaines, un domaine variable ($V\kappa$ ou $V\lambda$) et un domaine constant ($C\kappa$ ou $C\lambda$). Les chaînes H comportent un domaine variable (VH) et 3 (δ , γ , α) ou 4 (μ , ξ) domaines constants CH (Constant). Au niveau de chaque domaine variable VH ou VL , on note la présence de 3 zones hypervariables ou régions déterminant la complémentarité (**CDR** pour complementary determining regions). Le paratope (zone sur l'Ig reconnaissant l'épitope sur l'antigène) est formé de ces zones hypervariables, elles même séparées par des régions plus conservées (dites régions charpentes ou framework, **FR**). Les régions C-terminales des domaines CL et $CH1$ possèdent une cystéine qui va permettre la liaison covalente des chaînes lourdes et légères par un pont disulfure inter-chaîne.

La zone située entre les domaines $CH1$ et $CH2$ des chaînes lourdes est appelée région charnière (région hinge) et assure la flexibilité de l'anticorps. Elle constitue une zone de clivage pour certaines enzymes

protéolytiques comme la papaïne et la pepsine. Cette région possède deux cystéines qui vont former deux nouveaux ponts disulfures inter-chaînes. La région constante (**Fc pour Fragment cristallisable**) est formée par les domaines constants CH2 et CH3, elle est responsable des fonctions effectrices de l'anticorps par interaction avec **C1q**, le premier composé impliqué dans la cascade du complément ou par liaison avec les récepteurs Fc présents sur les leucocytes. Ces liaisons sont fortement dépendantes du profil de glycosylation de l'anticorps. Tous les anticorps contiennent des chaînes oligosaccharidiques à des positions conservées et principalement au niveau de la région Fc. L'Asn292 au niveau du CH2 d'une IgG par exemple porte un core de base glycosylé sur lequel viennent se greffer d'autres résidus. Ce profil est primordial pour lier le C1q et les récepteurs Fc. Des expériences ont montré que la suppression de ces sucres modifiait de manière drastique les fonctions effectrices.

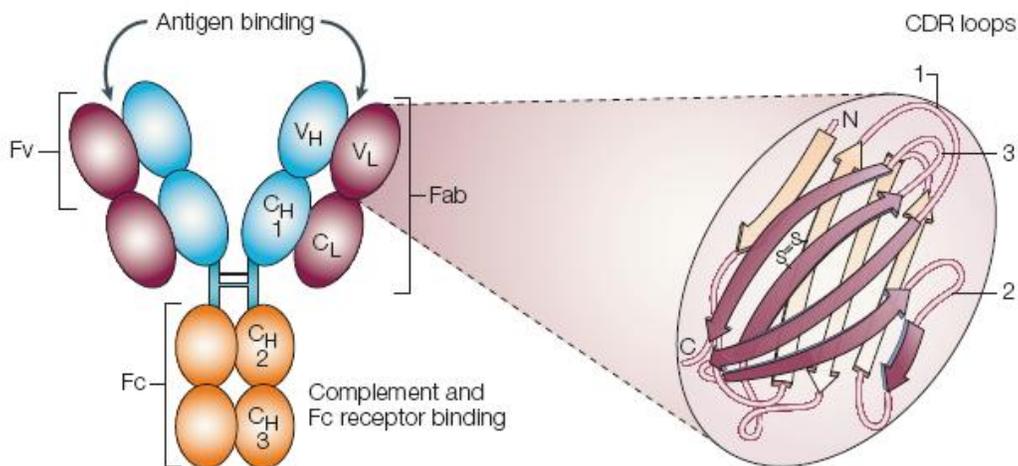


Figure 4.1 : Structure d'une immunoglobuline avec son domaine globulaire de 110 acides aminés. D'après Henrik Brekke et Inger Sandlie, 2002.

4.2.2. Structure génétique

Ce n'est qu'au regard de l'organisation des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères et de leur réarrangement au cours de la maturation des cellules B qu'il est possible d'expliquer l'incroyable diversité des anticorps.

4.2.2.2.1. Locus IgH, IgK et IgL

Les locus des gènes codant les chaînes H et les chaînes L sont situés sur des chromosomes différents. Le locus des chaînes lourdes est situé en 14q32.23, le locus des chaînes légères κ en 2p12 et le locus λ , en 22q11.2. Chaque locus d'Ig est composé de plusieurs dizaines

de gènes V, appartenant à différentes familles de séquence homologue, et un nombre limité de segments de diversité D (23 segments D uniquement pour les chaînes lourdes), de segments de jonction (6 J_H, 5 J_κ, 4 à 5 J_λ) et de gènes constants (9 C_H, 1 C_κ, 4 C_λ). Ce nombre élevé de gènes V, D et J est le premier élément expliquant la diversité des anticorps.

4.2.2.2. Réarrangement et mise en place de la diversité

Tonegawa a montré que les gènes des chaînes H et L ont une organisation différente dans les cellules B et les autres cellules de l'organisme. Ces expériences sur le réarrangement des gènes d'immunoglobuline lui ont valu le prix nobel de médecine en 1987 [Tonegawa et al. 1983]. Il s'agit en fait d'un mécanisme de recombinaison entre les segments V, D et J pour les chaînes lourdes, et V et J pour les chaînes légères qui s'opère durant la différenciation de la cellule B. Les différents segments se réarrangent entre eux aléatoirement par recombinaison. Ce deuxième mécanisme est appelé diversité combinatoire. Deux autres mécanismes viennent encore accroître cette diversité: (1) la diversité jonctionnelle qui correspond à une recombinaison imprécise et à l'ajout d'un nombre variable (de 1 à 20) de nucléotides par une deoxyribonucléotidyl transférase entre les segments D-J et V-DJ, (2) des hypermutations somatiques propres aux cellules B induites lors de la réponse secondaire. Ces mécanismes sont résumés dans la **Figure 4.2**.

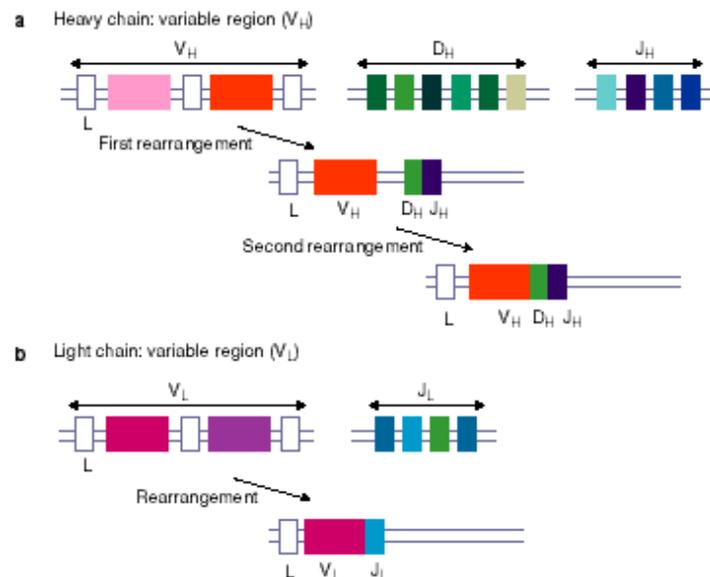


Figure 4.2 : Représentation schématique de l'organisation et du réarrangement des gènes d'immunoglobuline durant la différenciation des cellules B. D'après Hoogenboom 2005.

4.2.3. Format des anticorps

Tous les anticorps ont une structure de base identique, et contiennent des domaines protéiques qui peuvent être séparés après digestion par des enzymes protéolytiques ou directement obtenus par les technologies de l'ADN recombinant. Ces manipulations aboutissent à des formats d'anticorps aux propriétés très variées. Quelques-uns de ces formats, les plus répandus, sont illustrés dans la **figure 4.3**. L'immunoglobuline d'isotype G est majoritaire dans l'organisme. Il s'agit d'une molécule dimérique capable de fixer deux antigènes. Nous avons déjà vu que la partie **Fc** lui confère des fonctions effectrices, notamment cytotoxiques par interaction avec le complément ou les récepteurs FcγR. Néanmoins, dans un grand nombre d'applications, notamment en imagerie, les fonctions effectrices deviennent indésirables. Grâce à l'ingénierie des anticorps, il est possible aujourd'hui de générer différents formats de fragments d'anticorps mieux adaptés aux applications souhaitées et facilement manipulables [Holliger et al. 2005]. Toutefois, les fragments d'anticorps tels que les **Fv** (domaine VH associé à un domaine VL) sont rarement utilisés car très peu stables. Au contraire, les **scFv** (Single chain fragment variable) possèdent entre le domaine VH et VL un peptide de liaison (linker) permettant d'apporter une meilleure stabilité à la molécule. Cette dernière forme est particulièrement intéressante, du fait de sa petite taille (en moyenne 30 kDa), de sa bonne capacité à pénétrer les tissus [Chames et Baty, 2009]. De par leur format monovalent, les scFv montrent assez fréquemment des constantes de dissociation rapides et des temps de rétention faibles sur l'antigène ciblé. Pour pallier ce problème, des vecteurs permettant de fusionner deux fragments scFv à la surface d'un Fc sont utilisés [Moutel et al. 2009]. Ceci a pour effet d'augmenter l'avidité du scFv pour sa cible. Une autre alternative est l'utilisation des **VHH**, qui représentent les plus petits domaines variables découverts à ce jour susceptibles de reconnaître les antigènes avec de bonnes spécificités et affinités. Les VHH sont des fragments dérivés des anticorps simples chaînes découverts chez les camélidés (chameau, lama...). Ils sont composés d'une simple chaîne VH non associée à une chaîne VL et de ce fait, lient leur cible par un seul domaine variable. Par ailleurs leurs séquences en acides aminés sont très homologues à celles des VH humains de type III, ouvrant de fait à ces anticorps des perspectives intéressantes en thérapie humaine comme on le verra ultérieurement au cours de ce chapitre [Chames et Baty, 2009].

Les différents formats et combinaisons proposés sont illimités ; ils offrent aujourd'hui des possibilités de traitement et d'imagerie élégantes et parfaitement adaptées à des pathologies comme les cancers, les maladies inflammatoires auto-immunes, bactériennes et virales.

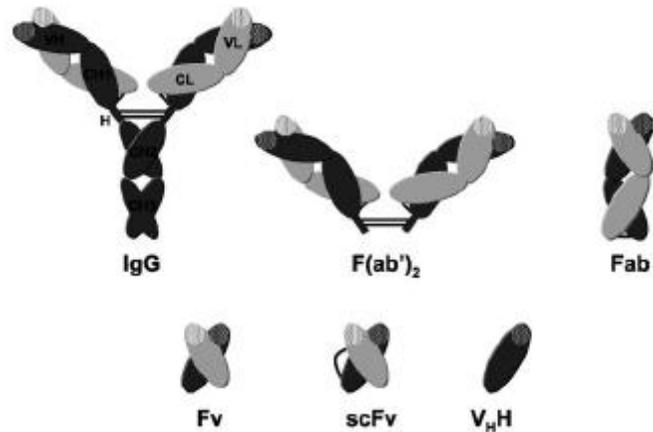


Figure 4.3 : Différents formats d'anticorps. D'après Baty et Chames, 2006.

4.3. Les Anticorps et la thérapie

La mise en évidence de lignées cellulaires de type B produisant des anticorps de nature identique dans certaines pathologies prolifératives (myélome en l'occurrence), permit en 1975 à MILSTEIN et KOHLER (prix Nobel de médecine et physiologie en 1984) de faire une découverte historique avec la mise au point d'une technique permettant la production « infinie » *in vitro* d'anticorps murins dit monoclonaux à l'aide de cellules B immortalisées [Kohler et al. 1975]. Dès lors, un grand nombre d'anticorps monoclonaux murins dérivés de cette technologie, dite **des hybridomes**, a été développé en tant qu'outil de diagnostic *in vitro* et en recherche. Malheureusement, peu de ces anticorps ont été utilisés comme agents thérapeutiques. En effet, les anticorps monoclonaux murins présentent un inconvénient majeur qui limite fortement leur utilisation *in vivo* chez l'homme : ils sont immunogènes, induisant une réponse immunitaire de type **HAMA** (human anti-mouse antibody) [Hwang et al. Methods 2005]. Pour contourner ce problème, les chercheurs ont dû faire appel aux technologies de l'ADN recombinant. C'est ainsi que l'ingénierie des anticorps a vu le jour avec la construction d'anticorps chimériques dans un premier temps, humanisés dans un second temps et aujourd'hui entièrement humains (**Figure 4.4**).

4.3.1. Les anticorps chimériques

L'idée consiste ici à fusionner les parties VH et VL d'un anticorps murin de spécificité et d'affinité connues aux régions constantes d'un anticorps humain (Morrison et al. 1984). La molécule obtenue contient 70% de séquences humaines et présente une immunogénicité fortement réduite. Le premier

anticorps chimérique approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 1994 est le ReoPro, anticorps anti- α IIb β 3 utilisé pour prévenir les complications thrombotiques survenant lors d'angioplasties. Néanmoins, au cours d'études portant sur des patients ayant bénéficié de ces thérapeutiques, l'origine immunologique des thrombocytopenies qui se développent 7 à 12 jours après le début de la prise de la drogue lors d'une première cure ou à la suite d'injections répétées, a pu être démontrée [Nurden, 2004][Clofent-Sanchez et al. 2007][Lajus et al. 2009]. Les anticorps humains développés *in vivo*, sont dirigés contre les parties murines de la drogue ou contre un néoépitope formé à la surface de l'intégrine suite à la fixation du Reopro.

4.3.2. Les anticorps humanisés

Pour minimiser encore l'immunogénicité, seules les régions CDRs d'un anticorps murin impliquées dans la liaison avec l'antigène sont conservées et greffées au sein de régions charpentes humaines. L'anticorps est alors à 95% humain [Jones et al. 1986]. Néanmoins, ces techniques d'humanisation sont d'une part très lourdes et des réactions immunes de type **HABA** (Human Anti-Humanized Antibody) ont là encore été décrites [Hwang et Foote, 2005].

4.3.3. Les anticorps recombinants humains

Il y a deux manières de produire des anticorps totalement humains. La première consiste à les faire synthétiser par des souris transgéniques [Bruggemann et al. 1989]. Chez ces souris, les loci impliqués dans la synthèse des anticorps murins ont été inactivés et remplacés par les gènes humains présents sur des chromosomes artificiels, les YAC (Yeast Artificial Chromosome). Après immunisation de la souris, les loci humains sont capables de se réarranger et de subir des mutations somatiques conduisant à des anticorps de très haute affinité. La seconde technique, plus simple et plus rapide, est la technique du phage display (voir section II du chapitre).

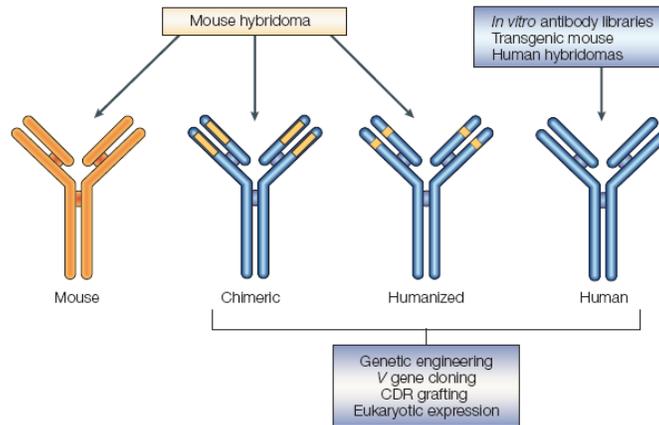


Figure 4.4 : Les anticorps chimériques. D'après Henrik Brekke et Inger Sandlie, 2002.

Les différentes catégories d'Acm précédemment cités sont injectées aux patients soit par voie intraveineuse, péritonéale ou sous cutanée pour une pathologie donnée. Une autre perspective pour l'immunothérapie est l'utilisation des Intrabodies [Nizak et al. 2003][Moutel et Perez, 2009][Goenaga et al. 2007]. Le format scFv est le plus couramment utilisé pour les intrabodies. Ces fragments sont sous-clonés dans des vecteurs modifiés pour permettre une expression intracellulaire dans les cellules de mammifères. Ainsi, ces anticorps intracellulaires ou intrabodies ont été appliqués à l'étude et à la perturbation de l'activité de protéines cellulaires et ce dans une optique soit de recherche fondamentale soit thérapeutique. Cependant certains problèmes pour leur utilisation en immunothérapie devront être résolus tel que la maîtrise de leur dégradation après leur expression intracellulaire.

4.4 Les anticorps utilisés en imagerie ou en thérapie

Le choix du format d'anticorps ainsi que son origine murine, chimérique, humanisée ou entièrement humaine est fonction de son application finale, par exemple, les anticorps murins peuvent être utilisés pour des applications en imagerie médicale sous condition qu'ils ne soient pas administrés à plusieurs reprises, tel que pourrait l'être un anticorps dédié à la thérapie. La petite taille des formats d'anticorps tels que les scFv ou les Fab sont également bien adaptés pour une utilisation en imagerie. Ces formats pénètrent mieux les tumeurs solides et sont rapidement éliminés par voie rénale contrairement aux anticorps entiers. Aujourd'hui seulement 6 anticorps tous d'origine murine sont autorisés sur le marché. Parmi ces anticorps, on peut citer 3 anticorps entiers (**Satumomab**, **Capromab** et le **Fanolesomab**) et 3 fragments d'anticorps (**Arcitumomab**, **Nofetumomab** et le **Sulesomab**) tous utilisés en imagerie nucléaire. L'administration de radiotraceurs rend obligatoire l'utilisation d'anticorps à courte demi-vie.

Ainsi, les Fragments Fab ont une demi-vie de 7h et sont aisément utilisés dans ce sens. Contrairement à l'imagerie, les anticorps utilisés en immunothérapie sont administrés à plusieurs reprises et doivent de ce fait, ne pas entraîner de réponses immunitaires. Pour cette application, les anticorps sont préférentiellement chimériques, humanisés voire entièrement humains. Un autre élément important est la capacité de ces anticorps à activer une réponse cytotoxique. Les sous classes d'IgG1 et 3 sont les mieux adaptées. Elles se fixent aux récepteurs **FcγRIII** présents à la surface de cellules effectrices, notamment les cellules NK (Natural Killer) entraînant un phénomène de cytotoxicité à médiation cellulaire ou **ADCC** (*antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*). Un anticorps thérapeutique peut également soit neutraliser sa cible soit activer le complément par un phénomène appelé **CDC** (*Complement-dependent cytotoxicity*). Le format d'IgG apparaît d'autant plus intéressant lorsqu'on sait que sa demi-vie est d'environ 3 semaines. En effet, grâce aux récepteurs FcRn, les IgG peuvent être recyclées et exposées à la surface cellulaire. Ainsi, ceci souligne l'importance du fragment Fc dans le prolongement de la demi-vie des IgG. L'absence de ce fragment Fc ou l'origine murine (moindre affinité) expliquent en partie la faible demi-vie de l'**Abciximab** (Fab) et du **Muromomab** (IgG murine) comparée à celle des autres anticorps monoclonaux chimériques ou humanisés tel que le **Trastuzumab** (une IgG1k humanisée prescrite contre le traitement du cancer du sein).

II) La technologie du « phage-display »

4.5. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, l'immonogénicité des anticorps murins, puis chimériques et humanisés est longtemps restée un facteur limitant leur administration chez l'homme. Mais l'obtention d'anticorps entièrement humains est très difficile par la technique des hybridomes, ainsi que leur production *ex vivo* par des lymphocytes immortalisés, prélevés chez des patients « naturellement immunisés » [Laroche-Traineau et al. 1994]. Il est aujourd'hui possible de mimer le système immunitaire *in vitro* et ainsi de générer plusieurs millions d'entités différentes grâce à la construction de banques combinatoires de gènes variables humains, entités qui peuvent être exprimées à la surface d'organismes tels que des phages filamenteux.

Toute la puissance de cette biotechnologie réside dans le lien qui est créé au sein d'un même organisme entre le génotype (la séquence codant pour le fragment d'anticorps) et le phénotype (le fragment d'anticorps exprimé, spécifique d'un antigène donné).

4.6. Principe

Le phage display consiste à présenter à la surface de phages filamenteux des peptides aléatoires, des protéines, ou des fragments d'anticorps (scFv, Fab ou Fv). Cette technique a été initialement mise au point par Georges Smith en 1985 où il présenta à la surface de phages filamenteux des peptides fusionnés aux protéines du manteau viral [Smith, 1985]. Ensuite, c'est John McCafferty qui, en 1990, présenta à la surface d'un phage des fragments d'anticorps [McCafferty et al. 1990]. Depuis, plusieurs banques combinatoires comprenant jusqu'à plusieurs millions de combinaisons différentes ont vu le jour et, en quelques années seulement, cette technique est devenue un outil incontournable pour la sélection de biopharmaceutiques innovants. Elle a permis la sélection d'inhibiteurs enzymatiques [Bratkovic et al. 2005][Lunder et al. 2005] d'agonistes ou antagonistes de polypeptides [Bonetto et al. 2005], la sélection d'anticorps dirigés contre des virus tel que le VIH-1 [Miller et al. 2005] mais encore bien d'autres applications que cela soit dans le domaine thérapeutique, d'imagerie moléculaire ou de la recherche fondamentale. Un des anticorps qui a rencontré le plus de succès et qui provient d'une sélection par phage display est l'adalimumab (HUMIRA) : un anticorps entièrement humain dirigé contre les récepteurs du TNF α et prescrit contre la polyarthrite rhumatoïde, le rhumatisme psoriasique ou la maladie de crohn. Aujourd'hui, 20% des biopharmaceutiques en phase de développement clinique sont des anticorps monoclonaux, ce qui les porte en seconde position après les vaccins [Brekke et Sandlie, 2002]

4.7. Biologie des phages filamenteux

4.7.1. Structure du phage M13

Les bactériophages M13 et fd ou phages filamenteux font partie de la famille de virus non lytiques qui infectent les bactéries gram négatives telles que E.Coli. Ils possèdent, un génome circulaire d'ADN simple brin, encapsidé dans un long tube flexible de nature protéique. Le phage M13 possède un diamètre de 6.5 nm et une longueur qui dépend de la taille de son génome. Classiquement, il est constitué d'un filament d'ADN simple brin (ssDNA : single strand DNA) d'environ 6500 nucléotides encapsidé par 5 types de protéines du manteau. La g8p (ou pVIII) est majoritaire avec plusieurs milliers

de copies par phage, les quatre autres sont présentes à raison de 5 par phage, la g7p (pVII) et la g9p (pIX) d'un côté de la particule et la g3p (pIII) et la g6p (pVI) de l'autre côté (**Figure 4.5**).

Bien que ces 5 protéines assurent la stabilité de la structure phagique, seule la g3p est nécessaire à la reconnaissance et à l'infection de la cellule hôte via son extrémité N-terminale. Cette g3p, protéine de 406 résidus est prioritairement utilisée pour la fusion avec des peptides ou anticorps. Elle contient 2 domaines distincts (N1 et N2) séparés par 2 chaînes riches en Glycine. Les 2 domaines N1 et N2 interagissent entre eux et forment une boucle. En revanche, en présence d'un pilus bactérien, ces 2 domaines se séparent et le domaine N1 interagit avec la protéine bactérienne TolA et N2 avec le pilus. Le domaine N-terminal initie la translocation de l'ADN viral dans *E.coli*. Enfin, le domaine C-terminal permet la fixation de la g3p à la capsidie par interaction avec les autres protéines du phage (**Figure 4.6**). Du fait de la faible quantité de pili à la surface bactérienne et de la faible superficie permettant un bon contact avec la particule phagique, il est nécessaire d'utiliser des bactéries cultivées en phase de croissance exponentielle afin d'augmenter la probabilité de rencontre entre les 2 protagonistes.

4.7.2. Cycle d'amplification

Le génome du phage M13 contient onze gènes, 5 codent pour les protéines de la capsidie, les autres codent pour les protéines nécessaires à la réplication et l'assemblage de la particule virale. Dans la cellule hôte, le ssDNA est converti en DNA double brin ou dsDNA (double strand DNA). Dans un premier temps cet ADN sert à la production des protéines du phage, en particulier d'une ADN polymérase virale. Cette polymérase permet la production de l'ADN simple brin par un mécanisme répliatif appelé « rolling circle ». Ainsi, les composants des nouvelles particules sont accumulés dans la bactérie.

Avant l'assemblage des particules de phages, les protéines de la capsidie sont insérées dans la membrane interne avec leur séquence N-terminale dans le périplasme et leur séquence C-terminale dans le cytoplasme. D'autres protéines du phage forment un pore à travers la membrane interne et la membrane externe et, par un mécanisme non connu, l'ADN viral est expulsé à travers ce pore. L'assemblage du phage est initié par l'incorporation de la g7p et de la g9p à une extrémité de la particule. Le processus d'élongation suit alors par assemblage de quelques milliers de molécules g8p pour former un tube englobant la molécule d'ADN simple brin. Le processus est terminé par l'addition de

g6p et de la g3p à l'autre extrémité du tube. La particule assemblée est alors expulsée à l'extérieur de la cellule (**Figure 4.7**).

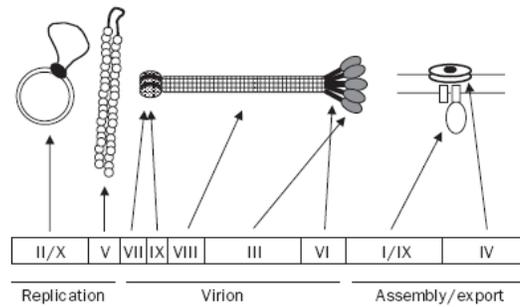


Figure 4.5 : Phage filamentueux f1 (M13/fd), numérotation et produit des gènes codants. D'après Russel article paru dans l'ouvrage : "Phage display: a practical approach Par Tim Clackson, Henry B. Lowman".

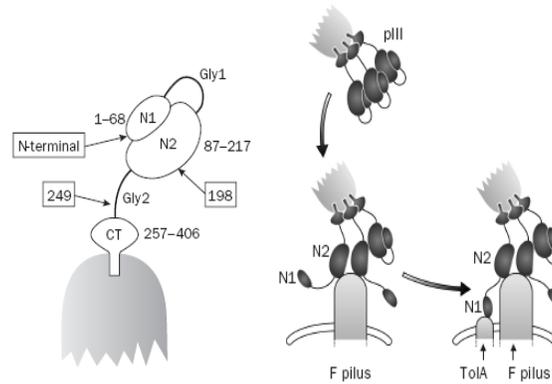


Figure 4.6 : Structure de la g3p ainsi que son fonctionnement. D'après Russel article paru dans l'ouvrage : "Phage display: a practical approach Par Tim Clackson, Henry B. Lowman".

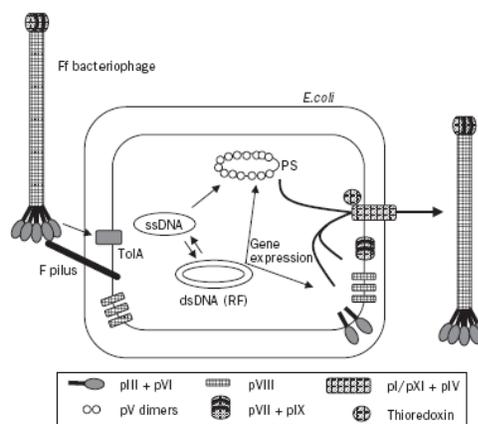


Figure 4.7 : Cycle d'amplification d'un phage filamentueux f1 (M13/fd). D'après Russel article paru dans l'ouvrage : "Phage display: a practical approach Par Tim Clackson, Henry B. Lowman".

4.8. Les Protéines d'enveloppe pour l'expression de banques

Les cinq protéines de la capsid du phage M13 peuvent être utilisées comme support de présentation pour l'expression de banques de peptides ou de protéines à la surface des particules de phages. Des vecteurs viraux qui permettent l'expression des protéines g7p et g9p associées par leur N-terminal à une protéine ou un peptide d'intérêt ont ainsi été construits. Dans le cas de la protéine g6p, les constructions de chimère sont effectuées en C-terminal de la protéine. Cependant, l'utilisation des protéines g8p et g3p semble plus efficace.

La g8p est la protéine majeure du phage, et est présente à raison de 2700 copies par phage. La protéine à exprimer est fusionnée au niveau de la région N-terminal de la g8p entre le peptide signal et le début de la protéine mature. Toutefois, seuls des peptides de courte taille (6-8 acides aminés) peuvent être exprimés en raison de la restriction de taille imposée par les contraintes géométriques d'assemblage de ces sous unités lors de la formation de la capsid. De plus, la présence de nombreuses copies de la protéine chimère à la surface du phage induit la formation d'interactions multiples entre les peptides exprimés par les phages et l'antigène cible utilisé pour le criblage. Cet effet d'avidité favorise la sélection de clones qui expriment des peptides présentant une affinité faible pour la cible.

La g3p présente à raison de 3 à 5 copies à l'extrémité du phage, est la protéine de choix pour l'expression des banques. Son utilisation permet l'expression de protéines plus grosses, et offre un large choix de vecteurs appropriés. Ainsi, la protéine minoritaire des phages filamenteux est largement utilisée pour présenter des peptides aléatoires, des polypeptides codés par des ADNc, mais également des anticorps « simple chaîne » (Fv, scFv), ou encore des anticorps sous format Fab.

Les techniques développées pour la présentation de fragments d'anticorps font généralement intervenir deux protagonistes : un vecteur de type phagemide et un phage auxiliaire (ou helper) M13 nécessaire à la réplication et à l'empaquetage des particules phagiques.

4.9. Les phagemides et phages auxiliaires

Un phagemide est un plasmide contenant en plus de son origine de réplication propre (ColE1 ori), une origine de réplication de phage (M13 ori) (**Figure 4.8**). Le gène de la protéine de fusion g3p-scFv est sous le contrôle d'un promoteur bactérien régulé par l'opéron lactose. Deux étiquettes ont été rajoutées en

aval du gène du scFv (Tags c-myc et 6-His) et un codon ambre a été placé en aval des Tags pour une expression sous forme soluble du scFv (non fusionné à la g3p) lorsque le vecteur est incorporé dans une souche non suppressive.

Dans la bactérie, le phagemide se réplique comme un plasmide normal. Mais lors d'une infection de la bactérie par un phage avec une origine de répllication mutée (défaillante) appelé « phage helper », l'ADN du phagemide est amplifié et encapsidé dans la particule de phage à la place de l'ADN viral sauvage. Le phage helper fournit toutes les protéines nécessaires pour l'assemblément du phage. La particule virale recombinante présente à la fois la protéine g3p sauvage et la g3p chimère codée par le phagemide. Chaque capsid ne contient qu'une seule molécule d'ADN. Du fait de la déficience de l'origine de répllication du phage helper, l'ADN encapsidé est préférentiellement l'ADN du phagemide. Les particules virales recombinantes ainsi formées permettent la transmission du phagemide à d'autres bactéries par infection mais ne permettra pas la propagation du phagemide sous sa forme virale en l'absence du « phage helper ». L'utilisation d'un vecteur de type phagemide permet la production de particules virales présentant à la fois des copies de la g3p sauvage et de la g3p chimère à leur surface. Cette astuce permet de cloner des fragments d'ADN de grande taille sans altérer les capacités d'infection du phage et en réduisant le nombre de copies de la g3p chimère à la surface. Elle permet aussi de limiter les effets d'avidité qui diminuent l'efficacité des criblages.

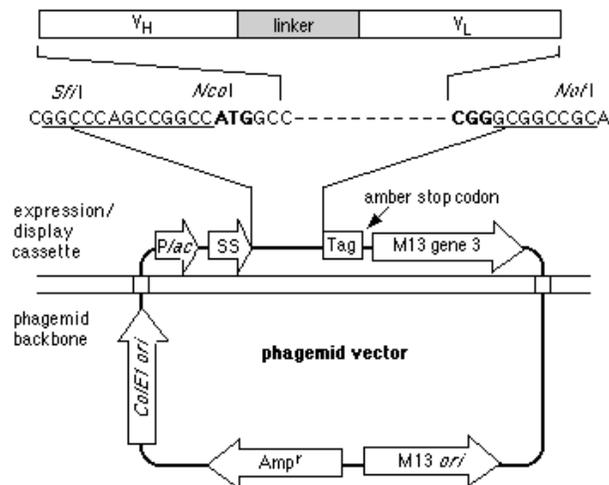


Figure 4.8: Vecteur phagemide (pCANTAB5E). Les séquences nucléotidiques des scFv sont insérées entre de sites de restriction NcoI et NotI. ColE1 ori : origine de répllication bactérienne, M13 ori : origine de répllication phagique, Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline, , *plac* : promoteur inductible, SS : séquence signal. Tag : étiquette (c-myc, 6-his...), M13 gene 3 : g3p. D'après Itai Benhar, Yoram Reite, 2002.

4.10. Les banques d'anticorps

4.10.1. Les banques combinatoires

La construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps humains est résumée dans la **figure 4.9** et reflète le répertoire naturel des lymphocytes B humains [McCafferty et al. 1990]. Ces banques d'anticorps sont dérivées des gènes réarrangés V(D)J d'immunoglobulines humaines obtenus de l'ARNm extrait de cellules lymphocytaires B. L'ARNm va être rétrotranscrit en ADNc grâce à l'utilisation d'oligonucléotides définis selon les gènes VH et VL du répertoire germinale permettant d'amplifier les gènes réarrangés [Welschof et al. 1995][Barbie et al. 1998][Pallares et al. 1998][Pallares et al. 1999]. Les gènes des régions variables VH et VL sont amplifiés séparément, pour être ensuite assemblés en utilisant un fragment d'ADN (linker) s'hybridant sur la partie 3' du gène de la chaîne lourde et la partie 5' du gène de la chaîne légère. Le gène ainsi assemblé est alors amplifié par PCR avec un jeu d'amorces permettant l'introduction de sites de restriction pour le clonage ultérieur dans le phagemide. L'ADN est cloné « en masse » dans le vecteur et introduit dans des bactéries *E.Coli* électrocompétentes par électroporation. Le clonage et la transformation des bactéries sont des étapes cruciales, car elles influencent directement la taille de la banque. La qualité de la banque peut être contrôlée en vérifiant sa diversité. L'ADN de clones pris au hasard va être digéré par des enzymes comme BstNI ou RsaI, et le profil de digestion contrôlé sur gel d'agarose. Des profils de digestion distincts devront être obtenus pour conclure à la diversité de la banque. En fonction de la provenance des cellules B pour l'extraction d'ARNm on va distinguer plusieurs types de banques.

4.10.2. Les banques immunes

Dans ces banques, les gènes variables VH et VL sont issus de l'ARNm d'IgG de cellules B de patients immunisés. On comprend dès lors que l'utilisation de ces banques est restreinte et limitée à certaines cibles. Il est en effet difficile pour des raisons éthiques évidentes d'immuniser un patient contre un antigène déterminé. Il faut ainsi s'adresser à des individus « naturellement » immunisés de par la pathologie développée. Le cas des maladies auto-immunes est particulièrement intéressant pour l'étude du répertoire immunitaire des patients [Chapal et al. 2001] [Jacobin et al. 2002]. Ce type de banque a permis d'isoler des anticorps humains de très haute affinité (10^{-8} - 10^{-9} M).

4.10.3. Les banques naïves

Les gènes variables VH et VL sont ici issus de l'ARNm d'IgM de cellules B de patients non immunisés [Vaughan et al. 1996][Little et al. 1999]. Ces banques sont antigène-indépendantes et donnent accès à une large diversité d'anticorps. Elles peuvent être criblées contre n'importe quel antigène. Cependant, les anticorps isolés à partir de banques naïves présentent en général une faible affinité, comparable à celle obtenue lors de la réponse immunitaire primaire (10^{-6} - 10^{-7} M). Ces banques naïves présentent un autre inconvénient, à savoir qu'elles ne permettent pas d'isoler des anticorps dirigés contre les antigènes du soi, or ces derniers représentent des cibles de choix en thérapeutique. Ajoutons à cela qu'énormément d'anticorps sont toxiques pour la bactérie ou alors produits à des taux très faibles (cette remarque est aussi valable pour les banques immunes). Ces problèmes ont été résolus avec la création de banques humaines synthétiques construites *in vitro*.

4.10.4. Les banques synthétiques ou semi-synthétiques

La spécificité des anticorps réside dans les six régions CDR (complementarity determining regions) qui forment le site de liaison à l'antigène (paratope). La région CDR3 de la VH est la plus variée en composition mais aussi en longueur, faisant d'elle la zone centrale du paratope. Les premières banques semi-synthétiques consistaient seulement à introduire des CDR3H aléatoires au sein de segments VH [Barbas et al. 1993a]. Des banques semi-synthétiques de plus grande taille ont ensuite été construites en introduisant également des CDR3L aléatoires au sein de segments VL [Barbas et al. 1993b].

Des banques entièrement synthétiques ont été également réalisées en introduisant des mutations dans les 6 régions hypervariables simultanément et ce en utilisant des jeux d'oligonucléotides chevauchants qui permettent l'extension de gènes entiers dans les conditions de PCR [Hayashi et al. 1994]. Les régions CDRs sont de ce fait synthétisées de manière totalement aléatoire. Les effets négatifs imposés par les CDRs aléatoires sur la structure des anticorps ont, par la suite, été minimisés en conservant les résidus canoniques de chaque CDR [Cobaugh, 2008][Soderlind et al. 1995][Soderlind et al. 2001].

Il est ensuite apparu qu'il était aussi crucial d'optimiser la qualité des anticorps présentés par le phage. Les régions CDRs aléatoires ont de ce fait été insérées dans des charpentes d'anticorps connues

pour leurs propriétés thermodynamiques correctes et pour leur grande représentativité au sein de la réponse immune, comme les régions germinales DP-47 et DPL-3 [Soderlind et al. 2000]. L'équipe de Knappik a développé une banque où les régions charpentes consensus ont été définies puis assemblées avec les régions CDR *in vitro* [Knappik et al. 2000]. Ce type de banque permet d'obtenir un fort taux d'expression et d'éviter les phénomènes d'agrégation.

Plus récemment, une nouvelle banque semi-synthétique entièrement humaine a vu le jour. Cette banque est basée sur l'armature d'un scFv humain (scFv13R4) et sur des régions CDR3 H et L semi-aléatoires dans la mesure où elles respectent la distribution des acides aminés à chaque position des régions hypervariables humaines. L'avantage du scFv13R4 est qu'il adopte une conformation tridimensionnelle correcte dans le cytoplasme des bactéries et dans celui des cellules de mammifères (cellules HeLa), autorisant une expression optimale de scFv fonctionnels (**Figure 4.10**) [Philibert et al. 2007].

La banque présente une diversité de $1,5 \times 10^9$ fragments scFvs. Elle est construite à partir de 13 sous-librairies VH et 5 sous-librairies VL de façon à mimer la diversité naturelle rencontrée dans les régions hypervariables CDR3 humaines. Dix-huit oligonucléotides dégénérés spécifiques des régions CDR3 des VH et VL ont été élaborés à partir de 3 banques de données (Kabat database, IMGT/LIGM-DB database et Protein data bank) en vue de conserver la distribution des acides aminés à des positions précises dans les régions CDR3 humaines. Ceci a pour but d'éviter les réactions immunitaires éventuelles. Un autre avantage de cette banque est l'élimination de tous les clones scFvs comportant des codons STOP ou des décalages du cadre de lecture. Pour cela, les gènes codant les scFvs ont été au préalable fusionnés au gène rapporteur CAT (Chloremphenical Acetyl Transférase) de façon à ne conserver que les scFvs fonctionnels.

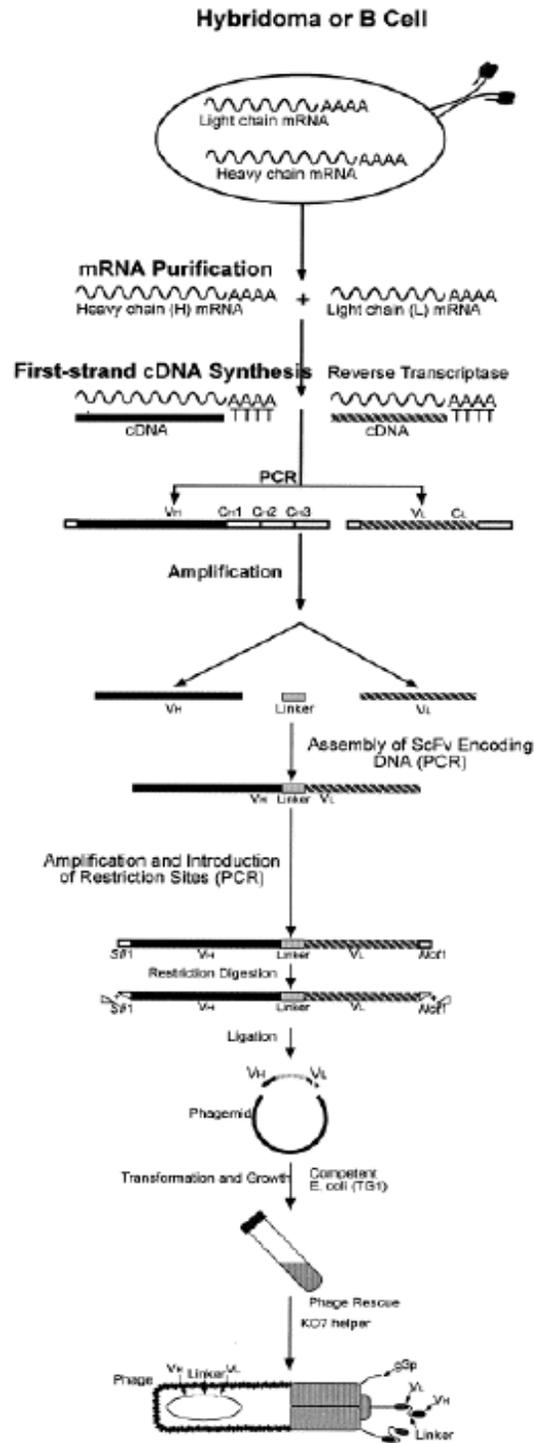


Figure 4.9: Principe de construction d'une banque de scFv. D'après Azzazy et al. 2002.

