



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude des effets biologiques de peptides RGD (cycliques ou linéaires) comme substituts de la fibronectine, après greffage sur une protéine anti-adhésive, l'albumine de sérum bovin

Dewelle, Janique

Award date:
1996

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Reçu le 02 DEC. 1996

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

SECRETARIAT BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
Rue de Bruxelles, 61
B - 5000 NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Etude des effets biologiques de peptides RGD
(cycliques ou linéaires) comme substituts de la fibronectine,
après greffage sur une protéine anti-adhésive,
l'albumine de sérum bovin**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

Dewelle Janique

Décembre 1996

SEQUENCES PEPTIDIQUES	NOMS ABREGES
Ac-DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH ₂)	P21
Ac-DVRGDβAla-Ahx-Y-NH ₂	P15
Ac-REDV-εAhx-C-NH ₂	P18
c(VRGD _D N)	C8
c[_D VRGDE(-εAhx-Y-C-NH ₂)]	T26
c[DR _D VGE(-εAhx-Y-C-NH ₂)]	T29

Ahx : Acide 6 aminohexanoïque

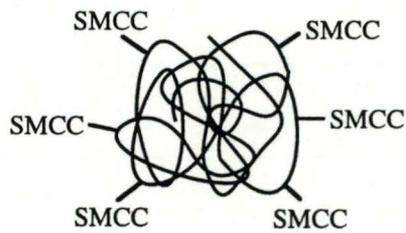
P : Linéaire

C : Cyclique

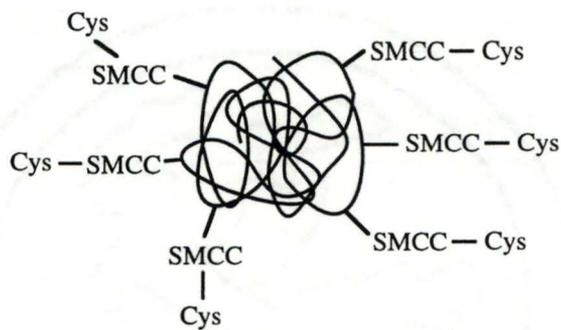
T : Tailed

Ac : Acétyl

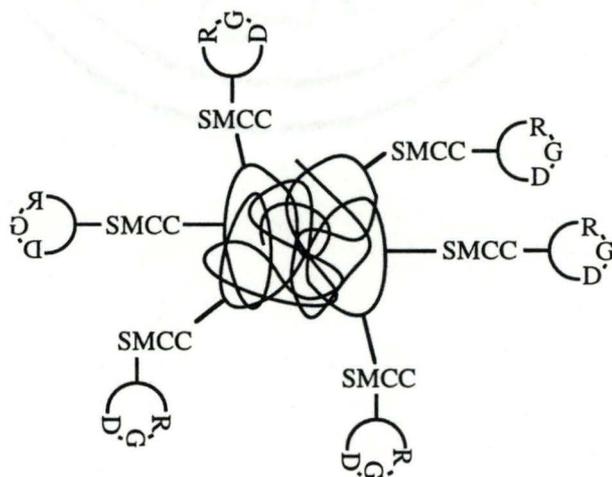
1) BSA/Sulfo-SMCC



2) BSA/Cystéine



3) BSA/Peptide



Représentation schématique des différents types de BSA modifiées, utilisées pour reconditionner des surfaces en polystyrène.

**Etude des effets biologiques de peptides RGD (cycliques ou linéaires)
comme substituts de la fibronectine, après greffage sur une protéine
anti-adhésive, l'albumine de sérum bovin**

DEWELLE Janique

Résumé

L'adhérence des cellules dépend des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que de leurs récepteurs, les intégrines. Afin d'augmenter cette adhérence sur des supports peu adhésifs, différentes approches sont possibles. Parmi celles-ci, nous avons choisi de synthétiser des peptides mimant les protéines de la MEC et de les greffer sur de la BSA. En effet, au sein de nombreuses protéines de la MEC, il existe un domaine favorisant l'adhérence cellulaire : le motif RGD. Nous avons donc choisi de synthétiser des peptides linéaires et cycliques munis d'un bras d'ancrage contenant le motif RGD. Dans la forme cyclique, le motif RGD se trouve dans sa conformation idéale (en boucle). Avant de greffer ces peptides sur un matériau, nous les avons tout d'abord testés en solution afin de vérifier leur effet inhibiteur sur l'adhérence cellulaire sur de la FN. Ensuite, nous avons essayé de voir si les peptides RGD étaient capables de reproduire les effets biologiques de la fibronectine (FN). Pour ce faire, les peptides ont été greffés sur de la BSA, protéine plutôt anti-adhésive. Les résultats obtenus montrent que par cette approche, la BSA modifiée par les peptides favorise l'adhérence cellulaire de manière comparable à la FN. Enfin, dans une troisième partie, nous avons voulu vérifier si un peptide contenant le motif RGD pouvait induire, comme la FN, la formation de plaques d'adhérence, enrichies en protéines phosphorylées en tyrosine. Nos expériences ont permis de montrer que la présence de peptides RGD sur de la BSA induit la formation de plaques d'adhérence dans les cellules endothéliales de manière comparable à la FN.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Décembre 1996

Promoteur: M. Raes

Co-promoteur: J. Remacle

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire .

Mes remerciements s'adressent à Martine Raes : "De par vos connaissances et votre rigueur scientifique, vous avez su éclairer les routes un peu plus sombres."

A Barbara : "Pas un mot plus haut qu'un autre et surtout, tu as toujours été là pour m'aider et m'encourager dans les moments difficiles. C'était vraiment un plaisir de travailler avec toi. Je te tire un grand coup de chapeau!"

A Mumu, Dédé et Barbara : "l'équipe de choc! Le "cellulaire" et le "greffage" ont fait bon ménage. Un grand merci à vous trois, vous avez su me conseiller tout au long de ce travail."

A Edouard : "la synthèse peptidique n'a jamais été orpheline de père, par contre de mère..."

A Andrée : "Grâce à toi, la culture cellulaire n'a jamais rimé avec misère!"

A Patsy et Maggy : "j'ai été très heureuse de partager le bureau avec une "posée" et une "speedée". Malheureusement pour vous, vous avez dû supporter le spécimen que je suis!"

A Alex, Nancy, Domi, Berthe, Anne et Marc : "Une pointe d'humour tous les matins avant de commencer le train-train quotidien!"

A Isa G. et Catherine : "Vous avez pu subvenir à mes besoins : les THP-1."

A tous les mémorants et à ceux qui m'ont aidée discrètement.

A mes parents, grands-parents, Christel, Jasmine et Isa Gille : "Vous m'avez soutenue durant toutes ces années d'études et encouragée lorsqu'un obstacle venait perturber mon petit univers."

Grâce à vous tous, j'ai passé une année extraordinaire. De nouveaux liens se sont créés. Ce que j'ai retenu de ce mémoire, ce n'est pas le travail que j'ai effectué (bien qu'il m'ait beaucoup plu!), mais c'est toute cette ambiance qui a régné durant ces 10 mois. J'en garde un excellent souvenir. Encore une fois : MERCI.

Liste des abréviations

εAhx : Acide aminohexanoïque

A : Alanine

aa : Acide aminé

BSA : Bovine serum albumine

C : Cystéine

CDI : Carbodiimide

CHO : Chinese hamster ovary

D : Acide aspartique

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

E : Acide glutamique

ELAM-1 : Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1

FACIT : Fibril associated collagens with triple-helices

FAT : Focal adhesion targetting domain

FGF-2 : Fibroblast growth factor-2

FN : Fibronectine

G : Glycine

Grb2 : Growth factor receptor binding protein 2

H : Histidine

HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells

I : Isoleucine

IC 50 : Inhibition concentration of 50 %

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

K : Lysine

L : Leucine

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MEC : Matrice extracellulaire

N : Asparagine

NC : Non collagénique

P : Proline

PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule

Pen : Pénicilamine

PS : Polystyrène

Q : Glutamine

R : Arginine

RGD : Arginine-Glycine-Acide aspartique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

S : Sérine

SH2 : Src homology domain 2

SMCC : Succinimidyl 4-(N-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate

Sos : Son of sevenless

Src : Sarcome de Rous

Sulfo-SMCC : Sulfo-succinimidyl 4-(N-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate

TGF- β : Transforming growth factor- β

TSP : Thrombospondine

V : Valine

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

Y : Tyrosine

INTRODUCTION

AVANT PROPOS	1
1. RECEPTEURS CELLULAIRES : LES INTEGRINES	2
2. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	7
2.1. GENERALITES	7
2.2. FIBRONECTINE	8
2.3. COLLAGENES	11
2.4. AUTRES GLYCOPROTEINES	14
3. LE MOTIF ARG-GLY-ASP (RGD)	15
4. LES PEPTIDES CYCLIQUES RGD	18
5. LES BIOMATERIAUX ET LEURS MODIFICATIONS	21
5.1. DEFINITION ET APPLICATIONS PRINCIPALES	21
5.2. BIOCOMPATIBILITE	21
6. MODIFICATION DE POLYMERES - EXEMPLE DU POLYSTYRENE	23
6.1. ADSORPTION	23
6.2. COUPLAGE COVALENT DE BIOMOLECULES EN GENERAL	24
7. OBJECTIFS	25

MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE DE CELLULES	27
1.1. CELLULES ENDOTHELIALES	27
1.1.1. MISE EN CULTURE	27
1.1.1.A. Matériels	27
1.1.1.B. Méthode	28
1.1.2. REPIQUAGE DES CELLULES	29
1.1.2.A. Matériels	29
1.1.2.B. Méthode	29
1.2. CELLULES THP-1	30
1.2.1. REPIQUAGE	30
1.2.1.A. Matériels	30
1.2.1.B. Méthode	30
2. GREFFAGE DE PEPTIDES	31
2.1. PEPTIDES SYNTHETISES	31
2.2. GREFFAGE SUR BSA	31
2.2.1. GREFFAGE SUR BSA EN SOLUTION	31
2.2.1.A. Principe	31
2.2.1.B. Matériels	32
2.2.1.C. Méthode	33
2.2.2. GREFFAGE SUR BSA ADSORBEE	33
2.2.2.A. Principe	33
2.2.2.B. Matériels	34
2.2.2.C. Méthode	34
2.3. GELS UNIDIMENSIONNELS	35
2.3.1. MATERIELS	35
2.3.2. METHODE	36
3. TEST D'ADHERENCE CELLULAIRE	37
3.1. TEST EN SOLUTION	38
3.1.1. MATERIELS	38
3.1.2. METHODE	39

3.2. TEST SUR BSA ADSORBEE	39
3.2.1. MATERIELS	39
3.2.2. METHODE	40
<u>4. IMMUNOCYTOCHIMIE</u>	41
4.1. MATERIELS	41
4.2. METHODE	42

RESULTATS

<u>1. MODELES EXPERIMENTAUX</u>	44
1.1. MODELES CELLULAIRES	44
1.2. MODELES PEPTIDIQUES	45
<u>2. TESTS D'INHIBITION DE L'ADHERENCE CELLULAIRE PAR DES PEPTIDES RGD EN SOLUTION</u>	47
2.1. COMPARAISON DE L'EFFET INHIBITEUR DE DIFFERENTS PEPTIDES RGD EN SOLUTION SUR L'ADHERENCE DE CELLULES ENDOTHELIALES A DIFFERENTS TEMPS D'ADHERENCE	48
2.2. COMPARAISON DE L'EFFET INHIBITEUR DE DIFFERENTS PEPTIDES RGD EN SOLUTION SUR L'ADHERENCE DES CELLULES THP-1 A DIFFERENTS TEMPS D'ADHERENCE	49
2.3. COMPARAISON DE L'EFFET INHIBITEUR DU PEPTIDE REDV SUR L'ADHERENCE DES CELLULES ENDOTHELIALES ET DES THP-1	50
2.4. DISCUSSION	50
<u>3. EFFETS DE PEPTIDES RGD GREFFES SUR DE LA BSA SUR L'ADHERENCE DE CELLULES ENDOTHELIALES ET DE THP-1</u>	54
3.1. GREFFAGE DE PEPTIDES RGD SUR DE LA BSA	54
3.2. ADHERENCE DE CELLULES ENDOTHELIALES ET DE THP-1 SUR DE LA BSA MODIFIEE AVEC DES BRAS PEPTIDIQUES RGD	58

4. EFFETS DE PEPTIDES GREFFES SUR LA FORMATION DE PLAQUES

D'ADHERENCE **63**

4.1. RESULTATS 63

4.2. DISCUSSION 65

DISCUSSION GENERALE **67**

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Avant propos

Le travail réalisé s'inscrit dans le cadre d'un projet inter-universitaire financé par la Région Wallonne sur les biomatériaux. Celui-ci visait à moduler l'adhérence cellulaire et par là-même, la prolifération et l'activation de cellules en culture sur des polymères tels que le polyéthylène téréphtalate - PET-, polymère biocompatible accepté pour les greffons vasculaires, ou le polystyrène, classiquement utilisé en culture de cellules.

Etant donné que l'adhérence d'une cellule dépend directement des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et des récepteurs correspondants, les intégrines, différentes approches ont été proposées pour modifier la surface des polymères afin de mimer au mieux la situation in vivo. Ainsi, divers laboratoires tentent de greffer ou d'adsorber des protéines entières, des peptides ou encore des peptido-mimétiques. Au Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire, nous nous sommes surtout intéressés au greffage de peptides sur des matériaux tels que le polystyrène et la BSA (albumine de sérum bovin). La BSA est reconnue pour ses propriétés anti-adhésives et constitue donc un modèle expérimental intéressant d'acquisition, par greffage de peptides, de propriétés pro-adhésives.

Comme nous venons de le mentionner, plusieurs approches sont envisageables afin de mimer la MEC. La première possibilité consiste en l'utilisation de protéines de la MEC purifiées (fibronectine, collagène, laminine,...), exprimées de façon constitutive par les cellules. Toutefois, cette solution présente plusieurs inconvénients, car différentes étapes sont lourdes à mettre en oeuvre pour les obtenir comme par exemple, l'extraction de la protéine et sa purification. Pour éviter ces tâches fastidieuses, on peut se procurer certaines de ces protéines, disponibles commercialement, mais leur coût est très élevé. On peut également les produire par génie génétique. En introduisant un plasmide codant pour une protéine de la matrice extracellulaire ou des fragments de cette protéine dans une bactérie hôte, on peut obtenir cette protéine (ou des fragments) exprimée par la bactérie, excrétée et purifiée. Il n'en demeure pas moins que ce sont des protéines, de poids moléculaire très élevé et difficiles à manipuler. En outre, il s'agit de glycoprotéines, ce qui pose des problèmes lorsqu'on les exprime en bactéries et la plupart des protéines de la MEC sont polymériques (homo-ou hétéropolymériques), ce qui complique également l'approche génétique.

Une autre approche possible consiste à synthétiser des peptides mimant les protéines de la MEC. En effet, au sein de ces protéines, on retrouve des domaines de petite taille indispensables pour l'adhérence cellulaire tandis que d'autres le sont moins ou

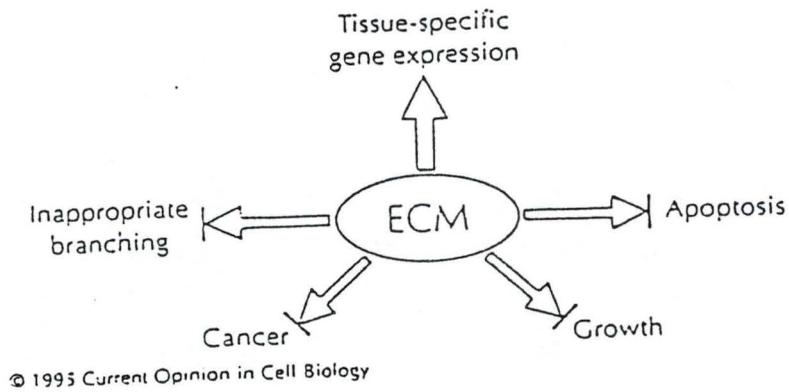


Figure I.1. : Exemples de signaux médiés par des éléments de la matrice extracellulaire (d'après Roskelley *et al.*, 1995).

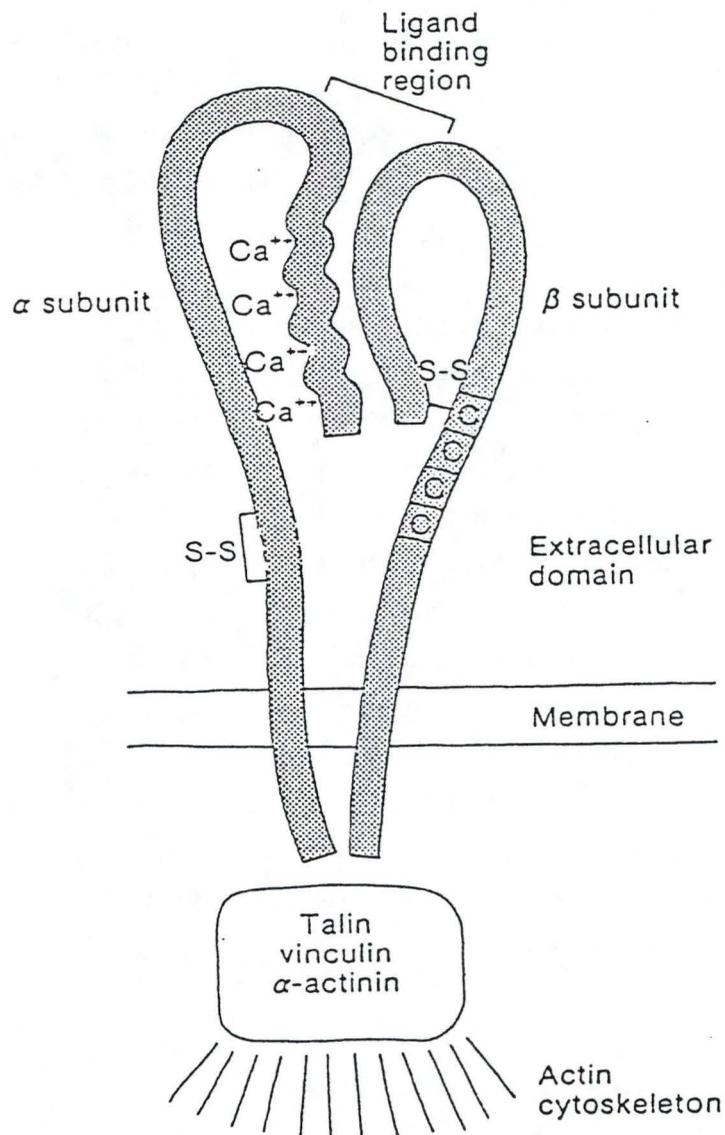


Figure I.2. : Représentation schématique d'une intégrine (d'après Albelda et Buck, 1990).

même pas du tout. C'est pourquoi, au laboratoire, nous avons choisi de synthétiser des peptides contenant un motif peptidique présent dans les domaines d'adhérence de la plupart des protéines de la MEC : le motif Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD). Nous avons synthétisé ces peptides sous forme, linéaire et cyclique. Gurrath *et al.*, (1992) ont en effet démontré que la cyclisation d'un peptide possédant la séquence RGD augmentait l'affinité des intégrines pour ces peptides. Dans ce cas, on se rapproche effectivement de la conformation dans laquelle se trouve le motif RGD dans la protéine native (Main *et al.*, 1992).

Enfin, une quatrième approche consiste à synthétiser des composés non peptidiques qui miment la structure du motif RGD et pourront être reconnus par les récepteurs cellulaires tout comme l'étaient les peptides ou les protéines. Ce sont de petites molécules appelées peptido-mimétiques. Cette approche a été réalisée par l'équipe du Professeur Marchand à l'UCL.

1. Récepteurs cellulaires : les intégrines

L'adhérence cellulaire semble être fondamentale pour la cellule. En effet, on a longtemps pensé que l'adhérence était un phénomène passif alors qu'en fait elle influence divers processus tels que la croissance, la différenciation, la réponse inflammatoire, ... et ce, en modulant l'expression génique (figure I.1.). Cette adhérence est médiée par des récepteurs qu'on nomme intégrines. Celles-ci interviennent dans l'interaction cellules-cellules mais aussi dans l'interaction cellules-matrice extracellulaire (Hynes, 1992), au niveau des protéines telles que la fibronectine, les collagènes, la laminine, ... Dans ce travail, nous nous limiterons aux interactions cellules-matrice extracellulaire, puisque le but du travail est de modifier des surfaces de polymères, en vue de recréer artificiellement des motifs de type matrice extracellulaire sur ces polymères. Signalons néanmoins que les interactions cellules-cellules modulent également considérablement le comportement cellulaire. Comme déjà mentionné, les interactions cellules-cellules font intervenir les intégrines, mais également d'autres systèmes ligands-récepteurs, tels que les cadhérines, les sélectines et les protéines de la superfamille de immunoglobulines, dont V-CAM et PECAM.

Les intégrines constituent une famille homogène de glycoprotéines transmembranaires formant des hétérodimères ayant une sous-unité α (120 à 180 kDa) et une sous-unité β (90 à 110 kDa) liées de façon non covalente (figure I.2.).

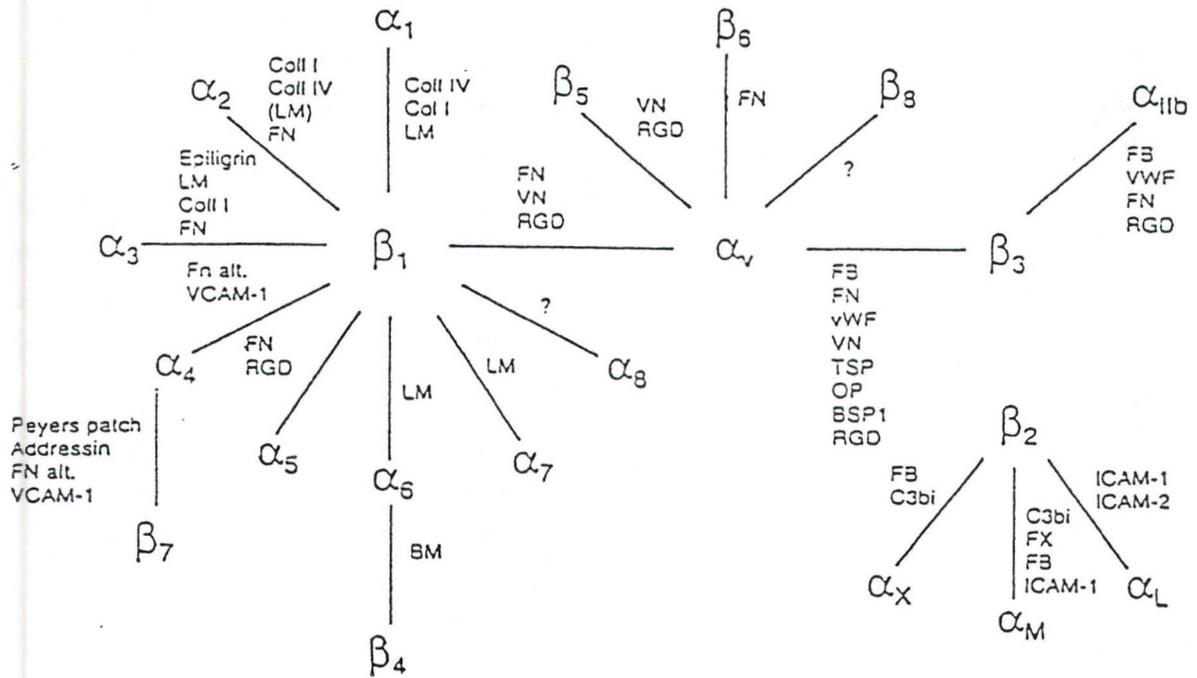


Figure I.3. : Représentation schématique des associations entre les sous-unités α et β identifiées dans les intégrines (d'après Ruoslahti *et al.*, 1994). Les ligands des diverses intégrines sont également cités, ainsi que le rôle éventuel du motif RGD.

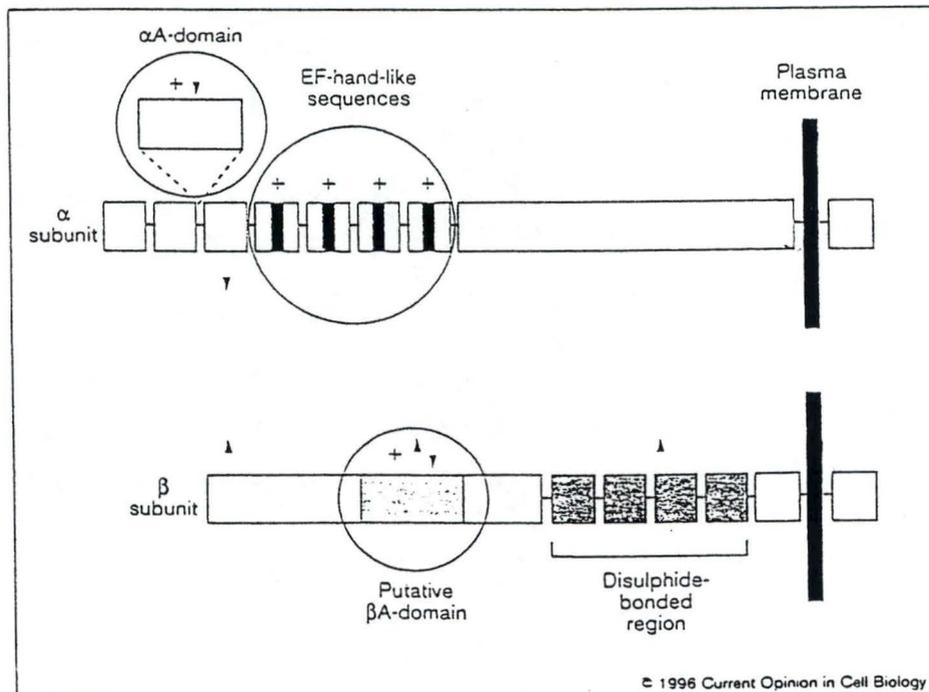


Figure I.4. : Structure des domaines extracellulaires des sous-unités α et β des intégrines (d'après Humphries, 1996). Les 3 sites impliqués dans la liaison au ligand sont entourés et les sites de liaison aux ions calcium sont indiqués par un +. Ces sites ont été identifiés entre autre via des anticorps monoclonaux, une production de fragments d'intégrine recombinante ...

A l'heure actuelle, 16 sous-unités α et 9 sous-unités β ont été identifiées. Cela constituerait plus de 100 hétérodimères possibles. Or, en réalité, seule une vingtaine de dimères existent dans la nature. Cela signifie donc qu'il y a des associations préférentielles entre les sous-unités α et β (figure I.3.).

Tout comme une intégrine peut être exprimée par des types cellulaires différents, une même cellule peut exprimer des intégrines différentes. Toutefois, il a été démontré que certaines intégrines étaient spécifiques d'un type cellulaire (Ruoslahti, 1994). Par exemple, les intégrines $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$ sont spécifiques des plaquettes (Raes, 1994).

La diversité des intégrines se complexifie encore par l'existence d'un épissage alternatif des sous-unités α et β .

Les deux sous-unités α et β sont des glycoprotéines constituées d'un segment transmembranaire, d'un domaine cytoplasmique, et d'un domaine extracellulaire. Pour la plupart des intégrines, les domaines cytoplasmiques sont courts (moins de 50 acides aminés). Seule la sous-unité β_4 a un domaine cytoplasmique de plus de 1000 acides aminés (soit un poids moléculaire total de 220.000). Les domaines extracellulaires (plus de 75 kDa pour β et plus de 100 kDa pour α) s'associent pour former l'hétérodimère $\alpha\beta$.

Chaque sous-unité β contient dans sa partie extracellulaire 4 domaines riches en cystéines formant des ponts disulfures. Une région conservée proche de l'extrémité amino-terminale contribue au domaine de liaison du ligand (figure I.4.) (Humphries, 1996). Quant au domaine intracellulaire, c'est par son intermédiaire qu'un lien est réalisé avec les protéines du cytosquelette telles la vinculine, l' α -actinine et la taline (Albelda et Buck, 1990). Toutefois, l'interaction des intégrines avec le cytosquelette et la MEC nécessite la présence des 2 sous-unités.

En ce qui concerne la sous-unité α , elle possède dans sa partie extracellulaire 7 domaines répétitifs. Certains d'entre eux (3 à 4) ont la capacité de fixer des cations bivalents tels que le Ca^{2+} (Bosman, 1993). La nature de ces cations peut affecter à la fois l'affinité et la spécificité du ligand (Hynes, 1992). Kirchofer *et al.* (1990) ont montré que ces cations sont nécessaires à l'association de certaines intégrines. Tout comme pour la sous-unité β , le domaine extracellulaire de la sous-unité α contribue aussi à la liaison du ligand.

La liaison des protéines de la MEC aux intégrines se fait par la reconnaissance de domaines spécifiques présents au niveau de la protéine de la MEC. Cette reconnaissance

Table 1. Integrin recognition sequences

Sequence	RGD	KQAGDV	LDV	KRLDGS	DGEA
$\alpha_3\beta_1$		$(\alpha_3\beta_1)$			
$\alpha_v\beta_1$					
$\alpha_v\beta_3$					
$\alpha_v\beta_5$					
$\alpha_v\beta_6$					
$\alpha_{11b}\beta_3$		$\alpha_{11b}\beta_3$			$\alpha_2\beta_1$
$(\alpha_2\beta_1)$					
$(\alpha_3\beta_1)$					
			$\alpha_4\beta_1$		
				$\alpha_M\beta_2$	

Tableau I.1. : Tableau récapitulatif des principales séquences en aa impliquées dans la reconnaissance intégrine-ligand, avec les intégrines correspondantes (d'après Ruoslahti, 1994).

permet donc l'ancrage de la cellule à la matrice. Pour la plupart de ces domaines, on a pu identifier un motif peptidique court, qui était la séquence minimale nécessaire pour qu'il y ait reconnaissance. C'est le cas du motif RGD, le plus courant. Parmi les autres motifs, on trouve par exemple les séquences DGEA, YIGSR, LDV, REDV, ... (tableau I.1.). Une particularité de la séquence REDV est qu'elle semble être spécifique des cellules endothéliales.

Lorsque la reconnaissance intégrine-ligand est réalisée, il se produit un regroupement des intégrines au niveau de la membrane cellulaire formant un site d'adhérence focale (Kornberg *et al.*, 1991). C'est à ce niveau que les intégrines font le lien avec d'une part les protéines associées au cytosquelette et les microfilaments (figure I.5.), et d'autre part des protéines impliquées dans la transduction du signal (figure I.6.) (Clark et Brugge, 1995). Ainsi, en plus de leur rôle "mécanique", les intégrines peuvent transmettre des signaux biochimiques de la MEC vers l'intérieur de la cellule, modulant l'expression génique. Nous n'évoquerons que brièvement la transduction du signal par les intégrines qui dépasse le cadre de ce travail. Nous pouvons dire malgré tout qu'il existe différentes voies possibles de transduction par les intégrines qui ont de nombreuses interconnexions entre elles. Toutefois, si beaucoup de choses ont été élucidées dans ce domaine au cours des dernières années, certains points restent encore à élucider (figure I.6.).

Les intégrines n'ont pas d'activité catalytique intrinsèque (telle qu'une activité tyrosine kinase, par exemple), pourtant leur regroupement induit la phosphorylation de résidus tyrosine d'une protéine dont le poids moléculaire se situe entre 115 à 130 kDa, la pp125^{FAK} ou FAK (focal adhesion kinase). FAK est une tyrosine kinase, qui ne devient active que lorsqu'elle est phosphorylée sur la tyrosine 397. Cette phosphorylation, induite par l'occupation des intégrines par leurs ligands, résulte vraisemblablement d'une auto-phosphorylation mais aussi de l'association de FAK avec une seconde tyrosine kinase, pp60^{src} ou src, ce qui aboutit à la formation d'un complexe tyrosine kinase FAK-src. Src interagit avec FAK via son domaine SH2, à haute affinité pour les tyrosines phosphorylées. La pp125^{FAK} est donc l'une des protéines majeures recrutées au niveau des intégrines et qui joue un rôle clé dans la transduction du signal liée aux intégrines (Richardson et Parsons, 1995). Grâce aux techniques d'immunofluorescence, il a été démontré que pp125^{FAK} est bien localisée aux sites d'adhérence focale lorsque des cellules adhèrent sur des substrats contenant le motif RGD (Schaller *et al.*, 1992).

Différents domaines de la pp125^{FAK} interviennent pour sa localisation aux sites focaux. Ainsi, un domaine situé dans sa région carboxy-terminale (aa 853-1012), appelé

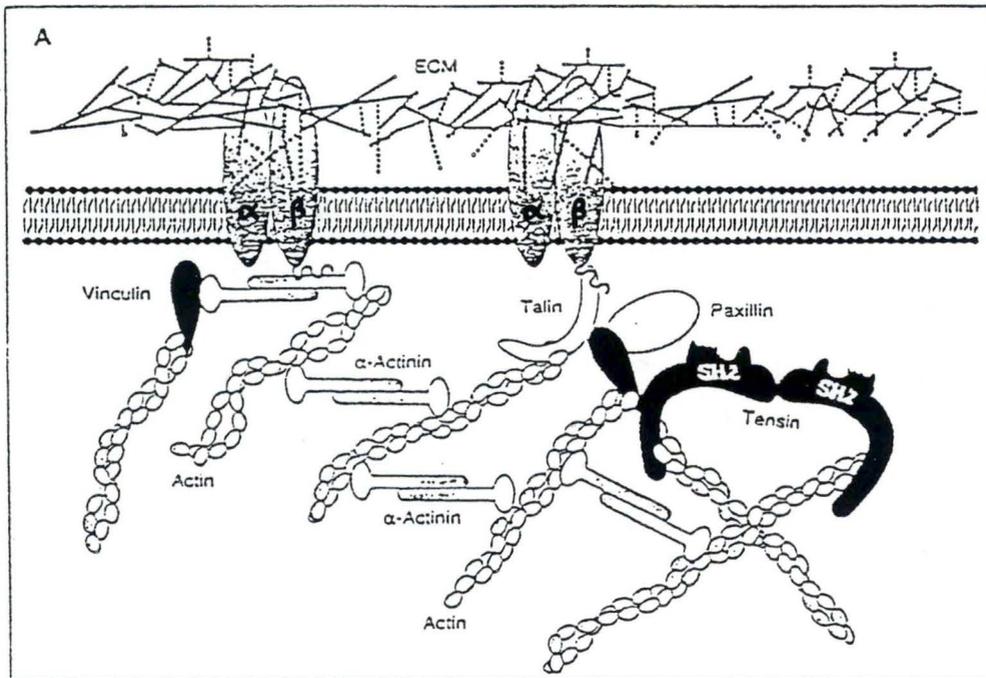


Figure I.5 : Représentation schématique des différents éléments du cytosquelette s'associant au niveau des sites d'adhésion focale et interagissant avec les intégrines (d'après Clark et Brugge, 1995).

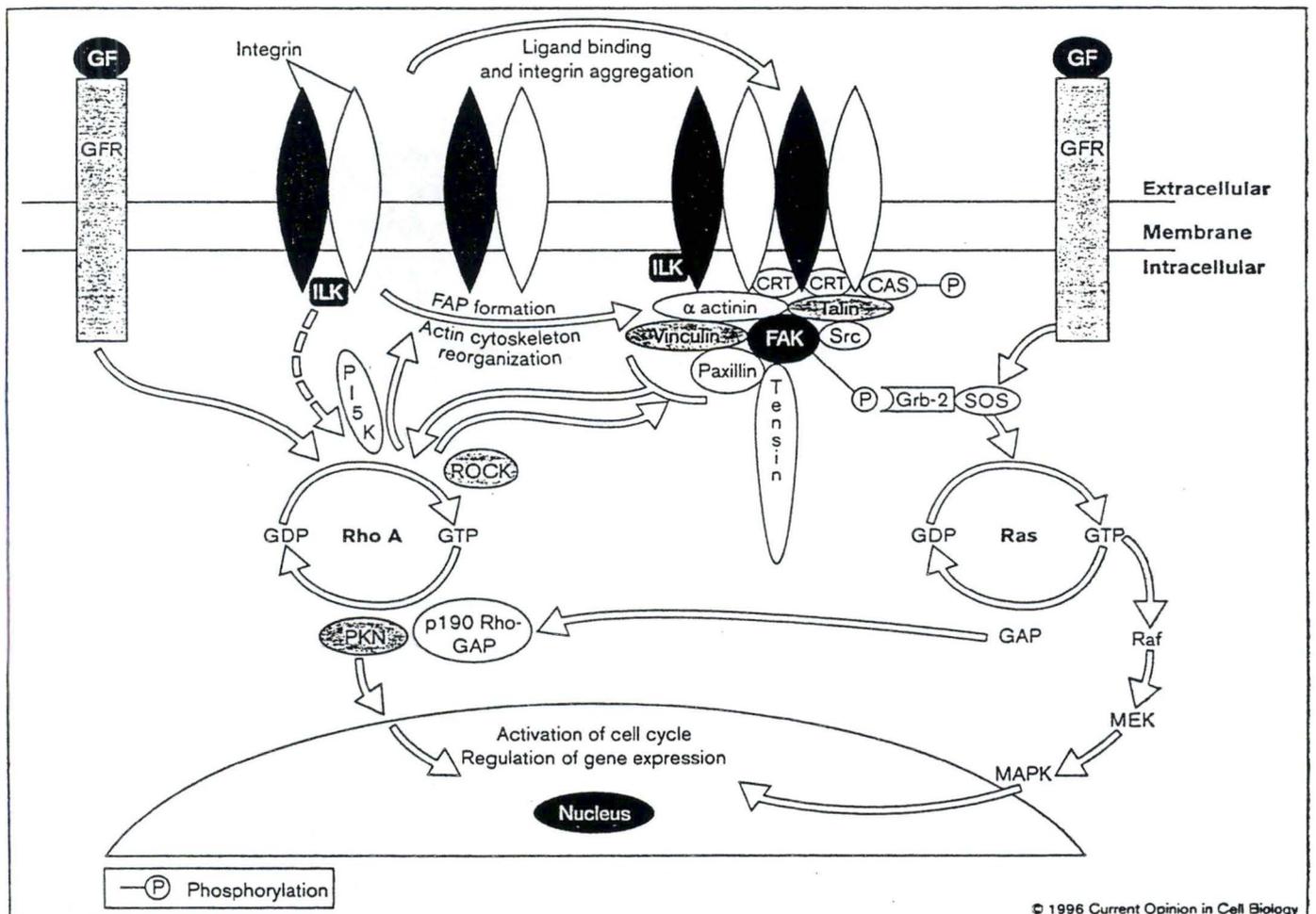


Figure I.6 : Événements moléculaires impliqués dans la transduction du signal via les intégrines (d'après Dedhar et Hannigan, 1996).

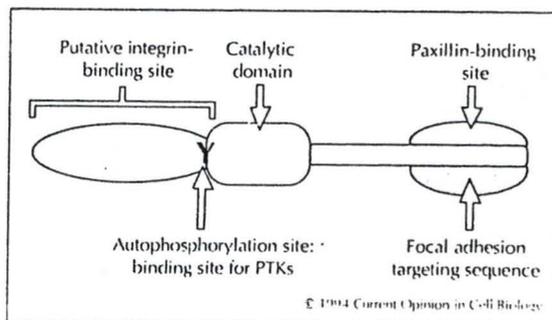


Figure I.7. : Représentation schématique des domaines de la pp 125^{FAK} (d'après Schaller et Parsons, 1994).

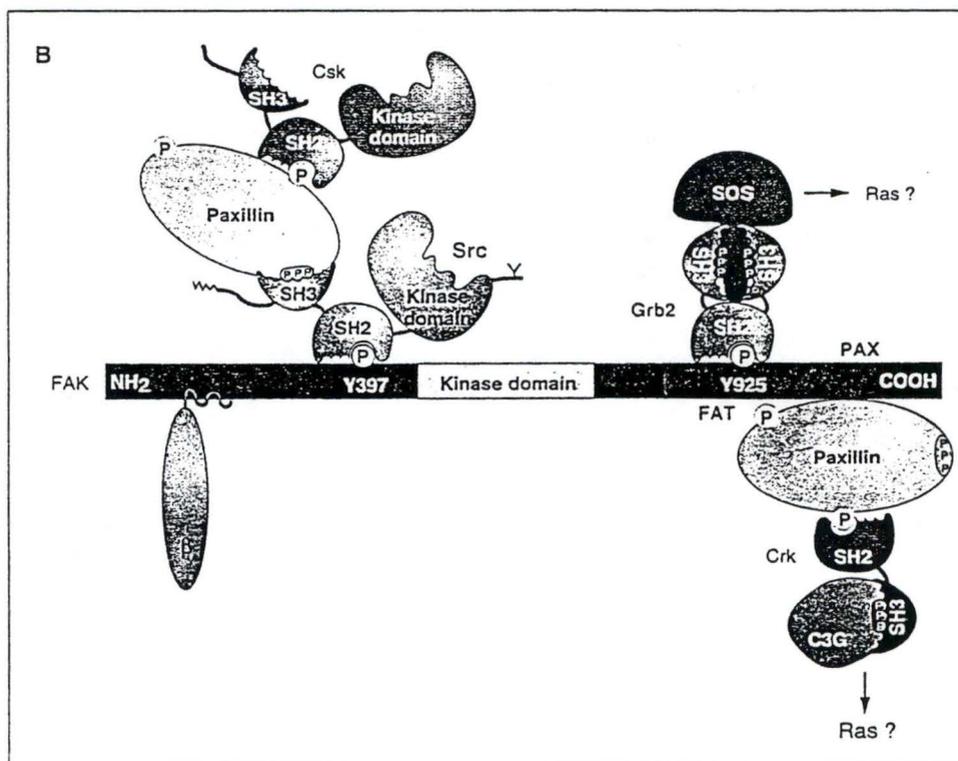


Figure I.8. : Représentation centrée sur la pp125^{FAK} des complexes supramoléculaires se formant lors du regroupement des intégrines et aboutissant à l'activation de la cascade des MAP Kinases représentée dans la figure I.6.(d'après Clark et Brugge, 1995).

FAT ou "focal adhesion targetting domain", permet le recrutement de la pp125^{FAK} à ces sites (Hildebrand *et al.*, 1993). La séquence amino-terminale quant à elle peut se lier au domaine cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines (Schaller *et al.*, 1994). La partie catalytique de la pp125^{FAK} se situe entre les domaines COOH- et NH₂-terminaux (figure I.7.).

