



Ingénierie des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique : conception d'une forme tronquée de la galectine 3 à potentialités antirhumatismales

Mélissa Yéléhé-Okouma

► To cite this version:

Mélissa Yéléhé-Okouma. Ingénierie des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique : conception d'une forme tronquée de la galectine 3 à potentialités antirhumatismales. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01770730

HAL Id: hal-01770730

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01770730>

Submitted on 29 Mar 2021

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2014

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 06 octobre 2014

Par **YELEHE-OKOUMA Mélissa**
Née le 10 janvier 1987, à Libreville (GABON)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Ingénierie des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique :
conception d'une forme tronquée de la galectine 3
à potentialités antirhumatismales.**

Membres du Jury

Président : Mr le Professeur Raphaël Duval

Université de Lorraine

Juges :

Mr le Professeur Jean-Yves Jouzeau

Université de Lorraine - CHU de Nancy

Mme le Professeur Geneviève Ubeaud-Sequier

Université et CHU de Strasbourg

Mr le Docteur Pascal Reboul, MCF

Université de Lorraine

Mr le Docteur David Attivi, PH

CH de Neufchâteau

Mr Alexandre Kriznik, IE2

UMR CNRS UL 7365

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Brigitte LEININGER-MULLER

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Chantal FINANCE

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Responsable de la filière Officine :

Responsables de la filière Industrie :

Responsable de la filière Hôpital :

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Francine KEDZIEREWICZ

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTSSection
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Hygiène sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86	Droit en Santé
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAILOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
PROFESSEUR AGREGÉ		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A
LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le **Professeur Jean-Yves Jouzeau**, qui a accepté de me proposer un poste d'interne au sein du Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et d'Ingénierie Articulaire (PPIA), alors même que je commençais à désespérer de trouver un laboratoire d'accueil. Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, le **Docteur Pascal Reboul** pour avoir accepté de me confier ce projet, tout en sachant que j'aurais plutôt préféré travailler dans le domaine de la cancérologie. Je le remercie particulièrement pour son aide technique « à la paillasse » alors que je n'avais que très peu de notions sur l'aspect expérimental. J'ai eu la chance d'apprendre et de travailler tout près de mon « maître à penser ».

A tous deux pour qui j'ai un profond respect, je manifeste toute ma gratitude pour le temps qu'ils m'ont accordé, pour leurs conseils et avis scientifiques, leurs encouragements et leur soutien dans les moments difficiles tant professionnels que personnels.

Je remercie le **Professeur Raphaël Duval** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, **Mme le Professeur Geneviève Ubeaud-Sequier**, le **Docteur David Attivi** et **Mr Alexandre Kriznik**, d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

Je remercie chaleureusement les membres de l'équipe 4 du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Physiopathologie Articulaire (IMoPA, ex-PPIA) dans laquelle j'ai évolué durant quatre ans. Je pense tout particulièrement à **David Moulin**, **Arnaud Bianchi**, **Mérim Koufany**, **Cécile Guillaume** et **Hervé Kempf**, pour leur aide technique et conceptuelle en biologie moléculaire et culture cellulaire, pour leurs conseils, leurs encouragements et leur soutien. Bien entendu je n'oublie pas **Yong Hu (Victor)**, mon « frère de paillasse ». Je lui tire mon chapeau car il a dû supporter mon exigence et ma rigueur durant ces années, et je le remercie de tout cœur car il a accepté de m'aider chaque fois que j'en ai eu besoin.

De nouveau, je remercie très cordialement **Mr Alexandre Kriznik**, ainsi que **Mme Sandrine Boschi-Muller**, pour les conseils et astuces efficaces qu'ils m'ont donnés en vue de l'expression et de la purification de la galectine 3. Je remercie également **Mr Jean-Baptiste Vincourt**, pour son aide et son expertise quant à l'identification et à la caractérisation de cette protéine, entre autres, par spectrométrie de masse.

Je remercie sincèrement toutes les personnes du laboratoire IMoPA qui ont interagi avec moi de façon positive. Je citerai d'abord **Brigitte Guerber, Ghislaine Charpentier, Nadia Bézaï, Josiane Fournier, Marie-Hélène Piet, Nasser Charif, Laurent Grossin, Jean-Marc Dussaulx, Christophe Muller, et Nick Ramalanjoana**, pour leur sourire, leur humour, leurs conseils et encouragements, ainsi que leur sollicitude à mon égard.

Je citerai ensuite les stagiaires que j'ai côtoyés et/ou encadrés/co-encadrés. Ils m'ont non seulement aidée pour mes expériences, mais m'ont aussi fait réaliser que j'aime beaucoup l'enseignement « à la paillasse ». Il s'agit de **Cindy Birk, Yang Liu (Léo), Mickaël Lescroart, Claire Perrin et Ayria Sadegh**.

Je citerai enfin les doctorants, avec qui je faisais des « réunions de crise existentielle » durant lesquelles nous nous racontions nos déboires et nous soutenions mutuellement. Je pense naturellement à **Lina Tabcheh** et à sa spontanéité ainsi qu'à son brin de folie, mais aussi à **Mathieu Riffault** et à ses blagues absurdes pleines d'autodérision. Tous deux m'ont apporté tellement de légèreté durant ces années difficiles. Je pense également à **Suzanne Abbas, Antoine Bersweiller, Samia Boukhénouna, Thomas Clément, Chao-Hua Deng (Olivier), Reine El-Omar, Mathilde Guibert, Moustapha Khair, Yue Ying Li, Hassan Rammal, Emilie Roeder, Irfan Saukhat, Zhe Xie (Xavier)** et bien d'autres encore, qui ont su m'apporter aide, joie et bonne humeur.

Je remercie les anciennes internes **Anne-Sophie Chrétien, Lakshmi Rughoo, Marianne Parent, et Camille Boscher**, pour les conseils qu'elles m'ont donnés au début et durant cette aventure qu'est l'internat.

Enfin, les derniers mais pas des moindres, mes amis et toute ma famille, membres du « COSMOS ! » (Comité Officiel de Soutien de Mélissa Okouma Seulement !).

Trop nombreux, je ne peux tous les citer mais je remercie spécialement mon ami **J-C** pour sa fidélité, mes amies **Juliette, Marina, Prisca, Kémy et Manuela**, mes oncles et tantes ainsi que mes frères et sœurs, dont **Sylvie, Cyriaque, Aymar, Maxence, Ultry, Vénusia**, etc., pour leur amour et leur soutien. Je n'oublie pas **Yves**, mon adorable petit frère et colocataire, qui a vécu les difficultés de cette thèse au plus près, et s'est transformé en chef cuisinier pour moi, m'évitant ainsi de mourir de faim !

En tout dernier lieu, je témoigne tout mon amour et ma reconnaissance à mes **grands-parents**, mes **mamans Yvette et Huguette** ainsi qu'à mes **papas Norbert et Paul**. C'est grâce à leur amour et leur soutien, tant financier que moral et spirituel, que j'ai tenu bon durant ces longues années d'études, et que j'en suis là aujourd'hui.

Chers parents, cette réussite, c'est aussi la vôtre !

QUELQUES DICTONS AFRICAINS...

Extraits libres de l'ouvrage "*Pensées africaines, proverbes, dictons et sagesse des Anciens*"
de Mr **Titinga Frédéric PACERE** (Ed. L'Harmattan – 2004) et du site [en ligne] **Dicocitation**



lesenfantsdafrique.org

" L'éducation forme, l'expérience forge."

" L'étoile a besoin de la nuit pour éclairer."

"Si la branche veut fleurir, qu'elle honore ses racines."

"C'est en essayant encore et encore que le singe apprend à bondir."

"Aussi longue que sera la nuit, le jour finira toujours par se lever."

"Lorsque tu ne sais pas où tu vas, regarde d'où tu viens."

"L'erreur n'annule pas la valeur de l'effort accompli."

"La persévérance est un talisman pour la vie."

"Au bout de la patience, il y a le ciel."

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX	17
INTRODUCTION GENERALE	19
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	25
Chapitre 1 - Stratégies de production des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique	26
Chapitre 2 - Physiopathologie de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde.....	80
Chapitre 3 - La galectine 3 : une cible potentielle pour le traitement de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde.....	105
HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	133
PARTIE EXPERIMENTALE.....	137
Chapitre 1 - Gal-3R et CRDr <i>tagués</i> : conception, production et évaluation de leur activité biologique	138
Chapitre 2 - Gal-3R et CRDr non <i>tagués</i> : conception, production et évaluation de leur activité biologique.....	177
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	205

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
SOMMAIRE	1
TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX	17
INTRODUCTION GENERALE	19
Les protéines recombinantes	20
Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique.....	20
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	25
Chapitre 1	26
Stratégies de production des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique.....	26
Section 1 - Etapes préliminaires à la production des protéines recombinantes.....	27
1. Clonage moléculaire (transgénèse).....	27
1.1. Principe	27
1.2. Isolement d'un fragment d'ADN d'intérêt	27
1.3. Insertion du transgène dans un vecteur de clonage	28
1.4. Insertion de l'ADN recombinant dans une cellule hôte	30
1.5. Sélection des cellules hôtes recombinantes	30
2. Choix d'un système d'expression des protéines recombinantes	31
2.1. Critères de choix.....	31
2.2. Bactéries	32
2.2.1. Espèces utilisées	32
2.2.2. Avantages et inconvénients de ce système.....	32
2.2.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système	33
2.3. Levures et champignons filamenteux	33
2.3.1. Espèces utilisées	33
2.3.2. Avantages et inconvénients de ce système d'expression	34
2.3.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système	34
2.4. Baculovirus en cellules d'insectes	35

2.4.1.	Lignées utilisées.....	35
2.4.2.	Avantages et inconvénients de ce système.....	36
2.4.3.	Exemples de protéines recombinantes produites par ce système	36
2.5.	Cellules de mammifères	37
2.5.1.	Lignées utilisées.....	37
2.5.2.	Avantages et inconvénients de ce système.....	37
2.5.3.	Exemples de protéines recombinantes produites par ce système	38
2.6.	Animaux transgéniques.....	40
2.6.1.	Espèces animales utilisées.....	40
2.6.2.	Avantages et inconvénients de ce système.....	41
2.6.3.	Exemples de protéines recombinantes produites par ce système	42
2.7.	Plantes transgéniques	42
2.7.1.	Espèces utilisées	42
2.7.2.	Avantages et inconvénients	43
2.7.3.	Exemples de protéines recombinantes produites par ce système	44
2.8.	Récapitulatif des systèmes d'expression de protéines recombinantes	44
Section 2 - Expression des protéines recombinantes dans <i>Escherichia coli</i> : défis et solutions ...		47
1.	Garantir un bon niveau d'expression des protéines recombinantes	47
1.1.	Choix du plasmide d'expression	47
1.1.1.	Origine de répllication	48
1.1.2.	Marqueurs de sélection.....	48
1.1.3.	Acteurs et étapes de la transcription	48
1.1.4.	Acteurs et étapes de la traduction	51
1.1.5.	Séquences codant des partenaires de fusion.....	54
1.1.6.	Exemples de plasmides commercialisés.....	54
1.2.	Choix de la souche de production de protéines recombinantes	55
1.2.1.	Souches permettant la stabilité du plasmide ou des ARNm	55
1.2.2.	Souches déficientes en protéases	55
1.2.3.	Souches surexprimant des codons rares.....	56
1.2.4.	Souches favorisant la formation de ponts disulfures et le bon repliement.....	56
1.2.5.	Souches résistantes à la toxicité de la protéine exprimée	56
1.2.6.	Souches auxotrophes pour la méthionine	57
1.2.7.	Exemples de souches d'expression commercialisées	57
1.3.	Choix des conditions de culture	58

1.3.1.	Les récipients.....	58
1.3.2.	Le milieu nutritif	58
1.3.3.	Les paramètres physicochimiques et la méthode d'induction.....	58
2.	Garantir la solubilité des protéines recombinantes exprimées	59
2.1.	Repliement des protéines et formation de corps d'inclusion	59
2.2.	Solutions permettant d'éviter la formation des corps d'inclusion.....	60
2.2.1.	Culture bactérienne à basse température	60
2.2.2.	Co-expression de partenaires de fusion.....	60
2.2.3.	Co-expression de chaperonnes	60
2.2.4.	Expression dans le périplasma et sécrétion dans le milieu de culture.....	61
2.3.	Renaturation des protéines recombinantes agrégées	62
2.3.1.	Isolement des corps d'inclusion	62
2.3.2.	Solubilisation des corps d'inclusion et des protéines recombinantes	62
2.3.3.	Repliement des protéines recombinantes solubilisées.....	63
2.4.	Synthèse sur la solubilité des protéines recombinantes.....	64
3.	Garantir la stabilité des protéines recombinantes exprimées	64
4.	Synthèse sur l'expression des protéines recombinantes dans <i>E. coli</i>	64
Section 3 - Purification et caractérisation des protéines recombinantes		65
1.	Etape préalable à la purification des protéines recombinantes : clarification.....	65
1.1.	Lyse physique : sonication.....	65
1.2.	Lyse mécanique : homogénéisateurs	65
1.3.	Lyse enzymatique : lysozyme	65
1.4.	Lyse thermique : cycles congélation-décongélation	66
2.	Purification des protéines recombinantes	66
2.1.	Chromatographie d'affinité.....	67
2.2.	Chromatographie d'échange d'ions	68
2.3.	Chromatographie d'exclusion stérique	69
2.4.	Chromatographie d'interactions hydrophobes	70
2.5.	Clivage des partenaires de fusion.....	70
2.5.1.	Clivage chimique.....	71
2.5.2.	Clivage enzymatique classique	71
2.5.3.	Clivage enzymatique sur colonne.....	71
2.5.4.	Intérêt des protéines recombinantes non <i>taguées</i>	72
2.6.	Elimination des endotoxines	72

3.	Caractérisation des protéines recombinantes	73
3.1.	Méthodes qualitatives.....	73
3.1.1.	Electrophorèse	74
3.1.2.	Mesure du dichroïsme circulaire.....	74
3.1.3.	La diffusion dynamique de la lumière	75
3.1.4.	La spectrométrie de masse	75
3.1.5.	La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.....	76
3.1.6.	La cristallographie aux rayons X.....	76
3.2.	Méthodes quantitatives	77
4.	Conservation de la protéine recombinante	77
5.	Synthèse sur la purification et la caractérisation des protéines recombinantes	78
Conclusion sur les stratégies de production des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique.....		79
Chapitre 2		80
Physiopathologie de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde		80
Section 1 - Rappels anatomiques d'une articulation synoviale.....		81
Section 2 - La polyarthrite rhumatoïde		82
1.	Epidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde	82
2.	Signes cliniques de la polyarthrite rhumatoïde.....	82
3.	Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde	83
3.1.	Généralités	83
3.2.	L'arthrite subclinique.....	84
3.3.	L'arthrite clinique	85
4.	Prise en charge médicamenteuse de la polyarthrite rhumatoïde	86
4.1.	Généralités	86
4.1.1.	Recommandations de la Haute Autorité de Santé.....	86
4.1.2.	Recommandations de l' <i>European League Against Rheumatism</i>	86
4.2.	Biothérapies indiquées dans la polyarthrite rhumatoïde	88
4.2.1.	Biothérapies ciblant des cytokines ou leurs récepteurs.....	89
4.2.2.	Biothérapies ciblant les lymphocytes T ou B.....	89
4.2.3.	Inconvénients des biothérapies indiquées dans la polyarthrite rhumatoïde	90
Section 3 - L'arthrose.....		92
1.	Epidémiologie de l'arthrose	92
2.	Signes cliniques de l'arthrose	93

3.	Physiopathologie de l'arthrose.....	94
3.1.	Généralités	94
3.2.	L'arthrose débutante à modérée	95
3.3.	L'arthrose évoluée.....	96
4.	Prise en charge médicamenteuse de l'arthrose des membres inférieurs.....	97
4.1.	Traitements actuels	97
4.1.1.	Généralités	97
4.1.2.	Recommandations de la Haute Autorité de Santé.....	97
4.1.3.	Recommandations des sociétés savantes	98
4.2.	Les perspectives thérapeutiques.....	100
4.2.1.	Inhibition des cytokines pro-inflammatoires	100
4.2.2.	Inhibition des protéases matricielles	100
4.2.3.	Inhibition ou ralentissement du remodelage tissulaire	101
4.2.4.	Activation de la régénération du cartilage par ingénierie tissulaire	102
4.2.5.	Synthèse sur les perspectives thérapeutiques dans l'arthrose.....	104
Chapitre 3		105
La galectine 3 : une cible potentielle pour le traitement de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde		105
Section 1 - Présentation des galectines.....		106
1.	Nomenclature des galectines	106
2.	Expression des galectines	107
3.	Rôles biologiques des galectines	108
Section 2 - La galectine 3		109
1.	Structure de la galectine 3.....	109
1.1.	Le domaine N-terminal.....	109
1.2.	La chaîne latérale.....	109
1.3.	Le domaine lectinique	110
2.	Expression de la galectine 3	112
2.1.	Cellules exprimant la galectine 3.....	112
2.2.	Régulation de l'expression de la galectine 3	112
3.	Rôles biologiques de la galectine 3	115
3.1.	Rôles biologiques de la galectine 3 intracellulaire	115
3.1.1.	Régulation de l'expression de gènes	116
3.1.2.	Régulation du cycle, de la croissance et de la survie cellulaires	116

3.2. Rôles biologiques de la galectine 3 extracellulaire.....	117
3.2.1. Induction de l'apoptose.....	118
3.2.2. Modulation de l'adhésion cellulaire.....	118
3.2.3. Activation cellulaire au cours de la réponse immuno-inflammatoire.....	119
4. Rôles de la galectine 3 dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose	120
4.1. Données cliniques obtenues chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou d'arthrose	120
4.1.1. Expression intra-articulaire de la galectine 3	120
4.1.2. Sécrétion synoviale et sérique de la galectine 3	121
4.1.3. Synthèse des données cliniques.....	121
4.2. Données expérimentales obtenues chez l'animal.....	122
4.2.1. Injection de galectine 3 recombinante chez la souris saine	122
4.2.2. Invalidation permanente de la galectine 3 chez la souris	123
4.2.3. Invalidation transitoire de la galectine 3 chez le rat, dans un modèle d'arthrite au collagène	127
4.2.4. Synthèse des données expérimentales.....	129
4.3. Effets de la galectine 3 recombinante sur les cellules articulaires humaines	130
5. Synthèse sur le rôle de la galectine 3 dans la physiopathologie de polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose	131
HYPOTHESE ET OBJECTIFS	133
DU TRAVAIL	133
Hypothèse de travail	134
Objectifs du travail	136
PARTIE EXPERIMENTALE.....	137
Chapitre 1	138
Gal-3R et CRDr <i>tagués</i> : conception, production et évaluation de leur activité biologique	138
Section 1 - Matériels et méthodes	139
1. Production de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	139
1.1. Clonage moléculaire	139
1.1.1. Isolement des fragments d'ADN	139
1.1.2. Insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pTrcHis	142
1.1.3. Transformation de bactéries compétentes.....	143
1.1.4. Validation du clonage moléculaire	144
1.2. Expression de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	144

1.3.	Clarification.....	145
1.4.	Purification de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	145
1.4.1.	Etapas de la purification.....	145
1.4.2.	Contrôle de la purification.....	147
1.5.	Conservation de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	148
2.	Etude du potentiel antirhumatismal du CRDr <i>tagué</i>	148
2.1.	Culture primaire de chondrocytes humains arthrosiques	148
2.2.	Etude du rôle de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i> sur des chondrocytes humains arthrosiques	149
2.2.1.	Stratégie générale	149
2.2.2.	Conditions d'incubation des chondrocytes humains arthrosiques avec la Gal-3R ou le CRDr <i>tagués</i>	150
2.2.3.	Recueil et analyse des échantillons issus de la culture cellulaire.....	152
	Section 2 - Résultats expérimentaux.....	155
1.	Production de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	155
1.1.	Validation du clonage moléculaire	155
1.2.	Expression et purification de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	160
1.3.	Quantification de la Gal-3 et du CRDr <i>tagués</i>	161
1.4.	Contrôle de l'absence d'endotoxines.....	161
2.	Résultats préliminaires de l'étude du potentiel antirhumatismal du CRDr <i>tagué</i>	162
2.1.	Vérification de l'activité biologique de la Gal-3R <i>taguée</i>	162
2.2.	Caractérisation des effets biologiques de la Gal-3R <i>taguée</i>	162
2.2.1.	Gènes de l'inflammation	163
2.2.2.	Gènes du catabolisme matriciel	164
2.2.3.	Gènes de l'anabolisme matriciel	164
2.2.4.	Synthèse sur la caractérisation des effets de la Gal-3R <i>taguée</i>	165
2.3.	Evaluation du rôle antagoniste du CRDr <i>tagué</i>	166
2.3.1.	Gènes de l'inflammation	166
2.3.2.	Gène du catabolisme matriciel.....	167
2.3.3.	Gènes de l'anabolisme matriciel	168
	Section 3 - Discussion	170
1.	Production de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	170
1.1.	Stratégie de purification	170
1.2.	Méthode de contrôle de l'absence d'endotoxines	170
1.3.	Résultats de la purification.....	171