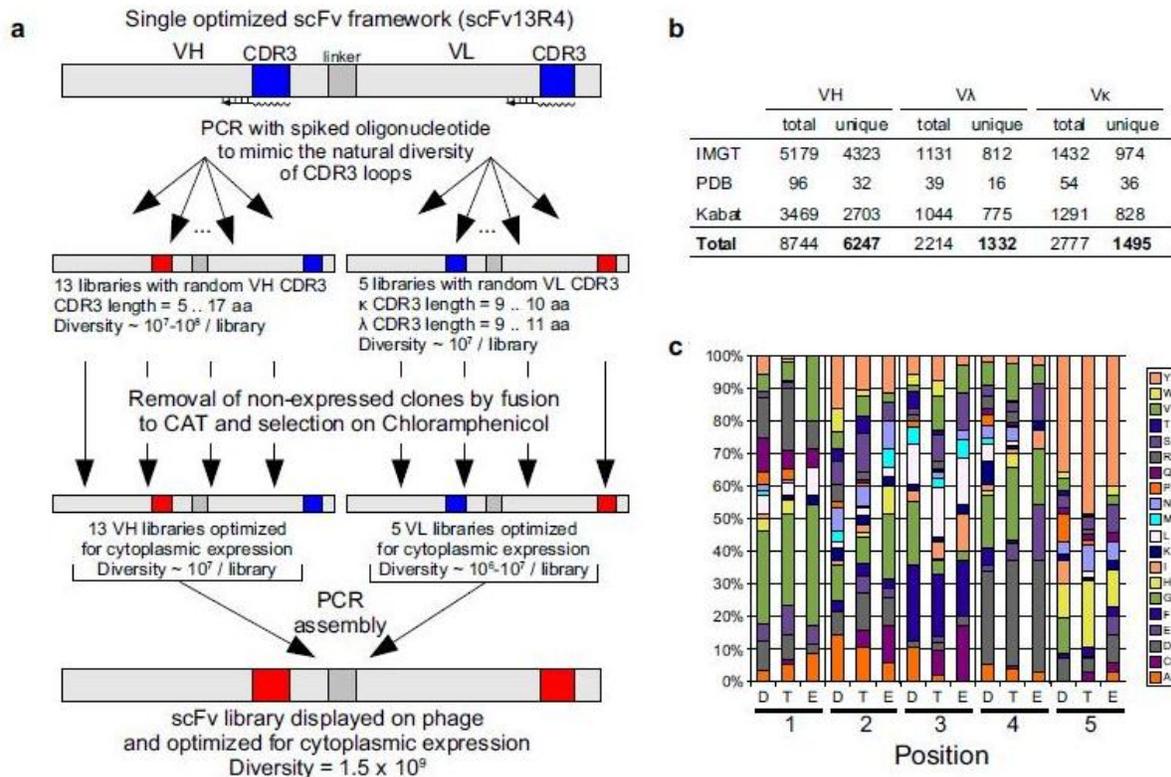


Figure 4.10: Library construction. (a) Schematic outline of the steps followed during library construction. The critical steps are: introduction of tailored CDR3 loops in an unique human scFv framework; removal of non-expressed clones by fusion with the CAT enzyme and selection on CAM plates; recombination of the 13 VH and 5 VL libraries, and display on phage. (b) Summary of the CDR3 loops collected in the database. (c) Distribution of the amino acids at each position of the 5 amino acid long VH CDR3s from 55 rearranged human antibodies (D), 43 sequenced clones from the library (E), and predicted from the oligonucleotide sequence H3_5 given in additional file 2 (T). D'après Philibert et al. 2007.

4.11. Le phage display *in vitro*

Le phage display *in vitro* est de loin la méthode de display la plus utilisée en laboratoire. Elle consiste à sélectionner des phages recombinants sur des antigènes identifiés, purifiés ou recombinants, portés par un support solide ou en solution.

Un degré de complexité est ajouté lorsque la sélection se fait sur des cellules exprimant un récepteur ou des protéines membranaires. Quoiqu'il en soit, cette technique permet de générer très rapidement un ou plusieurs ligands différents avec des séquences consensus, qui pourront ensuite être testées pour leur capacité à lier la molécule sur laquelle ils ont été sélectionnés.

4.11.1. Sélection sur antigène isolé

C'est la technique la plus courante. Concrètement, la banque combinatoire est mise en présence de l'antigène préalablement immobilisé sur un support (Immuntubes, plaques ELISA) [Jacobin et al. 2002]. Les phages recombinants se lient sur les régions accessibles de cet antigène. Plusieurs lavages successifs plus ou moins stringents permettent l'élimination des phages recombinants non spécifiques. Les phages spécifiques sont ensuite décrochés par une élution acide ou par traitement enzymatique, généralement par la trypsine si le phage contient un site de coupure entre la g3p et l'insert recombinant (peptide, scFv...). Enfin, les phages récoltés pourront servir à l'élaboration d'un nouveau tour de sélection qui aura pour but d'affiner la sélection (**Figure 4.11**) Il est à noter que l'intégrité conformationnelle de la cible après immobilisation est à prendre en considération. Les anticorps sélectionnés peuvent être par la suite incapables de reconnaître la cible sous sa forme native. Pour remédier à ce problème, la sélection peut être effectuée sur des antigènes en solution, par exemple préalablement biotinylés.

4.11.2. Sélection sur cellules

Les protéines membranaires représentent environ un quart des protéines totales. Leurs rôles dans les mécanismes de transport et de signalisation en font des cibles évidentes pour des molécules thérapeutiques. Or la purification de ces protéines reste un exercice difficile qui nécessite l'utilisation de détergents pouvant altérer leur structure intrinsèque, et de ce fait rendre la sélection de ligand par phage display inefficace. Ceci peut être contourné en réalisant une sélection directement sur cellules. L'un des problèmes majeurs de ce type de sélection est le bruit de fond généré car bon nombre de phages se fixent à la surface membranaire. Certaines équipes se sont essayé à la sélection négative sur des surfaces cellulaires afin d'épuiser la banque, d'autres ont plutôt opté pour l'élution des phages en utilisant des compétiteurs de ces récepteurs [Cortese et al. 1996]. Même si cette technique reste difficile à maîtriser, elle reste extrêmement utile pour la sélection de ligands présents à la surface cellulaire.

4.11.3. Sélection sur sérum de patients

La technique consiste à sélectionner des ligands contre des anticorps développés lors de maladies infectieuses ou auto-immunes. Ces ligands peuvent alors se lier aux anticorps présents dans le sérum de patients malades mais pas aux anticorps issus de sérums contrôles. Ainsi ont pu être

sélectionnés des peptides qui miment des épitopes antigéniques reconnus par des anticorps développés contre le virus de l'hépatite C [Cortese et al. 1996] ou du virus de l'Epstein-Barr [Casey et al. 2009].

Les différentes méthodes de sélection *in vitro* énumérées ci-dessus ne sont pas exhaustives, bien que d'autres méthodes ne soient pas citées dans cette partie, leur pertinence reste bien entendu identique à celle que j'ai choisi de présenter.

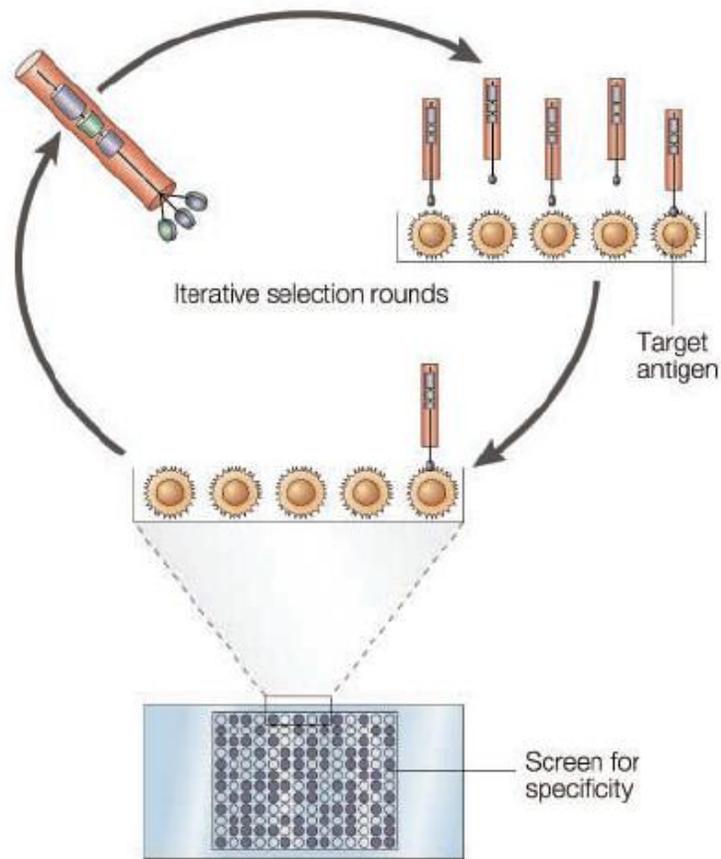


Figure 4.11 : Sélection par phage Display *in vitro*. D'après Henrik Brekke et Inger Sandlie, 2002.

4.12. Phage display *in vivo*

L'endothélium exprime des molécules spécifiques en fonction de sa localisation tissulaire et, comme nous l'avons vu précédemment, en fonction de son état pathologique. Un exemple bien connu est celui de l'endothélium présent au niveau des vaisseaux lymphatiques, qui exprime des récepteurs spécifiques, responsables du homing des lymphocytes T vers les tissus lymphoïdes [Springer et al. 1994]. Il semble que la plupart, pour ne pas dire tous les tissus, sains ou pathologiques apposent une « signature » au niveau de leur endothélium [Garlanda et al. 1997][Ruoslahti et al. 2000]. La connaissance de ces signatures ou adresses vasculaires est extrêmement importante en médecine en général et plus particulièrement dans le développement de thérapies et de traceurs toujours plus spécifiques. Néanmoins, une des limitations majeures dans l'étude de cette hétérogénéité de l'endothélium est la fâcheuse tendance de ces cellules à perdre leur intégrité tissulaire lorsqu'elles sont soustraites à leur microenvironnement [Augustin et al. 1994]. De ce fait, malgré la mise au point de nouveaux systèmes de co-culture et l'arrivée des techniques de génomique qui ont permis de comparer les ARNm exprimés au niveau de cellules endothéliales issues de différents tissus, l'identification de ces marqueurs spécifiques n'a progressé que très lentement. Ce n'est que depuis une quinzaine d'années que les connaissances dans ce domaine, que l'on peut qualifier de cartographie vasculaire, ont explosé. En 1996 une nouvelle technique mise au point par Pasqualini et Ruoslahti est publiée dans Nature [Pasqualini et al. 1996]. Dans cet article, les auteurs identifient plusieurs ligands protéiques spécifiques de l'endothélium des reins et du cerveau après injection dans la circulation sanguine de souris d'une banque peptidique exposée à la surface de bactériophages. Cette technique appelée « phage display *in vivo* » est très proche des expériences de phage display classiques réalisées sur un antigène immobilisé (**Figure 4.12**). La répétition des tours de sélections et la récupération des phages fixés sur les organes d'intérêt les conduisent systématiquement à un enrichissement de phages exhibant à leur surface des peptides, ligands de récepteurs endothéliaux tissus spécifiques. Un des aspects clés de cette technique est la sélection à la fois négative et positive qui s'opère lors de la circulation des phages dans le sang. En effet, après l'injection, les phages vont rencontrer l'endothélium de la majorité des organes et s'y fixer en fonction de l'affinité du peptide qu'ils portent (sélection négative). La sélection positive s'effectue alors car seuls ceux fixés sur l'organe étudié seront récupérés et réinjectés. Au jour d'aujourd'hui, le phage display *in vivo* a permis d'identifier un nombre impressionnant de peptides ciblant l'endothélium d'organes [Kolonin et al. 2004][Wu et al. 2003][Zhang et al. 2005], de tumeurs [Essler et al. 2002] [Laakkonen et al. 2002][Joyce et al. 2003], de la plaque d'athérome [Houston et al. 2001][Liu et al. 2003][Robert et al.

2006][Hong et al. 2007] et ainsi de mettre en lumière l'incroyable hétérogénéité vasculaire [Rajotte et al. 1998][Kolonin et al. 2001][Trepel et al. 2002]. Un autre point fort de la technique réside dans le fait que l'on sélectionne d'emblée des ligands présentant un comportement intéressant *in vivo*. La suite logique de ces études a donc été de lier ces peptides à différents composés thérapeutiques pour cibler le site d'intérêt. Ainsi, il a été montré, après couplage à des drogues [Arap et al. 1998], des cytokines [Ellerby et al. 1999] ou des peptides pro-apoptotiques [Curnis et al. 2002] que ces molécules chimériques présentaient une efficacité largement accrue par rapport à la drogue administrée seule. Ces peptides couplés à des vecteurs en thérapie génique ont aussi présenté un ciblage amélioré. La myriade de protagonistes cellulaires et moléculaires impliquée dans le phénomène d'athérogénèse se prête parfaitement à une étude par phage display *in vivo*. Le but de notre étude a donc été d'identifier des anticorps humains ciblant des constituants spécifiques de la plaque d'athérome chez différents modèles animaux d'athérosclérose. De telles molécules pourront soit être couplées à des agents de contraste ou des marqueurs radioactifs pour l'imagerie moléculaire ou bien testées pour leur capacité à agir fonctionnellement sur le tissu cible.

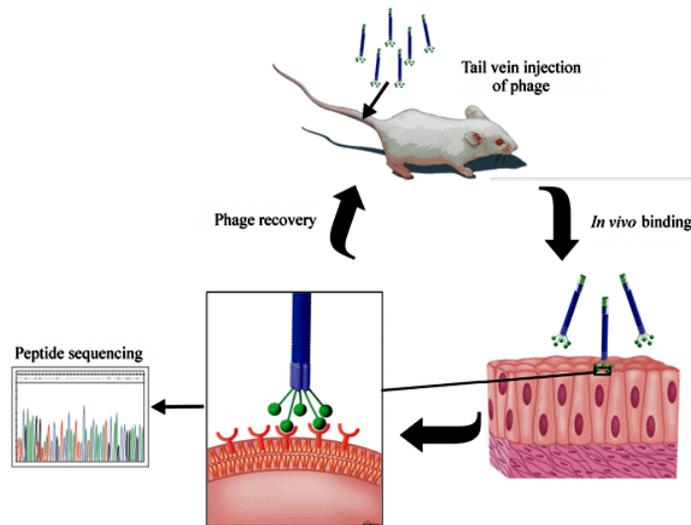


Figure 4.12 : Principe du phage display *in vivo*. D'après Arap, 2005.

4.13. Conclusion

Aujourd'hui, 30 anticorps ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM : voir **tableau 3.2**) et plus de 200 sont en phase clinique. En 2002 le premier anticorps entièrement humain isolé par « phage display », l'HUMIRA a obtenu le précieux sésame, presque 20 ans après OKT3 (Orthoclone, un anticorps

murin immunosuppresseur). Le chemin parcouru a été quelque peu chaotique et la molécule souvent critiquée, mais l'ingénierie génétique combinée à la formidable flexibilité de cette molécule fait que l'anticorps est et restera encore longtemps le réactif de référence en vue d'une utilisation thérapeutique toujours plus ciblée.

4.14. Tableau des anticorps soumis à l'AMM

| Acm/DCI* | Produc. | Format | AMM** | Laboratoires | Indications | Ag ciblé | 1/2-vie**** | Adm. | Immuno-génicité*** |
|---|----------------|---------------------------|------------|--------------------------|---|--------------|-------------|-----------------|-------------------------|
| Anticorps murins (6 dont 3 radioimmunoconjugués IgG et F(ab')₂ et 1 bispécifique souris/rat) | | | | | | | | | |
| Orthoclone/muromonab*** | Hybr. | IgG2ak | 1986 | Johnson & Johnson | Rejet de greffe | CD3 | 0,73 | i.v. | 53 % |
| Panorex/édrecolomab | Hybr. | IgG2ak | 1995 (Ger) | Centocor/GSK | Cancer colorectal | EpCAM | / | i.v. | forte |
| ¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y-Zevalin/ibritumomab** | CHO | IgG1k (RIC) | 2002 | Biogen-Idex | LNH | CD20 | 1.1 | i.v. | 30 % |
| ¹³¹ I-Bexxar/tositumomab | Hybr. | IgG2aλ (RIC) | 2003 | GSK | LNH | CD20 | 2,7-2,8 | i.v. | 9 % |
| ¹³¹ I-Licartin/métuximab | Hybr. | (Fab') ₂ (RIC) | 2005 (Chi) | Cheng Hoist Hitech | Hépatocarcinome | CD147 | / | i.v. | / |
| Removab/catumaxomab | Quadr. | sIgG2a/rlgG2b | 2009 | Trion/Fresenius | Ascite maligne | EpCAM/CD3 | / | i.p. | / |
| Anticorps chimériques (6 dont 1 Fab chimérique ; 3 d'entres eux représentent un chiffre d'affaire > 1 milliard d'euros) | | | | | | | | | |
| Réopro/abciximab | SP2/0 | Fab | 1994 | Centocor/Lilly | Angioplastie | GP1Ib/GPIIIa | 4,8 | i.v. | 4-21 % |
| Rituxan/rituximab | CHO | IgG1k | 1997 | Genentech/BiogenId. | LNH, PR | CD20 | 9,4 | i.v. | 0 % (LNH); 67 % (PR) |
| Rémicade/infliximab | SP2/0 | IgG1k | 1998 | Centocor/Scherring | Maladie de Crohn, psoriasis | TNF alpha | 9,5 | i.v. | 8-61 % |
| Simulect/basiliximab | SP2/0 | IgG1k | 1998 | Novartis | Rejet de greffe | CD25 | 4-16 | i.v. | 0-1 % |
| ¹³¹ I-Vivatumin/ ¹³¹ I-chTNT | NS0 | / | 2003 (Chi) | Shanghai Med. Biot. | Cancer du poumon | TNT | / | i.v. | / |
| Erbix/cétuximab*** | SP2/0 | IgG1k | 2004 | ImClone/ Merck-Serono | Cancer colorectal, tête et cou | EGFR | 4,8 | i.v. | 5 % |
| Anticorps humanisés (14 dont 1 immunoconjugué, 1 Fab et 1 Fab-pégylé) | | | | | | | | | |
| Zénopax/daclizumab*** | NS0 | IgG1k | 1997 | PDL/Roche | Rejet de greffe | CD25 | 20 | i.v. | 8-34 % |
| Herceptin/trastuzumab | CHO | IgG1k | 1998 | Genentech | Cancer du sein | HER-2 | 2,7-10 | i.v. | 0,1 % |
| Synagis/palivizumab | NS0 | IgG1k | 1998 | Medimmune/AstraZen. | Virus resp. syncytial | Protéine F | 19-27 | i.m. | 0-1 % |
| Mylotarg/gemtuzumab*** | NS0 | IgG4k-ImConj | 2000 (USA) | Wyeth | LAM | CD33 | 1,9-2,5 | i.v. | 0 % |
| MabCampath/alemtuzumab | CHO | IgG1k | 2001 | Millenium LLC | LLC | CD52 | 12 | i.v. | 50 % |
| Xolair/omalizumab | CHO | IgG1k | 2003 | Genentech/Novartis | Allergie | IgE-Fc | 20-35 | s.c. | 0 % |
| Raptiva/éfalizumab | CHO | IgG1k | 2003 | Genentech/Serono | Psoriasis | CD11a | 5-10 | s.c. | 2-6 % |
| Avastin/bévacizumab | CHO | IgG1k | 2004 | Genentech/Roche | Cancer colorectal, tête et cou, sein | VEGF-A | 12-14 | i.v. | 0 % |
| Tysabri/natalizumab | NS0 | IgG4k | 2004 | Biogen-Idex/Elan | Sclérose en plaques | Intégrine α4 | 14 | i.v. | 7 % |
| TheraCIM/nimotuzumab | NS0 | IgG1k | 2005 (Chi) | YM Biosciences | Cancer tête et cou | EGFR | / | i.v. | / |
| Lucentis/ranibizumab*** | <i>E. coli</i> | Fab | 2006 | Genentech | DMLA | VEGF-A | / | i.o. | / |
| Soliris/éculizumab | NS0 | IgG2/4k | 2007 | Alexion | PNH | C5 | 5-11 | i.v. | 2 % |
| Cimzia/certolizumab pégol*** | <i>E. coli</i> | Fab'-PEG | 2008 | UCB | Maladie de Crohn | TNF alpha | / | s.c. | faible (PEG) |
| Roactemra/tocilizumab | CHO | IgG1k | 2009 | Roche/Chugai | PR, maladie de Castelman | IL-6R | 10 | i.v. | 2 % |
| Anticorps humains (6 dont 1 par phage display (CAT) et 5 par souris transgéniques [technologies Abgenix/ABX et Medarex/MDX]) | | | | | | | | | |
| Humira/adalimumab (CAT) | CHO | IgG1k | 2002 | Abbott | Polyarthrite rhumatoïde | TNF alpha | 14,7-19,3 | s.c. | 5-12 % |
| Vectibix/panitimumab*** (ABX) | CHO | IgG2k | 2006 | Amgen | Cancer colorectal | EGFR | 3,6-10,9 | i.v. (2 sem) | 1-4 % |
| Stélara/ustékinumab (MDX) | CHO | IgG1k | 2009 | Centocor (J&J) | Psoriasis | IL12/ IL23 | 21 | s.c. | / |
| Simponi/golimumab (MDX) | CHO | IgG1k | 2009 | Centocor (J&J) | Polyarthrite rhumatoïde | TNF alpha | 7-21 | s.c. | / |
| Ilaris/canakinumab (MDX) | SP2/0 | IgG1k | 2009 | Novartis | SPAC (auto-inflamm.) | IL-1β | 26 | s.c. | 0 % |
| Arzerra/ofatumumab (MDX) | CHO | IgG1k | 2009 | GSK/Genmab LLC | LLC | CD20 | 12,6-23,6 | i.v. | < 1 % |
| Protéines-Fc (4 immunoadhésines) | | | | | | | | | |
| Enbrel/étanercept*** | CHO | p75 TNFR-Fc | 1998 | Amgen/Wyeth | PR, pso, SA | TNF alpha | 4 | s.c. | / |
| Amevive/aléfacept | CHO | LFA-3-Fc | 2003 | Astellas/BiogenIdex | PR, pso, transplant. | CD2 | 11,3 | s.c. | / |
| Orencia/abatacept | CHO | CTLA4-Fc | 2005 | BMS | PR | CD80/CD86 | / | s.c. | 2,8-3 % |
| Arcalyst/rilonacept | CHO | IL1R-Fc | 2008 | Regeneron | SPAC (auto-inflamm.) | IL-1 | 5,3-7,6 | s.c. | / |
| Peptide-Fc (1 peptibody) | | | | | | | | | |
| Nplate/romiplostim** | <i>E. coli</i> | Fc-peptide | 2008 | Amgen | Purpura thromboéniq | TPO-R | 4 | s.c. | / |

Tableau 3.2: le tableau liste par catégories, les anticorps monoclonaux (Acm) et dérivés qui ont été approuvés pour un usage thérapeutique par la FDA (Food and drug administration), l'EMA (European medicines agency) ou la SFDA (China state Food and drug administration). D'après Beck et al. 2009.

4.15. Bibliographie

- Arap, W., R. Pasqualini, et al. (1998). "Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model." Science **279**(5349): 377-80.
- Augustin, H. G., D. H. Kozian, et al. (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." Bioessays **16**(12): 901-6.
- Bagnato, C., J. Thumar, et al. (2007). "Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **6**(6): 1088-102.
- Barbas, C. F., 3rd, W. Amberg, et al. (1993). "Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries." Gene **137**(1): 57-62.
- Barbas, C. F., 3rd, J. S. Rosenblum, et al. (1993). "Direct selection of antibodies that coordinate metals from semisynthetic combinatorial libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6385-9.
- Barbie, V. and M. P. Lefranc (1998). "The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGJ) segments." Exp Clin Immunogenet **15**(3): 171-83.
- Beck, A., E. Wagner-Rousset, et al. (2009). "[Therapeutic antibodies and related products: choosing the right structure for success]." Med Sci (Paris) **25**(12): 1024-32.
- Bonetto, S., I. Carlván, et al. (2005). "Isolation and characterization of antagonist and agonist peptides to the human melanocortin 1 receptor." Peptides **26**(11): 2302-13.
- Bratkovic, T., M. Lunder, et al. (2005). "Affinity selection to papain yields potent peptide inhibitors of cathepsins L, B, H, and K." Biochem Biophys Res Commun **332**(3): 897-903.
- Bruggemann, M., H. M. Caskey, et al. (1989). "A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(17): 6709-13.
- Casey, J. L., A. M. Coley, et al. (2009). "Peptide mimics selected from immune sera using phage display technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection." Protein Eng Des Sel **22**(2): 85-91.
- Chames, P. and D. Baty (2009). "[The future of antibody fragments, made of a single immunoglobulin domain]." Med Sci (Paris) **25**(12): 1159-62.
- Chapal, N., T. Chardes, et al. (2001). "Thyroid peroxidase autoantibodies obtained from random single chain FV libraries contain the same heavy/light chain combinations as occur in vivo." Endocrinology **142**(11): 4740-50.
- Clofent-Sanchez, G., J. Laroche-Trainean, et al. (1997). "Incidence of anti-mouse antibodies in thrombocytopenic patients with autoimmune disorders." Hum Antibodies **8**(2): 50-9.
- Cobaugh, C. W., J. C. Almagro, et al. (2008). "Synthetic antibody libraries focused towards peptide ligands." J Mol Biol **378**(3): 622-33.
- Cortese, I., R. Tafi, et al. (1996). "Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11063-7.
- Ellerby, H. M., W. Arap, et al. (1999). "Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides." Nat Med **5**(9): 1032-8.
- Essler, M. and E. Ruoslahti (2002). "Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2252-7.
- Garlanda, C. and E. Dejana (1997). "Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(7): 1193-202.
- Goenaga, A. L., Y. Zhou, et al. (2007). "Identification and characterization of tumor antigens by using antibody phage display and intrabody strategies." Mol Immunol **44**(15): 3777-88.

- Hayashi, N., M. Welschof, et al. (1994). "Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR." Biotechniques **17**(2): 310, 312, 314-5.
- Holliger, P. and P. J. Hudson (2005). "Engineered antibody fragments and the rise of single domains." Nat Biotechnol **23**(9): 1126-36.
- Hong, H. Y., H. Y. Lee, et al. (2007). "Phage Display Selection of Peptides that Home to Atherosclerotic Plaques: IL-4 Receptor as a Candidate Target in Atherosclerosis." J Cell Mol Med.
- Houston, P., J. Goodman, et al. (2001). "Homing markers for atherosclerosis: applications for drug delivery, gene delivery and vascular imaging." FEBS Lett **492**(1-2): 73-7.
- Hwang, W. Y. and J. Foote (2005). "Immunogenicity of engineered antibodies." Methods **36**(1): 3-10.
- Jacobin, M. J., J. Laroche-Traineau, et al. (2002). "Human IgG monoclonal anti-alpha(IIB)beta(3)-binding fragments derived from immunized donors using phage display." J Immunol **168**(4): 2035-45.
- Joyce, J. A., P. Laakkonen, et al. (2003). "Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis." Cancer Cell **4**(5): 393-403.
- Knappik, A., L. Ge, et al. (2000). "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides." J Mol Biol **296**(1): 57-86.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.
- Kolonin, M., R. Pasqualini, et al. (2001). "Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy." Curr Opin Chem Biol **5**(3): 308-13.
- Laakkonen, P., K. Porkka, et al. (2002). "A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels." Nat Med **8**(7): 751-5.
- Lajus, S., G. Clofent-Sanchez, et al. "Thrombocytopenia after abciximab use results from different mechanisms." Thromb Haemost **103**(3): 651-61.
- Laroche-Traineau, J., G. Clofent-Sanchez, et al. (1994). "The ex vivo production of human monoclonal antibodies to glycoprotein IIb-IIIa complexes of blood platelets." Hum Antibodies Hybridomas **5**(3-4): 165-77.
- Little, M., M. Welschof, et al. (1999). "Generation of a large complex antibody library from multiple donors." J Immunol Methods **231**(1-2): 3-9.
- Liu, C., G. Bhattacharjee, et al. (2003). "In vivo interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces." Am J Pathol **163**(5): 1859-71.
- Lunder, M., T. Bratkovic, et al. (2005). "Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies." J Lipid Res **46**(7): 1512-6.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature **348**(6301): 552-4.
- Miller, M. D., R. Geleziunas, et al. (2005). "A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14759-64.
- Moutel, S., A. El Marjou, et al. (2009). "A multi-Fc-species system for recombinant antibody production." BMC Biotechnol **9**: 14.
- Moutel, S. and F. Perez (2009). "[Intrabodies, potent tools to unravel the function and dynamics of intracellular proteins]." Med Sci (Paris) **25**(12): 1173-6.
- Nizak, C., S. Martin-Lluesma, et al. (2003). "Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics in vivo." Traffic **4**(11): 739-53.
- Nurden, P., G. Clofent-Sanchez, et al. (2004). "Delayed immunologic thrombocytopenia induced by abciximab." Thromb Haemost **92**(4): 820-8.
- Pallares, N., J. P. Fripiat, et al. (1998). "The human immunoglobulin lambda variable (IGLV) genes and joining (IGLJ) segments." Exp Clin Immunogenet **15**(1): 8-18.

- Pallares, N., S. Lefebvre, et al. (1999). "The human immunoglobulin heavy variable genes." Exp Clin Immunogenet **16**(1): 36-60.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." Nature **380**(6572): 364-6.
- Philibert, P., A. Stoessel, et al. (2007). "A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm." BMC Biotechnol **7**(1): 81.
- Rajotte, D., W. Arap, et al. (1998). "Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display." J Clin Invest **102**(2): 430-7.
- Robert, R., M. J. Jacobin-Valat, et al. (2006). "Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display." J Biol Chem **281**(52): 40135-43.
- Soderlind, E., R. Carlsson, et al. (2001). "The immune diversity in a test tube--non-immunised antibody libraries and functional variability in defined protein scaffolds." Comb Chem High Throughput Screen **4**(5): 409-16.
- Soderlind, E., L. Strandberg, et al. (2000). "Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries." Nat Biotechnol **18**(8): 852-6.
- Soderlind, E., M. Vergeles, et al. (1995). "Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions." Gene **160**(2): 269-72.
- Trepel, M., W. Arap, et al. (2002). "In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine." Curr Opin Chem Biol **6**(3): 399-404.
- Vaughan, T. J., A. J. Williams, et al. (1996). "Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library." Nat Biotechnol **14**(3): 309-14.
- Welschof, M., P. Terness, et al. (1995). "Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes." J Immunol Methods **179**(2): 203-14.
- Wu, R., Y. Shoenfeld, et al. (2003). "Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations--possible immunomodulation of atherosclerosis." Autoimmunity **36**(2): 91-7.
- Zhang, L., J. A. Hoffman, et al. (2005). "Molecular profiling of heart endothelial cells." Circulation **112**(11): 1601-11.

Résultats

1) Objectifs du projet de thèse

L'objectif principal est de définir de nouveaux biomarqueurs de l'athérosclérose par les techniques de phage-display et de protéomique pour *in fine* développer des bio-pharmaceutiques de façon à visualiser la dangerosité d'une plaque d'athérome. L'imagerie a non seulement pour but de diagnostiquer les sujets à risque mais également de suivre l'évolution des plaques d'athérome sous l'effet de médicaments comme les statines. La pertinence du ciblage peut également autoriser la délivrance d'un agent thérapeutique sur le site d'intérêt.

L'objectif de ma thèse est dans un premier temps de concevoir des **anticorps humains** ciblant les plaques d'athérome. J'ai pour cela conduit une **interrogation *in vivo* du tronc aortique pathologique par une approche phage-display à l'aide d'anticorps monoclonaux humains, de façon à déterminer *in situ* la représentativité et la disponibilité d'une cible**. Le phage-display *in vivo* a été initié en 1996 par l'équipe de R. Pasqualini avec des banques de peptides. Dans notre approche, ce sont des **anticorps humains** de format scFv qui sont sélectionnés sur des protéines surexprimées au sein de plaques d'athérome, *in vivo*, sur des modèles animaux d'athérosclérose. Ces fragments d'anticorps humains sélectionnés *in vivo*, pourront être ensuite déclinés en biopharmaceutiques pour l'immunociblage de la plaque d'athérome. Cette phase de l'étude consiste à les coupler à des agents de contraste para ou superparamagnétiques pour une utilisation en **Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)**.

Le projet de recherche de l'équipe « athérosclérose » au sein de l'UMR 5536 dans laquelle je réalise ma thèse, consiste ainsi à mettre à profit les dernières avancées dans le domaine de l'ingénierie des anticorps, pour la mise en place de nouvelles méthodes **préventives** et **thérapeutiques** de l'athérosclérose.

II) Phage Display in vivo

5.1. Introduction

En fonction de leur état (patho)physiologique, les cellules de la paroi vasculaire expriment des marqueurs biologiques différents. Ainsi, à chaque étape de l'athérogénèse, il s'exprime toute une série de protéines qui reflète l'état d'avancement de la pathologie. Par exemple, les intégrines VCAM-1 ou P-sélectines s'expriment précocement alors que les marqueurs de l'apoptose le sont à un stade plus avancé de la maladie. De ce fait, il est possible grâce à des modèles animaux développant des lésions athéroscléreuses, de cartographier *in vivo* l'état d'expression protéique depuis la formation de la strie lipidique jusqu'au stade où la plaque est susceptible de se rompre. Le phage display *in vivo* est parfaitement adapté à ce type d'usage. La sélection est réalisée sans connaissance préalable de la cible mais est fonction du niveau d'expression et de l'accessibilité du ligand. Cette sélection peut soit se faire à l'aide d'une banque peptidique ou d'une banque d'anticorps synthétique, semi-synthétique, naïve ou immune. D'un point de vue technique, la sélection *in vivo* consiste à injecter dans la circulation sanguine d'un modèle animal, des phages présentant à leur surface des fragments d'anticorps (scFv). Ces phages-scFv circulent dans l'organisme vivant et se lient par leur scFv aux marqueurs exprimés dans les lésions.

L'approche *in vivo* autorise un ciblage de tous les antigènes exposés à la surface du tissu d'intérêt. De plus, l'utilisation d'anticorps humains palie les problèmes liés à l'immunogénicité développée lors de l'utilisation des anticorps murins ou humanisés. Enfin, ils sont d'une grande spécificité et peuvent être déclinés sous une multitude de formats différents grâce à l'ingénierie des régions variables des immunoglobulines. Les éléments clés de l'approche *in vivo* sont **(1)** la sélection à la fois négative et positive qui s'opère lors de la circulation des phages-scFv **(2)** le criblage *in vivo* des marqueurs de la plaque directement impliqués dans son évolution vers la rupture et enfin **(3)** l'identification de nouveaux marqueurs et leur niveau d'expression entre les tissus sains et pathologiques.

Plusieurs équipes se sont intéressées au répertoire moléculaire présent à la surface des vaisseaux sanguins, notamment lors de l'angiogénèse tumorale. Parmi ces études, citons la sélection de peptides dirigés contre l' $\alpha v \beta 3$ ou l' $\alpha v \beta 5$ [Arap, Pasqualini et al. 1998], l'aminopeptidase P [Essler and Ruoslahti 2002] ou la nucleoline [christian et al., 2003]. Ces études montrent, que l'on peut identifier des biomarqueurs spécifiques d'un état pathologique et que ces derniers peuvent parfaitement être ciblés pour la thérapie [Arap et al., 1998][Pastorino, Brignole et al. 2006], l'imagerie [Burtea, Laurent et al.

200][Nahrendorf, Jaffer et al. 2006]. La combinaison des deux peut être envisagée [Ozawa, Zurita et al. 2008]. On parle alors de théranostic.

Bien que très peu d'études *in vivo* utilisant des anticorps humains aient été rapportées dans la littérature, notre laboratoire a réussi par le passé à isoler un anticorps humain dirigé contre un constituant de la matrice extracellulaire, la vitronectine, contenue dans la chape fibreuse de la plaque d'athérome [Robert, Jacobin-Valat et al. 2006]. Cette étude a reposé sur l'injection dans la circulation sanguine d'un lapin mis sous régime hypercholestérolémiant, de phages-scFvs issus d'une banque de fragments d'anticorps humains construite à partir d'une seule charpente VH et Vk dont quelques acides aminés clés dans les CDR3 ont été mutés (MRC, Geneservice). Après un temps bien défini de circulation, l'animal a été sacrifié, l'aorte disséquée et les phages présents dans les sections atteintes élues puis testés individuellement par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

5.2. Sélection *in vivo* de fragments d'anticorps

En me basant sur les précédents travaux réalisés au laboratoire, j'ai pu au cours de ma thèse effectuer plusieurs tours de sélection *in vivo* en utilisant une banque de phages-anticorps recombinante humaine et 2 modèles d'animaux d'athérosclérose. L'innovation par rapport aux travaux précédents réside dans **(1)** la nature de la banque qui permet une expression optimale de fragments d'anticorps (scFv) dans le cytoplasme bactérien et des cellules de mammifères **(2)** l'élution séquentielle des phages (extracellulaire/intracellulaire) **(3)** un criblage *in vitro* innovant des clones par HTRF (Homogeneous time resolved fluorescence) **(4)** et l'utilisation de modèles animaux différents : souris apoE^{-/-} et un modèle de lapin à inflammation induite.

5.2.1. Matériel biologique utilisé

Au cours de mon projet de thèse, j'ai utilisé une banque de fragments d'anticorps qualifiée « d'hyperstable », capable de résister aux conditions physico-chimiques particulières du cytoplasme. Il s'agit d'une banque synthétique de (scFv) humains [Philibert, Stoessel et al. 2007]. La banque synthétique utilisée est basée sur l'armature d'un scFv humain (scFv13R4) et sur des régions CDR3 H et L semi-aléatoires dans la mesure où elles respectent la distribution des acides aminés à chaque position

des régions hypervariables humaines. L'avantage du scFv13R4 est qu'il adopte une conformation tridimensionnelle correcte dans le cytoplasme des bactéries et dans celui des cellules humaines, autorisant une expression optimale de scFv fonctionnels. La banque présente une diversité de $1,5 \times 10^9$ fragments scFvs.

5.2.2. Modèles animaux

Le phage-display *in vivo* a été réalisé sur 2 modèles animaux mis sous régime hypercholestérolémiant. L'avantage est ici d'obtenir des phage-scFv capables de reconnaître des protéines athéromateuses dans le modèle animal que l'on va utiliser ultérieurement pour les études *in vivo* après couplage des scFv à des agents de contraste.

5.2.2.1. Modèle de lapin athéromateux

Nous avons mis en place chez le lapin un nouveau protocole qui présente l'avantage d'un régime hypocholestérolémiant réduit à 6-8 mois mais qui nécessite **2 interventions chirurgicales à 1-2 mois** d'intervalle : une désendothélialisation et une angioplastie. L'altération mécanique de la couche superficielle de la paroi vasculaire entraîne une lésion pouvant être interprétée comme proche de celles observées chez l'homme en terme de composition cellulaire et d'accumulation lipidique [Rekhter et al. 1998].

5.2.2.2. Modèle de souris ApoE^{-/-}

L'apolipoprotéine (**apoE**) est un constituant des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et des molécules rémanentes des chylomicrons et des LDL (IDL). Elle est responsable de la **clairance** de ces lipoprotéines riches en cholestérol et triglycérides en se liant aux récepteurs des LDL (LDLR). Ainsi, une déficience en apoE entraîne une élévation dramatique de VLDL et molécules rémanentes dans le sang et aboutit au développement de l'athérosclérose [Piedrahita et al. 1992]. Les souris apoE^{-/-} sont mises sous un régime hypercholestérolémiant (Western Diet, 0.3 % cholestérol) pendant 6 mois.

5.2.3. Sélections *in vivo* réalisées

Une série de 3 tours de sélection a été réalisée chez le modèle souris et une série de 3 tours chez le lapin. A chaque tour, les phages sont élués séquentiellement puis produits, amplifiés et réinjectés dans la circulation sanguine de l'animal (**Figure 5.1**).

En résumé, 10^{13} phages-scFv sont injectés dans la circulation sanguine du modèle lapin et 10^{12} phages-scFv dans la circulation de la souris ApoE^{-/-}. Après 30 min de circulation chez le lapin et 15 min chez la souris, les animaux sont sacrifiés et l'aorte disséquée. L'intérêt de cette sélection est de récupérer sélectivement des phages-scFv susceptibles de résider dans différents compartiments de la plaque comme **(1)** la paroi vasculaire athéromateuse, **(2)** les tissus lésés du sous-endothélium ou encore **(3)** les cibles internalisées dans les cellules résidentes de la plaque. Après 2 à 3 tours de sélection, les phages sont amplifiés dans les bactéries et les phagemides des clones bactériens séquencés. Les séquences des gènes VH et VL des phages-scFv sont alignées et comparées entre elles de façon à en tirer des motifs consensus, liés à la pression de sélection exercée par les différents tours de phage-display.

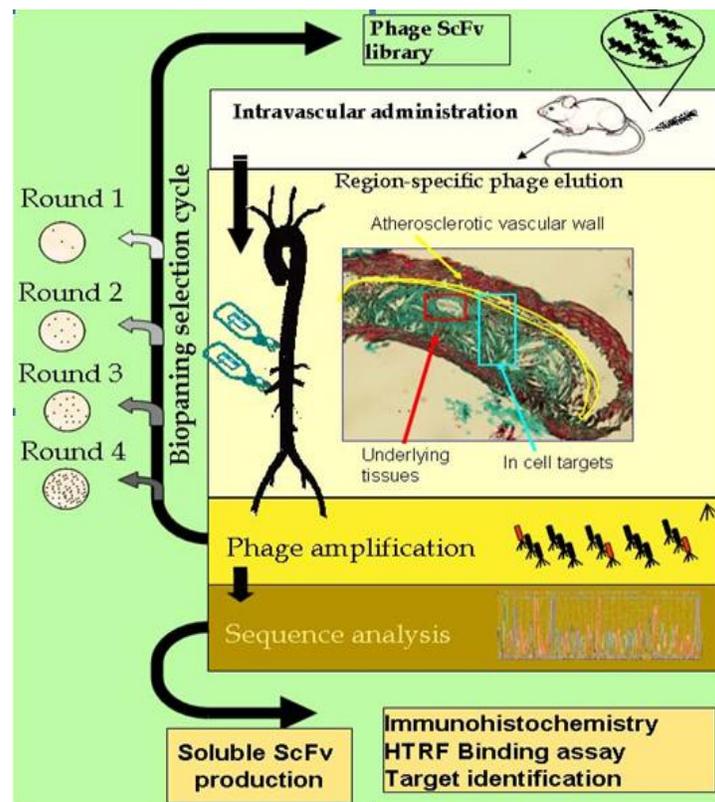


Figure 5.1: Schéma récapitulatif de la procédure de sélection des phages-scFv *in vivo*.

5.2.4. Production de fragments scFv solubles

Afin de tester l'activité des fragments d'anticorps présélectionnés par séquençage, les phagemides recombinants ont été clonés dans une souche bactérienne non suppressive pour le codon Ambre (la souche HB2151). Cette souche bactérienne a de ce fait la capacité de produire des fragments scFv solubles qui ont été par la suite purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (cf matériel et méthodes).