Parsons *et al.* (1994) ont identifié plusieurs substrats de la pp125^{FAK} (figure I.5. et I.6.). On retrouve notamment la paxilline et la tensine qui sont des protéines du cytosquelette et d'autres protéines telles que pp60^{src} et pp59^{fyn} qui interviennent également dans la transduction du signal. La paxilline s'associe à la pp125^{FAK} via une séquence carboxy-terminale de la pp125^{FAK} distincte du domaine FAT. D'autre part, la pp125^{FAK} via ses tyrosines phosphorylées recrute d'autres protéines contenant un domaine SH2 (Schlaepfer *et al.*, 1994). Signalons par exemple, l'adaptateur Grb2, complexé à la protéine Sos, qui active la cascade bien décrite des MAP Kinases, également impliquées dans plusieurs voies de transduction du signal, et en particulier, dans celles induites par les facteurs de croissance (figures I.6. et I.8.)

Outre la phosphorylation de nombreuses protéines, le regroupement des intégrines entraîne également un remaniement du cytosquelette. Les intégrines, par le domaine intracellulaire de la sous-unité β , se lient aux protéines du cytosquelette. Parmi celles-ci, on retrouve l' α -actinine, la vinculine, la taline, la paxilline et la tensine. A leur tour, ces protéines se lient aux filaments d'actine assurant ainsi le lien entre les intégrines et les microfilaments. Ainsi, elles sont colocalisées avec les intégrines au niveau des sites d'adhérence focale (Clark et Brugge, 1995). Comme le montre la figure I.5., on remarque que l'interaction des filaments d'actine avec la sous-unité β des intégrines, se réalise par l'intermédiaire de nombreuses protéines dont les relations entre elles sont complexes. Parmi ces protéines, on retrouve la tensine, l' α -actinine et la vinculine.

Toute cette architecture protéinique semble jouer un rôle important dans l'adhérence et dans la morphologie cellulaire, impliquées dans l'étalement et la mobilité de la cellule. L'intégrité du cytosquelette semble nécessaire pour l'activation de pp125^{FAK}. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de l'assemblage du cytosquelette (par exemple, la cytochalasine D qui désorganise les microfilaments) abolit l'activation de plusieurs tyrosine kinases et entraîne le dysfonctionnement des intégrines (Schaller et Parsons, 1994).

La formation de plaques d'adhérence et le remaniement du cytosquelette découlent de différentes voies biochimiques intracellulaires qui conduisent à une augmentation du taux de calcium et du pH dans la cellule, à des changements dans le métabolisme

phospholipidique et enfin à des changements dans l'expression génique. Ceux-ci sont médiés entre autres par la voie des MAP Kinases (mitogen-activated protein kinase). En effet, la MAP Kinase peut phosphoryler des facteurs de transcription et a été impliquée dans la régulation de l'expression de gènes dans plusieurs types cellulaires (Jonhson *et al.*, 1994). Ainsi, Huhtala *et al.* (1995) ont montré que, dans les fibroblastes synoviaux de lapin, l'occupation des intégrines $\alpha_5\beta_1$ favorise l'expression des gènes de métalloprotéinases spécifiques alors que celle de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ ne l'affecte pas. Ainsi donc, en plus d'être impliquées dans des voies biochimiques, les intégrines peuvent agir comme mécano-récepteurs transmettant des signaux de stress à partir de la surface cellulaire jusque dans le noyau (Pierson, 1995). La modulation des activités d'éléments régulateurs, agissant en cis ou en trans, a pour conséquence l'induction de l'expression génique. Récemment, il a été démontré que la régulation de l'expression de gènes dans des tissus spécifiques nécessitait à la fois la transduction de signaux biochimiques et mécaniques.

Ces remaniements intracellulaires lors de la reconnaissance intégrines-protéines de la MEC nous ont permis de comprendre que les interactions cellules-cellules ou cellules-MEC médiées par les intégrines sont intimement impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires et dans de nombreux processus, incluant le développement embryonnaire, la croissance de cellules tumorales, l'apoptose, l'hémostase, ...

Ainsi par exemple, les mouvements de cellules durant la réparation d'un tissu dépendent des interactions médiées par les intégrines. Le caillot sanguin résulte d'un réseau formé principalement de fibronectine plasmatique et de fibrine. Cela fournit une matrice sur laquelle les cellules peuvent s'attacher et migrer (Ruoslahti, 1994). Clark (1990) a montré que les kératinocytes utilisaient les récepteurs à la fibronectine pour migrer au niveau de blessures épidermiques. Ces cellules n'expriment ces récepteurs que lorsqu'elles sont issues de tissus endommagés.

D'autre part, nous savons que les cellules normales synthétisent leurs propres constituants de la matrice extracellulaire alors que les cellules tumorales, pour lesquelles la prolifération n'est plus dépendante de l'adhérence, n'en produisent plus ou à un taux inférieur. Plantefaber et Hynes (1989) ont mis en évidence que l'expression de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ était réduite dans les cellules transformées, cette intégrine correspondant au récepteur de la fibronectine. De plus, Giancotti et Ruoslahti (1990) ont montré qu'en transfectant des cellules CHO avec les gènes codant pour l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, il y avait une augmentation dans la synthèse et la libération de fibronectine. Une surexpression du récepteur $\alpha_3\beta_1$

supprime le phénotype transformé des CHO. En effet, ces cellules synthétisent de la FN, migrent moins, acquièrent des caractéristiques de cellules normales. Il est connu que le récepteur à la fibronectine est nécessaire pour la mise en place de la matrice.

D'autres études nous révèlent que les intégrines interviennent également dans l'apoptose. D'après Meredith (1993), les cellules endothéliales et épithéliales normales entrent en apoptose si elles sont détachées de leur substrat par des peptides RGD. Une fois que la cellule perd contact avec les composants de la MEC, elle meurt. Ainsi, on peut dire que l'apoptose peut être induite par des signaux mécaniques correspondant au détachement d'une cellule de sa MEC.

Enfin, les glycoprotéines d'adhérence jouent également un rôle actif en régulant les réponses inflammatoires. Quatre types de molécules d'adhérence (P-sélectine, E-sélectine (ELAM-1), ICAM-1 et VCAM-1) contrôlent en effet la diapédèse des granulocytes aux sites d'inflammation (pour revue, voir Wegner *et al.* (1993)). Ainsi, on comprend mieux que plusieurs maladies associées à des anomalies génétiques, affectant les intégrines, peuvent avoir une importance dans divers procédés physiologiques et pathologiques. Une altération des intégrines $\alpha_X\beta_2$ et $\alpha_M\beta_2$ provoque des infections bactériennes récurrentes. Les recherches visant à interférer avec ces récepteurs, en utilisant par exemple des anticorps ou des peptides constituent également une nouvelle approche pour des interventions thérapeutiques dans des maladies telles que la thrombose, l'inflammation, le cancer, ...

2. La matrice extracellulaire

2.1. Généralités

La MEC fut tout d'abord considérée comme un ensemble structural maintenant les cellules les unes aux autres.

Mais, par la suite, des analyses biochimiques ont permis de caractériser les constituants-mêmes de la matrice et d'en découvrir de nouveaux variants ainsi que des récepteurs cellulaires. On a pu mettre en évidence le caractère actif de la MEC notamment dans la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, ... Les composants de la MEC, bien qu'en général insolubles, peuvent affecter et réguler des événements cellulaires de manière spécifique tout comme les facteurs de croissance, les cytokines et les hormones solubles (Von der Mark *et al.*, 1992).

Subunits	220,000 ± 20,000-dalton chains in disulfide-bonded dimer.
pI	5.5-6.3
Carbohydrate	5-9% asparagine-linked complex oligosaccharides.
Sulfhydryl groups	One or two in the C-terminal 30%
Disulfide bonds	~20 per subunit. Intersubunit bond(s) are very near C-terminal. N-terminal 25% is very rich in intrachain disulfides.
Secondary structure	No α helix, probably some β structure.
Tertiary structure	Asymmetric and elongated with globular domains.
High order associations	Form disulfide-bonded complexes and fibrils.

Tableau I.2. : Propriétés de la fibronectine (d'après Hynes et Yamada, 1982).

La découverte des constituants de la MEC en a montré la complexité. En effet, elle est formée en majeure partie de fibres de collagènes, de fibronectine et d'autres glycoprotéines, ainsi que de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes telles que l'acide hyaluronique (Von der Mark *et al.*, 1992). Nous ne décrivons pas ces deux derniers constituants mais nous vous renvoyons aux revues de Kjellén et Lindhal (1991) pour les protéoglycanes ainsi qu'aux revues de Jackson *et al.* (1991) et de Hardingham et Fosang (1992) pour les glycosaminoglycanes. Dans ce travail, nous nous attacherons exclusivement aux composants de la MEC interagissant avec les intégrines.

2.2. Fibronectine

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine dimérique (PM de 450.000 Da), jouant un rôle important dans différents processus cellulaires impliquant les interactions des cellules avec les constituants de la MEC (c'est-à-dire l'adhérence cellulaire, la morphologie, l'organisation du cytosquelette, la différenciation, ...). Cette protéine représente le constituant principal de la MEC qui puisse promouvoir l'adhérence et l'étalement cellulaire (Raes, 1994).

On retrouve la FN dans les tissus conjonctifs et dans la plupart des membranes basales. La FN est également présente sous forme de protéines solubles dans le plasma. Elle est synthétisée par de nombreuses cellules. Les fibroblastes et les cellules endothéliales en sont les principaux producteurs.

Une caractéristique importante de la FN est qu'elle est capable d'interagir spécifiquement avec de nombreuses autres macromolécules telles que la gélatine, le collagène, l'héparine, ... et avec de nombreux types cellulaires.

Hynes et Yamada (1982) ont déterminé la structure et les propriétés biochimiques principales de la FN (tableau I.2). Celle-ci est constituée d'un dimère polypeptidique dont chaque sous-unité a un poids moléculaire de 220 à 250 kDa. Ces 2 sous-unités sont similaires et liées par deux ponts disulfures du côté carboxy-terminal. Chaque chaîne est constituée d'un bras flexible et allongé d'environ 60 nm de long et est formée de plusieurs domaines globulaires dont la liaison aux cellules ou aux molécules est spécifique. Les régions polypeptidiques flexibles sont plus susceptibles d'être attaquées par des protéases.

Comme le décrivent Petersen *et al.* (1983) et Skorstengaard *et al.* (1982, 1984), la FN est constituée d'une série de répétitions homologues, encore appelées modules (figure

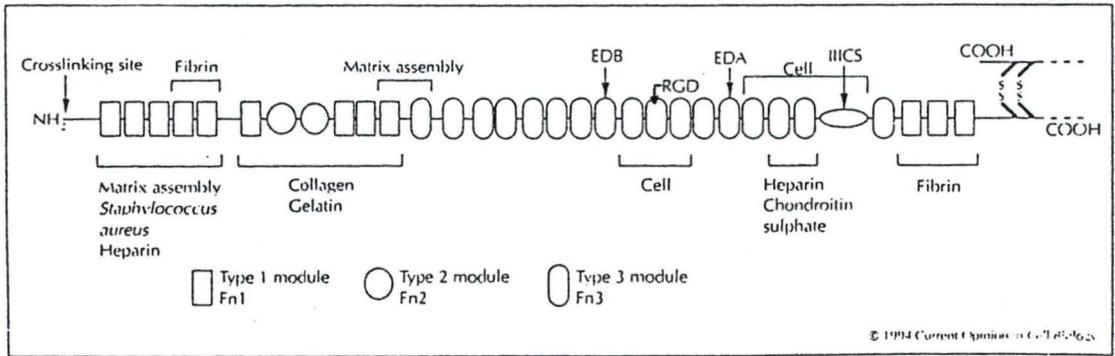


Figure I.9. : Structure modulaire de la fibronectine (d'après Potts et Campbell, 1994).

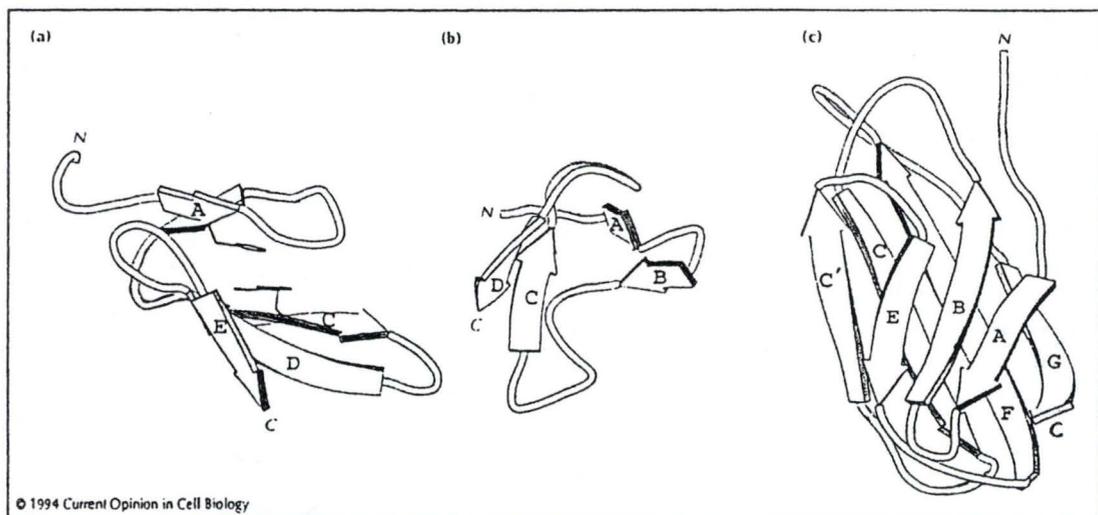


Figure I.10. : Structure tertiaire des modules de type I, II et III de la fibronectine (d'après Potts et Campbell, 1994).

I.9.). Cette analyse a pu être réalisée par digestion de la FN avec la plasmine ou la chymotrypsine donnant lieu à des domaines séparés, structurés de la FN. Ces modules sont de 3 types : type I, type II, type III. Les modules sont organisés en domaines fonctionnels résistant à la protéolyse et contenant des sites de liaison pour différentes protéines et glycosaminoglycanes de la MEC ou du plasma, ainsi que pour les cellules via les intégrines (figure I.9.). Les structures tertiaires de ces trois modules sont à présent connues (figure I.10.) (Potts et Campbell, 1994).

Les modules de type I se situent aux extrémités amino- et carboxy-terminales de la molécule de FN. Chaque module de type I est constitué de 45 acides aminés. Des études de résonance magnétique nucléaire ont montré un repliement caractéristique de ce module. Il s'agit d'un feuillet β anti-parallèle double brin (A et B) proche de la région amino-terminale et d'un feuillet β triple brin (C, D et E). Cette structure tertiaire est stabilisée par des interactions hydrophobes, la plus forte se situant entre les chaînes latérales de deux résidus aromatiques, l'un sur le brin B et l'autre sur le brin C. Ce module contient 4 cystéines pouvant faire des ponts disulfures entre les brins A et D, et entre D et E. La répétition des modules de type I contribue entre autre aux deux domaines de liaison pour la fibrine (figure I.9.).

Le module de type II est constitué de 60 acides aminés. Tout comme dans le motif de type I, il existe deux ponts disulfures. Le module de type II est formé par deux feuillets β anti-parallèles double brin orientés, approximativement, perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Sa surface est rendue hydrophobe par la présence de résidus aromatiques. Ces modules ne sont présents que dans le domaine de liaison aux collagènes.

Les modules de type III ont une longueur de 90 acides aminés. Chaque sous-unité de la FN possède entre 15 à 17 modules de ce type. A l'opposé des modules de type I et II, le module de type III ne contient pas de pont disulfure. Une caractéristique dominante de sa structure tertiaire est sa forme en "sandwich" constituée de deux feuillets β anti-parallèles renfermant un centre hydrophobe.

La FN est composée de différents sites de liaison comme par exemple le site de liaison pour des protéines de la MEC telles que le collagène et la thrombospondine, des récepteurs de surface cellulaire tels que les intégrines, des protéines plasmatiques telles que la fibrine et des glycosaminoglycanes telles que l'héparine et la chondroïtine sulfate.

L'extrémité amino-terminale de la FN contient des modules de type I intervenant dans la liaison à la fibrine et à d'autres molécules mais, elle est aussi essentielle pour l'assemblage de la FN au sein de la MEC. Le site amino-terminal de liaison à la fibrine est situé au niveau des quatrième et cinquième modules de type I. Il semblerait que ce site résulte de l'interaction entre ces modules. L'autre domaine de liaison à la fibrine, situé du côté carboxy-terminal, est aussi entièrement constitué de trois modules de type I. Les cinq modules de ce type semblent nécessaires pour la liaison de *Staphylococcus aureus* et pour l'assemblage dans la matrice de FN fibrillaire. Ces fonctions nécessitent l'intégrité du domaine.

Un autre domaine de liaison contenant également des modules de type I est le site de liaison au collagène et à la gélatine. Ce domaine est un peu particulier puisqu'il contient à la fois des modules de type I et des modules de type II. Ce domaine a un poids moléculaire de 46 kDa. La FN se lie à la plupart des collagènes mais elle possède une plus grande affinité pour les collagènes dénaturés ou gélatines. A nouveau, il semblerait qu'il y ait une interaction fonctionnelle entre certains modules comme par exemple le deuxième module de type II et le septième module de type I.

Les modules de type III constituent la région centrale de la FN. Bien que certains modules de type III, tels que le dixième qui comporte le motif RGD, contiennent des résidus impliqués dans des interactions avec des protéines spécifiques, d'autres peuvent avoir un rôle plus structural ayant pour résultat un arrangement spatial correct des sites de liaison. C'est dans cette partie que le site d'attachement cellulaire a été décrit par Pierschbacher *et al.* (1981). Ces auteurs ont pu préciser la région d'attachement cellulaire grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des segments protéolytiques de la FN de plasma humain. L'anticorps qui réagit avec le fragment promouvant l'attachement cellulaire, inhibe l'adhérence des cellules à des plaques reconditionnées par de la FN. Ce domaine de liaison aux cellules se situe entre le site de liaison au collagène et celui de l'héparine et est constitué de la séquence RGD, porté par le dixième module. D'autres domaines de liaison existent dans la FN comme par exemple les domaines de liaison au DNA, aux facteurs XIIIa et d'autres qui doivent encore être élucidés. Comme dans les autres types de modules, des interactions coopératives entre les modules de type III se produisent. Ainsi, le treizième module de ce type se lie à l'héparine avec une plus faible affinité que l'association des treizième et quatorzième modules.

La FN peut présenter des variations dans sa séquence primaire. En effet, un des modules de type III, situé entre le domaine d'attachement cellulaire et celui de la liaison à l'héparine, peut être présent ou absent. Une seconde région de variations se situe au

Type	Chains	Molecule Composition	Length of Triple Helix; Structural Details	Representative Tissues
COLLAGENS THAT FORM LONG FIBRILS WITH STRIATIONS EVERY 67 NM				
I	$\alpha 1(I)$; $\alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$ $[\alpha 1(I)]_3$	300 nm; 67-nm banded fibrils	Skin, tendon, bone, dentin Fetal form in skin, other tissues
II	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$	300 nm; small 67-nm banded fibrils	Cartilage, vitreous humor
III	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	300 nm; 67-nm banded fibrils	Skin, muscle, blood vessels, frequently together with type I collagen
V	$\alpha 1(V)$; $\alpha 2(V)$; $\alpha 3(V)$	$[\alpha 1(V)]_3$ $[\alpha 1(V)]_2[\alpha 2(V)]$ $[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$	390 nm; N-terminal globular domain; frequently together with type I collagen	Cell cultures, fetal tissues fetal membranes, skin, bones, placenta, most interstitial tissues
XI	$\alpha 1(XI)$; $\alpha 2(XI)$; $\alpha 3(XI)$	$[\alpha 1(XI)][\alpha 2(XI)][\alpha 3(XI)]$	300 nm; small fibers; frequently together with type II collagen	Cartilage
FIBRIL-ASSOCIATED COLLAGENS WITH INTERRUPTED TRIPLE HELICES				
IX	$\alpha 1(IX)$; $\alpha 2(IX)$; $\alpha 3(IX)$	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)]$ $[\alpha 3(IX)]$	200 nm; N-terminal globular domain; bound glycosamino-glycan; associated with type II collagen	Cartilage, vitreous humor
XII	$\alpha 1(XII)$	$[\alpha 1(XII)]_3$	Large N-terminal domain; cross-shaped molecule; interacts with type I collagen	Embryonic tendon and skin
XIV	$\alpha 1(XIV)$	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Large N-terminal domain; cross-shaped molecule	Fetal skin and tendon
FIBRIL-ASSOCIATED COLLAGENS THAT FORM BEADED FILAMENTS				
VI	$\alpha 1(VI)$; $\alpha 2(VI)$; $\alpha 3(VI)$	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)]$ $[\alpha 3(VI)]$	150 nm; N- and C-terminal globular domains; microfibrils banded every 100 nm; associated with type I	Most interstitial tissues
COLLAGENS THAT FORM SHEETS				
IV	$\alpha 1(IV)$; $\alpha 2(IV)$; $\alpha 3(IV)$; $\alpha 4(IV)$; $\alpha 5(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$ other forms	Two-dimensional cross-linked network	All basal laminae
VIII	$\alpha 1(VIII)$; $\alpha 2(VIII)$	Not known	Regular triangular lattice	Endothelial cells; Descemet's membrane separating corneal epithelial cells from the stroma
X	$\alpha 1(X)$	$[\alpha 1(X)]_3$	150 nm; C-terminal globular domain	Growth plate (mineralizing cartilage forming bone)
COLLAGENS THAT FORM ANCHORING FIBRILS				
VII	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$	450 nm; dimeric; globular domains at each end	Epithelia (anchors skin basal lamina to underlying stroma)
COLLAGENS KNOWN FROM cDNA CLONING ONLY				
XIII	$\alpha 1(XIII)$	Not known	Not known	Endothelial cells

Tableau I.3. : Caractéristiques des différents types de collagène (d'après Lodish *et al.*, 1995).

niveau des 2 derniers modules de type III. Des analyses de DNA recombinant ont montré que tous les variants étaient codés par un seul gène (Schwartzbauer *et al.*, 1983). Ces différences proviennent donc de diverses formes d'épissage alternatif du transcrit primaire et sont spécifiques d'un type cellulaire.

2.3. Collagènes

D'autres glycoprotéines importantes pour l'adhérence cellulaire sont les collagènes. Les collagènes sont des molécules trimériques constituées par l'assemblage de sous-unités identiques ou différentes, les chaînes α (tableau I.3.). Les chaînes α comportent des domaines en hélice à pas gauche, dus à la répétition du motif Gly-X-Y. Lorsque trois chaînes α polymérisent pour former une molécule de collagène, les domaines hélicoïdaux s'associent pour former une triple hélice à pas droit. Ces domaines en triple hélice sont communs à tous les collagènes, même si leur importance relative varie selon les types de collagènes (van der Rest et Garrone, 1990). Les autres caractéristiques qui sont spécifiques aux collagènes sont les taux élevés de résidus proline, alanine et lysine, des modifications post-traductionnelles telles que l'hydroxylation des prolines et des lysines, diverses glycosylations et la formation de ponts intermoléculaires via les lysines et les hydroxylysines. Cette structure est stabilisée par la présence de prolines et d'hydroxyprolines, respectivement, dans les positions X et Y.

On classe les différents collagènes selon l'importance relative des domaines en triple hélice, appelés domaines collagéniques et des segments interrompant la triple hélice, ces derniers correspondant à des structures tridimensionnelles différentes. Cette importance relative détermine également l'arrangement supramoléculaire des collagènes. Sur cette base, on distingue donc en général 2 groupes principaux : les collagènes fibrillaires et les collagènes non fibrillaires. Parmi les collagènes fibrillaires, on retrouve les types I, II, III, V et XI. De par leur capacité à s'organiser en fibrilles, ces collagènes fournissent un support structural au niveau de la peau (I et III), des vaisseaux sanguins (III), du cartilage (II), ... Par contre, les collagènes dits non fibrillaires se regroupent en diverses sous-catégories. Ainsi, les types IX, XII et XIV forment un sous-groupe qu'on nomme FACIT pour Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices (Shaw et Olsen, 1991) (figure I.11).

Les collagènes fibrillaires sont présents dans la plupart des tissus conjonctifs. La triple hélice dans ce type de collagène est caractérisée par la présence de plus de 300 répétitions ininterrompues de la séquence Gly-X-Y, flanquées de part et d'autre par un petit domaine globulaire (figure I.12.) (van der Rest et Garrone, 1990).

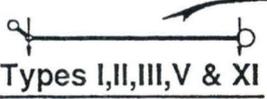
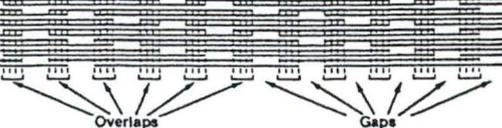
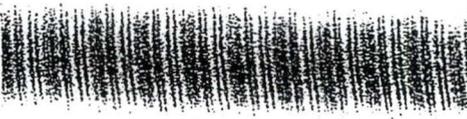
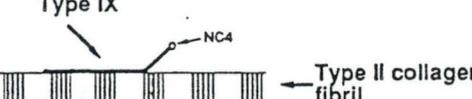
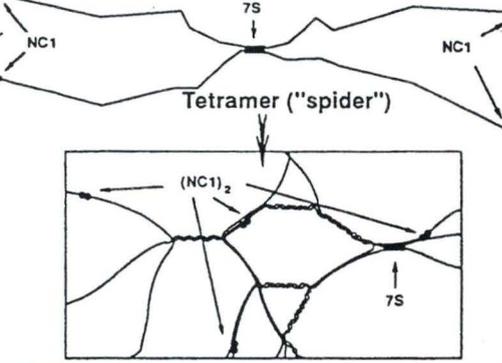
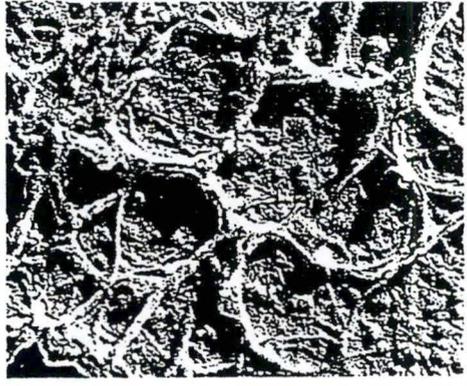
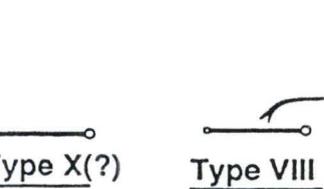
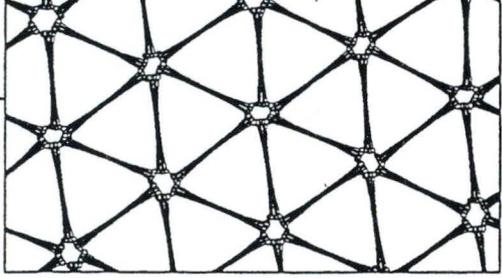
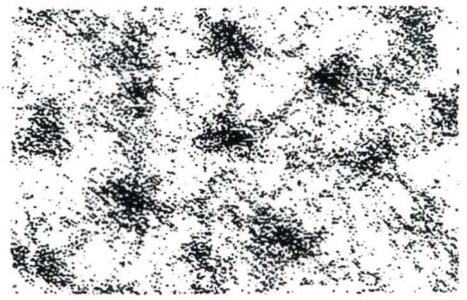
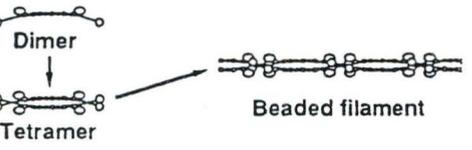
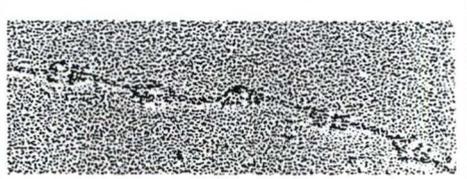
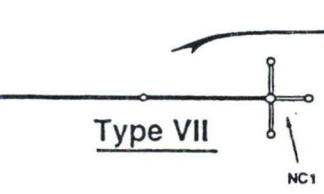
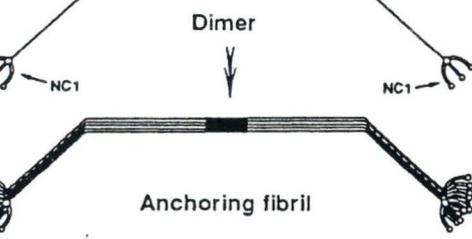
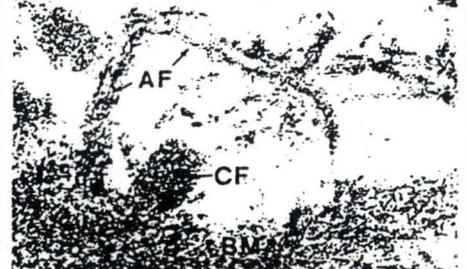
MOLECULES 	AGGREGATES (schematic representation) 	AGGREGATES (EM visualisation) 
Collagens participating in quarter staggered fibrils		
 <p>Types I,II,III,V & XI</p>	 <p>Overlaps Gaps</p>	
Fibril-associated collagens with interrupted triple helices (FACITs)		
 <p>Types XII & XIV Type IX</p>	 <p>Type IX Type II collagen fibril</p>	
Collagens forming sheets		
 <p>Type IV</p>	 <p>Tetramer ("spider")</p>	
 <p>Type X(?) Type VIII</p>		
Collagen forming beaded filaments		
 <p>Type VI</p>	 <p>Dimer Tetramer Beaded filament</p>	
Collagen forming anchoring fibrils		
 <p>Type VII</p>	 <p>Dimer Anchoring fibril</p>	 <p>AF CF BM</p>

Figure I.11. : Représentation schématiques des différents types de collagènes (d'après van der Rest et Garrone, 1991).

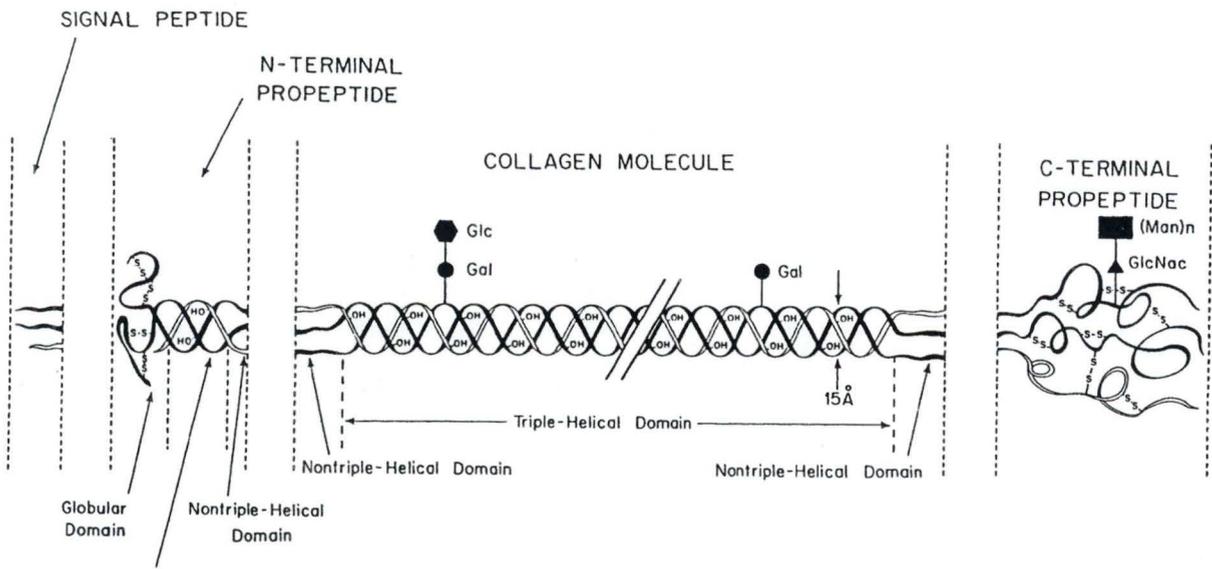


Figure I.12. : Représentation schématique d'une molécule de collagène fibrillaire (d'après Olsen et Ninomiya, 1994).

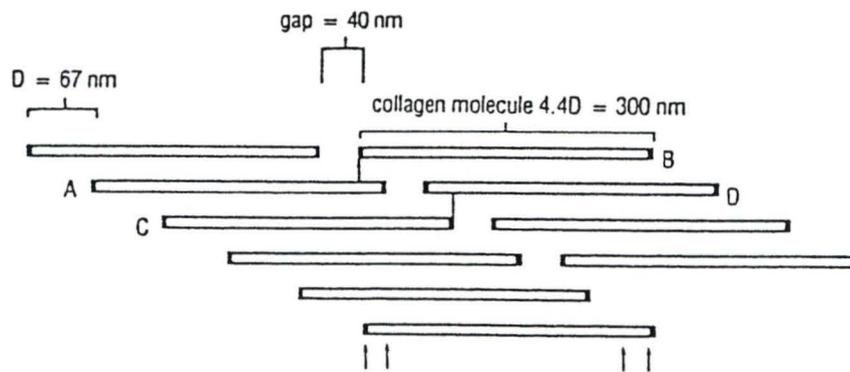


Figure I.13.A : Représentation schématique de molécules de collagène assemblées en fibrilles (d'après Vuorio et de Crombrughe, 1990).



Figure I.13.B : Représentation des molécules de collagène en fibrilles striées (d'après van der Rest et Garrone, 1990).

Des mutations dans le domaine en triple hélice peuvent engendrer des modifications importantes de la structure primaire des collagènes et donc influencer dramatiquement les propriétés des tissus contenant la molécule altérée. Par exemple, la substitution d'un résidu glycine dans la chaîne $\alpha 1(I)$ entraîne le cas le plus léthal d'ostéogenèse imparfaite, une maladie héréditaire caractérisée par une fragilité des os.

Le collagène de type I, membre le plus important de la famille des collagènes fibrillaires, est un hétérotrimère composé de 2 chaînes identiques $\alpha 1(I)$ et d'une chaîne $\alpha 2(I)$. Cependant, des molécules homotrimériques $(\alpha 1)_3$ ont également été identifiées. Les types II et III sont homopolymériques. Pour les 2 derniers types V et XI, il existe des variations dans la composition de la triple hélice. Différentes associations ont été identifiées et parmi celles-ci, certaines prédominent. Ainsi, pour le collagène V, la structure la plus fréquente est un hétérotrimère constitué de 2 chaînes $\alpha 1(V)$ et d'une chaîne $\alpha 2(V)$ tandis que pour le type XI, la forme principale est $\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$.

Les molécules de collagènes fibrillaires I, II, III, V et XI s'alignent les unes derrière les autres et latéralement, mais avec un décalage de 64 nm, tandis qu'une molécule de collagène fait 300 nm. Cette disposition particulière explique l'aspect strié des fibrilles de collagène (figure I.13.A et B). Les fibrilles sont stabilisées par des ponts intermoléculaires et intramoléculaires via des résidus lysines et hydroxylysines situées dans des positions conservées (Vuorio et de Crombrughe, 1990).

Le groupe de collagènes non fibrillaires est très hétérogène à la fois dans la structure et dans les fonctions. Plusieurs de ces collagènes constituent les composants de différents réseaux de la MEC (types IV, VI, VII, VIII) ou interagissent avec le collagène fibrillaire (types IX, XII et XIV). Il est à noter que la structure des exons et l'organisation des gènes de cette famille de collagène divergent de celles des collagènes fibrillaires bien que la répétition Gly-X-Y soit toujours présente.

Le type VIII est exprimé dans la membrane de Descemet de l'oeil tandis que le type IV est restreint aux membranes basales dont il est le composant majeur. Cette forme de collagène est constituée de 2 chaînes $\alpha 1(IV)$ et d'une chaîne $\alpha 2(IV)$ mais d'autres formes existent également, associées à des membranes basales spécialisées.

Le collagène de type VI est un hétérotrimère avec des chaînes $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$. Une dimérisation se produit par l'association anti-parallèle de deux molécules de collagène. Deux dimères de collagène s'associent pour former un tétramère, via une

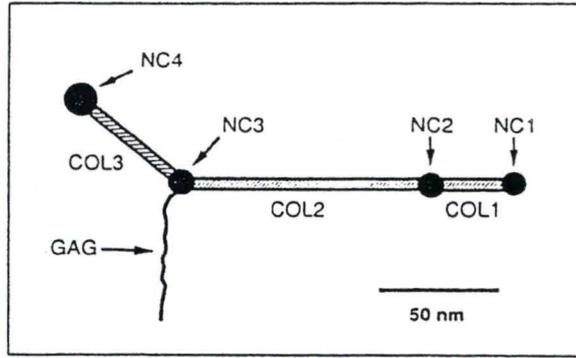


Figure I.14. : Représentation schématique d'une molécule de collagène de type IX (d'après van der Rest *et al.*, 1990).

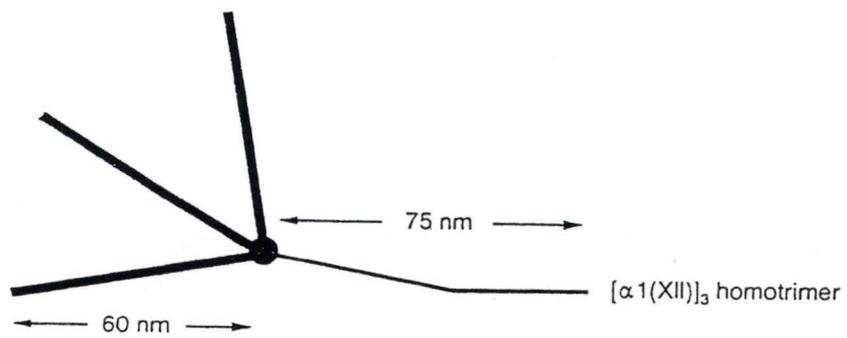


Figure I.15. : Représentation schématique d'une molécule de collagène de type XII (d'après Shaw et Olsen, 1991).

agrégation latérale. Ces tétramères, stabilisés par des ponts disulfures et terminés par deux domaines globulaires, s'associent à leur tour pour former des filaments avec une périodicité de 100 nm (figure I.11.). Ces microfibrilles ont une large distribution dans les tissus conjonctifs. La structure des gènes codant pour les chaîne α (VI) n'est pas encore bien connue. De l'épissage alternatif peut se produire au niveau de l'extrémité 3' du RNA de la chaîne α 2(VI). Une synthèse accrue de ce type de collagène a été décrite dans des maladies fibrotiques.

Le type XIII est exprimé au niveau de la peau, de l'os, des muscles striés et du cartilage. La structure supramoléculaire n'est pas encore connue, mais la caractéristique la plus frappante est l'existence d'au moins 5 modes d'épissages alternatifs du RNA.

Le collagène de type VII est synthétisé par les kératinocytes et a pour rôle la stabilisation de la jonction dermo-épidermique. Il forme un homotrimère.

Les types IX, XII et XIV ont été groupés parce qu'ils partagent des régions de grande homologie et possèdent des caractéristiques structurales uniques (Shaw et Olsen, 1991). Ces FACIT unissent les collagènes fibrillaires entre eux et/ou avec d'autres composants de la MEC non collagéniques. Le collagène de type IX semble être le meilleur représentant de ce groupe (figure I.14.). Il est exprimé dans les cartilages au niveau des chondrocytes hypertrophiques. Ceci suggère qu'il ait une fonction spécifique liée à la minéralisation du cartilage. C'est grâce à l'interruption entre les domaines hélicoïdaux que les FACIT présentent une grande flexibilité. Ces domaines sont appelés "non-triple helical" ou non collagéniques (NC). Ils sont toujours courts (moins de 50 aa) et très sensibles à la protéolyse (van der Rest et Garrone, 1990). Signalons que le collagène IX porte une chaîne latérale de glycosaminoglycanes (GAG), et peut donc être également classé comme protéoglycane particulier.

Le collagène de type XII est un homotrimère avec un PM d'approximativement 220.200. Tout comme le collagène de type IX, le type XIV s'associe latéralement avec le collagène de type I. Les domaines hélicoïdaux forment un bras de 75 nm de long et sont attachés à un globule central duquel partent 3 bras de 60 nm. La chaîne α 1 du collagène XIV a 60 % d'homologie avec la chaîne α 1 du collagène XII (figure I.15.).

L'expression des FACIT est spécifique de certains tissus. Il existe en plus, des variations dans la partie amino-terminale de ce type de collagène. Par exemple, on retrouve 2 formes de collagène IX qui résultent de 2 sites différents de transcription dans le gène codant pour α 1(IX).

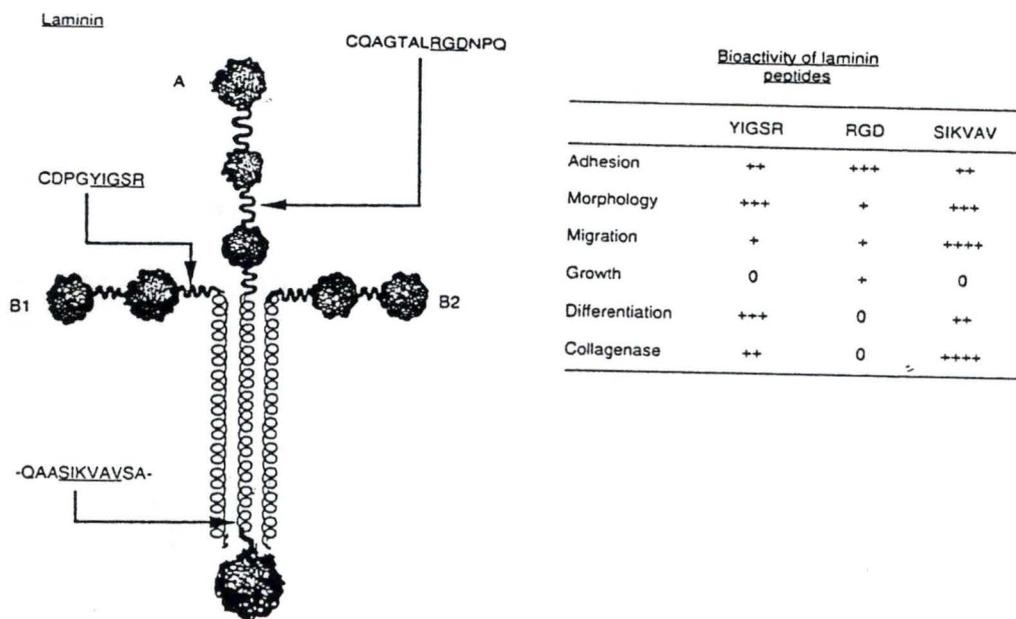


Figure I.16. : Modèle schématique de la molécule de laminine (d'après Schnaper *et al.*, 1993).