2.	Etude du potentiel antirhumatismal du CRDr <i>tagué</i>	172
2.1.	Caractérisation des effets biologiques de la Gal-3R <i>taguée</i>	172
2.1.1.	Choix de la concentration de Gal-3R <i>taguée</i>	172
2.1.2.	Choix des conditions expérimentales	172
2.1.3.	Effets biologiques de la Gal-3R <i>taguée</i>	172
2.1.4.	Synthèse	174
2.2.	Evaluation du rôle antagoniste du CRDr <i>tagué</i>	174
3.	Synthèse	176
Chapitre 2		177
Gal-3R et CRDr non <i>tagués</i> : conception, production et évaluation de leur activité biologique		177
Section 1 - Matériels et méthodes		178
1.	Clonage moléculaire de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i>	178
1.1.	Stratégie spécifique à la Gal-3R non <i>taguée</i>	178
1.1.1.	Digestion enzymatique du vecteur pTrcHis Gal-3	178
1.1.2.	Amplification du fragment <i>NcoI</i> Gal-3 <i>EcoRI</i>	179
1.1.3.	Digestion enzymatique du plasmide pTrcHisA	180
1.2.	Stratégie spécifique au CRDr non <i>tagué</i>	180
1.2.1.	Digestion enzymatique du vecteur pTrcHis CRD	181
1.2.2.	Amplification du fragment <i>NcoI</i> CRD <i>EcoRI</i>	181
1.3.	Etapes de clonage communes à la Gal-3 et au CRD non <i>tagués</i>	183
2.	Expression de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i>	183
2.1.	Préparation de bactéries compétentes	183
2.2.	Vérification de l'expression de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i> , dans la souche C41(DE3)	184
2.3.	Production de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i> , dans la souche C41(DE3)	184
3.	Purification de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i>	184
Section 2 - Résultats		185
1.	Clonage moléculaire de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i>	185
2.	Expression de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i> , dans la souche C41(DE3)	189
2.1.	Vérification de l'expression de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i> , dans la souche C41(DE3)	189
2.1.1.	Suivi de la croissance bactérienne de la souche C41(DE3)	189
2.1.2.	Test d'expression de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i> , dans la souche C41(DE3)	190
2.2.	Production la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i> , par la souche C41(DE3) : contrôle de la purification	192

2.2.1.	Gal-3R non <i>taguée</i>	192
2.2.2.	CRDr non <i>tagué</i>	193
3.	Tests d'activité biologique de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i>	193
3.1.	Gal-3R non <i>taguée</i>	193
3.1.1.	Contrôle de l'absence d'endotoxines	193
3.1.2.	Vérification de l'activité biologique de la Gal-3R non <i>taguée</i>	194
3.2.	CRDr non <i>tagué</i>	195
Section 3 - Discussion		197
1.	Clonage moléculaire de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i>	197
2.	Production de la Gal-3R et du CRDr non <i>tagués</i>	198
2.1.	Gal-3 R non <i>taguée</i>	198
2.2.	CRDr non <i>tagué</i>	198
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		205

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADAMTs : A Disintegrin and Métalloprotéinases with Thrombospondin Motifs (agrécannes)
ADNr : ADN recombinant
ADNg : ADN génomique
AJI : arthrite juvénile idiopathique
ARNm : ARN messager
ARNr : ribosomique
ARNt : ARNt de transfert

B

BSA : sérum albumine bovine

C

CEI : chromatographie d'échange d'ions
CES : chromatographie d'exclusion stérique
CHR : cellule hôte recombinante
CI : corps d'inclusion
CRD : domaine lectinique de la galectine 3 ; désigne aussi la forme tronquée de la galectine 3
CRDr : CRD recombinant
Ck : cytokines
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

D

DCI : dénomination commune internationale
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
dNTP : dinucléotide triphosphate
DTT : dithiothréitol
DsbA : disulfide oxidoreductase

E

EC : extracellulaire
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
EPO : érythropoïétine

F

FS : fibroblastes synoviaux

G

Gal-3 : galectine 3
Gal-3R : galectine 3 recombinante
GST : glutathion S transférase

H

HTLV-1 : virus T-lymphotropique humain

I

IAC : indice d'adaptation des codons
IL : interleukine
iNOS : oxyde nitrique synthase inductible
IPTG : isopropyl-b-D-thiogalactoside

K

KO : *knock out* (inactivation génique)

M

MBP : *maltose binding protein*
MEC : matrice extracellulaire
MMPs : métalloprotéases matricielles
MS : macrophages synoviaux
MSP : médiateurs solubles pro-inflammatoires

N

NusA : *N-utilizing substance A*

O

OA : *osteoarthritis* (arthrose)

P

PBS : *phosphate buffered saline* (tampon phosphate)
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes
PAR : polyarthrite rhumatoïde (NB : l'abréviation conventionnelle est PR, mais pour éviter la confusion avec PtR, nous avons choisi l'abréviation PAR)
Pt : protéine
Ptl : protéine d'intérêt
PtR : protéine recombinante
PtRIT : protéine recombinante d'intérêt thérapeutique
PtT : protéine thérapeutique

S

SDS : dodécyl sulfate de sodium
shARN : *small hairpin RNA* (ARN non codant utilisé pour réprimer l'expression d'un gène)
SVF : sérum de veau fœtal

T

TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha
tPA : activateur tissulaire du plasminogène

V

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

W

WT : *wild type* (sauvage ; par opposition à « muté »)

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Classification des bio-médicaments.	21
Figure 2. Classification par aires thérapeutiques des 168 bio-médicaments disponibles en France au 31 mai 2013.	22
Figure 3. Classification pharmacologique des 168 bio-médicaments disponibles en France au 31 mai 2013.	22
Figure 4. Etapes de la transcription inverse et de la PCR.	27
Figure 5. Représentation schématique d'une bactérie.	28
Figure 6. Plasmide contenant les gènes <i>amp^r</i> , <i>lacZ</i> et le site de restriction <i>EcoRI</i>	29
Figure 7. Mode d'action d'une enzyme de restriction. Exemple d' <i>EcoRI</i>	29
Figure 8. Recombinaison entre un transgène et un plasmide sous l'action de la ligase.	29
Figure 9. Espèces d'ADN retrouvés dans un milieu réactionnel de <i>ligation</i>	29
Figure 10. Vue d'ensemble du clonage d'un gène.	30
Figure 11. Transgénèse par micro-injection.	41
Figure 12. Clonage par transfert de noyaux.	41
Figure 13. Spécimens de plantes carnivores utilisables pour produire des PtR.	43
Figure 14. Classement des systèmes d'expression de PtRIT en fonction de certains critères.	46
Figure 15. Eléments plasmidiques essentiels à l'expression d'une PtR dans <i>E. coli</i>	47
Figure 16. Fonctionnement du promoteur hybride <i>T7/lac</i>	50
Figure 17. Transcription de l'ADN en ARNm.	51
Figure 18. Structure en tige boucle de l'ARNm.	51
Figure 19. Traduction de l'ARNm en protéine.	52
Figure 20. Expression de PtR dans le périplasme d' <i>E. coli</i>	61
Figure 21. Lyse enzymatique du peptidoglycane bactérien.	66
Figure 22. Principe de purification des PtR par chromatographie d'affinité.	67
Figure 23. Principe de purification des PtR par chromatographie d'échange d'anions.	68
Figure 24. Principe de purification des PtR par chromatographie d'exclusion stérique.	69
Figure 25. Principe de purification des PtR par chromatographie d'interactions hydrophobes.	70
Figure 26. Principe du clivage enzymatique du <i>tag</i> sur colonne.	72
Figure 27. Limule (<i>Limulus polyphemus</i>).	73
Figure 28. Dispositif d'électrophorèse de protéines.	74

Figure 29. Principe de la diffusion dynamique de la lumière.	75
Figure 30. Principe de la spectrométrie de masse.	75
Figure 31. Principe de la détermination de la structure d'une protéine par cristallographie aux rayons X.	77
Figure 32. Structure d'une articulation synoviale.	81
Figure 33. Différents degrés de déformation de la main dans la PAR.	82
Figure 34. Etapes de la pathogenèse de la PAR.	83
Figure 35. Localisation du pannus synovial.	83
Figure 36. Rôle des cytokines pro-inflammatoires la physiopathologie de la PAR.	84
Figure 37. Rôle des cytokines pro-inflammatoires et des métalloprotéases matricielles dans la dégradation du cartilage et l'érosion osseuse au cours de la physiopathologie de la PAR.	85
Figure 38. Stratégie thérapeutique de la prise en charge de la PAR (proposée par l'EULAR).	87
Figure 39. Mécanisme d'action des principales biothérapies indiquées dans la PAR.	88
Figure 40. Principales localisations de l'OA.	92
Figure 41. Structure d'une articulation au cours de l'évolution de l'OA.	94
Figure 42. Rôle des cytokines pro-inflammatoires dans la physiopathologie de l'OA.	96
Figure 43. Stratégie thérapeutique de la prise en charge de l'OA (proposée par l'ESCEO).	99
Figure 44. Structures schématisées des différentes galectines.	106
Figure 45. Rôles de quelques galectines dans l'homéostasie cellulaire.	108
Figure 46. Structure schématisée et séquence protéique de la Gal-3 humaine.	109
Figure 47. Structure schématisée d'un dimère et d'un pentamère de Gal-3.	110
Figure 48. Promoteur du gène <i>LGALS3</i> et localisation des éléments de régulation.	113
Figure 49. Fonctions de la Gal-3 intracellulaire.	115
Figure 50. Homologie de structure entre la Gal-3 et Bcl-2.	116
Figure 51. Rôles biologiques de la Gal-3 extracellulaire.	117
Figure 52. Modélisation de l'adhésion cellulaire médiée par la Gal-3.	118
Figure 53. Effets de la Gal-3 sur les cellules immunitaires.	119
Figure 54. Expression de Gal-3 dans le cartilage de patients arthrosiques.	120
Figure 55. Concentrations synoviales et sériques de la Gal-3 chez des patients atteints d'OA ou de PAR.	121
Figure 56. Effets de la Gal-3 injectée dans les genoux de souris WT.	122
Figure 57. Effets articulaires de l'inactivation génique permanente de la Gal-3 chez des souris.	123
Figure 58. Rôle de la Gal-3 intracellulaire dans la survie de cellules chondrogéniques.	124
Figure 59. Effets articulaires d'une injection de mono-iodoacétate à des souris WT.	124
Figure 60. Effets articulaires d'une injection de mono-iodoacétate à des souris Gal-3 KO.	125

Figure 61. Effets articulaires de l'invalidation permanente de la Gal-3 chez des souris arthritiques (modèle AA).....	126
Figure 62. Effets de l'invalidation permanente de la Gal-3 sur les concentrations sériques d'IL-6 et de TNF- α produites par des souris arthritiques (modèle AA).....	126
Figure 63. Effets de l'invalidation transitoire de la Gal-3 sur les scores articulaire et radiologique calculés au niveau des chevilles de rats arthritiques (modèle CIA).	127
Figure 64. Effets histologiques de l'invalidation transitoire de la Gal-3 observés au niveau des chevilles de rats arthritiques (modèle CIA).	128
Figure 65. Effets de l'invalidation transitoire de la Gal-3 sur le nombre de lymphocytes T synoviaux des chevilles de rats arthritiques (modèle CIA).....	129
Figure 66. Production <i>in vitro</i> de cytokines par des fibroblastes synoviaux de patients atteints de PAR.	130
Figure 67. Production <i>in vitro</i> d'enzymes de dégradation du cartilage par des fibroblastes synoviaux de patients atteints de PAR et par des chondrocytes de patients atteints d'OA.....	131
Figure 68. Rôles de la Gal-3 dans l'inflammation articulaire au cours de la PAR ou de l'OA.	132
Figure 69. Modélisation du mécanisme d'action de la Gal-3 EC au cours de la physiopathologie de la PAR ou de l'OA.....	134
Figure 70. Structure schématique et séquence protéique d'une forme tronquée de la Gal-3.	135
Figure 71. Modélisation du mécanisme d'action d'une forme tronquée de la Gal-3 administrée en intra-articulaire chez des patients atteints de PAR ou d'OA.	136
Figure 72. Principe de l'amplification du fragment d'ADN codant la Gal-3R.	140
Figure 73. Principe de l'amplification du fragment d'ADN codant le CRDr.....	141
Figure 74. Cartographie du plasmide pTrcHis.	142
Figure 75. Principe de recombinaison des séquences de la Gal-3 ou du CRD avec le plasmide pTrcHis.	143
Figure 76. Etapes de la production bactérienne de Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	145
Figure 77. Principales étapes de la purification de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	146
Figure 78. Stratégie de l'étude des propriétés biologiques de la Gal-3R et du CRDr produits.	149
Figure 79. Exemple de plan de plaque de culture de chondrocytes humains arthrosiques en vue de l'évaluation de l'activité biologique de la Gal-3R.	150
Figure 80. Exemple de plan de plaque de culture de chondrocytes humains arthrosiques en vue de la caractérisation des effets de la Gal-3R sur leur métabolisme.	151
Figure 81. Exemple de plan de plaque de culture de chondrocytes humains arthrosiques en vue de l'étude des effets biologiques du CRDr sur leur métabolisme.....	152
Figure 82. Résultats du séquençage des vecteurs pTrcHis Gal-3 et pTrcHis CRD.	155

Figure 83. Comparaison de la séquence nucléotidique de la Gal-3 obtenue, avec la base de données <i>Nucleotide BLAST</i>	156
Figure 84. Comparaison de la séquence nucléotidique du CRD obtenue, avec la base de données <i>Nucleotide BLAST</i>	157
Figure 85. Traduction des séquences nucléotidiques de la Gal-3 et du CRD obtenues.....	158
Figure 86. Comparaison de la séquence protéique de la Gal-3 ou du CRD obtenue, avec la base de données <i>Protein BLAST</i>	159
Figure 87. Contrôle de l'efficacité de la purification de Gal-3R ou de CRDr <i>tagués</i>	160
Figure 88. Quantification de la Gal-3R et du CRDr <i>tagués</i>	161
Figure 89. Vérification de l'activité biologique de la Gal-3R <i>taguée</i> , sur l'expression génique de la MMP-3 dans des chondrocytes humains arthrosiques.....	162
Figure 90. Effet de la Gal-3R <i>taguée</i> , sur l'expression génique de l'IL-1 dans des chondrocytes humains arthrosiques.	163
Figure 91. Effet de la Gal-3R <i>taguée</i> , sur l'expression génique de l'IL-6 dans des chondrocytes arthrosiques.	163
Figure 92. Effet de la Gal-3R <i>taguée</i> , sur l'expression génique de la MMP-3 et de l'ADAMTS-4 dans des chondrocytes humains arthrosiques.	164
Figure 93. Effet de la Gal-3R <i>taguée</i> sur l'expression génique du collagène 2 et de l'agrécan dans des chondrocytes humains arthrosiques.	165
Figure 94. Effet du CRDr <i>tagué</i> , sur l'expression génique de l'IL-1 dans des chondrocytes humains arthrosiques.	166
Figure 95. Effet du CRDr <i>tagué</i> , sur l'expression génique de l'IL-6 dans des chondrocytes humains arthrosiques.	167
Figure 96. Effet du CRDr <i>tagué</i> , sur l'expression génique de la MMP-3 dans des chondrocytes humains arthrosiques.....	168
Figure 97. Effet du CRDr <i>tagué</i> , sur l'expression génique du collagène 2 dans des chondrocytes humains arthrosiques.....	169
Figure 98. Effet du CRDr <i>tagué</i> , sur l'expression génique de l'agrécan dans des chondrocytes humains arthrosiques.....	169
Figure 99. Hypothèse de la dimérisation artificielle du CRDr <i>tagué</i>	175
Figure 100. Fragments obtenus après la digestion du vecteur pTrcHis Gal-3 par <i>NcoI</i> et <i>EcoRI</i>	179
Figure 101. Cartographie du plasmide pTrcHisA.....	180
Figure 102. Fragments obtenus après la digestion du vecteur pTrcHis CRD par <i>NcoI</i> et <i>EcoRI</i>	181
Figure 103. Sites d'hybridation de l'amorce sens lors de l'amplification du fragment <i>NcoI</i> CRD <i>EcoRI</i>	182
Figure 104. Résultats du séquençage des vecteurs pTrc Gal-3 et pTrc CRD.	185

Figure 105. Comparaison de la séquence nucléotidique de la Gal-3 obtenue, avec la base de données <i>Nucleotide BLAST</i>	186
Figure 106. Comparaison de la séquence nucléotidique du CRD obtenue, avec la base de données <i>Nucleotide BLAST</i>	187
Figure 107. Traduction des séquences nucléotidiques de la Gal-3 et du CRD obtenues.....	188
Figure 108. Comparaison de la séquence protéique de la Gal-3 ou du CRD obtenue, avec la base de données <i>Protein BLAST</i>	188
Figure 109. Croissance des bactéries transformées par les plasmides pTrc Gal-3 ou pTrc CRD.....	190
Figure 110. Test d'expression de la Gal-3R non <i>taguée</i> , dans la souche C41(DE3).	191
Figure 111. Test d'expression du CRDr non <i>taguée</i> , dans la souche C41(DE3).....	191
Figure 112. Contrôle de la purification de la Gal-3R non <i>taguée</i> , produite dans <i>E. coli</i> C41(DE3).	192
Figure 113. Effet de la Gal-3R non <i>taguée</i> sur l'expression génique de la MMP-3 dans des chondrocytes humains arthrosiques.....	194
Figure 114. Effet de la Gal-3R non <i>taguée</i> sur l'expression génique de l'IL-6, du collagène 2 et de l'agrécan dans des chondrocytes humains arthrosiques.	195
Figure 115. Modélisation de la liaison lectinique entre la LacNAc et la Gal-3R.....	197
Figure 116. Perspectives de travail.....	204

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Exemples d'indications médicales des PtRIT.	23
Tableau II. Différents vecteurs de type ADN.	28
Tableau III. Exemples de PtRIT produites dans <i>E. coli</i> et commercialisées en France.	33
Tableau IV. Exemples de PtRIT produites dans <i>S.cerevisiae</i> et commercialisées en France.	35
Tableau V. Exemples de PtRIT produites dans des cellules murines et commercialisées en France.	38
Tableau VI. Exemples de PtRIT produites dans des cellules simiennes et commercialisées en France.	38
Tableau VII. Exemples de PtRIT produites dans des cellules de hamster et commercialisées en France.	39
Tableau VIII. Exemples de PtRIT produites dans des cellules humaines et commercialisées en France.	40
Tableau IX. Principaux avantages et inconvénients des systèmes d'expression de PtRIT.	45
Tableau X. Exemples de promoteurs utilisés pour l'expression de PtR dans <i>E. coli</i>	49
Tableau XI. Codons rares pour <i>E. coli</i>	53
Tableau XII. Exemples de plasmides utilisés pour l'expression de PtR dans <i>E. coli</i>	55
Tableau XIII. Exemples de souches d' <i>E. coli</i> utilisées pour l'expression de PtR.	57
Tableau XIV. Exemples de <i>tags</i> d'affinité utilisés pour purifier des PtR.	68
Tableau XV. Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des biothérapies indiquées dans la PAR.	90
Tableau XVI. Prévalence de l'OA en fonction de la tranche d'âge.	93
Tableau XVII. Principales cytokines impliquées dans la physiopathologie de l'OA.	95
Tableau XVIII. Distribution tissulaire et cellulaire des galectines et exemples de pathologies associées à la modification de leur niveau expression.	107
Tableau XIX. Affinité de la Gal-3 pour quelques ligands osidiques.	111
Tableau XX. Exemples de ligands glycoprotéiques de la Gal-3.	111
Tableau XXI. Principales fonctions biologiques régulées par certains facteurs de transcription du gène <i>LGALS3</i>	114
Tableau XXII. Séquences des amorces de clonage de la Gal-3 dans le vecteur pTrcHis.	141
Tableau XXIII. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes potentiellement ciblés par la Gal-3.	153

Tableau XXIV. Dosage des nitrites dans les surnageants de culture de chondrocytes humains arthrosiques stimulés par de la Gal-3R ou du CRDr <i>tagués</i>	161
Tableau XXV. Séquences des amorces de clonage de la Gal-3 dans le vecteur pTrc.	179
Tableau XXVI. Séquences des amorces de clonage de la Gal-3 dans le vecteur pTrc.	182
Tableau XXVII. Dosage des nitrites dans les surnageants de culture de chondrocytes humains arthrosiques stimulés par de la Gal-3R non <i>taguée</i>	194
Tableau XXVIII. Dosage des nitrites dans les surnageants de culture de chondrocytes humains arthrosiques stimulés par du CRDr non <i>tagué</i>	196

INTRODUCTION GENERALE

Les protéines recombinantes

Une protéine recombinante (PtR) est une protéine produite par une cellule procaryote ou eucaryote dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique : un gène codant une protéine d'intérêt est introduit dans le patrimoine génétique de l'espèce productrice (bactéries, cellules de mammifères, cellules d'insectes, cellules végétales, animaux, etc.), y est exprimé puis traduit en protéine (Schmid, 2005).