5.2.5. Tests de réactivité

5.2.5.1. HTRF (Homogeneous time resolved fluorescence)

Les scFv solubles ont été criblés grâce à une méthode dont les paramètres ont été mis au point par Stéphane Bonetto au sein de notre équipe en collaboration avec Hervé Bazin de CisBio bioassays. Cette technique innovante repose sur la technologie du **FRET**. Le FRET (Fluorescence Resonance Energy transfer) est basé sur le transfert d'énergie entre 2 fluorophores, un donneur et un accepteur, lorsqu'ils sont à proximité immédiate (**Figure 5.2A**). Les interactions moléculaires entre les biomolécules peuvent être réalisées en couplant à chaque partenaire un fluorophore. Lorsque les deux entités sont associées, l'excitation du donneur par une source d'énergie (un laser fluoromètre par exemple) entraîne un transfert d'énergie vers l'accepteur, qui à son tour émet une fluorescence à une longueur d'onde donnée. Grâce aux différences des propriétés spectrales des deux partenaires, la formation du complexe peut être détectée sans avoir à le séparer des constituants du milieu réactionnel.

Le donneur et l'accepteur peuvent être couplés de façon covalente à des partenaires multiples pouvant s'associer tels que des dimères protéiques, des acides nucléiques, un anticorps et son antigène ou un ligand et son récepteur. Les techniques de FRET classiques sont néanmoins limitées par l'émission de fluorescence endogène provenant par exemple du milieu réactionnel ou du lysat protéique utilisé. Cependant, cette fluorescence endogène est transitoire (quelques nanosecondes) et la détection de ce signal peut être contournée à l'aide d'une variante du FRET, l'**HTRF**[®] (Homogeneous time resolved fluorescence) [Bazin, Preaudat et al. 2001]. L'HTRF est basée sur des mesures d'intensité de fluorescence en temps résolu (avec un temps de latence), ce qui permet de s'affranchir de la fluorescence endogène. Cette méthode met à profit la désactivation extrêmement lente de certains fluorophores tels que les terres rares (Europium,

Terbium, ...) pour séparer la fluorescence des molécules engagées dans un FRET de celles qui ne le sont pas. Comme montré sur la **figure 5.2B**, un décalage du délai de lecture (de 50 à 150 µsecondes) entre l'excitation et la mesure de la fluorescence, permet d'obtenir un signal spécifique de l'interaction moléculaire que l'on recherche.

Pour notre étude, les deux fluophores choisis sont le cryptate d'euporium (EuK) qui peut être excité à une longueur d'onde de 320nm et le XL665 qui émet de la fluorescence à 665nm. Dans le cadre de notre projet, 3 approches basées sur le principe de l'HTRF ont été envisagées **(1)** la première (HTRF sandwich) consiste à déterminer, pour les fractions de scFv solubles produites, un seuil de sensibilité pour le test « direct HTRF » grâce à une méthode d'inhibition d'un peptide contrôle (**Figure 5.3A**), **(2)** la seconde (Direct HTRF) permet de détecter l'interaction moléculaire produite entre un extrait de protéines athéromateuses biotinylées et le scFv purifié (**Figure 5.3B**), **(3)** enfin la dernière (HTRF de compétition) repose sur l'inhibition de la reconnaissance des protéines athéromateuses biotinylées avec des protéines non biotinylées saines ou malades (**Figure 5.3C**).

5.2.5.2. Immunohistochimie

Tous les clones ayant donné un signal positif en HTRF ont été ensuite testés pour leur capacité à reconnaître des coupes de tissus athéromateux (de lapin, de souris et humains) en immunohistochimie.

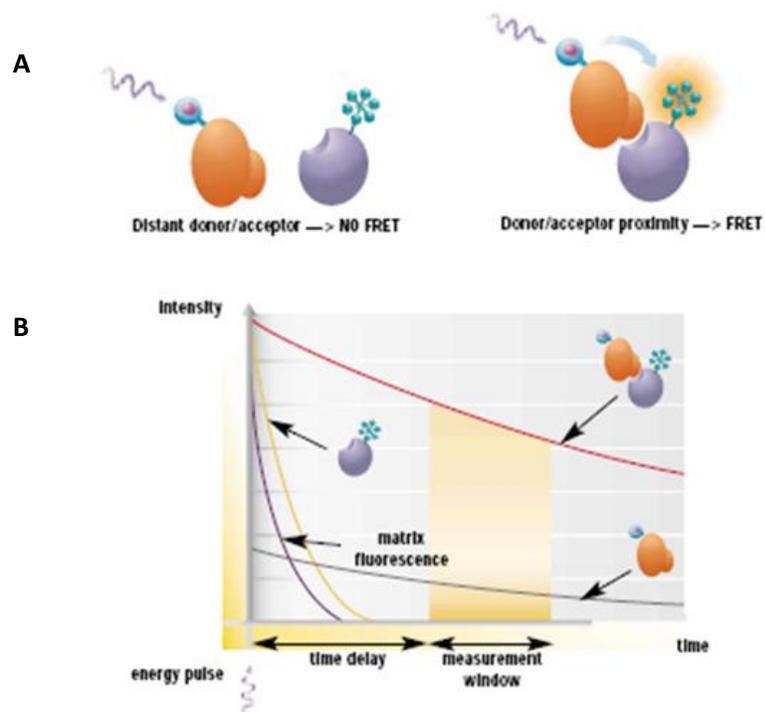
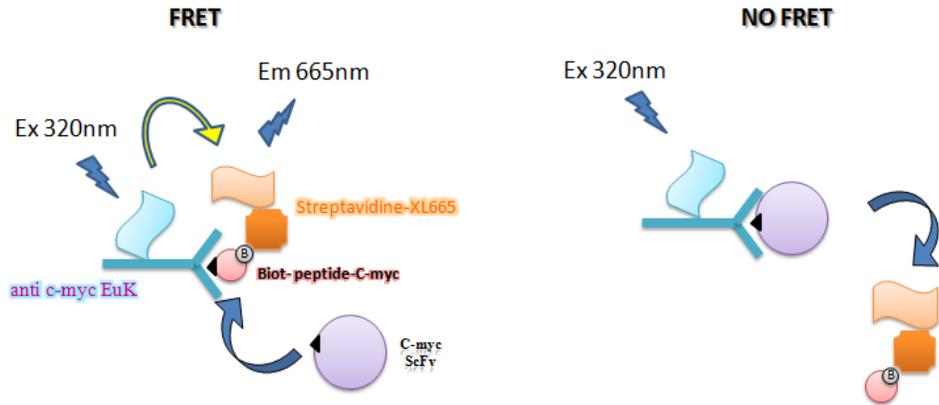
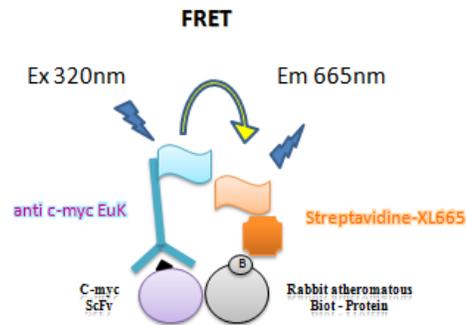


Figure 5.2: Principe du FRET en temps résolu (HTRF). Les deux partenaires (donneur et accepteur) ne peuvent entraîner l'émission d'un signal de fluorescence que s'ils sont à proximité immédiate (A). Le signal de fluorescence émis par le complexe peut être lu après un temps de latence (time delay) (B).

A : « Sandwich HTRF »



B : « Direct HTRF »



C : HTRF de compétition

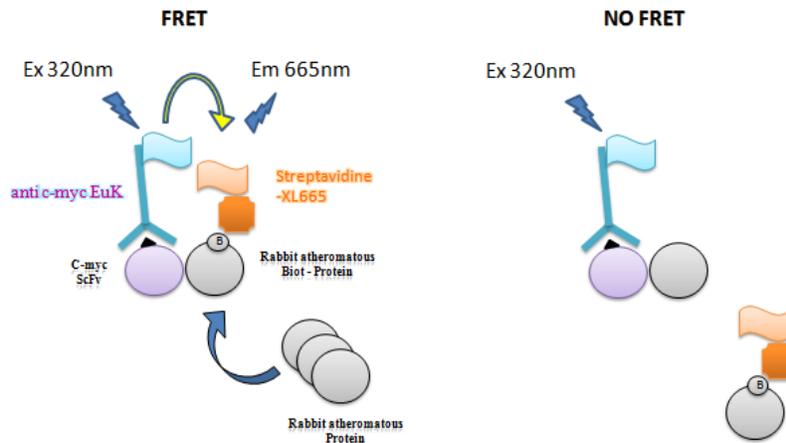


Figure 5.3: Criblage des scFv par HTRF. Après purification, chaque clone scFv est testé individuellement pour sa capacité à déplacer la liaison du peptide contrôlé « c-myc-peptide-biotine » (A). L'inhibition du signal HTRF est une valeur arbitraire, permettant de valider une quantité minimum de scFv, capable de générer un signal dans le test du « direct HTRF ». Le direct HTRF consiste à mettre en contact chaque clone scFv avec des protéines athéromateuses biotinylées. Ne peut être généré de signal que s'il y a association entre un scFv et un partenaire protéique biotinylé. Ce signal provient du transfert d'énergie entre l'accepteur (anticorps anti -c-myc-EuK) et le donneur (streptavidine -XL665) (B). Les expériences d'HTRF de compétition consistent à rompre l'équilibre formé lors du direct HTRF, en ajoutant dans le milieu, un excès de protéines athéromateuses non biotinylées (C).

Sélection in vivo chez la souris :

Article (en cours de rédaction)

III) Identification of new human antibody fragments homing specifically to atherosclerotic endothelial and subendothelial tissues by *in vivo* phage display

Kamel Deramchia^{*}, Marie-Josée Jacobin-Valat^{*}, Amélie Vallet[†], Hervé Bazin[‡], Stéphane Sanchez^{*}, Jean-Michel Franconi^{*}, Gisele Clofent-Sanchez^{*,1,2}, and Stéphane Bonetto^{*,1}

^{*} Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536, 33076 Bordeaux, France; and

[‡] 33200 Bordeaux

[†] Ecole Nationale Supérieure de Technologie des Biomolécules de Bordeaux (ENSTBB), 33076 Bordeaux Cedex, France

[‡] CIS bio International, BP 84175, F-30204 Bagnols sur Cèze Cedex, France

¹Equivalent position

²Corresponding author :

Address : Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536, 33200 Bordeaux, France.

E-mail address: clofent-sanchez@rmsb-bordeaux2.com

ABSTRACT

In vivo phage display selection is a powerful strategy leading to the direct identification of agents that selectively target the vasculature of normal or diseased tissues into living animals. We describe here the development of an *in vivo* biopanning procedure into a high-fat diet fed ApoE-deficient mouse model to identify single-chain antibodies (scFvs) capable of homing specifically to atherosclerotic lesions. A semi-synthetic scFv phage library was intravenously injected into living animals, and extracellular and internalized phages were selectively recovered both from diseased vascular endothelium and subjacent tissues. After three successive biopanning rounds, a panel of six distinct clone sequences was isolated. Produced and purified under soluble form, four scFvs were showed to specifically (1) interact *in vitro* with an atheromatous protein extract by direct homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) and (2) target *ex vivo* the endothelial cell surface and inflamed intima-related regions of rabbit and human tissue sections by immunohistology approaches. The staining patterns were different according to the scFvs and to stage of lesion development. We demonstrate here the feasibility to isolate antibody fragments able to selectively bind markers onto atherosclerotic endothelial cell surface or buried into deep intimal layers, without recognition of the non-lesional intima. The identification of such scFvs provides new opportunities for targeted imaging applications, as well as for therapeutic treatments of atherosclerosis.

Key Words: human scFv · HTRF · atherosclerosis · semi-synthetic phage display library · *in vivo* phage display biopanning · human atherosclerotic sections ·

INTRODUCTION

Epidemiological studies have established that elevated plasma levels of apolipoprotein B-containing lipoproteins in human increase the incidence to develop coronary heart diseases (CHD) ((Miller 1987), 2, 3j). Besides, there is no known animal models in which atherosclerosis can be induced without altering lipoprotein profiles. However, studies on patients developing premature CHD revealed that 48% had cholesterol levels less than 200 mg/dl (4). In addition, in children as early as 5 of age with familial hypercholesterolemia and with identical high cholesterol levels, one child may have a fatal myocardial infarction at age 10 and the other survives to age 50. Clearly, the rate at which atherosclerosis progresses could considerably vary independently of the plasma cholesterol level, suggesting that additional factors determine just how fast the disease progresses. So, it seems that the disease may not be necessarily initiated in a hypercholesterolemic context, and other risk factors, local and systemic may be necessary or sufficient to induce atherosclerosis lesions ().

Atherosclerosis imaging and therapy strategies are entered in a new era at the turn of the century. Emerging modalities have raised the limits of imaging based on the architecture and morphology of vessel wall in the prediction of asymptomatic and vulnerable plaques. Furthermore, experimental and clinical studies have suggested the possibilities to treat atherosclerosis by bypassing the common way using cholesterol- and lipid-lowering drugs. Research efforts have been focusing toward the development of new classes of agents capable to act locally and to target the atherogenic components, and especially those involved in early lesion formation and vulnerable plaque rupture (6, 7). Nevertheless, despite beneficial advances in the understanding of the atherogenic molecular basis, opening the way to a plethora of promising novel targets, the development of new targeting agents more and more efficient is still in demand (6-12). This challenge has been advanced by the rising of

random screening technologies based on nanoparticles libraries (13, 14), combinatorial chemistry (15-17) and phage display (18-20). *In vivo* phage display has been particularly effective to lead to the identification of new target / ligand pairs specific to the vasculature of normal and diseased tissues, like in atherosclerosis (21-23). From these selections, some peptide sequences revealed homology with natural ligands and were able to recognize known or new targets expressed on the activated endothelial cell surface.

Even though peptide phage display is commonly used for the *in vivo* vascular targeting (24, 25), antibodies and especially antibody fragments can also be successfully selected (26, 27). We have chosen to take advantages of the ability of antibodies to recognize their target with high specificity and affinity to develop a novel *in vivo* biopanning strategy to interrogate both the endothelial cell surface proteins and the subendothelial molecular repertory expressed in atherosclerotic lesions of animal maintained in a high fat “western diet”. We identified several scFv sequences, both capable to recognize lesional protein extracts in a direct *in vitro* homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) binding assay, and to target rabbit and human atherosclerotic tissue sections *ex vivo* by immunohistological approaches. Through the targeting of intra-tissular molecules, this work on atherosclerotic mammalian models expands the field of the *in vivo* phage display selection applications, which may be extended to other disorders and especially to those with a strong angiogenic component. These scFvs may constitute the basis for the development of new clinical tools dedicated to the molecular imaging and therapy.

MATERIALS & METHODS

Animal models

All animal experiments were performed in conformation with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and accredited by the local ethic committee. Adult male New Zealand rabbits (NZW), weighing between 2.5 and 3.0 kg, and ApoE^{-/-} KO mice were obtained from Charles Rivers Laboratories (St Germain sur l'Arbresle, France). One group of rabbits was submitted for six to eight months to a fat atherogenic diet including 0.3% (w/w) cholesterol, whereas another group of untreated rabbits (control) was fed a standard laboratory diet. In order to promote the development of complicated plaques, rabbits were subjected, one to two months after the beginning of the diet, to an inflammatory surgical injury under anaesthesia (intramuscular injection of 20 mg/kg ketamin and 2 mg/kg xylazin). A de-endothelialization of the thoracic and abdominal areas of aorta was mechanically induced three times by inflation and drawing back of a 4F Fogarty balloon catheter (Edwards Lifesciences, Maurepas, France). Rabbit anaesthesia was maintained by mask inhalation of 0.25% to 0.35% isofluran, and preventive anti-thrombotic treatment was achieved using heparin sodium solution (1000 UI/ml) (Heparin Choay®, Sanofi Synthelabo, Paris, France). Analgesia was obtained with 100 mg of aspirin (Injectable Aspegic®, Sanofi Synthelabo). To promote advanced lesions in ApoE^{-/-} mice, animals were fed a high-fat Western-diet (0.3 % (w/w) cholesterol) for 24 weeks.

Human tissue specimens

Human carotid arteries were collected from carotid endarterectomy. Human coronary arteries were harvested from patients with end-stage heart failure having undergone heart transplantation. All the clinical interventions took place at Haut-Lévêque Hospital (Pessac, France). Human tissue specimens

were collected after informed consent. They were immediately processed, frozen at -80°C or embedded in paraffin.

Human ScFv phage library

Semi-synthetic scFv-fragment libraries were designed and constructed by P. Philibert and al. (28). Briefly, the library was created from a single optimized human scFv framework (13R4 scFv), by introducing an amino acid distribution and lengths in the CDR3 the closest as that observed in natural human CDR3 loops. Two sets of 13 VH libraries with CDR3 loops ranging from 5 to 17 amino acids and 5 VL libraries (κ + λ) with CDR3 loops ranging from 9 to 11 amino acids were then screened for their ability to be expressed in frame with fusion protein CAT enzyme on selective media before PCR assembling. The library was constructed in the phagemid vector pCANTAB6 in fusion with the N-terminus of the minor pIII protein. Its diversity is about 1.5×10^9 different variants.

Atheromatous proteins extraction and biotinylation

Aortas from normal and hypercholesterolemic NZW rabbits were extracted from the aortic arch to the iliac bifurcation, washed and fractioned in order to independently resuspend tissue proteins in four different lysis buffers: M-PER (Thermo Fisher Scientific, Brebières, France), T-PER (Thermo Fisher Scientific), low stringent lysis buffer (50mM HEPES, pH 7.4; 137 mM NaCl; 10% Glycerol; 1% NP-40 (v/v); 2 mM EDTA; 1 mM PMSF; protease inhibitors cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France)) and high stringent lysis buffer (50mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% (v/v) NP-40; 0.5% (v/v) Triton; 0.5% Na-Deoxycholate; 1mM EDTA; 1 mM PMSF; protease inhibitors cocktail). The homogenization is performed using firstly, a Polytron TP-20 Homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland) and secondly, a sonicator

(3 x 10 sec pulses at 80% magnitude). After twice centrifugations at 13,000 x g for 45' at 4°C to clear the supernatant of insoluble material, the concentration of every soluble protein extracts was determined using the Bradford assay kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Proteins from M-PER and T-PER extraction were then dialysed against low stringent lysis buffer for 16 h at 4°C and about 200 µg from four protein extractions were biotinylated with three different molar ratios of proteins / biotin-XX SSE (Invitrogen, Eragny sur Oise, France): 1:5, 1:10 and 1:20 in 100 mM NaHCO₃, pH 8.3 for 30 min at 4°C. Excess of reactive biotin was then quenched with 100 mM Glycine, pH 7.4 for 10 min at 4°C and the samples dialysed against low stringent lysis buffer for 16 h at 4°C.

In vivo biopanning in atherosclerotic mouse model

In vivo phage display selections were performed in ApoE^{-/-} mice. Three continuous flows (30 µl/min) of PBS containing each 1 x 10¹² colony-forming units (cfu) were injected into the tail vein of mouse for 5 min. After 5 min of phage circulation, the animal was sacrificed and perfused through the heart with 20 ml of PBS to ensure phage clearance from the blood. The aorta was then extracted from the aortic arch to the iliac bifurcation. The tissue was weighted, gently cut along the length and rinsed six times with 500 µl of cold DPBS. The endothelium cell surface bound phages (F1 fraction) were eluted with 100 µl of 0.1 M Glycine-HCl, pH 2.2 for 8 min at room temperature under gently agitation. After centrifugation at 500 x g, eluted phages were collected and immediately neutralized with 15 µl of 1 M Tris-HCl, pH 9.1 in a clean tube. Meantime, aorta was washed three times with 300 µl of PBS and the eluates pooled in the same previous tube containing 100 µl of 1 M Tris-HCl, pH 7.4. In order to access to intra-tissular phages (F2 fraction), aorta was dissociated with 900 µl of PBS (Ca²⁺, Mg²⁺ free) containing 2000 U/ml of collagenase type II and adjusted at 1 ml with 2.5% Trypsin-EDTA for 30 min at 37°C under agitation. The solubilizate was vigorously vortexed, centrifuged at 1000 x g for 10 min at 4°C and washed three times

with 400 μ l of PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} free). In addition, 250 μ l of 0.1 M Glycine-HCl, pH 2.2 was added to the cells homogenate and incubated for 8 min at room temperature under gently agitation. After centrifugation, eluted phages were collected and neutralized in a clean tube as described above. Three supplementary cell washings with 250 μ l of PBS were then carried out. Eventually, to access to internalized phages (F3 fraction), the homogenate was incubated with 500 μ l of 0.1 M TEA for 5 min at room temperature by vigorous vortexing. Neutralization was then done by addition of 250 μ l of 1M Tris-HCl, pH 7.4. After centrifugation at 1000 x g for 10 min, the supernatant was collected and the pellet containing the phages was washed twice more with 500 μ l of PBS. Phage fractions were separately rescued by infection of 25 ml of 2 x TY medium containing XL1-blue *E.coli* host (Stratagene, La Jola, CA) in log growth phase. After 45 min of infection, bacteria were centrifuged and spread onto 2 x TY Amp (100 μ g / ml) / Glucose (2% (w/v)) agar plates for 16 h incubation at 30°C. The phage libraries were then produced in 100 ml of 2 x TY Amp (100 μ g/ml) / Kana (50 μ g / ml) following super-infection with M13KO7 helper phage (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and for 16 h of incubation at 25°C. Phages were then purified from the supernatant culture by two precipitations with 0.2 vol. of solution containing 20% (w/v) PEG 8000, 2.5 M NaCl. Eventually, the pellet containing phage particles was resuspended in a final volume of 500 μ l sterile cold PBS and passed through a 0.22 μ m pore-size filter. The titer of each production was around 5×10^{13} cfu/ml. Two additional rounds of selection and amplification into subsequent mice were performed with respectively 1×10^{11} and 1×10^{10} cfu. Plated bacterial clones from the second and third rounds of biopanning were randomly picked for nucleotide sequence analysis (Millegen, Toulouse, France) by using LMB3 primer (sequence, CAGGAAACAGCTATGAC) corresponding to the pCANTAB6 phagemide sequence downstream of the scFv insert. Sequence translation, comparison and alignment were done using IMGT/V-QUEST database (Lefranc 2009; <http://imgt.cines.fr/>).

Soluble scFv production from bacterial culture

Selected XL1-blue clones cultured for 5 h in 500 μ l of 2 x TY Amp (100 μ g / ml) / Glucose (2% (w/v)) in 2 ml masterblock (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France) were super-infected with M13KO7 helper phage for 45 min. After centrifugation and removal of the supernatant, pellets were resuspended in 1 ml of 2 x TY Amp (100 μ g / ml) / Kana (50 μ g/ml) and an aliquot of each culture was spread onto 2 x TY Amp / Kana agar plates. Isolated bacterial clones were then incubated for 16 h in 500 μ l of 2 x TY Amp / Kana at 25°C to induce phages production. After two successive centrifugations, 1 μ l of phage-containing supernatant was used to infect 20 μ l of HB2151 *E.coli* host (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) in log growth phase. After 45 min infection, bacteria were plated onto 2 x TY Amp (100 μ g / ml) / Glucose (2% (w/v)) and incubated for 16h at 30°C. Selected HB2151 clones were then cultured in 2 x TY Amp (100 μ g / ml) / Glucose (2% (w/v)) until reaching the log growth phase. After spinning, the scFv production from bacterial pellet was induced in 50 ml of 2 x TY Amp (100 μ g / ml) / Glucose (0.1% (w/v)) / IPTG (200 mM) for 16 h at 25°C.

ScFv purification on Nickel-affinity chromatography

Fifty ml of HB2151 cell culture were pelleted by centrifugation and the pellet resuspended in 1:10 (v/v) of ice-cold osmotic choc buffer (1M Tris-HCl pH 8, 1 mg / ml Lysozyme, 1mM PMSF, protease inhibitors cocktail (Roche Diagnostics)) for 1 h at 4°C on rotary shaker. Bacterial lysis was then performed by two cycles of sonication of 3 x 10 sec pulses at 80% magnitude. After centrifugation at 20,000 x g for 30 min at 4°C to remove insoluble material, 6His-tagged scFvs from the supernatants were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using Ni-NTA resins (Pierce, Bezons, France) (27) and monitored by the Biopilot Chromatographic System (Amersham Biosciences, Saclely, France). Briefly,

after equilibration of the column with running buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0) and samples loading, a two-step elution was performed. The first one was achieved in the presence of 25 mM imidazole (pH 7.0) to remove unspecific binding on nickel column, and the second one with 250 mM imidazole (pH 7.0) to elute nickel-bound scFvs in four to five 1ml-fractions. Each recovered 1 ml fraction was evaluated for its proteins content by absorption at 280 nm and then dialysed against PBS for 16 h at 4°C.

HTRF ScFv binding assays

Binding assays between scFvs and atheromatous protein extracts were assessed by Direct HTRF® (homogeneous time resolved fluorescence) assay (Cisbio International, Bagnols-sur-Cèze, France). Black Fluotrac 600 microplate (Greiner) was coated with 10 µl of scFv (final concentration enclosed between 3 and 10 µg / ml according to the clone) in 0.1 M NaHCO₃, pH 8.6 for 16 h at 4°C. Subsequently, plates were blocked for 3 h at 4°C using 1% BSA (w/v) in PBS solution. Following washing in PBS, 30 µg / ml of biotinylated atheromatous proteins extract in 1% BSA / PBS was incubated for 16 h at 4°C. After washing in PBS, were incubated in 100 µl of reaction volume: 50 µl of reaction buffer (100 mM HEPES, pH 7; 200 mM Tris-Krebs buffer; 0.1% BSA), 4 nM of anti c-myc-(Eu)K (Cisbio International) and 4 nM of streptavidin-XL665 (Cisbio International). FRET signal emission was measured and monitored with Infinite® F500 reader (Tecan, Lyon, France) on a 40 h time course. The % DeltaF values reported the intensity of the direct binding between scFvs and proteins extract.

Inhibition assays of the direct HTRF binding signal was performed after 16 h of incubation at 4°C in the presence of 2.5 x, 5 x, 6 x quantity excess of unlabelled proteins extract from atherogenic animal and 6 x excess of proteins extract from healthy animals. The fluorescence emission signals were measured in the absence of competitor (100% DeltaF binding) and in the presence of unlabelled proteins.

Nickel-purified scFv fractions were tested beforehand for their ability to inhibit HTRF sandwich emission signal of biotin-c-myc peptide. The reaction was set up in 96-halfwell black plates (Greiner) and in 100 μ l of reaction volume containing 50 μ l of reaction buffer (100 mM HEPES, pH 7; 200 mM Tris-Krebs buffer; 0.1% BSA), 0.4 nM of anti c-myc-(Eu)K (Cisbio International), 5 μ l of scFv (final concentration enclosed between 50 and 170 nM according to the clone), 1.25 nM of streptavidin-XL665 (Cisbio International), and 5 nM of biotin-c-myc peptide (Cisbio International). The fluorescence emission was measured on a 24 h time course after incubation at 4°C. The % DeltaF values of competitor-free wells was used as the maximal value activation (=100%).

The HTRF measures were expressed as the ratio of the emission intensity at 665 nm to that at 620 nm x 10,000. The ratio were then normalized by subtracting value obtained from control-wells, followed by calculation of percent of activation (% DeltaF) by dividing the normalized ratio by control-well values x 100. For the direct and inhibition binding assays, the control-values were obtained from signals generated in the absence of scFvs coating. For the inhibition sandwich binding assay, the control-values were determined in the absence both of biotinylated c-myc peptide and scFvs.

ScFv immunohistochemical analysis on rabbit and human sections

Paraffin-embedded sections were prepared from rabbit and human arterial tissues. Briefly, sections of 10 μ m thick were deparaffinized and re-hydrated before neutralizing endogenous peroxidase activity with 3% H₂O₂ / H₂O for 5 min. Non-specific binding was then blocked with 4% (w/v) BSA in PBS solution for 30 min at RT. Positive scFv fractions in HTRF sandwich assay were diluted in 2% BSA / PBS (final concentration between 5 and 12.5 μ g / ml according to the clone production) and incubated on sections for 16 h at 4°C. Following washings in PBS, a mix of 1/250 anti c-myc (Miltenyi Biotec, Paris, France) and 100 mU / ml of anti 6His (Roche) mAbs in 4% BSA / PBS were applied to the sections for 3 h at RT. After

washings, the sections were incubated with 1.6 µg / ml of HRP-conjugated anti-mouse IgG (Immunotech, Marseille, France) for 1 h at RT. The binding of secondary antibody was detected with DAB substrate kit (Vector laboratories, Peterborough, UK), which yields a yellow brown colour reaction. After washings, the sections were dehydrated and mounted in DPX medium.

H2.1 scFv competitive binding assay on rabbit atherosclerotic aorta sections

Specificity of H2.1 scFv binding on tissue sections was also assessed by a competitive binding assay to inhibit staining generated by the biotinylated form of H2.1 scFv. 200 µg of scFv were biotinylated according to a molar ratio protein / biotin-XX SSE of 1:10 as described in a previous section. 50 µg of biotin-H2.1 scFv were then incubated on atherosclerotic NZW rabbit sections with or without a 4 x quantity excess of unlabelled H2.1 scFv in 4% BSA / PBS for 16h at 4°C. Following washings, biotinylated scFv binding was detected using 5 µg / ml of streptavidin-peroxydase conjugate (Vector laboratories) and DAB substrate (Vector laboratories).

RESULTS

In vivo phage-scFvs selection

To isolate human phage-scFvs able to home to atherosclerotic plaques, we used an ApoE^{-/-} mouse model that, maintained on a high fat “western diet”, develop advanced lesions mimicking the pathophysiological aspects of coronary artery disease observed in humans (29). We choose to perform three successive injections of five minutes time circulation each to promote the chance of phages of interest to reach their target without being unspecifically adsorbed both on luminal surface of vascular endothelium cells and on circulating proteins, and to avoid their clearance from the blood by the reticuloendothelial system (30). Furthermore, we reasoned that during the *in vivo* selection a subtractive procedure of the library takes place naturally at the unaffected sites.

To have access to the endothelial cell surface, extravasated and internalized, binding phages, we independently recovered three fractions from aortic tissue (**Figure 1**). From the second and third rounds of selection, the number of recovered colony forming units (cfu) from affected tissue markedly increased relative to the first round (**Figure 2**). The enrichment of phages rescued after the third round was about 100-, 10- and 5-fold higher than that recovered from the first round of selection for both F1, F2 and F3 fractions respectively, underlining the probable selection of phages specific to endothelial and sub-endothelial targets (**Table 1**). Following the two last rounds of selection, the random sequencing of 150 clones revealed three over-represented amino-acid sequences, representing for two of them 10% and for the third one 8% of the sequenced clones in the screen. Three other amino-acid sequences that appeared more than once were also reported (**Table 1**). None of the scFv bearing these sequences was detected in the sequenced clones from the second round of biopanning, showing that the *in vivo* phage display selection pressure was not high enough in the second round, regarding the huge diversity of

targets. Sequence analysis of these six scFvs using IMGT/V-QUEST database revealed six unique sequences whose both CDRH3 and CDRL3 loops enclosed variability in amino-acid composition. Regarding CDR length, the three dominant clones showed a similarity both in CDRH3 length (13 residues) and CDRL3 length (10 residues), lengths that represented the fifth representativity of CDRH3 and the first and the third of CDR3L κ and CDR3L λ respectively, in the original library (Philibert 2007). The other clones displayed CDRH3 length much more variable, whereas the CDRL3 loops enclosed systematically 9 amino acids. We also noted that among the three dominant clones, H2.1 scFv was mostly found in the F2 fraction, whereas the C3.3 scFv clone was not detected in the F3 fraction, thus excluding possible contaminations between fractions. (**Table 1**).

ScFv purification and inhibition of HTRF sandwich binding signal

To have access to higher concentrations of antibody fragments, the six scFvs were produced in soluble form using a non-suppressor *E.coli* strain and purified from the induced bacterial lysates by nickel chromatography affinity (**Figure 3A**). The lane 2 of this figure illustrates the purification of one of our scFv, H2-1, showing that our procedure allowed us to obtain pure scFv preparations. In order to test the feasibility to detect interactions between purified scFvs and atheromatous protein extracts, we developed a high sensitive binding assay from HTRF technology. In this test, the scFvs were investigated for their abilities to inhibit the positive HTRF sandwich signal generated by a biotinylated c-myc peptide (**Figure 3B**). In the absence of competitor, the positive sandwich signal was taken as 100%. Every fraction from each purified scFv was incubated with the biotin-c-myc peptide, and the time course of competition was measured for 24 h. The results showed that the highest concentrated fraction from each scFv was capable to compete for the c-myc-tag by inhibiting the signal by 50 to 95% after 16 h of incubation according to the purified clones. In these fractions, final concentrations of scFvs were estimated

between 50 and 170 nM according to the clone production and purification. This set of experiments showed that purified scFvs could easily be detected in a HTRF assay and subsequently be used in a direct HTRF screening assay for their abilities to recognize atheromatous proteins extract.

HTRF binding assay between scFvs and atheromatous protein extracts

Confronted with the limitations of the classic screening approaches from soluble tissue extracts or cell cultures (31), which are both time- and material-consuming, a very sensitive HTRF (32) screening method based on the direct binding between purified scFvs and atherosclerotic tissue lysate was set up. Firstly, rabbit tissue proteins were solubilized in four different buffers constituted of non-ionic and / or anionic detergents in order to access to a wide panel of proteins. Every protein extract was then biotinylated according to three different molar ratios of proteins / biotin so as to yield a panel of labelling. The totality of these reagents was pooled according to a 1:1 (v/v) ratio and then examined in a direct HTRF binding assay. In order to determine the feasibility to use the biotinylated proteins pool in such assay, we previously analyzed the ability of biotin-labelled proteins to inhibit the positive sandwich signal generated by the biotin-c-myc peptide. Final concentrations of biotinylated atheromatous proteins at 0.1 and 1 µg / ml were capable to inhibit the signal by 80 and 100% respectively after 16 h of incubation at 4°C (data not shown).

In order to detect the specific fluorescence signal over background, the acceptor fluorophore streptavidin-XL665 needed to be used in a nM final range of concentration (33 and unpublished results). Direct HTRF binding assay was monitored on solid phase so as to eliminate uncomplexed biotinylated proteins with scFvs and thus avoiding trapping of the fluorophore acceptors by the abundant and unspecific proteins. In these experimental conditions, streptavidin-XL665 could be used in a nM range. Consequently, the six purified scFvs were pre-adsorbed on wells and independently incubated with

biotinylated protein extracts. After washing out of unbound proteins and incubation with both fluorophore reporters, the time course of the assay revealed a positive FRET signal stable for at least the first 40 h for four of six purified scFv, consequently suggesting that four scFvs were able to recognize a partner present within the protein soup (**Figure 4**). F5.1 scFv was certainly not concentrated or pure enough to be detected in this assay, whereas concentrated K3.24 scFv was not able to bind partners in the extracts. It needs to be taken in consideration that the DeltaF signals were not only proportional to the scFv concentration but also to the abundance of the atheromatous partner in the tissue extracts. These FRET signals were absent or very weak when the HTRF approach was achieved in liquid phase, without coating and washing steps (data not shown).

To further confirm the specificity of the FRET signal recorded on the atheromatous proteins, a new set of experiments was carried out in the additionally presence of unlabelled proteins extract used as competitor (**Figure 5**). As expected, an unbiotinylated atherosclerotic proteins dose-dependent inhibition was observed and a six times excess of unlabelled proteins was able to quench the DeltaF binding values of approximately 75%, 80% and 60% for H2.1, I8.1 and K3.1 scFvs respectively (**Figure 5A**). Moreover, the same experiments performed with a six times excess of proteins extracted from untreated control rabbits revealed also an inhibition response, but weaker, around 50%, 35% and 40% for H2.1, I8.1 and K3.1 scFvs respectively (**Figure 5B**). These last results suggested either that scFvs recognized a binding partner expressed in the rabbit “normal” vascular wall but over-expressed in lesional tissue, or and more probably that the proteins extract from the control rabbit displayed a pro-atherogenic phenotype. Altogether, these experiments demonstrated that at least three selected scFvs were able to recognize intimal partners over-expressed in diseased tissues.

Immunohistochemical localization of scFvs on aorta sections

ScFvs responding positively to the direct HTRF binding assay were tested for their abilities to target *ex vivo*, rabbit and human atherosclerotic arterie sections. These sections were obtained from thoracic and abdominal aorta regions in hypercholesterolemic rabbits that were subjected to a chirurgical injury in order to display advanced and complicated lesions. Indeed, endovascular local injuries are well-known to potentiate atherogenesis and to improve reproductability of the induced lesions (Weidinger, 1991, Circulation, Rekhter, Circ Res, 1998). This model is well suited to the mimicking of the vulnerable plaque formation in humans (Stary, 2000, ATVB). Deparaffinized sections of the rabbit thoracic region were incubated with selected scFvs and the binding then revealed by immunohistochemistry. A labelling was observed for all of them, with however scFv-specific binding patterns (**Figure 6**). Although a diffuse extracellular labelling was found within the intima (**Figure 6A and B**), H2.1 and K3.1 scFvs stained intensively an area rich in macrophage- and smooth muscle cell-derived foam cells under endothelium and another area rich in necrotic cells adjacent to the internal elastic lamina in the advanced lesion (**Figure 6A1, A2, B1 and B2**). This staining was comparable to that observed with anti-macrophage RAM11 mAb (**Figure 6F**). Unlike staining patterns obtained with H2.1 and K3.1 scFvs, I8.1 scFv stained mostly endothelium and superficial subendothelial layers, whereas a weak labelling was detected in the deeper intimal layers and in the adventitia (**Figure 6C1 and C2**). C3.3 scFv staining appeared much more localized beneath the endothelium, especially in lipid and necrotic cores (**Figure 6D**). Regarding the K3.24 scFv clone, there was no detectable binding through the section (**Figure 6E**).

To further confirm the specificity of H2.1 scFv binding on atherosclerotic sections, a biotinylated version of this scFv was co-incubated in the presence of a four times excess of unlabelled H2.1 scFv (**Figure 7**). The revelation with the streptavidin-HRP conjugate showed a net decrease of the staining (**Figure 7B1 and B2**) relative to that obtained in the absence of competitor (**Figure 7A1 and A2**), illustrating the inhibition of biotin-H2.1 scFv binding by its homologous unlabelled H2.1 scFv.

Standard NZW rabbit diets are not classically considered to be favorable for promoting atherosclerotic lesions formation. However, after a long life in laboratory, rabbits are spontaneously susceptible to develop atheromatous lesions besides apparently healthy areas. We observed such modifications in our untreated control rabbits. Staining with H2.1 scFv was predominantly associated with neointimal macrophage foam cells, although diffuse intimal labelling was also observed (**Figure 8A1** and **A2**). I8.1 scFv bound mainly the endothelium cell surface of the early atheroma, even though a diffuse weak staining was also seen through the intima (**Figure 8B1**). Interestingly, the aortic regions without neointimal lesions in the same animal did not reveal intense staining with H2.1 and I8.1 scFvs, although a weak binding was seen on some endothelial cells, highlighting the pro-atherogenic state of this control rabbit (**Figure 8A3** and **B3**).

H2.1 and I8.1 scFvs were also incubated both onto human sections of carotid and coronary arteries obtained from endarterectomy and cardiac transplant recipients respectively. Both arteries showed atherosclerotic lesions, the coronary artery presenting with more advanced lipid cores formation (**Figure 9**). Both scFvs exhibited binding patterns very close to those observed onto rabbit atheroma sections. The localization of H2.1 scFv occurred predominantly within the foam cell-rich regions in carotid (**Figure 9A1**) and in the necrotic lipid-rich areas of coronary artery (**Figure 9A2**). I8.1 scFv staining was concentrated on the endothelium and the adventitia in the carotid (**Figure 9B1**) and the coronary arteries (**Figure 9B2**), whereas a weak staining seemed also to be seen in necrotic cores of coronary artery. Taken altogether, these analyses confirmed that the selected scFvs were able to specifically home to atherosclerotic lesional sites in rabbit but also in human. In addition, the staining patterns were different according to the scFvs and to the stage of lesion development. The lack of binding within the aortic sections displaying a normal intima suggested that recognized binding partners were certainly absent in the intima or weakly expressed on the pro-atherogenic endothelium.

DISCUSSION

Clinical trial data clearly documented that lipid-lowering therapies are a potent way to reduce the risk of cardiovascular events (34-36). However, many individuals develop coronary heart disease in the absence of abnormal lipoprotein profiles (37-38), and in practice the treatment with statins (inhibitor of endogenous cholesterol biosynthesis) reduces at best the risk of coronary heart disease of only about one third (39-41).

Besides, it is now well accepted that sudden cardiovascular events often result from plaque rupture at sites with no or only modest arterial stenosis at angiography, underlining that the plaque composition rather than the degree of narrowing is a critical determinant of the vulnerability and thrombogenicity (42). Altogether, these studies highlighted that the diagnosis and treatment of atherosclerosis may be greatly improved through the development of agents targeting directly the atherogenic mediators located within the intimal wall.

With the isolation of genes encoding human variable Ig regions, their successful expression in *E.coli*, the introduction of phage display technology (43) and the use of transgenic mice for the human Ig locus (44), the task of selecting fully human antibodies for clinical applications has been greatly improved (45). Selection by phage display is today the most used and the best-established technology for the selection of such antibodies (46). Nevertheless, *in vivo* phage display is a panning procedure that offers the advantages to interrogate directly into living animals the molecular repertory of vascular endothelium irrigating a particular "normal" or "diseased" tissue. Unlike the *in vitro* phage display selection on isolated targets that allow to identify only one single family of binders, *in vivo* selection, through the wide panel of markers targeted on vasculature, allows to select several groups of homing moieties, thereby offering a larger choice of new target / ligand pairs (47-49). Most of the *in vivo* procedures use

random phage libraries expressing short peptides on their surface (21, 22), and in spite of a few reported works (26, 27), an ambivalence persists on the efficiency or the difficulties to use antibody fragment libraries associated to an *in vivo* selection strategy. Nevertheless, antibodies exhibit apparent advantages over other binders, especially through their high specificities and affinities for their antigens, and their long half-life *in vivo*.

Taking advantages of antibody properties, we report here the use of a semi-synthetic human scFv library (28) to interrogate the molecular repertory expressed within atherosclerotic lesions under *in vivo* conditions. To optimize this selection, we decided to perform three successive injections for 5 min so as to improve the opportunity of phages-scFv of interest to reach and target the affected sections, avoiding their unspecific depletion by the rest of the vasculature (**Figure 1**). Moreover, previous works raised the hypothesis that a negative selection should taken place in the arterial tree, trapping common ligands to all vascular endothelium and letting the unbound ligands to reach the tissue-specific targets. Furthermore, circulating time of three times 5 min fitted both with the serum half-life of phages of around 15 min (30) and the conditions for ligand-induced receptor internalization (50). Besides, after 15 min, the phages are beginning to accumulate in the organs of reticuloendothelial system so as to be degraded (30).