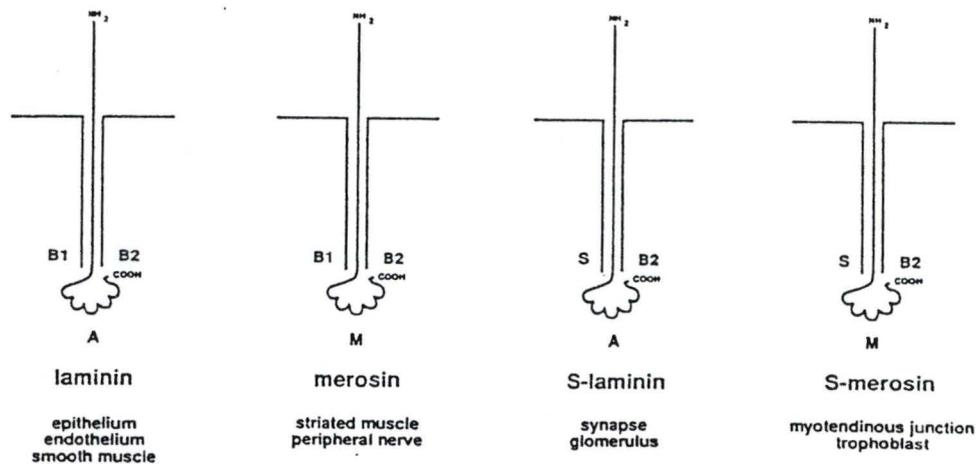


Figure I.17. : Représentation schématique des isoformes de la laminine (d'après Engvall, 1994).

2.4. Autres glycoprotéines

Parmi les autres protéines de la MEC, on retrouve la laminine, composant majeur des membranes basales. La laminine est une glycoprotéine insoluble qui possède une activité structurale et biologique. En effet, cette molécule promeut des fonctions différentes telles que l'adhérence, la croissance, la migration, ... Son poids moléculaire est de 850.000 et elle est formée de 3 chaînes polypeptidiques unies par des ponts disulfures, désignées : A (PM de 400.000), B1 (PM de 210.000) et B2 (PM de 200.000) (Schnaper *et al.*, 1993). Ces chaînes s'associent entre elles pour former une structure en croix avec des domaines globulaires. La croix comporte 3 bras courts et un bras long. Ce dernier résulte de l'association des 3 sous-unités en superhélice, au niveau de la partie carboxy-terminale. Le bras long se termine par un domaine globulaire principalement constitué par l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité A. Grâce à la digestion de la laminine par diverses protéases, des domaines particuliers ont pu être mis en évidence tels que des sites d'adhérence cellulaire, celui de la liaison au collagène, ... (figure I.16.). Une portion de la chaîne A contenant la séquence RGD médie l'attachement des cellules à la laminine via les intégrines. La laminine possède encore 2 sites d'attachement cellulaire. Le second site, YIGSR, est localisé sur la chaîne B1. Enfin, une troisième séquence (SIKVAV) semble quant à elle stimuler la migration de cellules endothéliales (Schnaper *et al.*, 1993). La laminine est synthétisée par de nombreuses cellules dont les cellules épithéliales, endothéliales, musculaires, les cellules nerveuses, ... mais sa distribution est limitée à certains tissus. En outre, on retrouve également des variations dans les niveaux d'expression des chaînes. La chaîne A est moins exprimée dans beaucoup de cellules en culture que la chaîne B. Enfin, il existe plusieurs types de laminine (isoformes) avec des distributions tissulaires qui leur sont propres (figure I.17).

La thrombospondine (TSP) est une glycoprotéine de la MEC, sécrétée par de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les muscles striés, ... Elle est composée de 3 sous-unités identiques reliées par des ponts disulfures. La TSP présente 2 domaines globulaires, l'un situé du côté amino-terminal, l'autre situé du côté carboxy-terminal séparés par un long domaine central. La TSP se lie à divers constituants de la MEC ainsi qu'à des molécules solubles telles que le plasminogène, le TGF- β , ... On retrouve le motif RGD dans chacune des trois sous-unités (Lawler et Hynes, 1986).

La tenascine est formée de 6 sous-unités identiques, unies par des ponts disulfures (figure I.18.). L'expression de cette glycoprotéine est limitée dans le temps et dans

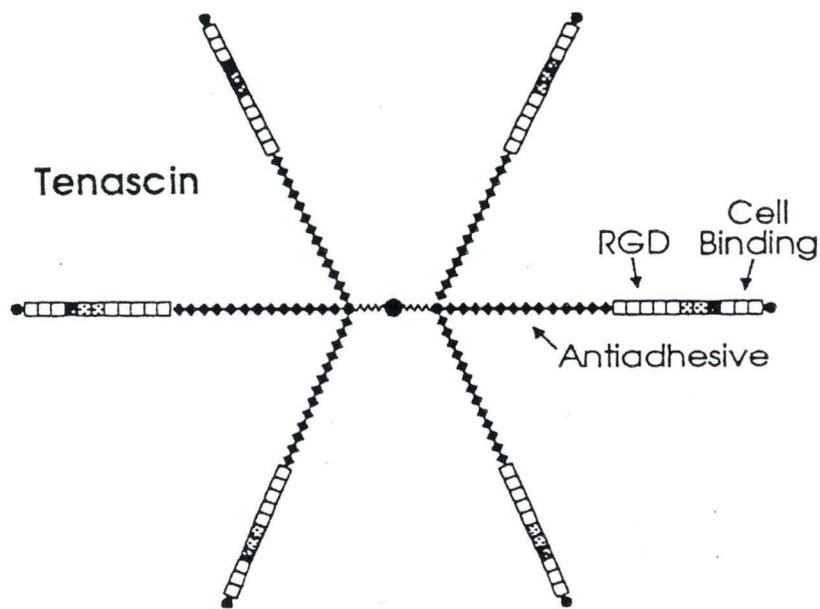


Figure I.18. : Représentation schématique de l'hexabrachion de la tenascine (d'après Reichardt, 1994).

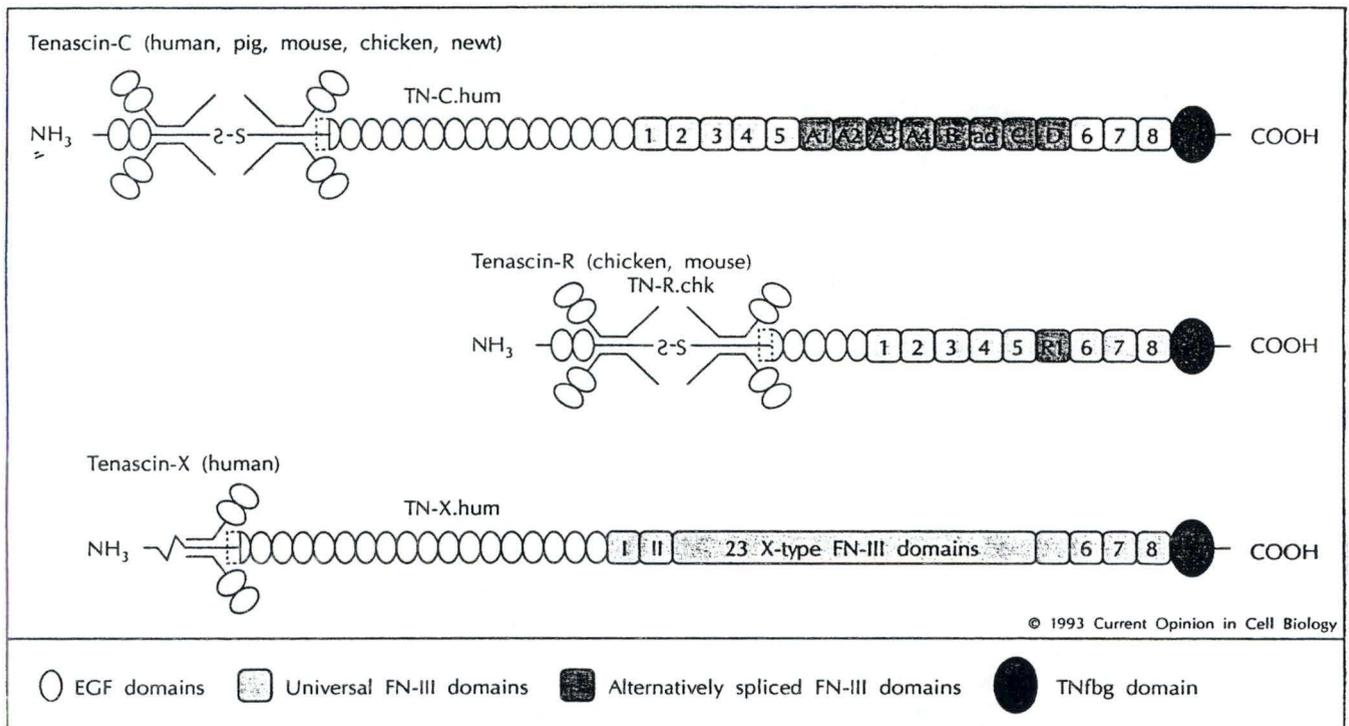


Figure I.19. : Structure de la famille des tenascines (Erickson, 1993).

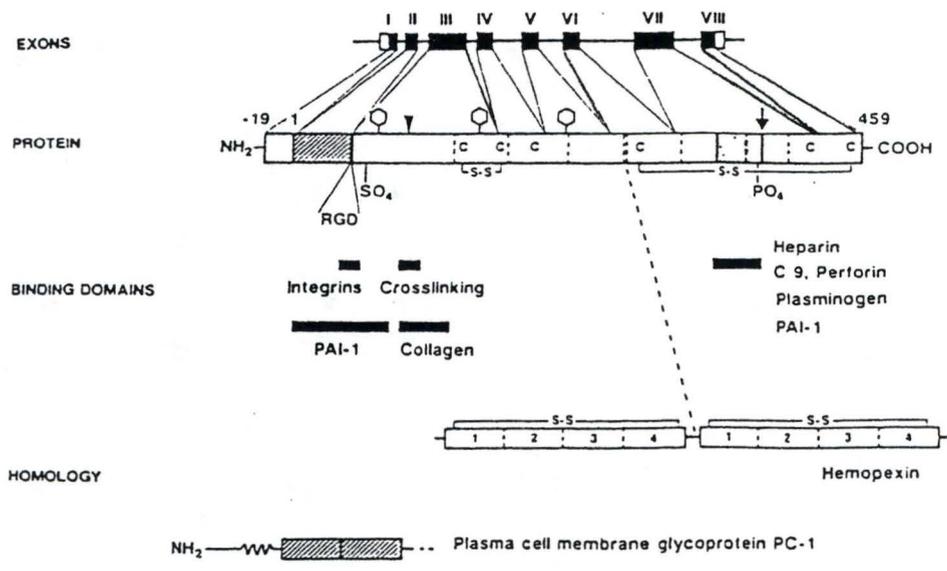


Figure I.20. : Structure de la vitronectine humaine (d'après Preissner, 1991).

l'espace. On la retrouve dans les tissus embryonnaires, dans les tumeurs, au cours du développement du système nerveux, des étapes initiales de l'organogenèse des glandes mammaires, ... Chaque sous-unité se caractérise par la répétition d'un certain nombre de modules structuraux et fonctionnels comme indiqué dans la figure I.19. : les modules EGF et les modules de type III de la FN. Le complexe hexamérique possède 2 activités opposées. D'une part, il promeut l'adhérence cellulaire grâce à un domaine impliquant des modules de type III de la FN. L'un de ces modules comporte le motif RGD (Joshi *et al.*, 1993 et, Bourdon et Ruoslahti, 1989). Par contre, un autre domaine, localisé au niveau des modules EGF, possède des propriétés anti-adhésives (figure I.18.). Cette protéine se lie aussi à divers constituants de la MEC. Comme les autres constituants de la MEC, il existe plusieurs formes de tenascine (figure I.19.).

La SPARC est une glycoprotéine de 40 kDa qui inhibe, *in vitro*, la progression du cycle cellulaire et induit l'arrondissement des cellules (Lane et Sage, 1994).

Nous constatons donc que plusieurs glycoprotéines de la MEC contiennent un motif commun : le motif RGD. Ce motif RGD est également présent dans des glycoprotéines plasmatiques, telles que le fibrinogène et la vitronectine (figure I.20). Ce motif reconnu par une série d'intégrines exerce une action au niveau des fonctions cellulaires. Nous détaillerons l'importance de cette séquence dans le chapitre qui suit.

3. Le motif Arg-Gly-Asp (RGD)

Un des motifs peptidiques principaux qui médie l'adhérence cellulaire à la FN a été identifié, séquencé et localisé au niveau du dixième module de type III. L'utilisation de peptides synthétiques a permis de reproduire l'effet de cette petite séquence (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984). C'est une séquence qui ne représente que 0,2 % de la FN qui a été retenue pour médier les fonctions adhésives que possédait la FN entière. Cette séquence est le térapeptide RGDS. Pierschbacher et Ruoslahti (1984, 1987) ont réalisé différentes substitutions afin de déterminer l'importance jouée par chaque acide aminé. Les résultats de ces expériences montrent que l'arginine lévogyre peut être substituée en sa configuration dextrogyre sans vraiment modifier l'efficacité de la séquence alors que ce n'est pas le cas pour l'acide aspartique. La substitution de la sérine quant à elle est particulière car elle a un effet sélectif sur l'activité du peptide. La sérine dextrogyre ne joue aucun rôle dans l'activité inhibitrice du motif RGDS sur l'adhérence des cellules à la vitronectine, par contre elle est importante pour inhiber l'adhérence cellulaire sur la FN. Cet acide aminé peut être échangé contre d'autres acides aminés sans modifier fortement l'activité. Par contre, toute substitution de l'Arg, Gly ou Asp rend le peptide inactif.

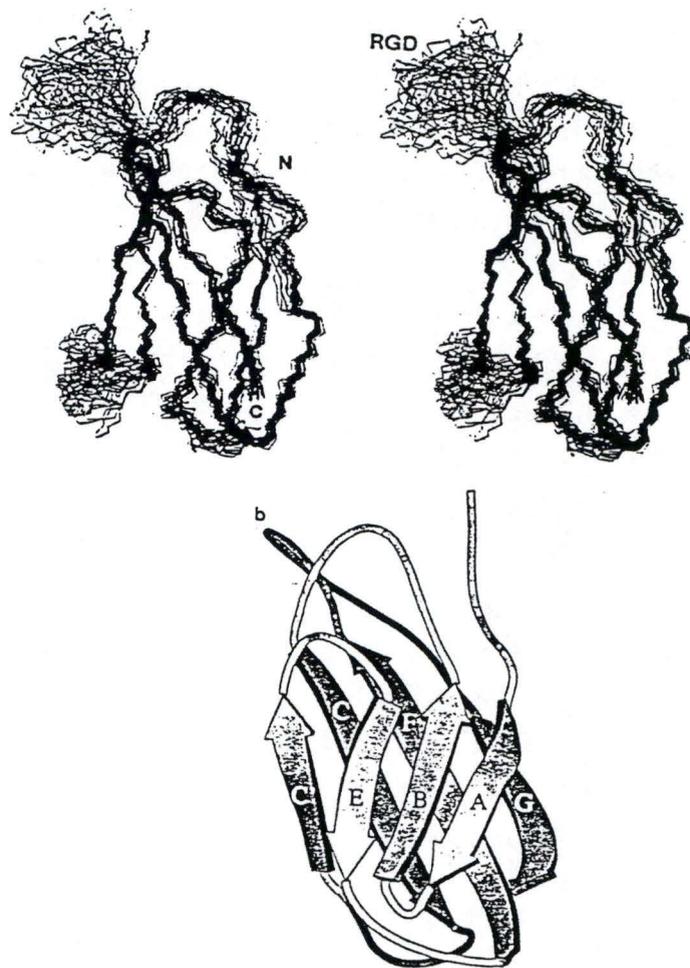


Figure I.21. : Structure du dixième module de type III de la FN (d'après Kühn et Eble, 1994 et d'après Main *et al.*, 1992).

Ainsi, RGD semble constituer les résidus essentiels pour l'activité. Ils constituent l'unité fonctionnelle minimale (D'Souza *et al.*, 1991). Rappelons que ce motif RGD sur la FN est reconnu spécifiquement par les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est un récepteur spécifique de la FN, tandis que l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ reconnaît également la laminine et les collagènes. Ces deux intégrines sont largement distribuées dans l'organisme. Enfin, il existe sur la FN un second site d'adhérence cellulaire RGD-indépendant, reconnu par l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (figure I.9.).

Pour démontrer l'efficacité de la séquence RGD dans l'adhérence cellulaire, divers auteurs ont testé des peptides synthétiques sur cette adhérence. Si des peptides RGD synthétiques sont greffés sur un polymère, ils sont capables de promouvoir l'adhérence cellulaire, grâce à la reconnaissance de ce peptide par les intégrines. Par contre, mis en solution en présence des cellules, ils peuvent en inhiber l'adhérence à un support, préalablement reconditionné par une protéine de la MEC, contenant le motif RGD. En effet, les peptides RGD solubles peuvent entrer en compétition avec les motifs RGD présents dans les protéines de la MEC pour leur liaison aux intégrines et inhiber ainsi l'adhérence (Hynes, 1992).

Main *et al.* (1992) ont mis en évidence la structure du dixième module de type III de la FN, obtenue par les techniques de RMN. Ce module est constitué de 7 brins β formant 2 feuillets β anti-parallèles, l'un contient les 3 brins (A,B,E) et l'autre les 4 brins C, C', F et G. Ces auteurs ont localisé le motif RGD au niveau d'une boucle, située entre les brins G et F (figure I.21.). Le statut fonctionnel du motif RGD dans une protéine dépend de l'accessibilité de cette séquence dans la conformation globale de la molécule. On comprend dès lors que la reconnaissance du motif RGD par les intégrines peut être modulée par la nature des acides aminés adjacents.

Des expériences réalisées par Hirano *et al.* (1991) ont montré que des peptides **RGDX**, greffés sur un polymère avaient un effet pro-adhésif supérieur à des peptides RGD, également greffés sur ce polymère. De même, en solution, le térapeptide **RGDX** semble plus efficace que le tripeptide RGD. Il en ressort donc que la nature de l'acide aminé flanquant a de l'importance. Il semblerait que la valine soit l'acide aminé le plus actif pour médier l'adhérence cellulaire (Hirano *et al.*, 1991). Cette séquence **RGDV** se retrouve dans la vitronectine.

Chen et Hawiger (1991) ont testé des peptides analogues des sites d'adhérence cellulaire de la FN, de la vitronectine, du facteur de Von Willebrand et de la chaîne α du fibrinogène sur leur pouvoir à détacher les cellules endothéliales de veine ombilicale

humaine (HUVEC) adhérentes à des protéines de la MEC in vitro. Seuls les peptides contenant le motif RGD ont été capables d'interférer avec l'adhérence de ces cellules sur des surfaces reconditionnées avec des constituants de la MEC. Le peptide homologue de l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne γ du fibrinogène (HHLGGAKQAGDV) n'affecte pas l'adhérence des cellules endothéliales. Cette séquence ne se retrouve pas dans d'autres protéines pro-adhésives. Elle interagit directement avec les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et a été identifiée comme le domaine de reconnaissance des plaquettes. On le nomme peptide γ 400-411. L'ancrage des cellules endothéliales à la MEC est possible grâce aux peptides possédant le motif RGD alors que HHLGGAKQAGDV n'est pas réactif. Les peptides hybrides (AKQRGDF et KQRGDF) contenant le motif RGD de la chaîne α et le motif 400-411 γ de la chaîne γ semblent avoir des effets intermédiaires.

Le motif RGD joue également un rôle dans les interactions collagènes-intégrines, mais son importance varie considérablement selon le type de collagène, la nature de la chaîne α et le degré de dénaturation des collagènes.

RGD se retrouve plusieurs fois dans les segments hélicoïdaux des chaînes de collagène de type VI. Cependant, Aumailley *et al.* (1989) ont montré que certaines cellules telles que HT-1080 et B16F10, provenant respectivement d'un fibrosarcome humain et d'un mélanome de souris, se lient à un support reconditionné avec des chaînes $\alpha_3(\text{VI})$ ou $\alpha_2(\text{VI})$ mais ne se lient pas à la chaîne $\alpha_1(\text{VI})$. $\alpha_3(\text{VI})$ possède la plus haute activité. Des séquences de liaison cellulaire à la vitronectine (RGDV) et à la fibronectine (RGDS) sont présentes dans les chaînes $\alpha_2(\text{VI})$ et/ou $\alpha_3(\text{VI})$ avec en plus un regroupement de 3 RGD sur 20 résidus de la chaîne $\alpha_3(\text{VI})$. Davis (1992) a montré que des sites RGD sont présents dans le collagène de type I, mais masqués et qu'ils ne deviennent exposés qu'après une dénaturation de la molécule. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se liant à RGD interagit fortement avec le collagène dénaturé de type I et faiblement avec la molécule native. L'adhésion de cellules de mélanome au collagène dénaturé est dépendante de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de RGD tandis que l'adhésion au collagène natif n'est dépendante ni de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ni du motif RGD.

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le premier chapitre de l'introduction, les cellules adhèrent aux protéines de la MEC via des récepteurs de surface cellulaire. Ces récepteurs reconnaissent de façon spécifique des séquences présentes dans leurs ligands tels que la FN, la vitronectine et d'autres protéines de la MEC. Parmi toutes les séquences peptidiques pro-adhésives, c'est le motif RGD qui est le plus commun. Chaque intégrine a néanmoins une spécificité différente vis-à-vis des protéines contenant le motif RGD. Deux explications sont envisageables. La première est que, alors que le motif RGD est

RGD recognition		Non-RGD recognition	
Integrin receptor	Key ligands	Integrin receptor	Key ligands
$\alpha_3\beta_1$	Fibronectin	$\alpha_1\beta_1$	Collagen
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	$\alpha_2\beta_1$	Collagen Laminin
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectin	$\alpha_3\beta_1$	Collagen Laminin
$\alpha_M\beta_2$	C3bi Leishmania Fibrinogen	$\alpha_4\beta_1$	Fibronectin VCAM
$\alpha_{11b}\beta_3$	Fibronectin von Willebrand factor Vitronectin	$\alpha_6\beta_1$	Laminin
$\alpha_v\beta_3$	Fibrinogen Fibronectin von Willebrand factor Vitronectin	$\alpha_1\beta_2$	ICAM-1 ICAM-2
$\alpha_v\beta_5$	Vitronectin	$\alpha_M\beta_2$	Factor X Fibrinogen
$\alpha_v\beta_b^a$	Fibronectin	$\alpha_6\beta_4$	ICAM-1 ?

Tableau I.4. : Classification des intégrines basée sur la reconnaissance de la séquence RGD (d'après D'Souza *et al.*, 1991).

important pour l'interaction récepteur-ligand, d'autres sites de liaison sont nécessaires pour stabiliser cette interaction. Ces derniers sites détermineraient la spécificité de l'intégrine pour son ligand. La deuxième explication est que la séquence RGD présente différentes conformations dans différentes protéines. Ces conformations seraient reconnues sélectivement par les intégrines (Pytela *et al.*, 1987).

Enfin, on sait qu'une même intégrine exprimée dans deux types cellulaires différents, ne présente pas toujours la même affinité pour un constituant donné de la MEC.

Notons également que certaines intégrines reconnaissent leur ligand par d'autres motifs que RGD. Cela ne les empêche pas de promouvoir l'adhérence cellulaire (tableau I.4.) (Humphries, 1992).

En résumé, les peptides contenant le motif RGD constituent l'une des approches possibles pour imiter les constituants de la matrice extracellulaire, sans exclure d'autres motifs peptidiques. Il est clair cependant que cette approche s'applique préférentiellement à certains constituants de la MEC, dont la FN et à certaines intégrines (dont $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$) et que l'environnement du motif RGD et sa conformation, seront essentiels pour conférer aux peptides RGD, une activité biologique significative.

4. Les peptides cycliques RGD

Comme nous l'avons déjà évoqué auparavant, le motif RGD se trouve dans une boucle dans la FN (figure I.21.). Ainsi, Pierschbacher et Ruoslahti (1987) ont eu l'idée de synthétiser des peptides cycliques analogues au peptide RGD. En effet, il semble que les peptides linéaires aient une faible affinité pour les intégrines. Cette faible affinité peut s'expliquer par un haut niveau de flexibilité. Ainsi, en cyclisant le peptide, on le contraint à une seule conformation et on pourrait donc en principe améliorer son affinité pour l'intégrine. Ces auteurs ont testé en solution la séquence G-c(Pen-GRGDSPC)-A pour sa capacité à inhiber l'adhérence cellulaire sur un support conditionné. Ils ont remarqué que cette séquence inhibe plus l'adhérence cellulaire sur la vitronectine que son équivalent linéaire. Par contre, ce peptide n'a eu aucun effet sur l'adhérence FN-dépendante. La cyclisation du peptide permet donc pour un type de récepteur ou intégrine donné, d'augmenter l'activité biologique du peptide, mais aussi d'augmenter la sélectivité de son activité vis-à-vis de plusieurs intégrines.

D'autres peptides cycliques et divers types cellulaires ont été testés sur des supports tels que la FN, laminine, ... Toutes ces expériences montrent que les peptides cycliques sont plus efficaces que leur équivalent linéaire. Par exemple, le peptide c(**GRGDSPA**) interfère fortement avec l'adhérence cellulaire sur des supports reconditionnés à la FN et à la vitronectine. Ceci s'explique par le fait que ces peptides miment beaucoup mieux la structure de ces séquences dans les protéines natives (Kumagai *et al.*, 1991 et Gurrath *et al.*, 1992).

Une restriction conformationnelle favorise la liaison au récepteur si la conformation biologiquement active est incluse dans cet espace conformationnel. Une réduction drastique de cet espace dans des peptides est possible grâce à une cyclisation du squelette peptidique. Un tel peptide contraint indique une structure plus favorable à la liaison au récepteur que son correspondant linéaire et flexible. Gurrath *et al.* (1992) ont également établi que les cycles à 5 acides aminés étaient plus actifs que les cycles à 6 acides aminés. Le contrôle conformationnel peut être affiné par l'introduction d'un résidu dextrogyre et/ou d'une proline dans le peptide cyclique. En effet, la chaîne à 5 carbones de la proline, cyclisée en noyau pyrrolidone, exerce une contrainte sur la géométrie du squelette peptidique qui la contient, créant parfois de brusques changements de direction dans sa conformation. La conversion d'un acide aminé lévogyre en un acide aminé dextrogyre dans un peptide cyclique le conduit à un peptide biologiquement inactif alors que, dans un peptide linéaire et flexible, une réorientation des chaînes latérales restent possibles via des torsions du squelette peptidique, ce qui permet de rapprocher certains acides aminés. Une substitution d'acides aminés a également un effet sur l'activité biologique du peptide. En effet, il est clair que les résidus précédant l'arginine, dans la séquence RGD, sont de moindre importance que les résidus suivants. Ainsi, on peut modifier l'effet inhibiteur d'un peptide en solution sur l'adhérence cellulaire en jouant sur la nature de ces acides aminés (Gurrath *et al.*, 1992).

Si les peptides cycliques RGD ont fait leurs preuves dans des modèles d'adhérence cellulaire en culture, ils suscitent également beaucoup d'intérêts pour leur application potentielle *in vivo*. Le système d'adhérence via le motif RGD semble en effet jouer un rôle dans des phénomènes aussi diversifiés que la formation de métastases tumorales, l'agrégation plaquettaire, et la relation hôte-parasite (Finlay, 1990).

Par exemple, Kumagai *et al.* (1991) ont montré l'effet du peptide cyclique **GRGDSPA** sur les métastases pulmonaires. Ils constatèrent en effet que l'injection simultanée de ce peptide avec des cellules tumorales dans des souris réduisait la formation de centres métastatiques à la surface du poumon. Puisque ces peptides peuvent

TABLE

Antithrombotic Strategies for Resistant Thrombosis

- Interruption of platelet reactivity
 - a. Inhibitors of platelet adhesion
 - b. Inhibitors of platelet recruitment
 - c. Inhibitors of the platelet thrombin receptor
 - d. Orally active inhibitors of platelet recruitment
 - Direct inactivation of thrombin
 - a. Natural antithrombin polypeptides
 - b. Synthetic antithrombin peptides
 - Inhibition of thrombin production
 - a. Activated Protein C
 - b. Protein and peptide inhibitors of fXa
 - c. Inhibitors of tissue factor pathway
 - Impairment of vascular wall thrombogenicity
 - a. Dietary n-3 fatty acids
-

Tableau I.5. : Stratégies thérapeutiques pour les processus thrombotiques (Harker, 1994).

contrecarrer l'invasion des cellules tumorales, des potentialités thérapeutiques peuvent être envisageables dans des maladies associées à des dérégulations au niveau de l'adhérence cellulaire.

Nous pouvons également évoquer un autre champ d'application qui est la stratégie anti-thrombotique (Harker, 1994). Normalement, le sang n'interagit pas avec l'endothélium vasculaire mais s'il y a une blessure vasculaire, les plaquettes et les facteurs de coagulation interagissent rapidement avec les constituants sous-endothéliaux pour former un thrombus. Différentes stratégies thérapeutiques sont admises pour les processus thrombotiques (tableau I.5.). Les peptides RGD interviennent comme inhibiteurs de regroupement plaquettaire dépendant de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (jadis appelée $GP_{IIb/IIIa}$). Le recrutement plaquettaire implique l'activation des plaquettes par des agonistes dérivés de la coagulation et des plaquettes activées et, est dépendante de l'expression de récepteurs fonctionnels pour le fibrinogène, le facteur de von Willebrand, la FN, la vitronectine et la thrombospondine. Le fibrinogène est le ligand le plus important parce qu'il est présent à forte concentration dans le plasma. Le motif RGD sert de séquence de reconnaissance pour l'intégrine dans des protéines adhésives interagissant avec ce récepteur. Le fibrinogène se lie également à $\alpha_{IIb}\beta_3$ via un dodécapeptide carboxy-terminal de chaque chaîne γ . Ce peptide ne contient pas la séquence RGD mais une séquence apparentée : LAGD. Le regroupement plaquettaire est inhibé par des anticorps monoclonaux anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$, par des peptides naturels provenant de venin de serpents contenant RGD ou la séquence dodécapeptidique et par des peptides synthétiques.

Des peptides cycliques contenant d'autres motifs que le motif RGD sont également à l'étude. Par exemple, la firme Texas Biotechnology essaie de développer un peptide cyclique inhibiteur de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$. Celle-ci lie la FN et la protéine d'adhésion VCAM-1 de manière RGD indépendante. Ce peptide est envisagé pour le traitement de maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, mais aussi l'asthme (Genetic Engineering News, Nov 95).

Enfin, les peptides RGD et apparentés, qu'ils soient linéaires ou cycliques, suscitent beaucoup d'intérêts dans le domaine des biomatériaux, qu'ils soient à usage médical (sous forme d'implants chirurgicaux) ou à applications biotechnologiques, dans le cadre des bioréacteurs prévus pour la culture de cellules. Dans le chapitre suivant, nous évoquerons les biomatériaux et leur biocompatibilité, ainsi que le rôle que peuvent jouer des peptides tels que les peptides RGD, pour ce dernier aspect.

A	Implants	Exemples
1	cardio-vasculaires	- valves cardiaques - pacemakers - prothèses vasculaires
2	orthopédiques	+ prothèses de la hanche - prothèses du genou - plaques et vis
3	ophtalmologiques	- implants intra-oculaires - lentilles cornéennes
4	divers	- implants dentaires - prothèses mammaires - prothèses du pénis - sutures
B	Suppléances extracorporelles	Exemples
		- oxygénateurs (membranes) - hémodialyseurs (membranes) - tubes pour circulations extracorporelles diverses - cathéters - poches à sang - pansements pour blessures et brûlures

Tableau I.6. : Applications des biomatériaux en ingénierie médicale (d'après Marchand-Brynaert, 1996).

	Matériaux	Exemples
1	métaux	aciers inoxydables, alliages à base de cobalt ou de titane, or...
2	céramiques	oxyde d'aluminium, verres, hydroxyapatite, carbone...
3	composites	matériaux (métaux, polymères...) recouverts de céramiques ou associés à des fibres de carbone
4	matériaux biologiques	peau et valves cardiaques de porcins, artères de bovins, boyaux d'ovins, autogreffes, allogreffes, ...
5	polymères d'origine naturelle	collagène, cellulose, gélatine, dextran...
	polymères de synthèse	silicones, téflon, polyuréthanes, polyacryliques, polyglycoliques, ...

Tableau I.7. Différentes classes des biomatériaux (d'après Marchand-Brynaert, 1996).

5. Les biomatériaux et leurs modifications

5.1. Définition et applications principales

Un biomatériau est, par définition, destiné à entrer en contact direct avec le "vivant" (Piskin, 1992). Le contact avec le vivant peut être permanent (cas des prothèses, implants, ...) ou temporaire (pansements, cathéters, ...). Les biomatériaux peuvent être stables ou plus ou moins dégradables. Ces applications concernent tout d'abord l'ingénierie médicale, comme résumé dans la table I.6. : il s'agit principalement d'implants de diverses sortes (prothèses mammaires, greffes vasculaires, intra-oculaires ...), et de matériaux impliqués dans les suppléances extracorporelles (canules, endoscopes, cathéters, membranes d'hémodialyse, ...). Deuxièmement, les biomatériaux sont déjà largement utilisés dans le domaine de la biotechnologie, qu'il s'agisse de systèmes diagnostiques, de systèmes de filtration, ou de supports pour la culture cellulaire. Enfin, les biomatériaux présentent également des potentialités dans le domaine thérapeutique, sous la forme de système de délivrance de médicaments, principalement.

Les biomatériaux sont généralement classés en 5 classes, sur base de leurs propriétés physico-chimiques (pour revue, voir Marchand-Brynaert, 1996) : les métaux, les céramiques, les composites et les polymères comme renseigné dans la table I.7.

Dans ce travail, nous nous limiterons aux polymères et à leurs modifications de surface. Ils constituent actuellement la classe la plus importante des biomatériaux. Leur avantage majeur est la grande diversité de formes sous lesquelles ils peuvent être préparés, vu leur chimie particulière, ce qui explique que leur champ d'application est extrêmement diversifié comme illustré à la table I.8. Ces biomatériaux présentent donc une large variété de propriétés et peuvent voir leur forme et leur taille modifiées suivant l'application désirée.

5.2. Biocompatibilité

L'organisme vivant in vivo et la cellule in vitro sont des systèmes hautement complexes : de nombreuses réactions peuvent se produire au niveau de l'interface du biomatériau avec le système biologique (figure I.22.). La biocompatibilité intègre toutes les réponses de l'organisme envers le biomatériau. Un biomatériau se dit biocompatible si -lorsqu'il est en contact avec un milieu biologique donné, - il n'entraîne aucune réaction non souhaitée, voire néfaste, telle que les réactions inflammatoires ou allergiques, la

	Formes	Applications
1	objets moulés	- implants pour tissus durs - implants pour tissus mous
2	fibres et tissus	- sutures, fixations d'implants - pansements - implants vasculaires
3	tubes	- cathéters - circulations extracorporelles
4	microsphères	- vectorisation et délivrance de médicaments, de sondes diagnostiques
5	membranes	- hémodialyseurs - oxygénateurs - encapsulation de drogues - filtrations - support de cultures cellulaires
6	gels (ou formes solubles)	- formulation de pro-drogues - système de délivrance de médicaments
7	recouvrement (d'un autre matériau)	- pacemakers - pompes implantables pour la délivrance de drogues

Tableau I.8. Différentes formes des biomatériaux polymériques (d'après Marchand-Brynaert, 1996).

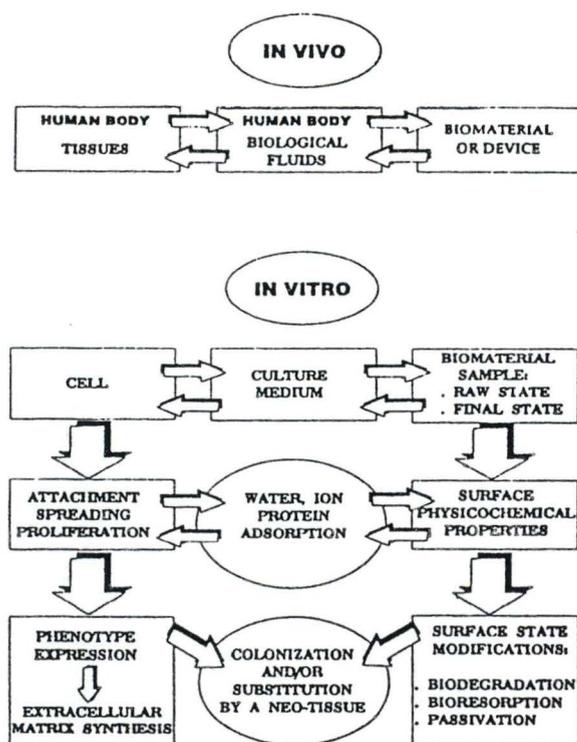


Figure I.22. : Interactions entre cellules et biomatériaux (d'après Harmand, 1992).

formation d'un thrombus, ou à plus long terme un processus de carcinogenèse. Des matériaux non biocompatibles peuvent causer d'importants problèmes tels que l'embolie, la nécrose tissulaire et le cancer (Piskin, 1992).

La réponse du milieu biologique au biomatériau dépend essentiellement des propriétés physico-chimiques de celui-ci. Il est donc capital de commencer par étudier le polymère afin d'en connaître ses caractéristiques. On distingue pour cela, les propriétés de surface et les propriétés de masse. Les propriétés de surface telles que l'hydrophobicité, les charges, l'hétérogénéité dans la distribution de groupements fonctionnels, ... semblent être très importantes puisque l'adhérence et la prolifération de certains types cellulaires sur des biomatériaux polymériques en dépendent. Les propriétés de masse jouent aussi un rôle primordial lorsque le biomatériau est implanté directement dans le tissu vivant (comme pour les vaisseaux sanguins, les os). En effet, s'il existe, par exemple, une trop grande différence de rigidité entre le polymère et le tissu adjacent, l'hyperplasie va prévaloir, entraînant l'échec de l'implantation (Ikada, 1994).

On distingue également la biocompatibilité passive et active. On parle de biocompatibilité passive, lorsque le biomatériau se comporte comme un objet étranger inerte et non toxique, ce qui est rarement le cas. On parle de biocompatibilité active, si le biomatériau induit une réponse "naturelle". Par exemple, si on envisage l'adhérence cellulaire, la biocompatibilité active sera positive, si le matériau favorise l'adhérence cellulaire, ce qui est souhaitable dans certains types de pansements par exemple. Mais elle peut être négative, si le biomatériau est au contraire réfractaire à l'adhérence cellulaire, ce qui est souhaitable dans le cas des lentilles oculaires, par exemple. La définition de la biocompatibilité n'est donc pas simple et variera encore une fois selon les applications et la destination du biomatériau.

Enfin, l'un des aspects les plus importants de la biocompatibilité est tout ce qui concerne le contact avec le milieu sanguin. On parle alors d'hémobiocompatibilité. Les biomatériaux qui entrent en contact direct avec le sang sont utilisés soit à court terme (quelques heures), soit à long terme (quelques jours ou semaines). Dans ces deux cas, l'administration simultanée d'héparine ou l'immobilisation d'enzymes fibrolytiques en surface du polymère permettent à ce dernier d'être accepté par le tissu hôte. En ce qui concerne les surfaces polymériques qui doivent rester en permanence en contact avec le sang (coeur artificiel, implants vasculaires), aucune méthode réellement effective n'a encore été développée à ce jour (Ikada, 1994). Des greffons vasculaires synthétiques sont fortement utilisés afin de remplacer ou de ponter des segments artériels. L'occlusion thrombotique est le problème majeur dans ce type de greffon. Elle est évitée par

<i>Proteins</i>	<i>Drugs</i>
Enzymes	Antithrombogenic agents
Antibodies	Anticancer agents
Antigens	Antibiotics
	Contraceptives
<i>Saccharides</i>	Drug antagonists
Sugar	Peptide, protein drugs
Oligosaccharides	
Polysaccharides	<i>Ligands</i>
	Hormone receptors
<i>Others</i>	Cell surface receptors
Phospholipids	Avidin, biotin
DNA, RNA,...	

Tableau I.9. Exemples de molécules biologiquement actives qui peuvent être immobilisées sur ou dans des biomatériaux polymériques (Hoffman, 1992).

l'administration orale d'anti-coagulants, on l'attribue à l'absence d'endothélium à la surface du greffon. L'endothélium est en effet la "base" naturelle et bioactive des vaisseaux sanguins. On tente donc d'améliorer la colonisation de ces greffons par les cellules endothéliales endogènes, en modifiant les propriétés de surface des biomatériaux, par exemple via des molécules adhésives telles que la fibronectine (Piskin, 1992).

En résumé, il est très rare qu'un biomatériau possède d'excellentes propriétés aussi bien au niveau de sa masse que de sa surface. C'est la raison pour laquelle les modifications de surface des polymères sont de plus en plus proposées pour mieux cibler leurs applications (Ikada, 1994). En outre, ces modifications de surface permettent d'imaginer non seulement des biomatériaux biocompatibles, mais également bioactifs, c'est-à-dire capables d'induire préférentiellement une réponse cellulaire et/ou tissulaire donnée.

6. Modification de polymères - exemple du polystyrène

Les polymères peuvent être modifiés physiquement, chimiquement ou biochimiquement. Ainsi, de nombreuses molécules biologiquement actives (comme par exemple des polypeptides et protéines, des antigènes, des acides nucléiques) (table I.9.) ainsi qu'une grande variété de cellules peuvent être immobilisées sur des supports polymériques (Piskin, 1992). Ces approches, en créant des interfaces biomatériaux-système biologique qui sont plus proches de la réalité, peuvent être également exploitées pour améliorer la biocompatibilité du biomatériau et pour les rendre éventuellement bioactifs.

6.1. Adsorption

L'adsorption passive fait intervenir les interactions hydrophobes entre la phase solide et les molécules de la phase liquide. La force de ce type de liaison dépend des sites d'interaction possibles entre les molécules et la phase solide. Ainsi, de grosses molécules avec de nombreux sites de liaison potentiels s'adsorbent mieux et avec une plus grande stabilité que de petites molécules avec une faible affinité pour ces interactions hydrophobes (Rasmussen, 1990). En culture de cellules, il est classique d'adsorber la fibronectine, les collagènes et la gélatine, pour améliorer l'adhérence cellulaire.