Les premières manipulations *in vitro* sur les gènes ont débuté en 1972 (Colin, 1999). Le biochimiste américain Paul Berg obtient le premier ADN recombinant (ADNr) et reçoit le Prix Nobel de chimie en 1980 pour « ses études fondamentales de la biochimie des acides nucléiques [...] » (The official web site of the Nobel Prize, [en ligne]). En 1982, le premier produit issu du génie génétique est commercialisé aux Etats-Unis (laboratoire Lilly) : il s'agit de l'insuline recombinante humaine produite par des bactéries génétiquement modifiées (Fédération Française des Diabétiques, [en ligne]). C'est aussi à cette période que les scientifiques se rendent compte que toutes les protéines produites par cette méthode ne sont pas forcément fonctionnelles. Ce problème provient du fait que les bactéries ne possèdent pas toute la machinerie nécessaire à la maturation post-traductionnelle et donc à l'acquisition de l'activité biologique des protéines eucaryotes. Les chercheurs se tournent alors vers des modèles plus complexes tels que les cellules eucaryotes (levures, cellules d'insectes, cellules de mammifères) ou encore les animaux transgéniques.

Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique

Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique (PtRIT) sont des bio-médicaments obtenus par génie génétique (Les entreprises du médicament, 2008, [en ligne]). Selon l'article L5121-1 du Code de la Santé Publique (Légifrance, [en ligne]), un bio-médicament est, « [un] médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle [...] ».

Les procédés de fabrication des PtRIT sont standardisés, rentables et présentent une sécurité d'emploi pour le patient. En effet, historiquement, les protéines thérapeutiques étaient pour la plupart extraites de tissus biologiques humains ou animaux, exposant bien souvent à des risques de pénurie de matières premières, à de très faibles rendements d'extraction ou encore à des risques biologiques et immunologiques. Ainsi par exemple, dans les années 30, un pancréas porcin permettait de ne traiter un diabétique que pendant trois jours ; de plus, des réactions allergiques avaient été décrites lors d'utilisations

prolongées (Schmid, 2005). Pour surmonter ces problèmes, en 1980, les scientifiques ont humanisé l'insuline porcine, par modification d'un seul acide aminé, puis ils ont réussi à produire de l'insuline recombinante humaine, commercialisée pour la première fois en 1982 par le laboratoire Lilly (Fédération Française des Diabétiques, [en ligne]). Un autre exemple illustrant les risques biologiques est celui de l'hormone de croissance (somatotropine) qui a fait l'objet d'un scandale sanitaire en France. En effet, entre 1983 et 1988, 1698 enfants atteints de nanisme ont été traités par de la somatotropine extraite d'hypophyse de cadavres humains. Or plusieurs d'entre eux sont décédés de la maladie de Creutzfeld-Jakob, ce qui a fait éclater un scandale sanitaire pour lequel des responsables scientifiques, médicaux et politiques ont été jugés (L'Express, 2014, [en ligne]). Finalement, dès 1991 en France, les patients atteints de nanisme ont été traités par de la somatotropine recombinante humaine produite dans *E. coli*. Ce type de scandale souligne bien l'importance du recours à des protéines thérapeutiques dont le processus de fabrication est contrôlé.

De nos jours, les PtRIT constituent la quasi totalité (94%) des 168 bio-médicaments commercialisés en France (Les entreprises du médicament, 2013 [en ligne]) et sont indiquées dans de nombreux domaines thérapeutiques (rhumatologie : 8%, métabolisme : 11%, onco-hématologie : 18%, infectiologie : 32%, etc.). Elles se déclinent en trois catégories (protéines thérapeutiques : 42%, vaccins recombinants : 35%, anticorps monoclonaux : 17%) (**figures 1 à 3**) et possèdent plusieurs indications médicales (**tableau I**).

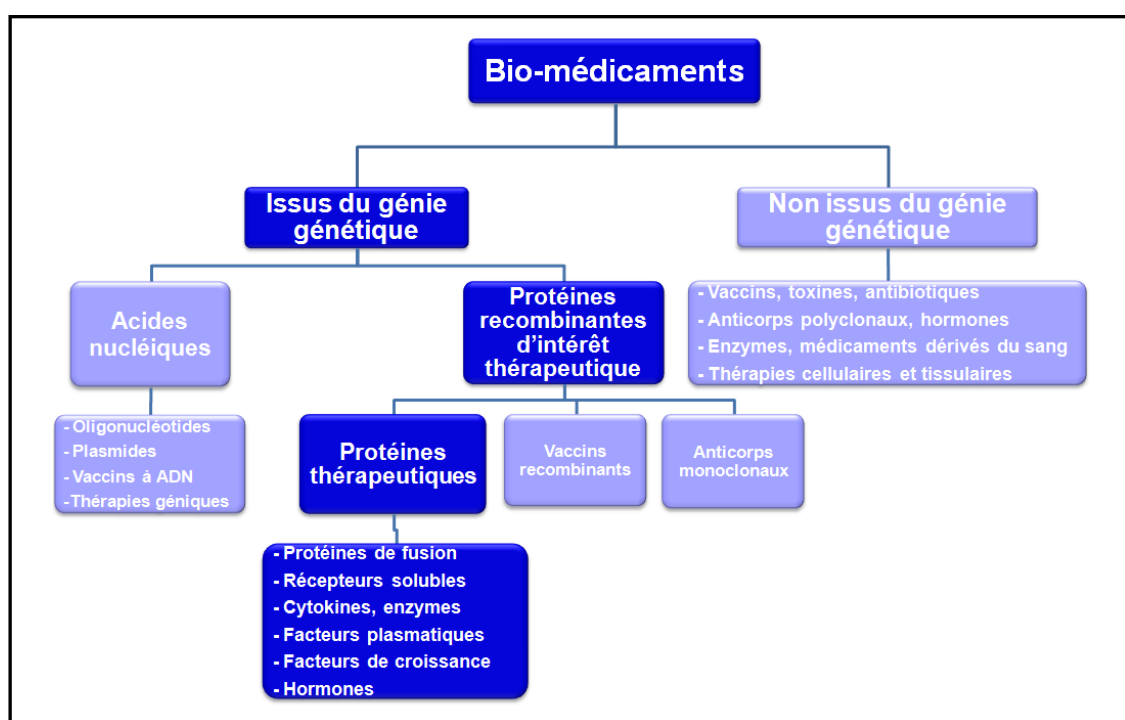


Figure 1. Classification des bio-médicaments.

(Les entreprises du médicament, 2008, [en ligne])

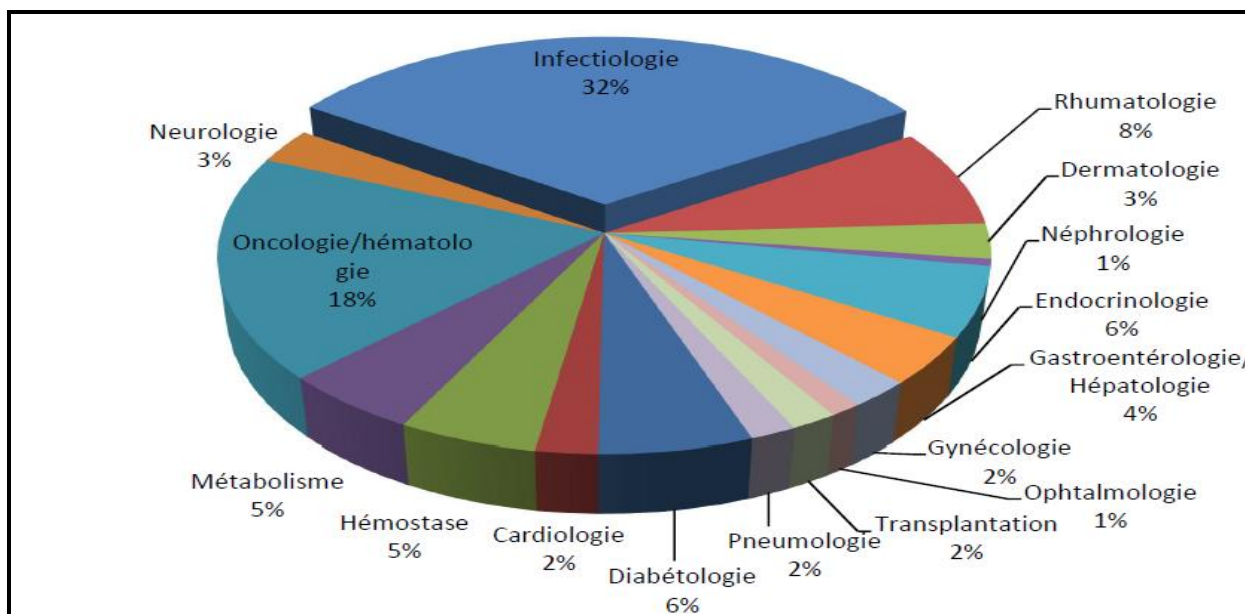


Figure 2. Classification par aires thérapeutiques des 168 bio-médicaments disponibles en France au 31 mai 2013.

(Les entreprises du médicament, 2013, [en ligne])

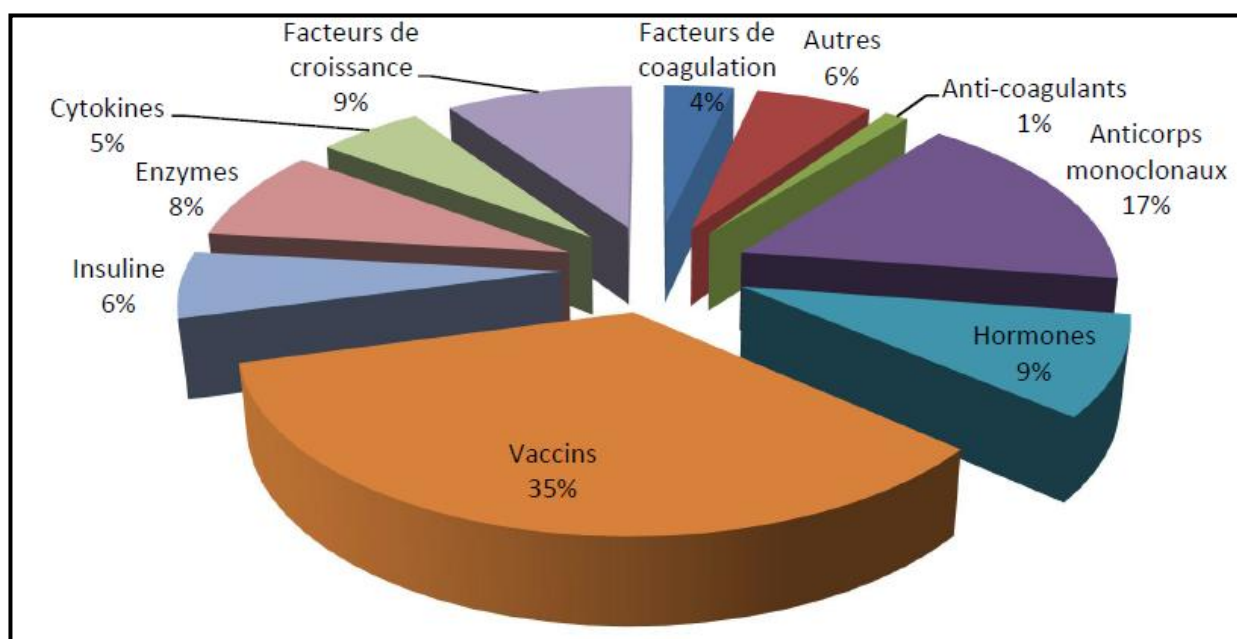


Figure 3. Classification pharmacologique des 168 bio-médicaments disponibles en France au 31 mai 2013.

(Les entreprises du médicament, 2013, [en ligne])

Protéines thérapeutiques	Fonctions	Exemples d'applications
Cytokines	Régulation du système immunitaire	
	Ex : Interférons Interleukines	Hépatite B Cancers, VIH
Enzymes	Catalyse de réactions biochimiques	
	Ex : Enzymes lysosomales Lipase gastrique	Maladies lysosomales Mucoviscidose
Hormones	Régulation des fonctions de l'organisme	
	Ex : Insuline Œstrogènes	Diabète Traitements de substitution hormonale
Facteurs de coagulation	Régulation de la coagulation du sang	
	Ex : Facteur VIII	Hémophilie
Antigènes	Stimulation du système immunitaire pour la production d'anticorps spécifiques	
	Ex : Hémagglutinine Antigène HB	Vaccin contre la grippe Vaccin contre l'hépatite B
	Allergènes	Désensibilisation et traitement des allergies
Anticorps	Régulation du système immunitaire	
	Ex : Anticorps polyclonaux Anticorps monoclonaux	Sérothérapie, prévention des maladies hémolytiques du second nouveau-né Cancérologie, transplantation d'organes, maladies auto-immunes

Tableau I. Exemples d'indications médicales des PtRIT.

(Dumas and Robert, 2009)

L'objectif de ce mémoire est de rapporter les résultats de l'étude des potentialités antirhumatismales d'une forme tronquée recombinante d'une lectine, la galectine 3 (Gal-3). Pour ce faire, dans la première partie, une mise au point bibliographique sera faite sur les stratégies de production des PtRIT (chapitre 1), sur la physiopathologie de deux rhumatismes chroniques fréquents, la polyarthrite rhumatoïde (PAR) et l'arthrose (OA) (chapitre 2) et enfin sur la galectine 3 (chapitre 3) et l'intérêt de la cibler pour traiter ces rhumatismes. Dans la deuxième partie, les résultats expérimentaux de la production d'une forme tronquée recombinante de la Gal-3, ainsi que ceux des tests préliminaires visant à définir ses potentialités antirhumatismales, seront présentés.

Le procédé de production d'une PtRIT doit répondre à plusieurs objectifs afin d'obtenir un produit biologiquement efficace et sécurisé pour le patient. A ce titre, il doit assurer un haut rendement de production et maintenir un produit de qualité en supprimant les impuretés et contaminants dérivant de la chaîne de production. Dans le 1^e chapitre de la partie bibliographique, trois sections seront développées : les étapes préliminaires à la production d'une PtRIT, les objectifs et enjeux de la production de ces protéines dans le système bactérien *Escherichia coli* et enfin les aspects relatifs à leur purification et à leur caractérisation. En somme, ce chapitre présentera la stratégie et les outils qui ont permis de concevoir et de produire une forme tronquée recombinante de la Gal-3 dont les propriétés semblent intéressantes pour le traitement de deux rhumatismes chroniques fréquents, la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose.

L'OA et la PAR sont caractérisées par des phénomènes inflammatoires et dégénératifs (Société Française de Rhumatologie, [en ligne]). La prise en charge médicamenteuse de l'OA n'est que symptomatique (antalgiques, anti-inflammatoires) et, à ce jour, aucun traitement n'a permis de retarder l'évolution de la maladie (VidalReco, [en ligne]). Quant à la PAR, sa prise en charge médicamenteuse est symptomatique mais aussi étiologique grâce à l'avènement des biothérapies ciblant les cytokines pro-inflammatoires et les cellules immunitaires (VidalReco, [en ligne]). Néanmoins, de plus en plus de cas de non réponse, d'échappement aux traitements ou de toxicité sont décrits (Association Française des polyarthrites, [en ligne]), ce qui justifie la nécessité de rechercher d'autres cibles thérapeutiques. Parmi elles, figure la Gal-3 qui est une protéine sécrétée au cours de la pathogenèse de ces deux rhumatismes (Ohshima et al., 2003; Reboul et al., 2004) et qui concourt à leur évolution défavorable.

La Gal-3 régule de nombreux mécanismes physiologiques inhérents à l'homéostasie cellulaire (croissance, différenciation, apoptose, etc.) et pathologiques (prolifération tumorale, métastase, inflammation chronique, fibrose, etc.). La plupart de ses effets bénéfiques sont le résultat de son activité intracellulaire tandis que nombre de ses effets délétères résultent de son activité extracellulaire. Ainsi, dans le contexte de la PAR et de l'OA, de nombreux travaux ont démontré qu'en localisation extracellulaire, la Gal-3 concourt à l'entretien de la réaction inflammatoire et à la dégradation des tissus articulaires (Forsman et al., 2011; Neidhart et al., 2005), ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de ces deux pathologies (Li et al., 2011). L'enjeu du ciblage de cette protéine est de bloquer ses effets extracellulaires sans affecter ses effets intracellulaires. Pour ce faire, nous avons envisagé une stratégie de compétition de la Gal-3 extracellulaire par une forme tronquée recombinante, d'affinité similaire pour ses ligands mais incapable d'engendrer les mêmes effets biologiques (Janelle-Montcalm et al., 2007; Nieminen et al., 2006).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Stratégies de production des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique

Section 1 - Etapes préliminaires à la production des protéines recombinantes

1. Clonage moléculaire (transgénèse)

1.1. Principe

Le clonage moléculaire consiste à isoler un fragment d'ADN complémentaire (codant une protéine d'intérêt) et à l'insérer dans un vecteur de clonage. Celui-ci, de nature plasmidique ou virale, est ensuite introduit dans des cellules hôtes adaptées. Grâce à leur croissance dans un milieu sélectif, ces cellules permettent l'amplification du transgène.

1.2. Isolement d'un fragment d'ADN d'intérêt

Pour obtenir des fragments d'ADN complémentaire (ADNc, 3'→5') codant la protéine d'intérêt (Ptl), il faut extraire les ARN totaux des cellules exprimant la Ptl et les rétrotranscrire grâce à une ADN synthétase ARN dépendante (transcriptase inverse).

Les ARN messagers (ARNm) contenus dans le pool d'ARN totaux sont reconnus par la transcriptase inverse qui, en présence de nucléotides, génère de l'ADNc monocaténaire (hybridé avec l'ARNm) qui sera ensuite amplifié par PCR (*Polymerisation Chain Reaction*). Au début de la PCR, la température élevée permet de dénaturer l'hybride ARNm-ADNc et d'activer la Taq polymérase (ADN synthétase ADN dépendante, enzyme thermostable). Lors du premier cycle d'amplification, l'enzyme synthétise le brin d'ADN sens (5'→3') en utilisant uniquement l'ADNc comme matrice. Dès le deuxième cycle de PCR, l'ADN bicaténaire précédemment obtenu est dénaturé et chacun des brins sert de matrice pour la synthèse de l'autre. Au total, l'amplification aboutit à 2^n copies d'ADN bicaténaire (**figure 4**).

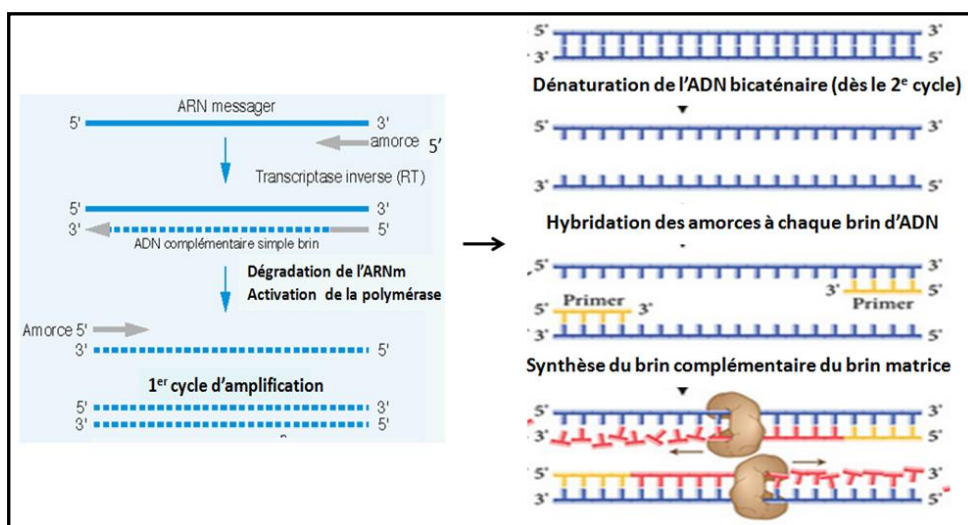


Figure 4. Etapes de la transcription inverse et de la PCR.

(Pignon, 1998 ; New England Biolabs [en ligne])

1.3. Insertion du transgène dans un vecteur de clonage

Il existe plusieurs types de vecteurs de clonage (**tableau II**). Les critères de choix reposent sur la taille du transgène mais aussi sur la cellule hôte dans laquelle sera introduit le vecteur. Les plus couramment utilisés étant les plasmides, seules les caractéristiques de ceux-ci seront détaillées par la suite.

Vecteur	Cellule hôte	Taille du transgène (kb)
Plasmides	Bactérie	0,5 - 10
Bactériophages (virus infectant les bactéries)	Bactérie	10 - 20
Bacterial Artificial Chromosome	Bactérie	50 - 300
Yeast Artificial Chromosome	Levure	100 - 2000
Virus (adénovirus, rétrovirus, lentivirus, etc)	Cellule animale	variable

Tableau II. Différents vecteurs de type ADN.