An important limitation to the *in vivo* phage biopanning approach would be that only the targets covering the vasculature surface could be accessible, since the extravasation of phages toward subjacent tissues has been suggested as being strongly limited (51). Nevertheless, Molenaar et al. showed that a small proportion of phages could be uptaken by subendothelial parenchymal cells (50). In our study, we eluted only twice less phages on the vascular surface area than within the subendothelial intimal tissue and that from the first round of selection (data not shown). One of most important hallmarks of the progression of atherosclerotic plaques is the proliferation of a dense microvascular network of vasa

vasorum that extends deeply from the adventitia and outer media towards the intima (52, 53). In the advanced lesions, these neoformed vessels are poorly invested by smooth muscle cells, discontinuous, leaky and fragile, which suggest that the short circulation times used in our study were lengthy enough for letting phages from the circulation reach the deep layers of intima. Consequently, our experimental conditions allowed selecting the scFvs stripped both from the endothelial cell surface (F1 fraction) and the subendothelial cellular and extracellular matrix (F2 fraction) and at last the scFv endocytosed in the cells invading the intima (F3 fraction) (**Figure 2, Table 1**). The identification of the same scFv sequences in several fractions suggests the presence of targets expressed both by endothelial cells and others cell types. Obviously, future directions would need to specifically identify the components recognized by these scFvs, whose patterns of (over)expression show a spatial- and temporal-dependence (**Figure 6 and 8**).

Unlike *in vivo* selections performed with random peptide libraries, which often allow identifying positive peptides from significant similarities with known receptor ligands, the selection of potential scFv binders is markedly more complex and requires the development of robust and reproducible screening approaches. To get round these difficulties, we incremented a high sensitive fluorescent screening assay allowing identifying scFvs able to recognize partners present within an atheromatous protein lysate. FRET signal requires the close vicinity of two fluorophores, each recognizing one binding partner, which greatly limit the emission of non-specific signals (32). HTRF technology combines the homogenous assay format of FRET with the low background benefit of TRF (Time-Resolved Fluorescence) using lanthanides with extremely long half-lives. Taking advantages of detecting purified scFvs in a competitive HTRF sandwich assay for the c-myc tag accessibility (**Figure 3**), and using a wide panel of solubilization and labelling conditions of protein extracts, we showed that after washing out of unrecognized atheromatous proteins, a specific HTRF signal could be detected for four scFvs (**Figure 4**). Furthermore, the specificity of these signals could be demonstrated through the inhibition of about 70% of

fluorescence emission for three scFvs in the presence of six times amount excess of unlabelled atheromatous proteins over labelled proteins after 16 h of incubation (**Figure 5A**). The same experiment carried out with an excess of unlabelled aortic proteins from control rabbits fed a normal diet showed a lower signal inhibition, around 50% (**Figure 5B**). The largest difference of signal inhibition between the incubations with the atheromatous proteins and “healthy” proteins was observed with the I8.1 scFv clone, a difference around 35%. These last results suggested that probably the four months old control rabbit was in an early stage of lesions formation, an intimal thickness that is known to arise spontaneously in rabbit (54). This hypothesis was confirmed by immunohistochemical analysis from the untreated control rabbit aorta sections that displayed a foam-cell rich intimal thickness in some areas (**Figure 8**).

In the binding assays, HTRF signal intensities were not directly proportional to the abundance of the target in the plaques, but depended also on experimental conditions of the extraction, solubilization and labelling of tissue components and on scFvs purification and concentration.

Indeed, for example the F5.1 scFv weakly detected in the competitive HTRF sandwich assay (**Figure 3**) was probably not concentrated or pure enough to detect it in the direct HTRF binding assay, regarding the low abundance of individual targets in the mixture of atheromatous proteins. However, this approach may easily be adapted to high throughput screening (HTS) methods of binders against known and purified targets. We are thinking that in these conditions, the limiting ligand purification steps could not be required. Since the main vector of phage display approach is a recombinant virus particle, it will be very interesting for HTS assays to determine if scFv-ligand displayed on the particle surface could generate a HTRF binding signal in the same conditions. Currently, our laboratory aims to explore such an approach.

To further validate the *in vitro* HTRF binding signals obtained from scFvs, we achieved *ex vivo* immunohistochemistry analysis on rabbit and human atherosclerotic tissue sections. Interestingly, the four positive HTRF scFvs were able to stain diseased sections, whereas negative HTRF K3.24 scFv revealed no detectable binding. In advanced and complicated plaques observed in diseased rabbit and human, staining with H2.1 and K3.1 scFvs was predominantly associated with areas both rich in macrophage- and smooth muscle cell-derived foam cells and rich in necrotic cores (**Figure 6, 7 and 9**). In early atheroma in control rabbit, H2.1 scFv staining was closely associated with neointimal macrophage foam cells (**Figure 8**). I8.1 scFv stained essentially endothelium cell surface and superficial subendothelial layers of early and advanced lesions in rabbit and human, whereas the C3.3 scFv staining appeared much more localized around lipid and necrotic cores (**Figure 6, 8 and 9**). The lack of staining obtained with H2.1 and I8.1 scFvs in the non-lesional areas of control rabbit strongly suggested that binding partners were certainly absent or weakly expressed in this pro-atherogenic intima and underlined that selected scFvs targeted specific markers of atherogenic state (**Figure 8**).

These observations highlighted that the scFvs were able to target independent markers expressed in specific regions of intimal lesions, binding that was highly dependent on the stage of advancement of plaque formation. Moreover, the same pattern of staining was observed in diseased rabbit and human with every scFv, suggesting that the targeted molecules were common to two species (**Figure 6, 7 and 9**).

Altogether these results showed that *in vivo* biopanning strategy makes possible the interrogation of markers (over)expressed both on the atherosclerotic endothelium cell surface but also into the subjacent lesional tissue layers, clearing up the doubt that an insufficient proportion of phages was able to extravasate through vascular wall. The access to the cell surface proteins, secreted mediators and extracellular matrix proteins of the lesional subendothelial space opens the door to the discovery of a

new molecular repertoire and the identification of novel targeting moieties. ScFvs reported here, and especially those capable of homing to subendothelial tissue offer real new opportunities for the molecular targeting strategies. They may have interesting applications both as imaging agents in individuals at risks and in the monitoring of the disease progression, but also as therapeutic vectors for the local drugs or gene delivery (55, 56).

Table

Table 1. Selected clones after the third round of panning and number of identical sequences found into each extracted fraction

| Clone | Round 3 | | | Final Frequency (%)* |
|-------|---------|----|----|-------------------------|
| | F1 | F2 | F3 | |
| H2.1 | 2 | 8 | 5 | 10 |
| C3.3 | 9 | 6 | 0 | 10 |
| K3.1 | 5 | 3 | 4 | 8 |
| F5.1 | 1 | 3 | 4 | 5.3 |
| I8.1 | 1 | 1 | 3 | 3.3 |
| K3.24 | 2 | 0 | 0 | 1.3 |

*The sequence frequency represented the number of identical sequences identified from the pool of sequenced clones from the round 3.

Figure 1

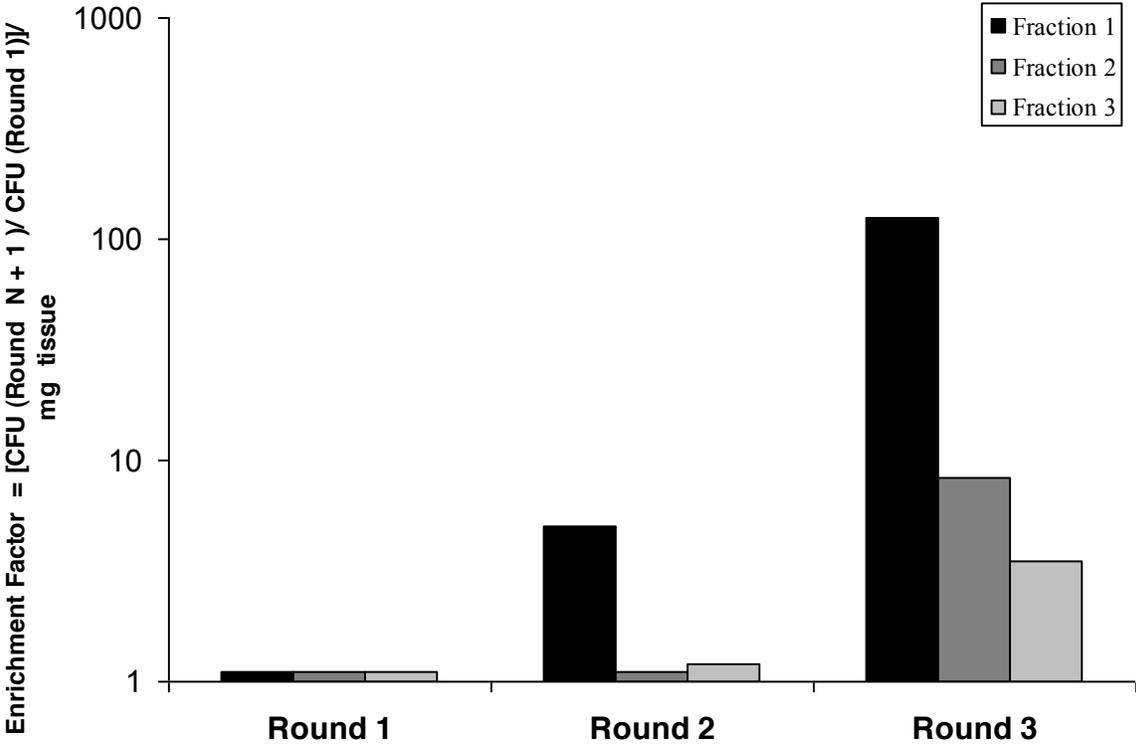


Figure 2

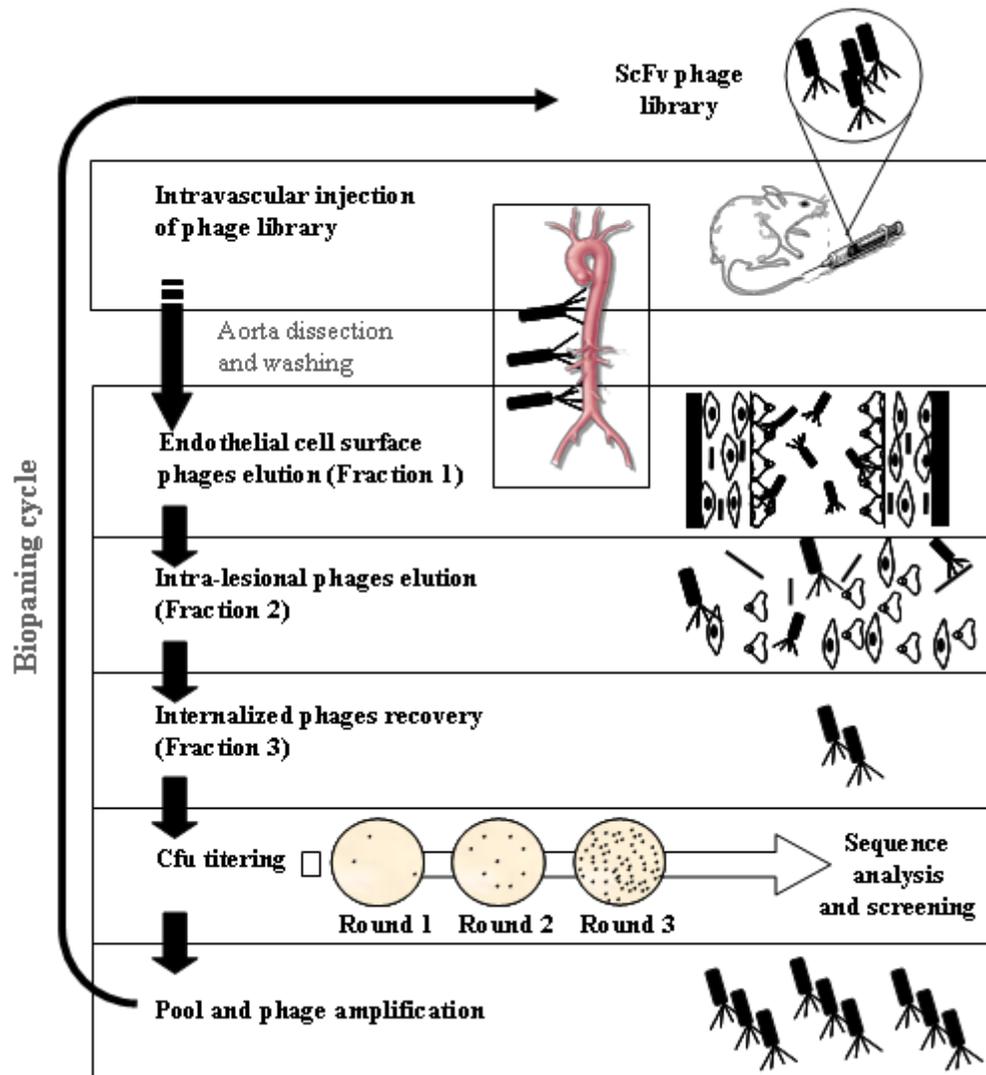
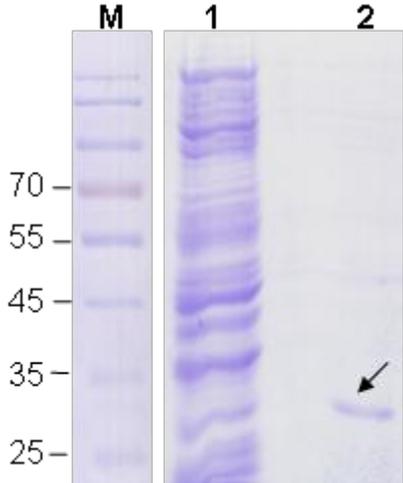


Figure 3

A



B

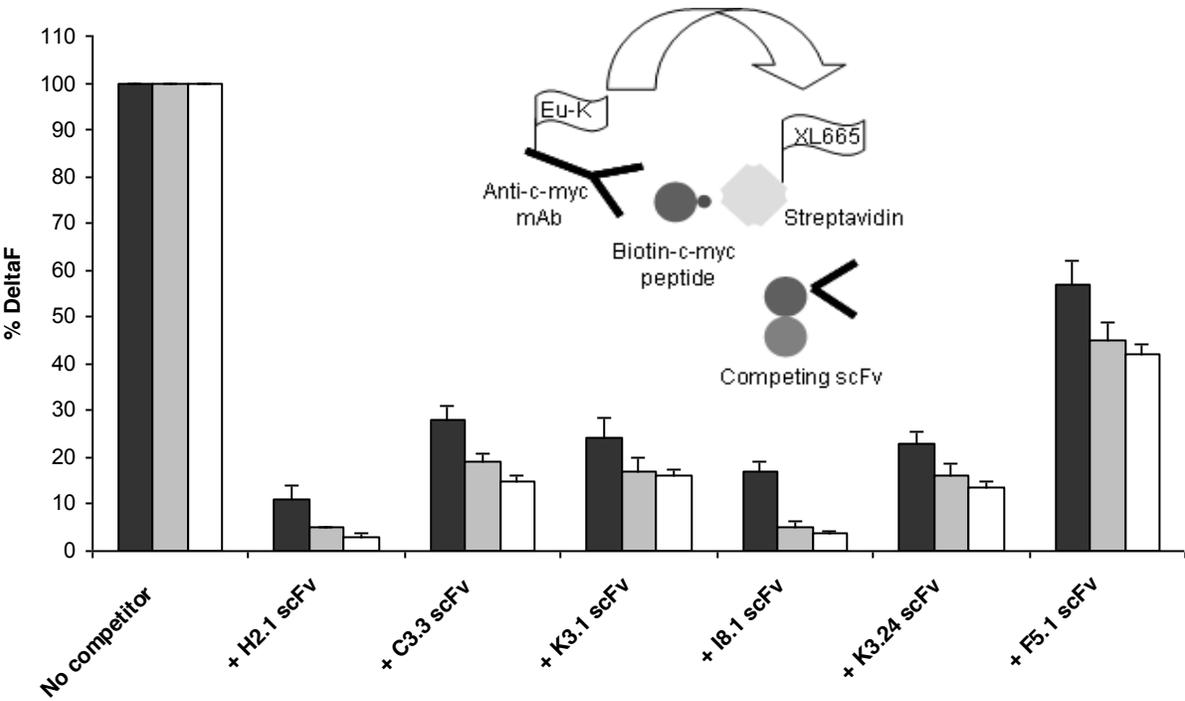


Figure 4

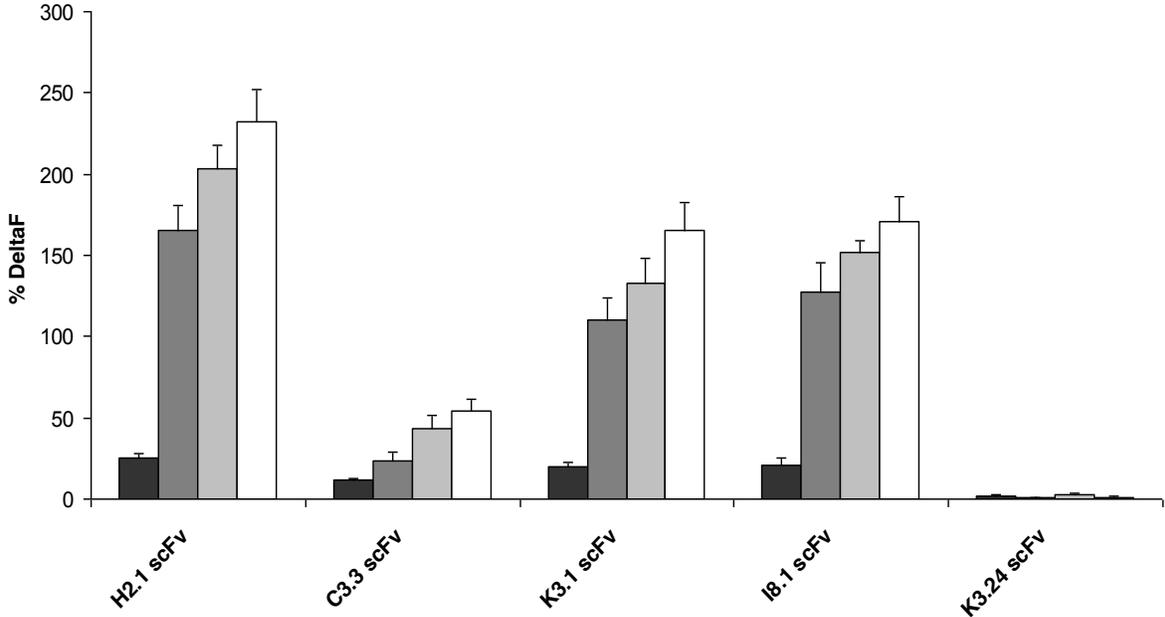
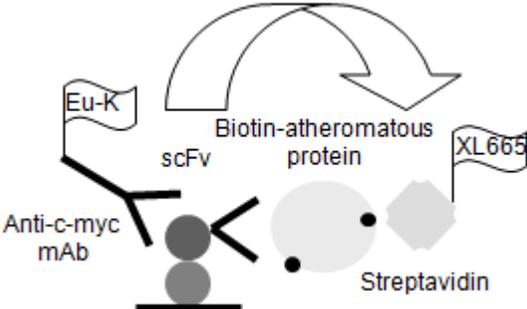
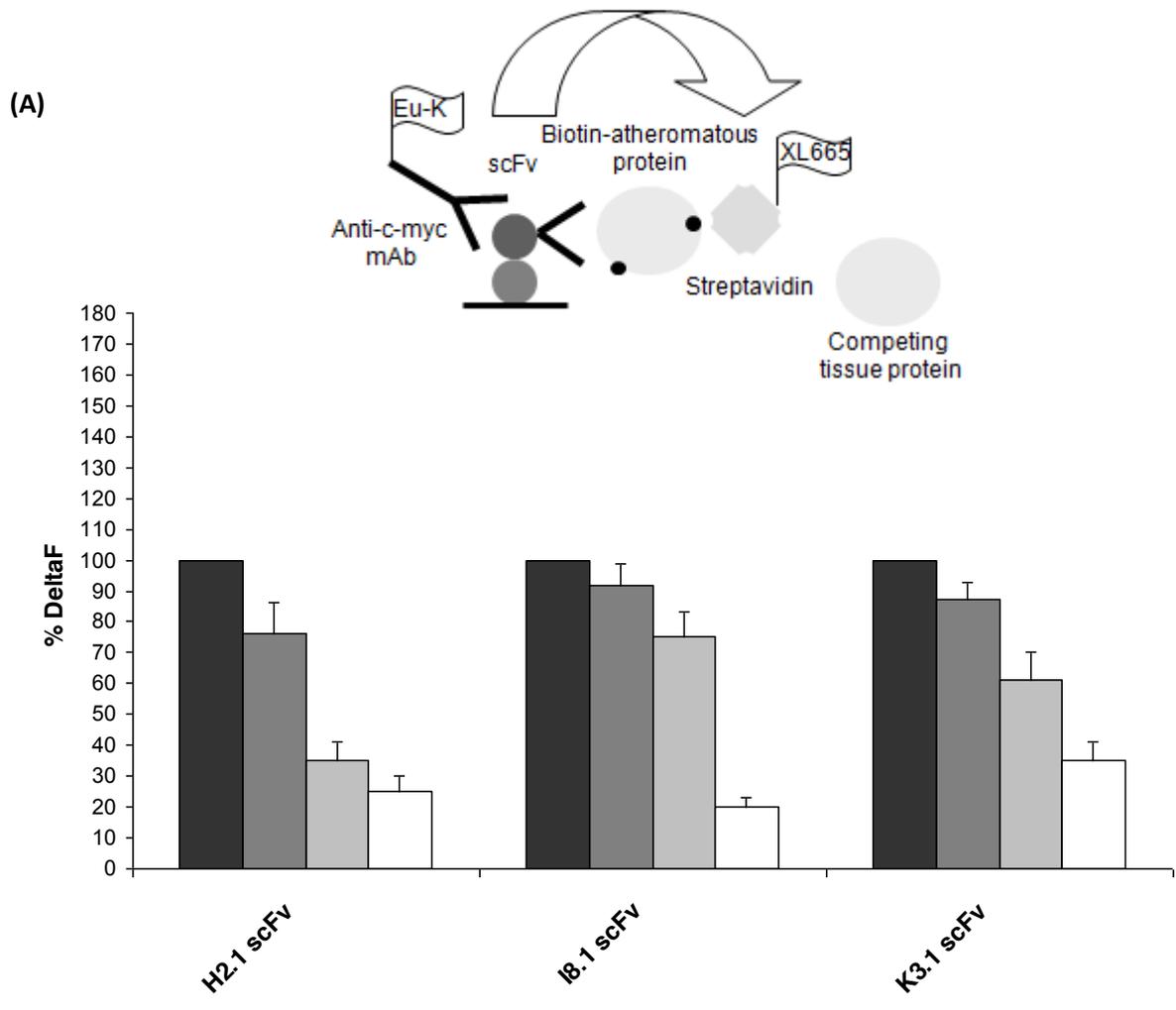


Figure 5



(B)

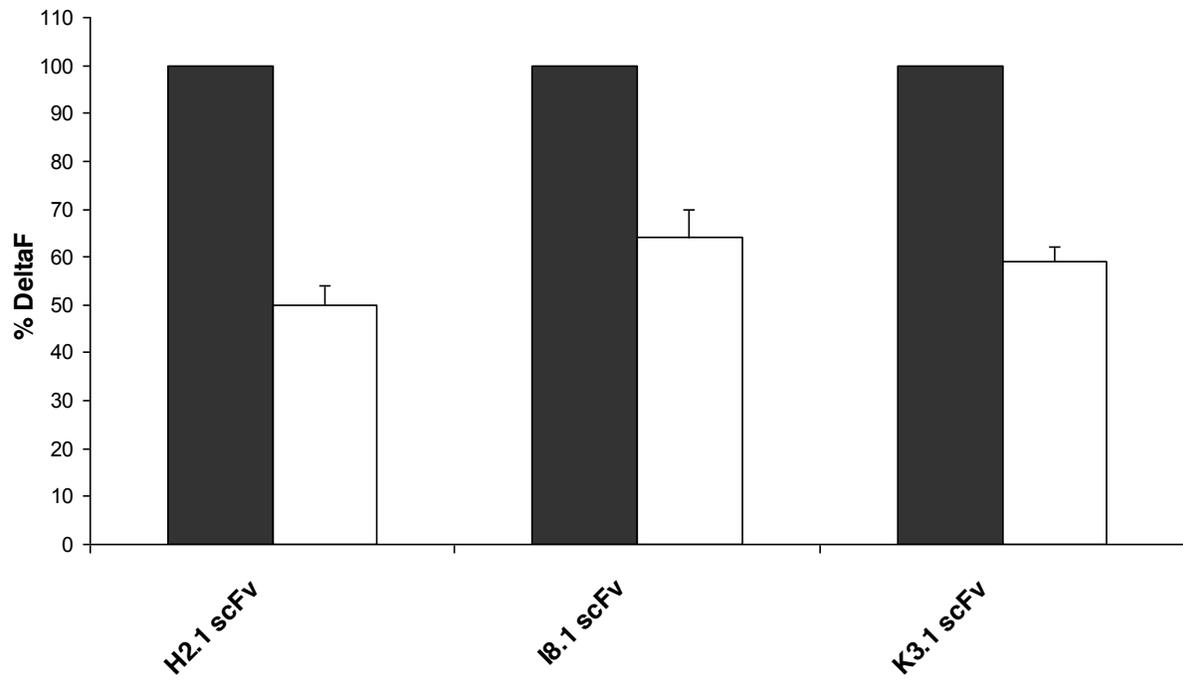


Figure 6

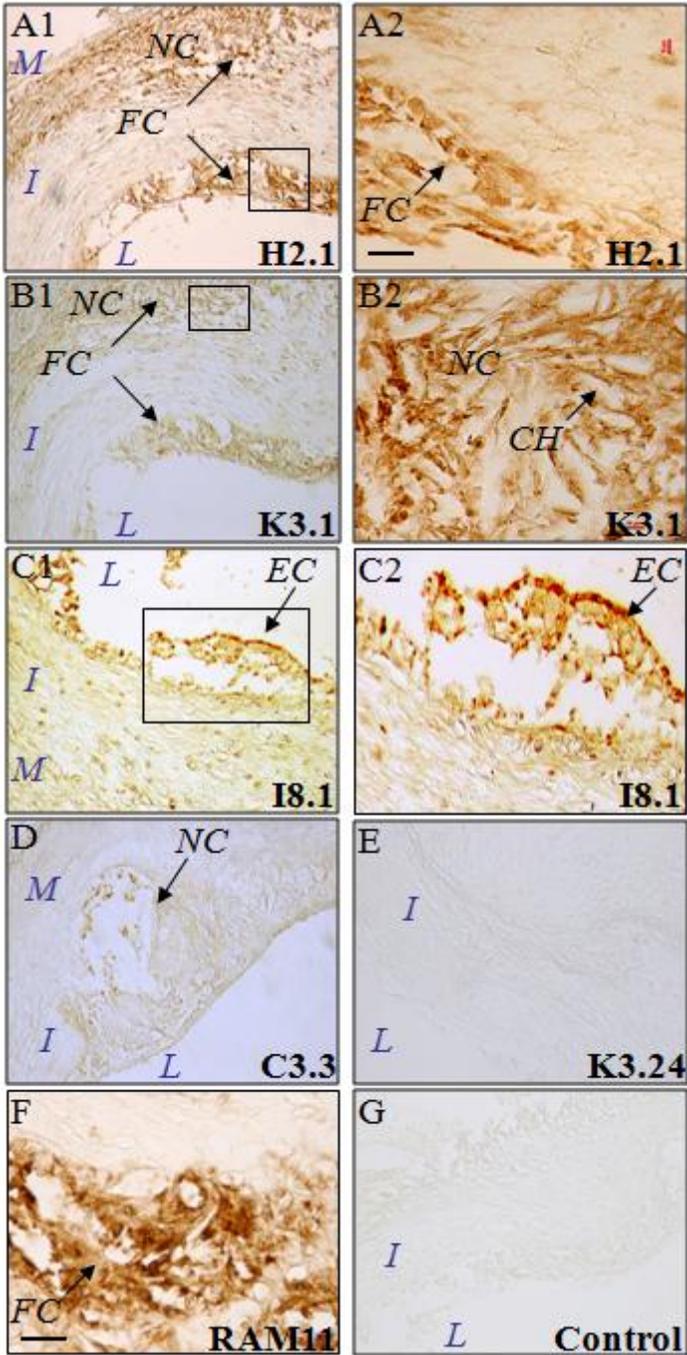


Figure 7

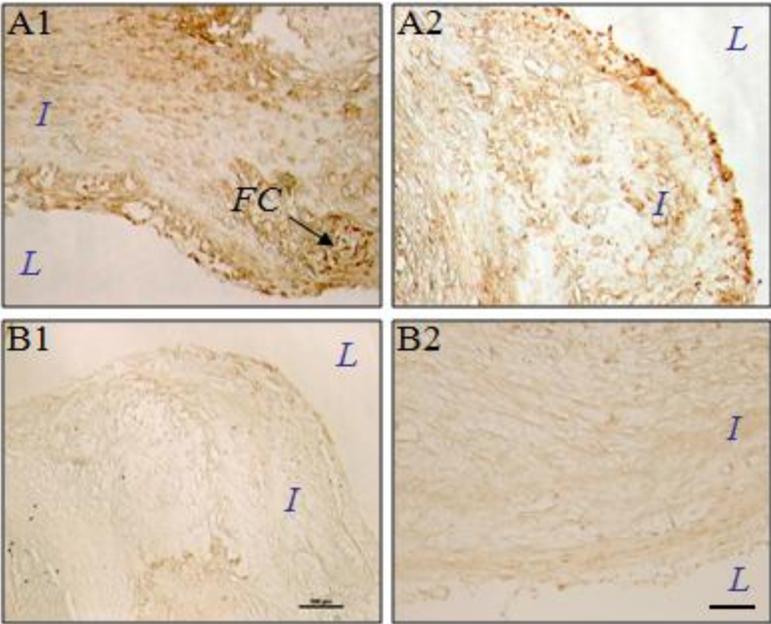


Figure 8

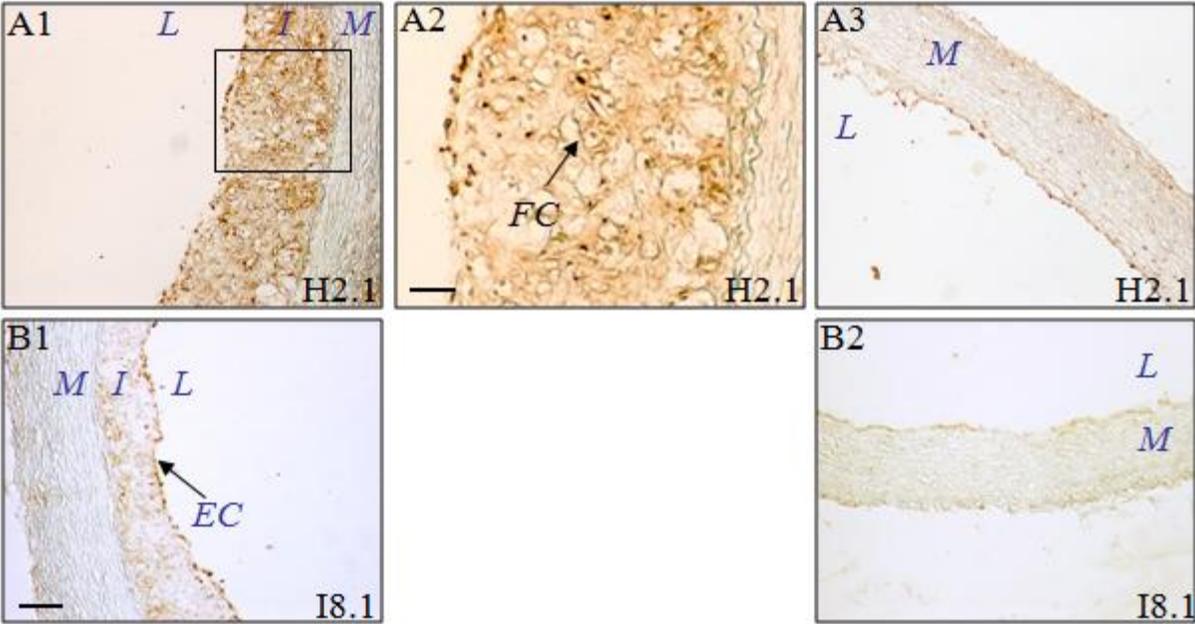
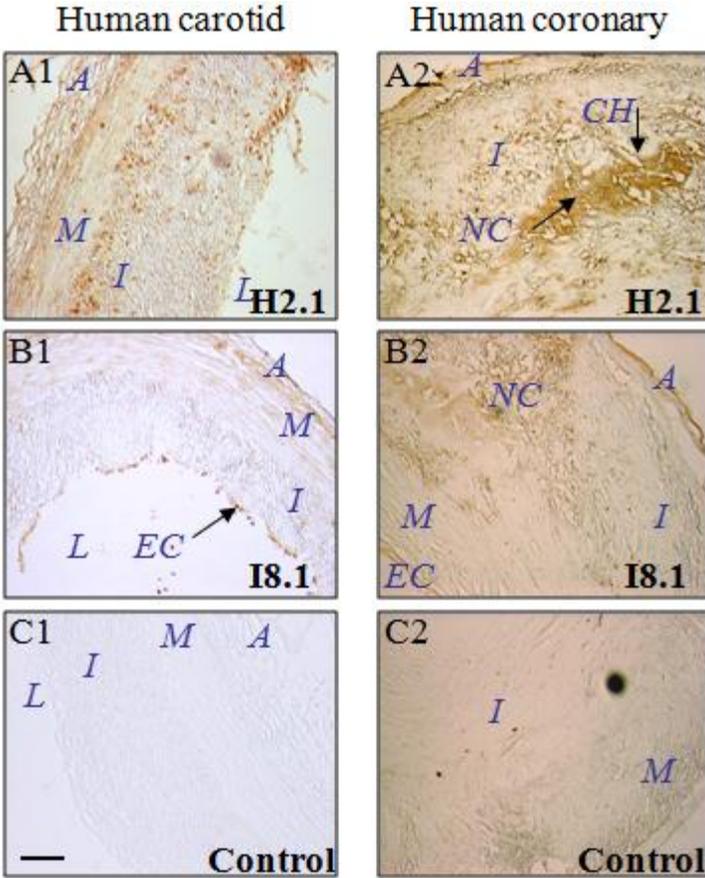


Figure 9



LEGENDS

Figure 1. Phage enrichment after 3 rounds of *in vivo* biopanning. The number of phages recovered (cfu, colony forming units) from round $n + 1$ was determined relative to the number of cfu obtained from the round 1 per mg of tissue. F1, F2 and F3 fractions correspond to phages rescued from vascular surface, subjacent tissue and internalized.

Figure 2. *In vivo* selection protocol scheme. ScFv phage library was intravenously injected into the ApoE^{-/-} mouse model and let circulate for 15 min. The aorta was then removed, and washed out of the unbound phages. Sequential recovery of bound phages was performed from vascular surface (F1), subjacent tissue (F2) and internalized (F3). A sample from each fraction served to generate a common selected library for the next round of biopanning. This process was repeated three times, whereas from the second round, the selected scFv sequences were determined for a future screening.

Figure 3. ScFv purification and inhibition of HTRF biotin-c-myc peptide sandwich signal with scFvs. (A) Example of SDS-PAGE obtained before (lane 1) and after (lane 2) IMAC purification of induced H2.1 scFv soluble production. Arrow indicates the localization of scFv band that was estimated by Bradford protein assay kit at 30 µg/ml. Gels were stained with Coomassie blue. Lane M: molecular size marker in kDa. (B) HTRF sandwich assay principle is depicted on the top. The donor fluorophore Eu-cryptate (EuK) conjugated to anti-c-myc mAb was able to recognize c-myc tag of biotinylated peptide. The acceptor fluorophore XL665 conjugated to streptavidin bound biotinylated amino-acids of c-myc peptide. In the absence of competitors, a FRET sandwich signal generated by the biotin-c-myc peptide is recorded. The

competition with scFvs for the c-myc tag abolished the FRET signal. The % DeltaF values represented the intensity of FRET signal. It was determined by the ratio of signals measured at 665 nm and 620 nm. The signals were measured in the presence of 0.4 nM of mAb-EuK, 1.25 nM of streptavidin-XL665 and 5 nM of biotin c-myc peptide. 5 μ l of competitor was added in each well, which corresponded to a final concentration encompassed between 50 and 170 nM according to the scFv clone production and purification. The % DeltaF values were normalized with regard to the maximum signal in the absence of competitor (100%) and the time course of competition was measured after 6h (■), 16h (▒) and 24h (□) of incubation at 4°C. Histogram values represented the average of at least three independent experiments \pm SD performed from the same purified scFv production.

Figure 4. Direct HTRF binding assays between scFvs and atheromatous tissue extracts. Direct HTRF principle is schematized on the top. The donor fluorophore Eu-cryptate (Eu-K) conjugated to anti-c-myc mAb was able to recognize c-myc tag expressed by scFvs. The acceptor fluorophore XL665 conjugated to streptavidin bound biotinylated proteins extract. If there was binding between scFvs and proteins, a FRET signal is recorded (% DeltaF). The excitation of the donor at 320 nm resulted in the fluorescence resonance transfer to the acceptor at 620 nm, leading to the emission of the acceptor at 665 nm. % DeltaF values were determined by the ratio of signals measured at 665 nm and 620 nm. The time course of the detection of the complexes formation was performed after 6h (■), 16h (▒), 24h (□) and 40h (□) of incubation at 4°C. 10 μ l of scFv were coated on the plate at concentration enclosed between 3 and 10 μ g / ml according to the clone. The signals were measured in the presence of 4 nM of mAb-EuK, 4 nM of streptavidin-XL665, and 30 μ g / ml of biotinylated atheromatous protein extract. Histogram values represented the average of at least three independent experiments \pm SD performed from the same purified scFv production.

Figure 5. Inhibition of direct HTRF binding assays with unlabelled tissue extracts. Inhibition of direct HTRF principle is depicted on the top of Figure 5A. The donor fluorophore Eu-cryptate (Eu-K) conjugated to anti-c-myc mAb was able to recognize c-myc tag expressed by scFvs. The acceptor fluorophore XL665 conjugated to streptavidin bound biotinylated atherogenic proteins extract. The FRET signal recorded (% DeltaF) was then measured in the presence of 2.5 x (■), 5 x (□), 6 x (□) quantity excess of unlabelled proteins extract from animal submitted to an atherogenic diet (A) and 6 x (□) quantity excess of unlabelled proteins extract from untreated animal (B). The % DeltaF values were normalized with regard to the signal obtained in the absence of competitor (100%) (■). 10 µl of scFv were coated on the plate at concentration enclosed between 3 and 10 µg/ml according to the clone. The signals were measured in the presence of 4 nM of mAb-EuK, 4 nM of streptavidin-XL665, 30 µg / ml of biotinylated atheromatous proteins extract and monitored after 16h of incubation at 4°C. Histogram values represented the average of at least three independent experiments ± SD performed from the same purified scFv production.

Figure 6. Immunodetection of scFvs homing to advanced atherosclerotic lesions from balloon-catheterized cholesterol-fed NZW rabbit sections. Selected scFvs and irrelevant control scFv (random CDRH3 and CDRL3) were incubated on rabbit tissue sections at final concentration at 2 µg / ml, 5 µg / ml, 12.5 µg / ml, 16.5 µg / ml for C3.3, H2.1, I8.1 and K3.24 scFvs respectively. After adding secondary antibodies as described in Materials and Methods, sections were revealed with the ABC kit reagent. The presence of the antigen recognized by scFvs was indicated by a yellow-brown staining. Incubation with H2.1 scFv (A); K3.1 scFv (B); I8.1 scFv (C); C3.3 scFv (D); K3.24 scFv (E) revealed the specific localization of each binding. (A2), (B2) and (C2) showed higher magnifications of areas targeted by H2.1, K3.1, I8.1 scFvs respectively. Foam cells-rich advanced atherosclerotic lesions were stained with RAM11 mAb (positive control) (F), whereas incubation with the control scFv (12.5 µg / ml) produced no staining (G). H2.1 and

K3.1 scFvs targeted predominantly cells located within the sub-endothelial layer and in the necrotic core region, remembering the staining obtained from the RAM11 antibody. We noted the presence of increased cholesterol monohydrate area in the necrotic core region. I8.1 scFv revealed a superficial localization and a deeper region relatively devoid of staining. C3.3 scFv predominantly stained the necrotic core region. No staining was detected with K3.24 scFv. L = artery lumen; I = intima; M = media; NC = necrotic core; FC = foam cell; EC = endothelial cell; CH= cholesterol. Scale bars represent 100 μm and 10 μm in enlarged views.

Figure 7. Inhibition of H2.1 scFv binding on rabbit atherosclerotic sections. Staining of biotinylated H2.1 scFv (5 μg / ml) was carried out without (**A1, A2**) or in the presence of a four times quantity excess of unlabelled H2.1 scFv (**B1, B2**). Biotinylated H2.1 scfv was revealed with streptavidin-HRP conjugate and DAB substrate kit. In the presence of unlabelled H2.1, a significant decrease of subendothelial and necrotic regions staining was observed. L = artery lumen; I = intima; FC = foam cell. Scale bars represent 100 μm .

Figure 8. Immunodetection of H2.1 and I8.1 scFvs to healthy aorta and early atherosclerotic lesions in control rabbit. H2.1 and I8.1 scFvs (5 μg / ml and 12.5 μg / ml respectively) were incubated on sections of normal diet-fed rabbits exhibiting both pathologic (**A1, A2, B1**) and normal regions along the artery (**A3, B3**). H2.1 scFv staining was observed within the macrophage-rich early atherosclerotic lesions (**A1**). A greater magnification of the foam-cell area targeted by H2-1 gives details of this staining (**A2**). I8.1 scFv staining was essentially localized on the endothelium surface of the early atheroma (**B1**). H2.1 and I8.1 scFvs showed only weak and scattered staining on some endothelial cells along the normal intimal areas

(A3, B3). L = artery lumen; I = intima; M = media; A = adventitia; FC = foam cells; EC = endothelial cell.

Scale bars represent 100 μm and 10 μm in enlarged views.

Figure 9. Immunodetection of H2.1 and I8.1 scFvs to atherosclerotic lesions of human carotid and coronary arteries. Selected H2.1 and I8.1 scFvs (5 μg / ml and 12.5 μg / ml respectively) and irrelevant control scFv (12.5 μg / ml) were incubated on human atherosclerotic sections. The localization of staining with H2.1 scFv occurred mostly within foam cell-rich regions in carotid early lesions (**A1**) and within necrotic- and lipid-rich areas of advanced lesions of coronary artery (**A2**). We noted the presence of increased cholesterol monohydrate area in the advanced lesions. I8.1 scFv showed a staining pattern targeting the endothelial layer both in advanced lesions in carotid (**B1**) and coronary arteries (**B2**), although diffuse labelling was also observed in other regions. Control scFv (random CDR3) yielded no staining (**C1** and **C2**). L = artery lumen; I = intima; M = media; A = adventitia; NC = necrotic core; EC = endothelial cell; CH= cholesterol. Scale bars represent 100 μm .