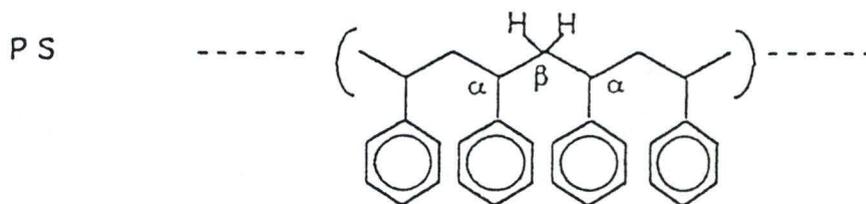


Figure I.23. : Structure du polystyrène (d'après Zammatteo *et al.*, 1996).

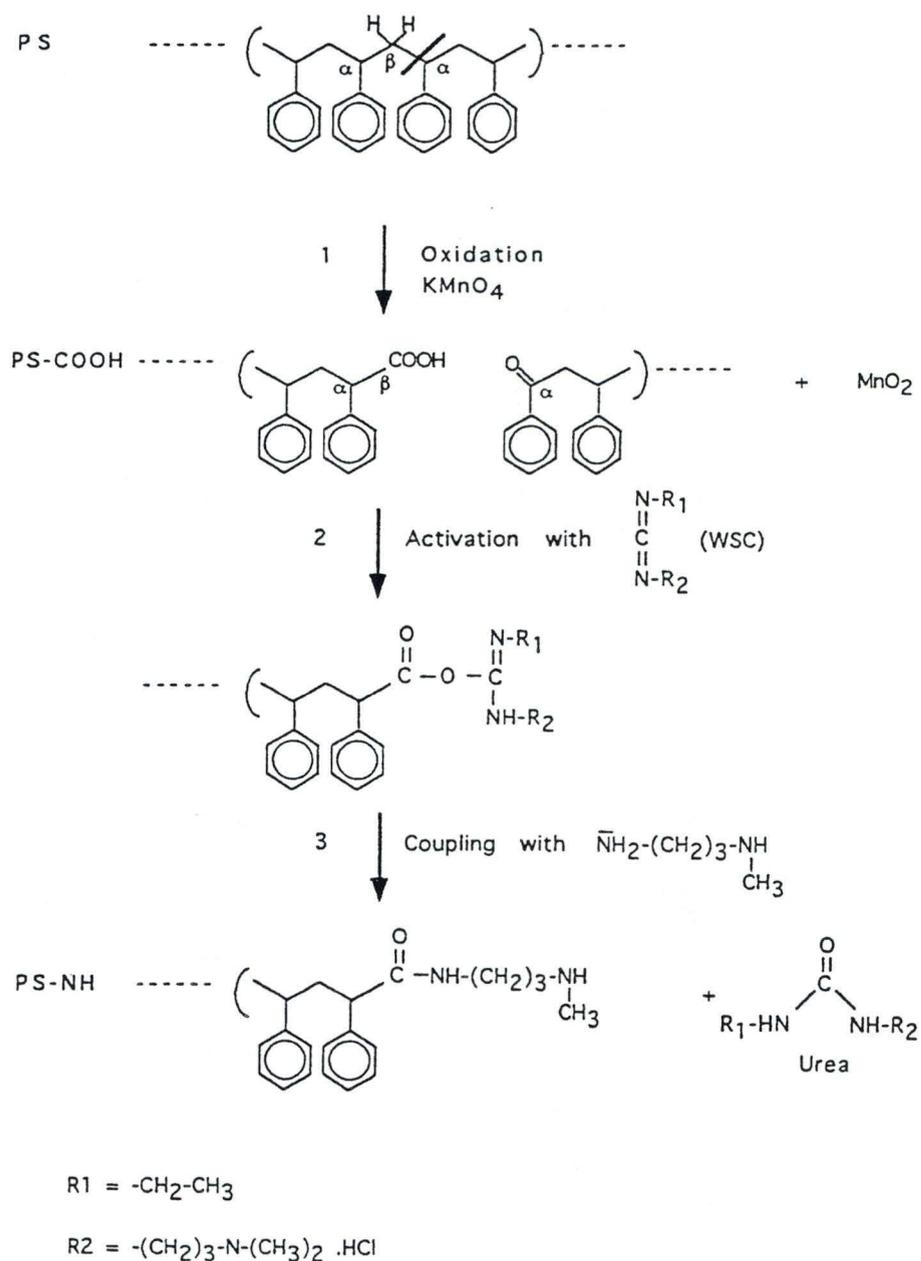


Figure I.24. : Etapes de fonctionnalisation du PS (d'après Zammatteo *et al.*, 1996).

6.2. Couplage covalent de biomolécules en général

On peut également envisager une liaison chimique d'une molécule intéressante, sur le matériau polymérique. Cette approche suppose plusieurs étapes successives.

1. *La fonctionnalisation* : En premier lieu, il est nécessaire de modifier préalablement la surface du polymère afin d'y incorporer des groupes fonctionnels qui pourront servir, par la suite, de site de fixation pour une molécule active. Il existe actuellement une grande variété de techniques permettant de modifier les surfaces polymériques selon les applications biologiques que l'on souhaite y développer ultérieurement. Au laboratoire, nous nous sommes surtout focalisés sur les méthodes de modifications de surface par voie chimique afin d'introduire des fonctions nouvelles sur le polystyrène, dont la formule chimique est donnée à la figure I.23.

Le polystyrène (PS) est très largement utilisé comme support dans les cultures cellulaires de par sa transparence optique, sa durabilité, son faible coût, ... La surface du PS peut être modifiée afin d'améliorer l'hydrophilicité du matériau ou d'y introduire des fonctions spécifiques. La méthode de fonctionnalisation développée au laboratoire permet d'incorporer des amines en surface du polystyrène et se déroule en deux étapes (figure I.24.). Le PS est tout d'abord oxydé par le permanganate de potassium suivant la méthode décrite par Marchand-Brynaert *et al.* (1995) pour le poly(éthylène téréphtalate). Les groupements carboxyliques créés sont alors activés avec la carbodiimide (CDI) et couplés à une diamine, comme détaillé plus loin dans le travail.

Une autre technique utilise les traitements par plasmas froids. Ce traitement, provoqué par ionisation de l'air lors d'une décharge électrique entre deux électrodes, permet d'introduire des fonctions oxygénées en surface. Les plasmas froids sont des gaz ionisés générés à basse pression entre deux électrodes. Un plasma à l'ammoniac par exemple permet d'introduire des fonctions azotées en surface (Marchand-Brynaert *et al.*, 1995).

Une technique faisant appel aux radiations électromagnétiques est utilisée pour greffer des amines secondaires sur des plaques de polystyrène. Ces plaques sont disponibles commercialement sous le nom de COVALINK-NH (NUNC, Roskilde, Danemark). Cette méthode est basée sur le fait que des composés polycycliques possédant des groupements fonctionnels à leur surface soient photo-sensibles. Ainsi, ils peuvent se lier à différents polymères s'ils sont exposés à des radiations électromagnétiques sous certaines conditions (Gluetech, WO Patent 8905329). D'autres méthodes telles que la

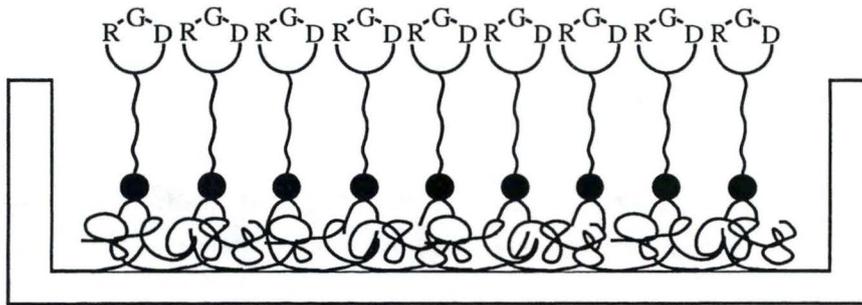


Figure I.25. : Adsorption de la BSA sur le polystyrène, suivie du couplage covalent d'un peptide RGD cyclique via bras d'ancrage.

nitration (Chin *et al.*, 1977), l'irradiation γ (Varga *et al.*, 1990) sont possibles pour introduire des fonctions amines sur le PS.

2. *Le couplage* : Après l'étape d'amination, différentes molécules bioactives peuvent être couplées telles que des peptides, des acides nucléiques et oligonucléotides en particulier, ... Rasmussen (1990) a montré qu'un peptide couplé, via la CDI, aux amines secondaires des plaques COVALINK rendait ce peptide plus accessible que lorsqu'il était adsorbé sur du PS ayant subi une irradiation γ . Zammateo *et al.* (1996) ont, quant à eux, réussi à greffer de façon covalente des sondes de DNA pouvant être utilisées dans des tests d'hybridation.

7. Objectifs

Le but du mémoire est d'évaluer dans quelle mesure des peptides contenant le motif RGD présent au niveau de molécules de la matrice extracellulaire, sont capables de reproduire des effets d'un constituant particulier de la MEC, la fibronectine.

Les peptides ont été synthétisés sous diverses formes, linéaires ou cycliques, et avec éventuellement un bras d'ancrage permettant leur greffage ultérieurement sur une protéine porteuse ou un polymère.

Nous avons tout d'abord testé des peptides linéaires, cycliques et cycliques munis d'un bras d'ancrage, en solution afin de vérifier leur effet inhibiteur sur l'adhérence des cellules sur la fibronectine.

Ensuite, nous avons voulu vérifier si ces peptides RGD étaient capables d'exercer des effets pro-adhésifs comparables à ceux obtenus pour la FN. Dans ce but, nous avons choisi de tester les peptides après les avoir greffés sur une protéine considérée comme peu favorable à l'adhérence cellulaire, l'albumine de sérum bovin (BSA). En outre, cette protéine anti-adhésive s'adsorbe facilement sur du polystyrène, et est disponible commercialement. Nous avons utilisé deux stratégies différentes de greffage : l'une se faisant sur de la BSA en solution et l'autre se faisant de la BSA adsorbée au fond des puits d'une plaque en polystyrène (figure I.25.). Nous avons choisi ces types de greffage pour mieux mettre en évidence l'activité biologique du peptide. Par cette approche, nous verrons qu'il est possible par greffage de peptides, de rendre la BSA pro-adhésive au même titre que la FN, ce qui confirme bien l'activité biologique des peptides RGD.

Dans la dernière partie du mémoire, nous avons évalué l'activité biologique des peptides RGD en étudiant non plus les effets sur l'adhérence mais sur la transduction du signal liée aux intégrines, récepteurs impliqués entre autre dans la reconnaissance MEC-cellules. Encore une fois, nous constaterons que les peptides RGD sont capables d'activer une kinase, la pp125^{FAK}, de manière comparable à la FN, au niveau des plaques d'adhérence.

**MATERIELS ET
METHODES**

1. Culture de cellules

1.1. Cellules endothéliales

1.1.1. Mise en culture

1.1.1.A. Matériels

- Solution de récolte, pour la conservation des cordons ombilicaux, à pH 7,36 et composée de:

*KCl 4 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

*NaCl 140 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

*Hépes 10 mM (Janssen-Chimica, Geel, Belgique)

*D-glucose 1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne)

*Streptomycine 100 µg/ml (Sigma, St Louis, MO, USA)

*Penicilline 100 U/ml (Sigma)

*Fungizone (Amphotéricine B) 0,25 µg/ml (Sigma)

Cette solution est stérilisée par filtration (pompe péristaltique et filtre Stérivex GV, 0,22 µm, Millipore, Bedford, MD, USA) et stockée à 4°C dans des bouteilles en verre stérilisées pendant 8 heures à 180°C ou autoclavées 20 minutes à 120°C.

- Solution de rinçage (0,15 M en NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM (PBS) à pH 7,4 et stérilisée par filtration. Cette solution contient des antibiotiques et de la fungizone aux mêmes concentrations que la solution de récolte. Elle est stockée à 4°C dans des bouteilles en verre stérilisées.

- Collagénase de Clostridium Histolyticum (type II, Sigma, St Louis, MO, USA) 0,05 % dans du milieu MCDB et stérilisée par filtration (filtre minisart NML, 0,22 µm, Sartorius, Göttingen, Allemagne).

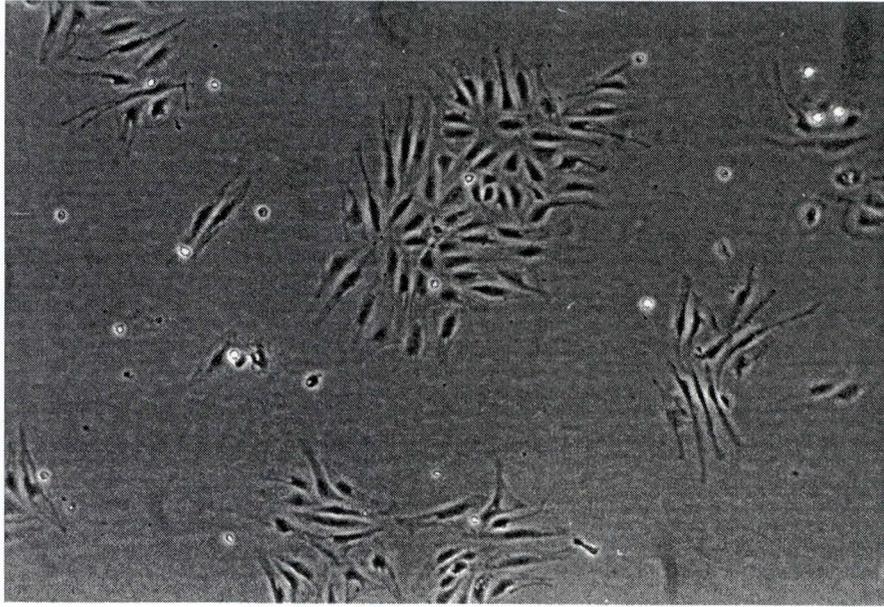
- Gélatine (Merck, Darmstadt, Allemagne) 0,2 % dans de l'eau distillée et stérilisée par filtration.

- Milieu de culture MCDB + glutamine + 20 % Sérum : milieu MCDB (Gibco, Grande-Bretagne) auquel on a ajouté 20 % de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne) et 10 % de glutamine.
- Pots en plastique stérilisés à l'alcool dénaturé pour le stockage des cordons ombilicaux.
- Boîtes de pétri en verre stérilisées.
- Berlins en verre stérilisés.
- Tubes stériles en plastique (Stérilin, Staffordshire, Grande-Bretagne).
- Boîtes de culture T25 (Corning, 25 cm², New-York, USA)
- Seringues de 5, 10 et 50 ml.
- Cathéters.
- Serre-joint.

1.1.1.B. Méthode

Après l'accouchement, les cordons ombilicaux sont stockés dans des pots en plastique contenant 50 ml de solution de récolte et conservés à 4°C. Durant la mise en culture, les cordons sont tout d'abord lavés extérieurement dans 20 ml de solution de rinçage, puis nettoyés avec du papier imbibé d'alcool dénaturé. Ensuite, la veine ombilicale est perfusée avec 30 ml de solution saline. Au moyen d'un système seringue-cathéter, la veine ombilicale est canulée avec 2 serre-joint et incubée avec 4 ou 5 ml de collagénase Sigma de type II (0,05%) pendant 35 minutes à 37° dans une boîte de pétri en verre. Dans ces conditions, les cellules endothéliales sont détachées de la paroi veineuse et récoltées dans du milieu MCDB + glutamine + 20% S dans un berlin. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube stérile et centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne) afin d'éliminer la collagénase. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans 5 ml de MCDB + glutamine + 20% S. Cette suspension est placée dans une boîte de culture T25 préalablement incubée en présence de gélatine (2 ml/T25). Celle-ci constitue en effet un film favorisant l'adhérence et la prolifération des cellules endothéliales.

A



B

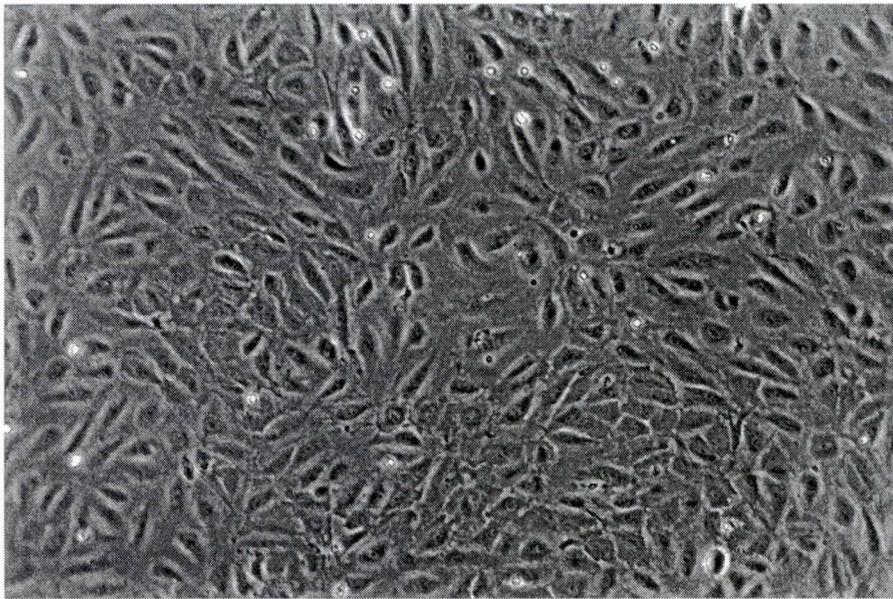


Figure II.1.: Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) subconfluentes en génération 1 après la mise en culture (A), confluence en génération 1, quatre jours après la mise en culture (B) ($\times 115$).

Après 24 heures, les cellules adhérentes sont rincées 2 à 3 fois avec 5 ml de solution de rinçage afin d'éliminer les globules rouges, les cellules mortes et les autres cellules sanguines. Du nouveau milieu (MCDB + glutamine + 20% S) est alors ajouté. Les cellules sont gardées dans l'étuve à 37°C jusqu'à confluence, moment où elles pourront être repiquées (figure II.1.).

1.1.2. Repiquage des cellules

1.1.2.A. Matériels

- Trypsine-EDTA 0,25 % (Gibco, Grande-Bretagne).
- MCDB + glutamine : milieu de culture (Gibco, Grande-Bretagne) auquel on a ajouté 10 % de glutamine.
- MCDB + glutamine + 20 % S : milieu MCDB auquel on a ajouté 20 % de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne) et de la glutamine.
- HAM : milieu de rinçage
- Gélatine 0,2 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Boîtes de culture T75 (Corning, 75 cm², New-York, USA).

NOTE : Les milieux de culture sont conservés à 4°C. La trypsine-EDTA et le sérum sont stockés à -20°C. Tous ces milieux doivent être préchauffés dans l'étuve à 37°C avant leur utilisation.

1.1.2.B. Méthode

Lorsque les cellules arrivent à confluence, soit à une densité approximative de 50.000 cellules/cm² pour les cellules endothéliales, on les repique en 2 ou en 4. Elles sont rincées 2 fois avec 10 ml de milieu HAM ou du milieu MCDB + glutamine seul afin d'éliminer toute trace de sérum. On trypsinise les cellules endothéliales durant 1 à 2 minutes avec 2 ml de trypsine-EDTA. Afin d'accélérer la réaction, on place la boîte de culture dans l'étuve à 37°C. Lorsque les cellules se détachent, on y ajoute 8 ml de milieu

MCDB + glutamine + 20 % S afin d'inhiber la trypsine. La suspension cellulaire est alors centrifugée à 1000 rpm pendant 10 minutes à la centrifugeuse de table (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne) afin d'éliminer la trypsine. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans du milieu MCDB + glutamine + 20% S à raison de 25.000 cellules/cm² pour un repiquage en deux. La nouvelle boîte de culture (T75) aura été incubée au préalable avec 3 ml de gélatine et celle-ci sera décantée avant que les cellules n'y soient transférées.

1.2. Cellules THP-1

1.2.1. Repiquage

1.2.1.A. Matériels

- RPMI + glutamine + 10% sérum : milieu RPMI auquel on a ajouté 10% de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne) et 10 % de glutamine.
- Trypan bleu (T8154, Sigma chemical Co, St Louis, MO, USA).
- Boîte de culture T75 (Corning, New-York, USA).
- Tubes stériles en plastique

1.2.1.B. Méthode

Les THP-1 sont des cellules issues d'une lignée monocyttaire. Elles nous ont été gracieusement données par le Center for Molecular and Vascular Biology, KUL, Leuven. Ces cellules sont cultivées en suspension et gardées dans un milieu RPMI + 10% S jusqu'à une densité maximale de $10 \cdot 10^6$ de cellules/ml, densité à laquelle elles seront repiquées. On compte régulièrement les cellules afin de les repiquer en temps voulu. Lors du repiquage, les cellules vivantes sont comptées grâce au colorant vital Trypan bleu. Seules les cellules mortes apparaissent bleutées. On prélève ensuite le volume nécessaire pour obtenir une concentration finale en cellules de $3 \cdot 10^6$ /ml. Les THP-1 sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne). Après avoir décanté le surnageant, le culot est resuspendu dans du milieu

SEQUENCES PEPTIDIQUES	NOMS ABREGES
Ac-DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH ₂)	P21
Ac-DVRGDβAla-Ahx-Y-NH ₂	P15
Ac-REDV-εAhx-C-NH ₂	P18
c(VRGD _D N)	C8
c[_D VRGDE(-εAhx-Y-C-NH ₂)]	T26
c[DR _D VGE(-εAhx-Y-C-NH ₂)]	T29

Ahx : Acide 6 aminohexanoïque

P : Linéaire

C : Cyclique

T : Tailed

Ac : Acétyl

Tableau II.1. : Peptides utilisés dans les tests cellulaires.

RPMI + glutamine +10% S. Cette suspension est placée dans une nouvelle boîte de culture de 75 cm². On ajoute enfin 5% de CO₂ pour ajuster le pH.

2. Greffage de peptides

2.1. Peptides synthétisés

Ce travail s'inscrit dans le cadre plus général d'un projet financé par la Région Wallonne sur les biomatériaux, projet actuellement terminé. Dans ce projet, différents peptides contenant le motif RGD ont été synthétisés, avec la collaboration de Muriel Art, Edouard Delaive et Dominique Delforge, du Laboratoire de Biochimie et Biologie Cellulaire. Le tableau II.1. reprend les peptides utilisés dans ce travail avec leurs caractéristiques principales.

2.2. Greffage sur BSA

2.2.1. Greffage sur BSA en solution

2.2.1.A. Principe

Pour pouvoir greffer le peptide désiré sur la BSA en solution, celle-ci est tout d'abord activée par un agent de couplage, le sulfo-succinimidyl 4-(N-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate ou Sulfo-SMCC. La réaction se déroule entre le groupement ester du Sulfo-SMCC et les lysines de la BSA. En effet, la liaison covalente s'établit suite à l'attaque nucléophile du carbone de l'ester du Sulfo-SMCC par le doublet libre des NH₂ de la chaîne latérale des lysines. A cette étape-ci, la BSA est activée et est prête à réagir avec le peptide désiré. Celui-ci doit obligatoirement contenir une cystéine terminale puisque c'est par ce dernier acide aminé que le greffage s'effectue.

Le groupement maléimide possède une double liaison pouvant réagir avec le groupement thiol de la cystéine. Le peptide est ainsi greffé de façon covalente à la BSA activée (figure II.2.).

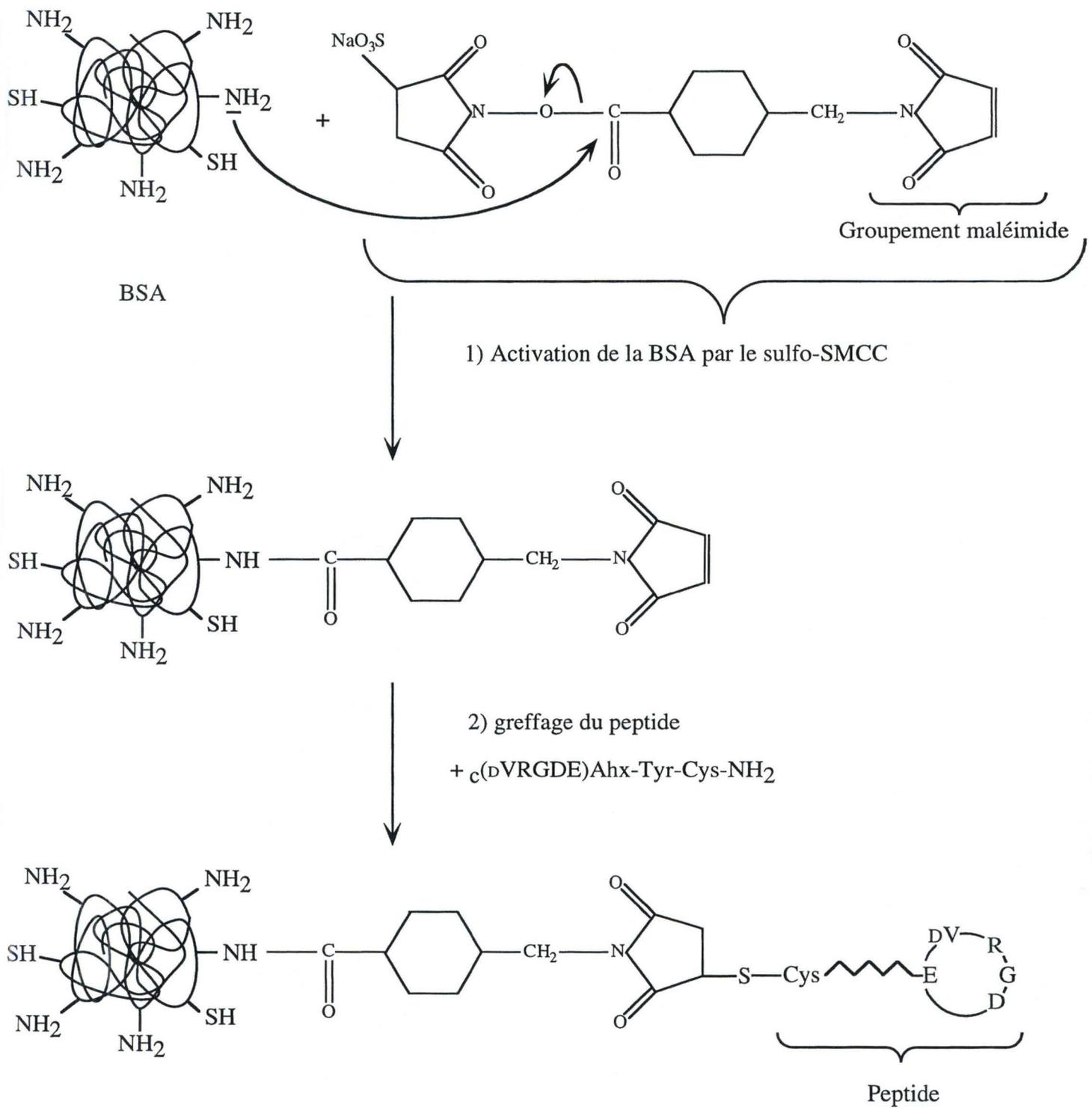


Figure II. 2. : Représentation schématique du greffage d'un peptide RGD muni d'un bras d'ancrage sur de la BSA par l'intermédiaire du Sulfo-SMCC.

2.2.1.B. Matériels

- Albumine de sérum bovin (BSA) : à une concentration de 8 mg par ml de PBS (Sigma Chemical Co, USA).
- Tampon phosphate 100 mM à pH 7,2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Sulfo-succinimidyl 4-(N-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) : à une concentration de 1.8 mg/ml de tampon phosphate 100 mM à pH 7,2. (22322, Pierce Chemical Co, USA).
- Colonne ACA 44 (Tamis moléculaire).
- Solution saline (0,15 M NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM à pH 7,4.
- Amicon PM 10.
- Centricon PM 10
- Dosage de protéines par la méthode du Folin (Lowry, 1951) :
 - * Carbonate de sodium anhydride 2 % (Na_2CO_3 , Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - * Tartrate de potassium sodium tétrahydraté 2 % ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - * Sulfate de cuivre 1 % ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - * NaOH 1N (Merck, Darmstadt, Allemagne).
 - * Folin (1 : 1) dans de l'eau (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Les peptides sont synthétisés au laboratoire par la méthode Fmoc (Atherton et Sheppard, 1989) sur un synthétiseur automatique Millipore (9050 Pepsynthetizer) suivant un protocole mis au point au Laboratoire (Delforge et al., 1996 a et b). Les séquences qui ont été greffées sur la BSA en solution sont :

c[_DVRGDE(-εAhx-Y-C-NH₂)] (T26).

Ac-_DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH₂) (P21).

2.2.1.C. Méthode

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le principe (voir le point 2.1.1.A. des matériels et méthodes), la première partie de l'expérience consiste en l'activation de la BSA par le Sulfo-SMCC. Pour ce faire, l'albumine est dissoute à une concentration finale de 8 mg/ml dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,2. Cette solution est alors incubée durant une heure à température ambiante en présence du Sulfo-SMCC à une concentration finale de 1,8 mg/ml. Par après, la solution est passée sur colonne ACA 44 (Tamis moléculaire) afin d'éliminer le Sulfo-SMCC qui n'aurait pas réagi. Après un temps de rétention de 25 minutes, le pic du conjugué BSA-Sulfo-SMCC est détecté à une longueur d'onde de 280 nm grâce à un spectrophotomètre UVICON 930 (figure II.3.A). On récupère ainsi le conjugué formé et on dose les protéines par la méthode du Folin afin de connaître le rendement de l'activation. On reconcentre le tout jusqu'à 1 mg/ml en amicon 10 PM.

Ensuite, on incube la BSA activée en présence du peptide désiré (ou de la cystéine utilisée dans les tests cellulaires comme contrôle), dont la concentration est de 1,6 mg/ml , pendant toute une nuit à température ambiante.

Le lendemain, la solution subit un dessalage sur tamis moléculaire afin de ne garder que le conjugué BSA-peptide (figure II.3.B). A nouveau, on récupère le pic contenant la BSA sur laquelle ont été greffés des peptides et on dose le conjugué BSA-peptide. Une reconcentration sur amicon, voire même sur centricon, est nécessaire pour atteindre une concentration finale de 1 mg/ml de la BSA conjuguée. Le conjugué BSA-peptide sera alors stocké à -20°C.

2.2.2. Greffage sur BSA adsorbée

2.2.2.A. Principe

Afin de faciliter le greffage du peptide sur la BSA, nous avons imaginé une autre expérience qui consiste à greffer le peptide sur de la BSA adsorbée au fond des puits d'une plaque 96 puits. En effet, cela permet d'éviter certaines étapes du protocole de greffage sur la BSA en solution telles que le passage sur colonne, ... puisque de simples lavages permettent d'éliminer les réactifs en excès.

La méthode d'activation de la BSA au Sulfo-SMCC est identique à celle utilisée pour la BSA en solution (voir le point 2.1.1.A. des matériels et méthodes) à la seule différence que, dans ce cas-ci, toute la réaction se déroule au fond des puits (figure II.4.)

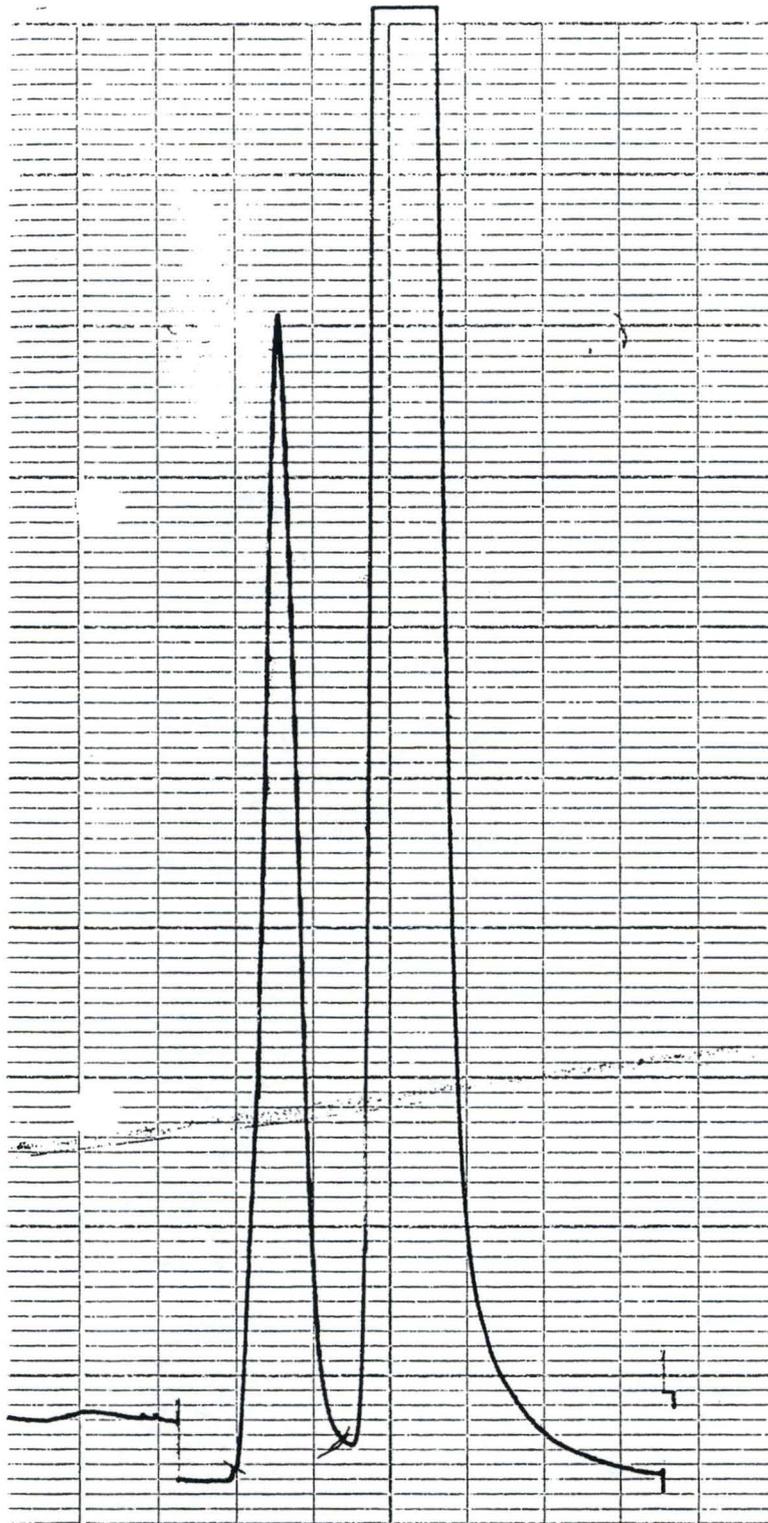


Figure II.3.A. : Pic du conjugué BSA-Sulfo-SMCC en fonction du temps.

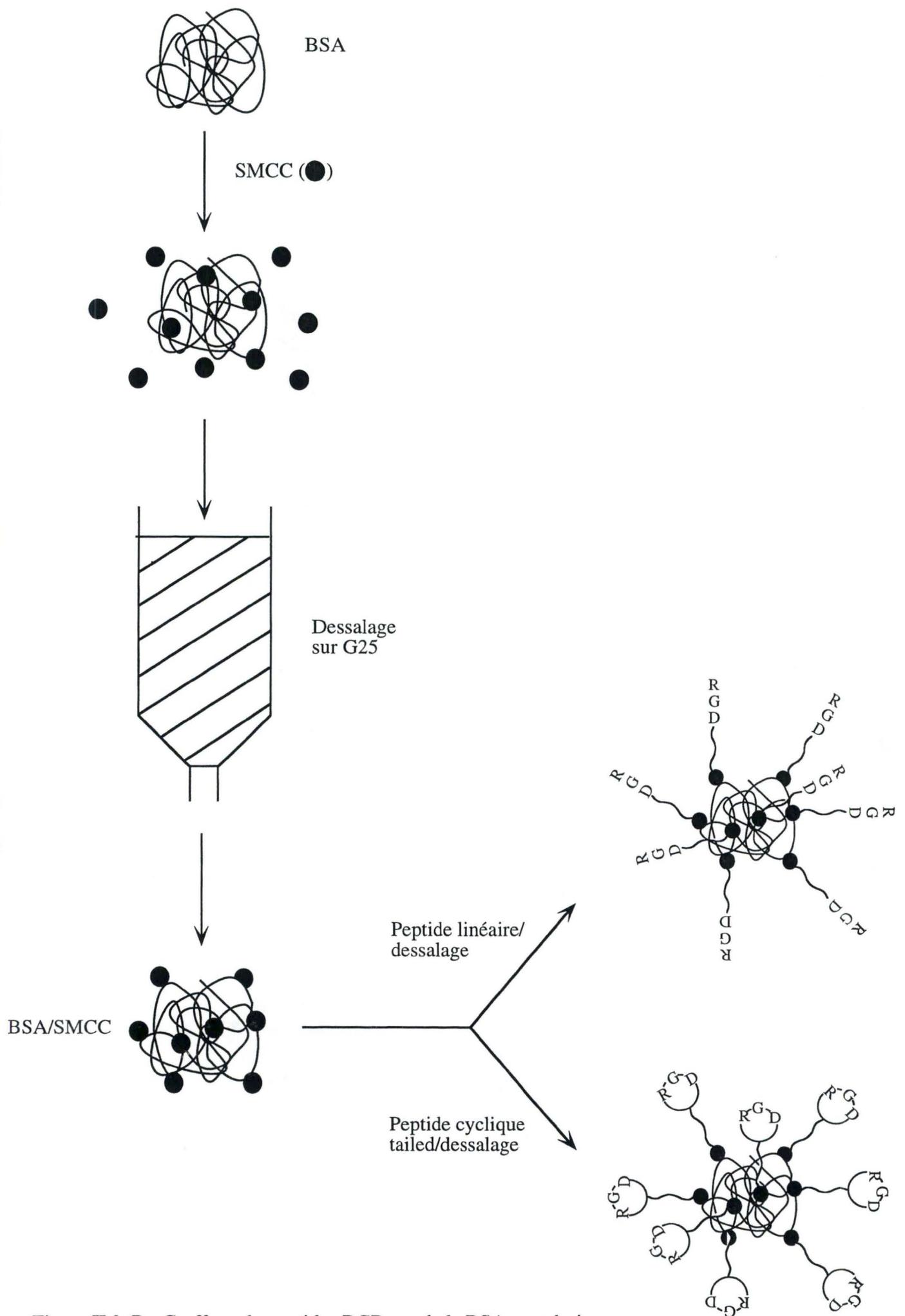


Figure II.3. B : Greffage de peptides RGD sur de la BSA en solution

2.2.2.B. Matériels

- Plaques multipuits (96 puits) non stériles (Nunc, Roskilde, Danemark).
- Albumine de sérum bovin (BSA) : à une concentration de 8 mg par ml dans du PBS (Sigma chemical Co, USA).
- Tampon phosphate 100 mM à pH 7,2 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC) : à une concentration de 1,8 mg/ml dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,2. (Pierce Chemical Co, USA).
- Peptides :
 - c[DVRGDE(-εAhx-Y-C-NH₂)] (T26).
 - Ac-DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH₂) (P21).
 - c[DRDVGGE(-εAhx-Y-C-NH₂)] (T29).

2.2.2.C. Méthode

Les puits d'une plaque 96 puits sont tout d'abord reconditionnés pendant 1 heure à 37°C à l'aide d'une solution de BSA à une concentration de 1 mg/ml dans du PBS (100 µl/puits). Après l'incubation, on rince deux fois au PBS. La BSA peut alors être activée, pendant une heure à température ambiante, par le Sulfo-SMCC dilué à une concentration de 1,8 mg/ml dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,2. Deux rinçages au tampon phosphate sont alors réalisés afin d'éliminer le Sulfo-SMCC qui n'aurait pas réagi.

A présent, on peut venir fixer le peptide désiré ($2 \cdot 10^{-4}$ M dans du tampon phosphate, 100 µl/puits). Des plaques sont incubées toute la nuit à température ambiante. Deux rinçages au tampon phosphate sont nécessaires afin d'éliminer l'excès de peptide qui ne se serait pas greffé au fond des puits.

2.3. Gels unidimensionnels

L'analyse électrophorétique en gel unidimensionnel (gel 1D) permet de séparer les protéines suivant leur poids moléculaire par une électrophorèse dénaturante (en SDS) sur gel de polyacrylamide. Nous utilisons des grands gels présentant un gradient de polyacrylamide de 10 à 14%, de manière à séparer le mieux possible à la fois les protéines de haut poids moléculaire et les protéines de faible masse.

2.3.1. Matériels

A) Electrophorèse

- Tampon d'échantillon :
- Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 (8382, Merck, Darmstadt, Allemagne).
- SDS 4,6 % (13760, Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Glycérol 20 % (4096, Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Bleu de bromophénol 0,006 % (1513505, Janssen Chimica, Geel, Belgique)

On réalise une solution stock de 1 % que l'on conserve à - 20°C.

- ExcelGel SDS buffer strips (Pharmacia 17-1342-01, Suède)
- Paraffine fluide (Merck, Allemagne)
- ExcelGel XL SDS 12-14 (Pharmacia 17-1236-01, Suède)
- Etalon de poids moléculaire de 10 000 à 100 000 (0,1 g/μl par bande) (161-0304 Bio-Rad, USA)
- Générateur programmable 2117 Multiphor (Pharmacia EPS 3500 XL, Suède)

B) Coloration à l'argent

- Solution de fixation (30 minutes) :
 - . Ethanol 40 % (Merck, Allemagne)
 - . Acide acétique 10 % (Merck, Allemagne)
- Solution d'incubation (de 30 minutes à "overnight") :
 - . Ethanol 33 % (Merck Allemagne)
 - . Acétate de sodium.3H₂O 0,5 M (Merck, Allemagne)
 - . Glutardialdéhyde 0,13 % (Fluka 49629, Italie)
 - . Na₂S₂O₃.5H₂O 8 mM (Merck, Allemagne)
- Rinçages (3 x 5 minutes) : H₂O.

- Solution d'argent (40 minutes) :
 - . Nitrate d'argent 0,1% (w/v) (Janssen Chimica, Belgique)
 - . Formaldéhyde 0,02 % (194002, Belgolabo, Belgique)
- Solution de développement :
 - . Na₂CO₃ 0,42 M (Merck, Allemagne)
 - . Formaldéhyde 0,02 % (194002, Belgolabo, Belgique)
- Solution stop (2 X 5 minutes) : EDTA-Na₂.2H₂O 39 mM (Merck, Allemagne).
- Rinçages (3 X 5 minutes) : H₂O.