(Perrin-Schmitt, 2011)

Un plasmide est une molécule d'ADN circulaire extra-chromosomique dotée d'une capacité d'auto réplication et, essentiellement retrouvée à l'état naturel dans les organismes procaryotes (**figure 5**) (Palomares et al., 2004). Pour des applications de biotechnologies, ce sont des plasmides purifiés et commercialisés qui sont utilisés.

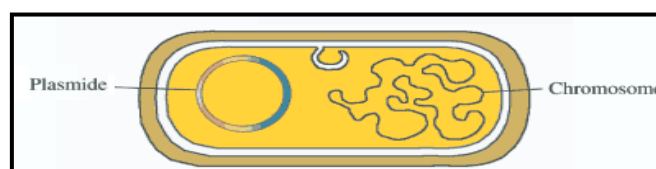


Figure 5. Représentation schématique d'une bactérie.

(Pronovost M, 2013, [en ligne])

Les plasmides possèdent plusieurs caractéristiques justifiant de leur usage pour la transgénèse. En effet, compte tenu de leur petite taille, ils sont faciles à isoler, à purifier, et à réintroduire dans une autre cellule hôte. Leur origine de réplication permet le maintien du transgène dans la cellule hôte recombinante (CHR) et leurs marqueurs de sélection (gènes de résistance à des antibiotiques, gène lacZ, etc.) facilitent le criblage des CHR. De plus, les plasmides possèdent un site dit de « multi clonage » reconnu par de nombreuses enzymes de restriction. Celles-ci ont pour rôle d'exciser le vecteur et le transgène de façon spécifique et complémentaire afin que la ligase, une autre enzyme, puisse catalyser leur recombinaison (*ligation*) (**figures 6 à 8**). Il faut noter que la *ligation* n'est pas effective à 100%. Il existe 3 « espèces » d'ADN dans le milieu post-*ligation* : le transgène (circularisé), le plasmide vide re-circularisé (si les extrémités sont compatibles) et le plasmide recombinant (**figure 9**).

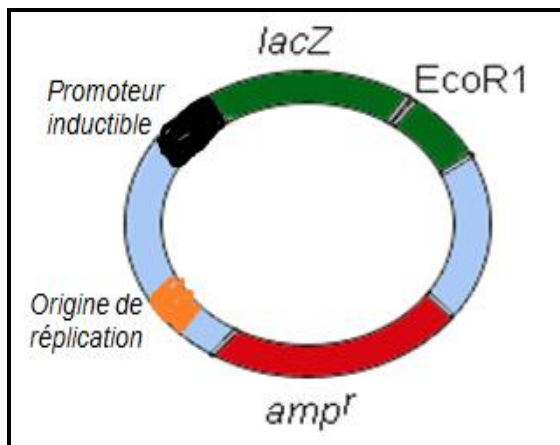


Figure 6. Plasmide contenant les gènes amp^r , $lacZ$ et le site de restriction $EcoRI$.

(Pronovost M, 2013 [en ligne])

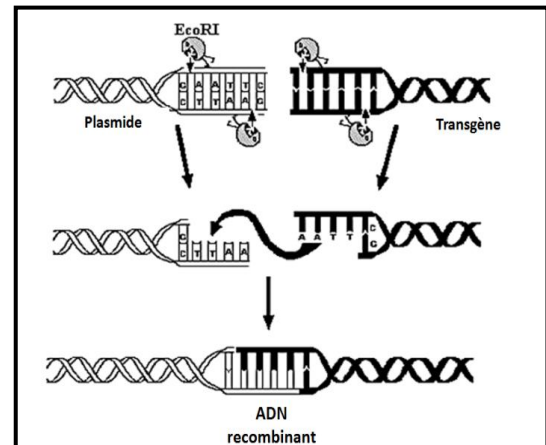


Figure 7. Mode d'action d'une enzyme de restriction. Exemple d' $EcoRI$.

(Pronovost M, 2013 [en ligne])

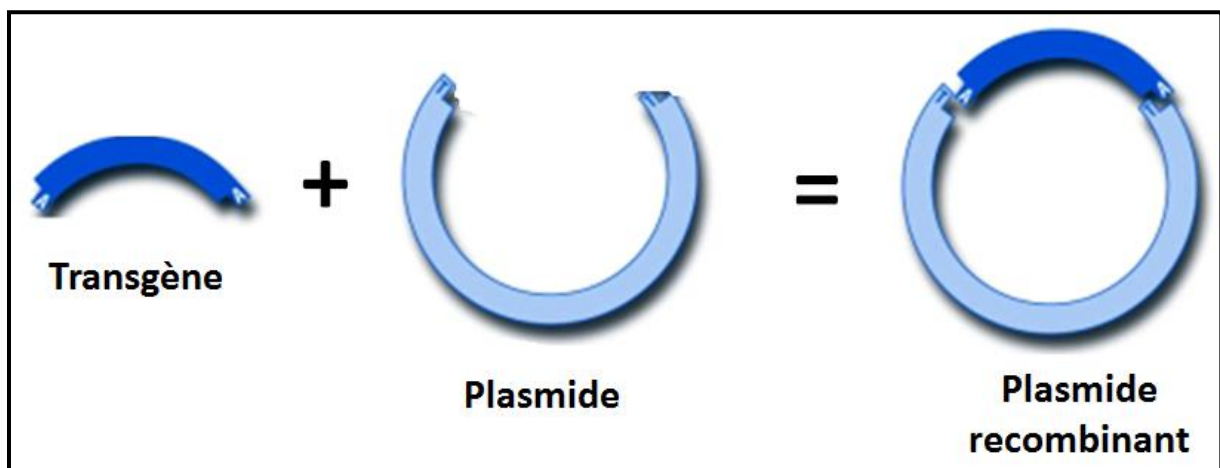


Figure 8. Recombinaison entre un transgène et un plasmide sous l'action de la ligase.

(Pronovost M, 2013 [en ligne])

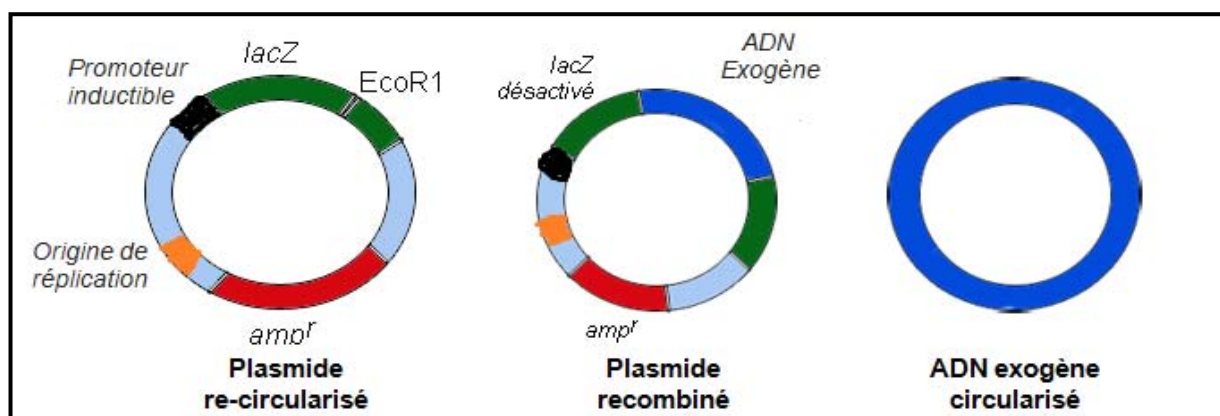


Figure 9. Espèces d'ADN retrouvés dans un milieu réactionnel de ligation.

NB : le schéma n'est pas à l'échelle

(Pronovost M, 2013 [en ligne])

1.4. Insertion de l'ADN recombinant dans une cellule hôte

L'insertion de l'ADN recombinant (ADNr) dans une cellule-hôte est possible par des techniques chimiques (lipofection), électriques (électroporation) ou mécaniques (biolistique). Quand de l'ADN « nu » est inséré dans une cellule hôte, on parle de transformation (cellule procaryote) ou de transfection (cellule eucaryote). Le terme transduction est utilisé quand l'ADNr est encapsidé dans des Pt virales de bactériophages (cellules procaryotes) ou d'autres virus (cellules eucaryotes) (Perrin-Schmitt, 2011).

1.5. Sélection des cellules hôtes recombinantes

L'insertion de l'ADNr dans les cellules hôtes n'est pas effective à 100% et à ce stade, il existe trois population de cellules : les non modifiées, celles qui ont internalisé le vecteur non recombinant (sans le transgène) et celles qui ont internalisé le vecteur recombinant (avec le transgène). Pour les séparer, elles sont cultivées dans un milieu sélectif contenant un antibiotique. Dans le cas d'un système d'expression bactérien, le milieu sélectif peut aussi contenir du lactose si le vecteur utilisé contient le gène lacZ. Ce gène code une β -galactosidase, enzyme capable d'hydrolyser des β -galactosides et d'engendrer des colonies bactériennes bleues. Comme l'illustre la **figure 10**, seules les bactéries ayant internalisé un plasmide sont capables de croître sur milieu sélectif, car résistantes à l'antibiotique. Celles qui parmi elles, ont reçu le plasmide reconstitué, donc qui possèdent un gène lacZ intact, se colorent en bleu. Les autres, celles qui ont reçu le plasmide recombinant n'ont plus de gène lacZ (car le transgène a été inséré à cet endroit) et demeurent donc blanches.

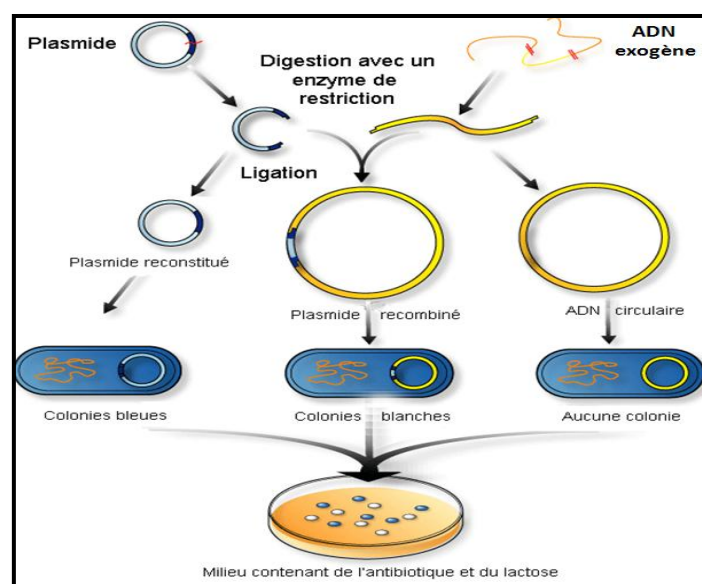


Figure 10. Vue d'ensemble du clonage d'un gène.

(Pronovost M, 2013, [en ligne])

Une fois isolées, les CHR sont cultivées en masse afin de pouvoir extraire et purifier une quantité importante de plasmides contenant l'ADNr qui sera ensuite sous-cloné dans un vecteur plasmidique d'expression, lui-même inséré dans des cellules hôtes. En plus des caractéristiques des plasmides de clonage, un plasmide d'expression possède des éléments indispensables à l'expression d'un gène (promoteur inductible assurant la transcription des gènes en aval, éléments d'initiation et de terminaison de la transcription, éléments de stabilisation des transcrits, etc). Une séquence codante pour un *tag*, petit peptide facilitant la purification des PtR exprimées, peut aussi être présente. Tous ces aspects seront développés dans la section 2 de ce chapitre.

A la fin du clonage, une partie des CHR est conservée à -80°C ou dans de l'azote liquide, sous forme de banque cellulaire, pour garantir la reproductibilité des lots d'ADNr cloné et des PtR exprimées.

2. Choix d'un système d'expression des protéines recombinantes

2.1. Critères de choix

Les critères de choix d'une cellule ou d'un organisme hôte reposent notamment sur les propriétés de la protéine à produire, celles de l'hôte lui-même, sur le coût de production, sur la durée requise entre le clonage du gène et la caractérisation finale de la Ptl, sur les contraintes réglementaires, etc. (Betton and Chaffotte, 2005).

Concernant la Ptl, il est nécessaire de connaître le compartiment cellulaire dans lequel elle exerce son activité biologique, ainsi que les propriétés physicochimiques (solubilité) et structurales garantissant cette activité (conformation, présence ou non de ponts disulfures ou d'autres modifications post-traductionnelles comme les glycosylations), etc. Il est important également que sa purification et sa caractérisation finale soient faciles et reproductibles.

Quant à l'hôte, il doit être simple à utiliser, parfaitement caractérisé (type procaryote ou eucaryote), capable d'internaliser un transgène, de résister aux contraintes de culture cellulaire ou de fermentation à grande échelle, et de synthétiser la Ptl en quantité suffisante.

Les principaux types de cellules ou d'organismes utilisés pour la transgénèse sont les bactéries, les levures, les cellules d'insectes associées au baculovirus, les cellules de mammifères, les animaux et plantes transgéniques.

2.2. Bactéries

2.2.1. Espèces utilisées

Escherichia coli, bactérie Gram à négatif, est la principale bactérie utilisée en biotechnologie car sa génétique est bien connue et elle possède de nombreuses souches disponibles. D'autres bactéries (*Bacillus spp*, *Lactococcus lactis*, *Caulobacter crescentus* et *Streptomyces lividans*) sont utilisées mais de façon anecdotique (Sodoyer, 2004).

2.2.2. Avantages et inconvénients de ce système

Les bactéries sont faciles à cultiver à l'échelle industrielle : leur croissance est rapide et possible en fermenteurs. Elles permettent d'obtenir des rendements élevés de Ptl : *E. coli* peut produire des PtR jusqu'à 80% de son poids sec (Demain and Vaishnav, 2009).

Néanmoins, elles sont incapables d'effectuer des modifications post-traductionnelles complexes propres aux mammifères (repliement optimal, glycosylations, association de sous-unités, γ -carboxylation, etc.), ce qui limite leur utilisation à la production de biomolécules simples. De plus, chez les bactéries, certains codons sont rares et donc peu utilisés lors de la traduction protéique alors qu'ils le sont usuellement chez les mammifères. Par conséquent il peut survenir des anomalies de traduction d'une Ptl eucaryote possédant des acides aminés correspondant à des codons rares pour la bactérie hôte. Par ailleurs, du fait de leur faible potentiel de sécrétion (Sodoyer, 2004), il est souvent nécessaire de lyser les bactéries pour récupérer la Ptl, ce qui complexifie le procédé d'extraction-purification et nuit aux rendements de purification (Dumas and Robert, 2009). En outre, lors de ces étapes, il n'est pas rare que la préparation de PtR soit contaminée par des endotoxines (ou lipopolysaccharide : LPS) (Palomares et al., 2004). Si la PtR est destinée à traiter des cellules en culture ou à être injectée à des mammifères, le LPS devra être impérativement éliminé de la préparation, étape supplémentaire exposant à une diminution du rendement de production.

Contrairement à *E. coli*, les *Bacillus* utilisés ne possèdent pas d'endotoxines et sont donc intéressants pour l'expression de protéines thérapeutiques destinées à l'usage parentéral. Ils ne forment pas de corps d'inclusion (CI) (agrégats issus du mauvais repliement et donc de l'insolubilité de la Ptl) mais au contraire, ils sont capables de sécréter la Ptl directement dans le milieu de culture. Cela facilite la purification de la Ptl, qui néanmoins, est diluée, ce qui influence le rendement de production. De même, la protéolyse massive qui peut s'observer du fait de la présence de protéases bactériennes affecte ce rendement (Diaz Martinez V. et Martos M.C., 2011).

2.2.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système

Depuis des décennies, de nombreuses PtRIT sont produites par *E. coli* : hormones, facteurs de croissance, cytokines, enzymes, etc. (Demain and Vaishnav, 2009) et, nombre d'entre elles sont actuellement commercialisées en France (**tableau III**).

Nature de la PtRIT	DCI Composition	Classe pharmacologique	Domaine thérapeutique d'utilisation (+ exemples d'indications)	Laboratoire exploitant
Ac monoclonal	Ranibizumab (Lucentis®)	Inhibiteur de la néo-vascularisation (anti-VEGF)	Ophtalmologie (DMLA)	Novartis
Cytokine ou facteur de croissance	Adesleukine (Proleukin®)	Immuno-modulateurs (IL-2)	Oncologie (adénocarcinome rénal)	
	Interféron α 2a (Roféron®)	Immunostimulant (interféron)	Onco-hématologie (leucémies, lymphomes, myélomes, mélanomes, cancers rénaux et cutanés...) Infectiologie (hépatites virales B et C)	Roche
	Interféron α 2 (Introna®)			Merck
	Filgrastim (Neupogen®)	Immunostimulants (facteur de croissance : G-CSF)	Oncologie (réduction des neutropénies post chimiothérapie cytotox)	Amgen
	Pegilgrastim (Neulasta®)			
	Romiplostim (Nplate®)	Stimulant de l'hématopoïèse (facteur de croissance plaquettaire)	Hémostase (purpura thrombopénique auto-immun ou idiopathique)	
	Mécasermine (Increlex®)	Facteur de croissance (IGF)	Endocrinologie (retards de croissance liés à un déficit en IGF)	Ipsen Pharma
Enzyme	Rétéplase (Rapilysin®)	Anti-thrombotique (activateur du plasminogène)	Hémostase (traitement thrombolytique des suspicions d'IDM)	Activis
Hormone	Insuline (Umuline® / Insuman®)	Hormone hypoglycémiante (insuline humaine)	Métabolisme et nutrition (diabète)	Eli Lilly / Sanofi Aventis
	Somatropine (Umatrope® / Omnitrope®)	Hormone de croissance humaine	Endocrinologie (retards de croissance liés à un déficit en hormone de croissance)	Lilly / Sandoz

Tableau III. Exemples de PtRIT produites dans *E. coli* et commercialisées en France.

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). **DMLA** : dégénérescence maculaire liée à l'âge. **IL** : interleukine. **IDM** : infarctus du myocarde. **G-CSF** : Granulocyte Colony-Stimulating Factor (facteur de croissance de la lignée des granulocytes). **IGF** : Insulin-Like Growth Factor (facteur de croissance insulino-mimétique).

(Vidal [en ligne] ; Les Entreprises du Médicament, 2013, [en ligne])

2.3. Levures et champignons filamenteux

2.3.1. Espèces utilisées

Les levures utilisées pour la production de PtRIT sont *Saccharomyces cerevisiae* (levure de bière) et *Pichia pastoris*. Quant aux champignons filamenteux, ce sont ceux du genre *Aspergillus* qui sont le plus souvent utilisés.

2.3.2. Avantages et inconvénients de ce système

Les levures et champignons filamenteux offrent les mêmes facilités expérimentales et industrielles (Liu et al., 2012) que les bactéries mais possèdent des avantages supplémentaires. Les *Aspergillus spp* sont par exemple capables d'intégrer le transgène dans leur génome et permettant ainsi une expression stable à long terme. Par ailleurs, ils sont tous capables de sécréter la PtR (Jayaraj and Smooker, 2009) dans le milieu de culture avec des rendements intéressants (25 g/L pour la glucoamylase produite par *Aspergillus niger*) (Demain and Vaishnav, 2009). En outre, ils peuvent opérer plusieurs types de modifications post-traductionnelles comme le repliement, la formation de ponts disulfures et les glycosylations (Demain and Vaishnav, 2009; Palomares et al., 2004).

Malgré leurs avantages apparents, les levures et champignons filamenteux présentent des inconvénients qui limitent leur usage. Ils sont peu adaptés à la production de PtR nécessitant une glycosylation de type mammalien puisqu'ils privilégient l'incorporation de mannose, or ces résidus sont immunogènes pour les mammifères (Palomares et al., 2004). Ils sont également peu adaptés pour la production de protéines très complexes comme les anticorps monoclonaux (Dumas and Robert, 2009). De plus, les champignons filamenteux expriment des protéases, ce qui peut diminuer le rendement de production de la PtR. Les hôtes du genre *Pichia* hébergent en général des transgènes dont l'expression est sous la dépendance d'un promoteur inductible par le méthanol. Or cet alcool est très inflammable et très toxique non seulement pour la levure (en cas d'accumulation), mais aussi pour les humains pour lesquels est destinée la PtR produite (Palomares et al., 2004).

2.3.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système

En recherche académique, *S. cerevisiae*, *P. pastoris* et *Aspergillus spp* ont déjà été utilisés pour produire plusieurs PtR : des hormones (insuline, glucagon), des facteurs de croissance (GM-CSF, EPO, PDGF), des facteurs anticoagulants (hirudine), des cytokines (IL-2, TNF), des enzymes (urate oxydase), etc. (Demain and Vaishnav, 2009).

Dans le **tableau IV** figurent des exemples de PtRIT produites par *S. cerevisiae* actuellement commercialisées en France.