BIBLIOGRAPHY

1. Miller, N.E., Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J*, 1987. **113**(2): p. 589-97.
2. Wood, D., et al., Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. *Atherosclerosis*, 1998. **140**(2): p. 199-270.
3. Williams, K.J. and I. Tabas, Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. **340**(24): p. 1928-9.
4. Genest, J.J., et al., Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1991. **67**(15): p. 1185-9.
5. Williams, K.J. and I. Tabas, The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(5): p. 551-61.
6. Sanz, J. and Z.A. Fayad, Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 953-7.
7. Rader, D.J. and A. Daugherty, Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 904-13.
8. Briley-Saebo, K.C., et al., Magnetic resonance imaging of vulnerable atherosclerotic plaques: current imaging strategies and molecular imaging probes. *J Magn Reson Imaging*, 2007. **26**(3): p. 460-79.
9. Koenig, W. and N. Khuseyinova, Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(1): p. 15-26.
10. Antoniades, C., et al., Nanoparticles: a promising therapeutic approach in atherosclerosis. *Curr Drug Deliv*. **7**(4): p. 303-11.
11. Shaw, S.Y., Molecular imaging in cardiovascular disease: targets and opportunities. *Nat Rev Cardiol*, 2009. **6**(9): p. 569-79.
12. Wickline, S.A., et al., Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles. *J Magn Reson Imaging*, 2007. **25**(4): p. 667-80.

13. Lam, K.S., et al., A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature*, 1991. **354**(6348): p. 82-4.
14. Weissleder, R., et al., Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(11): p. 1418-23.
15. Toepert, F., et al., Combining SPOT synthesis and native peptide ligation to create large arrays of WW protein domains. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003. **42**(10): p. 1136-40.
16. Aina, O.H., et al., From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides. *Mol Pharm*, 2007. **4**(5): p. 631-51.
17. Alvim, J., Jr., et al., Solution phase synthesis of a combinatorial library of chalcones and flavones as potent cathepsin V inhibitors. *J Comb Chem*. **12**(5): p. 687-95.
18. Burtea, C., et al., Magnetic Resonance Molecular Imaging of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Inflammatory Lesions Using a Peptide-Vectorized Paramagnetic Imaging Probe. *J Med Chem*, 2009.
19. Hong, H.Y., et al., Phage display selection of peptides that home to atherosclerotic plaques: IL-4 receptor as a candidate target in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(5B): p. 2003-14.
20. Iwamoto, S., et al., Generation and characterization of chicken monoclonal antibodies against human LOX-1. *MAbs*, 2009. **1**(4): p. 357-63.
21. Houston, P., et al., Homing markers for atherosclerosis: applications for drug delivery, gene delivery and vascular imaging. *FEBS Lett*, 2001. **492**(1-2): p. 73-7.
22. Liu, C., et al., In vivo interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces. *Am J Pathol*, 2003. **163**(5): p. 1859-71.
23. Kelly, K.A., et al., In vivo phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging. *Mol Imaging Biol*, 2006. **8**(4): p. 201-7.
24. Ruoslahti, E., Vascular zip codes in angiogenesis and metastasis. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt3): p. 397-402.
25. Ladner, R.C., et al., Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today*, 2004. **9**(12): p. 525-9.

26. Johns, M., A.J. George, and M.A. Ritter, In vivo selection of sFv from phage display libraries. *J Immunol Methods*, 2000. **239**(1-2): p. 137-51.
27. Robert, R., et al., Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display. *J Biol Chem*, 2006. **281**(52): p. 40135-43.
28. Philibert, P., et al., A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. *BMC Biotechnol*, 2007. **7**(1): p. 81.
29. Curtiss, L.K. and W.A. Boisvert, Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2000. **11**(3): p. 243-51.
30. Zou, J., et al., Biodistribution of filamentous phage peptide libraries in mice. *Mol Biol Rep*, 2004. **31**(2): p. 121-9.
31. Durr, E., et al., Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(8): p. 985-92.
32. Albizu, L., et al., Toward efficient drug screening by homogeneous assays based on the development of new fluorescent vasopressin and oxytocin receptor ligands. *J Med Chem*, 2007. **50**(20): p. 4976-85.
33. Maurel, D., et al., Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology. *Anal Biochem*, 2004. **329**(2): p. 253-62.
34. Cannon, C.P., et al., Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2004. **350**(15): p. 1495-504.
35. LaRosa, J.C., Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. *Am J Cardiol*, 2001. **88**(3): p. 291-3.
36. Brousseau, M.E., HDL Cholesterol - Third Annual International Conference. *Metabolic Pathways and Drug Development*. 25-26 February 2002, Boston, MA, USA. *IDrugs*, 2002. **5**(4): p. 327-30.
37. Steinberg, D., and A.M. Jr. Gotto, Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels: fifty years from bench to bedside. *JAMA*, 1999. **282**(21): p. 2043-50.
38. Libby, P., et al., Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
39. Ross, S.D., et al., Clinical outcomes in statin treatment trials: a meta-analysis. *Arch Intern Med*, 1999. **159**(15): p. 1793-802.

40. Assmann, G., et al., Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(8): p. 1819-24.
41. MRC/BHF, Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. Heart Protection Study Collaborative Group. *Lancet*, 2002. **360**(9326): p. 7-22.
42. Bengel, F.M., One life to live, but many ways to die--imaging of cardiomyocyte death. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006. **33**(3): p. 237-8.
43. Smith, G.P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
44. Green, L.L., Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 1999. **231**(1-2): p. 11-23.
45. Brekke, O.H. and G.A. Loset, New technologies in therapeutic antibody development. *Curr Opin Pharmacol*, 2003. **3**(5): p. 544-50.
46. Pansri, P., et al., A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnol*, 2009. **9**: p. 6.
47. Rajotte, D., et al., Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest*, 1998. **102**(2): p. 430-7.
48. Arap, W., et al., Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med*, 2002. **8**(2): p. 121-7.
49. Krag, D.N., et al., Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries. *Cancer Res*, 2006. **66**(15): p. 7724-33.
50. Molenaar, T.J., et al., Uptake and processing of modified bacteriophage M13 in mice: implications for phage display. *Virology*, 2002. **293**(1): p. 182-91.
51. Pasqualini, R. and E. Ruoslahti, Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996. **380**(6572): p. 364-6.

52. Wilson, S.H., et al., Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Circulation*, 2002. **105**(4): p. 415-8.
53. Doyle, B. and N. Caplice, Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(21): p. 2073-80.
54. Bragdon, J.H., Spontaneous atherosclerosis in the rabbit. *Circulation*, 1952. **5**(5): p. 641-6.
55. Kolonin, M.G., et al., Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med*, 2004. **10**(6): p. 625-32.
56. Lanza, G.M., et al., Molecular imaging and targeted drug delivery with a novel, ligand-directed paramagnetic nanoparticle technology. *Acad Radiol*, 2002. **Suppl 2**: p. S330-1.

Des expérimentations d'identification des cibles de scFv ont récemment été initiées sur le clone **H2.1**.

Les résultats sont présentés ci-dessous.

5.3. Immunopurification

5.3.1. Matériel et méthodes

Cent μ l de microbilles magnétiques couplées à un anticorps monoclonal anti-c-myc (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) sont saturées avec 400 μ l de PBS BSA 1% (10mg/ml) pendant 1h à 4°C. Deux cent cinquante μ l de billes saturées sont ensuite mises en contact avec 500 μ g de protéines athéromateuses pendant 2h à 4°C et les 250 μ l restant sont mis en contact avec 1-10 μ g de scFv purifiés pendant 2h à 4°C. Après passage des échantillons sur les colonnes magnétiques, environ 200 μ l de protéines (fraction non retenue sur la colonne) sont mis en contact avec 200 μ l de billes-scFv et le volume ajusté à 1ml avec du tampon de lyse à faible stringence (1% NP40, 50 mM Tris-HCL pH 8, BSA 1%) pendant 16h. Les échantillons sont ensuite passés sur la colonne magnétique et les complexes billes-scFv-protéine cible sont rincés 5 fois avec 200 μ l de tampon de lyse et 1 fois avec du tampon 2 (kit miltenyi). Les complexes sont finalement élués avec 2 x20 μ l de tampon d'éluion (Tampon Laemmli, 1% SDS) chauffé à 95°C. Les complexes sont ensuite passés sur gel SDS-PAGE et révélés à l'aide d'un kit à base de nitrate d'argent (Sigma, France).

5.3.2. Résultat

Après criblage des scFv par une technique *in vitro* (par HTRF) et validation de la liaison par une deuxième technique *ex vivo* (immunohistochimie), des expérimentations d'identification de cibles par immunoprécipitation ont été réalisées. Des billes magnétiques greffées d'anticorps anti-c-myc sont mises en contact avec chacun des clones scFv et les complexes formés au contact d'extraits protéiques provenant d'aorte de lapins sains ou athéromateux. Les immunocomplexes formés sont ensuite déposés sur des colonnes magnétiques pour l'éluion spécifique des protéines immunopurifiées. Ces dernières sont ensuite déposées sur gel d'acrylamide dénaturant et révélées à l'aide d'un kit de révélation au nitrate d'argent. En parallèle, un deuxième gel est transféré sur membrane PVDF puis incubé à l'aide du scFv concerné ainsi que d'un anticorps anti-c-myc-HRP. La membrane est finalement révélée en chemiluminescence.

L'immunopurification du clone **H2.1** a montré la présence d'une bande à 19 kDa en SDS-PAGE et en immunoblot (**Figure 5.4**). Cette bande a ensuite été découpée du gel et analysée en spectrométrie de masse pour l'identification des protéines immunoprécipitées (**Tableau 5.1**). La spectrométrie de masse est réalisée par la plateforme génomique fonctionnelle de l'Université de Bordeaux 2. Chaque peptide identifié est comparé aux banques de données SwissProt et TrEMBL databases (restreinte au lapin). Plus le nombre de peptides identifiés est élevé, plus grande est la probabilité que la protéine identifiée soit la protéine cible, immunoprécipitée par notre scFv. Le choix de la protéine immunoprécipitée est également dicté par le nombre de peptides différents (#Distinct Pept) identifiant la protéine et par l'adéquation avec le poids moléculaire théorique même si ce dernier élément n'est qu'un critère empirique que l'on doit considérer avec précaution du fait des dégradations protéiques.

Les protéines **SerpinB3**, **S100-A9** et **Glutamine γ -glutamyltransferase E (GGT)** ont un nombre de scans compris entre 5 et 9 et pourraient être potentiellement ciblées par **H2.1** (**Tableau 5.1**). La SerpinB3 dont le nombre de scan est le plus élevé, est un inhibiteur de sérines protéases qui a récemment été impliqué dans l'activation du TGF β au cours des lésions hépatiques. En activant le TGF β , cette protéine favorise la production de matrice extracellulaire pour la production de tissu cicatriciel [Turato et al. 2010]. La protéine S100-A9 est une protéine cytosolique liant le calcium. Elle a un rôle dans les phases précoces de l'inflammation et a récemment été identifiée dans des plaques carotidiennes humaines calcifiées et au sein des néovaisseaux de la plaque [McCormick et al. 2005]. La GGT est une protéine membranaire impliquée dans la balance redox cellulaire. Elle est abondamment exprimée lors de surproduction des ROS et joue un rôle protecteur vis-à-vis de l'oxydation. La GGT peut être également libérée dans le sérum où elle peut se complexer aux LDL. Un rôle dans l'athérosclérose a été suggéré mais reste à confirmer [Paolicchi et al. 2006][Pompella et al. 2007]. Ces trois protéines devront faire l'objet d'une attention particulière pour la suite de l'étude.

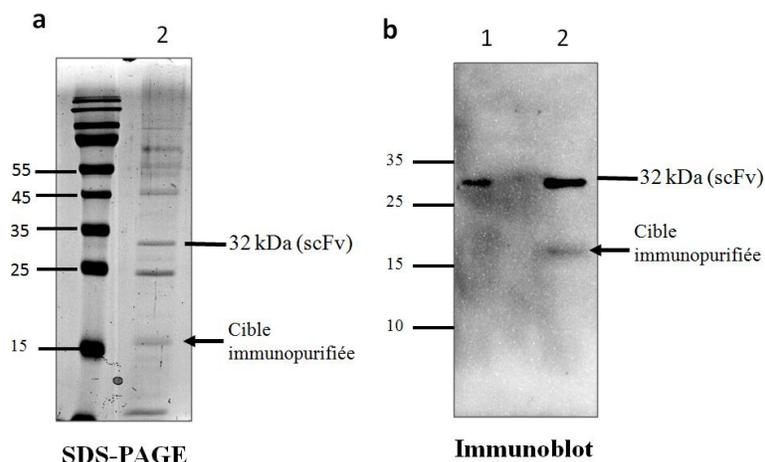


Figure 5.4 : Identification de la cible protéique du clone **H2.1**. L'immunopurification est réalisée en incubant des billes magnétiques anti-c-myc couplées au scFv H2.1 avec 20 μ g d'un lysat de protéines athéromateuses. Après passage sur gel d'acrylamide, une bande est révélée au nitrate d'argent à 19kDa visible sur la colonne 2 (A). Cette bande est également retrouvée en immunoblot après incubation de la membrane avec le clone scFv purifié et une révélation à l'aide d'un anticorps anti-c-myc-HRP. La colonne n°1 correspond à une immunopurification réalisée à l'aide d'un scFv non relevant.

| Peptide homology | # MS/MS scan | # distinct pep | % coverage | MW (Da) |
|--|--------------|----------------|--------------|--------------|
| Cystatin-SN | 3 | 2 | 24.82 | 16351 |
| Cystatin-A | 2 | 2 | 30.61 | 10999 |
| Desmoplakin | 3 | 3 | 1.57 | 331567 |
| Serpin B3 | 9 | 7 | 23.59 | 44536 |
| Prot. Glutamine γ-glutamyltransferase E | 5 | 5 | 12.12 | 76583 |
| Protein S100-A9 | 6 | 3 | 35.96 | 13233 |
| Protein S100-A7 | 3 | 2 | 30.69 | 11463 |
| Calmodulin like protein 5 | 1 | 1 | 11.41 | 15882 |
| Phosphatidylethanolamine binding protein 1 | 1 | 1 | 7.49 | 21043 |
| Annexin A1 | 1 | 1 | 4.62 | 38690 |
| Desmoglein-1 | 4 | 3 | 4.39 | 113644 |
| Kallikrein-7 | 2 | 2 | 6.32 | 27506 |
| Zymogen granule protein 16 homolog | 2 | 2 | 14.42 | 22724 |

Tableau 5.1 : Tableau récapitulatif des cibles potentielles du scFv H2.1. La colonne « # MS/MS scan » correspond au nombre de scans MS/MS identifiant la protéine. La colonne « # distinct pep » correspond au nombre de peptides différents identifiant la protéine. La colonne « % coverage » traduit le pourcentage de couverture de séquence, soit le nombre d'acides aminés couverts par les peptides identifiés sur le nombre total d'acides aminés dans la protéine. La colonne « MW » correspond au poids moléculaire donné par la banque de données. Plus le paramètre # MS/MS est élevé, plus grande est la probabilité que la protéine identifiée soit la protéine cible, immunopurifiée par notre scFv.

IV) Sélection in vivo chez le lapin : Etude en cours

L'intervention chirurgicale réalisée sur les lapins consiste à léser l'endothélium et induire une lésion inflammatoire ce qui a pour conséquence de compliquer la lésion athéroscléreuse. Deux angioplasties sont réalisées à un mois (ou deux) d'intervalle. La première est une désendothélialisation (dénudation de la paroi artérielle) et la seconde un tassement de la paroi lésée. Ce protocole a été principalement réalisé par Stéphane Sanchez (UMR5536) au sein de l'animalerie gros animaux de l'hôpital Xavier Arnoz, dirigée par Pierre DosSantos. Le Professeur Pierre DosSantos a supervisé la deuxième intervention chirurgicale. Mon rôle a été de les assister tout du long de la procédure.

5.4. Matériel et méthodes

5.4.1. Intervention chirurgicale chez le lapin

5.4.1.1. 1ère intervention : La désendothélialisation

Le lapin est anesthésié par injection intramusculaire d'un mélange Kétamine-Xylazine (5 mg/kg de xylazine (Rompun 2%, 0,25 ml/kg) et 50 mg/kg de ketamine (Imalgène 1000, 0,5 ml/kg)). L'entretien anesthésique est appliqué par voie orale grâce à un dispositif d'isoflurane. Une prévention anti-thrombotique est réalisée au niveau de la veine marginale de l'oreille par une injection de 1000 UI d'héparine sodique (Héparine Choay®, Sanofi Synthélabo) et l'analgésie par 100 mg d'aspirine (Aspégic® injectable, Sanofi Synthélabo). L'artère fémorale commune droite est abordée dans un premier temps pour permettre la pose d'un désilet 5 French (Terumo). Une aortographie est réalisée par l'injection fémorale de 5 ml de produit de contraste (Hexabrix®, Guerbet) permettant de visualiser l'origine de la crosse aortique. Sous contrôle angioscopique, une sonde de Fogarty 4F (Edwards Lifesciences) est introduite par le désilet fémoral pour être positionnée au niveau de la crosse. Après inflation du ballonnet de la sonde de Fogarty à l'aide de 0,35 ml de produit de contraste, une désendothélialisation de l'aorte est réalisée sous scopie par traction de la sonde jusqu'à la bifurcation iliaque. Après occlusion de l'artère fémorale droite à son origine, le désilet est retiré et les plans musculaires et cutanés suturés à l'aide de Filapeau 3/0. La cicatrice est recouverte de suspension d'aluminium (Alumisol®, Sanofi Santé Animal).

5.4.1.2. 2ème intervention : Angioplastie de l'aorte sous-rénale

A J30-60 de la désendothélialisation de l'aorte, les mêmes protocoles d'anesthésie, d'analgésie et de prévention anti-thrombotique sont appliqués. L'artère fémorale commune gauche est abordée et la pose d'un désilet 4 French (Terumo) effectuée. Une nouvelle aortographie est réalisée pour localiser l'artère rénale gauche. Sous contrôle scopique, un guide hydrophile de 0,014 inch (Cross-it®, Guidant) est introduit par le cathéter fémoral permettant de placer un ballonnet d'angioplastie (Maxxum®, Boston Scientific, 20 mm de long, 4,5 mm de diamètre) dans l'aorte sous l'origine de l'artère rénale gauche. Quatre inflations à 14 Atmosphères sont réalisées (diamètre final 5 mm) le long de la paroi lésée puis le ballonnet est retiré. Après occlusion de l'artère fémorale gauche à son origine, le désilet est retiré et les plans musculaires et cutanés sont suturés. Le régime est ensuite poursuivi jusqu'à l'obtention d'une plaque d'athérome visualisable par échographie (**Figure 5.5**).

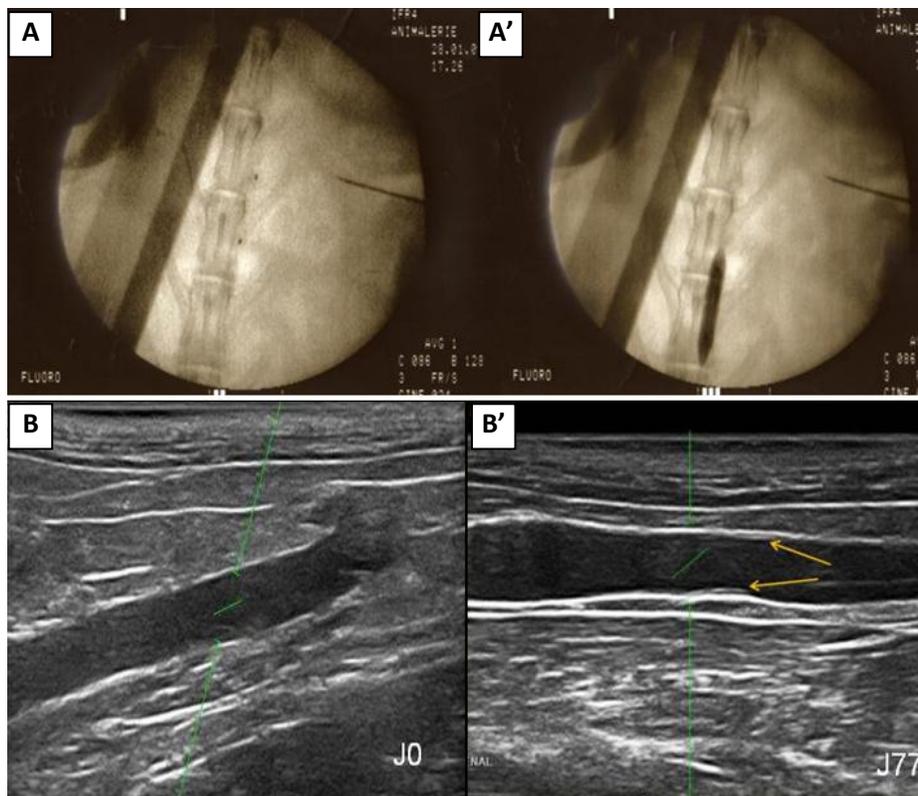


Figure 5.5: Préparation du modèle d'inflammation induite chez le lapin mis sous régime hypercholestérolémiant. Deux interventions chirurgicales sont nécessaires : une désendothélialisation réalisée en tractant une sonde Fogarty 4F le long de l'endothélium et une angioplastie à l'aide d'un ballonnet (20mm de long et 4.5mm de diamètre) sous contrôle radioscopique (A : ballonnet non gonflé, A' : Ballonnet gonflé et tracté). Le développement de plaques d'athérome est ensuite suivi par échographie (B : avant intervention, B' : 77 jours après intervention).

5.4.2. Banque combinatoire

La banque de fragments d'anticorps humains utilisée est basée sur la charpente d'un scFv hyperstable (le scFv13R4) où des mutations des CDR3-H et -L ont été introduites. L'optimisation des boucles du CDR3 a été menée selon 3 critères :

- La longueur des CDR3-H varie entre 5 et 17 acides aminés, ce qui représente 85% des longueurs retrouvées dans les anticorps humains,
- La longueur des CDR3-L varie entre 9 à 10 acides aminés pour les chaînes λ et de 9 à 11 pour les chaînes κ , ce qui représente respectivement 81 et 85% de la longueur des anticorps humains,
- Des oligonucléotides semi-dégénérés ont été construits pour l'introduction des mutations avec le but de respecter la distribution des acides aminés à chaque position des CDR3 humains.

Ainsi, cette banque a été construite à partir de 13 sous-banques VH et 5 sous-banques VL à l'aide de 18 oligonucléotides dégénérés, spécifiques des régions CDR3 des VH et VL élaborés à partir de 3 banques de données (Kabat database, IMGT/LIGM-DB database et Protein data bank). Comme mentionné précédemment, la banque a été conçue de façon à mimer le plus exactement possible, la distribution des acides aminés observés dans les CDR3 humains. Ceci a pour but d'éviter les réactions immunitaires éventuelles. Un autre avantage de cette banque est l'élimination de tous les clones scFv comportant des codons STOP ou des décalages du cadre de lecture. Pour cela, les gènes codant les scFvs ont été au préalable fusionnés au gène rapporteur CAT (Chloremphenical Acetyl Transférase) de façon à ne conserver que les scFvs fonctionnels (**voir section 4.9.4**).

5.4.3. Sélection *in vivo*

10^{13} phages-scFv dilués dans du PBS sont injectés dans la circulation sanguine pendant 15 minutes à l'aide d'un pousse seringue (166 μ l/min) avec un temps de circulation de 30min. L'animal est ensuite sacrifié par injection d'une dose létale d'anesthésique. L'aorte entière disséquée, perfusée avec 2x60ml de PBS est débarrassée du tissu adipeux qui l'entoure puis pesée et coupée en long. Après plusieurs cycles de lavages à l'aide d'HBSS1x sans $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ froid, les phages-scFv liés à la surface de l'endothélium sont élués en appliquant 950 μ l de glycine-HCl 100mM pH2.2 pendant 8 minutes à température ambiante sous agitation. L'éluat est neutralisé à l'aide de 90 μ l de Tris-HCl pH9.1 (**Fraction**

F1). Les tissus sont également neutralisés par l'ajout de 1ml de Tris-HCl 1M pH7.4. Ensuite, pour la dissociation des tissus, l'aorte subit un traitement avec 900µl d'HBSS sans Ca⁺⁺/Mg⁺⁺/collagénase de type II (2000U/ml) [Gibco, France] et 100µl trypsine-EDTA [Eurobio, France] à 37°C pendant 30min puis est homogénéisée à l'aide d'un polytron ultraturax TP-20 (Kinematica, Lucerne, Switzerland). Les phages séquestrés dans la matrice extracellulaire sont ensuite récupérés par plusieurs jeux de centrifugation (**Fractions F2**). Enfin, les phages-scFv internalisés dans les cellules sont élués avec 500µl de TEA (triéthylamine) 100mM (**Fraction F3**) et neutralisés avec 250µl de Tris-HCl pH7.4. Les phages élués de chacune des fractions sont incubés avec 20mL de bactéries TG1 (Stratagene, La Jolla, CA) à DO_{600nm} = 0.5-1. Après 45 minutes d'infection à 150 rpm, les bactéries sont culotées, resuspendues dans 500µl de 2TYGA (100µg/mL ampicilline + 2% w/v glucose) puis étalées sur des boîtes de 90mm de diamètre en milieu 2TYAG Agar (100µg/mL ampicilline + 2% w/v glucose) incubées 16h à 30°C. Après numération de chacune des fractions, les bactéries sont décrochées de l'agar à l'aide d'un râteau et stockées à -20°C en présence d'un volume de glycérol 50% pour la production de pool de phages qui sera ensuite injecté lors d'un deuxième ou troisième tour de sélection.

5.4.4. Production de banques secondaires de phages

Les banques de phages secondaires sont produites à partir du pool de bactéries obtenues lors du précédent tour de sélection. Chaque fraction bactérienne estensemencée dans 25ml de milieu 2TYGA jusqu'à DO_{600nm} = 0.5-1 à 37°C et 260 rpm. Une super-infection est réalisée à l'aide de phages-auxiliaires M13K07 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) pendant 45 minutes à 37°C et 150 rpm. Le culot bactérien est ensuite repris dans 100ml de 2TYAK Amp (100 µg/ml) /Kana (50 µg/ml) et agité à 260 rpm pendant 16h à 25°C. Les phages produits sont alors purifiés du surnageant bactérien en appliquant 0.2 volumes de 20% (w/v) PEG 8000, 2.5 M NaCl. Les phages ainsi précipités sont resuspendus dans 500µl de PBS froid et titrés avant d'être réinjectés pour un autre tour de sélection. Après chaque tour de sélection, des clones sont piqués aléatoirement pour analyse de leur séquence nucléotidique (Millegen, Toulouse, France) en utilisant l'amorce LMB3 (CAG GAA ACA GCT ATG AC) correspondant à la séquence présente en amont du vecteur phagémide pCANTAB6. Le reste des clones est conservé à -80°C dans des microplaques 96 puits en présence d'un volume de glycérol 50%. L'analyse des séquences (traduction, comparaison et alignement) a été réalisée à l'aide de la base de données IMGT/V-QUEST (Lefranc 2009).

5.4.5. Production de scFv solubles

Les clones TG1 sélectionnés par analyse comparative de séquence sont mis en culture 5 heures dans 500µl de 2TY Amp (100 µg/ml) / Glucose (2% (w/v)) dans des masterblock 2ml (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France) et super-infectés 45 min à l'aide de 5.10^9 cfu de phages-auxiliaires M13K07. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans 1ml de 2TY Amp (100 µg/ml) /Kana (50 µg/ml) et un aliquot de chaque culture est étalé sur des boîtes 2TY agar Amp/Kana incubées à 25°C pendant 16h. Une colonie de chaque clone étalé est mise en culture dans 500 µl de 2TY Amp/Kana à 25°C pour la production de phages. Après 2 centrifugations successives, 1µl de la production de phage est mis en contact de 20µl de bactéries HB2151 *E.coli* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) à $DO_{600nm}=0.5-1$. L'infection est réalisée pendant 45 minutes à 37°C et sous agitation à 150rpm. Les bactéries infectées sont alors étalées sur des boîtes 2TY Amp (100 µg/ml) / Glucose (2% (w/v)) et incubées 16h à 30°C. Les clones sont ensuiteensemencés dans 50ml de milieu 2TY Amp (100 µg/ml) / Glucose (2% (w/v)) pendant 5h à 37°C, centrifugés et le culot repris et incubé dans 250ml de milieu 2TY Amp (100 µg/ml) / Sucrose (0.4 M) / IPTG (200 mM) à 25°C pendant 16h. Les cellules sont ensuite culotées et resuspendues dans 12,5ml de tampon de lyse froid (1M Tris-HCl pH 8, 1mg/ml Lysozyme 1mg/ml, 1mM PMSF, inhibiteurs de protéases 100X (Thermofisher)). Après 1h d'incubation à 4°C, les cellules sont lysées par sonication (80w, 3x30sec) puis centrifugées 10 min à 20.000g et le culot traité une nouvelle fois par sonication. Après deux centrifugations, les surnageants sont rassemblés et les scFvs séparés des débris bactériens par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel (IMAC : Nickel-immobilized metal affinity chromatography).

5.4.6. Purification des scFv solubles

Les scFvs ont été purifiés à l'aide d'une colonne IMAC pré-chargée en résine de nickel (HiTrap HP, 1ml), reliée à un « AKTA purifier » (GE helthcare) et les résultats analysés à l'aide du logiciel Unicorn (GE helthcare). Ces expérimentations sont réalisées sous la direction de Xavier Santarelli à l'ENSTBB, Ecole Nationale Supérieure de Technologie des Biomolécules de Bordeaux.

Toute la procédure est réalisée avec un débit constant de 1ml/minute et la lecture de densité optique à 280nm. Rapidement, la colonne est équilibrée avec 5 volumes de colonne (CV) de Tris-HCl 1M pH8 (TP-A) suivie de l'injection de l'échantillon à purifier. Les molécules de l'échantillon non liées aux

ions nickel de la matrice sont éliminées à l'aide de 10 à 15 CV de tampon d'éluion jusqu'au retour de l'absorbance à la ligne de base (Fraction non retenue). Une première étape d'éluion des molécules possédant des His est réalisée à l'aide de 5% d'un tampon Tris-HCl 1M pH8 Imidazole 0.5M (TP-B) et une deuxième étape d'éluion avec 50% de TP-B. Enfin la colonne est entièrement régénérée à l'aide de 100% de TP-B. Des fractions de 1ml sont récoltées, dialysées contre du PBS froid et contrôlées en SDS-PAGE et Immunoblot pour la présence de molécules scFv purifiées par leur étiquette 6His.

5.4.7. Extraction et biotinylation de protéines athéromateuses

Des aortes saines et malades sont extraites, perfusées et fractionnées pour la solubilisation des protéines avec 4 solutions de lyses différentes. M-PER (Thermo Fisher Scientific, Brebières, France), T-PER (Thermo Fisher Scientific), tampon de lyse à faible stringence (50mM HEPES, pH 7.4; 137 mM NaCl; 10% Glycerol; 1% NP-40 (v/v); 2 mM EDTA; 1 mM PMSF; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, Meylan, France)) et à forte stringence (50mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% (v/v) NP-40; 0.5% (v/v) Triton; 0.5% Na-Deoxycholate; 1mM EDTA; 1 mM PMSF; cocktail d'inhibiteur de protéases). Les tissus sont tout d'abord homogénéisés à l'aide d'un polytron ultraturax TP-20 (Kinematica, Lucerne, Switzerland) puis lysés par sonication (3x10 sec à 80w). La fraction soluble des protéines est récoltée après 2 centrifugations de 45 minutes à 13.000 g et à 4°C. La quantité totale de protéines est mesurée à l'aide du kit Bradford (Thermofisher scientific). Les protéines extraites à partir des tampons M-PER, T-PER et du tampon de lyse à forte stringence sont dialysés contre le tampon à faible stringence à 4°C pendant 16h. 200µg de protéines sont ensuite biotinylées en utilisant 3 ratios de molarité différents de protéine/biotin-XX SSE (Invitrogen, Eragny sur Oise, France) : 1:5, 1:10 et 1:20 dans 100 mM NaHCO₃, pH 8.3 pendant 30 min et à 4°C. L'excès de biotine est ensuite neutralisé avec 100mM Glycine pH7.4 pendant 10min à 4°C puis les échantillons sont dialysés contre du tampon à faible stringence à 4°C pendant 16h.

5.4.8. HTRF

Le test de liaison entre les scFv et les protéines athéromateuses a été rendu possible grâce à la technique HTRF® (homogeneous time resolved fluorescence) (Cisbio International, Bagnols-sur-Cèze, France). Les 100 µl de volume réactionnel contiennent : 50µl de tampon de réaction (HEPES 100 mM, 200 mM KF), 4nM d'anticorps anti-c-myc-(Eu)K (Cisbio International), 5 µl de scFv (concentration estimée

entre 50-100 nM), 3.2nM de streptavidine-XL665 (Cisbio International), et un volume d'extraits de protéines athéromateuses biotinylées de façon à obtenir 13 nM. Les scFv purifiés ont également été testés pour leur capacité à inhiber un signal d'émission de fluorescence par un peptide-c-myc-biotinylé. Les 100 µl de volume réactionnel contiennent : 50µl de tampon de réaction (HEPES 100 mM, pH 7; 200 mM KF, 0.1% BSA), 0.4nM d'anti-c-myc-(Eu)K (Cisbio International), 5µl de scFv (50-100 nM), 1.25nM de streptavidin-XL665 (Cisbio International), et 5 nM de peptide-c-myc-biotinylé. Les réactions ont été réalisées dans des plaques blanches 96-halfwell (Greiner) et la fluorescence est mesurée grâce à un appareil à lecture de fluorescence homologué HTRF®, Infinite® F500 (Tecan, Lyon, France). La lecture est réalisée à 1h, 16h, 24h, et 40h d'incubation à 4°C. Les données sont exprimées sous la forme d'un ratio calculant l'intensité de fluorescence à 665nm (émission avec transfert de fluorescence) sur l'intensité de fluorescence mesurée à 620nm (émission sans transfert de fluorescence) multiplié par un facteur arbitraire de 10.000 permettant une manipulation plus aisée des données (voir le site HTRF de Cisbio Bioassays:

http://www.htrf.com/technology/htrfmeasurement/radio_data_reduction/

Les ratios sont ensuite normalisés en soustrayant les valeurs obtenues des puits contrôles (sans scFv ou sans protéine), suivi du calcul du pourcent d'activation (%DeltaF) en divisant les ratios normalisés par la valeur des puits contrôles, x 100. Dans le test de compétition, le %DeltaF des puits contrôles sans compétiteur est utilisé comme valeur maximale d'activation (=100%).

5.4.9. Immunohistochimie

Des sections aortiques saines et athéromateuses incluses en paraffine sont préparées de façon standard. Les sections (10µm) sont déparaffinées après une série de bains successifs de toluène, d'alcool et d'eau. Ensuite les peroxydases endogènes sont inhibées suite à l'application d'une solution d'eau oxygénée à 3% durant 15 minutes. Puis, les coupes d'aorte sont saturées pendant 30 minutes avec du PBS BSA 4% (Eurobio, France) afin d'inhiber les liaisons non-spécifiques. Elles sont ensuite incubées sur la nuit avec 100µL de scFv (5-10 µg/ml) dilués dans du PBS 2% BSA. La détection des scFv liés est réalisée au cours d'une incubation de 3H avec un anticorps anti-c-myc-HRP (Miltenyi biotec) (dilution 1/250) additionné d'un anticorps anti-6His (dilution 1/250). Il s'ensuit une incubation d'une heure avec un anticorps anti-souris IgG-HRP (Jackson immunoResearch) (dilution 1/500). La section de tissu contrôle est

incubée avec les anticorps anti-c-myc-HRP + anti-His, et anti-IgG-HRP. La coloration est développée avec un kit « DAB substrate kit for peroxydase » (Vector) qui produit un précipité marron jaune. Après un lavage à l'eau distillée, le tissu est déshydraté par une succession de bains d'éthanol et de toluène et la lame est montée et conservée à température ambiante.

5.5. Résultats

5.5.1. Sélection par Phage-Display *in vivo*

Afin d'isoler des **phages-scFv humains** ciblant la plaque d'athérome, nous avons utilisé un modèle de lapin d'inflammation induite qui mime, en terme de composition cellulaire et d'accumulation lipidique, les lésions athéroscléreuses observées chez l'homme [Rekhter et al., 1998]. De même, pour permettre une meilleure répartition des phages-scFv dans les tissus, nous avons choisi d'utiliser une pompe à injection en flux constant et un temps de circulation réduit à 30 min. Nous espérons ainsi réduire la clairance des phages-scFv par le système réticuloendothélial et l'adsorption non spécifique sur l'endothélium vasculaire. De plus, la sélection *in vivo* implique de fait une contre sélection négative sur les zones non affectées par la pathologie [(Zou, Dickerson et al. 2004)].

Nous avons ensuite réalisé une élution séquentielle des phages liés à la surface endothéliale (Fraction 1 : **F1**), aux tissus sous-jacents (Fraction 2 : **F2**) ou internalisés dans les cellules (Fraction 3 : **F3**). Après deux ou trois tours de sélection, le nombre de phages récupérés (cfu) des tissus malades est significativement plus élevé que celui constaté au premier tour (**Figure 5.6**). Il s'échelonne de **80 fois** au deuxième tour à plus de **10.000 fois** au troisième tour.

Après deux à trois tours de sélection, 300 phages pris au hasard ont été séquencés, les séquences alignées puis comparées. Cette stratégie vise à sélectionner des phages sur la base des séquences en acides aminés de leur scFv. Afin de mener à bien ce criblage, les clones ont été sélectionnés selon 2 critères :

- **L'homologie de séquences dans les CDR3-L, CDR3-H ou les 2 combinés.** Ainsi sur les 300 clones de départ, 2 clones se sont révélées homologues par leur CDR3-L, 2 clones se sont révélées homologues par leur CDR3-H et 3 par les 2 domaines variables CDR3-H et L (**Tableau 5.2**).

- La distribution en résidus d'acides aminés différente de celle de la banque originale.** En effet, il est connu qu'il existe une variabilité de longueur à la fois pour les CDR3-L ou CDR3-H et une variabilité en fréquences de distribution spécifiques des acides aminés à chaque position [Philibert et al., 2007]. Nous avons donc décidé de comparer la distribution en acides aminés à chaque position et pour chaque longueur des CDR3 des clones séquencés avant et après sélection. Nous illustrons sur la **figure 5.7** la comparaison des séquences de CDR3-H à 10 résidus avant et après sélection pour 50 clones. Si la fréquence d'un acide aminé à une position donnée est trois fois plus élevée après sélection, nous émettons alors l'hypothèse d'une « sélection positive ». De là, un **consensus de variabilité** a été déterminé (**Figure 5.8**). Les résidus dont la fréquence est 3 fois plus élevée sont surlignés en rouge, ceux dont la fréquence est égale à 3 sont en orange. Nous avons également considéré qu'il était nécessaire d'avoir au moins 2 résidus surreprésentés dans les séquences pour les sélectionner (**Figure 5.9**). Selon ce critère de sélection, 18 clones ont été sélectionnés à partir des différentes longueurs des CDR, 7 avec des consensus de variabilité sur le domaine CDR3-L et 11 sur le domaine CDR3-H (**Tableau 5.2**).

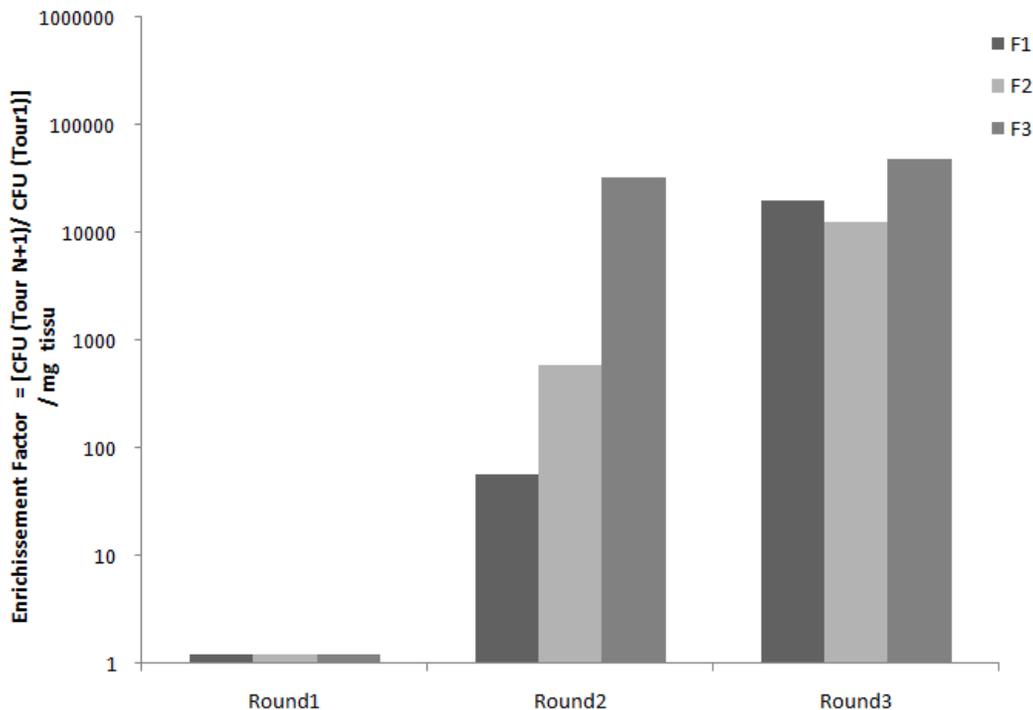


Figure 5.6 : Sélection *in vivo* de phages-scFv. Après 15 minutes de circulation, les lapins ayant reçu la banque de phages-scFv sont sacrifiés et leur aortes disséquées. Les phages de surfaces (F1) intercellulaires (F2) et intracellulaires (F3) sont séquentiellement élués. Le taux d'enrichissement correspond à la quantité de phages récoltés à chaque tour par rapport au tour initial et par mg de tissu.