2.3.2. Méthode

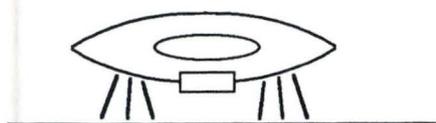
Les échantillons sont dilués 10 fois dans du tampon d'échantillon à partir d'une concentration de 1 mg/ml. Quant à l'étalon, il est dilué 20 fois. Les échantillons ainsi que l'étalon de poids moléculaire sont déposés sur le gel à raison de 20 µl par puits. Des bandes de tampon ("buffer strips") disposés de part et d'autre de ce grand gel fournissent un contact entre les électrodes et le gel 2D. La migration des protéines s'effectue grâce à un courant de 20 mA appliqué durant 45 minutes, suivi d'un courant de 40 mA pendant 2h45.

Nous avons utilisé la méthode de coloration à l'argent. Le gel est fixé 30 minutes dans la solution 1 contenant 10% d'acide acétique. Une seconde étape de fixation en présence de glutardialdéhyde permet d'augmenter la sensibilité de la coloration à l'argent. Le gel est ensuite rincé afin d'éliminer les résidus des tampons et des ions de l'électrophorèse, puis plongé dans une solution de nitrate d'argent et de formaldéhyde. Au cours de l'étape de révélation, du carbonate de sodium rend le gel alcalin, de sorte que la formaldéhyde puisse réduire l'argent ionique en argent métallique. Les protéines du gel altèrent localement les conditions physiques de réduction des ions argent, vraisemblablement à cause des charges localisées sur les protéines (Merril et Goldman 1984).

Le gel coloré est ensuite séché à 80°C durant 1h et analysé grâce au système d'analyse d'image, le Visage 101 (Millipore, USA).

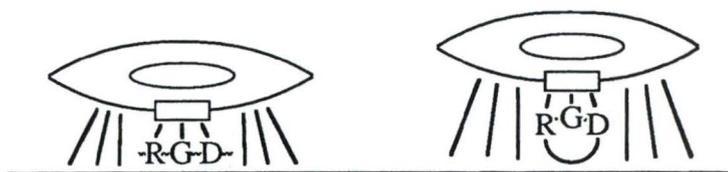
Support non reconditionné

Sans peptides



Adhérence médiée par les charges du support et par l'hydrophilicité

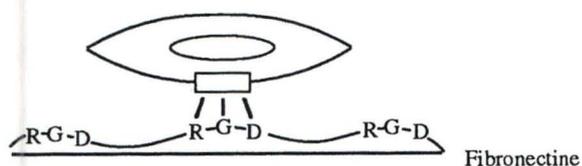
Peptides en solution



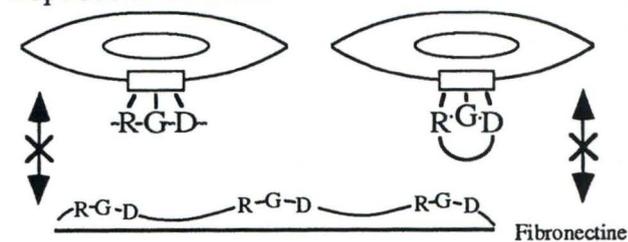
Pas d'effet inhibiteur exercé par les peptides en solution

Support reconditionné à la fibronectine

Sans peptides



Peptides en solution



Inhibition de l'adhésion par les peptides en solution

Figure II.5. : Représentation schématique montrant l'effet de peptides en solution sur l'adhésion de cellules mises en culture sur un support non reconditionné ou ayant subi un reconditionnement à la fibronectine.

3. Test d'adhérence cellulaire

Deux types de tests ont été effectués afin d'évaluer l'effet de peptides contenant le motif Arg-Gly-Asp (RGD) sur l'adhérence des cellules endothéliales.

Tout d'abord, un test négatif nous a permis de vérifier l'efficacité d'un peptide RGD en solution à inhiber l'adhérence cellulaire sur un support préalablement conditionné à la fibronectine (FN). En effet, comme le montre la figure II.5., le peptide (en solution) contenant le motif RGD peut entrer en compétition avec les motifs RGD présents dans la fibronectine. Si le peptide contient ce motif reconnu par les intégrines (celles-ci se liant effectivement à RGD), il s'y attachera et empêchera l'adhérence de la cellule aux motifs RGD de la FN. Il existe donc une compétition entre les RGD de la FN adsorbée au fond des puits et ceux du peptide en solution.

Sur un support non traité à la FN, seule l'adhérence non intégrine-dépendante interviendra.

La BSA a été utilisée comme contrôle négatif car cette protéine est reconnue pour avoir des propriétés anti-adhésives, probablement parce qu'elle contient un grand nombre de charges. Ainsi sur ce support, il ne devrait y avoir que peu ou pas d'adhérence cellulaire.

Dans ces 2 derniers cas (polystyrène nu et polystyrène + BSA), les peptides en solution devraient être sans effet car il n'existe pas de compétition avec un motif RGD.

Une fois que l'efficacité des peptides aura été testée en solution, un second test devrait nous permettre d'évaluer la capacité d'un peptide greffé sur un support à améliorer l'adhérence cellulaire.

Le peptide sera greffé sur de la BSA. En effet, puisque les cellules adhèrent déjà bien sur du polystyrène (PS) non reconditionné, le greffage du peptide sur ce polymère n'augmente pas fortement l'adhérence. Nous avons dès lors réalisé le greffage du peptide RGD sur de la BSA puisque comme nous l'avons mentionné plus haut, cette protéine possède des propriétés anti-adhésives évidentes. Ce conjugué BSA-peptide (voir le point 2.1.2. des matériels et méthodes) est ensuite utilisé afin de favoriser l'adhérence. Une fois le reconditionnement effectué, l'adhérence cellulaire est testée sur ces différents supports afin de vérifier les propriétés pro-adhésives des peptides RGD. Ces tests ont été réalisés sur les cellules endothéliales et THP-1.

Dans les 2 cas, un test colorimétrique nous permettra d'estimer la quantité de cellules adhérentes au fond des puits. La quantité de cellules par puits dépend du type cellulaire utilisé. En ce qui concerne les cellules endothéliales, 10 000 cellules suffiront alors que pour les THP-1, il en faut 7 fois plus, soit 70 000. Ce test, décrit par Landegren (1984) et repris par Givens *et al.* (1990), est basé sur le dosage d'une enzyme lysosomale la N-acétyl- β -D-glucosaminidase, qui dégrade les constituants cellulaires glycosylés. Le

para-nitrophénol-N-acétyl- β -D-glucosaminide est utilisé comme substrat synthétique de l'enzyme. Celui-ci le métabolise et libère le para-nitrophénol qui apparaît jaune à pH basique. La mesure de la DO à 405 nm permet d'estimer la quantité de cellules adhérentes.

3.1. Test en solution

3.1.1. Matériels

- Milieux de culture pour les cellules endothéliales (voir le point 1.1.2.A. des matériels et méthodes).
- Milieux de culture pour THP-1 (voir le point 1.2.1.A. des matériels et méthodes).
- FN (fibronectine) : 5 μ g/ml PBS (G5291, Promega, USA).
- BSA (albumine de sérum bovin) : 2 mg/ml PBS (2518, Sigma Chemical Co, USA).
- PBS : solution saline (0,15 M NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM à pH 7,4.
- Solution C composée de la solution A et de la solution B en quantité égale :
 - \Rightarrow Solution A : p-nitrophénol-N-acétyl- β -D-glucosaminide 7,5 mM dans du tampon citrate 100 mM à pH 5,0.
 - \Rightarrow Solution B : triton X-100 à 0,5 %.
- Tampon glycine (150 mM)-EDTA (5 mM) pH 10,4.
- Plaques multi-puits (96) non stériles (Nunc, Roskilde, Danemark).
- Peptides :
 - c[DVRGDE(- ϵ Ahx-Y-C-NH₂)] (T26).
 - Ac-DVRGDN(- ϵ Ahx-Y-C-NH₂) (P21).
 - Ac-REDV(- ϵ Ahx-C-NH₂) (P18).
 - Ac-DVRGD β Ala-Ahx-Y-NH₂ (P15).
 - c(VRGD_DN) (C8).

3.1.2. Méthode

La plaque multi-puits est reconditionnée à la FN durant la nuit à 4°C (100 µl/puits). Le lendemain, les puits sont rincés au PBS et saturés à la BSA 1 mg/ml PBS pendant 1 heure à 37°C. Pendant ce temps, on prépare la solution contenant les peptides et les cellules. Les peptides sont dilués en présence des cellules à différentes concentrations allant de 10^{-3} M à 10^{-7} M.

Cette suspension sera préincubée à 37°C durant 30 minutes afin de favoriser les rencontres cellules-peptides. 100 µl de cette solution seront alors incubés dans les puits reconditionnés à la fibronectine, à la BSA ou dans des puits non reconditionnés. On laisse alors les cellules adhérer pendant 30 ou 15 minutes à 37°C. Ensuite, on décante et on rince au PBS. La révélation se fait par la méthode de l'hexosaminidase décrite au point 3. des matériels et méthodes. La lecture de la DO se fait à 405 nm grâce à un lecteur de plaques (BIO-RAD, USA). Les résultats sont exprimés en DO. Celle-ci sera d'autant plus élevée qu'il y a de cellules présentes dans les puits.

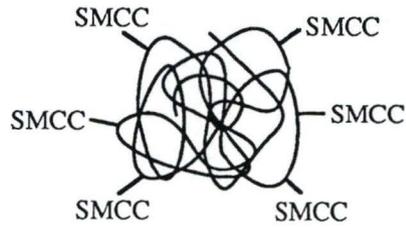
Toutefois pour pouvoir comparer les différents tests d'adhérence, nous exprimerons les résultats en pourcentage par rapport au contrôle. Le contrôle correspond à l'adhérence des cellules sur fibronectine, en l'absence de peptide.

3.2. test sur BSA adsorbée

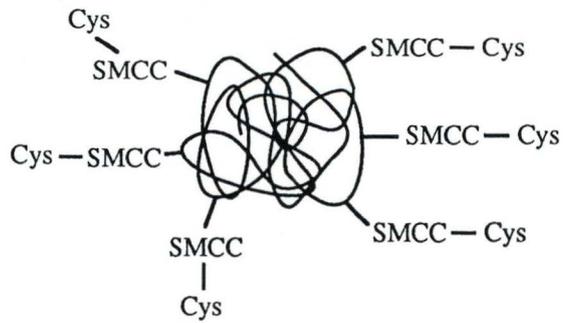
3.2.1. Matériels

- Milieu de culture pour les cellules endothéliales (voir le point 1.1.2.A. des matériels et méthodes).
- FN (fibronectine) : 5 µg/ml PBS (G5291, Promega, USA).
- BSA (albumine de sérum bovin) : 2 mg/ml PBS (2518, Sigma Chemical Co, USA).
- BSA-Sulfo-SMCC (voir le point 2.2.1.C. des matériels et méthodes).
- BSA-peptide (voir le point 2.2.1.C. des matériels et méthodes).
- BSA-Cystéine (voir le point 2.2.1.C. des matériels et méthodes).

1) BSA/Sulfo-SMCC



2) BSA/Cystéine



3) BSA/Peptide

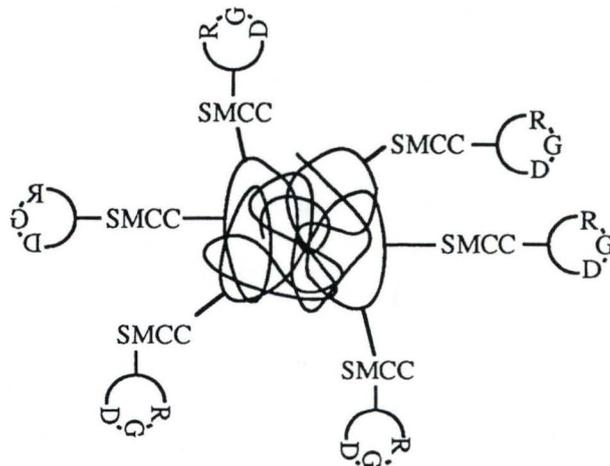


Figure II.6. : Représentation schématique des différents types de BSA modifiées, utilisées pour reconditionner des surfaces en polystyrène.

- Solution C composée de la solution A et de la solution B en quantité égale :
 ⇒Solution A : p-nitrophénol-N-acétyl-β-D-glucosaminide 7,5 mM dans du tampon citrate 100 mM à pH 5,0.
 ⇒Solution B : triton X-100 à 0,5 %.
- Tampon glycine (150 mM)-EDTA (5 mM) pH 10,4.
- Plaques multi-puits (96) non stériles (Nunc, Roskilde, Danemark).
- PBS : solution saline (0,15 M NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM à pH 7,4.
- Peptides :
 - c[^DVRGDE(-εAhx-Y-C-NH₂)] (T26).
 - c[DRDVGE(-εAhx-Y-C-NH₂)] (T29).
 - Ac-^DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH₂) (P21).

3.2.2. Méthode

Comme nous l'avons décrit plus haut, le peptide aura été greffé soit sur de la BSA en solution soit sur de la BSA préalablement adsorbée au fond des puits. Dans le cas où le greffage aura été réalisé en solution, (voir le point 3.1.2. des matériels et méthodes), le conjugué sera incubé pendant 1 heure à 37°C au fond des puits.

L'adhérence des cellules a été testée sur des supports reconditionnés à la BSA seule, BSA-Sulfo-SMCC, BSA-Cystéine et BSA greffée avec un peptide RGD (figure II.6.), sur de la FN et sur un support non reconditionné. La fibronectine est considérée comme étant le contrôle où 100% des cellules sont attachées tandis que sur un support non reconditionné, il n'y aura qu'une adhérence non spécifique.

La BSA tient lieu de contrôle négatif de par ses propriétés anti-adhésives.

On dépose 10 000 cellules endothéliales ou 70 000 THP-1 par 100 µl de milieu par puits. On laisse incuber les cellules pendant 30 minutes à 37°C. Ensuite, la plaque est rincée 2 fois au PBS afin d'éliminer les cellules non adhérentes. La méthode d'estimation de la quantité de cellules adhérentes au fond des puits est décrite au point 3 des matériels et méthodes.

Ce test cellulaire correspond à un test positif c'est-à-dire que l'on vérifie l'adhérence des cellules sur le peptide greffé.

4. Immunocytochimie

Par immunofluorescence, nous avons tenté de mettre en évidence la présence de plaques d'adhérence focale pour des cellules en culture sur un support contenant des motifs RGD.

4.1. Matériels

- PBS : solution saline (0,15 mM NaCl) tamponnée par du phosphate 10 mM pH 7,4.
- Paraformaldéhyde 4 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Triton X-100 1 % et 0,2 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- PBS + BSA 1 % : albumine de sérum bovin 1 % dans du PBS (Sigma Chemical CO, USA).
- Anticorps anti-phosphotyrosine (anticorps primaire) : IgG2b_k monoclonal de souris (UBI, New-York, USA) à une concentration de 10-30 µg/ml (dilution 33 fois).
- Anticorps anti-IgG marqué à la fluorescéine (anticorps secondaire) : Anticorps de chèvre (Sanvertch, Boechout, Belgique) à une concentration de 10 µg/ml (dilution 80 fois).
- FN (fibronectine) : 10 µg/ml PBS (G5291, Promega, USA).
- BSA (albumine de sérum bovin) : 2 mg/ml PBS (2518, Sigma Chemical Co, USA).
- Milieu de culture pour cellules endothéliales (voir le point 1.1.2.A. des matériels et méthodes).
- Poly-L-lysine : 1 mg/ml PBS (Sigma chemical Co , USA).
- BSA-Sulfo-SMCC (voir le point 2.2.1.C. des matériels et méthodes).
- BSA-peptide (voir le point 2.2.1.C. des matériels et méthodes).
- BSA-Cystéine (voir le point 2.2.1.C. des matériels et méthodes).

- Plaques multi-puits (à 6 cupules) (Corning, 25810, New-York, USA).

- PBS-glycerol 1:9 à pH 9.

- Peptides :

c[DVRGDE(-εAhx-Y-C-NH₂)] (T26).

Ac-DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH₂) (P21).

4.2. Méthode

Des lamelles de verre de 24 mm × 24 mm ont été placées au fond de puits d'une plaque multi-puits (12 puits). Ces lamelles ont ensuite été reconditionnées avec de la FN (10µg/ml PBS) et avec de la poly-L-lysine (1 mg/ml PBS) pendant toute la nuit à 4°C et avec de la BSA (2 mg/ml PBS) pendant 1 heure à 37°C. Cette BSA adsorbée peut alors être modifiée avec un peptide RGD linéaire et un peptide RGD cyclique muni d'un bras d'ancrage (voir le point 2.2. des matériels et méthodes). Des lamelles traitées à la BSA-Sulfo-SMCC et à la BSA-Cys ont également été testées. La fibronectine constitue un contrôle positif car la présence de motifs RGD entraîne la formation de plaques d'adhérence, tandis que la poly-L-lysine constitue le contrôle négatif puisque les cellules adhèrent peu sur ce support. Les cellules peuvent alors être ajoutées à raison de 15 000 cellules endothéliales par cm² pendant 2 et 4 heures à 37°C. Après ce temps d'adhérence, un rinçage délicat au PBS est réalisé afin d'éliminer les cellules qui ne se seraient pas attachées. On fixe ensuite les cellules dans une solution de paraformaldéhyde 4 % pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées deux fois au PBS et perméabilisées au triton X-100 1% pendant 3 minutes. Cette perméabilisation permettra l'entrée dans la cellule des anticorps. Enfin, pour éviter une fixation non spécifique de l'anticorps, une incubation des cellules en présence de PBS-BSA 1 % durant 30 minutes à 37°C est réalisée. A présent, l'anticorps primaire peut être ajouté et laissé toute la nuit à 4°C dans une atmosphère humide.

Le lendemain, on recommence le même procédé pour l'anticorps secondaire marqué à la fluorescéine. Les cellules sont rincées consécutivement avec du PBS, du triton 0,2% et de la BSA 1%. Les cellules sont alors incubées pendant 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire. Celui-ci va reconnaître l'anticorps anti-phosphotyrosine. Il est impératif de garder le deuxième anticorps à l'abri de la lumière. Les lamelles sont enfin rincées avec du PBS et montées dans du glycérol + PBS (1 : 9, pH 9).

Des clichés peuvent être pris directement au microscope à fluorescence (Leitz, Dialux 22, Allemagne).

RESULTATS

1. Modèles expérimentaux

Afin de faciliter la compréhension de ce chapitre, une brève description des modèles expérimentaux, aussi bien cellulaires que peptidiques, sera présentée.

Les expériences faites sur l'adhérence cellulaire ont été réalisées soit sur de la fibronectine, qui correspond au contrôle positif, soit sur des substituts peptidiques de protéines de la MEC. Ces peptides contiennent le motif RGD et ont été synthétisés sous forme linéaire, cyclique ou cyclique munie d'un bras d'ancrage.

Comme contrôle positif, nous avons choisi la FN car elle possède divers avantages :

- la FN est ubiquitaire *in vivo*.
- la FN disponible commercialement, est un bon agent pro-adhésif *in vitro*.
- la FN est souvent citée dans la littérature lors de tests d'inhibition cellulaire ce qui nous permettra de comparer nos résultats avec ceux de la littérature.

1.1. Modèles cellulaires

Nous avons choisi de réaliser les expériences d'adhérence sur 2 types cellulaires. En effet, nous savons qu'il existe une variabilité dans l'adhérence d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi, comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, chaque type cellulaire peut exprimer plusieurs intégrines qui sont plus ou moins spécifiques d'un ligand. Ceci nous permet d'expliquer pourquoi un même constituant de la MEC peut avoir des effets différents sur des types cellulaires différents. Mais de nombreux auteurs ont également montré qu'un même peptide pouvait agir différemment sur des types cellulaires différents (Gurrath *et al.*, 1992 ...). Notre choix s'est tout d'abord porté sur les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. Ces cellules sont bien connues au laboratoire puisqu'elles font l'objet de plusieurs études. De plus, nous savons qu'elles sont exigeantes du point de vue de l'adhérence. C'est ainsi que, lors de la mise en culture et du repiquage de cellules endothéliales, les boîtes de culture doivent être préalablement reconditionnées avec de la gélatine afin de favoriser leur adhérence. D'un point de vue plus appliqué, l'étude de ces cellules est intéressante lors de la mise au point d'implants vasculaires, par exemple.

D'autre part, nous nous sommes intéressés aux cellules THP-1. Ces cellules sont des pré-monocytes ayant des comportements d'adhérence différents des cellules

endothéliales. A plus long terme, ces cellules nous permettront d'étudier leur activation ou leur différenciation en monocytes sur un support contenant des motifs RGD.

1.2. Modèles peptidiques

Au laboratoire, nous avons synthétisé 3 types de peptides contenant le motif RGD : des peptides linéaires, des peptides cycliques et des peptides cycliques munis d'un bras d'ancrage, en vue de les greffer ultérieurement sur un polymère ou une protéine telle que la BSA.

Certains auteurs tels que Main *et al.* (1992) ont analysé la structure du motif RGD dans la FN native. Ils ont montré que cette séquence peptidique est localisée dans une boucle au sein de cette protéine. Sur base de ces données, Gurrath *et al.* (1992) ont dès lors synthétisé une série de pentapeptides RGD cycliques. Nous avons repris l'idée de cyclisation du motif RGD mais en y ajoutant un bras d'ancrage afin de pouvoir greffer ces peptides sur un support. Nous avons donc synthétisé 3 types de peptides :

A) les peptides linéaires :

P21 Ac-DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH₂)

P15 Ac-DVRGD-βAla-Ahx-Y-NH₂

P18 Ac-REDV-εAhx-C-NH₂

Le peptide P21 est l'analogue du peptide 18 c(RGDF_DV) de Gurrath *et al.* (1992).

Le peptide P15 est l'analogue linéaire du peptide T26 c[DVRGDE(-εAhx-Y-C-NH₂)] (voir plus bas).

Le peptide P18 ne trouve pas d'analogue dans les peptides testés par Gurrath *et al.* (1992) puisque ces auteurs n'ont testé que des peptides cycliques contenant le motif RGD ou des dérivés. Il contient le motif REDV qui, selon certains auteurs, serait spécifique pour les cellules endothéliales.

B) les peptides cycliques :C8 c(VRGD_DN)

Ce peptide est l'analogue du peptide 16 c(RGD_DFV) de Gurrath *et al.* (1992).

C) les peptides cycliques munis d'un bras d'ancrage ("tailed") en vue de leur greffage sur un support:T26 c[_DVRGDE(-εAhx-Y-C-NH₂)]T29 c[DR_DVGE(-εAhx-Y-C-NH₂)]

Ces peptides sont munis d'un bras d'ancrage constitué, de l'acide aminohexanoïque (εAhx) suivi d'une cystéine (C) qui permettra le greffage sur de la BSA grâce à son groupement thiol. Une tyrosine (Y) y est également incorporée. Elle peut être iodée et peut ainsi permettre de quantifier le greffage radioactivement.

Le peptide T29 comporte le motif RGD "aléatoire", en ce sens que le motif RGD n'est pas présenté sous cette forme séquentielle mais sous une forme désordonnée. Ce peptide permet de vérifier que l'effet inhibiteur ou pro-adhésif exercé par les peptides est bien spécifique du motif RGD.

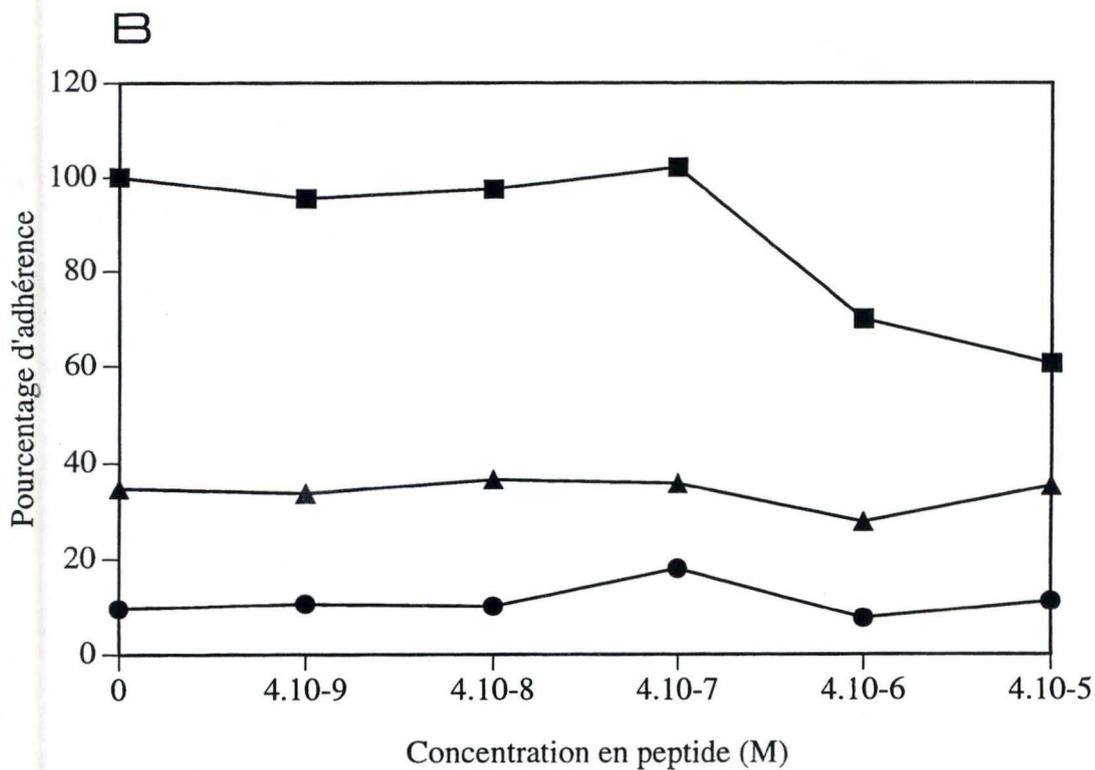
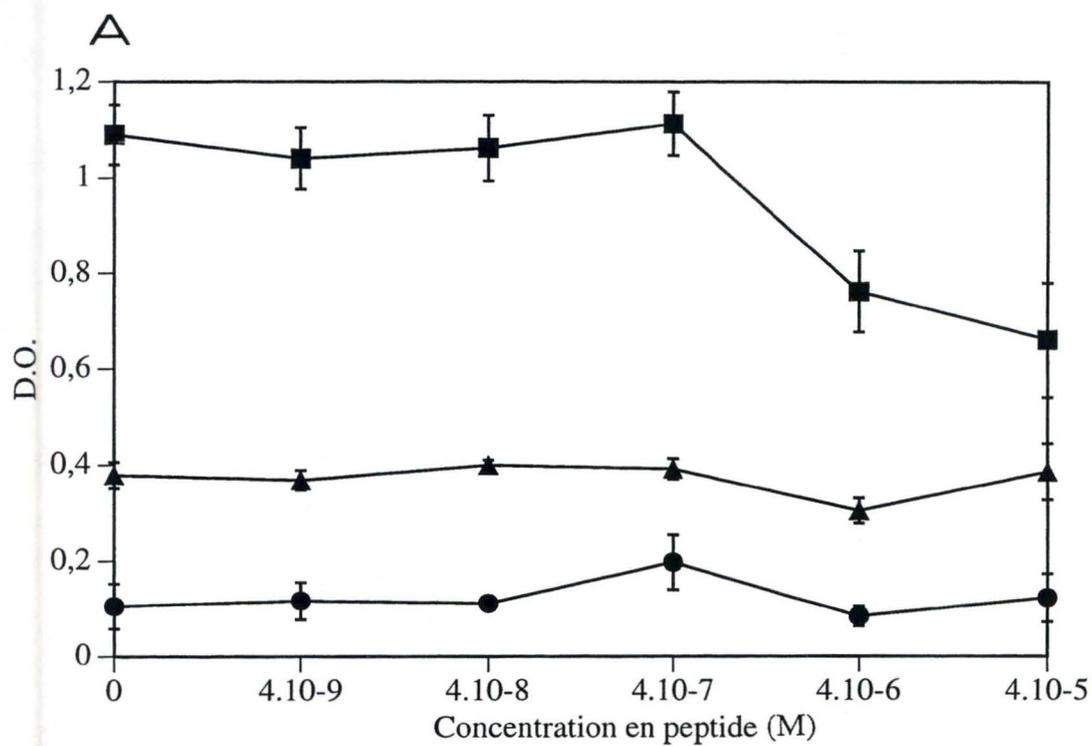


Figure III.1. : Effet du peptide tailed T26 présent en solution à des concentrations allant de $4 \cdot 10^{-9}$ à $4 \cdot 10^{-5}$ M sur l'adhérence des cellules endothéliales en cinquième génération mises en culture sur la FN (■), la BSA (●) et sur le PS non traité (▲). Cette expérience a été réalisée après 30 minutes d'adhérence. Les cellules adhérentes sont quantifiées par le test à l'hexosaminidase, la DO étant proportionnelle à la quantité de cellules (A). Chaque test correspond à la moyenne de 4 tests +/- un écart-type. En B, les résultats ont été exprimés en pourcentage d'adhérence : le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN en l'absence de peptide, la BSA et le PS non traité servent de contrôle négatif. Pour les courbes d'inhibition suivantes, nous nous limiterons à présenter les résultats en pourcentage d'adhérence.

2. Tests d'inhibition de l'adhérence cellulaire par des peptides RGD en solution

Dans un premier temps, afin de vérifier la reconnaissance d'un peptide RGD par les intégrines, nous choisissons de tester son pouvoir à inhiber l'adhérence de cellules sur de la FN : l'expérience consiste à mettre des cellules en présence de peptides en solution à des concentrations croissantes et ensuite à les incuber dans des puits reconditionnés à la FN. Ainsi, les intégrines des cellules, reconnaissant le motif RGD du peptide en solution, ne pourront plus reconnaître ceux de la FN et l'adhérence cellulaire sur la FN sera donc inhibée. Il existe donc une compétition entre le motif RGD des peptides en solution et les motifs RGD de la FN.

Tous les peptides cités précédemment ont été testés sur l'adhérence de 2 types cellulaires, les cellules endothéliales et les THP-1. La réalisation de ces expériences a toujours été faite sur 3 supports différents :

- le polystyrène (PS) reconditionné à la FN, contrôle positif étant donné les propriétés pro-adhésives de la FN.
- le PS reconditionné à la BSA, contrôle négatif, étant donné les propriétés anti-adhésives de la BSA.
- le PS non traité.

Un graphe d'inhibition de l'adhérence cellulaire typique, exprimé en pourcentage et en DO, est montré à la figure III.1. Cet exemple correspond à l'inhibition de l'adhérence des cellules endothéliales par le peptide cyclique muni d'un bras d'ancrage T26, durant 30 minutes d'adhérence. Nous pouvons dès lors constater qu'en présence des plus fortes concentrations en peptide ($4 \cdot 10^{-6}$ et $4 \cdot 10^{-5}$ M), l'adhérence cellulaire sur la FN diminue. Ceci s'explique par le fait que les peptides RGD en solution, se fixant sur les intégrines des cellules endothéliales, bloquent la reconnaissance des motifs RGD, présents dans la FN. Les cellules n'adhèrent donc pas à la FN. Par contre, aux faibles concentrations en peptides ($4 \cdot 10^{-9}$ à $4 \cdot 10^{-7}$ M), la quantité de peptides en solution ne suffit pas à inhiber l'adhérence des cellules. Ainsi, une grande quantité de cellules adhèrent à la FN via le motif RGD mais également via des interactions électrostatiques, des interactions hydrophiles, ... Ces expériences montrent bien que l'adhérence des cellules endothéliales sur la FN est RGD-dépendante. Par contre, on remarque que les peptides en solution n'ont aucun effet sur l'adhérence lorsque les cellules sont mises en adhérence sur le polystyrène (PS) reconditionné à la BSA ou sur le PS non traité. Ceci s'explique par le fait que l'adhérence sur de la BSA ou sur du PS ne fait pas intervenir le mécanisme de reconnaissance intégrine/RGD. Les peptides RGD en solution sont donc impuissants à

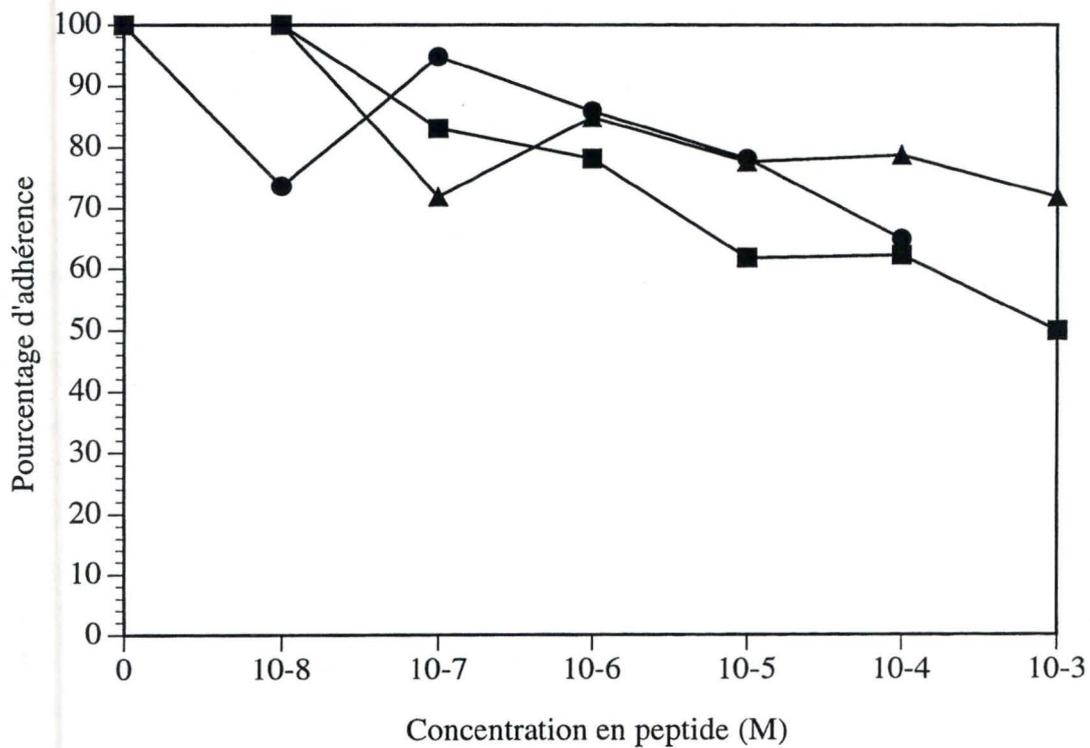


Figure III.2. : Effet des peptides P21 (▲), C8 (■) et T26 (●) présents en solution à des concentrations allant de 10⁻⁸ à 10⁻³ M sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération mises en culture sur la FN. Cette expérience a été réalisée après 15 minutes d'adhérence.

Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN en l'absence de peptide.

inhiber une adhérence médiée par des interactions électrostatiques, hydrophiles, ... Les valeurs d'adhérence sur la BSA sont toujours très faibles puisque cette protéine a été utilisée pour ces propriétés anti-adhésives de par ses nombreuses charges. Le pourcentage d'adhérence sur le PS non traité est quant à lui légèrement supérieur. Ces contrôles ont été réalisés pour chaque expérience effectuée et ont montré les mêmes effets. Toutefois, pour éviter une surcharge des figures et pour la clarté des résultats, ces courbes ne seront plus reprises dans la suite du mémoire.

2.1. Comparaison de l'effet inhibiteur de différents peptides RGD en solution sur l'adhérence de cellules endothéliales à différents temps d'adhérence

La figure III.2. compare l'effet de 3 peptides : un linéaire (P21), un cyclique (C8) et un tailed (T26) sur l'adhérence des cellules endothéliales sur de la FN pour un temps d'adhérence de 15 minutes. On peut observer que le peptide C8 est le peptide qui exerce l'effet inhibiteur le plus marqué puisqu'il parvient à inhiber l'adhérence des cellules endothéliales de 50 % à une concentration de 10^{-3} M.

Par contre, nous n'avons obtenu qu'une inhibition de 35 % à une concentration de 10^{-4} M pour le peptide T26 (tableau III.1.). Notons que pour des raisons de solubilité, ce peptide n'a pu être testé à une concentration de 10^{-3} M.

Le peptide P21 quant à lui n'atteint qu'un effet inhibiteur de 30 % à 10^{-4} M. Pour cette expérience, nous avons pu montrer que les peptides C8 et T26 en solution exercent un effet inhibiteur sur l'adhérence des cellules endothéliales sur la FN. Quant au peptide P21, une faible inhibition se produit à une concentration de 10^{-3} M. Nous pouvons expliquer ce faible effet exercé par le P21 par une plus grande mobilité de la séquence RGD et donc une interaction avec les intégrines moins forte.

Ensuite, nous avons testé un temps d'adhérence plus long afin de voir si les différences observées entre peptides se maintiennent.

Une comparaison des effets des peptides C8, T26 et P15 sur les cellules endothéliales durant 30 minutes d'adhérence est indiquée à la figure III.3.

Nous constatons que le peptide P15 inhibe l'adhérence des cellules endothéliales de 17 % et que le peptide C8 inhibe l'adhérence d'environ 22 % pour une concentration de 10^{-3} M en peptide.

Le peptide T26 quant à lui inhibe l'adhérence cellulaire de 33 % à une concentration de 10^{-4} M. Il est à noter qu'à nouveau, pour des raisons de solubilité ce peptide n'a pu être

Séquence peptidique	Cellules endothéliales		THP-1	
	15 min	30 min	15 min	30 min
Ac-DVRGDbAla-εAhx-Y-C-NH ₂ (P15)	N.D.	> 10 ⁻³ M	N.D.	N.D.
Ac-REDV(-εAhx-Y-C-NH ₂) (P18)	> 10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M
Ac-DVRGDN(-εAhx-Y-C-NH ₂) (P21)	> 10 ⁻³ M	N.D.	> 10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M
c(VRGD _D N) (C8)	10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M	4 10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M
c(DVRGDE)Ahx-C-NH ₂ (T26)	> 10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M	> 10 ⁻³ M

Tableau III.1. : Tableau récapitulatif des IC 50 estimés pour les différents peptides testés en solution sur l'adhérence des cellules endothéliales et THP-1, sur la fibronectine après 15 et 30 minutes. Les IC 50 sont estimés à partir de courbes d'inhibition comme celle présentée aux figures III.1.à 7. (N.D. : non déterminé).

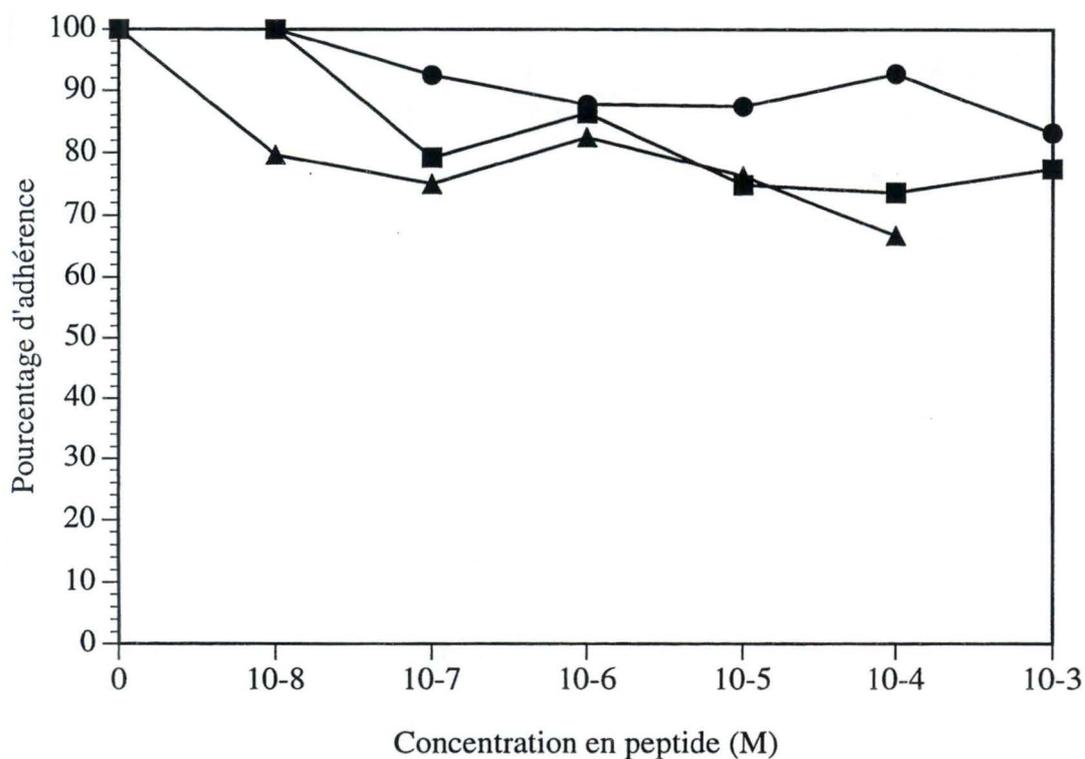


Figure III.3. : Effet des peptides P15 (●), C8 (■) et T26 (▲) présents en solution à des concentrations allant de 10^{-8} à 10^{-3} M sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération mises en culture sur la FN. Cette expérience a été réalisée après 30 minutes d'adhérence.

Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN en l'absence de peptide.

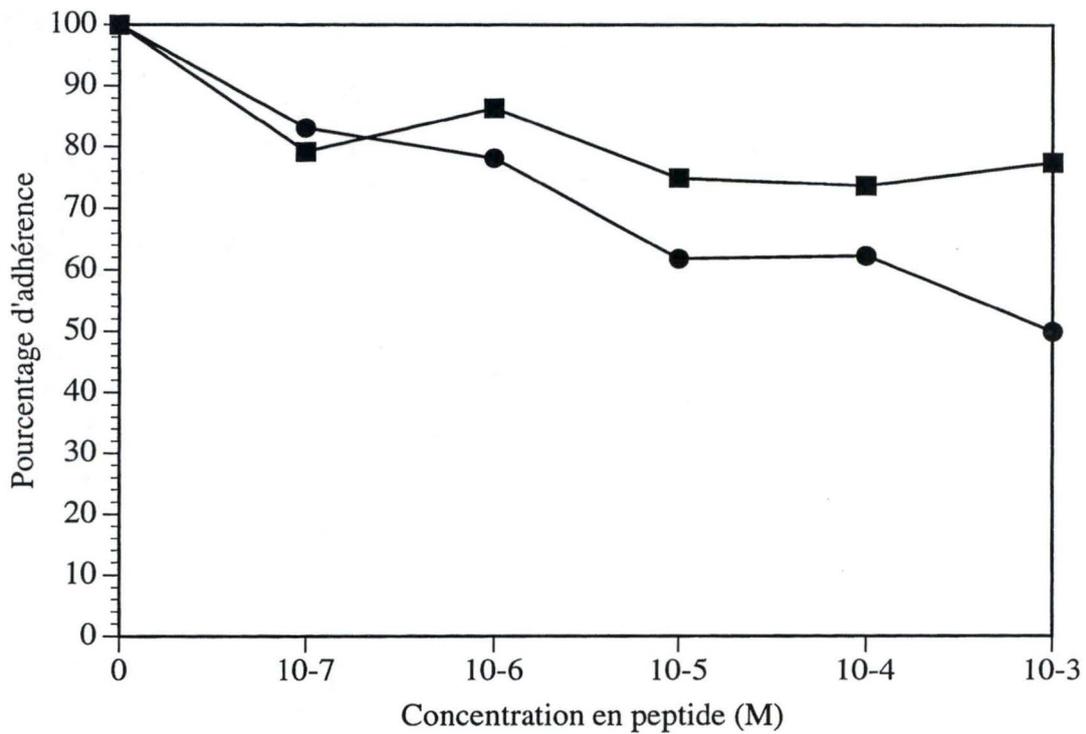


Figure III.4. : Effet du peptide C8 présent en solution à des concentrations allant de 10^{-7} à 10^{-3} M sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération mises en culture sur la FN. Cette expérience a été réalisée après 15 (●) et 30 (■) minutes d'adhérence. Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN en l'absence de peptide.

testé à une concentration de 10^{-3} M.