Nature de la PtRIT	DCI Composition	Classe pharmacologique	Domaine thérapeutique d'utilisation (+ exemples d'indications)	Laboratoire exploitant
Enzyme	Rasburicase (Fasturtec®)	Chimioprotecteur (analogue de l'urate oxydase)	Onco-hématologie (traitement et prévention de l'hyperuricémie liée à la lyse tumorale suivant l'initiation d'une chimiothérapie)	Sanofi Aventis
Hormone	Glucagon (Glucagen®)	Hormone glycogénolytique	Métabolisme et nutrition (hypoglycémies sévères des patients insulino-traités)	NovoNordisk
	Insuline aspartate (Novomix®)	Hormone hypoglycémiante (analogue de l'insuline)	Métabolisme et nutrition (diabète)	
	Insuline détemir (Levemir®)	Hormone hypoglycémiante (analogue de l'insuline)		
	Insuline (Actrapid®, Mixtard®, Insulatard®)	Hormone hypoglycémiante (insuline humaine)		
Vaccin recombinant	Anatoxine diphtérique + Anatoxine tétanique + Antigènes de <i>B. pertussis</i> + Virus (i) de la poliomyélite + Polyoside de <i>H. influenzae b</i> + Ag HBs du VHB (Infarix Hexa®)	Vaccins combinés viraux et bactériens	Infectiologie (vaccination contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite, la coqueluche, l'hépatite B et les infections à <i>H. influenzae b</i>)	GlaxoSmithKline
	Ag HBs (VHB) + VHA inactivé (Twinrix®)	Vaccins contre les hépatites	Infectiologie (vaccination contre les hépatites A et B)	
	Ag HBs (VHB) (Engerix®)		Infectiologie (vaccination contre l'hépatite B)	
	Ag HBs (VHB) (Hbvaxpro®)		Infectiologie (prévention des lésions génitales précancéreuses dues au papilloma virus)	Sanofi Pasteur
	Protéines L1 du <i>Papilloma virus</i> humain, sérotypes 6, 16, 11, 18 (Gardasil®)	Vaccin viral		

Tableau IV. Exemples de PtRIT produites dans *S.cerevisiae* et commercialisées en France.

Les principes actifs écrits en gris sont produits dans un système d'expression autre que celui traité ici. **B. pertussis** : *Bordetella pertussis* (agent de la coqueluche). (i) : inactivés. **Ag HBs du VHB** : antigène de surface du virus de l'hépatite B.

(Vidal [en ligne] ; Les Entreprises du Médicament, 2013, [en ligne])

2.4. Baculovirus en cellules d'insectes

2.4.1. Lignées utilisées

Les trois principales lignées cellulaires d'insectes utilisées sont les Sf9 et Sf21 (issues du papillon *Spodoptera frugiperda*) et la lignée Hi5 (issue du papillon *Trichoplusia ni*). Les cellules sont infectées par des baculovirus dans lesquels le transgène a été intégré. Ces virus sont naturellement pathogènes pour les insectes et les arthropodes mais pas pour les organismes vertébrés (Demain and Vaishnav, 2009; Dumas and Robert, 2009).

2.4.2. Avantages et inconvénients de ce système

La production de PtR dans des cellules ou des larves d'insectes est facilement industrialisable puisque la culture en suspension dans des bioréacteurs est possible (Demain and Vaishnav, 2009).

Avec ce système d'expression, non seulement il n'y a pas de limite de taille du transgène intégré mais en plus, plusieurs gènes peuvent être exprimés simultanément (Demain and Vaishnav, 2009). Le transgène intégré dans le génome viral étant sous la dépendance d'un promoteur fort (celui de la polyhédrine), son niveau d'expression est important. En effet, la quantité de PtR produite peut représenter 30% des protéines cellulaires totales et le rendement peut atteindre 11 g/L de culture (Demain and Vaishnav, 2009; Jayaraj and Smooker, 2009). Soit la PtR est sécrétée dans le milieu de culture et cela nécessite bien souvent de cloner une séquence signal d'insecte en 5' du transgène (Diaz Martinez V. et Martos M.C., 2011), soit elle y est relarguée après la lyse cellulaire liée à l'infection virale. Sa purification à partir du surnageant est par conséquent facile à effectuer. Cependant, si le recueil du surnageant intervient tard, la PtR peut subir l'action de protéases cellulaires aboutissant ainsi à la réduction du rendement (Dumas and Robert, 2009).

Par ailleurs, comparées aux bactéries ou aux levures, les cellules d'insectes sont capables d'opérer des modifications post-traductionnelles proches de celles effectuées par les cellules de mammifères (repliement, glycosylations, formation de ponts disulfures, phosphorylations, acylations). Néanmoins, il peut arriver que ces modifications soient imparfaites (mauvais repliement, hypo ou hyper-glycosylations...) (Demain and Vaishnav, 2009; Jayaraj and Smooker, 2009).

2.4.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système

Historiquement, ce système d'expression a été développé pour l'expression de l'interféron β humain en 1983. Depuis lors, plusieurs PtR antigéniques produites par ce système ont été testées en tant que vaccins contre de nombreux virus (virus de l'immunodéficience humaine, virus de l'hépatite C, virus respiratoire syncytial, entérovirus, virus de la dengue, rotavirus, etc.) sans jamais voir le jour en tant que médicament. Seuls le vaccin vétérinaire anti circovirus Ingelvac CircoFlex® (laboratoire Boehringer Ingelheim) et le vaccin humain anti papillomavirus Cervarix® (laboratoire GlaxoSmithKline) sont commercialisés en France (Jayaraj and Smooker, 2009 ; Vidal [en ligne] ; Les Entreprises du Médicament, 2013, [en ligne]).

2.5. Cellules de mammifères

2.5.1. Lignées utilisées

Plusieurs lignées cellulaires de mammifères sont habituellement utilisées pour la production de PtR complexes (anticorps monoclonaux, facteurs de la coagulation, etc) (Sodoyer, 2004). Parmi elles figurent des cellules de hamster (ovariennes : CHO, rénales : BHK), des cellules murines (myélomateuses : Sp2/0, plasmocytomateuses : NSO), des cellules humaines (embryonnaires rénales ou fibroblastiques : HEK ou MRC5, rétiniennes : PER.C6, cervicales : HeLa, lymphocytaires T : Jurkat), etc. (Demain and Vaishnav, 2009; Dumas and Robert, 2009; Wurm, 2004).

2.5.2. Avantages et inconvénients de ce système

Les cellules de mammifères sont très utiles pour la production de PtR de haut poids moléculaire et/ou nécessitant des modifications post-traductionnelles complexes (Demain and Vaishnav, 2009).

Ces cellules sont cultivées dans des milieux spécifiques enrichis en sérum de veau foetal (SVF) pour leur apporter des facteurs de croissance. Les PtR produites sont sécrétées dans le milieu, ce qui devrait faciliter leur purification. Cependant en pratique, il est parfois difficile de séparer la PtR des nombreuses Pt contenues dans le milieu enrichi en SVF (Palomares et al., 2004), ce qui peut expliquer des rendements de production modestes (3 à 5 g/l dans les CHO) (Demain and Vaishnav, 2009).

Par ailleurs, il est difficile d'industrialiser la culture de certaines de ces cellules car elles ne supportent pas bien les conditions en bioréacteurs (risque potentiel de déplétion en oxygène, d'accumulation de métabolites toxiques et donc d'apoptose et de diminution de la production de la PtR) (Palomares et al., 2004). Il faudrait adapter les chaînes de production, ce qui implique de gros investissements et des coûts importants, en plus de ceux des milieux spécifiques et du SVF (Dumas and Robert, 2009; Wurm, 2004).

Enfin, du fait de l'utilisation de SVF, le risque de contamination des préparations de PtR par des virus ou des prions n'est pas exclu (Demain and Vaishnav, 2009). C'est la raison pour laquelle, le SVF est de moins en moins utilisé et les milieux de plus en plus supplémentés en nutriments et facteurs de croissance purs (Wurm, 2004).

Les industriels ont apporté plusieurs solutions aux inconvénients de la production de PtR en cellules de mammifères (optimisation des milieux de culture, diminution des coûts et risques biologiques, etc.). Cela explique que ce système d'expression reste le plus utilisé actuellement ; en effet, la moitié des anticorps monoclonaux sont produits par des CHO (Dumas and Robert, 2009).

2.5.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système

L'utilisation des cellules de mammifères date des années 80 quand le besoin en protéines glycosylées (érythropoïétine : EPO, Tissue Plasminogène activator : tPA), s'est fait sentir. Depuis, elles restent les cellules de choix pour produire des anticorps monoclonaux ou d'autres PtR complexes. Dans les **tableaux V à VIII** figurent quelques PtRIT produites par différents types de cellules de mammifères et actuellement commercialisées en France.

Nature de la PtRIT	DCI Composition	Classe pharmacologique	Domaine thérapeutique d'utilisation (+ exemples d'indications)	Laboratoire exploitant
Anticorps monoclonal	Abciximab (Réopro®)	Agent anti-thrombotique (inhibition du récepteur de la GPIIb/IIIa plaquettaire)	Cardiologie/hémostasie (prévention des complications cardiaques ischémiques chez des patients subissant une angioplastie)	Lilly
	Canakinumab (Ilaris®)	Immunosuppresseur (inhibiteur de l'IL-1 β)	Rhumatologie (AJI, arthrite goutteuse)	Novartis
	Infliximab (Rémicade®)	Immunosuppresseur (inhibiteur du TNF α)	Rhumatologie (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante) Hépto-gastro-entérologie (maladie de Crohn, RCH) Dermatologie (psoriasis)	Merck
	Cétuximab (Erbix®)	Immuno-modulateur (inhibiteur de l'EGFR)	Oncologie (carcinome épidermoïde de la tête et du cou, CCR)	

Tableau V. Exemples de PtRIT produites dans des cellules murines et commercialisées en France.

GP : glycoprotéine. AJI : arthrite juvénile idiopathique. TNF- α : facteur de nécrose tumorale. RCH : rectocolite hémorragique. EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor (récepteur du facteur de croissance épidermique). CCR : cancer colorectal métastatique.

(Vidal [en ligne] et Rapport «Biomédicaments », Les Entreprises du Médicament, 2013, [en ligne])

Nature de la PtRIT	DCI Composition	Classe pharmacologique	Domaine thérapeutique d'utilisation (+ exemples d'indications)	Laboratoire exploitant
Vaccin recombinant	Virus grippal vivant atténué (Fluenz®)	Vaccin vivant atténué	Infectiologie (vaccination contre la grippe)	AstraZéneca
	Virus rabique inactivé (Vaccin Rabique Pasteur®)	Vaccin vivant inactivé	Infectiologie (vaccination contre la rage)	Sanofi Pasteur
	Virus inactivés (i) de la poliomyélite (Imovax Polio®)		Infectiologie (vaccination contre la poliomyélite)	
	Anatoxine diphtérique + Anatoxine tétanique + Antigènes de <i>B. pertussis</i> + Virus (i) de la poliomyélite + Polyoside de <i>H. influenzae b</i> + Ag HBs du virus de l'hépatite B (Infarix Hexa®)	Vaccins combinés viraux et bactériens	Infectiologie (vaccination contre diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche, l'hépatite B et les infections à <i>H. influenzae b</i>)	Glaxo SmithKline
	Rotavirus humain atténué (Rotarix®)	Vaccin vivant atténué	Infectiologie (vaccination contre les infections à Rotavirus)	

Tableau VI. Exemples de PtRIT produites dans des cellules simiennes et commercialisées en France.

Les principes actifs écrits en gris sont produits dans un système d'expression autre que celui traité ici.

(Vidal [en ligne] et Rapport «Biomédicaments », Les Entreprises du Médicament, 2013, [en ligne])

Nature de la PtRIT	DCI Composition	Classe pharmacologique	Domaine thérapeutique d'utilisation (+ exemples d'indications)	Laboratoire exploitant
Anticorps monoclonal	Dénosumab (Prolia®)	Inhibiteur de la résorption osseuse (inhibiteur de RANKL)	Oncologie (perte osseuse associée à un ttt hormono-ablatif chez les patients atteints d'un cancer de la prostate) Rhumatologie (ostéoporose post ménopausique)	Amgen
	Panitumumab (Vectibix®)	Immuno-modulateur (inhibiteur de l'EGFR)	Oncologie (cancer colorectal métastatique)	
	Rituximab (Mabthéra®)	Immuno-modulateur (inhibiteur du CD20)	Onco-hématologie (LNH, LLC) Rhumatologie (PR)	Roche
	Bévacizumab (Avastin®)	Immuno-modulateur (inhibiteur du VEGF)	Oncologie (cancer colorectal métastatique, cancer du sein, cancer bronchique, cancer du rein, cancer de l'ovaire)	
	Trastuzumab (Herceptin®)	Immuno-modulateur (inhibiteur de HER 2)	Oncologie (cancer du sein, cancer gastrique)	
	Tocilizumab (Roactemra®)	Immunosuppresseur (inhibiteur des l'IL-6R)	Rhumatologie (PAR, AJI)	
Cytokine ou facteur de croissance	Interféron β 1a (Rebif®)	Immunostimulant (interféron)	Neurologie (Sclérose en plaque)	Merck
	Darbépoéline α (Aranesp®)	Stimulant de l'hématopoïèse (analogue de l'EPO)	Néphrologie et onco-hématologie (anémie du patient IRC ou sous chimiothérapie cytotoxique)	Amgen
	Méthoxy-PEG-Epoéline β (Mircera®)	Stimulant de l'hématopoïèse (analogue de l'EPO)	Néphrologie (anémie du patient IRC)	Roche
	Dibotermine α (Inductos®)	Stimulant de l'ostéogenèse (analogue de BMP2)	Rhumatologie/traumatologie (induction osseuse en chirurgie)	Medtronic Biopharma
	Eptotermine α (Osigraft®)	Stimulant de l'ostéogenèse (analogue de BMP7)		Howmedica international
Facteur de la coagulation	Octocog α (Advate® ; Kogénate®)	Facteur de la coagulation (facteur VIII)	Hémostase (hémorragies du patient HA)	Baxter SAS ; Bayer
	Nonacog α (Bénéfix®)	Facteur de la coagulation (facteur IX)	Hémostase (hémorragies du patient HB)	Pfizer
Enzyme	Dornase α (Pulmozyme®)	Mucolytique (désoxyribonucléase)	Pneumologie (encombrement bronchique du patient mucoviscidique)	Roche
Hormone	Choriogonadotropine (Ovitrelle®)	Hormone sexuelle et modulateur de la fonction génitale	Gynécologie - procréation (anovulation - oligovulation)	Merck
	Follitropine + Lutropine (Pergoveris®)		Gynécologie (déficit sévère en LH et FSH)	
Vaccin	Ag HBs (Génhévac®)	Vaccins contre les hépatites	Infectiologie (vaccination contre l'hépatite B)	Sanofi Pasteur
Divers	Abatacept (Orencia®)	Immunosuppresseur (PtTF analogue du CTLA-4)	Rhumatologie (PAR, AJI)	Bristol Myers Squibb
	Etanercept (Enbrel®)	Immunosuppresseur (PtTF analogue du sTNFR)	Rhumatologie (PAR, AJI, SpA) Dermatologie (psoriasis)	Pfizer

Tableau VII. Exemples de PtRIT produites dans des cellules de hamster et commercialisées en France.

Les principes actifs écrits en gris sont produits dans un système d'expression autre que celui traité ici. **RANKL** : *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand* (ligand du récepteur RANK), situé à la surface des ostéoclastes, cellules impliquées dans la résorption osseuse. **EGFR / HER2** : *Epidermal Growth Factor Receptor / Human Epidermal growth factor Receptor* (récepteurs du facteur de croissance épidermique). **CD20** : glycoprotéine transmembranaire des lymphocytes B. **LNH** : lymphome non hodgkinien. **LLC** : leucémie lymphoïde chronique. **PAR** : polyarthrite rhumatoïde. **VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor* (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), impliqué dans l'angiogenèse et de la néo-vascularisation pendant les processus tumoraux. **IL-6R** : récepteur de l'interleukine 6. **EPO** : érythropoïétine. **AJI** : arthrite juvénile idiopathique. **IRC** : insuffisant rénal chronique. **BMP2/7** : facteurs de croissance impliqués dans l'ostéogenèse. **HA/HB** : hémophilie A/B. **Ag HBs** : antigène de surface du virus de l'hépatite B. **PtTF** : protéine thérapeutique de fusion. **CTLA-4** : *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4* (protéine transmembranaire associée aux lymphocytes T et qui régule leur activation). **sTNFR** : *soluble Tumor Necrosis Factor Receptor* (récepteur soluble du facteur de nécrose tumorale). **SpA** : spondylarthrite ankylosante.

(Vidal [en ligne] et Rapport «Biomédicaments », Les Entreprises du Médicament, 2013, [en ligne])

Nature de la PtRIT	DCI Composition	Classe pharmacologique	Domaine thérapeutique d'utilisation (+ exemples d'indications)	Laboratoire exploitant
Vaccin recombinant	Virus de la rougeole + Virus des oreillons + Virus de la rubéole (Priorix®)	Vaccin vivant atténué	Infectiologie (vaccination contre la rougeole, les oreillons et la rubéole)	GlaxoSmithKline
	Virus de la varicelle (Varilrix®)		Infectiologie (vaccination contre la varicelle)	
	VHA inactivé (Havrix®)	Vaccins contre les hépatites	Infectiologie (vaccination contre l'hépatite A)	
	VHA inactivé + Ag HBs (HBV) (Twinrix®)		Infectiologie (vaccination contre les hépatites A et B)	
	VHA inactivé + polyside de Salmonella typhi (Tyavax®)	Vaccins combinés viraux et bactériens	Infectiologie (vaccination contre l'hépatite A et la fièvre typhoïde)	Sanofi Pasteur

Tableau VIII. Exemples de PtRIT produites dans des cellules humaines et commercialisées en France.

Les principes actifs écrits en gris sont produits dans un système d'expression autre que celui traité ici. **VHA** : virus de l'hépatite A ; **Ag HBs du VHB** : antigène de surface du virus de l'hépatite B.

(Vidal [en ligne] et Rapport «Biomédicaments », Les Entreprises du Médicament, 2013, [en ligne])

2.6. Animaux transgéniques

2.6.1. Espèces animales utilisées

La plupart des animaux transgéniques utilisés pour produire des PtR sont des mammifères : de la souris à la vache, en passant par le lapin, la brebis, la chèvre ou encore le cochon. Des animaux non mammifères sont aussi utilisés, notamment des espèces aviaires pour une production de PtR dans le blanc d'œuf (Demain and Vaishnav, 2009; Dumas and Robert, 2009).

Il existe différentes techniques de transgénèse applicables (Houdebine, 2009) :

- microinjection de gène dans un des pronoyaux des embryons (**figure 11**)
- transfert de noyaux contenant l'ADN dans des ovocytes énucléés (**figure 12**)
- infection par des vecteurs lentiviraux
- fécondation des spermatozoïdes préalablement incubés avec l'ADN à transférer
- formation de chimères à l'aide de cellules souches embryonnaires portant le transgène

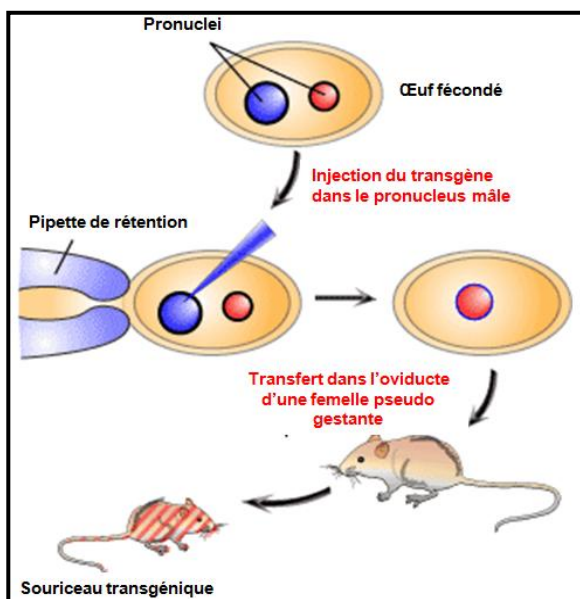


Figure 11. Transgénèse par micro-injection.

(Rinderknecht F-A et Zufelt M, [en ligne])

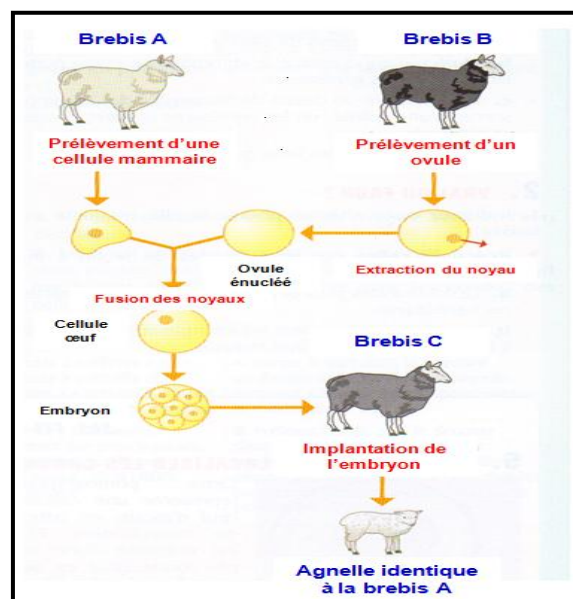


Figure 12. Clonage par transfert de noyaux.