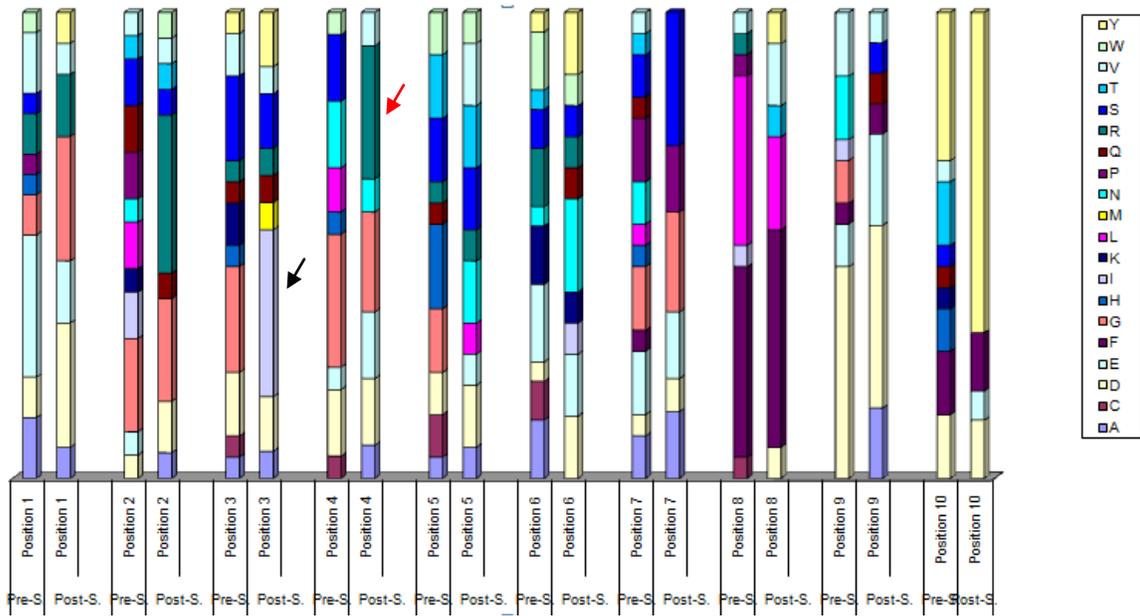


Figure 5.7: Fréquence d'apparition d'acides aminés pour chaque position d'un CDR3-H à 10 résidus avant et après sélection. Pour chacune des 10 positions sont représentées 2 colonnes : Pré-S (avant sélection) et Post-S (après sélection). L'acide aminé I (Isoleucine) en 3^{ème} position (violet clair ; flèche noire) est plus représenté après qu'avant sélection. De même pour l'acide aminé R (arginine) en 4^{ème} position (vert foncé ; flèche rouge) qui est plus représenté après qu'avant sélection.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
|-----------|---|---|---|-----|---|-----|-----|---|---|----|---|---|
| Consensus | V | R | X | R | I | R | N/V | N | X | X | A | X |
| | | | | > 3 | | = 3 | | | | | | |

Figure 5.8: Exemple de consensus obtenu pour un CDR3-H à 10 résidus. Les séquences CDR3-H à 10 résidus avant et après sélection ont été comparées et un consensus déterminé. Chaque position d'acide aminé est numérotée. Les acides aminés en rouge ou orange sont significativement différents (> ou = à 3) de ceux de la banque initiale. Les acides aminés X sont des acides aminés dont la distribution varie.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
|-----------|---|---|---|-----|---|-----|-----|---|---|----|---|---|
| Consensus | V | R | X | R | I | R | N/V | N | X | X | A | X |
| F8.31 | V | K | | I | R | | | | | | | |
| A2.32 | V | R | | R | | | N | | | | | |
| | | | | > 3 | | = 3 | | | | | | |

Figure 5.9: Exemple du clone F8.31 et A2.32. Comparaison entre la séquence consensus et la séquence de ces 2 clones. Pour des raisons de confidentialité, les résidus autres que ceux conservés ne sont pas mentionnés.

| critère | Clones | Homologies |
|---|------------------|------------------------|
| Séquences identiques | H8.32 et I8.31 | Homologie sur H3 et L3 |
| | J3.32 et J3.32 | Homologie sur H3 et L3 |
| | F8.32 et E8.31 | Homologie sur H3 et L3 |
| | F7.31 et B8.31 | Homologie sur H3 |
| | A2.32 et B4.31 | Homologie sur H3 |
| | C4.31 et A6.31 | Homologie sur L3 |
| | B2.31 et C4.32 | Homologie sur L3 |
| Distribution d'acides aminés avant/après sélection | A8.31 | Homologie sur L3 |
| | E8.31 | Homologie sur L3 |
| | I4.31 | Homologie sur L3 |
| | J8.31 | Homologie sur L3 |
| | J4.31 | Homologie sur L3 |
| | D1.31 | Homologie sur L3 |
| | L4.31 | Homologie sur L3 |
| | E1.31 | Homologie sur H3 |
| | K5.31 | Homologie sur H3 |
| | L1.32 | Homologie sur H3 |
| | K7.32 | Homologie sur H3 |
| | H8.31 | Homologie sur H3 |
| | J6.31 | Homologie sur H3 |
| | F8.31 | Homologie sur H3 |
| | L2.32 | Homologie sur H3 |
| | C5.32 | Homologie sur H3 |
| | A5.31 | Homologie sur H3 |
| A3.31 | Homologie sur H3 | |

Tableau 2: Identification des clones selon deux critères de sélection. Les fréquences d'apparition des clones sont données par rapport aux 300 clones initialement séquencés.

*Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur l'étude en HTRF des clones discriminés de par leur identité de séquence. Les expériences conduites en HTRF ont été concluantes pour les clones **C4.31**, **B2.31** et **H8.32** comme nous allons le décrire dans la suite de l'étude. Le clone **F8-31** a montré une réactivité en dessous du seuil de détection que nous avons fixé. Il a cependant été testé en immunohistochimie.*

*Les études HTRF ont ensuite été poursuivies sur les clones sélectionnés sur la base d'une « pression de sélection » sur la distribution en acides aminés dans le CDR3H. Les clones **A5.31** et **E1.31**, bien que présentant une réactivité faible en HTRF au cours d'un premier essai, ont été également testés en immunohistochimie. Les données pour les clones **F8.31**, **A5.31** et **E1.31** sont des données préliminaires qui doivent être confirmées par les tests HTRF mis en place récemment pour tester les clones issus de la sélection in vivo sur la souris.*

5.5.2. Production de scFv sous format soluble et test par HTRF sandwich

Les expérimentations du « *direct HTRF* » à l'aide de protéines athéromateuses, nécessitent deux conditions importantes : une **concentration de scFv minimum requise** pour générer un signal et la présence d'un **scFv avec un fort degré de pureté** après purification pour faciliter la rencontre des différents partenaires présents dans le milieu réactionnel.

Pour avoir accès à de fortes concentrations de fragments d'anticorps, les 3 scFv précédemment sélectionnés (**C4.31**, **B2.31** et **H8.32**) ont été produits sous forme soluble dans une souche d'*E.coli* non-suppressive pour le codon stop « amber », et le lysat bactérien purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (**Figure 5.10A**). Après une première élution à 25mM d'imidazole permettant d'éliminer les molécules contaminantes, les scFv ont été élués à l'aide de 250mM d'imidazole et déposés sur gel de polyacrylamide pour en apprécier la pureté (**Figure 5.10B**).

La « concentration relative » en scFv, n'a pu être déterminée, qu'en imaginant un test que l'on a dénommé « *HTRF sandwich* » et qui permet l'inhibition, par nos scFv purifiés, d'un signal positif généré par la liaison d'un peptide contrôle, « *peptide-biotine-c-myc* ». En absence de compétiteur, le signal positif a été rapporté à 100% d'activité. Chaque fraction de chaque scFv purifié a été incubée avec ce peptide contrôle et la cinétique de compétition mesurée pendant 24h. Les résultats montrent que la fraction la plus concentrée de chaque clone est capable de rentrer en compétition avec le peptide contrôle et inhiber le signal de 50 à 90% après une incubation de 24h à 4°C (**Figure 5.11**). Dans ces fractions, les concentrations en scFv ont été estimées entre 1 et 50nM selon la production et la purification du clone considéré (résultat non montré). Cette méthode montre que la forte sensibilité de l'HTRF permet de détecter la présence de scFv pour leur utilisation ultérieure dans un test d'HTRF direct avec les extraits de protéines athéromateuses.

5.5.3. Interaction entre les scFv solubles et l'extrait de protéines athéromateuses par HTRF direct

Confronté aux limitations des approches de criblage classiques (faible sensibilité, consommation accrue de matériel biologique...), nous avons démontré la faisabilité de l'utilisation d'un puissant test de criblage, basé sur la détection de la liaison entre des scFv purifiés et leurs partenaires issus de lysats protéiques athéromateux. Pour ceci, les protéines tissulaires ont été solubilisées en utilisant 4 tampons de solubilisation constitués de détergents ioniques et non ioniques. Chaque extrait protéique a ensuite

été biotinylé en utilisant 3 ratios de molarités différentes de protéines/biotine. Ces fractions ont été mélangées dans un rapport équimolaire. Les premiers tests d'HTRF direct ont été réalisés dans un format différent de ceux réalisés avec les scFvs sélectionnés sur la souris (**voir article en cours de rédaction**). Dans cette approche l'interaction des différents protagonistes (fluorophores, scFv et lysat protéique) a été réalisée en phase liquide, sans coating ni étapes de lavages. Ces premiers tests ont montré une activation échelonnée de 11 à 32% après 40h, démontrant leur capacité à lier un partenaire présent dans l'extrait protéique (**Figure 5.12**). Les signaux présentés en pourcentage ont été normalisés par soustraction des valeurs obtenues dans les puits contrôles (sans scFv et sans protéine). Même s'il semble que les scFvs reconnaissent des partenaires de liaison, la faible valeur des Delta F montre que l'approche n'est pas optimale. En effet, le fort background généré par XL-665 ne permet pas de l'utiliser à des concentrations élevées. Comme il doit saturer les protéines-biotinylées, il est le partenaire qui limite la concentration de protéines à utiliser. Avec un excès de protéines-biotinylées (ce qui augmente les chances d'avoir un grand nombre de partenaires de liaison), tous les XL-665 sont piégés par l'abondance des protéines-biotinylées non spécifiques. Avec un ratio molaire correct entre XL-665 (3.2 nM) et protéines (13 nM), toutes les protéines-biotinylées sont saturées par XL-665, mais la représentativité restreinte du partenaire de liaison dans le lysat ne génère qu'un signal faible voire absent. Nos résultats ne sont donc pas optimisés et les scFv devront être testés à nouveau en utilisant la nouvelle approche en phase solide où les scFv sont adsorbés à la surface des puits (**voir article en cours de rédaction**). Néanmoins **H8.32**, **C4.31** et dans une moindre mesure le clone **B2.32** ont montré leur capacité à lier un partenaire présent au sein d'homogénats protéiques issus de tissus malades. Une seule expérience HTRF a été réalisée sur les clones **F8-31**, **A5-31** et **E1-31**. Les valeurs sont en deçà de 10% après 40h (non montré).

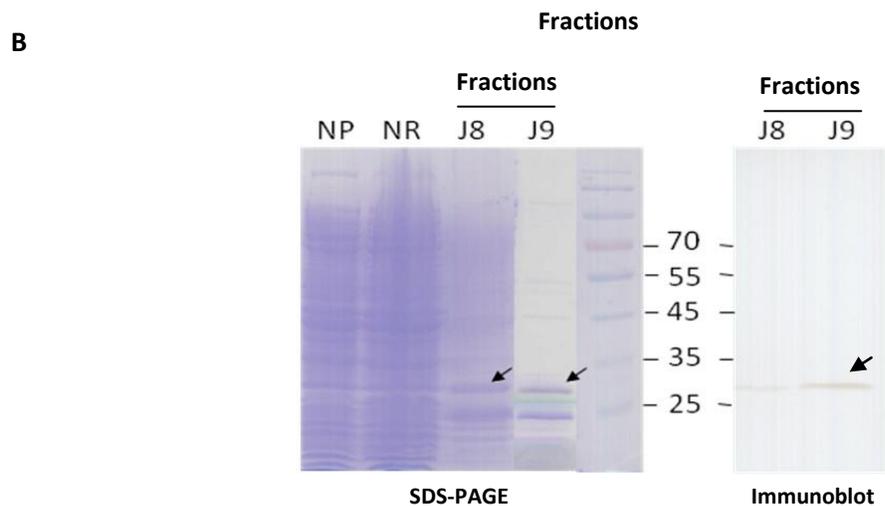
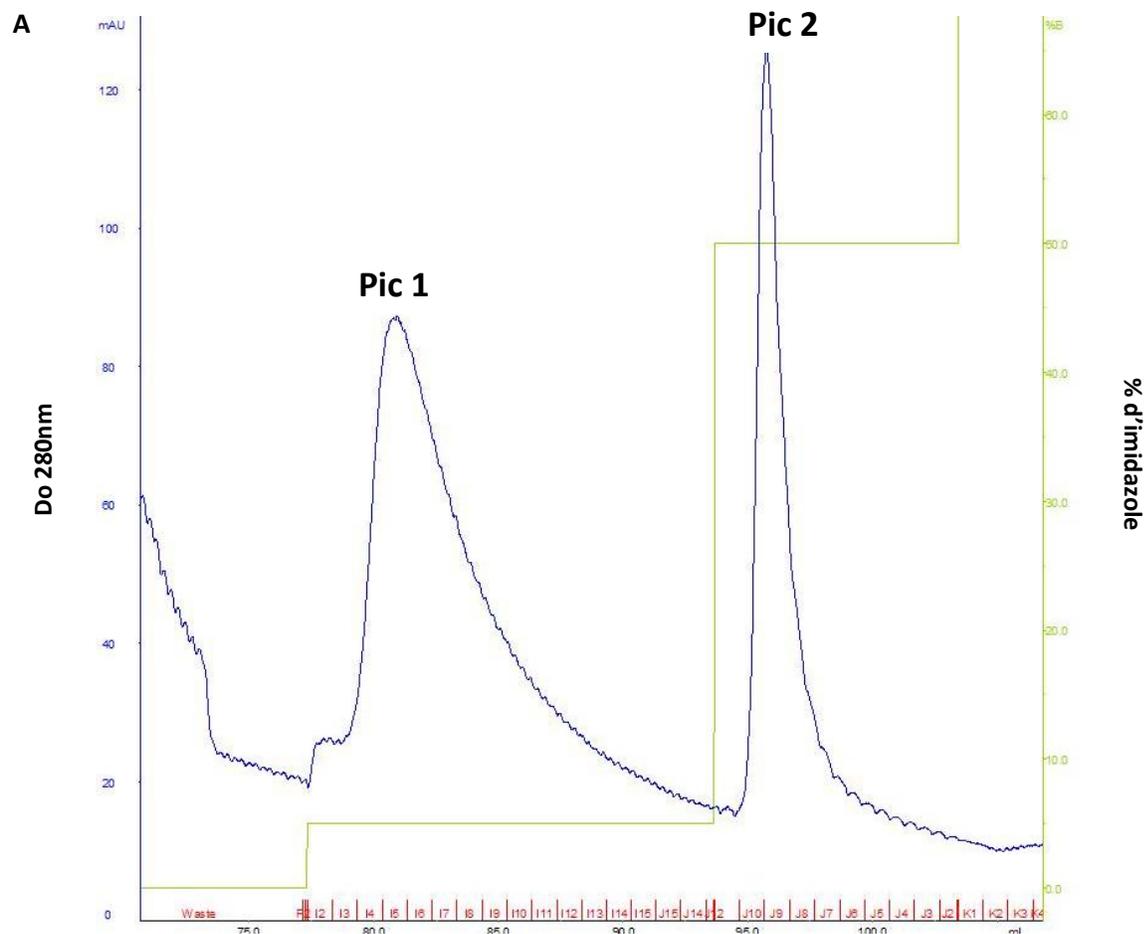


Figure 5.10: Profil de purification du clone scFv (soluble) **B2.31** à l'aide d'une colonne IMAC Hitrap 1ml. Les protéines sont détectées à DO280nm (courbe bleue). Les échantillons sont élués en appliquant 2 concentrations successives d'imidazole (25 et 250mM). Un premier pic est élué à 25mM d'imidazole (5%), les fractions testées en SDS-PAGE ne montrent pas la présence de scFv (non montré). Cependant, à 250mM d'imidazole (50%), un deuxième pic, plus fin montre la présence des scFv (flèche) dans les fractions J8 et J9 avec très peu de bruit de fond pour la fraction J9. NP : Non purifié, NR : Non retenu (fraction non retenue sur la colonne).

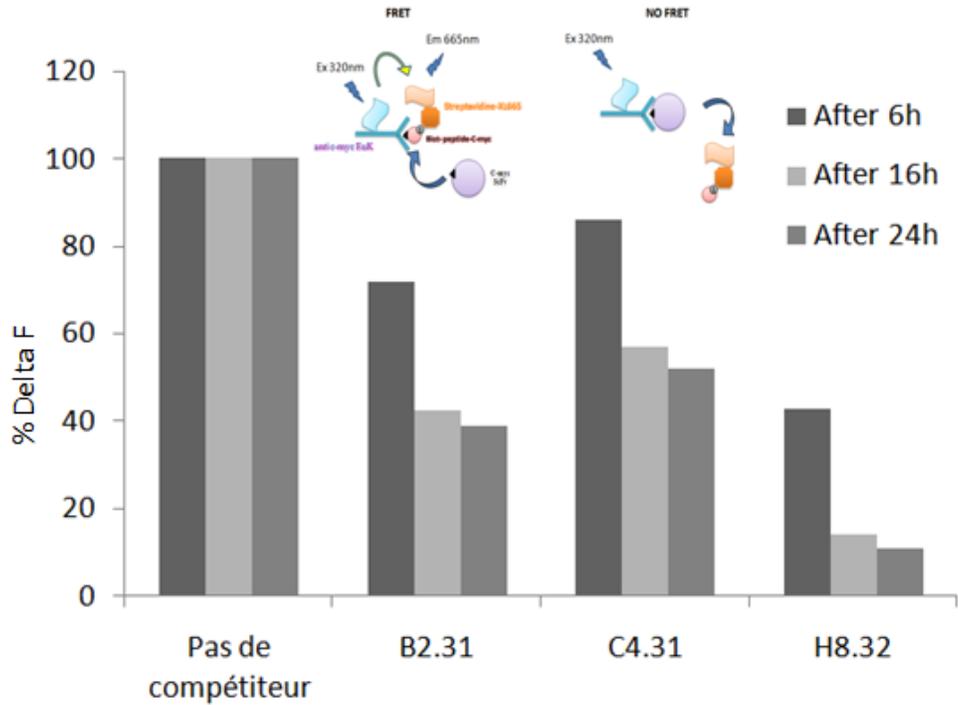


Figure 5.11: HTRF sandwich. Les fractions les plus concentrées en scFv sont capables de compétitionner avec le peptide contrôle et inhiber le signal de 50 à 90% après une incubation de 24h à 4°C. Sans compétiteur, le signal est rapporté à 100% d'activation.

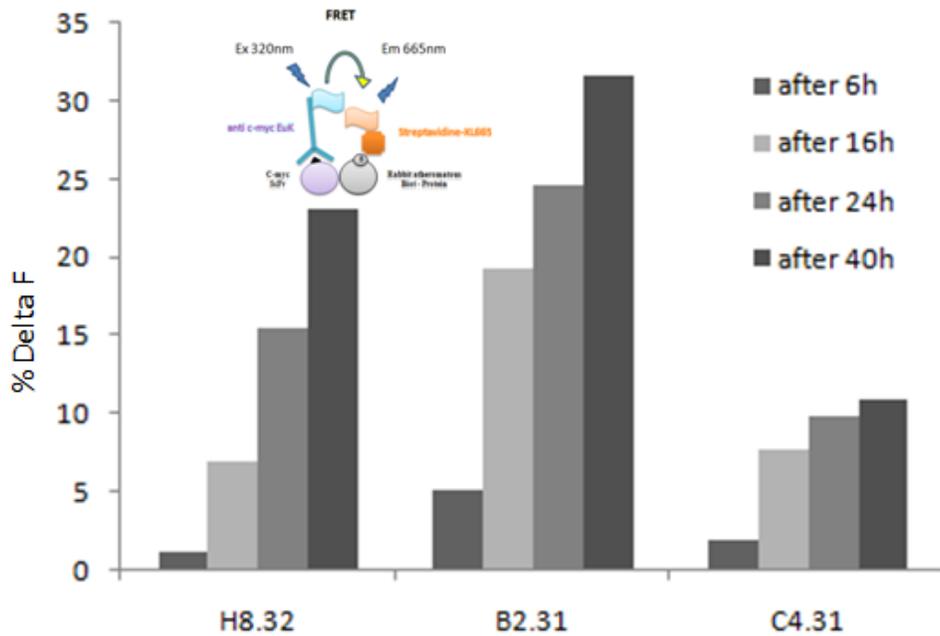


Figure 5.12: Direct HTRF. Les scFv sont capables de lier des protéines biotinylées et d'engendrer un signal positif allant de 11 à 32% d'activation après 40h d'incubation. Tous les signaux ont été normalisés en soustrayant la valeur des puits contrôles (sans scFv et sans protéines).

5.5.4. Immunohistochimie et localisation *ex vivo* des scFv

Afin de confirmer les résultats obtenus par la technique d'HTRF direct, les scFv ont été testés pour leur capacité à lier des biomarqueurs exprimés sur des coupes d'aortes de lapins malades. Entre 5 et 10 µg/ml de scFv purifiés sont déposés sur lame. Après 16h d'incubation et 5 lavages en PBS, il s'ensuit une incubation de 3 H avec des anticorps de souris anti-c-myc et anti-6His (Ac-I) et une incubation avec un anti-Ig de souris-HRP (Ac-II) (voir matériel et méthodes). Les 3 clones sélectionnés positifs en HTRF ont tous montré un marquage distinct au sein des tissus malades (**Figure 5.13A**). De façon intéressante, les clones **C4.31** et **H8.32** marquent l'endothélium et le sous endothélium riche en cellules inflammatoires et cellules spumeuses alors que le clone **B2.31**, marque également des zones riches en matrice extracellulaire et en débris cellulaires (cores nécrotiques).

Les premières expériences d'immunohistochimie réalisées sur les clones **F8-31**, **A5-31** et **E1-31** montrent un marquage différent pour chacun des clones. Ainsi, le clone **A5.31** montre un marquage assez étendu avec des spots bien localisés à la jonction intima/média riche en cores nécrotiques. Le clone **F8.31** montre un marquage spécifique de l'endothélium et le sous endothélium alors que le clone **E1.31** marque des zones riches en cristaux de cholestérol (**Figure 5.13B**).

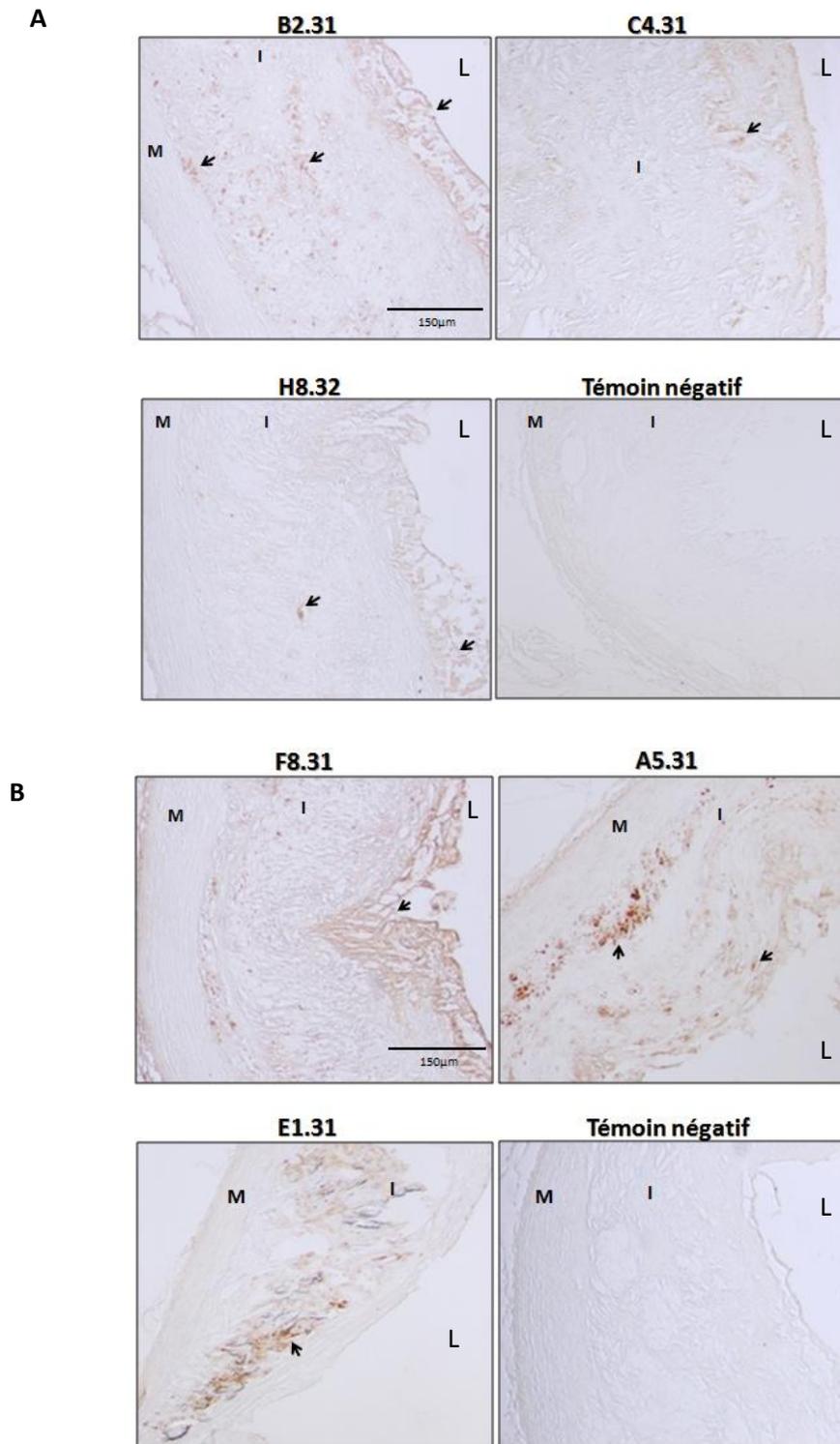


Figure 5.13 : Immunohistochimie sur coupes d'aorte de lapin à l'aide de scFv purifiés. **A :** validation des clones testés au préalable par direct HTRF. **B :** Essai préliminaire de marquage de clones scFv testés faiblement positifs par direct HTRF. Les flèches indiquent le marquage spécifique des phages scFv. I : Intima, M : média. L : Lumière. Explication, voir texte.

5.6. Discussion

Le phage display *in vivo* permet une interrogation, au sein même du modèle animal, des parois vasculaires d'organes « sains » et « malades » [Arap, 2002]. L'intérêt d'une telle approche est d'isoler des ligands, dans notre cas des fragments d'anticorps, directement liés à des biomarqueurs, sous leur conformation native et qui plus est, surexprimés au sein des tissus pathologiques. La majorité des études de phage display *in vivo* à ce jour, montre la faisabilité de la sélection de peptides à la surface de parois vasculaires d'organes [Arap, 2002][Hong et al. 2007][Trepel et al. 2002], mais très peu d'études sont disponibles sur l'utilisation de banques d'anticorps [Johns, George et al. 2000][Robert et al., 2006]. En conséquence, il a été suggéré que l'utilisation d'anticorps était moins adaptée au ciblage *in vivo* de la surface endothéliale. Quoiqu'il en soit, l'anticorps a un avantage structural qui lui confère une meilleure affinité (de l'ordre de nM ou pM) et une très grande spécificité pour son antigène [Beck et al. 2009]. **Nous avons dans ce travail, utilisé une banque semi-synthétique de phages-scFv pour interroger la paroi vasculaire lésée mais également les tissus sous-jacents riches en cellules inflammatoires et spumeuses.** Afin d'optimiser cette sélection, nous avons décidé d'injecter la banque d'anticorps sous un flux constant durant un temps court. Ceci dans l'objectif d'éviter leur rétention non spécifique et d'augmenter les chances d'interaction avec les tissus d'intérêt [Zou et al., 2004].

De même, la présence *in vivo* d'un réseau vasculaire comportant principalement des zones non pathologiques donne lieu en une sélection négative de la banque. Alors que les principales études *in vivo* réalisées à ce jour ne s'attachent qu'à une élution superficielle des phages à la surface de l'endothélium, notre étude a porté sur une élution aussi bien de surface (**F1**) que des tissus sous-jacents de la matrice extracellulaire (**F2**) ou intracellulaire (**F3**). La comparaison des séquences des phages isolés après deux à trois tours de sélection montre qu'il est possible, sur la base d'homologies de séquence ou bien sur la comparaison de distribution de résidus d'acides aminés avant et après sélection, d'isoler des scFv spécifiques des régions malades. En prenant avantage de la puissance de la technique **HTRF**, nous sommes parvenus à générer des signaux suite à la mise en contact de scFv hautement purifiés, avec des extraits protéiques provenant de différentes conditions de solubilisation (**Figure 5.12**). De façon tout à fait intéressante, les clones dont la valeur d'inhibition est la plus forte dans le test d'HTRF sandwich, montre un meilleur signal d'activation en direct HTRF. Ceci indique que les deux paramètres cités précédemment, qui sont : le degré de pureté et la concentration relative du scFv, sont d'importants paramètres pour la génération de signaux dans le test du direct HTRF. Bien que ces résultats soient encourageants, le test du direct HTRF devra être amélioré en adsorbant les scFv directement à la surface

des puits afin d'éliminer le surplus de protéines athéromateuses non ciblées. Un tel test pourra également être adapté au **criblage direct de phages-scFv**, ce que notre équipe va s'employer à réaliser prochainement. Les résultats *in vitro* obtenus ont été tous confirmés par une approche *ex vivo* d'immunomarquage. En effet, les clones scFv (**B2.31**, **C4.31** et **H8.32**) ont montré un marquage différent des régions épaissies de l'aorte de lapin (**Figure 5.13A**). Ce résultat suggère qu'ils ciblent différents marqueurs de la plaque. Cependant, il n'a pas été remarqué de différence particulière de ciblage pour les clones issus des fractions **F1** ou **F2**. Par exemple, le clone **B2.31**, isolé depuis la fraction **F1**, cible aussi bien la surface endothéliale que le sous endothélium, alors que le clone **C4.31**, isolé à partir de la fraction **F2**, ne cible apparemment que la surface endothéliale. Ceci peut s'expliquer par la cross-contamination des différentes fractions lors de l'élution des phages. Ce point mérite d'être éclairci dans les futures études. Un autre point encourageant est la présence d'immunomarquage sur des coupes d'aorte de lapin malade avec les clones **F8.31**, **A5.31** et **E1.31** (**Figure 5.13B**). Ces clones, qui ont été également purifiés par chromatographie d'affinité, ont montré un bon degré de pureté (résultat non montré) et sont en phase d'être testés en Direct HTRF par adsorption du scFv sur puits.

5.7. Conclusion et perspective

Cette étude est la première à avoir combiné une sélection de scFv par phage display *in vivo* et un criblage à moyen débit par HTRF. Bien que la technique d'HTRF utilisée dans cette étude, n'ait pas été testée sous sa forme optimisée, elle montre néanmoins que des scFv hautement purifiés peuvent engendrer des signaux de l'ordre de 30% d'activation. La prochaine étape de l'étude devra donc s'atteler à tester ces clones ainsi que d'autres à venir par la méthode optimisée du direct HTRF où l'accessibilité des différents partenaires est favorisée. De plus, l'utilisation de phages-scFv directement dans ce test permettrait de s'affranchir des étapes de purification et ainsi réaliser un criblage à haut débit, voire même à très haut débit en automatisant la procédure. Une autre perspective sera également, après validation de ces clones, de définir leur cible par des techniques d'immunoprécipitation que l'on a déjà amorcées avec l'étude réalisée chez la souris. Ces anticorps humains dirigés contre la plaque d'athérome développés chez le lapin, devront également être validés *in vitro* à l'aide d'homogénats de protéines athérosclérotiques humaines et *ex vivo* par immunohistochimie sur des coupes de carotide ou de coronaire. De tels anticorps pourront être prochainement utilisés en imagerie moléculaire non invasive pour le ciblage des constituants de la plaque. L'aspect thérapeutique ne doit pas être négligé. Les effets

antagonistes ou agonistes des anticorps humains que nous avons sélectionnés devront être évalués. Une alternative suscite actuellement un grand intérêt au sein de la communauté scientifique ; il s'agit du théranostic qui associe dans une même entité agent ciblant et molécule thérapeutique.

V) Imagerie par Résonance Magnétique de la P-sélectine exprimée dans les plaquettes humaines activées

5.8. Introduction

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire avec formation de plaques d'athérome à risque de rupture. L'identification de patients présentant une plaque instable ou vulnérable, c'est à dire susceptible de se rompre, est un problème d'actualité. Le concept récent que ce risque soit lié au contenu de la plaque et non à sa taille se traduit par un nouvel impératif d'imagerie. De fait, les études actuelles s'orientent vers la possibilité d'un diagnostic non invasif par un ciblage en IRM de molécules biologiques impliquées dans les plaques d'athérome vulnérables. L'utilisation de l'IRM a en effet entraîné une demande d'agents de contrastes de plus en plus efficaces, utilisés pour indiquer les fonctions spécifiques d'un organe ou pour accroître les différences entre les tissus sains et malades. Afin de pallier la faible sensibilité inhérente à la technique, les agents « ciblant » sont en plein essor. Les anticorps monoclonaux constituent un transporteur de choix pour ces agents de contraste IRM, ceci dû à leur haute spécificité. Ils peuvent être couplés à des agents de contraste paramagnétiques comme le gadolinium [Flacke et al., 2001][Winter et al., 2003][Botnar et al., 2004][Spuentrup et al., 2005] ou superparamagnétiques comme les nanoparticules d'oxydes de fer de type MION [Weissleder et al., 1992], USPIO [Johansson et al., 2001] ou VUSPIO [Jacobin-Valat et al., 2010]. Pour cela, nous avons mis en place, une méthode efficace de couplage **entre un AcM murin ciblant la P-sélectine, et des agents de contraste superparamagnétiques** créés par l'équipe d'Etienne Duguet de l'UPR 9048 (ICMCB : Institut de chimie de la matière condensée de Bordeaux) avec qui nous collaborons dans le cadre du projet ANR IMATHABIO.

5.9. Caractérisation de l'anticorps anti-P-sélectin (VH10)

La P-sélectine est une molécule d'adhésion présente à la surface des cellules endothéliales activées et des plaquettes activées après dégranulation. Elle est impliquée dans le recrutement des lymphocytes et des plaquettes circulant au niveau du site d'inflammation [Wang, 2003][Burger et al., 2003]. Le ciblage de la P-sélectine permet non seulement de détecter les plaquettes présentes dans le thrombus mais aussi de localiser les zones d'inflammation où les cellules endothéliales sont activées. L'Anticorps VH10

ciblant la P-sélectine utilisé dans cette étude, a été identifié par la technique des hybridomes, en immunisant une souris à l'aide de plaquettes humaines activées à la thrombine. Afin d'en disposer en quantité suffisante pour les techniques de greffage, cet anticorps a été préalablement produit à l'aide d'un bioréacteur en fibres creuses, le Tecnomouse. Les anticorps ont ensuite été purifiés par chromatographie sur colonne d'affinité (Protéine-G-Sépharose) puis soumis à l'action du MEA (2-mercaptoéthylamine). Le MEA entraîne une réduction ménagée des ponts disulfures intra-chaînes pour l'obtention de demi-anticorps (H+L), qui seront ultérieurement utilisés pour le couplage aux VUSPIOs (**Figure 5.14**).

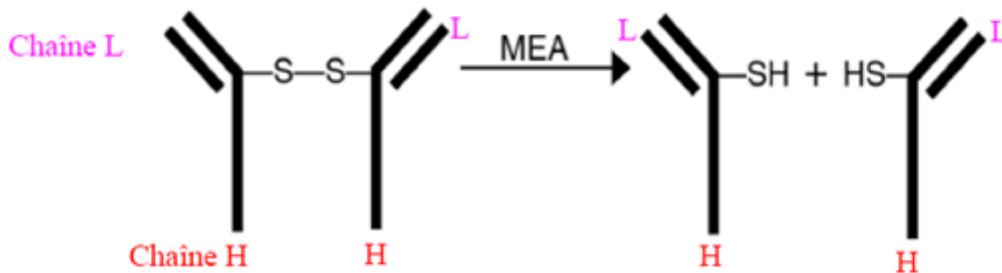


Figure 5.14 : Réduction ménagée d'un anticorps à l'aide de MEA (2-mercaptoéthylamine).

5.10. Synthèse des nanoparticules superparamagnétiques

Le laboratoire d'Etienne Duguet de l'ICMCB, avec qui nous collaborons pour cette étude, a développé une nouvelle génération d'USPIO, les **VUSPIO** (Versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide) [Mornet et al., 2004]. Ce sont des nanoparticules d'oxyde de fer (cœur maghémite) de taille comprise entre 1,6 et 7,5 nm et auxquelles sont liées de façon covalente des macromolécules de **dextran**. Des macromolécules de polyéthylèneglycol (mono ou di-amine-**PEG**) assurent en dernier lieu à ces particules un caractère versatile et furtif. Par ailleurs, cette PEGylation autorise le greffage de fluorochromes et de biomolécules d'intérêt, comme les AcM (**Figure 5.15**).

Le **greffage** de **VH10** a été réalisé en utilisant un linker hétérobi-fonctionnel, le **Sulfo-SMCC**, qui rend les groupements amines libres du **VUSPIO** réactifs avec les groupements Thiols (-SH) présents sur les demi-

anticorps préalablement réduits. Les agents de contraste couplés aux anticorps sont purifiés sur des colonnes magnétiques, avant d'être testés sur plaquettes humaines activées à la thrombine ou *in vivo* sur un modèle de souris athéromateuse.

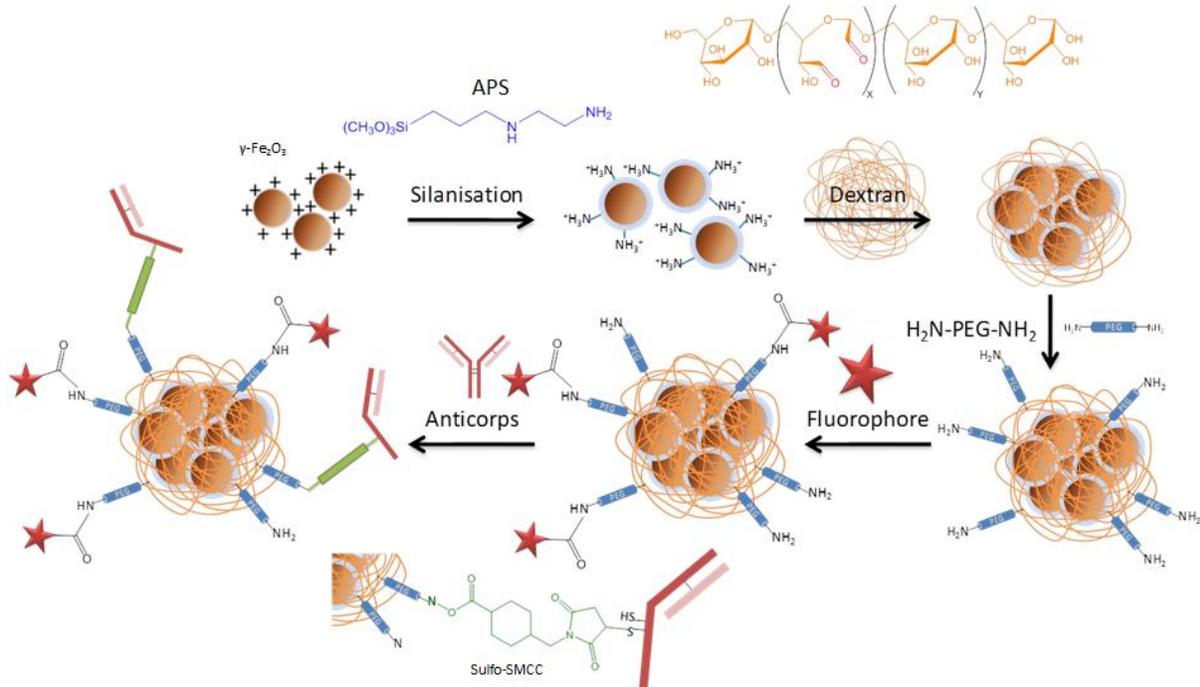


Figure 5.15 : La préparation des VUSPIO débute par la modification en surface du cœur maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) par silanisation à l'aide d'agents de couplage (γ -aminopropyl-triéthoxysilane ou APS) qui se condensent à la surface de l'oxyde de fer et forment une base de schiff réductible avec le dextran partiellement oxydé. Une deuxième étape de PEGylation (mono ou di-aminoPEG) est réalisée. L'amine libre peut, après activation à l'aide de Sulfo-SMCC, interagir avec des anticorps ou des fluorochromes. D'après Mornet et al., 2005.

5.11. Test de réactivité sur plaquettes activées et imagerie non invasive *in vivo*

Des plaquettes humaines quiescentes ou activées à la thrombine, après incubation avec les nanoparticules de VUSPIO couplées ou non à l'anticorps anti-P-Sélectine, sont testées en cytométrie en flux, puis observées en microscopie confocale et IRM *in vitro* (à 0,2 et 4,7T), dans des tubes spécifiques permettant d'imager des préparations plaquettaires figées dans un gel d'agarose. Les résultats obtenus en cytométrie en flux et en microscopie confocale ont montré une reconnaissance spécifique des plaquettes activées par l'agent ciblant VH10-VUSPIO (voir article, figure 2) (Figure 5.16). De même, les études d'IRM *in vitro* à 0.2T, ont permis d'obtenir un hypersignal en utilisant des séquences pondérées en T1 et un hyposignal en utilisant des séquences pondérées en T2 (voir article, figure 3) (Figure 5.16).