Sur base de ces résultats, nous pouvons dire qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les 3 peptides. L'augmentation du temps d'adhérence des cellules montre donc des effets peptidiques moins marqués. Ceci peut s'expliquer par le fait que pour un temps d'adhérence plus long (30 minutes), l'adhérence non spécifique s'ajoute aux interactions RGD/intégrines. Dans ce cas, mêmes si les peptides RGD en solution sont reconnus par les intégrines des cellules, ces cellules peuvent adhérer à la FN par l'intermédiaire d'autres interactions.

Cette évolution au cours du temps d'adhérence est illustré pour le peptide C8 aux 2 temps d'adhérence testés (figure III.4.). Le peptide a un pouvoir inhibiteur de 50 % à 10^{-3} M pour 15 minutes alors qu'à 30 minutes d'adhérence, il n'a un effet inhibiteur que de 22 % à 10^{-3} M.

2.2. Comparaison de l'effet inhibiteur de différents peptides RGD en solution sur l'adhérence des cellules THP-1 à différents temps d'adhérence

Parallèlement aux expériences réalisées sur les cellules endothéliales, nous avons testé l'effet de peptides RGD en solution sur les THP-1, cellules issues d'une lignée promonocytaire.

La figure III.5. nous montre l'effet inhibiteur des peptides C8 et T26 sur les cellules THP-1 après 30 minutes d'adhérence. Les résultats sont inattendus : le peptide C8, aux faibles concentrations, semble favoriser l'adhérence cellulaire, tandis qu'aux fortes concentrations (10^{-4} et 10^{-3} M), il semble exercer un effet inhibiteur. Nous n'avons pas d'interprétations pour ces résultats.

Le peptide T26 par contre semble inhiber, bien que légèrement, l'adhérence cellulaire (30 % d'inhibition à 10^{-4} M).

Nous ne constatons donc pas de différence significative entre l'effet inhibiteur du peptide C8 et celui du peptide T26 sur les THP-1.

Ensuite, tout comme pour les cellules endothéliales, nous avons comparé l'effet inhibiteur du peptide C8 pour 15 et 30 minutes d'adhérence. Les résultats observés à la figure III.6. nous montrent que pour un temps d'adhérence de 15 minutes, l'inhibition exercée par le peptide C8 est plus importante qu'à 30 minutes puisqu'on obtient respectivement 80 et 60% d'inhibition d'adhérence sur la FN.

Tout comme nous l'avons évoqué pour les cellules endothéliales, ceci s'explique par le

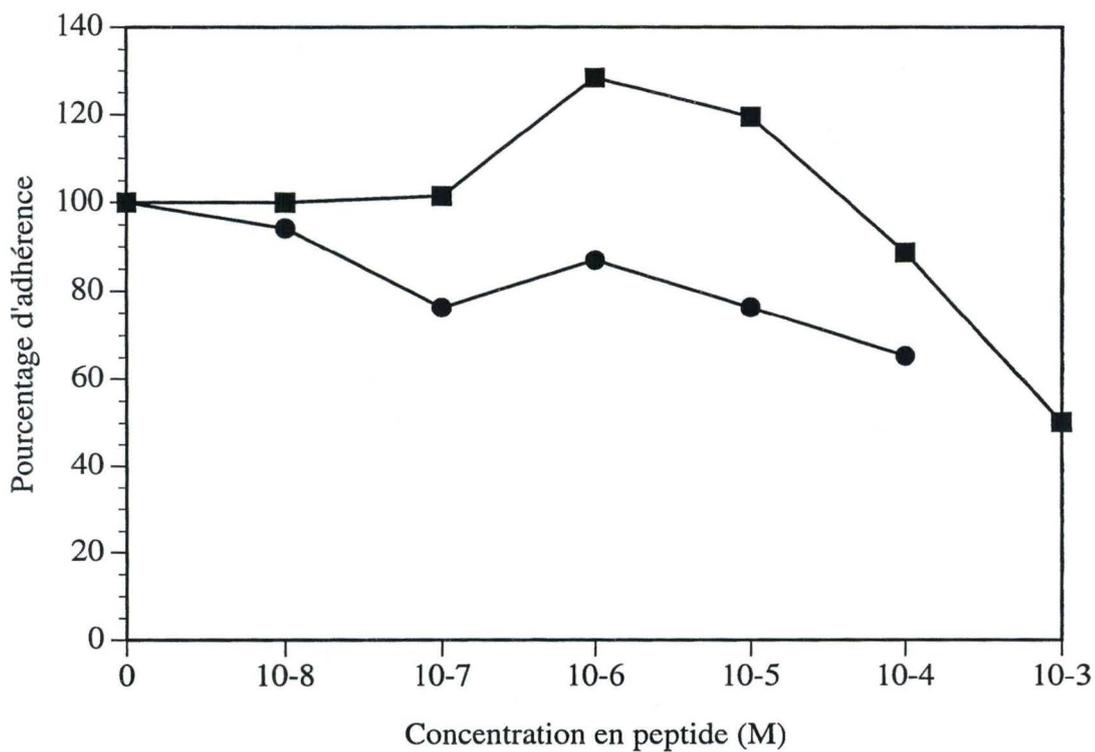


Figure III.5. : Effet des peptides C8 (■) et T26 (●) présents en solution à des concentrations allant de 10⁻⁸ à 10⁻³ M sur l'adhérence des cellules THP-1 mises en culture sur la FN. Cette expérience a été réalisée après 30 minutes d'adhérence.
Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN en l'absence de peptide.

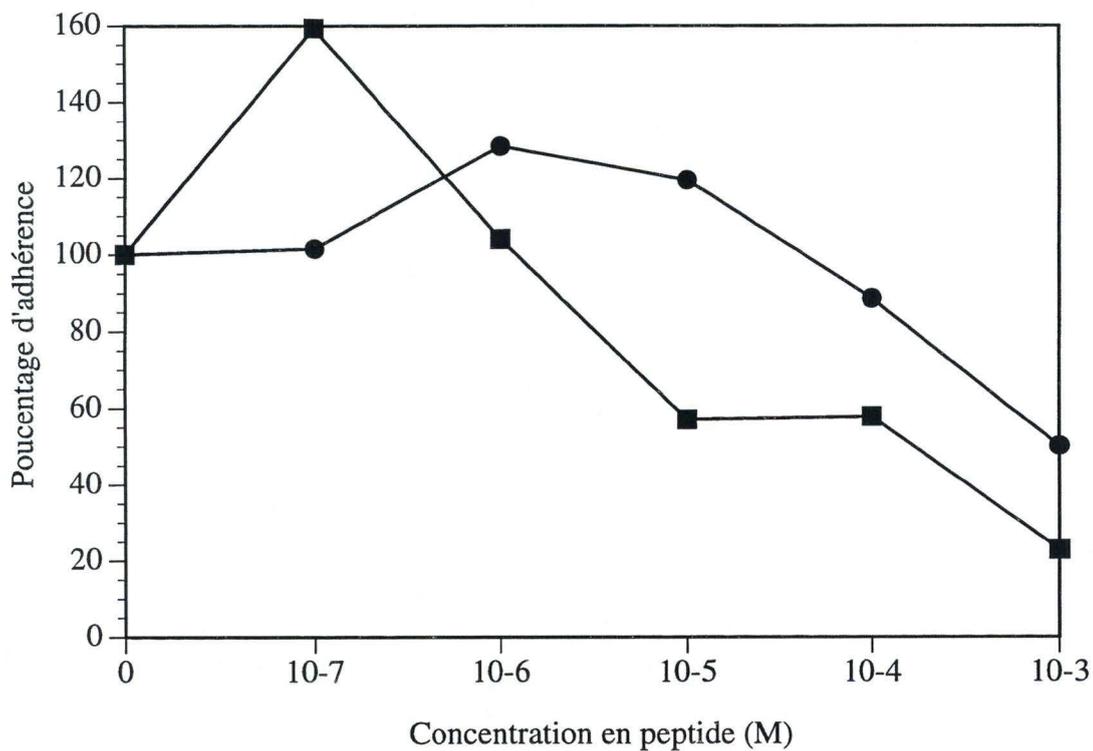


Figure III.6. : Effet du peptide C8 présent en solution à des concentrations allant de 10^{-7} à 10^{-3} M sur l'adhérence des THP-1 mises en culture sur la FN. Cette expérience a été réalisée après 15 (■) et 30 (●) minutes d'adhérence. Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN en l'absence de peptide.

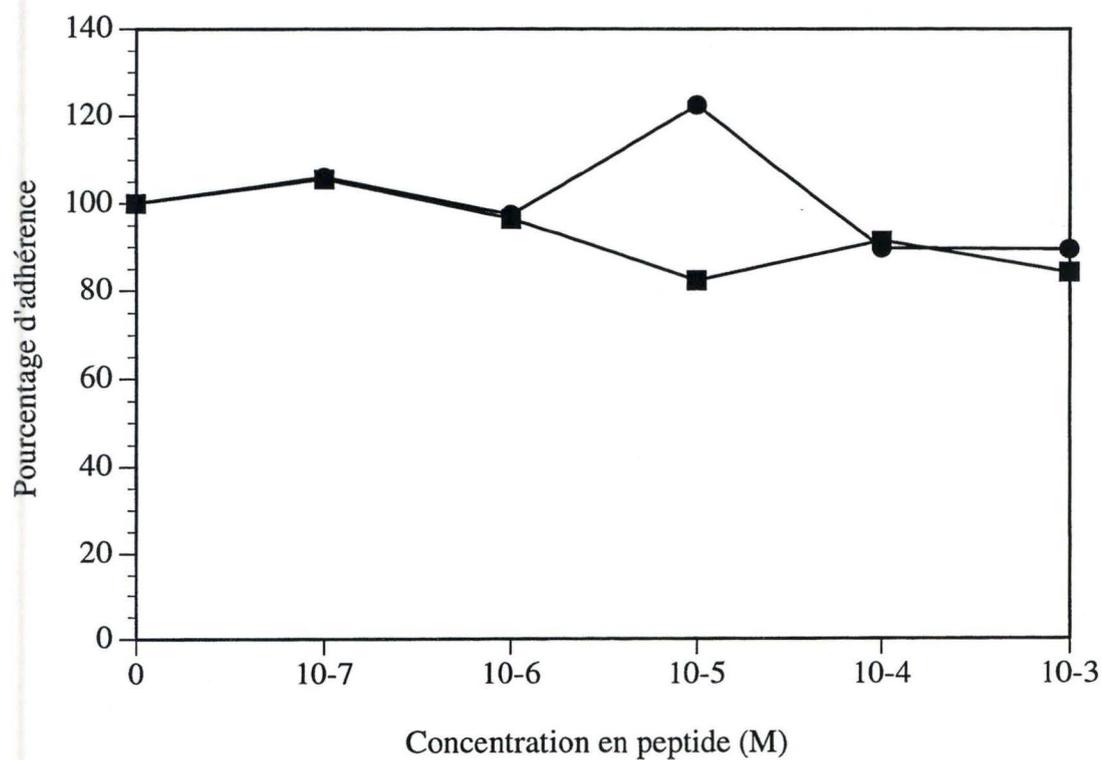


Figure III.7. : Effet du peptide P18 présent en solution à des concentrations allant de 10^{-7} à 10^{-3} M sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération (■) et des cellules THP-1 (●) mises en culture sur la FN. Cette expérience a été réalisée après 15 minutes d'adhérence. Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN en l'absence de peptide.

fait que les cellules ont d'autant plus de chances d'adhérer à la FN par des interactions non spécifiques que le temps d'adhérence est long.

2.3. Comparaison de l'effet inhibiteur du peptide REDV sur l'adhérence des cellules endothéliales et des THP-1

En 1991, Hubbell *et al.* ont découvert un nouveau récepteur spécifique des cellules endothéliales humaines. Ce récepteur reconnaît la séquence peptidique Arg-Glu-Asp-Val (REDV) qui est présente dans un domaine de la FN de plasma humain, sujet à l'épissage alternatif. Ce récepteur est l'intégrine $\alpha_4\beta_1$.

Massia et Hubbell (1992) ont alors montré que l'utilisation d'anticorps anti- α_4 et anti- β_1 pouvait inhiber l'adhérence cellulaire à des peptides REDV greffés sur du verre mais pas à la séquence RGD greffée. De même, ils ont montré que l'adhérence de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine à des substrats reconditionnés par des peptides REDV pouvait être inhibée par des peptides synthétiques REDV et RGD en solution.

Nous avons voulu tester l'effet de ce motif REDV inclus dans le peptide P18 en solution sur l'adhérence des cellules endothéliales et des THP-1. Comme le montre la figure III.7., nous ne pouvons pas observer de différence significative entre l'effet du P18 sur les cellules endothéliales et sur les THP-1 malgré qu'il ait été démontré que le motif REDV pouvait inhiber spécifiquement l'adhérence des cellules endothéliales. Nos résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence un effet inhibiteur des peptides REDV sur les cellules endothéliales.

2.4. Discussion

Suivant nos résultats, nous pouvons conclure que l'efficacité d'un peptide est fonction de la nature du peptide, de sa concentration et du type cellulaire sur lequel l'expérience a été réalisée.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, l'expression des intégrines varie d'un type cellulaire à l'autre. C'est probablement pour cette raison qu'un même peptide peut avoir des effets inhibiteurs différents selon le type cellulaire sur lequel il agit bien qu'on explique pas encore de manière moléculaire satisfaisante, ces différences.

Cardarelli *et al.* (1992) l'ont très bien montré dans les expériences qu'ils ont réalisées sur

des cellules d'ostéosarcome (MG-63) et sur des cellules de fibrosarcome (HT 1080). En effet, ils ont suivi la courbe d'inhibition d'adhérence de ces cellules pour un même peptide cyclique c(CGRGDSPC) et ont constaté des différences importantes entre ces 2 types cellulaires. A une concentration de 1 mM en peptide, ils obtenaient une inhibition de l'adhérence au collagène de type I de 90 % pour les MG-63 et de 30 % pour les HT-1080. D'autres auteurs tels que Koivunen *et al.* (1994) ont montré l'effet d'un peptide cyclique c(CRGDC) sur l'adhérence de cellules B2/α27 (cellules CHO transfectées avec la sous-unité α₅ humaine) et B2/v7 (cellules CHO exprimant l'intégrine α_vβ₅) sur la FN. Ils ont pu observer d'importantes différences entre ces deux types cellulaires. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules B2/α27 expriment majoritairement l'intégrine α₅β₁ tandis que les cellules B2/v7 expriment majoritairement l'intégrine α_vβ₅. Ces expériences confirment bien nos résultats puisque nous avons pu montrer que le peptide C8 avait des effets différents sur l'adhérence des cellules endothéliales et des THP-1. Ainsi, nous obtenons une valeur d'IC 50 (c'est-à-dire la concentration en peptide qui inhibe l'adhérence cellulaire de 50 %) de 4.10⁻⁴ M pour les THP-1 alors qu'elle est de 10⁻³ M pour les cellules endothéliales (tableau III.1.).

D'autre part, comme il a été montré dans la littérature, nous avons pu mettre en évidence l'importance jouée par la conformation du motif RGD. Nous avons résumé l'ensemble des résultats obtenus dans le tableau III.1., qui reprend les IC 50 c'est-à-dire la concentration estimée de peptides induisant 50 % d'inhibition d'adhérence pour les deux types cellulaires et les deux temps d'incubation testés (15 et 30 minutes). Nous pouvons observer que pour le P21, il faut une concentration supérieure à 10⁻³ M pour inhiber de 50 % l'adhérence des cellules endothéliales sur la FN après 15 minutes alors qu'une concentration de 10⁻³ M en peptide le C8 permet d'inhiber l'adhérence de 50 %. Nous obtenons un phénomène comparable pour les THP-1 c'est-à-dire qu'une faible concentration (4.10⁻⁴ M) en peptide C8 suffit pour inhiber l'adhérence de ces cellules de 50 % tandis qu'il faut des concentrations supérieures à 10⁻³ M pour inhiber l'adhérence de ces mêmes cellules par le P21.

De façon générale, nous pouvons admettre que un peptide cyclique RGD est un inhibiteur plus efficace que son correspondant linéaire.

De même, Cardarelli *et al.* (1992) ont montré que les peptides RGD cycliques avaient des effets inhibiteurs plus marqués que leur correspondant linéaire. Cette constatation a été faite sur base des résultats obtenus sur des cellules MG-63 et sur les HT 1080. Pour un peptide linéaire donné GRGDSP, ces auteurs obtiennent une inhibition de l'adhérence sur du collagène de type I, de 30 % alors que son analogue cyclique c(CGRGDSPC) inhibe l'adhérence de MG-63 de 90 % à une concentration de 10⁻³ M. En 1994, ces mêmes auteurs ont testé l'effet inhibiteur de différents peptides sur l'adhérence des cellules

Jurkat, une lignée lymphocytaire sur la FN. A une concentration de 10^{-3} M, le peptide linéaire GRGDSP, testé en solution, inhibe peu l'adhérence de ces cellules sur la FN alors que le peptide cyclique contenant le motif RGD l'inhibe de 85 % environ. Signalons que les IC 50 que nous avons estimés sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus par ces différents auteurs.

D'autres auteurs tels que Mohri *et al.* (1991) ont également pu montrer qu'un peptide cyclique c(GRGDSPA) était plus efficace que son analogue linéaire pour inhiber la liaison des plaquettes à la vitronectine. En effet, les valeurs d'IC 50 du peptide linéaire sont 800 fois supérieures que celle du peptide cyclique.

L'inhibition de l'adhérence des plaquettes stimulées à la thrombine sur la FN a été expérimentée par ces mêmes auteurs en 1993. Ils ont remarqué que la préincubation des plaquettes avec le peptide GRGDSPA inhibe leur adhérence de façon concentration-dépendante, avec une valeur d'IC 50 d'environ $3,75 \cdot 10^{-6}$ M. Le peptide cyclique quant à lui inhibe de manière plus marquée l'adhérence des plaquettes sur la FN. En effet, la valeur de son IC 50 se situe aux alentours de $0,223 \cdot 10^{-6}$ M. Ceci suggère que la cyclisation du peptide augmente bien son affinité pour le récepteur, comparé au peptide linéaire. Signalons que les valeurs d'IC 50 dans cette expérience sont beaucoup plus faibles que celles obtenues dans l'ensemble de nos résultats et des travaux cités précédemment, mais il s'agit de plaquettes, qui ont un comportement très particulier. D'autre part, Kumagai *et al.* (1991) ont aussi montré que ce même peptide cyclique inhibe l'attachement des cellules de carcinome épidermique humain A431 sur la FN alors que sa forme linéaire avait moins d'effet. Ils ont obtenu des résultats semblables pour les cellules de mélanome de souris, B16FE7.

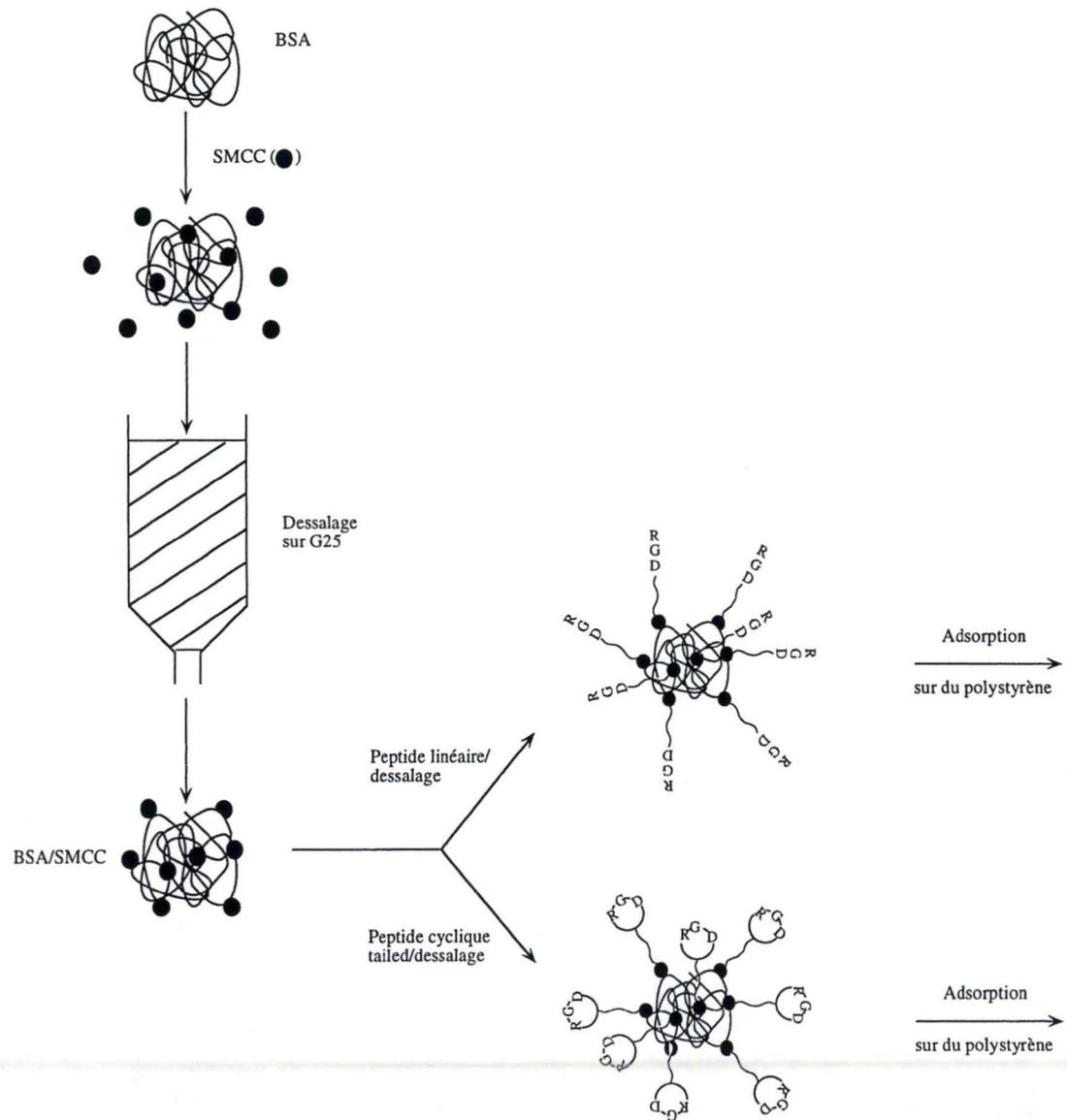
Ayant testé 2 temps d'adhérence différents (15 et 30 minutes), nous avons également pu montrer que l'adhérence cellulaire est fonction non seulement des reconnaissances RGD/intégrines mais aussi d'interactions non spécifiques.

Enfin, dans nos expériences, nous avons testé un nouveau peptide, le peptide T26. Ce peptide correspond au peptide RGD cyclique muni d'un bras d'ancrage, permettant son greffage sur un polymère ou sur une protéine telle que la BSA. Ce peptide a également été testé en solution afin d'estimer son effet inhibiteur avant de le greffer sur de la BSA.

Nous aurions pu nous attendre à un effet du T26 au moins aussi marqué que celui du C8 puisque le motif RGD se situe bien dans une boucle comme cela a été confirmé *in vivo*. Nous constatons cependant que le peptide T26 s'avère moins efficace que le peptide C8. Le manque d'effet de ce peptide peut probablement s'expliquer par le fait qu'il possède une queue qui encombrerait le site de reconnaissance du motif RGD. En outre, ce peptide

tailed aurait moins de liberté de mouvement en solution que son correspondant cyclique. Bien qu'il n'ait pas donné de bons résultats en solution, nous avons décidé malgré tout de le greffer sur la BSA, une molécule que l'on peut qualifier d'anti-adhésive. En effet, une fois greffé par son bras d'ancrage, le peptide T26 ne devrait plus être "gêné" par son bras, tandis que le motif RGD est de nouveau bien exposé en boucle au niveau du cycle. Nous avons donc décidé de greffer le peptide T26 sur la BSA, en espérant lui conférer des propriétés pro-adhésives.

METHODE I :
Greffage de peptides RGD sur de la BSA en solution



METHODE II :
Greffage de peptides RGD sur de la BSA adsorbée sur du polystyrène

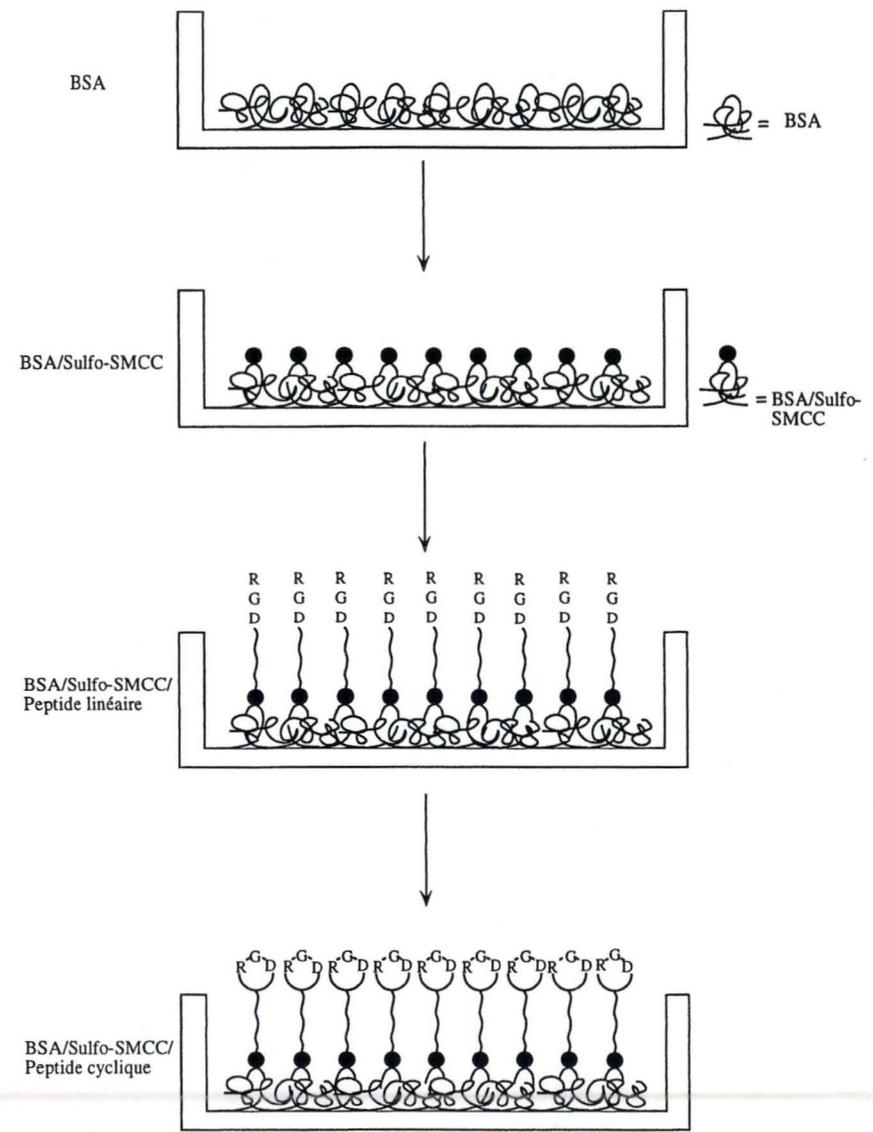


Figure III. 8. : Représentation schématique des deux méthodes de greffage de peptides RGD sur de la BSA.

3. Effets de peptides RGD greffés sur de la BSA sur l'adhérence de cellules endothéliales et de THP-1

Deux stratégies de greffage ont été choisies. D'une part, nous avons choisi de greffer le peptide sur de la BSA en solution dans du PBS. Les molécules de BSA greffées ont alors été utilisées afin de reconditionner des surfaces en polystyrène. D'autre part, nous avons commencé par reconditionner les puits en polystyrène avec de la BSA, avant d'y greffer le peptide désiré (figure III.8.).

3.1. Greffage de peptides RGD sur de la BSA

Nous avons choisi comme protéine, la BSA pour plusieurs raisons :

-la BSA est une protéine possédant des propriétés anti-adhésives. Cette caractéristique est importante puisqu'on désire éviter une adhérence non-spécifique des cellules. On pourra donc évaluer si le greffage de peptides sur la BSA lui confère des propriétés pro-adhésives.

-la BSA est une protéine qui s'adsorbe facilement sur divers supports.

-la BSA possède de nombreuses lysines. Celles-ci sont nécessaires aux greffage de peptides à bras d'ancrage que nous avons synthétisés.

A) Greffage de peptides RGD sur la BSA en solution

Rappelons que le peptide est greffé sur de la BSA préalablement activée par un agent de couplage, le Sulfo-SMCC. Ce conjugué BSA-Sulfo-SMCC est ensuite passé sur une colonne de chromatographie et reconcentré à une concentration finale de 1 mg/ml.

Cette technique nous a posé plusieurs problèmes. Au début de notre travail, nous activions la BSA avec le SMCC dans un mélange DMSO/tampon phosphate 100 mM à pH 7,2. Nous pouvions remarquer une légère précipitation. Nous l'avons attribuée au fait que le SMCC est un composé hydrophobe et donc lorsqu'il est mis en présence d'un tampon phosphate, il précipite. Ainsi, une grosse partie du SMCC n'est plus disponible pour réagir avec la BSA.

D'autre part, une autre cause possible de la précipitation était la formation de polymères de BSA. En effet, la BSA contient 57 lysines et 35 cystéines qui peuvent réagir avec le SMCC, ce dernier possédant des groupements réactionnels à la fois aux cystéines et aux lysines. Il est donc possible que des pontages entre différentes molécules de BSA puissent

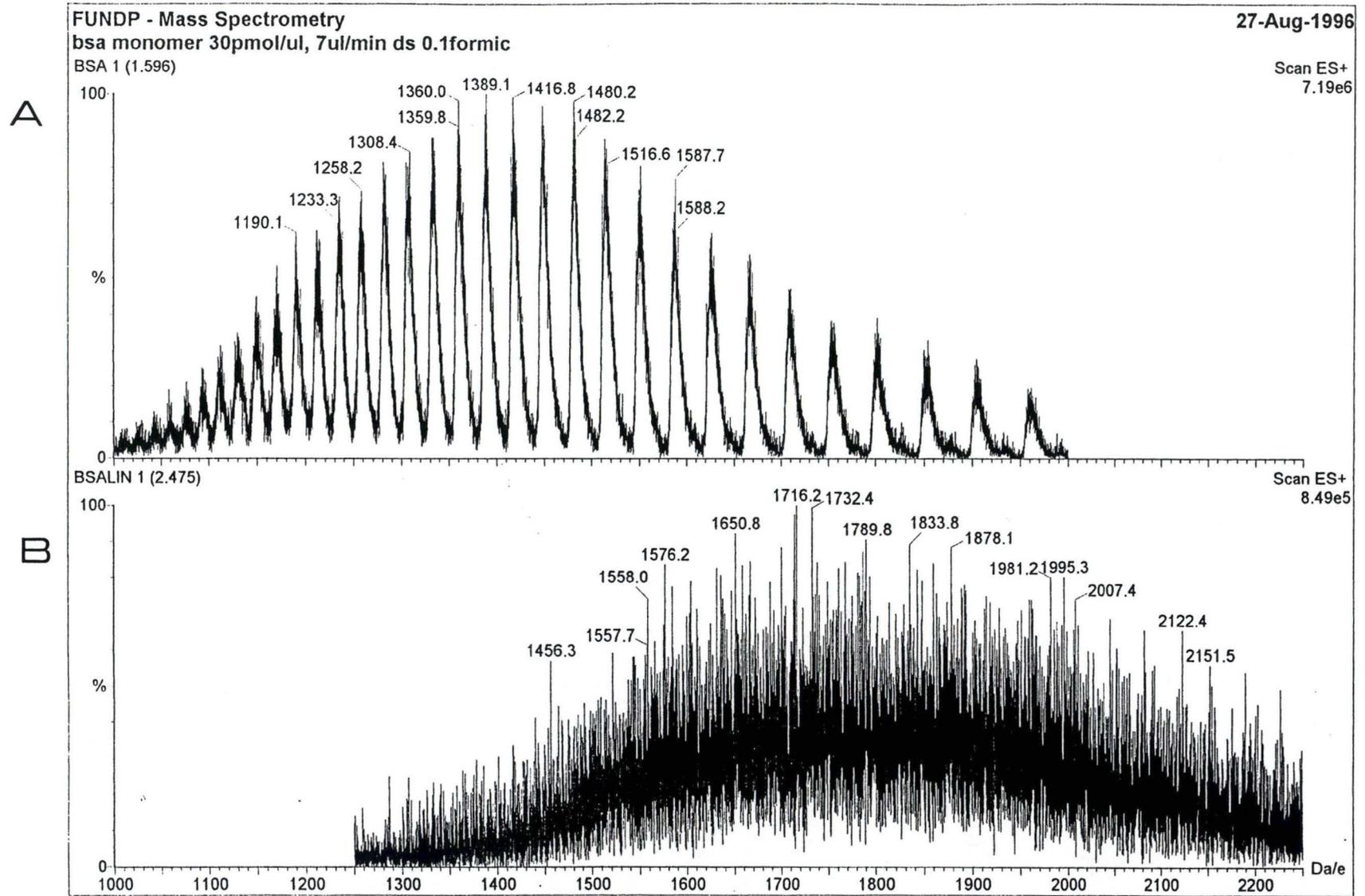


Figure III.9. : Graphe de spectrométrie de masse représentant l'analyse pour la BSA monomérique (A) et pour la BSA porteuse de peptides linéaires P21 (B).

se faire, par l'intermédiaire du SMCC (figure II.2. des matériels et méthodes). Dès lors, après passage sur colonne de chromatographie, on peut s'attendre à des pertes de 10 à 20 %. Suite à ce problème de précipitation, le rendement du couplage s'est révélé plus faible (de l'ordre de 40 %), puisque moins de groupements réactionnels sont disponibles pour le greffage du peptide sur la BSA activée .

Enfin, un autre désavantage est la faible quantité de solution finale de BSA porteuse de peptides greffés. En effet, après passage sur une colonne de chromatographie et après l'étape de reconcentration, nous ne récupérons que quelques centaines de microlitres, ce qui est très faible pour réaliser les expériences d'adhérence.

Afin d'éviter ce problème de précipitation, nous avons choisi un agent activateur plus polaire que le SMCC. Notre choix s'est porté sur l'analogue du SMCC, le Sulfo-SMCC. Nous avons ainsi pu augmenter le rendement de la réaction de greffage du peptide. Le rendement est passé de 40 % à 60 %, voire même plus.

Nous nous sommes alors posés la question d'estimer le nombre de peptides greffés par molécule de BSA. Nous avons tenté de mettre à profit les avantages de l'électrospray couplé à la spectrométrie de masse pour déterminer la quantité de peptides greffés par molécule de BSA. Deux problèmes majeurs sont survenus. Lors d'une analyse par électrospray, la première étape est d'injecter de la BSA standard. Nous avons choisi de prendre un monomère de cette protéine afin de ne pas compliquer le spectre de masse. L'électrospray rend la molécule chargée en ce sens que les acides aminés basiques acceptent un proton. La spectrométrie de masse permet d'obtenir une distribution d'espèces chargées caractéristique de la BSA suivant le rapport masse/charge. Par développement mathématique, cette distribution est transformée en une masse, celle de la BSA.

Ensuite, nous avons suivi la même démarche avec de la BSA greffée avec un peptide. En spectrométrie de masse, on remarque une distribution déplacée vers les hautes masses, ce qui signifie que des peptides ont bien été greffés (figure III.9.). Cependant, le nombre de peptides greffés varie d'une molécule de BSA à l'autre. Pour chaque molécule de BSA, nous obtenons donc une distribution des espèces chargées. Ceci donne lieu à un spectre complexe difficile à analyser. On remarque qu'aucun pic ne ressort vraiment de cette distribution. Dès lors, nous n'avons pas pu déterminer le nombre de peptides greffés par molécule de BSA. Cet échec partiel est dû d'une part à un manque de matériel lié à la faible quantité de solution peptide-BSA obtenue par la méthode du greffage en solution. D'autre part, cet échec peut résulter du fait qu'il existe tellement d'espèces différentes (c'est-à-dire des molécules de BSA avec un nombre de peptides greffés différents) et de

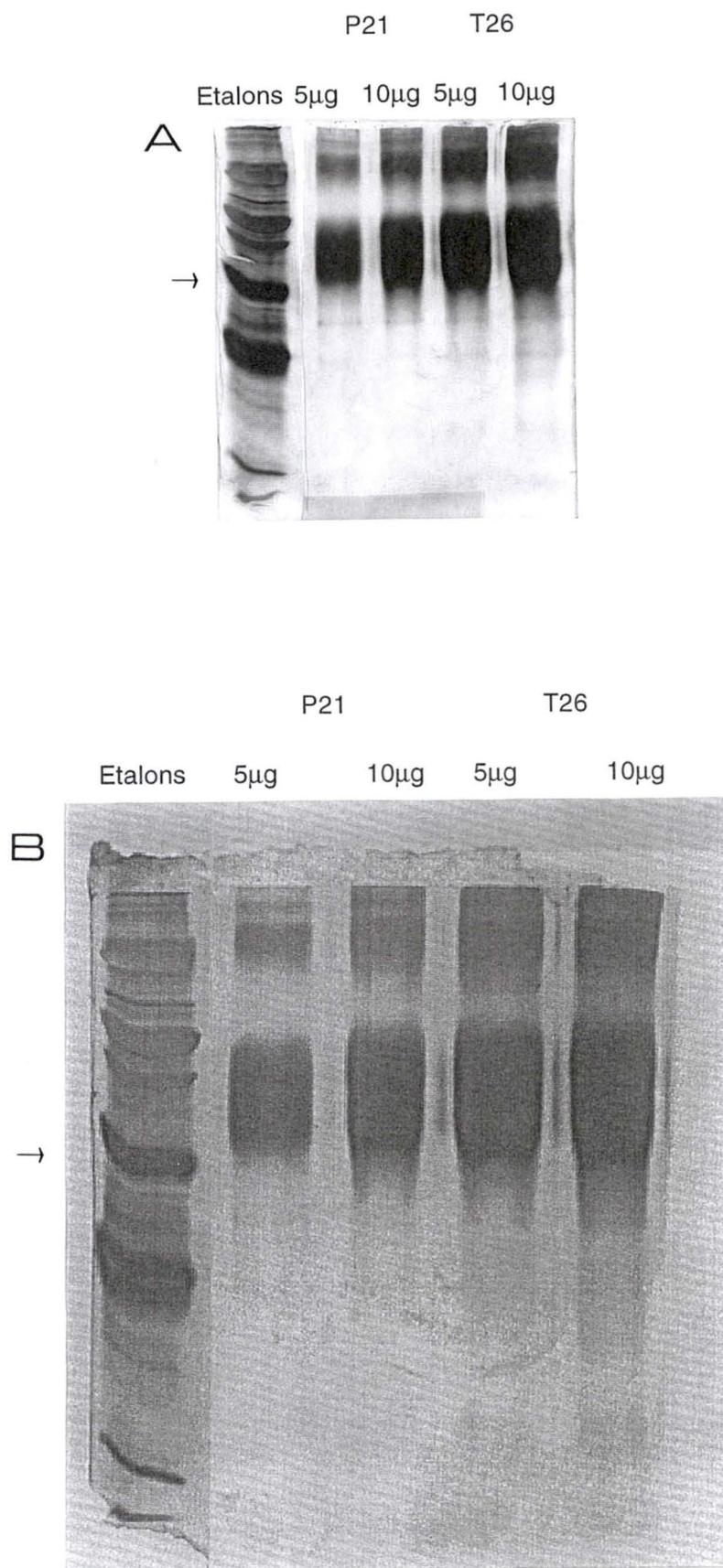


Figure III.10. : Estimation du nombre de peptides P21 et T26 greffés par molécule de BSA, par électrophorèse unidimensionnelle (A). Le gel a été coloré par la coloration à l'argent et puis analysé par le système d'analyse d'images Visage 101 (B), ce qui permet d'estimer le poids moléculaire correspondant aux différentes bandes.

masses proches que tous les pics sont confondus et que le programme informatique ne parvient pas à les déconvoluer.

Etant donné la complexité du problème et l'occupation de l'électrospray, nous avons renoncé à cette méthode d'analyse dans le cadre de ce mémoire. Nous avons donc choisi de nous tourner vers une technique beaucoup plus simple : l'électrophorèse unidimensionnelle (1D) (figure III.10).

Pour cette expérience, la BSA greffée avec un peptide en solution a été déposée sur un gel d'acrylamide. Après migration, le gel a été coloré et les bandes ont été analysées grâce à un système d'analyse d'image. Par comparaison avec la BSA purifiée, nous avons pu estimer grossièrement le nombre de peptides greffés par molécule de BSA. En effet, par cette technique, nous n'avons qu'une idée approximative du nombre de peptides greffés puisque sur le gel, il est impossible de distinguer chaque bande, correspondant à une BSA différemment chargées de peptides. Nous avons donc obtenu une bande assez large ce qui signifie qu'il existe plusieurs espèces de BSA avec des quantités variables de peptides greffés. Grâce à une analyse du gel par un système d'analyse d'images (Visage 101, Millipore), nous avons pu estimer que le nombre de peptides T26 fixés par molécule de BSA varie de 14 à 28. En effet, nous avons obtenu pour chaque peptide deux poids moléculaires correspondant à la BSA greffée avec le peptide : 92.500 et 79.350. En fait, pour chaque peptide, il existe deux sous-populations. De ces résultats, nous avons retranché le poids moléculaire (PM) de la BSA ($92.500 - 66.000 = 26.500$ et $79.350 - 66.000 = 13.350$). Ainsi, nous connaissons le PM des peptides greffés. Sachant le PM du peptide (935,1), nous pouvons calculé le nombre de peptides greffés par molécule de BSA. C'est pourquoi le nombre de peptides greffés se situe entre deux valeurs. Pour le peptide P21, ce nombre varie de 15 à 36 et ceci à l'erreur expérimentale près. Cela signifie qu'il existe des molécules de BSA avec plus de 50 % des lysines qui auraient réagi.