(Pirre F, 2012, [en ligne])

2.6.2. Avantages et inconvénients de ce système

Les animaux transgéniques offrent la possibilité d'effectuer des glycosylations très complexes et d'obtenir des PtR actives directement dans les liquides biologiques (lait, salive, sang, plasma séminal, sueur, urine, etc.). Cette sécrétion facilite le recueil des PtR mais il peut être difficile de les séparer des protéines animales endogènes et donc de standardiser le protocole de purification (Houdebine, 2009; Philippe et al., 2009).

Le choix de l'espèce doit prendre en compte plusieurs paramètres dont la durée des cycles reproductifs de l'animal. Plus celui-ci est grand, plus la durée de son cycle reproductif est incompatible avec le développement pharmaceutique. Ainsi, si la vache apparaît comme l'animal le plus intéressant en termes de volumes laitiers (8000 L/an) et de maîtrise des technologies de fractionnement du lait, ses durées de maturation sexuelle puis de gestation sont peu compatibles avec le cycle de développement d'un médicament. En effet, il faut au minimum 36 mois pour obtenir les premiers laits à partir d'une vache transgénique, contre à peine à 12 mois pour une lapine transgénique. Ce dernier modèle, élevé avec un statut sanitaire contrôlé est capable de produire 8 à 15 litres de lait par an et se révèle donc intéressant pour la production de petites quantités de PtR (jusqu'à 10 kg), ce qui permettrait d'alimenter les marchés de niche. Le modèle de chèvre transgénique quant à lui, semble présenter le meilleur rapport entre la durée de gestation (5 mois), les volumes de lait produits (1000 L/an) et le degré de mécanisation des technologies d'élevage et de traite (Demain and Vaishnav, 2009; Dumas and Robert, 2009; Houdebine, 2009).

Les quantités de PtR retrouvées dans le lait des mammifères transgéniques utilisés sont de l'ordre de quelques centaines de milligrammes à quelques grammes par litre de lait. Ceci place d'emblée le coût brut de production des protéines dans le lait à un niveau 5 à 100 fois plus faible que celui actuellement en vigueur pour les cellules CHO (Houdebine, 2009). Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la génération d'animaux transgéniques soulève des problèmes éthiques, représente un coût important et nécessite un personnel hautement qualifié ainsi que des conditions d'hébergement spécifiques. De plus, pendant les temps de gestation et jusqu'à l'obtention de niveaux de production corrects dans le lait, les animaux transgéniques sont maintenus en vie sans pouvoir en tirer un quelconque bénéfice (Diaz Martinez V. and Martos M.C., 2011).

2.6.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système

La production de PtRIT dans le lait de mammifères transgéniques est le procédé le plus avancé. En témoignent les nombreuses protéines humaines, commercialisées ou non, purifiées à partir de lait de différentes espèces (Demain and Vaishnav, 2009; Dumas and Robert, 2009; Houdebine, 2009) :

- souris : tissue plasminogen activator (tPA)
- lapine : facteur VIIa (Ripoll, 2011, brevet EP2271206 A1)
- chèvre : tPA, antithrombine III (Atryn® : non commercialisée en France mais ayant une AMM européenne), anticorps anti-CD20
- brebis : α 1-antitrypsine, facteur IX de la coagulation
- truie : protéine C
- vache : lactoferrine

2.7. Plantes transgéniques

2.7.1. Espèces utilisées

Parmi les espèces végétales habituellement utilisées pour la transgénèse figurent le tabac, la luzerne, le colza, le maïs, le riz et la pomme de terre. Deux procédés de transgénèse sont applicables pour les végétaux : le transfert direct du transgène par la technique de la biolistique ou alors l'infection spécifique par des virus contenant le transgène (Demain and Vaishnav, 2009). Les PtR produites sont généralement stockées dans les feuilles, les fleurs, les graines ou encore les racines (Dumas and Robert, 2009).

Récemment, la société Plant Advanced Technologies basée à Vandoeuvre-lès-Nancy a mis au point un procédé de production de PtR par des plantes carnivores : le « PAT Vendredi® » (Biteau, 2008, brevet WO/2008/040599). La preuve de concept, d'abord élaborée sur une espèce du genre *Drosera* (**figure 13, A**), a été transférée à une espèce du genre *Népenthes*, plus volumineuse (**figure 13, B**) dans un souci d'industrialisation. Les protéines sont recueillies dans les sécrétions digestives des pièges de la plante carnivore ; elles sont fonctionnelles en dépit de l'existence d'enzymes digestives. Selon les inventeurs de ce procédé, « cette avancée scientifique [...] permet d'envisager de produire de manière totalement nouvelle des protéines à très haute valeur pour la cosmétique, le diagnostic ou la thérapeutique » (Plant Advanced Technologies, [en ligne]).

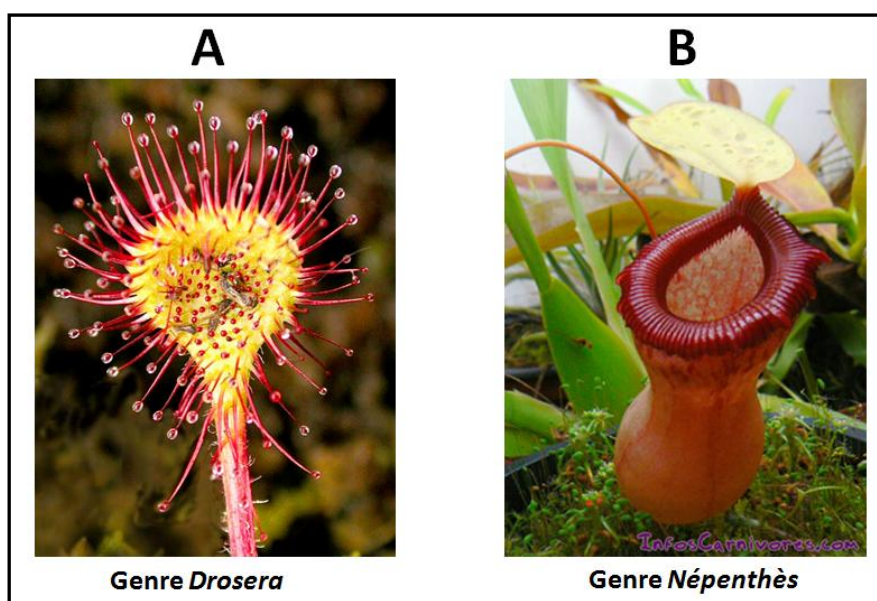


Figure 13. Spécimens de plantes carnivores utilisables pour produire des PtR.

La société Plant Advanced Technologies a utilisé des espèces du genre *Drosera* pour mettre au point le procédé de production de PtR, et des espèces du genre *Népenthes*, plus volumineuses, pour la production industrielle de ces protéines.

(*Forum pour les plantes carnivores [en ligne]* et *Site d'information sur les plantes carnivores [en ligne]*)

2.7.2. Avantages et inconvénients de ce système

Comparées aux animaux et aux cellules animales en culture, les plantes transgéniques permettent une production de PtR à grande échelle simple, rapide, peu chère et sûre du point de vue des risques biologiques. En effet, la culture des plantes ne nécessite que de l'eau, des minéraux et de la lumière. De plus, une éventuelle contamination de la PtR par des pathogènes végétaux n'aura aucune incidence sur l'être humain. En revanche, une contamination de la PtR par des pesticides ou des herbicides n'est pas à exclure (Demain and Vaishnav, 2009).

Les plantes transgéniques sont capables de synthétiser des protéines complexes comme des anticorps fonctionnels (Diaz Martinez V. and Martos M.C., 2011) et d'opérer des glycosylations proches de celles des mammifères. Toutefois, ces glycosylations peuvent être incomplètes ou imparfaites notamment avec l'ajout de résidus xylose, fortement immunogènes pour l'être humain (Demain and Vaishnav, 2009; Dumas and Robert, 2009).

La purification de la PtR produite peut s'avérer difficile car elle nécessite impérativement l'élimination des polyphénols et des substances pro-inflammatoires ou immunogènes pour l'Homme (Dumas and Robert, 2009; Houdebine, 2009).

L'utilisation de plantes transgéniques soulève également des problèmes éthiques et environnementaux comme l'éventuelle dissémination des transgènes par les pollens. Plusieurs pistes sont étudiées pour y remédier : l'utilisation de plantes stériles, la culture en serre, l'expression transitoire des transgènes dans des plantes non génétiquement modifiées, etc. (Dumas and Robert, 2009).

2.7.3. Exemples de protéines recombinantes produites par ce système

Du fait des problématiques éthiques et environnementales soulevées par les plantes transgéniques, leur utilisation pour la production de PtRIT reste marginale. Des études cliniques ont été menées par la société française Meristem® Therapeutics sur la lipase gastrique recombinante produite dans les grains de maïs transgénique. Cette enzyme a été administrée par voie orale à des enfants souffrant d'un syndrome de malabsorption lié à la pancréatite chronique associée à la mucoviscidose. L'utilisation de plantes alimentaires transgéniques est également envisagée pour le développement de vaccins oraux administrés directement sous forme d'aliments. Des premiers essais allant dans ce sens ont été effectués : production de pomme de terre exprimant un antigène de surface du virus de l'hépatite B (immunogénécité vérifiée chez la souris) ou une sous-unité de la toxine du choléra, production d'une tomate transgénique exprimant une glycoprotéine du virus de la rage, etc. (Dumas and Robert, 2009).

2.8. Récapitulatif des systèmes d'expression de protéines recombinantes

Le **tableau IX** récapitule les principaux avantages et inconvénients des systèmes d'expression de PtRIT habituellement utilisés. Comme précédemment évoqué, le système d'expression est choisi en tenant compte de la nature et de l'utilisation finale de la protéine. Généralement des protéines de plus de 100 kDa sont produites dans des systèmes eucaryotes et celles de moins de 30 kDa, dans des systèmes procaryotes (Demain and Vaishnav, 2009).

Si la PtR exprimée nécessite toute forme de modifications post-traductionnelles, le choix d'un système bactérien ne sera pas optimal. Un système eucaryote sera plus adapté : levure, cellules d'insectes ou de mammifères en fonction du degré de complexité des modifications requises. Par exemple, pour la sécrétion efficace de protéines comportant des ponts disulfures, la levure est suffisante, tandis que pour exprimer des protéines glycosylées, les cellules d'insectes sont plus adaptées que la levure (Jayaraj et Smooker, 2009). Les cellules de mammifères ou les animaux transgéniques, bien que coûteux, demeurent très étudiés. De gros efforts sont portés à l'amélioration de leur productivité car ils permettent de produire des molécules thérapeutiques complexes (Dumas and Robert, 2009).

Hôtes	Avantages	Inconvénients
Bactéries (<i>E. coli</i>)	- Bonne documentation sur le génome - Culture facile, peu chère - Expression rapide du gène d'intérêt - Rendements importants	- Pas de modifications post-traductionnelles - Faible potentiel de sécrétion - Formation de corps d'inclusions (agrégats de protéines) - Présence de protéases et d'endotoxines
Levures (<i>S. cerevisiae</i>)	- Culture facile, peu chère - Potentiel de sécrétion - Rendements importants - Modifications post-traductionnelles élaborées (repliement, glycosylation, ponts disulfure)	- Difficulté à sécréter des grosses molécules - Parfois problème d'isolement de la PtR - Glycosylation simple - Glycosylation immunogène (hypermannosylation) - Utilisation de méthanol dans la culture (<i>P. pastoris</i>)
Cellules d'insectes	- Potentiel de sécrétion, rendements importants - Modifications post-traductionnelles élaborées (repliement, glycosylation, ponts disulfure, acylations, phosphorylations, etc.) - Flexibilité de la taille de la PtR à produire - Expression simultanée de plusieurs gènes - Pas de risque biologique	- Parfois problème d'isolement de la PtR - Parfois production de PtR mal repliées - Glycosylation parfois incorrecte (hypo ou hyper) - Présence de protéases
Cellules de mammifères	- Glycosylation + modifications complexes - Potentiel de sécrétion	- Culture spécifique, chère, difficile à grande échelle - Parfois problème d'isolement de la PtR - Risque biologique, immunogénécité
Animaux transgéniques	- Glycosylation + modifications complexes - Sécrétion dans liquides biologiques, rendements importants	- Coût élevé, problème éthique + gestion des troupeaux - Parfois problème d'isolement de la PtR
Plantes transgéniques	- Culture à grande échelle, simple et peu chère - Glycosylation complexe - Pas de risque biologique	- Difficulté d'extraction et de purification - Glycosylation parfois immunogène (xylose) - Problème éthique et environnemental

Tableau IX. Principaux avantages et inconvénients des systèmes d'expression de PtRIT.

(Demain and Vaishnav, 2009; Philippe et al., 2009)

La **figure 14** illustre une proposition de classement de ces systèmes d'expression en fonction des certains de leurs avantages et inconvénients. Il apparait clairement que pour la production de petites PtR ne requérant aucune modification post-traductionnelle, les bactéries constituent le système idéal : le procédé est rapide, le coût total de la production est peu élevé, la production est facilement industrialisable et les contraintes réglementaires ne sont pas drastiques. Pour ces raisons, dans la suite de ce mémoire, le propos sera accentué sur les PtR produites par *E. coli* (section 2) et en particulier sur une forme tronquée de la galectine 3 (partie expérimentale).

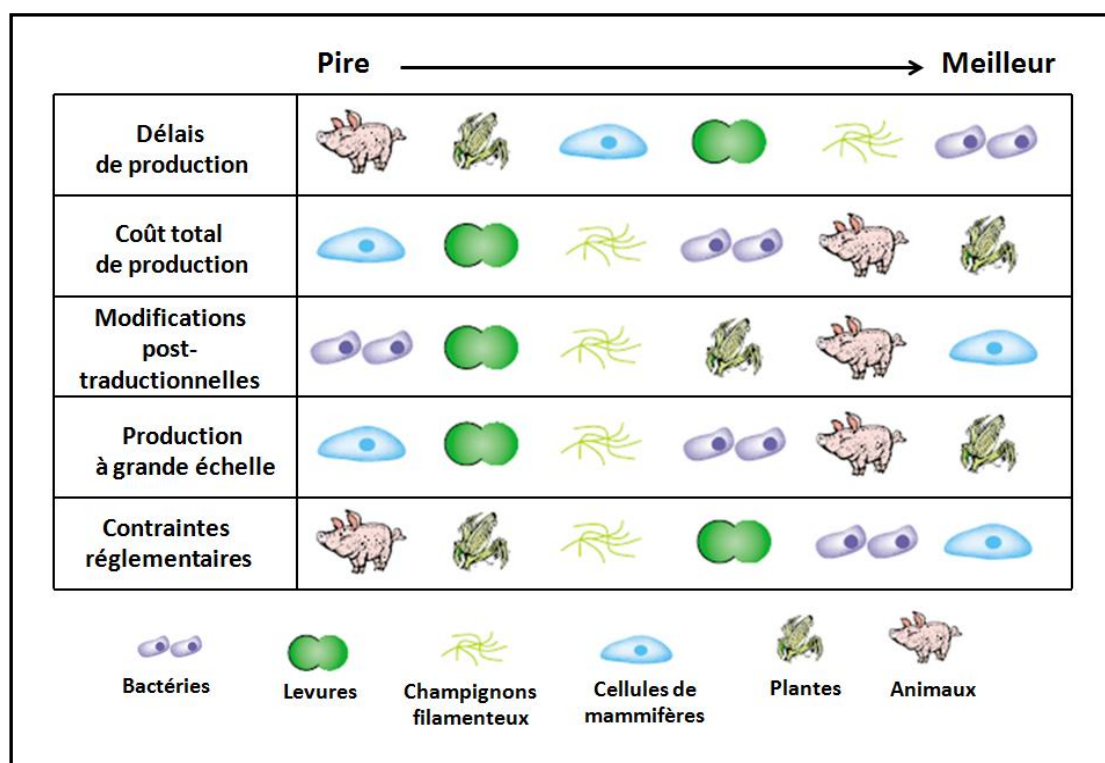


Figure 14. Classement des systèmes d'expression de PtRIT en fonction de certains critères.

Pour chaque critère, la mention « pire » désigne la pire des situations (long délai de production, coût de production élevé, incapacité à réaliser des modifications post-traductionnelles, industrialisation difficile, contraintes réglementaires drastiques). De la même façon, la mention « meilleur » désigne la meilleure situation relative à chaque critère.

(Adapté de Dyck et al., 2003)

Section 2 - Expression des protéines recombinantes dans *Escherichia coli* : défis et solutions

Plusieurs éléments doivent être pris en compte afin de garantir un bon niveau d'expression, une bonne solubilité et une bonne stabilité de la PtR à produire. Parmi ces éléments figurent le choix du plasmide, de la souche bactérienne et des conditions de culture, tous conditionnés par les propriétés de la PtR à exprimer (structure, taille, propriétés physico-chimiques, présence d'acides aminés codés par des codons rarement utilisés par l'hôte, présence de ponts disulfures, toxicité pour l'hôte, etc).

1. Garantir un bon niveau d'expression des protéines recombinantes

1.1. Choix du plasmide d'expression

Un plasmide d'expression doit obligatoirement comporter les éléments suivants (**figure 15**) : une origine de réplication, des marqueurs de sélection par antibiotique ainsi que des éléments d'initiation et d'arrêt de la transcription et de la traduction (Sørensen and Mortensen, 2005a). Il peut aussi contenir une ou plusieurs séquences codant des partenaires de fusion, éléments facilitant l'expression, la solubilité et la purification de la PtR (Gräslund et al., 2008; Sørensen and Mortensen, 2005a; Young et al., 2012).

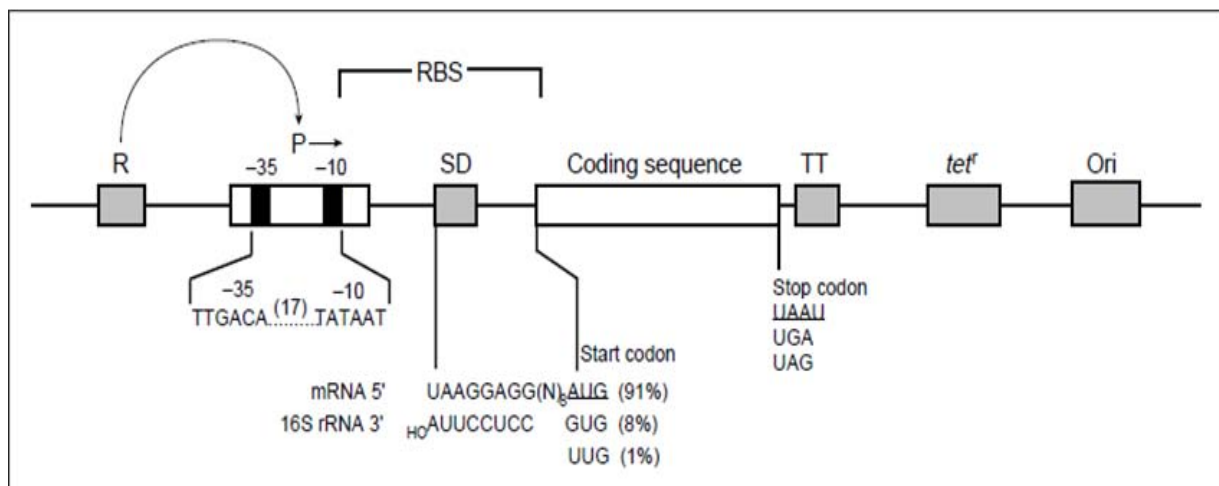


Figure 15. Éléments plasmidiques essentiels à l'expression d'une PtR dans *E. coli*.

R : répresseur du promoteur. **P** : promoteur (séquence -35 à -10 par rapport au codon d'initiation). **RBS** : site de fixation du ribosome lors de l'initiation de la traduction (la sous-unité 16S du ribosome fixe la séquence de Shine Delgarno (**SD**)). **Start / Stop codon** : codon d'initiation/de terminaison de la traduction, respectivement. **TT** : élément de terminaison de la transcription et de stabilisation des ARNm. **TET** : gène de résistance à un antibiotique (ici, la tétracycline). **Ori** : origine de réplication.

(Hannig and Makrides, 1998; Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996)

1.1.1. Origine de réplication

L'origine de réplication contrôle le nombre de copies plasmidiques dans la cellule hôte et donc le niveau d'expression du transgène (Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996; Sørensen and Mortensen, 2005a). La plupart des plasmides actuellement utilisés possèdent une origine de réplication dérivant de celle des plasmides pBR322 (15 à 20 copies/cellule) ou pUC (500 à 700 copies/cellule) (Sørensen and Mortensen, 2005a).