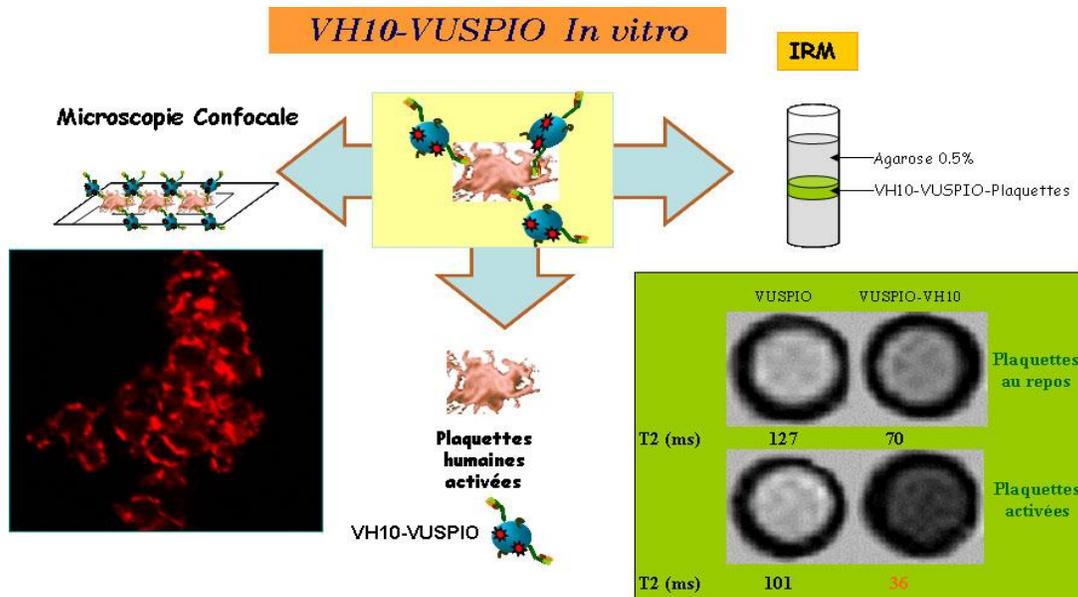


Figure 5.16 : Test de réactivité sur plaquettes activées et imagerie non invasive in vivo

Ensuite, afin de valider ces résultats *in vivo*, le complexe VH10-VUSPIO a été injecté à des souris ApoE^{-/-}. Des images sont réalisées avant et 24H après injection du complexe. Vingt-quatre heures après, il y a peu d'accumulation de VUSPIOs dans le foie. La zone gastrique montre des hyposignaux liés à la présence de bulles d'air de même intensité avant et après injection de l'agent de contraste. Par contre, certaines zones de l'artère présentent des temps de relaxation diminués avec des zones d'hyposignal intenses au sein de l'intima, ce qui tend à **démontrer l'accumulation de VH10-VUSPIO au niveau de l'épaississement aortique**, accumulation liée au ciblage (voir article, figure 4). L'image réalisée avec un temps d'écho (TE) de 5ms accentue l'hyposignal témoignant de l'accumulation de l'agent ciblant.

Article: MRI of inducible P-Selectin expression in human activated platelets involved in early stages of atherosclerosis.

Etude récemment publiée dans NMR in Biomedicine

MRI of inducible P-selectin expression in human activated platelets involved in the early stages of atherosclerosis

Marie-Josée Jacobin-Valat^{a,†}, Kamel Deramchia^{a,†}, Stéphane Mornet^{b,†}, Christoph E. Hagemeyer^c, Stéphane Bonetto^a, Rémy Robert^a, Marc Biran^a, Philippe Massot^a, Sylvain Miraux^a, Stéphane Sanchez^a, Anne-Karine Bouzier-Sore^a, Jean-Michel Franconi^a, Etienne Duguet^b and Gisèle Clofent-Sanchez^{a*}

The noninvasive imaging of atherosclerotic plaques at an early stage of atherogenesis remains a major challenge for the evaluation of the pathologic state of patients at high risk of acute coronary syndromes. Recent studies have emphasized the importance of platelet–endothelial cell interactions in atherosclerosis-prone arteries at early stages, and the prominent role of P-selectin in the initial loose contact between platelets and diseased vessel walls. A specific MR contrast agent was developed here for the targeting, with high affinity, of P-selectin expressed in large amounts on activated platelets and endothelial cells. For this purpose, PEGylated dextran/iron oxide nanoparticles [PEG, poly(ethylene glycol)], named versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide (VUSPIO) particles, labeled with rhodamine were coupled to an anti-human P-selectin antibody (VH10). Flow cytometry and microscopy experiments on human activated platelets were highly correlated with MRI (performed at 4.7 and 0.2 T), with a 50% signal decrease in T_2 and T_1 values corresponding to the strong labeling of activated vs resting platelets. The number of 1000 VH10–VUSPIO nanoparticles attained per activated platelet appeared to be optimal for the detection of hypo- and hyper-signals in the platelet pellet on T_2 - and T_1 -weighted MRI. Furthermore, *in vivo* imaging of atherosclerotic plaques in ApoE mice at 4.7 T showed a spatial resolution adapted to the imaging of intimal thickening and a hypo-signal at 4.7 T, as a result of the accumulation of VH10–VUSPIO nanoparticles in the plaque. Our work provides support for the further assessment of the use of VH10–VUSPIO nanoparticles as a promising imaging modality able to identify the early stages of atherosclerosis with regard to the pertinence of both the target and the antibody-conjugated contrast agent used. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: molecular imaging; MRI contrast agents; atherosclerosis; nanoparticles; platelets; antibodies; P-selectin

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the primary cause of heart diseases in industrialized nations. It is now accepted that it is not simply an inevitable consequence of aging but, rather, is a systemic, chronic and progressive inflammatory disease characterized by the build-up of lipid-rich plaques within the walls of large arteries (1–3). These vulnerable plaques with large lipid cores, a thin fibrous cap and inflammatory cell infiltrate can rupture, exposing thrombogenic material from the plaque core and precipitating acute coronary events and peripheral vascular disease.

MRI is continuously evolving, leading to enhanced spatial resolution and contrast flexibility, and combining different sequences and various contrast media (4–7). However, its sensitivity is low, leading to the need for imaging by targeting the compositional components of atherosclerotic plaques with contrast agents (6,7). Several attempts at *in vivo* MRI, aimed at visualizing key molecular targets with specific agents, have been reported. The most common approaches use the labeling of ligands or biomimetics (8–10), peptides (11–14) or monoclonal antibodies (Mabs) with gadolinium diethylenetriaminepentaacetate paramagnetic contrast agent (15–20). However, gadolinium

* Correspondence to: G. Clofent-Sanchez, CNRS, Université de Bordeaux, CRMSB, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.
E-mail: gisele.clofent-sanchez@rmsb.u-bordeaux2.fr

a M.-J. Jacobin-Valat, K. Deramchia, S. Bonetto, R. Robert, M. Biran, P. Massot, S. Miraux, S. Sanchez, A.-K. Bouzier-Sore, J.-M. Franconi, G. Clofent-Sanchez, J.-M. Franconi, G. Clofent-Sanchez
CNRS, Université de Bordeaux, CRMSB, Bordeaux, France

b S. Mornet, E. Duguet
CNRS, Université de Bordeaux, ICMCB, Pessac, France

c C. E. Hagemeyer
Atherothrombosis and Vascular Laboratory, Baker IDI Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Vic., Australia

† These authors contributed equally to this work.

Abbreviations used: BCA assay, bicinchoninic acid assay; CPMG, Carr–Purcell–Meiboom–Gill; FITC, fluorescein isothiocyanate; Flash, fast low-angle shot three-dimensional sequence; Gd-DTPA, gadolinium diethylenetriaminepentaacetate paramagnetic contrast agent; UVECs, human umbilical vascular endothelial cells; IFN γ , interferon- γ ; IL1 β , interleukin-1 β ; Mab, monoclonal antibody; 2-MEA, 2-mercaptoethylamine HCl reagent; MPIO, microparticles of iron oxide; N_A , Avogadro's number: $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$; PBS, phosphate-buffered saline; PEG, poly(ethylene glycol); PFA, paraformaldehyde; SPIO, superparamagnetic iron oxide; TNF α , tumor necrosis factor- α ; TRAP, thrombin receptor activating peptide; USPIO, ultrasmall superparamagnetic iron oxide; VUSPIO, versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide.

presents potential disadvantages, such as low intrinsic relaxivity, and its safety has not been established. By contrast, SPIO and USPIO particles are currently marketed (21,22). The advantages of SPIO and USPIO are the strong T_2 contrast at nanomolar concentrations and the well-known degradation occurring through normal physiologic iron-based pathways (23–26). Untargeted SPIO and USPIO nanoparticles have long been used clinically to target cells associated with both the reticular endothelial and monophagocytic systems (27–30). Some studies have reported the use of USPIO, SPIO or even microparticles of iron oxide (MPIO) for functionalization strategies (31–39). However, the most recent studies have focused on atherothrombosis imaging, which constitutes a late event in the atherogenesis process (35–37). Moreover, compounds containing commercial MPIO cannot be translated directly into clinical use because of the nonbiodegradable coat of the particle, which is made up of polymers, such as polyurethane, divinyl benzene and other polystyrene derivatives (34,35,40).

There is therefore a need for more specific and safe MR contrast agents to allow the detection of the first stages of vessel wall alterations in order to ensure the efficient follow-up of patients at risk of vascular diseases. A very early event in plaque formation is the interaction of circulating platelets with activated endothelial cells (41). Activated platelets cause the activation of intact resting endothelium *in vivo*, leading to inflammation (42), and play a key role in thrombotic vascular episodes (43,44). P-Selectin (CD62P) is a selectin class cell adhesion molecule that is overexpressed on activated platelets and on the luminal surface of pathologically activated endothelium. The role of P-selectin as a primary adhesion molecule in the initiation of cell activation and adhesion to platelets and endothelial cells at the onset of atherosclerosis is now recognized (45). Platelet and endothelial P-selectin are both critical for activated platelet-induced leukocyte rolling, and play a role in the promotion of circulating monocyte tethering and rolling, and lesion development (46–50). Studies have reported that P-selectin deficiency in ApoE^{-/-} mice has a protective effect in atherosclerotic lesion development (51).

Therefore, the literature highlights the interest in the targeting of P-selectin. We designed an original targeting contrast agent, based on a bimodal magnetofluorescent agent (52–54) covalently coupled to a targeting moiety specific to human P-selectin [the murine antibody (VH10)], for MRI of the early stages of atherosclerosis.

EXPERIMENTAL DETAILS

VH10 characterization and VH10–VUSPIO construction

VH10 anti-P-selectin Mab characterization

The anti-P-selectin hybridoma used in this study was generated in-house in the laboratory of Dr Alan Nurden. Mab VH10 was produced from spleen cells of a Balb/c mouse immunized with three injections at weekly intervals of 5×10^8 washed human platelets previously activated by thrombin. Our aim was to obtain antibodies recognizing activated platelets, but not resting (nonactivated) platelets. Mab VH10 was found to recognize a 140-kDa glycoprotein on the platelet surface by Western blot experiments. Immunogold labeling and electron microscopy confirmed that it recognized granule membranes in resting platelets and that the antigen was translocated to the platelet surface on secretion (55). The apparent dissociation constant was

estimated to be 1.5 nM with 8600 sites per activated platelet. VH10 is able to recognize murine platelets, but at three orders of magnitude lower than human platelets, in enzyme-linked immunosorbent assays (data not shown). The grafting process and MRI studies necessitate huge quantities of antibodies. VH10 was purified from hollow fiber cultures performed in a Tecnomouse apparatus using affinity chromatography on protein-G-Sepharose CL-4B IgG purification columns (Pierce, Perbio Science, Brebieres, France). After dialysis against phosphate-buffered saline (PBS) and quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce), aliquots of 640 µg/mL were stored at -20°C . Mab VH10 was tested by flow cytometry on human platelets activated by thrombin or thrombin receptor activating peptide (TRAP), and by immunofluorescence microscopy imaging on activated endothelial cells [e.g. tumor necrosis factor- α (TNF α) + interleukin-1 β (IL1 β) - or interferon- γ (IFN γ) + IL1 β -treated human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs)].

Flow cytometry

Washed platelets were prepared from acid-citrate-dextrose-anticoagulated blood according to described procedures (56). Samples (2×10^8 platelets/mL) in reaction buffer were activated with 0.5 U/mL human thrombin (Fibrindex; Ortho Diagnostics, Raritan, NJ, USA) or 25 µM TRAP (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and fixed with 1% paraformaldehyde (PFA). Aliquots of 2×10^7 activated and nonactivated platelets were incubated overnight with VH10 at 10 µg/mL. Secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse antibody (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) was added for 45 min and then washed off. Flow cytometry was performed on a FACSCalibur apparatus (BDBiosciences, Le Pont de Claix, France). Analysis was performed on 10^4 platelets per sample in the FL1 channel using the BD CellQuest™ Pro software program.

Immunofluorescence microscopy imaging

Endothelial cells were a generous gift from Dr Richard Daculsi and Dr Reine Barenne (INSERM U577, Bordeaux, France). P-Selectin was expressed after overnight activation of endothelial cells (HUVECs) with 3 ng/mL TNF α and 10 ng/mL IL1 β , 100 ng/mL IFN γ and 10 ng/mL IL1 β , or 10 ng/mL IL1 β alone. Cells were fixed with 1% PFA, blocked in PBS–2% bovine serum albumin–0.01% glycine (57) and sequentially incubated with VH10 antibody and with a secondary FITC-labeled antibody. Microscopic images were shot using the 40 \times objective lens in a fluorescent Zeiss Axiovert 25 microscope (Seli, Toulouse, France) equipped with an Olympus DP70 camera (Seli) and using the AnalySIS software program provided by Soft Imaging System (Münster, Germany).

Preparation of rhodamine-labeled VUSPIO superparamagnetic contrast agent and VH10–VUSPIO conjugate

The MR contrast agent was developed from maghemite nanoparticles covalently bonded to a dextran corona using silane coupling agents (Fig. 1C, see 'Results') (58). A mixture of two types of poly(ethylene glycol) (PEG) was used [O-(2-aminoethyl) polyethylene glycol ($M_w = 3000$ g/mol) and poly(ethylene glycol)-bis-(3-aminopropyl)-terminated ($M_w = 1600$ g/mol); Sigma-Aldrich] (59). The mean diameter of the maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) cores was 7.50 ± 0.27 nm, as determined by trans-

mission electron microscopy (TEM), and increased to a hydrodynamic diameter of around 80 nm with a polydispersity index lower than 0.3, as dextran and PEG modifications occurred, as determined by photon correlation spectroscopy. VUSPIO labeling was performed using a fluorescent organic dye [5(6)-carboxy-X-rhodamine-*N*-succinimidyl ester]. After reaction, the fluorescent magnetic dispersion was washed by tangential ultrafiltration and adjusted to 7.05 g Fe/L [$C_m = 126 \text{ mM (Fe}^{3+})$ or 63 mM (Fe_2O_3)]. The average mass of the particle (mean diameter of maghemite, 7.5 nm) was calculated using the formula: $m_p = 4/3\pi r^3 \rho$ ($r = 3.75$; $\rho = 4.87 \text{ g/cm}^3$) = $1.075 \times 10^{-18} \text{ g}$. Assuming approximately 20 crystals or particles per VUSPIO and a concentration of particles C_p given by $[C_m(\text{Fe}_2\text{O}_3)/m_p]/N_A = (0.063 \times 160/1.075 \times 10^{-18})/N_A = 1.56 \times 10^{-5} \text{ M}$, this led to a concentration of VUSPIO at $[\text{VUSPIO}] = [\text{particles}]/20 = 0.78 \mu\text{M}$. The number of Fe atoms per particle can be calculated using the formula $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{particles}] = 126 \times 10^{-3} \text{ M}/1.56 \times 10^{-5} \text{ M}$, leading to approximately 8100 Fe atoms per particle.

The relaxivity of rhodamine-labeled VUSPIO ($r_2 = 192 \text{ mmol/L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) was calculated from the slope of a curve correlating the $1/T_2$ values measured at 4.7 T with the Fe^{3+} concentration.

VH10 antibody conjugation to fluorescent VUSPIO contrast agent was achieved using sulfo-succinimidyl-4-*N*-maleimido-methyl)cyclohexane-1-carboxylate (Pierce) as coupling agent by converting the remaining primary amine groups into maleimide groups. In parallel, a controlled reduction of VH10 (200 μg) was performed with the mild 2-mercaptoethylamine HCl reagent [2-MEA at 35, 50 and 150 mM prepared in 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid buffer (20 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 6)] to generate thiol functions. Then, the maleimide groups of VUSPIO react with the thiol groups of the half-antibody to form stable thioether bonds (Fig. 1C, see 'Results'). A magnetic separation column (MACS, Miltenyi Biotec, Paris, France) was used to separate the unbound Mab from the magnetic conjugates. Three batches of VH10-VUSPIO were prepared: VH10-VUSPIO§2, VH10-VUSPIO§1 and VH10-VUSPIO§3 corresponding to a 2-MEA reduction of 35, 50 and 150 mM, respectively.

VH10-VUSPIO biochemical characterization

Human platelets were prepared as described previously. Samples were further activated with thrombin or TRAP and fixed with PFA. Another sample was first fixed with PFA and treated with Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in order to give antibody access to the P-selectin platelet pool. Activated, resting and permeabilized platelets were further washed in PBS, and 100 μL of 3.2×10^8 platelets were mixed with 100 μL of the specified formulation of VH10-VUSPIO overnight at 4°C (2 mg Fe/mL). An equivalent amount of rhodamine-labeled VUSPIO (antibody-free VUSPIO) was added in the same conditions to nonactivated and thrombin-activated platelets. After two washings in PBS, VH10-VUSPIO and antibody-free VUSPIO were resuspended in appropriate volumes to perform *in vitro* flow cytometry (0.2×10^8 platelets), confocal microscopy (10^8 platelets) and MRI studies (2×10^8 platelets).

Flow cytometry

Aliquots of 2×10^7 platelets were incubated overnight with VH10-VUSPIO. Secondary FITC-labeled anti-mouse anti-mouse antibody (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) was added for 45 min and then washed off. A positive control was

performed with the free VH10 antibody at 10 $\mu\text{g/mL}$ on TRAP-activated platelets.

Confocal fluorescence microscopy imaging

Aliquots of 10^8 platelets incubated overnight with VH10-VUSPIO and antibody-free VUSPIO were resuspended in 15 μL of anti-fading solution (mowiol). The confocal microscope was a Leica DMR TCS SP2 AOBs (Mannheim, Germany) on an upright stand, using objective HCX Plan Apo CS 63X NA 1.40. The laser used was green helium-neon (543 nm). The fluorescence emission was collected between 550 and 630 nm. For each fluorescence picture, a differential interference light microscopic image (Nomarski image) is given on the right to show the contour of the platelets.

MRI approaches

In vitro MRI

MRI was performed on aliquots of 2×10^8 platelets incubated overnight with VH10-VUSPIO or antibody-free VUSPIO in a 50- μL suspension and sealed with 100 μL 0.5% agarose gel to obtain the final pellet as a disk at least 5 mm in height. Cell pellets were imaged using a Bruker Biospec 47/50 (Ettlingen, Germany) and Siemens Open Viva (Erlangen, Germany) apparatus working at 4.7 and 0.2 T, respectively. On both imaging systems, a slice oriented perpendicularly to the sample tubes was used, allowing the whole group of tubes to be imaged in one experiment for each contrast.

On the 4.7-T system, transverse relaxation time constants were measured using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence (256 echoes) with an inter-echo time of 5.35 ms, imaging slice of 2 mm and a fixed repetition time (5000 ms). The resolution was $0.39 \times 0.39 \text{ mm}^2$.

On the 0.2-T system, we designed a T_2 measurement protocol with a multi-echo spin sequence (CPMG), with (5 mm imaging slice) sections obtained consecutively at 16 inter-echo times (from 22.5 to 360 ms) and a fixed repetition time (5000 ms). For longer T_2 values, the sequence was modified with 16 echo times ranging from 100 to 1600 ms. The spatial resolution was 0.86 mm/pixel (matrix size, 128×128 ; field of view, $110 \times 110 \text{ mm}^2$). Longitudinal relaxation times (T_1) were measured using a 'tomrop' multi-echo gradient sequence consisting of a preparative inverted motif with a pulse at 180° , followed by 16 acquisitions ranging from 20 to 6000 ms (adapted to the T_1 values to be studied) and a fixed repetition time (9000 ms). The resolution was 0.86 mm/pixel (matrix size, 128×128 ; field of view, $110 \times 110 \text{ mm}^2$). Spin-echo sequences were performed to acquire T_1 -weighted (TR/TE = 400/15 ms) and T_2 -weighted (TR/TE = 2500/42 ms) images (slice thickness, 5 mm; resolution, $0.51 \times 0.51 \text{ mm}^2$) (Fig. 3, see 'Results').

The T_1 and T_2 values of the different cell pellets were determined on regions of interest and averaged for three independent experiments. Signal intensity values and analyses of the data were performed using IGOR (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) and reported on a monoexponential curve, varying from $-M_0$ to $+M_0$ for T_1 and from M_0 to zero for T_2 .

In vivo and *ex vivo* MRI studies on atherosclerotic ApoE $^{-/-}$ mice

All animal studies were approved by the animal welfare and local ethics committee regulations. ApoE $^{-/-}$ mice were fed a cholesterol diet over 21 weeks and anesthetized using 2.5%

isoflurane before imaging. *In vivo* MRI was performed at 4.7 T after injection in the tail vein of a preparation of 100 μ L VH10–VUSPIO§1 diluted in 200 μ L physiological serum.

Precontrast axial images of the abdominal aorta were acquired with a fast low-angle shot two-dimensional sequence (TE = 2.1 ms; TR = 18 ms; 32 scans; two slices; thickness, 1 mm; resolution, 0.146 \times 0.146 mm²; field of view, 28 \times 28 mm²). After 24-h post-contrast MR acquisition (TE = 2.1 or 5 ms) to ensure complete body elimination of unfixed VH10–VUSPIO nanoparticles, the animals were sacrificed by pentobarbital overdose. Aortas were extracted, embedded in 0.5% agarose and MRI *ex vivo* analyses were performed using a 9.4-T MRI system (inner coil diameter, 10 mm). Imaging parameters (fast low-angle shot

three-dimensional sequence) included the following: TE = 8 ms; TR = 26 ms; field of view, 1.2 \times 1.2 \times 1.2 mm³; image resolution, 0.047 \times 0.062 \times 0.062 mm³/pixel; acquisition time, 12 h 47 min (overnight); 48 scans.

RESULTS

VH10 characterization and VH10–VUSPIO construction

VH10 binding on human platelets and endothelial cells

Flow cytometric studies showed that Mab VH10 reacts with human platelets activated by thrombin or TRAP, but does not

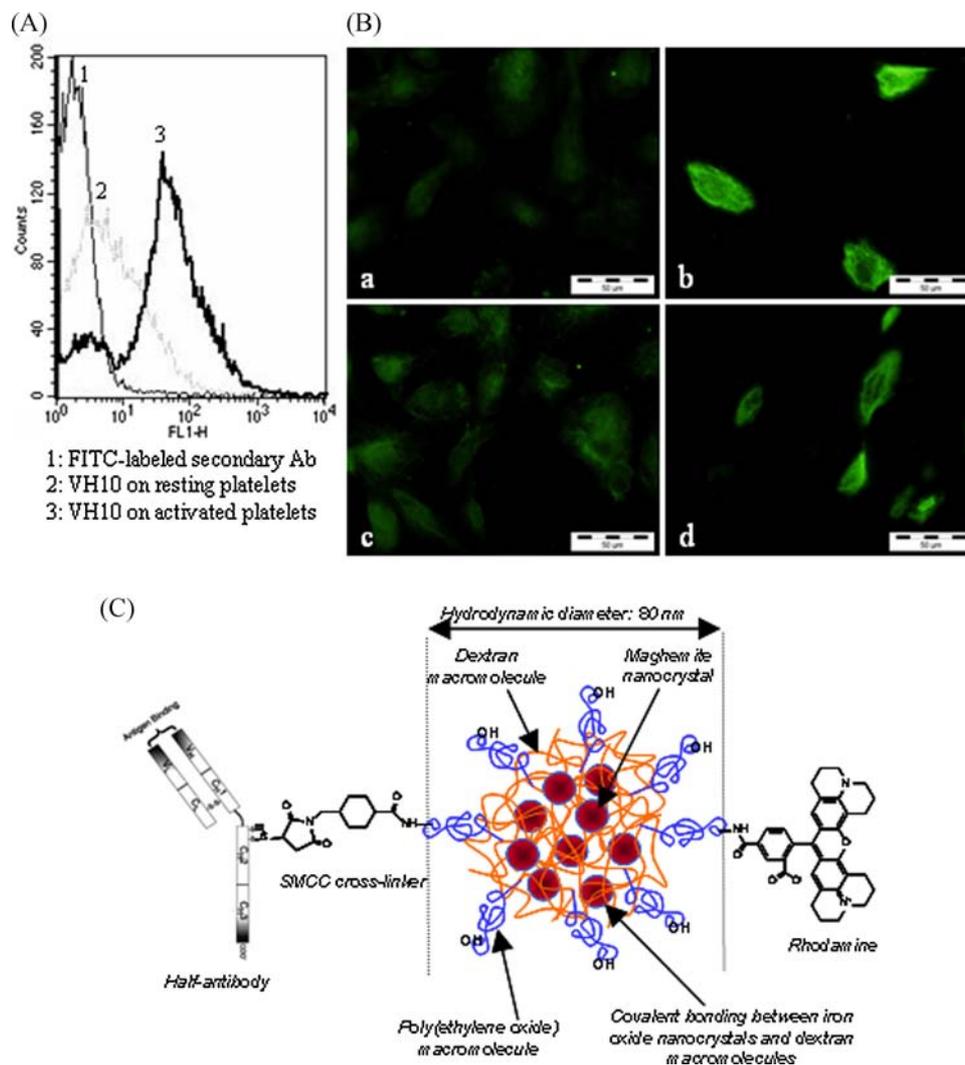


Figure 1. VH10 characterization and grafting to versatile ultrasasmall superparamagnetic iron oxide (VUSPIO) particles. (A) Cytometric profile on platelets. Selective labeling of thrombin-activated platelets with the murine anti-P-selectin monoclonal antibody (Mab) VH10 tested at 10 μ g/mL (3). A background labeling of resting platelets is observed as a result of residual activation of some cells during the washing steps (2). The control fluorescence intensity was obtained by incubating activated platelets with the secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse antibody alone (1). (B) Immunofluorescent experiments on endothelial cells. P-selectin is highly expressed after overnight activation of endothelial cells (human umbilical vascular endothelial cells, HUVECs) with 3 ng/mL tumor necrosis factor- α (TNF α) and 10 ng/mL interleukin-1 β (IL1 β) (b) or 100 ng/mL interferon- γ (IFN γ) and 10 ng/mL IL1 β (d). Photographs (b) and (d) show the selective labeling of activated HUVECs with 10 μ g/mL VH10 after incubation with a secondary FITC-labeled antibody. HUVECs are poorly activated with 10 ng/mL IL1 β alone and poorly labeled with VH10 (c). Background labeling of nonactivated HUVECs is shown in (a). (C) Multistep synthesis route of VH10–VUSPIO. To conjugate antibody on VUSPIO, a heterobifunctional coupling agent, sulfo-succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate, was used. The N-hydroxysuccinimide ester reacts with primary amines of VUSPIO to form covalent amide bonds. In parallel, a controlled reduction of VH10 is performed with the 2-mercaptoethylamine HCl reagent (2-MEA) to generate thiol functions. Then, the maleimide groups of VUSPIO react with the thiol groups of the half-antibody to form stable thioether bonds.

react with resting platelets (Fig. 1A). The background labeling of nonactivated platelets is essentially a result of the washing process of human platelets, which leads to the residual activation of some elements (60). We also confirmed the lack of binding of VH10 to resting platelets in whole blood (data not shown). The results highlighted a specificity of VH10 for activated platelets only, and therefore demonstrated that proteins and other cells in the blood did not take up VH10 nonspecifically.

Mab VH10 also binds to activated endothelial cells (e.g. TNF α + IL1 β - or IFN γ + IL1 β -treated HUVECs) (61), which are found in early atherosclerotic lesions (Fig. 1B).

VH10-VUSPIO conjugation

The iron content of the VH10-VUSPIO conjugate was estimated to be around 2 mg Fe/mL (0.22 μ M VUSPIO) using MRI curves which correlated the inverse of the T_2 and T_1 values measured on different dilutions of rhodamine-labeled VUSPIO with the Fe $^{3+}$ concentration (data not shown; see 'VH10-VUSPIO MRI testing'). The antibody content was estimated by colorimetric assay to be between 5 and 100 μ g/mL, depending on the concentration of 2-MEA used (Table 1). The concentration of 150 mM of MEA used for the VH10-VUSPIO \S 3 batch preparation led to a valency of 0.3 half-antibodies per VUSPIO. The VH10-VUSPIO \S 1 and VH10-VUSPIO \S 2 batch preparations were performed using 50 and 35 mM MEA, respectively. For VH10-VUSPIO \S 2 and VH10-VUSPIO \S 1 conjugations, each nanoparticle displayed, on average, a valency of 1.8 and 6 half-IgG molecules, respectively, which correspond to concentrations of 2.4×10^{14} and 8×10^{14} half-antibodies/mL, respectively, for 1.33×10^{14} VUSPIO/mL.

VH10-VUSPIO biochemical characterization

VH10-VUSPIO cytometric characterization on human platelets

Cytometric analysis showed that VH10-VUSPIO \S 2 maintained its specificity for activated platelets (Fig. 2A). A shift in fluorescence intensity was observed between TRAP-activated and resting platelets (cf. peak 2 with peak 4). However, a residual activation occurred during platelet preparation: the fluorescence intensity was higher in peak 2 relative to peak 1. A positive control was performed with the free VH10 antibody at 10 μ g/mL on TRAP-activated platelets to confirm the level of P-selectin expression. The binding of VH10-VUSPIO \S 2 targeting agent on TRAP-activated platelets was similar to that of free VH10 antibody.

VH10-VUSPIO confocal characterization on human platelets

Thrombin- or TRAP-activated human platelets incubated with VH10-VUSPIO \S 1 (Fig. 2B) showed fine labeling with the fluorochrome in confocal analyses. PFA-fixed platelets permeabilized with Triton X-100 showed extra- and intracellular accumulation of VH10-VUSPIO \S 1. In contrast, resting (nonactivated) platelets were poorly labeled. This residual labeling was interpreted as the activation of some cells during platelet washing (60). Nomarski images are given in parallel. Thus, confocal experiments also indicated that VH10-VUSPIO maintained its specificity for activated platelets. In order to assess the benefit of using targeted VUSPIO over uncoated VUSPIO, antibody-free VUSPIO (rhodamine-labeled VUSPIO without antibody grafting) was tested on resting and activated platelets. No labeling was observed (Fig. 2B).

The results for VH10-VUSPIO \S 2 were quite similar to those for VH10-VUSPIO \S 1. Platelet labeling with VH10-VUSPIO \S 3, which displayed a valency of only 0.3 half-antibodies per VUSPIO, compared with 1.8 and 6 for VH10-VUSPIO \S 2 and VH10-VUSPIO \S 1, respectively, was not significantly different from that of rhodamine-labeled VUSPIO without grafting (data not shown).

In summary, both VH10-VUSPIO \S 1 and VH10-VUSPIO \S 2 differentially recognized activated vs nonactivated platelets. This demonstrated the specificity of our targeted contrast agent for activated platelets only.

MRI approaches

VH10-VUSPIO in vitro MRI testing

In order to demonstrate that VH10-VUSPIO can be imaged by MRI and to determine whether differential binding of VH10-VUSPIO batch preparations to activated vs resting cells could be verified by MRI and MR signal intensity measurements, the mixtures of platelets with different samples of VH10-VUSPIO were embedded in agarose gel in suitable tubes for MRI at 0.2 and 4.7 T.

The same experiments were conducted with rhodamine-labeled VUSPIO without grafting to discount nonspecific trapping of ungrafted contrast agent. The confocal images showed a correlation with T_1 and T_2 values obtained by MRI at 0.2 and 4.7 T. All the MRI data concerning the different VH10-VUSPIO batch preparations or rhodamine-labeled VUSPIO without grafting incubated with activated vs resting platelets are summarized in Table 1. The average T_2 values at 4.7 T for three experiments are also given in Fig. 2B for VH10-VUSPIO \S 1 in order to compare MRI and confocal data.

As shown in Fig. 3, T_1 - and T_2 -weighted MR spin-echo images at 0.2 T revealed remarkable differences in signal intensity of VH10-VUSPIO \S 1 and VH10-VUSPIO \S 2 when they were incubated with activated vs resting platelets. This was reflected by a hyposignal in T_2 images, a hypersignal in T_1 images and a concomitant significant decrease in T_2 and T_1 relaxation times when incubated with activated platelets. The same MRI experiment was performed with different dilutions of rhodamine-labeled VUSPIO mixed with 2×10^8 platelets and further embedded in agarose gel. Tubes were imaged at 0.2 and 4.7 T (data not shown). A linear fit was obtained between the inverse of the measured T_2 and T_1 values and the Fe $^{3+}$ concentration (data not shown). The equation of the straight line allowed the calculation of the corresponding Fe $^{3+}$ concentrations in the VH10-VUSPIO conjugate (see 'VH10-VUSPIO conjugation') and in activated platelets incubated with VH10-VUSPIO. This can be exploited to estimate the concentration of Fe $^{3+}$ or VH10-VUSPIO accumulated per platelet and the rate of binding efficiency of VH10-VUSPIO on activated platelets when compared with the initially added iron oxide.

The initially added iron oxide was 1 pg per platelet (100 μ L of VH10-VUSPIO at 2 mg/mL for 2×10^8 platelets). T_1 and T_2 MR signal intensity measurements of the different VH10-VUSPIO/platelet incubation assays led to an estimation of the quantity of Fe $^{3+}$ finally bound to activated platelets in the incubation tube.

With the VH10-VUSPIO \S 1 conjugate, 0.021 pg of iron oxide was recovered per platelet, leading to 2.1% of the initially added iron oxide particles accumulated per activated platelet. The iron oxide accumulated corresponded to approximately 1000 VH10-VUSPIO particles per activated platelet.

Table 1. Differential binding of VH10-versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide (VH10-VUSPIO) to human platelets, activated or not with thrombin or thrombin receptor activating peptide (TRAP), or treated with Triton X-100 to give access to P-selectin contained in α granules. Activated and nonactivated platelets were embedded in agarose gel for MRI analysis at 4.7 and 0.2 T

| Iron and antibody content in 1 mL Valency | VH10-VUSPIO§1 | | VH10-VUSPIO§2 | | VH10-VUSPIO§3 | | VUSPIO | | Activated platelets |
|---|---|------------|---|--------------|--|-------------|-----------------------|-------------|---------------------|
| | 2 mg Fe ³⁺ for 100 μ g half-antibody 6 half-antibody per VUSPIO ^b | + | 2 mg Fe ³⁺ for 30 μ g half-antibody 1.8 half-antibody per VUSPIO | + | 2 mg Fe ³⁺ for 5 μ g half-antibody 0.3 half-antibody per VUSPIO | + | 2 mg Fe ³⁺ | + | |
| Thrombin activation | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| T ₂ (ms) (4.7 T) ^a | 29 ± 0.3 | 80.7 ± 0.5 | 56 ± 4 | 74.6 ± 0.9 | 77 ± 1.4 | 100.3 ± 1.9 | 103.2 ± 1.2 | 119.7 ± 0.9 | 133.3 ± 1.8 |
| T ₂ (ms) (0.2 T) | 35.6 ± 1.4 | 81.7 ± 2.2 | 48.5 ± 1.7 | 73.9 ± 2.3 | 64 ± 4 | 89 ± 3.2 | 90.6 ± 3.1 | 119.9 ± 4.1 | 124.7 ± 5.2 |
| T ₁ (ms) (0.2 T) | 342.4 ± 27 | 657 ± 23 | 412.8 ± 13.2 | 781.6 ± 25.5 | 580 ± 44 | 1002 ± 32 | 852.5 ± 25.4 | 1114 ± 36 | 1590.5 ± 68.5 |
| TRAP activation | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| T ₂ (ms) (4.7 T) | | | 33.6 ± 0.11 | 74.6 ± 0.9 | | | 179.6 ± 1.2 | 119.7 ± 0.9 | |
| T ₂ (ms) (0.2 T) | 29.1 ± 3.3 | 80.7 ± 2.2 | 29.7 ± 1.1 | 73.9 ± 2.3 | | | 182.9 ± 10.5 | 119.9 ± 4.1 | |
| T ₁ (ms) (0.2 T) | 178.9 ± 21.4 | 657 ± 23 | 173.6 ± 12.3 | 781.6 ± 25.5 | | | 1547.3 ± 60.2 | 1114 ± 36 | |
| Triton lysis | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| T ₂ (ms) (4.7 T) | 42.7 ± 0.4 | 80.7 ± 0.5 | | | | | 122.6 ± 0.6 | 119.7 ± 0.9 | |
| T ₂ (ms) (0.2 T) | 52.3 ± 2.3 | 81.7 ± 2.2 | | | | | 127 ± 4 | 119.9 ± 4.1 | |
| T ₁ (ms) (0.2 T) | 398.5 ± 30 | 657 ± 23 | | | | | 989.7 ± 44.9 | 1114 ± 36 | |

^aResults are the mean of two or three experiments and represent the mean statistical analysis of the significance of the inherent MRI measure. ^b8 × 10¹⁴ molecules of half-antibody for 1.33 × 10¹⁴ molecules of VUSPIO.

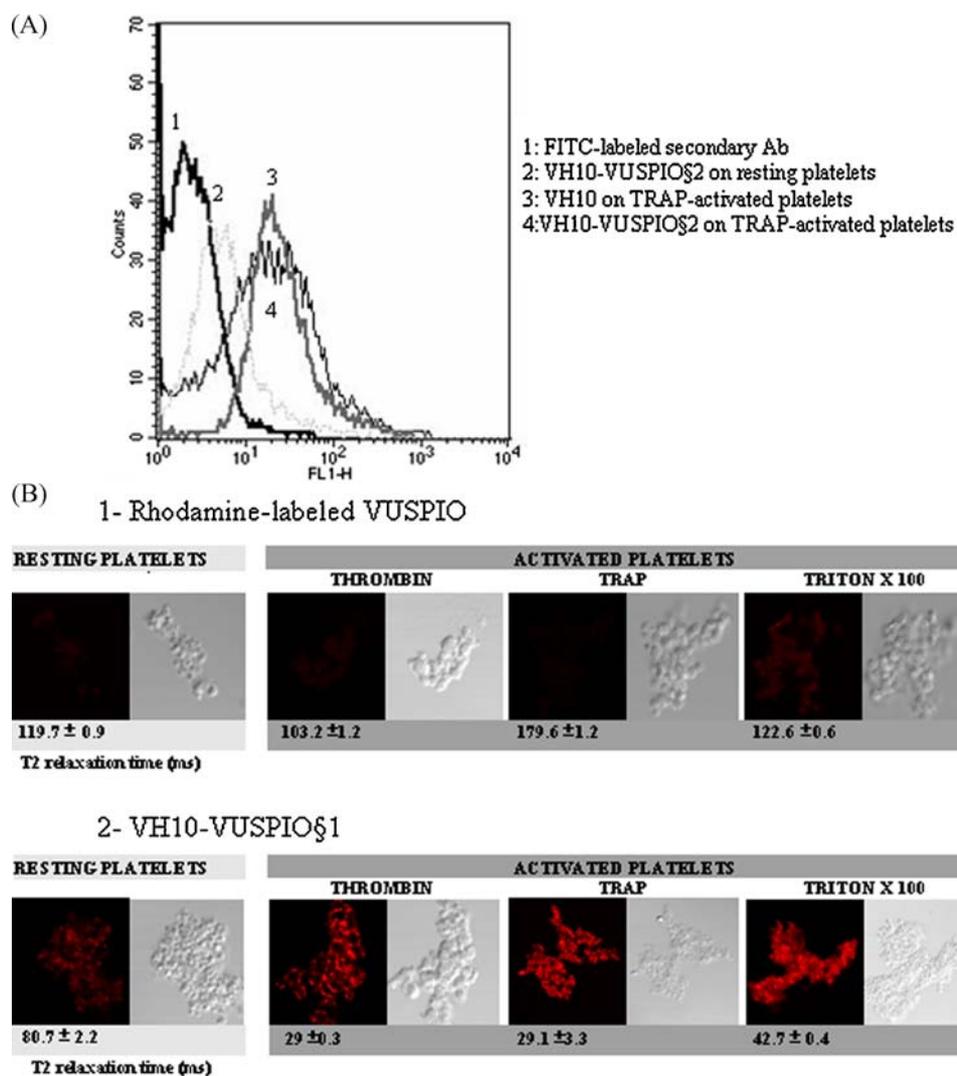


Figure 2. VH10-versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide (VH10-VUSPIO) biochemical characterization. (A) Flow cytometric profiles of *in vitro* binding of VH10-VUSPIO§2 to resting (2) and thrombin receptor activating peptide (TRAP)-activated platelets expressing P-selectin (4). Increasing fluorescence intensity on the FL1-H x axis is obtained for both VH10 and VH10-VUSPIO§2 on TRAP-activated platelets (3, 4). (B) Fluorescence confocal microscopy images of resting platelets, thrombin- or TRAP-activated platelets and permeabilized platelets with rhodamine-labeled VUSPIO (antibody-free VUSPIO) (1) or VH10-VUSPIO§1 batch preparation (2). VH10-VUSPIO§1 was highly accumulated on the surface of activated or permeabilized platelets, but there was poor labeling of resting platelets. Moreover, no labeling was observed with antibody-free VUSPIO. A differential interference light microscopic image (Nomarski image) on the right shows the contour of platelets for each fluorescence image. The T_2 -weighted measurements at 4.7 T of the mixtures of TRAP- and thrombin-activated platelets with rhodamine-labeled VUSPIO or VH10-VUSPIO§1 batch preparation were highly correlated with the confocal images, with a significant decrease in the T_2 relaxation time for higher platelet labeling (for example, 29 ± 0.3 ms vs 80.7 ± 2.2 ms for the VH10-VUSPIO§1 batch preparation incubated with thrombin-activated platelets vs resting platelets).

Some discrepancy may exist between the images of VH10-VUSPIO contrast agent diluted in gels and the images of platelets targeted by VH10-VUSPIO, because the iron oxide particles are, in this case, expected to be confined to the platelet membrane. Indeed, we have observed in previous studies slight differences between a homogeneous gel containing a contrast agent and cells that have captured the same quantity of contrast agent in vesicles. This was interpreted as an additive effect because of the high concentration of the agent. However, in our case, iron oxide particles surrounding platelets are homogeneously distributed on the platelet membrane. Thus, even if an additive effect occurs, this would only result in a small decrease

in T_2 values and concomitantly little overestimation of the calculation of the attached amount of iron.