B) Greffage de peptides RGD sur la BSA adsorbée

Dans cette approche, la BSA est tout d'abord adsorbée au fond des puits en polystyrène. Ensuite, le peptide peut être greffé grâce à un agent de couplage, le Sulfo-SMCC. Cette fois, seules les lysines de surface, c'est-à-dire accessibles au solvant et à l'agent activateur, peuvent réagir. Les résidus enfouis dans la molécule de BSA ne nous intéressent pas puisqu'ils ne seront pas disponibles pour les cellules. Si on compare cette stratégie avec celle où la BSA est greffée en solution, des pontages peuvent également se produire entre molécules de BSA mais à un taux inférieur puisque les pontages ne peuvent se réaliser soit qu'entre molécules de BSA proches soit au sein même de la molécule de BSA. L'utilisation du SMCC nous a également posé un problème puisqu'en présence

d'un mélange DMSO/tampon phosphate, il précipite. Dans ce cas-ci, nous ne pouvons pas dire que cette précipitation est due à la polymérisation de molécules de BSA puisque cette protéine est déjà adsorbée au fond des puits. A nouveau, afin d'éviter la précipitation du SMCC, nous avons utilisé son analogue hydrophile, le Sulfo-SMCC.

C) Discussion

Si nous comparons les 2 techniques, d'un point de vue pratique, la technique où le peptide est greffé sur de la BSA adsorbée est beaucoup plus simple à mettre en oeuvre que celle où le peptide est greffé sur de la BSA en solution. En effet, on évite les passages sur colonne de chromatographie. De plus, une seule journée suffit pour réaliser cette expérience alors que le greffage de peptide sur la BSA en solution nécessite deux journées. Nous n'avons malheureusement pas pu comparer les rendements de la réaction de couplage en solution et sur la BSA adsorbée. En effet, il est difficile de connaître le rendement du greffage sur la BSA adsorbée car la quantité de peptides greffés est très faible par rapport à la masse totale de la BSA. L'iodination sur la tyrosine des peptides greffés devrait permettre de répondre en partie à cette question.

Cependant, d'un point de vue financier, le coût de l'expérience du greffage sur BSA adsorbée est un peu plus élevé que celui sur la BSA en solution. La quantité de Sulfo-SMCC nécessaire à l'activation de la BSA adsorbée dans chaque puits est plus importante que celle utilisée pour le greffage sur de la BSA en solution.

Quant aux problèmes de précipitation que nous avons rencontrés, nous pouvons les expliquer en nous référant à Hashida *et al.* (1984). En effet, ces auteurs ont étudié le couplage par les groupements thiols de la Horse-radish peroxydase (HRP) avec des fragments d'anticorps F(ab'), par l'utilisation de groupements maléimides comme agent de couplage. Ces groupements se retrouvent au sein du SMCC et du Sulfo-SMCC. Ils ont observé que le SMCC utilisé n'était pas très soluble dans la solution tamponnée de la réaction et qu'il précipitait. Par contre, lorsque la réaction se déroule à pH 7, pendant 30 à 60 minutes, le rendement de l'activation de la peroxydase augmentait. Les groupements activateurs sont donc stables dans ces conditions. En effet, le SMCC et le sulfo-SMCC ne s'inactivent que de 5% (ou moins) à 30°C à pH 7,0 pendant 1 heure. Selon ces mêmes auteurs, il semblerait donc que le SMCC reste soluble lorsque sa concentration dans la solution réactionnelle est de l'ordre de 1,5 mM mais si sa concentration est supérieure à 3,7 mM, il précipite. Or, dans nos expériences, nous l'avons utilisé à du 5 mM. Il était donc normal d'observer une précipitation dans le milieu réactionnel. Quant au Sulfo-SMCC, il est suffisamment soluble dans le tampon phosphate pour obtenir une activation

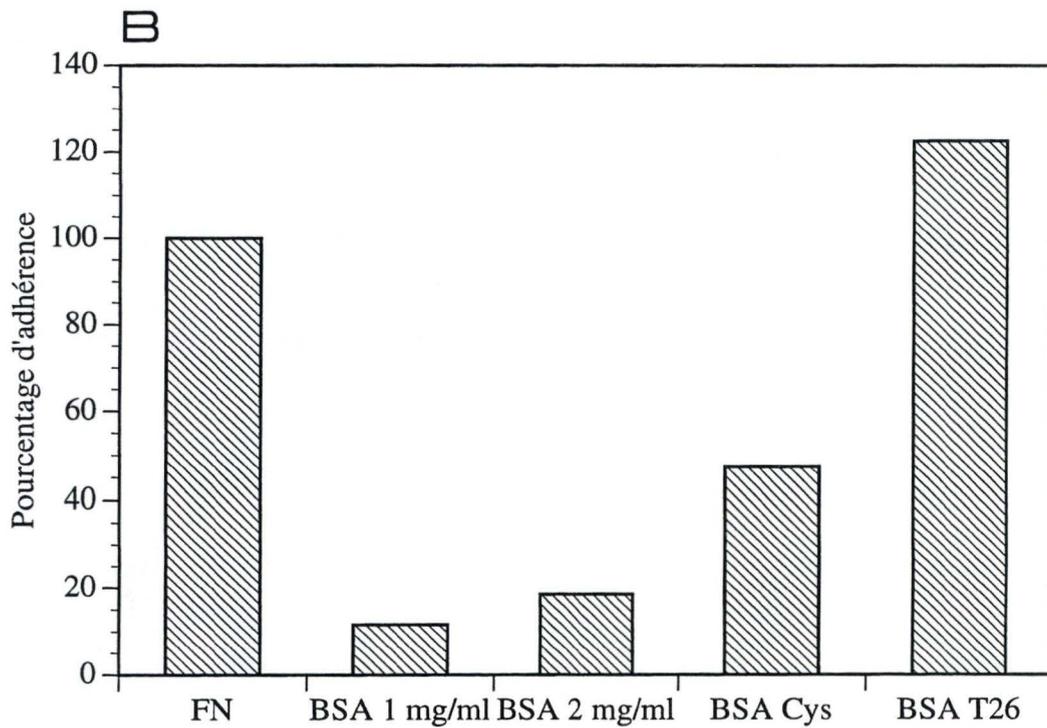
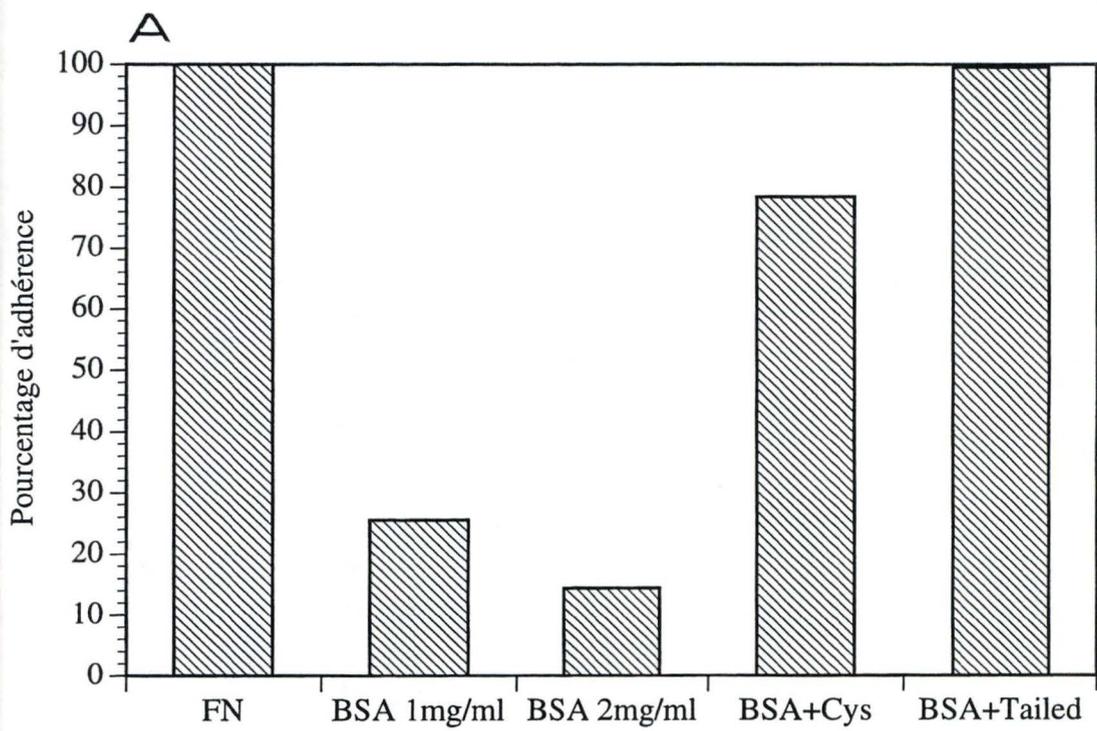


Figure III.11. : Effet du peptide T26 greffé sur de la BSA en solution, à une concentration de $2 \cdot 10^{-4} M$, sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération.

A) après 30 minutes d'adhérence.

B) après 15 minutes d'adhérence. L'adhérence des cellules a été évaluée sur le support reconditionné avec de la BSA native à 1 et 2 mg/ml de PBS, ainsi qu'avec de la BSA modifiée sur laquelle on a greffé soit des cystéines, soit le peptide cyclique RGD T26.

Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN.

maximale par les groupements maléimides. Le nombre de groupements maléimides introduits par l'utilisation de SMCC est légèrement inférieur à ceux introduits par l'utilisation du Sulfo-SMCC. Ceci s'explique par la plus faible solubilité du SMCC.

3.2. Adhérence de cellules endothéliales et de THP-1 sur de la BSA modifiée avec des bras peptidiques RGD

Sachant que sur un support conditionné avec de la BSA, les cellules adhèrent très mal, nous avons voulu tester l'activité biologique des peptides greffés sur de la BSA, en évaluant dans quelle mesure, ils confèrent à la BSA des propriétés pro-adhésives. Comme deux méthodes de couplage ont été réalisées (sur de la BSA en solution et sur de la BSA adsorbée), nous avons voulu les comparer.

A) Comparaison de l'adhérence cellulaire sur de la BSA modifiée par les 2 méthodes de couplage

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet pro-adhésif de peptides RGD greffés sur de la **BSA en solution**.

La figure III.11.A nous montre l'adhérence de cellules endothéliales sur du peptide T26 greffé sur de la BSA en solution, après un temps d'incubation cellules-BSA+peptide de 30 minutes. Cet effet est comparé au contrôle positif qu'est la FN. Nous l'avons arbitrairement porté à 100 % d'adhérence cellulaire.

Par contre, peu de cellules adhèrent sur la BSA ce qui confirme les propriétés anti-adhésives de la protéine, quelque soit sa concentration pour conditionner le support (1 et 2 mg/ml de PBS).

Enfin, nous pouvons remarquer que le peptide tailed reproduit un effet pro-adhésif semblable à celui de la FN. Ceci nous montre qu'en greffant un peptide RGD sur de la BSA protéine anti-adhésive, nous sommes parvenus à reproduire les effets pro-adhésifs de la FN.

Nous avons réalisé un contrôle intermédiaire qui consistait à greffer des cystéines sur de la BSA, ceci afin de s'assurer que l'adhérence observée était bien RGD dépendante. On remarque que le pourcentage d'adhérence des cellules endothéliales s'élève à 78 % alors qu'il n'existe pas de motif RGD susceptible d'être reconnu par les intégrines des cellules. Ceci peut s'expliquer par une adhérence non-spécifique des cellules sur la BSA-Cys, les cystéines neutralisant un certain nombre de charges sur la BSA, au même titre que le peptide.

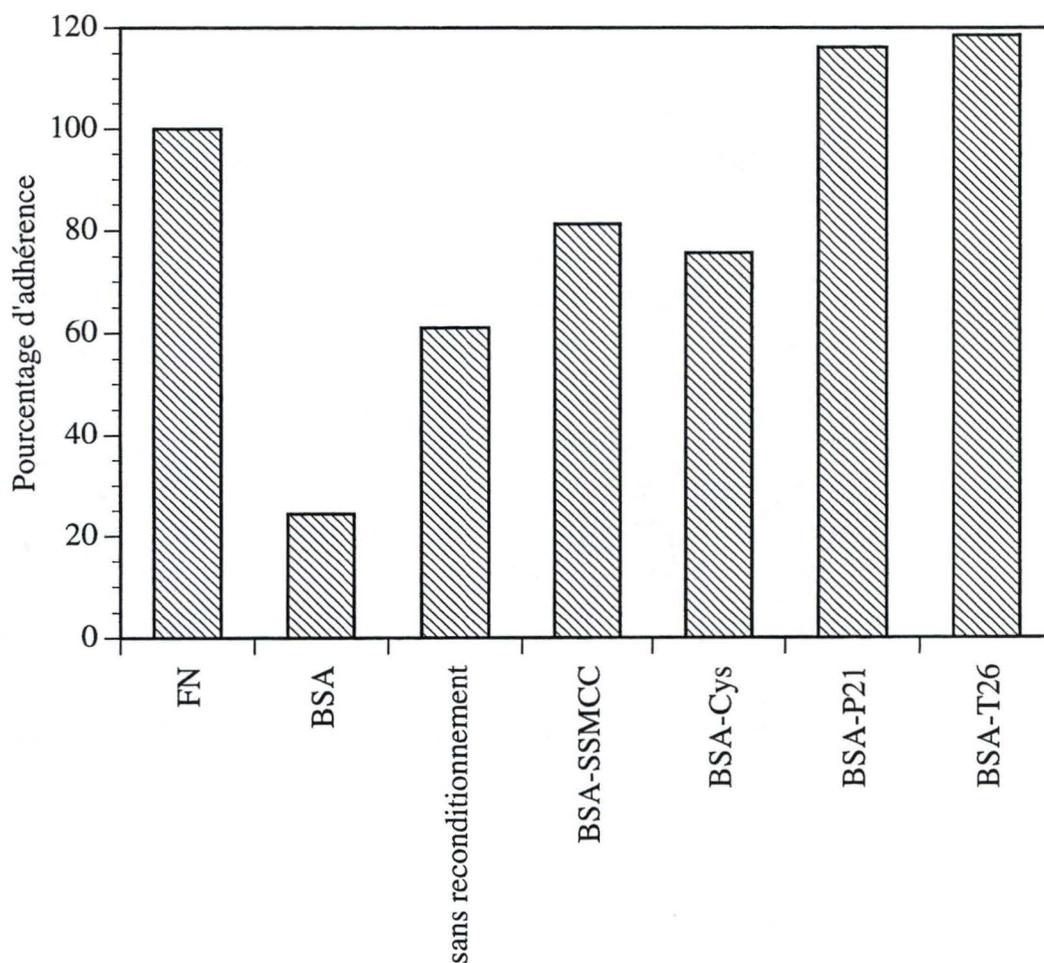


Figure III.12. : Effet des peptides P21 et T26 greffés sur de la BSA adsorbée, à une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ M, sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération après 30 minutes d'adhérence. L'adhérence des cellules a été évaluée sur le support reconditionné avec de la BSA native à 2 mg/ml de PBS, sur le support non reconditionné, sur le support reconditionné avec de la BSA modifiée avec du Sulfo-SMCC(SSMCC), de la cystéine (BSA-Cys) et avec le bras peptidique P21 (BSA-P21) et T26 (BSA-T26). Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN.

Afin de mieux discriminer les différents substrats et de diminuer l'effet d'adhérence non-spécifique exercé par la BSA-Cys, nous sommes passés de 30 minutes d'incubation à 15 minutes (figure III.11.B).

Dans ce cas, nous observons une diminution de l'effet d'adhérence non spécifique puisque l'adhérence des cellules endothéliales sur la BSA-Cys, passe de 78 % à 48%. Par contre, nous confirmons le net effet pro-adhésif du peptide tailed. On remarque ici que nous dépassons même légèrement l'effet pro-adhésif de la FN puisqu'on obtient jusqu'à 120 % d'attachement cellulaire par rapport à la FN.

D'autres expériences d'adhérence de cellules ont ensuite été réalisées sur la **BSA adsorbée** sur le polystyrène puis seulement modifiée avec des peptides RGD greffés. Ainsi, comme le montre la figure III.12., l'adhérence des cellules endothéliales après 30 minutes d'incubation sur de la BSA greffée avec des peptides P21 et T26 a été testée. A ce temps d'incubation, on peut remarquer que le peptide linéaire et le peptide tailed ont quasi le même effet sur l'adhérence des cellules, le pourcentage d'adhérence avoisinant les 120 %. Dans ce cas, nous n'avons pas pu montrer que la cyclisation du motif RGD pouvait jouer un rôle important dans l'adhérence cellulaire.

Comme précédemment, nous observons l'effet anti-adhésif de la BSA puisque seulement 25 % des cellules endothéliales y ont adhéré.

Nous avons à nouveau réalisé un certain nombre de contrôles intermédiaires, en testant l'adhérence des cellules en culture sur de la BSA-Sulfo-SMCC, de la BSA-Cys et sur le PS non traité. Nous constatons que les valeurs correspondantes sont assez élevées et se situent entre 60 et 80 % d'adhérence. Nous avons donc tenté de réduire le temps d'adhérence des cellules à 15 minutes dans l'espoir de mieux discriminer les différents substrats, c'est ce que nous montre la figure III.13.

Comme nous pouvons le remarquer, nous avons ainsi réussi à mieux discriminer l'adhérence spécifique de la non spécifique. En effet, l'adhérence sur le PS non traité passe de 60 à 35 %, tandis que celle sur la BSA-Cys passe de 75 à 50 %.

De façon étonnante, l'adhérence sur la BSA-Sulfo-SMCC reste très élevée alors que le motif RGD n'apparaît pas dans ce conjugué.

Pour le temps d'adhérence de 15 minutes, trois peptides (T26, P21 et T29) ont été greffés sur de la BSA.

Si nous comparons les valeurs d'adhérence obtenues, nous pouvons remarquer que l'effet pro-adhésif lié au peptide tailed T26 est supérieur de 45 % à celui de la FN et supérieur de 30 % au pourcentage d'adhérence de cellules sur le peptide linéaire P21 alors qu'à 30 minutes d'incubation, nous ne pouvions faire de distinction entre les 2 peptides. Ceci s'explique si on considère que pour un temps d'adhérence de 30 minutes, en plus d'une adhérence spécifique via les RGD, il se produit également une adhérence non

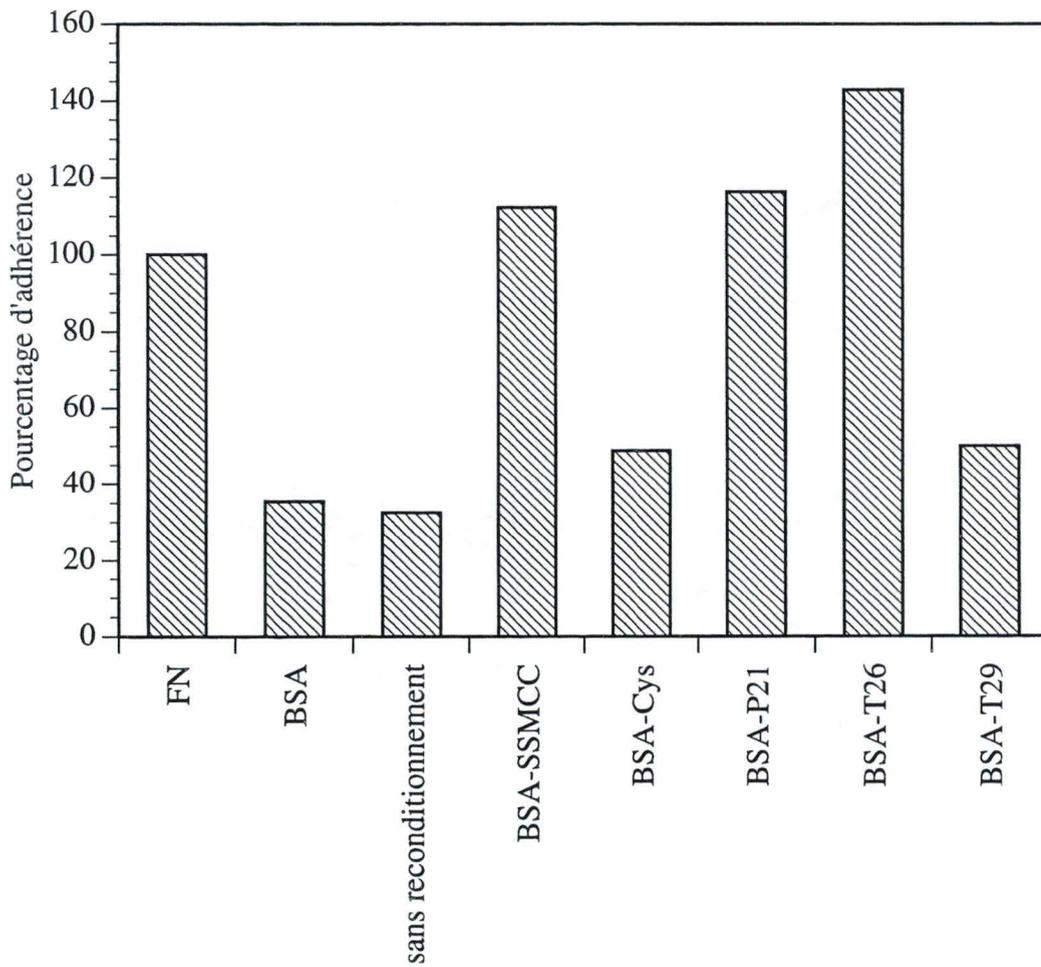


Figure III.13. : Effet des peptides P21, T26 et T29 greffés sur de la BSA adsorbée, à une concentration de 2.10^{-4} M, sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération après 15 minutes d'adhérence. L'adhérence des cellules a été évaluée sur le support reconditionné avec de la BSA native à 2 mg/ml de PBS, sur le support non reconditionné, sur le support reconditionné avec de la BSA modifiée avec du Sulfo-SMCC(SSMCC), de la cystéine (BSA-Cys) et avec le bras peptidique P21 (BSA-P21), T26 (BSA-T26) et T29 (BSA-T29). Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN.

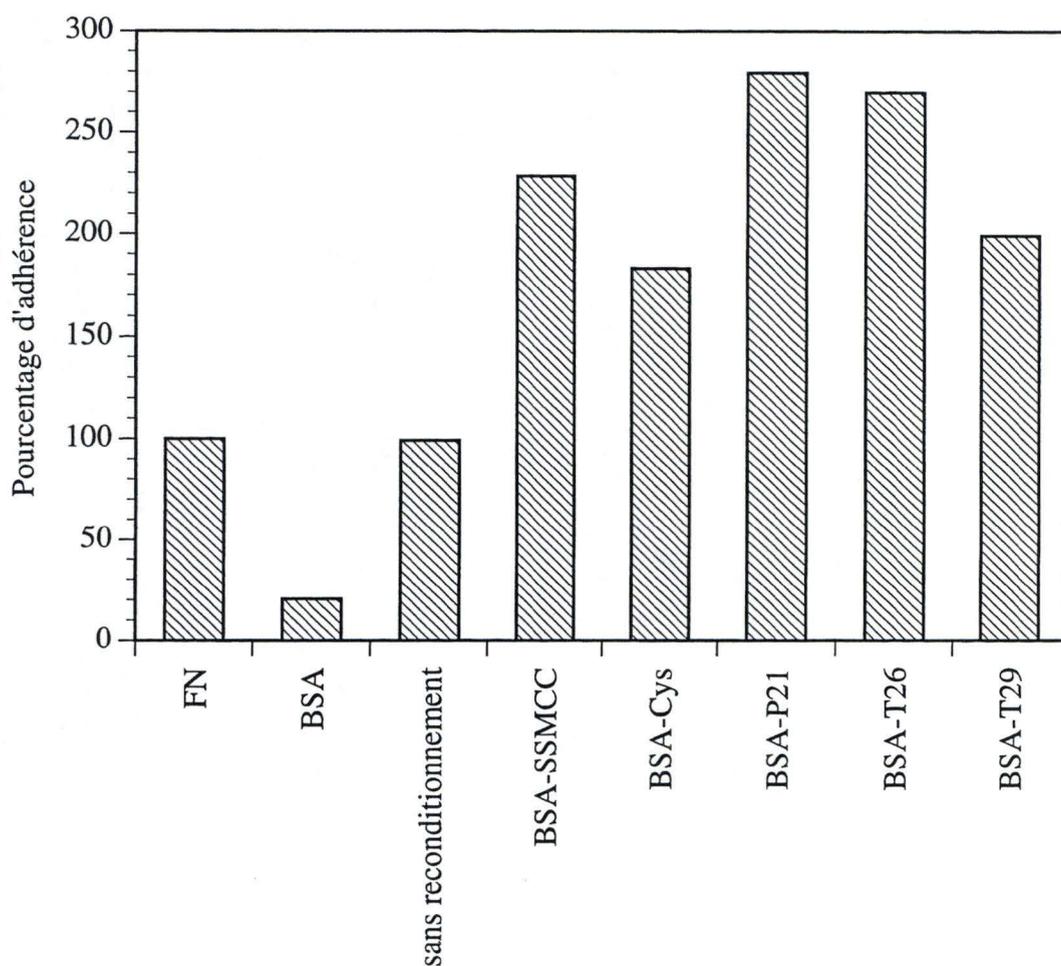


Figure III.14. : Effet des peptides P21, T26 et T29 greffés sur de la BSA adsorbée, à une concentration de $2 \cdot 10^{-4} M$, sur l'adhérence des cellules THP-1 après 15 minutes d'adhérence. L'adhérence des cellules a été évaluée sur le support reconditionné avec de la BSA native à 2 mg/ml de PBS, sur le support non reconditionné, sur le support reconditionné avec de la BSA modifiée avec du Sulfo-SMCC(SSMCC), de la cystéine (BSA-Cys) et avec le bras peptidique P21 (BSA-P21), T26 (BSA-T26) et T29 (BSA-T29).

Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN.

spécifique sur la BSA greffée.

Comme nous le montre la figure III.13., nous avons également testé le peptide T29 correspondant à un RGD aléatoire. Les résultats confirment bien que la cyclisation du motif RGD dans l'ordre est nécessaire pour conférer un effet pro-adhésif à la BSA puisque seulement 50 % des cellules endothéliales adhèrent au peptide T29, ce qui équivaut plus ou moins au pourcentage d'adhérence obtenu sur de la BSA-Cys.

Etant donné l'importance du type cellulaire dans les phénomènes d'adhérence médiés par les intégrines et les composants de la MEC, nous avons également étudié l'adhérence des cellules THP-1 sur ces mêmes substrats (figure III.14.). Ces cellules ont le désavantage d'être très difficiles à manipuler. En effet, ces cellules adhèrent peu et la méthode de quantification de l'adhérence passe par des rinçages susceptibles de détacher les cellules de manière artificielle. Nous avons donc observé une très grande variabilité, d'une expérience à l'autre, dans la densité de THP-1 encore présentes au fond des puits après rinçage ce qui rend l'interprétation des résultats difficile. C'est probablement pour cette raison que nous atteignons des valeurs d'adhérence de cellules sur la BSA modifiée avec les peptides RGD, 3 fois supérieures à celles enregistrées pour la FN.

Dans cette expérience, nous pouvons voir malgré tout un effet pro-adhésif du peptide linéaire et du peptide tailed contenant le motif RGD. Le peptide T29 contenant un RGD aléatoire favorise également l'adhérence cellulaire, de manière comparable à la BSA-Cys et légèrement inférieure à la BSA-Sulfo-SMCC. Ces contrôles négatifs sont également élevés puisqu'on atteint 180 % d'adhérence avec la BSA-Cys et 230 % d'adhérence avec la BSA-Sulfo-SMCC. Les expériences sur les cellules endothéliales et sur les THP-1 à 15 minutes ont été réalisées avec le même lot de BSA-Sulfo-SMCC. Ceci pourrait expliquer que les pourcentages d'adhérence pour ce type de support sont très élevés pour l'expérience sur les cellules endothéliales et celle sur les THP-1. L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et devrait être répétée, avant de tirer des conclusions.

Dans ces expériences, tous les peptides ont été greffés par liaison covalente ce qui constitue une démarche originale d'un point de vue scientifique. En effet, jusqu'à présent, nous sommes les seuls à avoir synthétisé des peptides cycliques munis d'un bras d'ancrage afin de les greffer sur un support protéinique en vue de promouvoir l'adhérence cellulaire. Notre démarche est également valable en ce sens que nous contrôlons mieux l'orientation des peptides greffés. Ainsi, nous espérons que le motif RGD soit plus accessible aux intégrines des cellules puisqu'il se retrouve dans la boucle "perchée" au niveau de la queue du peptide cyclique. De plus, le peptide est fixé de manière stable, covalente, ce qui évite sa désorption. Malgré tout, nous avons voulu voir si la simple adsorption de peptides sur la BSA sans greffage covalent pouvait également améliorer

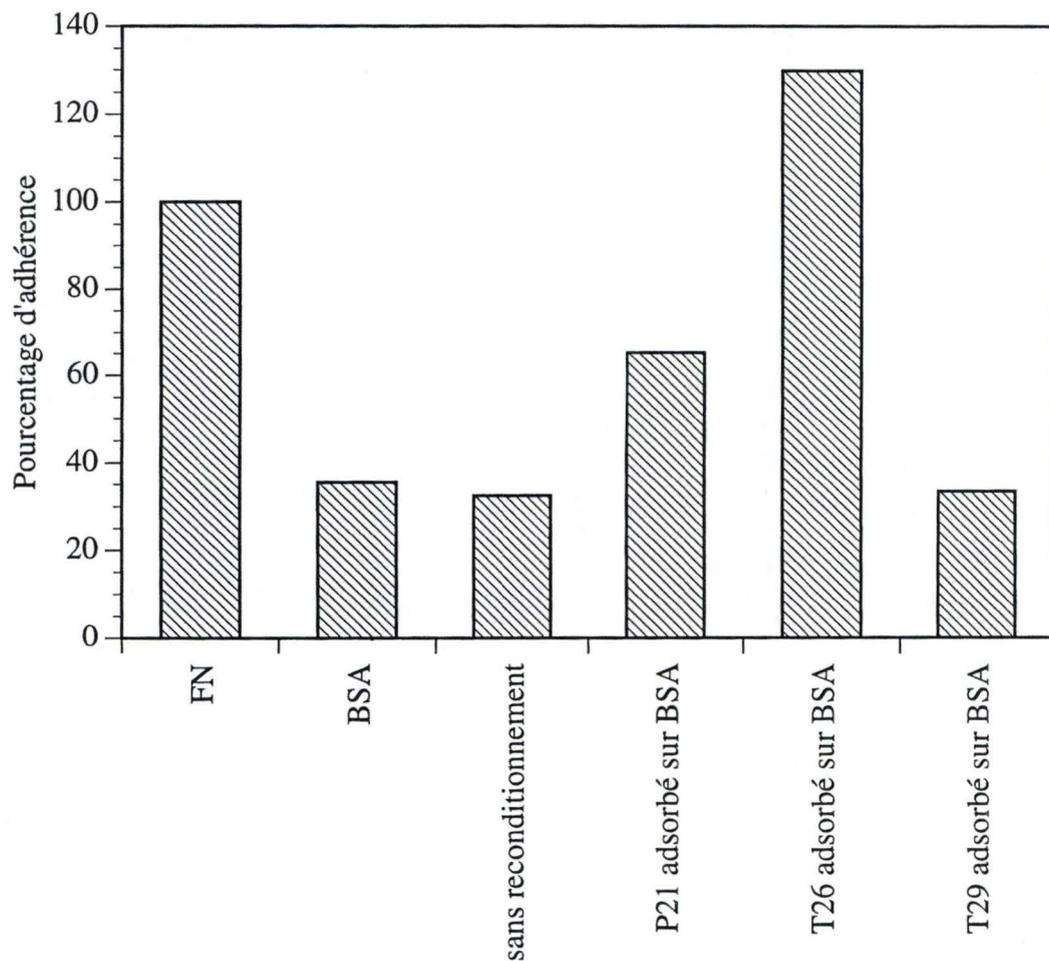


Figure III.15. : Effet des peptides P21, T26 et T29 adsorbés sur de la BSA elle-même adsorbée, à une concentration de $2 \cdot 10^{-4} M$, sur l'adhérence des cellules endothéliales en troisième génération après 15 minutes d'adhérence. L'adhérence des cellules a été estimée sur le support reconditionné avec de la BSA native (2 mg/ml de PBS), le support non reconditionné et le support reconditionné à la FN.

Le contrôle 100 % correspond au nombre de cellules qui adhèrent sur la FN.

l'adhérence de cellules sur de la BSA.

La figure III.15. nous renseigne sur l'effet pro-adhésif de cellules endothéliales exercé par des peptides adsorbés sur de la BSA. Pour ce faire, la BSA est incubée.

Nous pouvons constater que dans ces conditions, le peptide T26 peut promouvoir l'attachement des cellules endothéliales sur la BSA. En effet, nous obtenons un effet pro-adhésif supérieur à celui de la FN puisque nous atteignons 130 % d'adhérence. Nous remarquons également que le peptide T26 est le seul à avoir cet effet pro-adhésif. Le peptide P21 n'atteint en effet que 65 % d'adhérence.

Quant au peptide T29, le pourcentage d'adhérence est de 32 % ce qui correspond à l'adhérence de cellules sur de la BSA seule.

A nouveau, nous constatons que le motif RGD conserve son importance puisque l'adhérence des cellules endothéliales sur de la BSA n'est significativement augmentée que si un peptide cyclique est adsorbé sur de la BSA. Cependant, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Il faut donc rester prudent quant à ces conclusions. Dès lors, d'autres expériences devront être effectuées afin de confirmer qu'une simple adsorption suffit pour augmenter l'adhérence cellulaire par rapport à la FN.

B) Discussion

Suite à nos expériences, nous pouvons conclure que, dans les conditions expérimentales utilisées (c'est-à-dire 15 minutes d'adhérence), il n'existe pas de différence quant à l'adhérence cellulaire entre les tests qu'ils aient été réalisés sur des peptides greffés sur de la BSA en solution ou sur de la BSA adsorbée.

Tout comme nous l'avions observé pour les tests réalisés en solution, nous avons pu mettre en évidence l'importance jouée par la conformation du motif RGD. Ainsi, on peut remarquer que d'un peptide à l'autre, une variabilité dans l'adhérence cellulaire peut être observée. D'après nos résultats, c'est bien le peptide T26 greffé qui a l'effet pro-adhésif le plus marqué. Le peptide P21 par contre a un effet moins prononcé que le peptide T26, ce que l'on peut expliquer par le fait que le motif nécessaire à l'attachement cellulaire ne se trouve pas dans sa conformation idéale. Nous pouvons donc dire que la cyclisation du motif RGD joue un rôle positif dans l'attachement de cellules. Ces résultats sont conformes avec les données de la littérature. Mohri *et al.* (1991) ont montré que la cyclisation d'un peptide RGD pouvait augmenter l'affinité du peptide de 10 fois par rapport au peptide linéaire.

Gurrath *et al.* (1992) ont également montré qu'une perturbation, même légère, au niveau du motif RGD telle que l'introduction d'une arginine et d'un acide aspartique dextrogyre dans un peptide cyclique RGD a pour conséquence une chute de l'activité inhibitrice

lorsque ce peptide est en solution.

Enfin, le peptide aléatoire T29 n'a que peu d'effet sur l'adhérence des cellules. Le pourcentage d'adhérence obtenu est même inférieur à celui de la FN, ce qui semble logique puisqu'il ne contient pas la séquence RGD reconnue par les intégrines.

Encore une fois, ces résultats sont conformes à la littérature Pierschbacher et Ruoslahti (1984) avaient déjà démontré que la séquence RGD était importante pour l'adhérence des cellules NRK (cellules de rein de rat) sur la FN. En effet, ils ont testé différentes substitutions au niveau du motif RGD et ont constaté une faible inhibition de l'adhérence de ces cellules sur la FN lorsqu'ils étaient en solution.

Afin d'évaluer l'effet pro-adhésif de peptides, d'autres auteurs ont testé l'adhérence cellulaire sur des peptides greffés sur un support, mais il s'agit toujours de peptides linéaires, et non de peptides cycliques.

Ainsi, Lin *et al.* (1992) ont réalisé des expériences d'adhérence de cellules endothéliales sur des peptides linéaires greffés de façon covalente sur du polyuréthane. Ils constatèrent que l'adhérence cellulaire variait d'un peptide RGD à l'autre. De plus, ils ont également confirmé l'importance du motif RGD dans l'attachement des cellules endothéliales. Ils ont comparé l'adhérence des cellules sur les peptides GRGESY et **GRGDSY**, greffés sur le polyuréthane. Le peptide linéaire GRGESY n'avait que peu d'effet sur l'adhérence de ces cellules par rapport au peptide **GRGDSY**.

En 1993, Hirano *et al.* ont testé l'adhérence de différents types cellulaires sur différents peptides greffés sur un copolymère d'éthylène et d'acide acrylique. Ils ont observé un pourcentage d'attachement variable suivant les types cellulaires utilisés.

Ceci est en accord avec nos résultats puisque les valeurs obtenues avec les THP-1 sont, en général, supérieures à celles des cellules endothéliales.

Enfin, les résultats obtenus avec les peptides adsorbés sur la BSA sont étonnants : l'effet pro-adhésif du peptide T26 est comparable à celui survenu après greffage covalent sur la BSA et l'on observe une différence beaucoup plus marquée entre le peptide T26 et le peptide P21. Cette expérience n'a été réalisée qu'une fois et nous n'avons aucune idée du nombre de peptides greffés dans un cas sur la BSA ou adsorbés sur celle-ci dans l'autre cas. L'utilisation de peptides marqués à l'iode 125, via la tyrosine (prévue à cet effet) devrait permettre de lever une partie de cette inconnue.

4. Effets de peptides greffés sur la formation de plaques d'adhérence

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la phosphorylation de protéines spécifiques est le premier événement détecté suite à une occupation des intégrines soit par un constituant de la MEC, soit par l'utilisation d'anticorps. Cette phosphorylation de protéines sur les tyrosines est une réponse commune à l'activation des intégrines dans beaucoup de cellules parmi lesquelles on retrouve les fibroblastes, les leucocytes, ... Ces protéines ont été localisées au niveau des plaques d'adhérence focale. Parmi les protéines phosphorylées, on retrouve la pp125^{FAK} une tyrosine kinase, mais aussi la paxilline, la tensine associées aux microfilaments, ...

Il a été démontré que ces plaques d'adhérence focale ne se forment que lorsque l'adhérence cellulaire fait intervenir les intégrines. Par exemple, sur la poly-L-lysine, on n'observe ni plaque d'adhérence focale ni phosphorylation de la pp125^{FAK}. Une manière de voir dans quelle mesure les peptides RGD peuvent exercer des effets biologiques comparables à ceux exercés par exemple par la FN, consiste à étudier leur capacité éventuelle à induire la formation de plaques d'adhérence focale ainsi que la phosphorylation des protéines associées à ces plaques, telle la pp125^{FAK}.

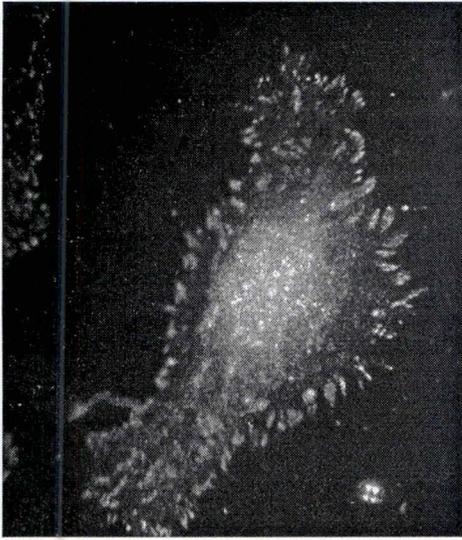
Nous avons choisi un marquage des phosphotyrosines parce que le marquage de la pp125^{FAK} est moins prononcé puisqu'il ne représente qu'une seule protéine. En effet, au niveau des plaques d'adhérence focale, il existe plusieurs protéines qui sont phosphorylées sur leurs tyrosines. De ce fait, la fluorescence sera beaucoup plus marquée.

Nous avons donc voulu vérifier si les peptides greffés, contenant le motif RGD, étaient également capables d'induire la formation de plaques d'adhérence au même titre que la FN. Pour ce faire, un test immunocytochimique a été réalisé sur différents types de supports tels que d'une part la FN, la BSA, la poly-L-lysine, du verre non traité et d'autre part la BSA-Cys, la BSA-Sulfo-SMCC, la BSA-P21 et la BSA-T26 après 2 et 4 heures d'adhérence cellulaire (figure III.16. et 17.).