Le nombre de copies de cellules-filles résulte de la distribution aléatoire des copies présentes dans la cellule-mère au moment de la division cellulaire. Plus ce nombre est élevé au départ (>10), plus la probabilité d'avoir des cellules-filles sans plasmide est faible (Baneyx, 1999; Palomares et al., 2004) et meilleure sera l'expression du transgène. Néanmoins, dans certains cas (recombinaison de plasmides résultant d'un nombre trop élevé de copies, toxicité des gènes plasmidiques pour l'hôte, culture de l'hôte en fermenteur, absence de pression de sélection, etc.), il peut se produire une « perte plasmidique » responsable d'une diminution de l'expression du transgène (Baneyx, 1999 ; Makrides, 1996 ; Palomares et al., 2004). Il existe des solutions pour contrecarrer ce phénomène : choix d'un hôte et d'un plasmide compatibles, optimisation des conditions de culture (température, durée, milieux sélectifs...), etc.

1.1.2. Marqueurs de sélection

Les marqueurs de sélection présents dans les plasmides les plus couramment utilisés confèrent aux bactéries recombinantes une résistance à l'ampicilline, la kanamycine, le chloramphénicol ou la tétracycline (Sørensen and Mortensen, 2005a). Pour des protéines d'intérêt thérapeutique, il est conseillé d'éviter l'usage de l'ampicilline étant donné son potentiel allergisant (Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996).

1.1.3. Acteurs et étapes de la transcription

Promoteur

Le promoteur est une séquence de six nucléotides située à environ 35 paires de base en 5' du triplet d'initiation de la transcription (Jana and Deb, 2005). Pour être efficace, il doit être fort, régulé et inductible. En effet, il doit permettre un haut niveau d'expression protéique (10 à 30% des Pt cellulaires totales), sa régulation fine par un répresseur doit garantir un niveau d'expression basal minimal (surtout si la PtR est toxique) et enfin, il doit être inductible par un moyen simple (Hannig and Makrides, 1998 ; Jana and Deb, 2005 ; Makrides, 1996).

Les promoteurs font partie d'un système global de régulation de la transcription : l'opéron, dont le plus connu chez *E. coli* est l'opéron lactose (inductible par des analogues du lactose comme l'isopropyl- β -D-thiogalactoside : IPTG). Il n'est donc pas étonnant que la structure de la plupart des promoteurs commercialisés soit basée sur celle de cet opéron. Cependant, seul, le promoteur contenu dans l'opéron lactose ne garantit pas un haut niveau d'expression des protéines hétérologues par *E. coli*. Il a par conséquent été modifié pour engendrer d'autres promoteurs, dont le *tac*, et le *trc*. (Baneyx, 1999). Il existe de nombreux autres promoteurs (**tableau X**), induits soit par l'acide indole acrylique ou la déplétion du milieu en tryptophane (*trp*), soit par l'acide nalidixique (*recA*), le L-arabinose (*araBAD*), la tétracycline (*tetA*), la déplétion du milieu en phosphate (*phoA*), l'anaérobiose (*nar*), la variation du pH (*cadA*), l'osmolarité (*proU*), ou encore, l'élévation brusque de la température, de 30°C à 42°C (λ pL, *T7*), etc. (Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996).

Promoteur	Répresseur	Méthode d'induction
lac	LacI	IPTG, température
trp	-	Acide indole acrylique, déplétion en tryptophane
tac	LacI	IPTG
λ pL	λ cIts	Température (<i>shift</i> de 30°C à 42°C)
T7		
T7/lac	LacI	IPTG, température
phoA	phoB, phoR	Déplétion en phosphate
araBAD	araC	L-arabinose
cadA	cadR	pH
recA	lexA	Acide nalidixique
nar	fnr	Anaérobiose
proU	-	Osmolarité
tetA	-	Tétracycline

Tableau X. Exemples de promoteurs utilisés pour l'expression de PtR dans *E. coli*.

(Hannig and Makrides, 1998; Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996)

Le promoteur *T7* présente l'inconvénient d'être peu régulé et d'être puissamment activé par la T7 RNA polymérase, une enzyme codée par le chromosome bactérien. Ainsi, même sans élévation brusque de la température, la transcription des gènes contrôlés par le *T7* est possible. Si ces derniers codent des protéines toxiques, ce phénomène aboutit à l'accumulation de mutations ou à l'instabilité de la souche bactérienne. L'un des moyens de réduire ce niveau d'expression basal est de créer un promoteur hybride *T7/lac* par exemple, en clonant une partie du promoteur *lac* juste en aval du *T7*, de sorte que la régulation du premier (par le répresseur LacI) soit effective pour les deux.

Comme illustré par la **figure 16**, la liaison de LacI au promoteur *lac* empêche la liaison de la T7 RNA polymérase au promoteur T7, ce qui bloque la transcription des gènes en aval. Lors de l'ajout d'un inducteur du promoteur *lac* (IPTG), celui-ci interagit avec le LacI, ce qui libère le site de liaison de la T7 RNA polymérase au promoteur T7, permettant ainsi la transcription des gènes contrôlés (Gräslund et al., 2008; Sørensen and Mortensen, 2005a; Studier, 2005). Ce système, présent dans les plasmides pET, permet un niveau d'expression encore plus intéressant qu'avec le promoteur *lac* seul (40-50 % des protéines cellulaires) (Baneyx, 1999). Il est généralement plus utilisé que les systèmes *trc* (plasmides pTrc), *tac*, (plasmides pGEX) ou encore *araBAD* (plasmides pBAD) (Sørensen and Mortensen, 2005a).

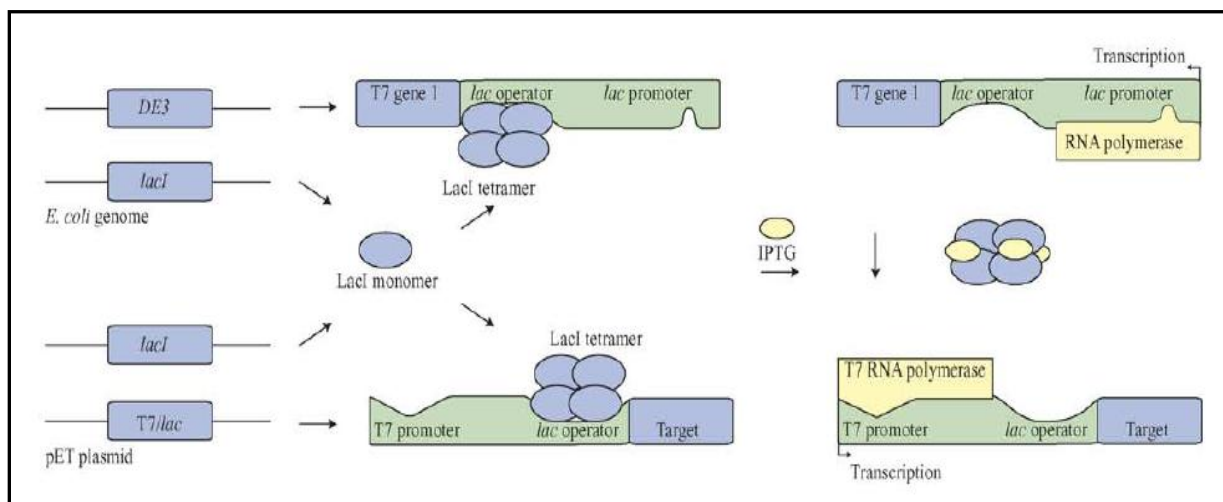


Figure 16. Fonctionnement du promoteur hybride T7/lac.

DE3 : gène bactérien codant la T7 RNA polymérase (T7 RNA pol). **lacI** : gène bactérien / plasmidique codant LacI le répresseur du promoteur lac. **T7/lac** : promoteur hybride, situé dans le plasmide. **Lac operator** : site de fixation du LacI sur le promoteur *lac*. **IPTG** : l'isopropyl-β-D-thiogalactoside. **Target** : gène d'intérêt (codant la protéine recombinante). Sans inducteur, les promoteurs lac (chromosome bactérien) et T7/lac (plasmide) sont régulés par LacI : aucun gène n'est transcrit. Lors de l'induction, l'IPTG séquestre LacI, ce qui libère les promoteurs : au niveau du chromosomique, le gène de la T7 RNA pol est transcrit. L'enzyme initie ensuite la transcription du gène d'intérêt en se fixant au T7/lac désormais accessible.

(Sørensen and Mortensen, 2005a)

Initiation de la transcription

La transcription (**figure 17**) de l'ADNc en ARNm par l'ARN polymérase commence à partir d'un triplet de nucléotides, situé à 35 pb en 3' du promoteur (Jana and Deb, 2005). Chez les procaryotes, ce triplet est généralement un ATG (91%) mais peut parfois être un GTG (8%) et plus rarement un TTG (1%) (Makrides, 1996). Les nucléotides qui l'entourent sont bien conservés et constituent la séquence Shine-Dalgarno (5'- AGGAGG -3'), interagissant avec le ribosome lors de la traduction. Afin de garantir la transcription en un ARNm fonctionnel puis la traduction en une protéine fonctionnelle, il est indispensable que le transgène ait été cloné dans le cadre de lecture du ribosome.

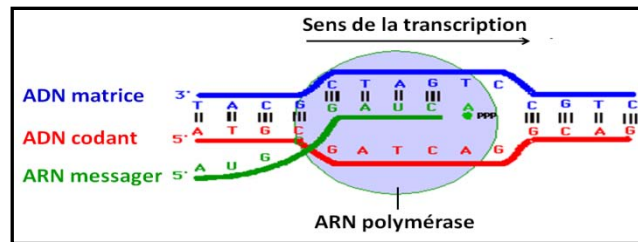


Figure 17. Transcription de l'ADN en ARNm.

(University of Arizona [en ligne])

Arrêt de la transcription

Cette étape survient quand l'ARN polymérase rencontre le triplet TAA, TAG ou TGA situé directement en 3' du transgène. Chez les procaryotes, la fin de la transcription est régie soit par les structures secondaires « épingle à cheveux » ou « tige-boucle » de l'ARNm néo-synthétisé (**figure 18**), soit par son interaction avec la protéine rho. Ces signaux d'arrêt de la transcription augmentent la stabilité de l'ARNm, permettant ainsi le début de la traduction (Hannig and Makrides, 1998; Makrides, 1996).

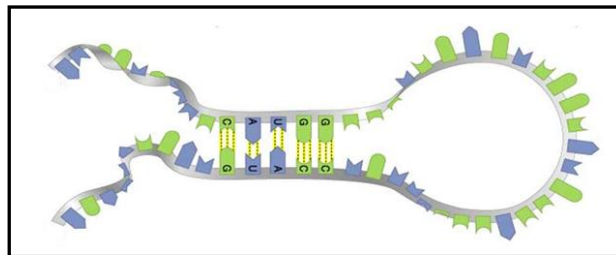


Figure 18. Structure en tige boucle de l'ARNm.

(Futura sciences, [en ligne])

1.1.4. Acteurs et étapes de la traduction

Stabilité de l'ARNm

La demi-vie des ARNm dans *E. coli* à 37°C s'étend de quelques secondes à vingt minutes au maximum (Baneyx, 1999; Sørensen and Mortensen, 2005a). Au-delà, ils sont dégradés par des RNases (RNase II, PNPase, RNase E). Il est donc nécessaire de les stabiliser afin d'augmenter le niveau d'expression protéique. Cette stabilisation est assurée par la formation de structures secondaires riches en uridines (UTR, en 5' ou en 3') ou en adénines (queue poly-A, en 3') (Baneyx, 1999; Hannig and Makrides, 1998; Makrides, 1996; Sørensen and Mortensen, 2005a; Swartz, 2001). Elle peut aussi être favorisée par l'usage de souches mutées pour les RNases, donc incapables de dégrader l'ARNm.

Initiation de la traduction

La traduction (**figure 19**) de l'ARNm en protéine débute au niveau d'un codon particulier : le codon d'initiation ou codon « start ». Chez les procaryotes, c'est généralement un AUG (91%) mais peut parfois être un GUG (8%) et plus rarement un UUG (1%) (Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996), correspondant respectivement aux triplets ATG, GTG et TTG évoqués dans le paragraphe 1.1.3. Le codon « start » est situé en 3' de la séquence Shine-Dalgarno (5'-AGGAGG-3') et la distance qui les sépare (5-13 nucléotides) peut influencer l'efficacité de la traduction (Baneyx, 1999; Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996; Sørensen and Mortensen, 2005a; Swartz, 2001). Quel que soit le codon d'initiation utilisé (AUG, GUG ou UUG), le premier acide aminé incorporé est toujours une *N*-formyl-méthionine (fMét) chez les procaryotes. Il est différent du codon correspondant à une méthionine interne à la séquence protéique.

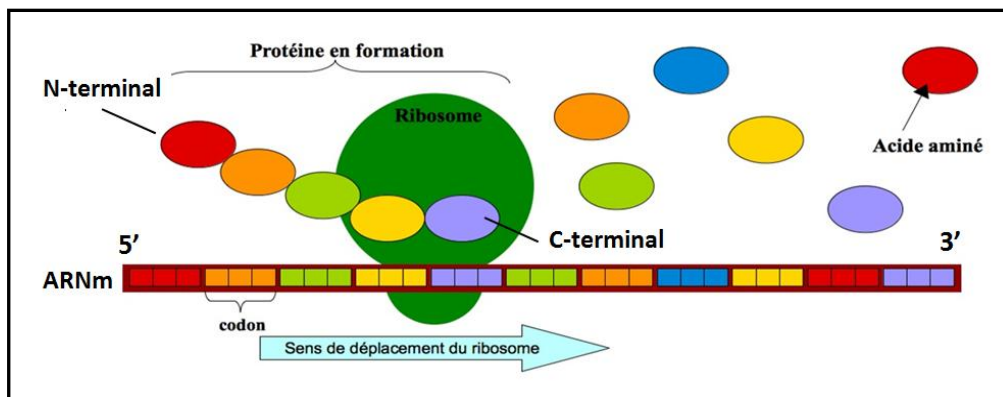


Figure 19. Traduction de l'ARNm en protéine.

(Adapté de Créa'rt, 2014, [en ligne])

Le problème du biais d'usage de codon lors de la synthèse protéique

Toute cellule utilise un panel de 64 de codons pour l'expression des gènes : 61 pour coder les 20 acides aminés, et 3 pour signaler la fin de la traduction (codon stop). Chaque acide aminé est codé par un (Mét, Trp) à six (Arg, Leu, Sér) codons synonymes. La fréquence d'usage des différents codons varie d'une espèce à l'autre et au sein de la même espèce en fonction du niveau d'expression de la protéine (Gustafsson et al., 2004). Les codons rares chez *E. coli* (**tableau XI**) sont utilisés par la bactérie pour les gènes faiblement exprimés (Sodoyer, 2004). Ainsi, la surexpression de protéines hétérologues comportant des codons rares pour *E. coli*, est une source potentielle d'anomalies : substitutions d'acides aminés, décalage du cadre de lecture, arrêt prématuré de la traduction... Fatalement, cela conduirait à une réduction de la quantité et/ou de la qualité de la protéine produite (Gustafsson et al., 2004; Jana and Deb, 2005; Sørensen and Mortensen, 2005a).

Codons	Acide aminé correspondant
AGA, AGG, CGA, CGG	Arg
UGU, UGC	Cys
GGA, GGG	Gly
AUA	Ile
CUA, CUC	Leu
CCC, CCU, CCA	Pro
UCA, AGU, UCG, UCC	Sér
ACA	Thr

Tableau XI. Codons rares pour *E. coli*.

(Makrides, 1996)

La corrélation observée entre le biais d'usage des codons d'un gène et son niveau d'expression a été utilisée pour définir l'indice d'adaptation des codons (IAC). Grâce à cet indice, plusieurs programmes informatiques permettent de prédire s'il est possible et judicieux de surexprimer une protéine donnée dans un hôte donné.

Plusieurs solutions permettent de surmonter le problème du biais d'usage des codons (Gustafsson et al., 2004). La première consiste à utiliser des souches d'*E. coli* capables de surexprimer des ARNt rares (Gräslund et al., 2008; Gustafsson et al., 2004; Jana and Deb, 2005; Sodoyer, 2004). La deuxième consiste à co-transformer une souche classique avec le plasmide d'intérêt et un plasmide contenant les gènes codant des ARNt rares (Gustafsson et al., 2004; Hannig and Makrides, 1998; Sodoyer, 2004; Sørensen and Mortensen, 2005a).

Ces deux solutions présentent néanmoins des inconvénients : la surproduction d'ARNt rares fonctionnels requiert l'implication d'autres composants cellulaires eux-mêmes en moindre quantité, ce qui pourrait entraîner une sur-activation métabolique à l'origine de dégâts cellulaires. De plus, cette surproduction aboutit potentiellement à un déséquilibre du pool d'ARNt et donc à des possibles substitutions « faux-sens », reflet d'une perte de fidélité de la traduction. Celle-ci a pour conséquence directe l'existence d'un pool hétérogène de protéines recombinantes, potentiellement immunogène pour le patient.

Une alternative à ces solutions consiste à modifier la séquence du transgène (sans modifier celle de la protéine correspondante) en altérant les codons rares présents, de sorte de les transformer en codons fréquemment utilisés par l'hôte (Baneyx, 1999; Gräslund et al., 2008; Gustafsson et al., 2004; Hannig and Makrides, 1998; Jana and Deb, 2005; Sodoyer, 2004; Sørensen and Mortensen, 2005a).

Ces modifications sont effectuées par mutagenèse dirigée ou encore par la synthèse *de novo* et présentent néanmoins quelques inconvénients : difficulté d'introduire des sites de restriction facilitant le clonage dans un plasmide, déséquilibre du pool des ARNt et ce qui en découle, répétition d'éléments de la structure secondaire de l'ARNm capable d'inhiber la traduction, etc.

Finalement, il ressort qu'aucune des solutions n'est idéale et que la corrélation entre le biais d'usage de codons et l'expression d'une protéine hétérologue n'est pas si simple : elle est bien souvent séquence-dépendante (Sodoyer, 2004).

Arrêt de la traduction

La traduction s'achève quand le ribosome rencontre le codon de terminaison ou « codon stop », situé directement en 3' de l'ARNm. Il en existe trois : UAA, UAG et UGA. Chez *E. coli*, c'est le codon UAA qui est le plus fréquemment utilisé (Hannig and Makrides, 1998; Jana and Deb, 2005; Sørensen and Mortensen, 2005a). La fin de la traduction dépend des interactions entre ribosome et ARNm, de l'action de facteurs solubles (RF1 et RF2), mais aussi de la nature du nucléotide qui suit le codon stop. Ainsi, chez *E. coli*, la séquence d'arrêt de la traduction la plus efficace est UAAU (Jana and Deb, 2005; Makrides, 1996).

1.1.5. Séquences codant des partenaires de fusion

Des séquences codant des partenaires de fusion peuvent être rajoutées en 3' ou en 5' de la séquence d'intérêt, en respectant le cadre de lecture. Ces éléments peptidiques ou protéiques présents à l'extrémité N ou C-terminale de la PtR permettent de faciliter son expression, sa solubilité et sa purification. Parmi ces partenaires figurent les *tags* poly-histidine, la glutathion-S-tranférase (GST), la *maltose binding protein* (MBP), la thioredoxine (Trx), etc. (Gräslund et al., 2008; Jayaraj and Smooker, 2009; Sodoyer, 2004; Young et al., 2012).

1.1.6. Exemples de plasmides commercialisés

Plusieurs dizaines de plasmides sont disponibles dans le commerce ; ils représentent différentes combinaisons d'origine de répllication, de marqueurs de sélection, de promoteurs, de partenaires de fusion, etc (Peti and Page, 2007). Le **tableau XII** est un extrait du panel de plasmides utilisés chez *E. coli* et actuellement commercialisés.

Plasmides	Origine de répllication	Marqueur de sélection	Promoteur	Partenaires de fusion	Fournisseur
pBAD/His	pUC	Amp	araBAD	6-Histidine en N-ter	Invitrogen
pBAD/Myc-His	pUC	Amp	araBAD	6-Histidine en C-ter	Invitrogen
pTrcHis	pUC	Amp	trc	6-Histidine en N-ter	Invitrogen
pTrcHis2	pUC	Amp	trc	6-Histidine en C-ter	Invitrogen
pTriEx-1	pUC	Amp	T7	6-Histidine en C-ter	Novagen
pTriEx-2	pUC	Amp	T7-lac	6-Histidine en N-ter	Novagen
				6-Histidine en C-ter	
pET-11a-d	pBR322	Amp	T7-lac	Néant	Novagen
pET-12a-c	pBR322	Amp	T7	Néant	Novagen
pTrc99A	pBR322	Amp	trc	Néant	Pharmacia
pGEX-1IT	pBR322	Amp	tac	GST	Pharmacia
pGEX-2T	pBR322	Amp	tac	GST	Pharmacia

Tableau XII. Exemples de plasmides utilisés pour l'expression de PtR dans *E. coli*.