VH10-VUSPIO MRI *in vivo* and *ex vivo* studies on aortas from atherosclerotic ApoE^{-/-} mice

Previous studies have reported the accumulation of superparamagnetic nanoparticles in the aortas of atherosclerotic rabbits (62,63). We therefore injected antibody-free VUSPIO in ApoE^{-/-} mice and failed to observe differences between uninjected and antibody-free VUSPIO-injected atherosclerotic ApoE^{-/-} mice (data not shown). VH10-VUSPIO§1 targeted

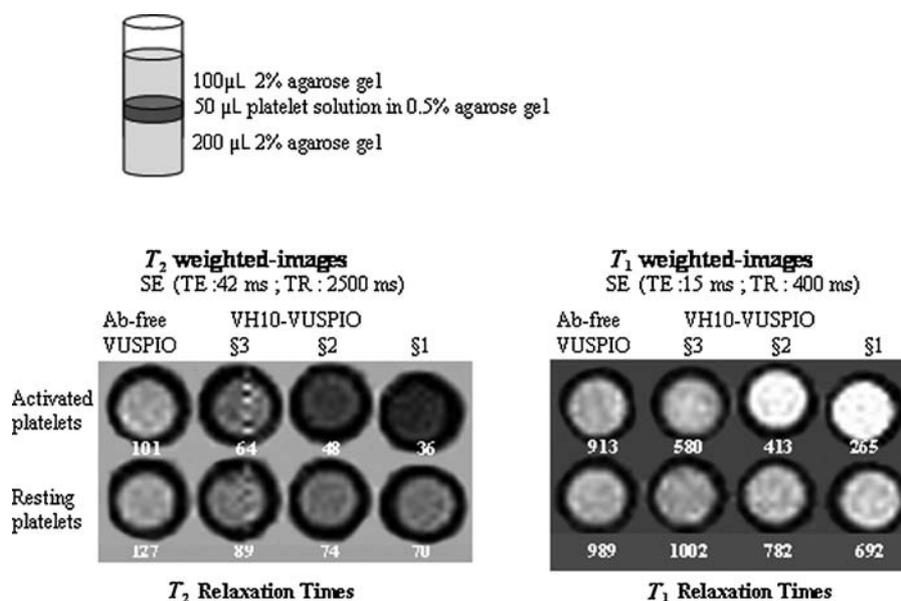


Figure 3. VH10-versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide (VH10-VUSPIO) *in vitro* MRI characterization. MR images of platelet pellets embedded in agarose gel were acquired at 0.2 T using spin-echo sequences. A hyposignal in T_2 images and a hypersignal in T_1 images show an accumulation of iron on platelets in an activated state when incubated with VH10-VUSPIO§1 and VH10-VUSPIO§2. Concomitantly, VH10-VUSPIO§1 and VH10-VUSPIO§2 showed, with activated platelets, significant decreases in the T_2 and T_1 relaxation times. The VH10-VUSPIO§3 preparation gave signals and T_2 or T_1 values not significantly different from those obtained with antibody-free VUSPIO. Ab, antibody.

contrast agent was then injected in ApoE^{-/-} mice (batch chosen for lower T_2 value when incubated with activated platelets, see Table 1). High-resolution MR follow-up of contrast enhancement of the aorta with VH10-VUSPIO was conducted successfully in the three mice tested. The injection was well tolerated by ApoE^{-/-} mice and no adverse reactions were observed. For each mouse, signal analysis was performed in the abdominal aorta and monitored 24 h after injection. Figure 4A shows axial T_2 -weighted images of an ApoE^{-/-} mouse, realized before (a, b) and 24 h after (c, c', d, d') the injection of VH10-VUSPIO. In the enlarged images of the 24-h (d, d') post-injection slice, we showed that VH10-VUSPIO could be detected by a loss of MRI signal generated by nanoparticle accumulation in the atherosclerotic vessel wall. Pre- and post-contrast images were performed at TE = 2.1 ms. For post-contrast images, TE = 5 ms was used to highlight the contrast caused by VUSPIO accumulation at the level of the aorta. Concomitantly, gastric areas appeared as large dark areas owing to bubbles generating hyposignals. However, when comparing 2.1-ms pre- and post-contrast images, it appeared that gastric areas presented with equivalent signal intensity. Moreover, no nonspecific accumulation in the liver was noticed.

MRI *ex vivo* studies on the aortas from atherosclerotic ApoE^{-/-} mice demonstrated the binding of targeted VUSPIO appearing as a focal signal loss (Fig. 4B). This negative contrast results in signal reduction on T_2 (transverse relaxation)-weighted images of all the protons of water and tissues surrounding the VUSPIO nanoparticles bound to the intimal thickening of the aorta.

DISCUSSION

Methods capable of assessing vulnerable plaques at risk of rupture, noninvasively and safely, are currently not available.

However, advances in nanotechnology have led to the development of a large panel of molecular probes for potential application in MRI (8,10–12,14,34,64). This rapidly evolving field remains challenging, and more safe and specific imaging agents are required that may aid in accelerated diagnosis so as to guide therapy. The key is to target events that indicate initial atherogenic molecular disorders leading to atherothrombosis. (41,50). P-Selectin, the primary adhesion molecule in the initiation of cell activation and adhesion to platelets and endothelium, plays a critical role in early atherosclerotic lesion development and advanced vascular disease progression (65). P-Selectin has therefore been suggested as a potential target of interest for both therapy (45,51) and ultrasound (66) or MRI (9,10,34,52).

High-resolution MR has emerged as a potential leading noninvasive imaging modality for the characterization of atherosclerotic plaques *in vivo* as it can provide anatomical, structural and functional data on the arterial wall. However, this technique suffers from a low sensitivity. This limitation can be overcome with the use of compounds able to deliver contrast agents at a pathologic site at a sufficient density to cause local contrast enhancement. Specific delivery is achieved through the development of imaging probes, usually consisting of a contrastophore conjugated to an appropriate targeting molecule (pharmacophore) able to recognize a relevant protein within the plaque. The affinity and binding properties of the pharmacophore moiety must be properly evaluated to improve sensitivity. Antibodies offer binding property advantages over biomimetics and peptides, such as high affinity and specificity. The pharmacophore used in this study is a home-prepared murine Mab highly specific for human P-selectin, and thus highly specific to platelet and endothelium activation, showing the efficacy of this antibody as an atherosclerosis imaging agent. The contrastophore moiety could be either a gadolinium- or iron oxide-based contrast agent. VUSPIO nanoparticles were chosen

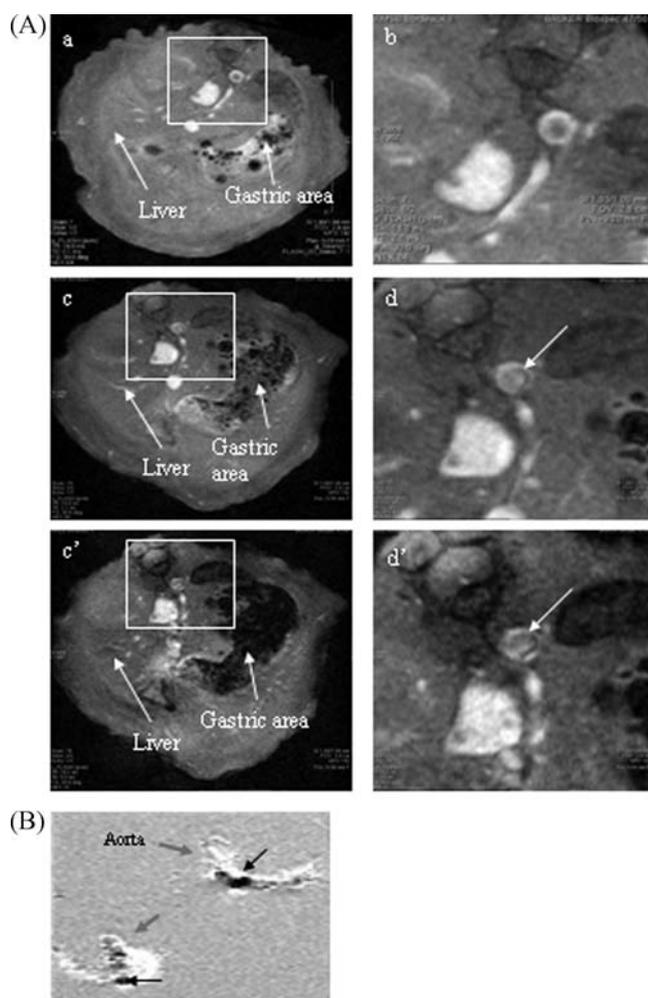


Figure 4. VH10-versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide (VH10-VUSPIO) *in vivo* MRI characterization. (A) Axial T_2 -weighted MR images of the abdominal aorta in atherosclerotic ApoE^{-/-} mice using a 4.7-T MRI system. (a, b) Images before VH10-VUSPIO injection. (c, c', d, d') 24-h images post-injection at TE = 2.1 ms (c, d) and TE = 5 ms (c', d'). b, d and d' are enlarged images of the abdominal aorta. Arrow: negative contrast shows the binding of functionalized VH10-VUSPIO contrast agent to the atherosclerotic vessel wall. (B) The corresponding *ex vivo* entire aorta of ApoE^{-/-} mice was imaged at 9.4 T. Gray arrows, intimal thickening; black arrows, accumulation of VH10-VUSPIO demonstrated an intensive focal signal loss.

here. These nanoparticles are a new generation of T_2 agents based on maghemite cores covalently bonded to dextran macromolecules. Their preparation involves colloidal maghemite synthesis, surface modification through the grafting of aminoalkylsilane groups and the coupling of partially oxidized dextran via the formation of an imine bond, which may be subsequently stabilized by reductive amination. Such a step-by-step synthesis allows the control of the magnetic core size and the overall hydrodynamic diameter, thanks to accurate and reproducible experimental conditions. These stable agents may be derivatized for surface labeling, e.g. ligand coupling, PEGylation, etc., and thus are called VUSPIOs for 'versatile' USPIOs. The difference from cross-linked iron oxide (33,67) particles is in the preparation strategy, which involves the covalent cross-linking of oxidized dextran macromolecules directly on the surface of aminated maghemite nanoparticles. PEGylation is often used to protect

carriers or contrast agents from the mononuclear phagocytic system and to increase the plasma half-life (68). In this study, the VUSPIO formulation was elaborated to control the covalent and regioselective coating of antibodies on the particle surface.

VH10 anti-P-selectin antibody conjugation to the fluoromagnetonanoparticle VUSPIO provides a proof-of-concept for the efficacy of targeting P-selectin for MRI. All *in vitro* data correlate with the minimal T_2 values, corresponding to clear labeling of human activated platelets in confocal microscopy and a higher shift in flow cytometry. Furthermore, there was minimal accumulation of VH10-VUSPIO on resting platelets, as judged by both microscopic images and T_2 and T_1 relaxation rates (Figs. 2 and 3). These results emphasize the conserved specificity of VH10-VUSPIO smart contrast agent for activated platelets. In addition, we showed that about 1000 VUSPIO particles per activated platelet appear to be well suited to obtain a local signal loss for T_2 -weighted images at 4.7 T and a local signal gain for T_1 -weighted images at 0.2 T (Fig. 3). VH10-VUSPIO nanoparticles could almost saturate the P-selectin glycoproteins per platelet (8600 copies, as determined by Scatchard analysis) as each nanoparticle displayed more than one antibody. Thus, contrary to the studies reported by McAteer *et al.* (34), which necessitates MPIO to address the lack of sensitivity regarding low-abundance molecular targets (69), we clearly demonstrated that the targeting of P-selectin molecules with 1000 VH10-VUSPIO particles per platelet was sufficient to induce a 50% reduction in T_2 values.

The strong specificity and affinity of VH10 antibody, the representativeness of the P-selectin target and the design of our new targeted contrast agent ensure that it is possible to obtain sufficiently intense signal modification within the imaged volume for ease of distinguishability from unmodified tissue. As VH10 reacts with murine platelets, although to a lower degree than human platelets, investigations were conducted on a murine model of atherosclerosis, the ApoE mouse. We showed both a spatial resolution in the 50–100- μ m range adapted to imaging of the vulnerable plaques and a clear signal reduction (hyposignal or negative contrast) on T_2 -weighted images at 4.7 T as a result of the accumulation of VH10-VUSPIO on activated target cells.

Our study compared favorably with other studies using USPIO coupled to a targeting moiety (32,70,71), which also demonstrated efficient *in vivo* imaging. The best way to address *in vivo* targeting is to use small particles because, relative to MPIO, they are more likely to reach the targeted region, taking into account their higher number (one MPIO particle of 1 μ m is equivalent to tens of thousands of VUSPIO particles) and their longer intravascular half-life, allowing them to circulate for a longer time. In terms of the diagnostic value of the MR image, small particles, such as USPIO, are more suited to the interpretation of the level of targeting in the pathologic region than are micrometer-sized particles. Indeed, these cause local magnetic field inhomogeneity, widely extending the microparticle diameter, with a negative impact on spatial resolution. Nevertheless, micrometer-sized iron oxide particles are very good biotechnological tools essentially developed for cell tracking (72). Even though they have been used as imaging tools for some *in vivo* studies (34,35) as proofs-of-concept, they are not biocompatible contrast agents because of their size and chemical composition.

Moreover, the use of VUSPIO particles allowed MRI measurements at 0.2 T. VH10-VUSPIO conjugates accumulated on the surface of platelets induce the shortening of the T_1 value and, thereby, a positive contrast on T_1 -weighted images. As, in MRI, a positive contrast allows the better discrimination

of labeled tissues, it would be of interest to further evaluate the VH10–VUSPIO conjugate as a potential P-selectin imaging positive contrast agent in hyperlipidemic rabbits at low magnetic fields. Several groups have developed ‘positive’ contrast imaging sequences as an alternative to iron oxide particle detection (73–76). The signal of tissues bordering labeled cells is suppressed by off-resonance techniques, often making the spatial resolution inadequate for the imaging of small anatomical structures. Nevertheless, Korosoglou *et al.* (76), using inversion recovery with on-resonant water suppression, reported a positive signal enhancement in aortic atherosclerotic plaques following the administration of iron oxide particles. However, ‘positive’ contrast protocols are based on T_2 - and T_2^* -weighted images with long-range effects, often difficult to combine with spatial resolution. Interest remains in the development of safe agents based on strictly paramagnetic local effects. With this aim, the imaging of superparamagnetic agents at low concentration in a low magnetic field could be of the greatest importance.

Imaging VH10–VUSPIO at 0.2 and 4.7 T highlights the possibility of obtaining both positive and negative signals using the same contrast agent with different image sequences. It will be of interest to develop imaging at 0.2 T for a better contrast and less susceptibility artefacts. Economical reasons must also be taken into account with regard to the lower cost of these magnets.

CONCLUSION

Iron oxide-based approaches have been investigated recently for the imaging of advanced stages of atherosclerosis, such as thrombosis, which are a sign of the ultimate phase of plaque rupture (36). Our study focuses on P-selectin targeting, with superparamagnetic nanoparticles, for the imaging of key processes involved earlier in the disease.

The VH10–VUSPIO contrast agent described in this study seems to have advantages over other MRI approaches targeting markers involved in atherogenesis. First, the antibody targets with high affinity and selectivity a candidate of strong interest expressed in cells activated during the early stages of atherogenesis. Second, iron oxide nanoparticles may offer advantages over gadolinium with regard to both the absence of tissue retention and potential toxicity, and the nanomolar range of detection.

These preliminary experiments justify the further development of such P-selectin-targeted agents for the monitoring of the early steps of atherosclerosis. In an ultimate aim to translate such agents into human clinical use, a ‘humanized’ version of murine VH10 is envisaged in order to attenuate potential immunogenicity. We plan to use phage display technology and directed mutagenesis approaches to develop a human antibody presenting the same specificity and affinity as its murine counterpart on human platelets, but also able to recognize with high affinity murine P-selectin (77,78). Toxicologic and pharmacokinetic *in vivo* data on ApoE mice will be further evaluated in order to lay the basis for preclinical development.

Future directions will involve the development of particles for imaging-associated drug delivery. Such agents may track noninvasively the therapeutic effects of the drug and offer promising opportunities for the selective delivery of bioactive molecules to the target tissue (79).

Acknowledgements

The authors are very grateful to Lynda Inséqué and Justine Schaefer for their helpful contributions in grafting experiments and the preparation of platelets for MRI studies. We acknowledge Dr Alan Nurden (Centre de Référence des Pathologies Plaquet-taires, Plateforme Technologique et d’Innovation Biomédicale, Pessac, France) for provision of the VH10 murine Mab which was made in his laboratory, and for fruitful discussions. The confocal microscopy experiments were performed at the PICIN Imaging Center of the Neurosciences Institute of the University of Bordeaux II, France. The technical support of Philippe Legros and Christel Poujol was appreciated. Special thanks go to Dr Richard Daculsi and Dr Reine Barenne for their help in studies on HUVECs (INSERM U577, Bordeaux, France).

REFERENCES

- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 115–126.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 1685–1695.
- Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 185–194.
- Saam T, Hatsukami TS, Takaya N, Chu B, Underhill H, Kerwin WS, Cai J, Ferguson MS, Yuan C. The vulnerable, or high-risk, atherosclerotic plaque: noninvasive MR imaging for characterization and assessment. *Radiology*, 2007; 244: 64–77.
- Cai JM, Hatsukami TS, Ferguson MS, Small R, Polissar NL, Yuan C. Classification of human carotid atherosclerotic lesions with *in vivo* multicontrast magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2002; 106: 1368–1373.
- Choudhury RP, Fuster V, Badimon JJ, Fisher EA, Fayad ZA. MRI and characterization of atherosclerotic plaque: emerging applications and molecular imaging. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1065–1074.
- Toussaint JF, LaMuraglia GM, Southern JF, Fuster V, Kantor HL. Magnetic resonance images lipid, fibrous, calcified, hemorrhagic, and thrombotic components of human atherosclerosis *in vivo*. *Circulation*, 1996; 94: 932–938.
- Boutry S, Burtea C, Laurent S, Toubreau G, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic resonance imaging of inflammation with a specific selectin-targeted contrast agent. *Magn. Reson. Med.* 2005; 53: 800–807.
- Chaubet F, Bertholon I, Serfaty JM, Bazeli R, Alsaid H, Jandrot-Perrus M, Zahir C, Even P, Bachelet L, Touat Z, Lancelot E, Corot C, Canet-Soulas E, Letourneur D. A new macromolecular paramagnetic MR contrast agent binds to activated human platelets. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2007; 2: 178–188.
- Alsaid H, De Souza G, Bourdillon MC, Chaubet F, Sulaiman A, Desbleds-Mansard C, Chaabane L, Zahir C, Lancelot E, Rousseaux O, Corot C, Douek P, Briguet A, Letourneur D, Canet-Soulas E. Biomimetic MRI contrast agent for imaging of inflammation in atherosclerotic plaque of ApoE^{−/−} mice: a pilot study. *Invest. Radiol.* 2009; 44: 151–158.
- Spuentrup E, Buecker A, Katoh M, Wiethoff AJ, Parsons EC Jr, Botnar RM, Weisskoff RM, Graham PB, Manning WJ, Gunther RW. Molecular magnetic resonance imaging of coronary thrombosis and pulmonary emboli with a novel fibrin-targeted contrast agent. *Circulation*, 2005; 111: 1377–1382.
- Burtea C, Laurent S, Murariu O, Rattat D, Toubreau G, Verbruggen A, Vanstherem D, Vander Elst L, Muller RN. Molecular imaging of alpha v beta3 integrin expression in atherosclerotic plaques with a mimetic of RGD peptide grafted to Gd-DTPA. *Cardiovasc. Res.* 2008; 78: 148–157.
- Burtea C, Laurent S, Port M, Lancelot E, Ballet S, Rousseaux O, Toubreau G, Vander Elst L, Corot C, Muller RN. Magnetic resonance molecular imaging of vascular cell adhesion molecule-1 expression in inflammatory lesions using a peptide-vectorized paramagnetic imaging probe. *J. Med. Chem.* 2009; 52: 4725–4742.

14. Amirbekian V, Aguinaldo JG, Amirbekian S, Hyafil F, Vucic E, Sirol M, Weinreb DB, Le Greneur S, Lancelot E, Corot C, Fisher EA, Galis ZS, Fayad ZA. Atherosclerosis and matrix metalloproteinases: experimental molecular MR imaging in vivo. *Radiology*, 2009; 251: 429–438.
15. Winter PM, Morawski AM, Caruthers SD, Fuhrhop RW, Zhang H, Williams TA, Allen JS, Lacy EK, Robertson JD, Lanza GM, Wickline SA. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles. *Circulation*, 2003; 108: 2270–2274.
16. Flacke S, Fischer S, Scott MJ, Fuhrhop RJ, Allen JS, McLean M, Winter P, Sicard GA, Gaffney PJ, Wickline SA, Lanza GM. Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation*, 2001; 104: 1280–1285.
17. Lipinski MJ, Amirbekian V, Frias JC, Aguinaldo JG, Mani V, Briley-Saebo KC, Fuster V, Fallon JT, Fisher EA, Fayad ZA. MRI to detect atherosclerosis with gadolinium-containing immunomicelles targeting the macrophage scavenger receptor. *Magn. Reson. Med.* 2006; 56: 601–610.
18. Winter PM, Neubauer AM, Caruthers SD, Harris TD, Robertson JD, Williams TA, Schmieder AH, Hu G, Allen JS, Lacy EK, Zhang H, Wickline SA, Lanza GM. Endothelial alpha(v)beta3 integrin-targeted fumagillin nanoparticles inhibit angiogenesis in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 2103–2109.
19. Briley-Saebo KC, Mulder WJ, Mani V, Hyafil F, Amirbekian V, Aguinaldo JG, Fisher EA, Fayad ZA. Magnetic resonance imaging of vulnerable atherosclerotic plaques: current imaging strategies and molecular imaging probes. *J. Magn. Reson. Imaging*. 2007; 26: 460–479.
20. Briley-Saebo KC, Shaw PX, Mulder WJ, Choi SH, Vucic E, Aguinaldo JG, Witztum JL, Fuster V, Tsimikas S, Fayad ZA. Targeted molecular probes for imaging atherosclerotic lesions with magnetic resonance using antibodies that recognize oxidation-specific epitopes. *Circulation*, 2008; 117: 3206–3215.
21. Petersein J, Saini S, Weissleder R. Liver. II: iron oxide-based reticuloendothelial contrast agents for MR imaging. *Clinical review. Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* 1996; 4: 53–60.
22. Anzai Y, Piccoli CW, Outwater EK, Stanford W, Bluemke DA, Nurenberg P, Saini S, Maravilla KR, Feldman DE, Schmiel UP, Brunberg JA, Francis IR, Harms SE, Som PM, Tempny CM. Evaluation of neck and body metastases to nodes with ferumoxtran 10-enhanced MR imaging: phase III safety and efficacy study. *Radiology*, 2003; 228: 777–788.
23. Bellin MF. MR contrast agents, the old and the new. *Eur. J. Radiol.* 2006; 60: 314–323.
24. Bartolozzi C, Lencioni R, Donati F, Cioni D. Abdominal MR: liver and pancreas. *Eur. Radiol.* 1999; 9: 1496–1512.
25. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* 2001; 11: 2319–2331.
26. Bourrinet P, Bengele HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee JM, Jacobs PM, Lewis JM. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest. Radiol.* 2006; 41: 313–324.
27. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology*, 1990; 175: 489–493.
28. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; 58: 1471–1504.
29. Tang TY, Howarth SP, Miller SR, Graves MJ, Patterson AJ, U. King-Im JM, Li ZY, Walsh SR, Brown AP, Kirkpatrick PJ, Warburton EA, Hayes PD, Varty K, Boyle JR, Gaunt ME, Zalewski A, Gillard JH. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53: 2039–2050.
30. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJ, van Engelsehoven JM. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2003; 107: 2453–2458.
31. Kang HW, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R, Bogdanov A Jr. Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjug. Chem.* 2002; 13: 122–127.
32. Reynolds PR, Larkman DJ, Haskard DO, Hajnal JV, Kennea NL, George AJ, Edwards AD. Detection of vascular expression of E-selectin in vivo with MR imaging. *Radiology*, 2006; 241: 469–476.
33. Nahrendorf M, Jaffer FA, Kelly KA, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Weissleder R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*, 2006; 114: 1504–1511.
34. McAteer MA, Schneider JE, Ali ZA, Warrick N, Bursill CA, von zur Muhlen C, Greaves DR, Neubauer S, Channon KM, Choudhury RP. Magnetic resonance imaging of endothelial adhesion molecules in mouse atherosclerosis using dual-targeted microparticles of iron oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 77–83.
35. von zur Muhlen C, Peter K, Ali ZA, Schneider JE, McAteer MA, Neubauer S, Channon KM, Bode C, Choudhury RP. Visualization of activated platelets by targeted magnetic resonance imaging utilizing conformation-specific antibodies against glycoprotein IIb/IIIa. *J. Vasc. Res.* 2009; 46: 6–14.
36. McCarthy JR, Patel P, Botnaru I, Haghayeghi P, Weissleder R, Jaffer FA. Multimodal nanoagents for the detection of intravascular thrombi. *Bioconjug. Chem.* 2009; 20: 1251–1255.
37. von zur Muhlen C, von Elverfeldt D, Moeller JA, Choudhury RP, Paul D, Hagemeyer CE, Olschewski M, Becker A, Neudorfer I, Bassler N, Schwarz M, Bode C, Peter K. Magnetic resonance imaging contrast agent targeted toward activated platelets allows in vivo detection of thrombosis and monitoring of thrombolysis. *Circulation*, 2008; 118: 258–267.
38. Jaffer FA, Nahrendorf M, Sosnovik D, Kelly KA, Aikawa E, Weissleder R. Cellular imaging of inflammation in atherosclerosis using magneto-fluorescent nanomaterials. *Mol. Imaging*, 2006; 5: 85–92.
39. Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Josephson L, Weissleder R. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circ. Res.* 2005; 96: 327–336.
40. Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP, Dunbar CE. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood*, 2003; 102: 867–872.
41. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 887–896.
42. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin: function facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*, 2003; 101: 2661–2666.
43. Egami K, Murohara T, Aoki M, Matsuishi T. Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79: 971–976.
44. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 2003; 24: 2166–2179.
45. Woollard KJ, Chin-Dusting J. Therapeutic targeting of P-selectin in atherosclerosis. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2007; 6: 69–74.
46. Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood*, 2005; 106: 2334–2339.
47. Tenaglia AN, Buda AJ, Wilkins RG, Barron MK, Jeffords PR, Vo K, Jordan MO, Kusnick BA, Lefer DJ. Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 1997; 79: 742–747.
48. Sakai A, Kume N, Nishi E, Tanoue K, Miyasaka M, Kita T. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 310–316.
49. Wang K, Zhou X, Zhou Z, Mal N, Fan L, Zhang M, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ, Penn MS. Platelet, not endothelial, P-selectin is required for neointimal formation after vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 1584–1589.
50. Mestas J, Ley K. Monocyte–endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2008; 18: 228–232.
51. Bourdillon MC, Randon J, Berek L, Zibara K, Covacho C, Poston RN, Chignier E, McGregor JL. Reduced atherosclerotic lesion size in P-selectin deficient apolipoprotein E-knockout mice fed a chow but not a fat diet. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006; 2006: 1–8.

52. Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle JM. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond)*, 2006; 1: 157–168.
53. Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, Hoebeke J, Duguet E, Colombo P, Couvreur P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug. Chem.* 2005; 16: 1181–1188.
54. Bouzier-Sore AK, Ribot E, Bouchaud V, Miraux S, Duguet E, Mornet S, Clofent-Sanchez G, Franconi JM, Voisin P. Nanoparticle phagocytosis and cellular stress: involvement in cellular imaging and in gene therapy against glioma. *NMR Biomed.* 2010; 23: 88–96.
55. Bihour C, Durrieu-Jais C, Macchi L, Poujol C, Coste P, Besse P, Nurden P, Nurden AT. Expression of markers of platelet activation and the interpatient variation in response to abciximab. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19: 212–219.
56. Clofent-Sanchez G, Lucas S, Laroche-Traineau J, Rispal P, Pellegrin JL, Nurden P, Nurden A. Autoantibodies and anti-mouse antibodies in thrombocytopenic patients as assessed by different MAIPA assays. *Br. J. Haematol.* 1996; 95: 153–160.
57. Daculsi R, Remy-Zolghadri M, Grellier M, Conrad V, Fernandez P, Bareille R, Bordenave L. Signal transduction and procoagulant state of human cord blood – progenitor-derived endothelial cells after interleukin-1alpha stimulation. *Endothelium*, 2007; 14: 163–171.
58. Mornet S, Lambert O, Duguet E, Brisson A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett.* 2005; 5: 281–285.
59. Mornet S, Portier J, Duguet E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 127–134.
60. Nurden P, Bihour C, Smith M, Raymond JM, Nurden AT. Platelet activation and thrombosis: studies in a patient with essential thrombocytopenia. *Am. J. Hematol.* 1996; 51: 79–84.
61. Raab M, Daxecker H, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller MM. Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 321: 11–16.
62. Ruehm SG, Corot C, Vogt P, Kolb S, Debatin JF. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation*, 2001; 103: 415–422.
63. Schmitz SA, Coupland SE, Gust R, Winterhalter S, Wagner S, Kresse M, Semmler W, Wolf KJ. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe hereditary hyperlipidemic rabbits. *Invest. Radiol.* 2000; 35: 460–471.
64. Botnar RM, Perez AS, Witte S, Wiethoff AJ, Laredo J, Hamilton J, Quist W, Parsons EC Jr, Vaidya A, Kolodziej A, Barrett JA, Graham PB, Weisskoff RM, Manning WJ, Johnstone MT. In vivo molecular imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent. *Circulation*, 2004; 109: 2023–2029.
65. Molenaar TJ, Twisk J, de Haas SA, Peterse N, Vogelaar BJ, van Leeuwen SH, Michon IN, van Berkel TJ, Kuiper J, Biessen EA. P-selectin as a candidate target in atherosclerosis. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66: 859–866.
66. Lindner JR, Song J, Christiansen J, Klivanov AL, Xu F, Ley K. Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation*, 2001; 104: 2107–2112.
67. Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Kelly KA, Patel P, Wolley A, Allport JR, Weissleder R. In vivo imaging of activated endothelium using an anti-VCAM-1 magneto-optical probe. *Bioconjug. Chem.* 2005; 16: 576–581.
68. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small*, 2010; 6: 12–21.
69. Sibson NR, Blamire AM, Bernades-Silva M, Laurent S, Boutry S, Muller RN, Styles P, Anthony DC. MRI detection of early endothelial activation in brain inflammation. *Magn. Reson. Med.* 2004; 51: 248–252.
70. Nahrendorf M, Aikawa E, Figueiredo JL, Stangenberg L, van den Borne SW, Blankesteijn WM, Sosnovik DE, Jaffer FA, Tung CH, Weissleder R. Transglutaminase activity in acute infarcts predicts healing outcome and left ventricular remodeling: implications for FXIII therapy and antithrombin use in myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2008; 29: 445–454.
71. Kang HW, Torres D, Wald L, Weissleder R, Bogdanov AA Jr. Targeted imaging of human endothelial-specific marker in a model of adoptive cell transfer. *Lab. Invest.* 2006; 86: 599–609.
72. Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn. Reson. Med.* 2005; 53: 329–338.
73. Lipinski MJ, Briley-Saebo KC, Mani V, Fayad ZA. ‘Positive contrast’ inversion-recovery with ON[corrected]-resonant water suppression magnetic resonance imaging: a change for the better? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52: 492–494.
74. Cunningham CH, Arai T, Yang PC, McConnell MV, Pauly JM, Conolly SM. Positive contrast magnetic resonance imaging of cells labeled with magnetic nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* 2005; 53: 999–1005.
75. Liu W, Dahnke H, Jordan EK, Schaeffter T, Frank JA. In vivo MRI using positive-contrast techniques in detection of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *NMR Biomed.* 2008; 21: 242–250.
76. Korosoglou G, Weiss RG, Kedziorek DA, Walczak P, Gilson WD, Schar M, Sosnovik DE, Kraitchman DL, Boston RC, Bulte JW, Weissleder R, Stuber M. Noninvasive detection of macrophage-rich atherosclerotic plaque in hyperlipidemic rabbits using ‘positive contrast’ magnetic resonance imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52: 483–491.
77. Jacobin MJ, Laroche-Traineau J, Little M, Keller A, Peter K, Welschof M, Nurden A, Clofent-Sanchez G. Human IgG monoclonal anti-alpha(IIb)beta(3)-binding fragments derived from immunized donors using phage display. *J. Immunol.* 2002; 168: 2035–2045.
78. Robert R, Jacobin-Valat MJ, Daret D, Miraux S, Nurden AT, Franconi JM, Clofent-Sanchez G. Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 40,135–40,143.
79. Winter PM, Cai K, Chen J, Adair CR, Kiefer GE, Athey PS, Gaffney PJ, Buff CE, Robertson JD, Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Targeted PARACEST nanoparticle contrast agent for the detection of fibrin. *Magn. Reson. Med.* 2006; 56: 1384–1388.

5.12. Conclusions et perspectives

Malgré les avancées réalisées ces dernières années dans le domaine de l'imagerie fonctionnelle et moléculaire, il n'existe aujourd'hui aucune technique non invasive et sans danger permettant de détecter une plaque d'athérome vulnérable à fort risque de rupture. L'IRM est une technique d'imagerie non invasive dont l'atout principal est sa forte résolution spatiale. Bien qu'elle soit très peu sensible, l'apport d'agents de contraste toujours plus performants la rend très attractive pour l'imagerie de la plaque d'athérome. Les agents de contrastes à base d'oxyde de fer comme les VUSPIO, permettent d'obtenir des variations nettes de temps de relaxation T2 ou T1 à de très faibles concentrations (de l'ordre du nM). De plus, ces nanoparticules, sont totalement inoffensives, leur dégradation se faisant par une voie bien connue dépendante des lysosomes. Dans ce travail, nous avons couplé à des VUSPIOs, un anticorps monoclonal murin dirigé contre la P-sélectine humaine (VH10). Comme mentionné au premier chapitre, la P-sélectine est présente aussi bien sur les cellules endothéliales lors de l'initiation des lésions que dans les plaquettes activées au cours de la thrombose. L'idée ici est de cibler des événements aussi bien précoces que tardifs de l'athérosclérose. En résumé, le complexe VH10-VUSPIO décrit dans cette étude présente deux avantages : **(1)** L'anticorps VH10 a une forte affinité et spécificité à l'encontre d'une cible extrêmement relevante de la pathologie et **(2)** les VUSPIO diminuent le temps de relaxation transversale T2 entraînant l'apparition d'un hyposignal dans les zones d'intérêt à des concentrations de l'ordre du nM sans présenter de phénomène de toxicité.

Ainsi, grâce à ces caractéristiques fonctionnelles, nous avons pu générer des images *in vivo* et apporter la preuve de concept d'une approche IRM pour de futures applications chez l'homme. Il est à noter que pour une application chez l'homme, cet anticorps devra au préalable être humanisé afin d'atténuer les possibles réactions de type HAMA. Une autre alternative est de réaliser une sélection à l'aide d'une banque d'anticorps humains sur des plaquettes humaines activées. C'est la stratégie qu'a choisie l'équipe qui travaille actuellement au couplage des particules superparamagnétiques VUSPIOs à des anticorps humains dirigés contre l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ exprimés dans le système BaculoMab (Collaboration avec Martine Cérutti, UPS 3044). Cette intégrine est présente également sur les plaquettes sous leur conformation activée et présente un intérêt indéniable en imagerie (**voir chapitre 2**).

Les étapes de couplage utilisées dans ce travail sont laborieuses et pourraient être simplifiées en liant indirectement les anticorps aux VUSPIO, par l'intermédiaire d'une protéine issue de la fusion entre **l'Annexine-A5 et le fragment ZZ** spécifique de la partie Fc (collaboration avec Alain Brisson, IECB :Institut

Européen de Chimie et de Biologie). Cette seconde option permettrait de coupler « à façon » l'anticorps aux VUSPIO. Il est intéressant de noter que la protéine de fusion **Anx5-ZZ**, peut aussi spontanément s'intégrer dans les bicouches lipidiques de liposomes. Ce type de construction peut s'avérer particulièrement utile pour le transport de produits de contraste mais aussi en thérapie pour le transport de drogues ou d'oligonucléotides après liaison au fragment ZZ de l'anticorps ciblant les lésions athéroscléreuses.

6. Conclusion Générale

Il y a moins d'un siècle, l'athérosclérose se définissait comme étant une maladie sous la dépendance de l'alcoolisme, du saturnisme, de la syphilis, de l'arthritisme et de la vieillesse (Larousse, édition 1922). Aujourd'hui, bien loin de ces connaissances « obsolètes », la recherche cardiovasculaire vient de franchir une étape clé dans la compréhension de la physiopathologie de l'athérosclérose. Ainsi, il est maintenant évident que l'inflammation joue un rôle déterminant dans l'athérogénèse et que son initiation débute par l'accumulation de lipides oxydés au sein des parois vasculaires... Cependant, en dépit de toutes ces avancées, l'identification de patients présentant une plaque d'athérome instable ou vulnérable, c'est à dire susceptible de se rompre, est un problème majeur que l'on ne sait pas encore prévoir. De plus, malgré les effets bénéfiques accordés aux traitements normolipidémians tels que les statines ou les fibrates, trop peu de **biomarqueurs de l'athérosclérose** sont exploités pour l'élaboration de nouvelles stratégies d'imagerie ou thérapeutiques. C'est dans ce sens que la recherche internationale évolue : l'identification de cibles relevantes de la pathologie pour le ciblage en **imagerie et/ou en thérapie**.

Notre approche **phage-display *in vivo*** permettrait de répondre à cette demande. L'intérêt est ici d'« interroger » *in vivo* les plaques d'athérome avec des phages-scFv issus de banques combinatoires humaines de façon à sélectionner des **couples anticorps humains / cibles de la pathologie**. Les perspectives immédiates de ce travail sont de caractériser les biomarqueurs ciblés par les fragments d'anticorps humains identifiés, par des techniques classiques de protéomique. Il s'agira alors de confronter les résultats de ces analyses aux connaissances accumulées sur les nombreuses molécules impliquées dans l'athérogénèse de façon à déterminer la relevance des **biomarqueurs ciblés par nos anticorps humains**.

En parallèle de cette étude, nous avons établi la preuve de concept de l'intérêt du **ciblage moléculaire** pour améliorer les images IRM de la plaque d'athérome. Nous avons pris comme modèle d'étude un Acm de souris (VH10), développé il y a quelques années par l'équipe, dont la spécificité est la P-sélectine,

décrite dans la littérature comme un biomarqueur des phases précoces de la pathologie. Nous avons créé un agent ciblant pour l'IRM en couplant chimiquement l'Acm à des particules superparamagnétiques, les VUSPIOs. L'agent VH10-VUSPIO a montré son efficacité dans le ciblage moléculaire par IRM de la plaque d'athérome. L'ensemble de ces technologies, impliquant des compétences multidisciplinaires, sera appliqué aux anticorps humains développés pour proposer des **molécules de ciblage en imagerie présentant une parfaite innocuité**.

Des thérapies ciblées peuvent être envisagées en combinant les anticorps sélectionnés spécifiques des protéines candidates à des vecteurs de transfert comme les liposomes [Bendas et al., 2001]. Ces vecteurs porteurs de drogues (**fumagilline** [Winter et al., 2006]), de gènes correcteurs (**IFN γ R**, [Koga et al., 2007], **VLDLR** [MacDougall et al., 2006]), de **siRNA** (small interfering RNA) contre des molécules impliquées dans les processus de l'athérogénèse (**TNF α** ; **Map4k4**, [Aouadi et al., 2009]), pourront cibler les cellules impliquées dans la plaque instable de manière spécifique pour y délivrer l'agent thérapeutique d'intérêt. Une alternative suscite actuellement un grand enthousiasme au sein de la communauté scientifique ; il s'agit du théranostic qui associe dans une même entité agent ciblant et molécule thérapeutique.

7. Bibliographie

- Arap, W., R. Pasqualini, et al. (1998). "Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model." Science 279(5349): 377-80.
- Bazin, H., M. Preaudat, et al. (2001). "Homogeneous time resolved fluorescence resonance energy transfer using rare earth cryptates as a tool for probing molecular interactions in biology." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 57(11): 2197-211.
- Beck, A., E. Wagner-Rousset, et al. (2009). "[Therapeutic antibodies and related products: choosing the right structure for success]." Med Sci (Paris) 25(12): 1024-32.
- Botnar, R. M., A. S. Perez, et al. (2004). "In vivo molecular imaging of acute and subacute thrombosis using a fibrin-binding magnetic resonance imaging contrast agent." Circulation 109(16): 2023-9.
- Burger, P. C. and D. D. Wagner (2003). "Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development." Blood 101(7): 2661-6.
- Burtea, C., S. Laurent, et al. (2009). "Magnetic Resonance Molecular Imaging of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Inflammatory Lesions Using a Peptide-Vectorized Paramagnetic Imaging Probe." J Med Chem.
- Essler, M. and E. Ruoslahti (2002). "Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A 99(4): 2252-7.

- Flacke, S., S. Fischer, et al. (2001). "Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques." Circulation 104(11): 1280-5.
- Hong, H. Y., H. Y. Lee, et al. (2007). "Phage Display Selection of Peptides that Home to Atherosclerotic Plaques: IL-4 Receptor as a Candidate Target in Atherosclerosis." J Cell Mol Med.
- Johansson, L. O., A. Bjornerud, et al. (2001). "A targeted contrast agent for magnetic resonance imaging of thrombus: implications of spatial resolution." J Magn Reson Imaging 13(4): 615-8.
- Johns, M., A. J. George, et al. (2000). "In vivo selection of sFv from phage display libraries." J Immunol Methods 239(1-2): 137-51.
- McCormick, M. M., F. Rahimi, et al. (2005). "S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis." J Biol Chem 280(50): 41521-9.
- Mornet, S., J. Portier, et al. (2005). "A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran." J. Magn. Magn. Mater. 293: 127-134.
- Nahrendorf, M., F. A. Jaffer, et al. (2006). "Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis." Circulation 114(14): 1504-11.
- Ozawa, M. G., A. J. Zurita, et al. (2008). "Beyond receptor expression levels: the relevance of target accessibility in ligand-directed pharmacodelivery systems." Trends Cardiovasc Med 18(4): 126-32.
- Paolicchi, A., M. Emdin, et al. (2006). "Beta-lipoprotein- and LDL-associated serum gamma-glutamyltransferase in patients with coronary atherosclerosis." Atherosclerosis 186(1): 80-5.
- Pastorino, F., C. Brignole, et al. (2006). "Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy." Cancer Res 66(20): 10073-82.
- Philibert, P., A. Stoessel, et al. (2007). "A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm." BMC Biotechnol 7(1): 81.
- Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, et al. (1992). "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4471-5.
- Pompella, A., A. Corti, et al. (2007). "Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance." Curr Opin Pharmacol 7(4): 360-6.
- Rekhter, M. D., G. W. Hicks, et al. (1998). "Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture." Circ Res 83(7): 705-13.
- Robert, R., M. J. Jacobin-Valat, et al. (2006). "Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: selection by single round in vivo phage display." J Biol Chem 281(52): 40135-43.
- Spuentrup, E., B. Fausten, et al. (2005). "Molecular magnetic resonance imaging of atrial clots in a swine model." Circulation 112(3): 396-9.
- Trepel, M., W. Arap, et al. (2002). "In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine." Curr Opin Chem Biol 6(3): 399-404.
- Turato, C., F. Calabrese, et al. "SERPINB3 modulates TGF-beta expression in chronic liver disease." Lab Invest 90(7): 1016-23.
- Weissleder, R., A. S. Lee, et al. (1992). "Antimyosin-labeled monocrySTALLINE iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging." Radiology 182(2): 381-5.
- Winter, P. M., S. D. Caruthers, et al. (2003). "Improved molecular imaging contrast agent for detection of human thrombus." Magn Reson Med 50(2): 411-6.
- Zou, J., M. T. Dickerson, et al. (2004). "Biodistribution of filamentous phage peptide libraries in mice." Mol Biol Rep 31(2): 121-9.