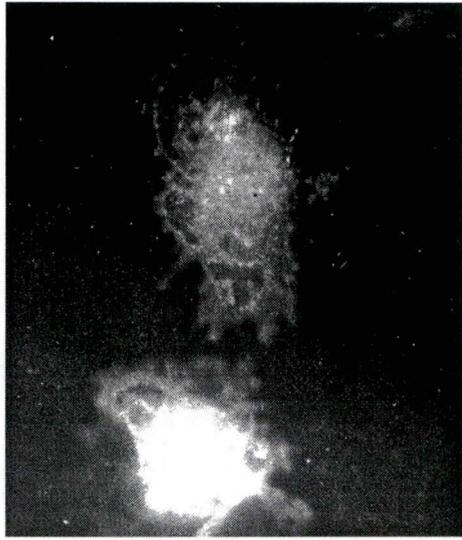
4.1. Résultats

La FN a été choisie comme contrôle positif. Sur ce support, suite à la reconnaissance de la FN par les intégrines, les cellules adhèrent, s'étalent et présentent de

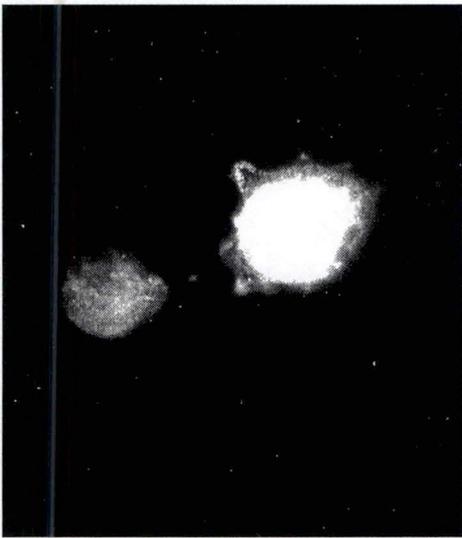
A



B



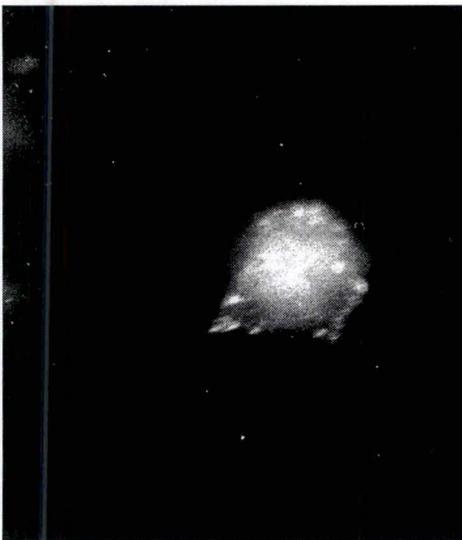
C



D



E



F



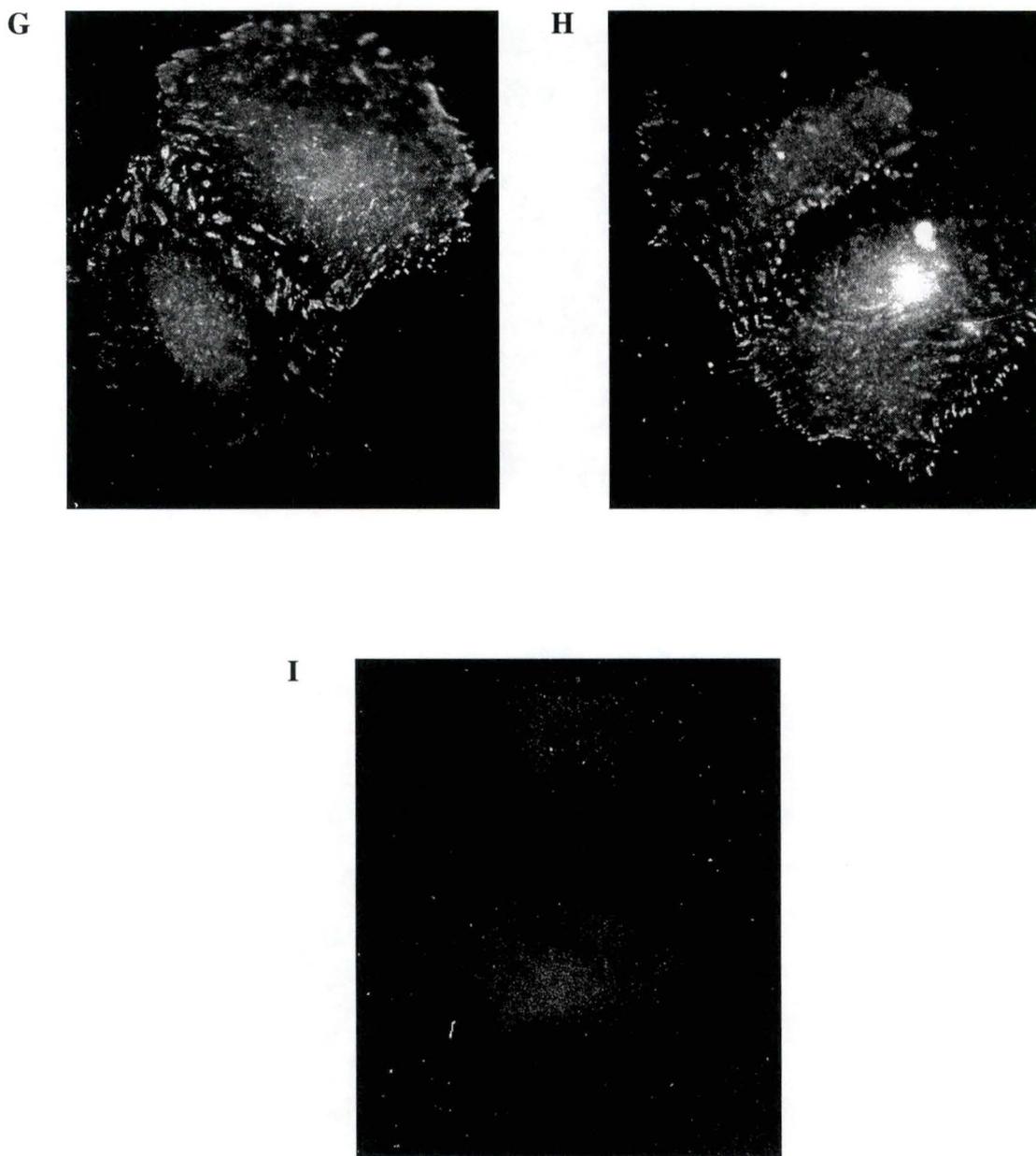
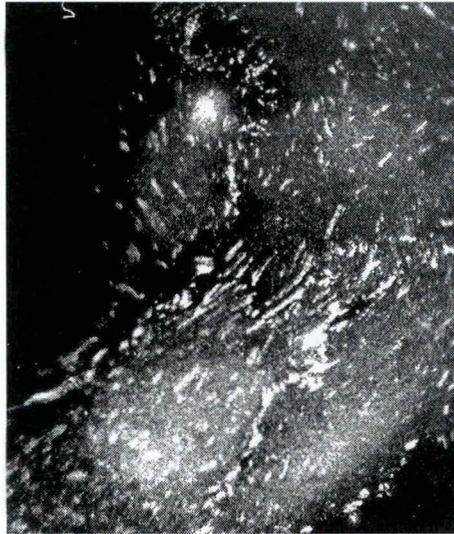


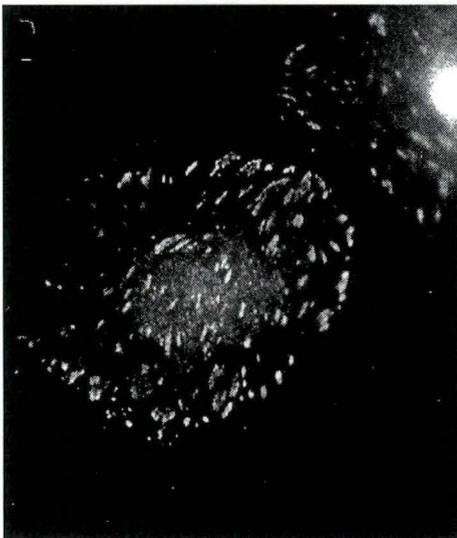
Figure II.16. : Marquage immunofluorescent de phosphotyrosines après 2 heures d'adhérence des cellules endothéliales sur de la FN (A), du verre non traité (B), de la poly-L-lysine (C), de la BSA (D), de la BSA-Sulfo-SMCC (E), de la BSA-Cys (F), de la BSA-P21 (G), de la BSA-T26 (H), contrôle négatif où les cellules ont été incubées en absence d'anticorps primaire (I).

(×1150)

A



B



C

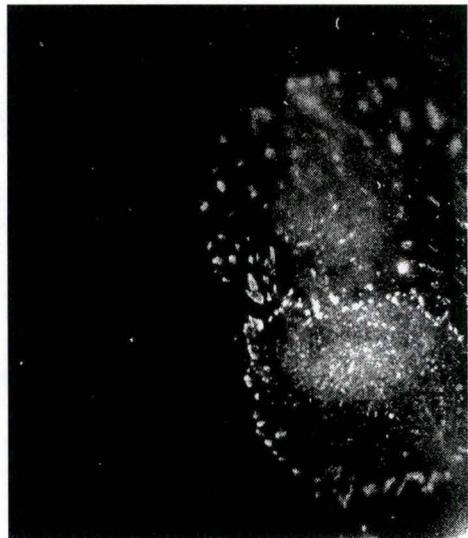


Figure III.17. : Marquage immunofluorescent de phosphotyrosines après 4 heures d'adhérence des cellules endothéliales sur de la FN (A), de la BSA-P21 (B) et sur de la BSA-T26 (C).
($\times 1150$)

nombreuses plaques d'adhérence focale constituées de gros complexes supramoléculaires. Certaines protéines de ces complexes sont phosphorylées lors de l'activation des intégrines.

Par contre sur les supports reconditionnés à la BSA et à la poly-L-lysine, après 4 heures, l'adhérence des cellules est comparativement plus faible qu'avec la FN et ne dépend pas des intégrines. Aucune protéine phosphorylée en tyrosine n'a été mise en évidence. Sur ces supports, les cellules restent arrondies même après 4 heures d'adhérence. Sur la poly-L-lysine, quelques cellules sont étalées. Aucune plaque d'adhérence n'a été observée.

Quant au support non traité, nous pouvons observer un faible étalement cellulaire. Après 4 heures d'adhérence, quelques plaques d'adhérence apparaissent. Toutefois, les cellules sont moins étalées que sur la FN. Cette adhérence n'est pas médiée par le complexe intégrine/RGD puisqu'il n'existe aucun motif RGD sur un tel support. Cependant, l'existence de quelques plaques d'adhérence pourrait s'expliquer par une synthèse par les cellules de leur propre MEC.

Lorsque les cellules sont mises en présence de BSA-Sulfo-SMCC et BSA-Cys, quelques cellules arrondies ou peu étalées apparaissent. Les photos indiquent que certaines cellules possèdent quelques plaques d'adhérence. Ces plaques existent déjà après 2 heures d'adhérence.

Enfin, en présence des peptides T26 et P21, greffés sur la BSA, les cellules adhèrent bien et on constate de très nombreuses plaques d'adhérence, comparables à celles obtenues pour des cellules adhérant à de la FN. Ces expériences ne nous ont toutefois pas permis de mettre en évidence l'effet de la cyclisation du motif RGD sur la formation de plaques d'adhérence focale.

Dans ces expériences, nous n'avons pas pu montrer l'effet temps sur la formation de plaques d'adhérence. En effet, aucune différence n'apparaît clairement entre 2 et 4 heures d'incubation cellulaire. Afin de vérifier si les cinétiques d'apparition des plaques d'adhérence sont semblables sur la FN et sur les peptides RGD greffés, il faudrait suivre la formation de plaques d'adhérence pour des temps beaucoup plus courts (15 et 30 minutes).

Nous pouvons donc dire que les peptides RGD sont donc bien capables d'induire la formation de plaques d'adhérence et la phosphorylation de tyrosines de protéines présentes au niveau de ces contacts focaux, via les mécanismes de transduction de signal qui utilisent les intégrines.

4.2. Discussion

Suite à la liaison spécifique du motif RGD avec les intégrines, il se produit un regroupement des intégrines et une phosphorylation de certaines protéines associées au niveau des contacts focaux, notamment sur les tyrosines. En immunocytochimie, ces plaques d'adhérence se présentent sous la forme de petits traits fluorescents.

Ce type d'expérience a déjà été réalisé lors du mémoire de Virginie Georges, sur des cellules endothéliales mises en adhérence sur de la FN afin de montrer la formation de plaques d'adhérence au niveau des contacts focaux des cellules endothéliales. Dans notre travail, nous avons voulu vérifier si la présence de peptides RGD greffés sur de la BSA était également capable d'induire la formation de plaques d'adhérence.

Plusieurs auteurs avaient déjà mis en évidence la localisation de protéines au niveau de ces plaques d'adhérence par l'utilisation d'anticorps spécifiques.

Ainsi, Hanks *et al.* (1992) ont localisé la pp125^{FAK} dans les fibroblastes 3T3 BALB/c au niveau des plaques d'adhérence focale créées par l'attachement des cellules à la FN. Ils ont investigué la possibilité que la phosphorylation de tyrosines des protéines soit une réponse aux interactions avec les composants de la MEC. Ils ont remarqué une phosphorylation peu de temps après l'attachement de ces cellules sur la FN. Au contraire, lorsqu'ils ont analysé les cellules attachées à la poly-L-lysine, ils n'ont pas retrouvé de trace positive de protéines phosphorylées sur leurs tyrosines. L'interprétation la plus simple de ces résultats est que les protéines sont phosphorylées suite aux interactions de la FN avec ses récepteurs de surface cellulaire.

Schaller *et al.* (1992) ont réalisé cette même expérience d'immunocytochimie utilisant des cellules transformées d'embryons de poulet qu'ils ont mis en adhérence sur des lamelles reconditionnées à la FN. Ils ont ainsi pu mettre en évidence la phosphorylation de la pp125^{FAK}, la vinculine et la taline.

Bockholt et Burridge (1993) quant à eux se sont intéressés à la phosphorylation de la tensine, une autre protéine de la MEC. Ils constatèrent sa phosphorylation lors de la mise en adhérence sur la FN de cellules REF (fibroblastes d'embryon de rat), de cellules de rein (MDCK) et de cellules de foie (WB)

Dans nos expériences, nous avons pu montrer que le greffage de peptides RGD sur de la BSA pouvait induire la formation de plaques d'adhérence et la phosphorylation des

protéines de ces complexes. Toutefois, de nombreuses expériences restent à réaliser pour s'assurer que ce motif suffit à lui seul à permettre la transduction du signal par les intégrines. En effet, lors de l'adhérence de cellules à une protéine de la MEC, outre la reconnaissance du motif RGD (par exemple) par les intégrines, il existe d'autres sites de reconnaissance des cellules avec les protéines de la MEC. A ce jour, il n'a pas encore été clairement établi dans quelle mesure ces sites de reconnaissance pouvaient moduler ou non la transduction du signal par les intégrines.

Kornberg *et al.* (1992) ont voulu vérifier si l'effet temps avait de l'importance dans la phosphorylation de protéines. Ils constatèrent que la quantité de pp125^{FAK} phosphorylée augmentait dès que les cellules adhéraient sur la FN. Après 20 minutes, la phosphorylation atteignait un niveau maximum. A ce moment, les cellules sont attachées au support mais pas étalées. Ainsi, la phosphorylation de cette protéine coïncide avec l'adhérence cellulaire mais se produit avant l'étalement.

Nous avons également testé deux temps d'adhérence différents mais aucune différence n'a pu être observée. Signalons que nos expériences ont été réalisées en heures et non en minutes.

Il serait intéressant de réduire le temps d'adhérence. En effet, la synthèse par les cellules de leur propre MEC pourrait ainsi être évitée.

A la suite de ces expériences, nous pouvons conclure que la localisation de protéines phosphorylées sur les tyrosines, au niveau des plaques d'adhérence focale, nécessite la liaison intégrines/RGD puisque nous avons pu mettre en évidence l'existence de protéines phosphorylées lorsque le support est reconditionné à la FN, par des peptides RGD linéaires et par des peptides RGD cycliques munis d'un bras d'ancrage. Par contre, ces observations ne se retrouvent pas pour des cellules mises en culture sur la BSA-Cys ou sur la BSA-Sulfo-SMCC bien que pour ces deux derniers tests, nous retrouvons quelques plaques d'adhérence après 2 heures. Cela signifie donc qu'un peptide contenant le motif RGD parvient à induire la formation de plaques d'adhérence. Nous avons également prévu de tester l'effet du peptide aléatoire tailed T29 sur la formation de plaques d'adhérence. Malheureusement, suite à un problème de synthèse peptidique, nous n'avons pas pu obtenir ce peptide en quantité suffisante pour ces dernières expériences d'immunocytochimie.

DISCUSSION GENERALE

Le but de ce mémoire était de vérifier si des peptides sont capables de reproduire de manière satisfaisante les effets biologiques d'une protéine. Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur des peptides RGD, qui ont été comparés à la fibronectine, protéine de la MEC, contenant effectivement ce motif. Les peptides RGD ont été synthétisés sous différentes formes, linéaires ou cycliques, et avec un bras d'ancrage prévu pour le greffage covalent des peptides sur une protéine porteuse ou sur un polymère.

Dans un premier temps, nous avons testé la capacité des peptides en solution à inhiber l'adhérence de cellules endothéliales et de cellules THP-1 sur un support reconditionné à la FN. Ces expériences ont été réalisées pour deux temps d'adhérence différents, 15 et 30 minutes.

Nous avons pu observer que les peptides RGD cycliques exercent un effet inhibiteur plus marqué que leur correspondant linéaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que le motif RGD se trouve dans sa conformation idéale dans les peptides cycliques. Comme l'avaient montré Main *et al.* (1992), le motif RGD est présent dans une boucle au sein de la FN. La cyclisation impose donc une contrainte conformationnelle qui permet une meilleure reconnaissance par les intégrines. Par contre, dans les peptides linéaires, la reconnaissance du motif RGD par les intégrines est moins bonne. En effet, le motif RGD ne se trouve pas dans une boucle. Le peptide linéaire a plus de liberté en solution ce qui n'entraîne pas une reconnaissance optimale.

D'autre part, comme l'ont montré certains auteurs tels que Gurrath *et al.* (1992) et Cardarelli *et al.* (1992), l'effet d'un même peptide peut être totalement différent d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi, ces auteurs montrent une inhibition de l'adhérence cellulaire sur le collagène de type I de 90 % pour les cellules MG-63 et 30 % pour les cellules HT-1080 à une concentration de 1 mM. Nos résultats sont en accord avec ces observations. En effet, nous avons pu observer que les cellules endothéliales ne répondaient pas aux peptides en solution, de la même manière que les cellules THP-1. Ceci s'explique en partie par des profils d'expression d'intégrines variables d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi, le peptide C8 inhibe de 50 % l'adhérence des cellules endothéliales à 10^{-3} M alors qu'il inhibe l'adhérence de 50 % des cellules THP-1 à 4.10^{-4} M.

Par contre, nos résultats montrent que le peptide tailed T26 inhibe l'adhérence cellulaire de la même façon que son analogue cyclique C8. On pouvait s'attendre à ce type de réponse puisque, que ce soit dans le peptide cyclique ou dans le peptide tailed, le motif RGD se trouve dans une boucle. Ainsi, l'affinité de ce motif aux intégrines est semblable pour les deux peptides. Nous n'avons pas pu comparer nos résultats du peptide tailed avec ceux de la littérature puisqu'aucune expérience n'a été réalisée à ce jour, avec des peptides RGD cycliques munis d'un bras d'ancrage.

Enfin, nous avons observé que l'effet inhibiteur du peptide cyclique C8, par exemple, à

	THP-1	cellules endothéliales	
	15 minutes	15 minutes	30 minutes
FN	100 %	100 %	100 %
Sans reconditionnement	100 %	32 %	60 %
BSA native 1 mg/ml		12 %	26 %
2 mg/ml	20 %	20 %	14 %
BSA-SSMCC	230 %	115 %	81 %
BSA-Cys	180 %	50 %	78 %
Peptides greffés sur BSA en solution BSA-T26		122 %	99 %
Peptides greffés sur BSA adsorbée BSA-T26	270 %	144 %	118 %
BSA-P21	280 %	115 %	115 %
BSA-T29	205 %	50 %	
Peptides adsorbés sur BSA adsorbée BSA-T26		130 %	
BSA-P21		65 %	
BSA-T29		35 %	

Tableau IV.1. : Effet comparatif des différents reconditionnements sur l'adhérence des cellules THP-1 et cellules endothéliales. L'adhérence sur la FN a été prise comme référence et portée arbitrairement à 100 %.

15 minutes d'incubation était plus marqué qu'à 30 minutes lorsque les peptides sont présents en solution. En effet, le pourcentage d'adhérence à 15 minutes est légèrement plus faible qu'à 30 minutes. Nous pouvons expliquer cet effet par le fait qu'à 30 minutes d'incubation, la probabilité d'avoir des liaisons non spécifiques à la FN devient plus grande. En réduisant le temps d'adhérence, nous ciblons mieux l'effet spécifique du motif RGD.

Une fois l'effet des peptides démontré en solution, nous avons tenté de greffer ces peptides contenant le motif RGD sur de la BSA. Le greffage s'est effectué suivant 2 méthodes. Pour la première méthode, les peptides étaient greffés à la BSA présente en solution dans du PBS alors que pour la seconde, les peptides ont été greffés sur de la BSA préalablement adsorbée au fond de puits en polystyrène. Nous avons ensuite testé les effets de ces peptides greffés sur l'adhérence cellulaire à différents temps. Nous avons essayé de résumer l'ensemble des résultats obtenus, dans le tableau récapitulatif IV.1.

D'un point de vue biologique, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre ces deux techniques sur l'adhérence cellulaire mais au niveau du greffage proprement dit, nous pouvons constater que le greffage sur de la BSA adsorbée est beaucoup plus simple à mettre en oeuvre.

De façon générale, nous avons pu observer un effet pro-adhésif du peptide linéaire P21 similaire à celui du peptide tailed T26 après 30 minutes d'adhérence. Ceci est un peu inattendu puisque le motif RGD du peptide linéaire ne se trouve pas dans sa conformation idéale pour être reconnu par les intégrines. Afin de discriminer l'effet de ces deux peptides et de diminuer les interactions non intégrines-spécifiques des cellules avec la FN, nous avons réduit le temps d'adhérence à 15 minutes. Cette fois, nous constatons une différence plus prononcée dans l'effet pro-adhésif du peptide T26 par rapport au peptide P21. En effet, nous avons pu montrer que le peptide T26 donnait des valeurs d'adhérence de 144 % pour les cellules endothéliales alors que pour le P21 on atteint des valeurs de 115 %.

Quant au peptide T29, qui correspond à un motif RGD aléatoire, il ne promeut pas l'adhérence cellulaire. Ceci confirme bien le fait que la séquence du motif RGD a de l'importance pour favoriser l'adhérence cellulaire. A nouveau, pour ces expériences, nous avons observé de nettes différences dans le pourcentage d'adhérence. En effet, les valeurs d'adhérence obtenues pour les THP-1 sont supérieures à celles obtenues pour les cellules endothéliales. Nous pouvons attribuer cette différence d'une part au fait que les THP-1 sont difficiles à manipuler car elles ont une faible affinité pour les supports testés et d'autre part au fait que chaque type cellulaire peut exprimer plusieurs intégrines qui soient plus ou moins spécifiques d'un ligand.

Une diminution du temps d'adhérence nous a permis de diminuer la non spécificité de l'adhérence cellulaire.

Enfin, afin de vérifier si l'adsorption de peptides sur la BSA pouvait à elle seule suffire à améliorer l'adhérence, nous avons testé l'effet de peptides adsorbés sur de la BSA elle-même ayant préalablement été adsorbée au fond des puits. Nous constatons qu'une simple adsorption du peptide tailed suffit pour promouvoir l'adhérence de cellules endothéliales, alors que l'adsorption des peptides linéaire et aléatoire s'avèrent beaucoup moins actifs. Néanmoins, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

Le troisième volet de ce mémoire consistait à vérifier si un peptide RGD pouvait induire la formation de plaques d'adhérence sur des cellules endothéliales mises en culture sur de la BSA greffée avec le peptide linéaire P21 et le peptide tailed T26. Nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de protéines se situant au niveau de ces plaques d'adhérence.

Les résultats de ces expériences montrent clairement la présence de plaques d'adhérence dans les cellules endothéliales en culture sur de la BSA greffée avec des peptides RGD.

Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'effet de la cyclisation du motif RGD au sein d'un peptide. En effet, nous n'observons pas de différence quantitative dans la formation de ces plaques d'adhérence, entre le peptide T26 et le P21.

Toutefois, nous pouvons constater l'importance du motif RGD puisque, sur les contrôles négatifs ne contenant pas le motif RGD c'est-à-dire la BSA, la poly-L-lysine, la BSA-Cys, la BSA-Sulfo-SMCC, nous n'observons pas de plaques d'adhérence à une exception près. En effet, on observe quelques plaques d'adhérence sur un support non traité après 4 heures d'adhérence. La formation des plaques d'adhérence dans ce dernier cas, pourrait s'expliquer par une synthèse par les cellules de leur propre MEC. Ceci confirme bien les résultats de la littérature. En effet, Hanks *et al.* (1992) n'observaient pas non plus la présence de protéines phosphorylées au niveau des plaques d'adhérence pour les contrôles négatifs. Quant à Schaller *et al.* (1992), ils ont observé la présence de protéines phosphorylées lors de la mise en culture de cellules transformées d'embryon de poulet sur de la FN.

Pour affiner ces résultats, nous pourrions réaliser des expériences d'immunocytochimie avec un temps d'adhérence de 15 et 30 minutes sur des lamelles reconditionnées avec des peptides RGD, de manière à étudier la cinétique d'apparition des plaques d'adhérence et de comparer ces résultats par rapport à des cellules en culture sur de la FN.

En conclusion, nous pouvons dire que ce travail nous a permis de mettre en évidence des peptides pouvant promouvoir l'adhérence cellulaire dans un milieu sans sérum. En effet, nous avons montré que le greffage de peptides RGD sur de la BSA

permettait d'améliorer l'adhérence de cellules endothéliales et de THP-1, au même titre que la FN. Le greffage de peptides RGD et peut-être même la simple adsorption de ces peptides sur la BSA, a donc permis de convertir la BSA, une protéine peu favorable à l'adhérence cellulaire, en une protéine modifiée dont les effets pro-adhésifs sont comparables, voire même légèrement supérieurs à ceux observés avec la FN. C'est avec le peptide cyclique T26 que les meilleures performances ont été obtenues. Plus en aval, nous avons observé que la BSA modifiée avec des peptides RGD, induisait les cascades de phosphorylations en tyrosine liées à l'activation des intégrines, comme en témoigne la formation des plaques d'adhérence. Nous n'avons plus obtenus de différence entre peptides cyclique et linéaire à ce niveau, mais la méthode d'immunocytochimie utilisée est essentiellement quantitative. Pour continuer ce travail, on pourrait envisager de suivre des comportements cellulaires sur des périodes de culture plus longues : prolifération cellulaire, activation cellulaire (dosage du Ca^{++} et du pH intracellulaires, ...) A la suite de ce travail, il serait intéressant de greffer des séquences peptidiques contenant d'autres motifs permettant de moduler la prolifération et/ou l'activation cellulaire. Ainsi, certains auteurs tels que Presta *et al.* (1991) ont déjà mis en évidence une séquence peptidique au sein du FGF-2 (fibroblast growth factor-2) reproduisant les effets de la protéine native. Ces séquences peptidiques pourraient être testées sur la prolifération et/ou l'activation cellulaire et ensuite être greffées sur des supports polymériques. Ces études permettraient sans doute d'améliorer la biocompatibilité de matériaux utilisés lors d'implants temporaires ou permanents et pourraient également être envisagées pour l'amélioration des supports de culture cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Albelda S.M. and Buck C.A. (1990).
"Integrins and other cell adhesion molecules."
FASEB J **4**, 2868-80.
- Atherton E. and Sheppard R.C. (1989).
"Solid phase peptide synthesis. A practical approach".
Oxford, Oxford University Press, pp 203
- Aumailley M., Mann K., Von der Mark H. and Timpl R. (1989).
"Cell attachment properties of collagen type VI and Arg-Gly-Asp dependent binding to its $\alpha 2$ (VI) and $\alpha 3$ (VI) chains."
Experimental cell research **181**, 463-474.
- Bockholt S.M. and Burridge K. (1993).
"Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin."
J Biol Chem **268**(20), 14565-7.
- Bosman F.T. (1993).
"Integrins : cell adhesives and modulators of cell function."
Histochemical Journal **25**, 469-477.
- Bourdon M.A. and Ruoslahti E. (1989).
"Tenascin mediates cell attachment through an RGD-dependent receptor."
J Cell Biol **108**, 1149-1155.
- Cardarelli P.M., Yamagata S., Taguchi I., Gorscan F., Chiang S.L. and Lobl T. (1992).
"The collagen receptor $\alpha 2\beta 1$, from MG-63 and HT1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide."
J Biol Chem **267**, 23159-64.
- Chen C.S. and Hawiger J. (1991).
"Reactivity of synthetic peptide analogs of adhesive proteins in regard to the interaction of human endothelial cells with extracellular matrix."
Blood **77**, 2200-2206.
- Chin N.W. and Lanks K.W. (1977).
"Covalent attachment of lactoperoxidase to polystyrene tissue culture flasks."
Anal. Biochem. **83**, 709-719.
- Clark E.A. (1990).
"Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin."
Invest. Dermatol. **6**, 1285-1345.
- Clark E.A. and Brugge J.S. (1995).
"Integrins and signal transduction pathways: The road taken."
Science **268**(5208), 233-239.
- D'Souza S.E., Ginsberg M.H. and Plow E.F. (1991).
"Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD) : a cell adhesion motif."
TIBS **16**, 246-250.

- Davis G.E. (1992).
 "Affinity of integrins for damaged extracellular matrix : $\alpha_v\beta_3$ binds to denatured collagen type I through RGD sites."
Biochemical and biophysical research communications **182**, 1025-1031.
- Dedhar S. and Hannigan G.E. (1996).
 "Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling."
Curr. Op. Cell Biology **8**, 657-669.
- Delforge D., Art M., Gillon B., Dieu M., Delaive E., Raes M. and Remacle J. (1996b).
 "Automated solid-phase synthesis of cyclic peptides bearing a side-chain tail designed for subsequent chemical grafting."
Analytical Biochemistry **241**, in press.
- Delforge D., Dieu M., Delaive E., Art M., Gillon B., Devreese B., Raes M., Van Beeumen J. and Remacle J. (1996a).
 "Solid-phase synthesis of tailed cyclic peptides : The use of α -allyl-protected aspartic acid leads to aspartimide and tetramethylguanidium formation."
Letters in Peptide Science **3**, 89-97.
- Engvall E. (1994).
 "Laminin".
 Oxford, Oxford university press, 66-68.
- Erickson H.P. (1993).
 "Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X : a family of talented proteins in search of functions."
Curr. Opin. Cell Biol. **5**, 869-876.
- Finlay B.B. (1990).
 "Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis."
Curr Biol **2**, 815-20.
- Giancotti F.G. and Ruoslahti E. (1990).
 "Elevated levels of the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of chinese hamster ovary cells."
Cell **60**, 849-59.
- Givens K.T., Kitado S., Chen A.K., Rothschiller J. and Lee D.A. (1990).
 "Proliferation of human ocular fibroblasts : an assesment of *in vitro* colorimetric assays."
Invest. Ophtalmol. Visual Sci. **31**, 1856-62.
- Glaser V. (1995).
 "Work on cell-adhesion-based interactions beginning to bear fruit".
 Genetic engineering news. New-York, **15**: 6-7.
- Gurrath M., Müller G., Kessler H., Aumailley M. and Timpl R. (1992).
 "Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides."
Eur. J. Biochem. **210**(911-21),
- Hanks S.K., Calalb M.B., Harper M.C. and Patel S.K. (1992).
 "Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin."
Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18), 8487-91.

- Hardingham T.E. and Fosang A.J. (1992).
"Proteoglycans : many forms and many functions."
FASEB **6**, 861-870.
- Harker L.A. (1994).
"New antithrombotic strategies for resistant thrombotic processes."
J Clin Pharmacol **34**, 3-16.
- Harmand M.F. (1992).
"Human cell culture and characterization of cell/biomaterial interface."
Clinical Materials **11**, 145-150.
- Hashida S., Imagawa M., Inoue S., Ruan K.-H. and Ishikawa E. (1984).
"More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge."
Journal of applied biochemistry **6**, 56-63.
- Hildebrand J.D., Schaller M.D. and Parsons J.T. (1993).
"Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions."
J Cell Biol **123**(4), 993-1005.
- Hirano Y., Kando Y., Hayashi T., Goto K. and Nakajima A. (1991).
"Synthesis and cell attachment activity of bioactive oligopeptides : RGD, RGDS, RGDV, and RGDV."
J Biomed Mat Res **25**, 1523-34.
- Hirano Y., Okuno M., Hayashi T., Goto K. and Nakajima A. (1993).
"Cell-attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDV, and YIGSR toward five cell lines."
J Biomater Sci Polym Ed **4**(3), 235-43.
- Hoffman A.S. (1992).
"Immobilization of biomolecules and cells on and within polymeric biomaterials."
Clinical Materials **11**, 61-66.
- Hubbell J.A., Massia S.P., Desai N.P. and Drumheller P.D. (1991).
"Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor."
Bio/Technology **9**, 568-72.
- Huhtala P., Humphries M.J., McCarthy J.B., Tremble P.M., Werb Z. and Damsky C.H. (1995).
"Cooperative signaling by $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 1$ integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin."
J Cell Biol **129**(3), 867-79.
- Humphries M.J. (1992).
"Peptide recognition motifs involved in the binding of integrins to their ligands."
Kidney Int. **41**, 645-9.
- Humphries M.J. (1996).
"Integrin activation : the link between ligand binding and signal transduction."
Curr. Op. Cell Biology **8**, 632-640.

- Hynes R.O. (1992).
"Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion."
Cell **69**(1), 11-25.
- Hynes R.O. and Yamada K.M. (1982).
"Fibronectins : multifunctional modular glycoproteins."
J Cell Biol **95**, 369-377.
- Ikada Y. (1994).
"Surface modification of polymers for medical applications."
Biomaterials **15**, 725-736.
- Jackson R.L., Busch S.J. and Cardin A.D. (1991).
"Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes."
Physiological Reviews **71**, 481-522.
- Johnson G.L. and Vaillancourt R.R. (1994).
"Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation."
Curr Op Cell Biol **6**, 230-8.
- Joshi P., Chung C.-Y., Aukhil I. and Erickson H.P. (1993).
"Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin."
Journal of cell biology **106**, 389-400.
- Kirchofer D., Gailit J., Ruoslahti E., Greesiak J. and Pierschbacher M.D. (1990).
"Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GP_{IIb/IIIa}."
J. Biol. Chem. **265**, 18525-18530.
- Kjellén L. and Lindahl U. (1991).
"Proteoglycans : structures and interactions."
Annu. Rev. Biochem. **60**, 443-475.
- Koivunen E., Wang B. and Ruoslahti E. (1994).
"Isolation of highly specific ligand for the $\alpha 5\beta 1$ integrin from a phage display library."
J Cell Biol **124**(3), 373-80.
- Kornberg L., Earp H.S., Parsons J.T., Schaller M. and Juliano R.L. (1992).
"Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase."
J Biol Chem **267**(33), 23439-42.
- Kornberg L.J., Earp H.S., Turner C.E., Prockop C. and Juliano R.L. (1991).
"Signal transduction by integrins : increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of $\beta 1$ integrins."
Proc. Natl. Acad. Sci. **88**, 8392-96.
- Kühn K. and Eble J. (1994).
"The structural bases of integrin-ligand interactions."
Trends in cell biology **4**, 256-261.
- Kumagai H., Tajima M., Ueno Y., Giga-Hama Y. and Ohba M. (1991).
"Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis."
Biochem Biophys Res Comm **177**(1), 74-82.

- Landegren U. (1984).
"Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase : Application to detection of lymphokines and cell surface antigens."
J. Immunol. Meth. **67**(379-88),
- Lane T.F. and Sage E.H. (1994).
"The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions."
FASEB J **8**, 163-73.
- Lawler J. and Hynes R.O. (1986).
"The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins."
The journal of cell biology **103**, 1635-1648.
- Lin H.-B., Garcia-Echeverria C., Asakura S., Sun W., Mosher F. and Cooper S.L. (1992).
"Endothelial cell adhesion on polyurethanes containing covalently attached RGD-peptides."
Biomaterials **13**(13), 905-914.
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky L., Matsudeira P. and Darnell J. (1995).
"Molecular Cell Biology".
New York, Scientific American Books, pp 1344 .
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951).
"Protein measurement with Folin phenol reagent."
J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- Main A.L., Harvey T.S., Baron M., Boyd J. and Campbell I.D. (1992).
"The three dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin : an insight into RGD-mediated interactions."
Cell **71**, 671-8.
- Marchand-Brynaert J. (1996).
"Les polymères de synthèse utilisés comme biomatériaux."
Chimie nouvelle **14**, 1580-1587.
- Marchand-Brynaert J., Deldime M., Dupont I., Dewez J.-L. and Schneider Y.-J. (1995).
"Surface functionalization of poly(ethylene terephthalate) film and membrane by controlled wet chemistry in order to improve mammalian cells cultivation : Chemical characterization of carboxylated surfaces."
J. Colloid Interface Sci. **173**, 236-244.
- Massia S.P. and Hubbell J.A. (1992).
"Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin $\alpha_4\beta_1$."
J Biol Chem **267**, 14019-26.
- Meredith J.E. (1993).
"The extracellular matrix as a cell survival factor."
Mol. Bio. Cell **4**, 953-961.
- Merril C.R. and Goldman D. (1984).
"Detection of polypeptides in two-dimensional gels using silver staining." *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins* .
Eds. J. E. Celis and R. Bravo. Orlando, Florida, Academic Press. 93-109.

- Mohri H., Hashimoto Y., Ohba M., Kumagai H. and Ohkubo T. (1991).
"Novel effect of cyclisation of the Arg-Gly-Asp-containing peptide on vitronectin binding to platelets."
Am J Hematol **37**, 14-9.
- Olsen B.R. and Ninomiya Y. (1994).
"Fibrillar collagens (types I-III, V, XI)".
Oxford, Oxford university press, pp 40-44.
- Parsons J.T., Schaller M.D., Hildebrand J., Leu T.H., Richardson A. and Otey C. (1994).
"Focal adhesion kinase: Structure and signalling."
J Cell Sci (Suppl. 18), 109-113.
- Petersen T.E., Thogersen H.C., Skorstengaard K., Vibe-Pedersen K., Shall P., Sottrup-Jensen L. and Magnusson S. (1983).
"Partial primary structure of bovine plasma fibronectin : Three types of internal homology."
Proc Natl Acad Sci U S A **80**, 137-141.
- Pierschbacher M.D., Hayman E.G. and Ruoslahti E. (1981).
"Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule."
Cell **26**, 259-67.
- Pierschbacher M.D. and Ruoslahti E. (1984).
"Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity."
Proc Natl Acad Sci USA **81**, 5985-5988.
- Pierschbacher M.D. and Ruoslahti E. (1987).
"Influence of stereochemistry of the sequence A-G-A-X on binding specificity in cell adhesion."
J Biol Chem **262**(36), 17294-8.
- Pierson J.A. and Tadmor B. (1995).
"ECM-mediated changes in cellular patterns of gene expression."
J NIH Res **7**, 84.
- Piskin E. (1992).
"Biologically modified polymeric biomaterial surfaces : introduction."
Clinical Materials **11**, 3-7.
- Plantefaber L.C. and Hynes R.O. (1989).
"Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells."
Cell **56**, 281-290.
- Potts J.R. and Campbell I.D. (1994).
"Fibronectin structure and assembly."
Curr. Opin. Cell Biol. **6**, 648-655.
- Preissner K.T. (1991).
"Structure and biological role of vitronectin."
Annu. Rev. Cell. Biol. **7**, 275-310.
- Presta M., Rusnati M., Urbinati C., Statuto M. and Ragnotti G. (1991).
"Functional domains of fibroblast growth factor. Possible role of Asp-Gly-Arg sequences in the mitogenic activity of bFGF."
Ann N. Y. Acad. Sci. **638**, 361-368

- Pytela R., Pierschbacher M.D., Argraves S., Suzuki S. and Ruoslahti E. (1987).
"Arginine-Glycine-Aspartic Acid adhesion receptors."
Methods in enzymology **144**, 475-489.
- Raes M. (1994).
"Cell-matrix interactions."
Animal Cell Biotechnology **6**, 67-98.
- Rasmussen S.E. (1990).
"Covalent immobilization of biomolecules onto polystyrene microwells for use in biospecific assays."
Ann. Biol. clin. **48**, 647-650.
- Reichardt L.F. (1994).
"Extracellular matrix molecules and their receptors".
Oxford, Oxford university press, pp 176.
- Richardson A. and Parsons J.T. (1995).
"Signal transduction through integrins: A central role for focal adhesion kinase?"
Bioessays **17**(3), 229-236.
- Roskelley C.D., Srebrow A. and Bissel M.J. (1995).
"A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue specific gene expression."
Curr Biol **7**, 736-47.
- Ruoslahti E., Noble N.A., Kagami S. and Border W.A. (1994).
"Integrins."
Kidney Int **45**, S17-S22.
- Schaller M.D., Borgman C.A., Cobb B.S., Vines R.R., Reynolds A.B. and Parsons J.T. (1992).
"pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions."
Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11), 5192-6.
- Schaller M.D. and Parsons J.T. (1994).
"Focal adhesion kinase and associated proteins."
Curr Opin Cell Biol **6**(5), 705-710.
- Schlaepfer D.D., Hanks S.K., Hunter T. and Vandergaer P. (1994).
"Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase."
Nature **372**(6508), 786-791.
- Schnaper H.W., Kleinman H.K. and Grant D.S. (1993).
"Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation."
Kidney International **43**, 20-25.
- Schwartzbauer J.E., Tamkun J.W., Lemischka I.R. and Hynes R.O. (1983).
"Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region."
Cell **35**, 421-431.
- Shaw L.M. and Olsen B.R. (1991).
"FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices."
TIBS **16**, 191-194.

- Skorstengaard K., Thogersen H.C., Vibe-Pedersen K., Petersen T.E. and Magnusson S. (1982).
"Purification of twelve cyanogen bromide fragments from bovine plasma fibronectin and the amino acid sequence of eight of them."
FEBS **128**, 605-623.
- Skorstengaard K., Thogersen H.C. and Petersen T.E. (1984).
"Complete primary structure of the collagen-binding domain of bovine fibronectin."
FEBS **140**, 235-243.
- van der Rest M. and Garrone R. (1990).
"Collagens as multidomain proteins."
Biochimie **72**, 473-84.
- van der Rest M. and Garrone R. (1991).
"Collagen family of proteins."
FASEB **5**, 2814-2823.
- Varga J.M., Klein G.F. and Fritsch P. (1990).
"Binding of a mouse monoclonal IgE (anti-DNP)antibody to radio-derivatized polystyrene-DNP complexes."
FASEB J. **4**, 2678-2683.
- von der Mark K., von der Mark H. and Goodman S. (1992).
"Cellular responses to extracellular matrix."
Kidney Int **41**, 632-40.
- Vuorio E. and de Crombrughe B. (1990).
"The family of collagen genes."
Annu. Rev. Biochem. **59**, 837-872.
- Wegner C.D., Gundel R.H., Churchill L. and Letts L.G. (1993).
"Control of inflammatory processes by adhesion glycoproteins."
Inflammatory Disease Therapy **41**, 47-57.
- Zammatteo N., Girardeaux C., Delforge D., Pireaux J.-J. and Remacle J. (1996).
"Amination of polystyrene microwells : Application to the covalent grafting of DNA probes for hybridization assays."
Analytical Biochemistry **236**, 85-94.