(European Molecular Biology Laboratory, [en ligne])

1.2. Choix de la souche de production de protéines recombinantes

Il existe une large gamme de souches d'*E. coli* génétiquement modifiées pour faciliter la stabilité du plasmide et des ARNm, l'expression, la solubilité et la stabilité des PtR. La plupart sont déficientes en protéases, certaines surexpriment spontanément des codons normalement rares ou des protéines chaperonnes, d'autres facilitent la formation de ponts disulfures, d'autres encore sont résistantes à la toxicité de certaines protéines ou sont auxotrophes pour la méthionine (Pacheco et al., 2012; Peti and Page, 2007; Sodoyer, 2004; Sørensen and Mortensen, 2005a).

1.2.1. Souches permettant la stabilité du plasmide ou des ARNm

Les souches BLR, déficientes en recombinaisons (recA-), empêchent la recombinaison de séquences répétées pouvant exister au sein d'un plasmide. Quant aux souches BL21(DE3) Star, elles portent la mutation *rne131* codant une forme tronquée de RNase E incapable de dégrader l'ARNm (Sørensen and Mortensen, 2005a).

1.2.2. Souches déficientes en protéases

Les souches BL21(DE3) et apparentées, compatibles avec le système T7/lac, sont déficientes en ompT et lon, deux puissantes protéases. Ainsi, les protéines recombinantes produites dans ces souches ne subiront pas de protéolyse (Gräslund et al., 2008; Sodoyer, 2004; Sørensen and Mortensen, 2005a).

1.2.3. Souches surexprimant des codons rares

Plusieurs souches dérivées des BL21(DE3) possèdent des gènes codant des ARNt supplémentaires (Gräslund et al., 2008) et permettent ainsi de surmonter le problème du biais d'usage de codons décrit au paragraphe 1.1.4. Parmi elles figurent les souches BL21 Codon Plus(DE3)-RIL, BL21 Codon Plus(DE3)-RP/RPIL et BL21(DE3)-Rosetta qui contiennent un plasmide codant des ARNt reconnaissant jusqu'à 6 codons rares (AGA/AGG = Arg ; Ile = AUA ; Leu = CUA ; Pro = CCC ; Gly = GGA) (Peti and Page, 2007).

1.2.4. Souches favorisant la formation de ponts disulfures et le bon repliement

Les souches AD494 et BL21-Origami, déficientes en deux réductases (thiorédoxine réductase (*trxB*-) ± glutathion réductase (*trxB*-/*gor*-) respectivement), permettent la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme de la bactérie. Les PtR fusionnées à la thiorédoxine ou à la GST produites par ces souches sont bien repliées, plus solubles et faciles à purifier (Peti and Page, 2007; Sørensen and Mortensen, 2005a, 2005b; Young et al., 2012).

D'autres souches, surexprimant les disulfides isomérases (foldases) DsbA et DsbC permettent d'obtenir un repliement optimal de la protéine recombinante (Andersen and Krummen, 2002; Sørensen and Mortensen, 2005b).

1.2.5. Souches résistantes à la toxicité de la protéine exprimée

Pour des protéines toxiques, plusieurs souches bactériennes peuvent être utilisées. Parmi elles, les souches BL21-AI, C41(DE3) et C43(DE3). La souche BL21-AI possède dans son génome le gène de la T7 ARN polymérase qui est sous le contrôle du promoteur araBAD dont la régulation est très fine (Peti and Page, 2007). Les souches C41(DE3) et C43(DE3), dérivent de la souche BL21(DE3) mais permettent d'obtenir de meilleurs niveaux d'expression (Dumon-Seignovert et al., 2004; Miroux and Walker, 1996; Peti and Page, 2007; Sørensen and Mortensen, 2005a, 2005b). Le mécanisme expliquant leur résistance à la toxicité des Pt exprimées reste inconnu. Cependant il est admis que ce mécanisme affecte l'activité du promoteur de la T7 polymérase ou réduit la quantité de la polymérase produite (Dumon-Seignovert et al., 2004; Miroux and Walker, 1996). Ces souches sont également utilisées pour surexprimer des protéines volumineuses comme les protéines membranaires (Sørensen and Mortensen, 2005b).

1.2.6. Souches auxotrophes pour la méthionine

Une souche auxotrophe pour la méthionine est incapable de synthétiser cet acide aminé qui doit par conséquent être apporté dans le milieu de culture. De telles souches, comme la B834(DE3), sont cultivées en présence de sélénio-méthionine (Se-Mét) ou de méthionine radioactive (^{35}S -Mét), ce qui permet d'exprimer des protéines marquées et faciles à détecter ou à analyser en cristallographie par exemple (Peti and Page, 2007).

1.2.7. Exemples de souches d'expression commercialisées

Plusieurs dizaines de souches bactériennes d'expression sont disponibles dans le commerce et le **tableau XIII** en répertorie une partie.

Souches	Description	Utilité	Fournisseur
AD494 (DE3)	Déficientes en réductases (<i>trxB</i> ou <i>trxB</i> + <i>gor</i>)	Formation de ponts disulfures dans le cytoplasme	Novagen
BL21-Origami (DE3)			
BL21	Déficientes en protéases (<i>lon</i> et <i>ompT</i>)	Pas de protéolyse	Novagen
BL21(DE3)		Résistance à la toxicité (BL21 AI)	Novagen
BL21(DE3) CodonPlus-RIL	Déficientes en protéases	Pas de protéolyse	Stratagene
BL21(DE3) CodonPlus-RP	Contient un plasmide codant des ARNt rares	Solution au problème du biais d'usage de codons	
BL21 Star(DE3)	Mutant pour la RNaseE (<i>rne131</i>)	Permet de stabiliser l'ARNm en inhibant sa dégradation	Invitrogen
BLR(DE3)	Déficiente en recombinaise A (<i>recA</i> -)	Empêche la recombinaison interne de plasmides	Novagen
B834(DE3)	Déficiente en protéases	Pas de protéolyse	G. Stier
	Auxotrophe pour la méthionine	Marquage des protéines avec la ^{35}S -Met ou la Se-Met	
B834(DE3) pRARE	Déficiente en protéases	Pas de protéolyse	A. Geerlof
	Auxotrophe pour la méthionine	Marquage des protéines avec la ^{35}S -Met ou la Se-Met	
	Contient un plasmide codant des ARNt rares	Solution au problème du biais d'usage de codons	
C41(DE3)	Mutations non identifiées	Résistance à la toxicité Expression de protéines volumineuses et membranaires	Avidis SA
C43(DE3)			
DL41(DE3)	Auxotrophe pour la méthionine	Marquage des protéines avec la ^{35}S -Met ou la Se-Met	C. Mueller
HMS174(DE3) pLysS	Déficiente en recombinaise A (<i>recA</i> -)	Empêche la recombinaison interne de plasmides	Novagen
Rosetta(DE3)	Contient un plasmide codant des ARNt rares	Solution au problème du biais d'usage de codons	Novagen

Tableau XIII. Exemples de souches d'*E. coli* utilisées pour l'expression de PtR.

(European Molecular Biology Laboratory, [en ligne])

1.3. Choix des conditions de culture

1.3.1. Les récipients

La culture d'*E. coli* se fait sous agitation, soit dans des grands erlenmeyers stériles (production à petite échelle) soit dans des bioréacteurs (production industrielle). Dans le premier cas, le volume du bouillon de culture ne doit pas excéder 20 à 25% de la capacité totale de l'erlenmeyer utilisé (Studier, 2005). La culture en bioréacteurs quant à elle peut s'effectuer de trois façons différentes : en système clos ou batch (pas de variation du volume), en système semi-ouvert ou fed-batch (apport discontinu de milieu de culture neuf) ou encore en système continu (apport continu du milieu de culture) (Jana and Deb, 2005 ; Makrides, 1996).

1.3.2. Le milieu nutritif

La composition du milieu de culture doit être parfaitement connue et contrôlée car elle influence le métabolisme bactérien mais aussi l'expression et la stabilité des ARNm et de la protéine recombinante (Hannig and Makrides, 1998 ; Jana and Deb, 2005 ; Makrides, 1996).

Il existe de nombreux milieux nutritifs, le plus utilisé étant le milieu *Lysogeny Broth* (LB). Sa base est composée de peptides, de tryptone, de vitamines, d'oligo-éléments et de minéraux. Sa composition peut changer en fonction des applications voulues, son osmolarité peut être augmentée, il peut être supplémenté en métaux, en sels, en sucres, en acides aminés marqués, etc (Studier, 2005).

1.3.3. Les paramètres physicochimiques et la méthode d'induction

La production de protéines recombinantes dans *E. coli* est fortement dépendante de paramètres comme le pH, l'oxygénation, le taux de dioxyde de carbone, la durée de culture, la température du milieu, mais aussi de la méthode d'induction (Palomares et al., 2004).

La culture bactérienne à haut débit expose au risque d'acidification et de mauvaise oxygénation du milieu, par conséquent à une réduction de la biomasse et à une altération de l'expression de la protéine ou à une protéolyse (Berlec and Štrukelj, 2013 ; Hannig and Makrides, 1998 ; Jana and Deb, 2005 ; Makrides, 1996).

En général, les bactéries sont cultivées à 37°C jusqu'en phase exponentielle de croissance (A_{600nm} : absorbance à 600 nm = 0,6). A ce moment-là, l'induction de l'expression de la Pt peut être déclenchée et la culture est poursuivie à plus basse température (15 - 30°C) pendant 16h. Cela se justifie par le fait qu'à 37°C, la plupart des PtR sont mal repliées et précipitent, alors qu'à 20°C, elles sont solubles (Gräslund et al., 2008; Studier, 2005).

L'induction est variable et dépend notamment de la nature du promoteur présent dans le plasmide d'expression. Dans le cas des systèmes T7/lac, l'inducteur le plus utilisé est l'isopropyl- β -D-thiogalactoside : IPTG (cf paragraphe 1.1.3.). Il est généralement utilisé à une concentration de 1 mM et ajouté directement dans le milieu nutritif au moment adéquat. Une alternative intéressante consiste à cultiver les bactéries dans un milieu dit « auto-inductible » dont le ZYM5052 est un exemple (Gräslund et al., 2008; Studier, 2005), d'abord à 37°C pendant 3h, puis à 20°C pendant 16h (Peti and Page, 2007; Studier, 2005). Ces milieux sont composés de plusieurs sucres (glycérol, glucose, lactose) permettant non seulement d'obtenir une biomasse importante, grâce à la métabolisation du glucose, mais aussi un haut niveau d'expression de la protéine, grâce à la métabolisation du lactose. En effet, tant qu'il y a du glucose dans le milieu, les bactéries le métabolisent, ce qui accroît leur biomasse. Quand il n'y a plus de glucose, les bactéries métabolisent alors le lactose en allolactose, un puissant inducteur du promoteur *lac*, permettant ainsi l'expression protéique (Peti and Page, 2007). Les avantages de ces milieux sont nombreux : l'induction ne nécessite pas d'intervention extérieure (Sodoyer, 2004), la biomasse et la quantité de PtR produite sont beaucoup plus importantes qu'avec une induction par IPTG (Studier, 2005).

2. Garantir la solubilité des protéines recombinantes exprimées

2.1. Repliement des protéines et formation de corps d'inclusion

Pour être stables, solubles et actives, les PtR doivent adopter une conformation tridimensionnelle précise (état natif) acquise au cours du processus de repliement (Betton and Chaffotte, 2005 ; Goldberg, 2005). Ce processus complexe nécessite l'intervention de deux types de Pt complémentaires : les foldases qui accélèrent le repliement des Pt, et les chaperonnes qui préviennent les mauvais repliements (Sodoyer, 2004). Pour être optimal, le repliement doit s'effectuer dans le bon compartiment et suffisamment vite pour éviter la protéolyse, mais pas trop, pour éviter les mauvaises conformations (Goldberg, 2005).

Lors de la surexpression de Pt hétérologues, quand leur repliement n'est pas correct, elles s'agrègent dans des corps d'inclusion (CI) dans le cytoplasme (Hannig and Makrides, 1998) mais aussi parfois dans le périplasme bactérien (Baneyx, 1999 ; Singh and Panda, 2005 ; Sørensen and Mortensen, 2005a). Ce mauvais repliement peut être dû à l'accumulation intracellulaire rapide de la PtR exprimée, la saturation de la machinerie bactérienne du repliement ou l'absence de formation de ponts disulfures dans le cytoplasme (liée à l'environnement réducteur) (Betton and Chaffotte, 2005 ; Palomares et al., 2004).

2.2. Solutions permettant d'éviter la formation des corps d'inclusion

La formation des CI peut être minimisée en contrôlant plusieurs paramètres dont les la température de culture, l'ajout d'un partenaire de fusion à la PtR ou la co-expression de molécules chaperonnes et/ou de foldases (Betton and Chaffotte, 2005 ; Makrides, 1996 ; Palomares et al., 2004 ; Sørensen and Mortensen, 2005a). De plus, il est possible de favoriser l'expression de la PtR dans le périplasme ou sa sécrétion dans le milieu de culture (Baneyx, 1999 ; Hannig and Makrides, 1998 ; Makrides, 1996). Il est enfin possible de moduler le taux d'expression (promoteur faible : trc au lieu de T7, plasmide ayant une faible origine de réplication, diminution de la concentration de l'inducteur, etc), la composition du milieu de culture ou encore le métabolisme de l'hôte (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]).

2.2.1. Culture bactérienne à basse température

L'agrégation des PtR survient à des températures hautes (Lilie et al., 1998 ; Sørensen and Mortensen, 2005b), d'où la nécessité d'abaisser la température de culture de 37°C à 15-30°C au moment de l'induction (Baneyx, 1999; Betton and Chaffotte, 2005; Gräslund et al., 2008 ; Studier, 2005), après l'obtention d'une biomasse suffisante pour garantir une grosse production de la PtR (Palomares et al., 2004 ; Sørensen and Mortensen, 2005b).

2.2.2. Co-expression de partenaires de fusion

Les partenaires de fusion, dont les plus couramment utilisés sont la GST, la MBP, la Trx et la N-utilizing substance A (NusA), permettent le bon repliement et augmentent la solubilité de la PtR d'intérêt (Baneyx, 1999 ; Betton and Chaffotte, 2005 ; Lilie et al., 1998; Palomares et al., 2004 ; Peti and Page, 2007; Sørensen and Mortensen, 2005a, 2005b).

2.2.3. Co-expression de chaperonnes

Les chaperonnes évitent la formation des CI en prévenant l'agrégation des PtR mal repliées et, le cas échéant, en favorisant leur protéolyse quand elles sont malgré tout, mal repliées (Goldberg, 2005 ; Hannig and Makrides, 1998 ; Sørensen and Mortensen, 2005a). Ces protéines (DnaK, GroEL, GroES, ClpB...) appartiennent à la famille des Heat Shock Proteins (Arrigo, 2005 ; Baneyx, 1999 ; Gräslund et al., 2008 ; Sørensen and Mortensen, 2005a). Leur co-expression avec certaines PtR d'intérêt améliorent le repliement et la solubilité de celles-ci (Hannig and Makrides, 1998).

2.2.4. Expression dans le périplasma et sécrétion dans le milieu de culture

L'expression cytoplasmique est désirée car elle permet d'obtenir des PtR en grande quantité (Sørensen and Mortensen, 2005a). Néanmoins, ce compartiment cellulaire n'est pas toujours optimal car il contient des protéases et plusieurs autres protéines qui peuvent complexifier la purification de la PtR (Berlec and Štrukelj, 2013). De plus, l'expression des PtR riches en ponts disulfures n'y est pas adaptée car l'environnement y est réducteur (Baneyx, 1999; Berlec and Štrukelj, 2013; Lilie et al., 1998). Pour y remédier, il est possible d'utiliser des souches mutantes pour des réductases (Assenberg et al., 2013; Baneyx, 1999; Hannig and Makrides, 1998; Makrides, 1996) et de les cultiver à basse température (Swartz, 2001), ou encore d'orienter l'expression dans le périplasma (**figure 20**) dont l'environnement oxydant et pauvre en Pt bactériennes est plus adapté pour le bon repliement et la purification de la PtR (Assenberg et al., 2013 ; Berlec and Štrukelj, 2013 ; Swartz, 2001). Pour cela, des bactéries surexprimant des foldases peuvent être cultivées dans un milieu oxydant (Andersen and Krummen, 2002 ; Baneyx, 1999 ; Hannig and Makrides, 1998 ; Lilie et al., 1998 ; Sørensen and Mortensen, 2005b).

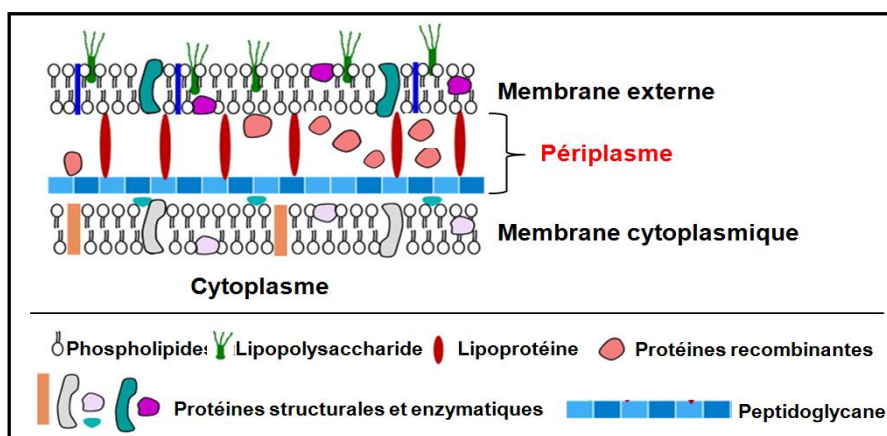


Figure 20. Expression de PtR dans le périplasma d'*E. coli*.

(Biologie marine, [en ligne])

En dernier recours, la sécrétion de la PtR dans le milieu de culture peut être envisagée. Dans ce cas, il s'agit soit d'utiliser des souches ne possédant pas de constituants membranaires, soit de perméabiliser la membrane cytoplasmique ou d'activer des mécanismes endogènes de sécrétion (Jana and Deb, 2005 ; Sørensen and Mortensen, 2005a). Cette stratégie est avantageuse car il y a peu de risques de protéolyse et elle facilite les étapes de purification (Hannig and Makrides, 1998). Néanmoins, elle est peu transposable à l'échelle industrielle à cause du faible rendement et de l'importante dilution de la PtR qu'elle entraîne (Baneyx, 1999 ; Hannig and Makrides, 1998 ; Swartz, 2001).

2.3. Renaturation des protéines recombinantes agrégées

Dans certains cas, la formation de corps d'inclusion est inévitable malgré l'usage des méthodologies décrites précédemment. Dans d'autres, elle est intentionnelle dans la mesure où les CI permettent l'expression d'une grande quantité de PtR, les protègent de la protéolyse et protègent l'hôte contre la toxicité de certaines PtR. De plus, leur purification est facile compte tenu de leur forte densité comparée à celle des autres constituants cellulaires (Berlec and Štrukelj, 2013 ; Betton and Chaffotte, 2005 ; Clark, 2001 ; Hannig and Makrides, 1998 ; Lilie et al., 1998 ; Palomares et al., 2004 ; Singh and Panda, 2005). Dans tous les cas, quand une PtR est produite dans des CI, des étapes de solubilisation et de « renaturation » sont nécessaires. Elles consistent à isoler les CI, solubiliser puis replier correctement la PtR (De Bernardez Clark, 1998 ; Palomares et al., 2004 ; Singh and Panda, 2005 ; Sørensen and Mortensen, 2005b).

2.3.1. Isolement des corps d'inclusion

Les bactéries contenant des CI sont lysées mécaniquement (pression), chimiquement ou enzymatiquement (lysozyme). Pour séparer les CI des autres constituants cellulaires, le lysat obtenu est centrifugé à faible vitesse, et le culot est récupéré. Ce culot est lavé avec des tampons contenant des sels, des agents chaotropiques (urée, chlorure de guanidium) ou des détergents (Triton®X-100, désoxycholate de sodium) à faible concentration (De Bernardez Clark, 1998 ; Clark, 2001 ; Lilie et al., 1998 ; Singh and Panda, 2005).

2.3.2. Solubilisation des corps d'inclusion et des protéines recombinantes

La solubilisation des CI est délicate car elle implique la dénaturation complète de la PtR d'intérêt. Elle est réalisée à pH alcalin, à forte température et en présence d'agents chaotropiques, de réducteurs, de détergents et de chélateurs (EDTA) (De Bernardez Clark, 1998 ; Betton and Chaffotte, 2005 ; Lilie et al., 1998 ; Singh and Panda, 2005).

Les agents réducteurs (dithiothréitol : DTT, β -mercapto-éthanol, cystéine, etc.) et les chélateurs permettent d'éviter l'oxydation des cystéines et la formation de ponts disulfures intra/inter moléculaires de façon aléatoire (Clark, 2001 ; Singh and Panda, 2005). Les détergents (dodécyl sulfate de sodium : SDS, etc.) permettent, quant à eux, la solubilisation mais ils présentent l'inconvénient d'interférer avec les étapes de purification. Ils doivent donc impérativement être retirés avant la renaturation et l'utilisation des PtR, surtout sur des cellules ou tissus vivants. Cette élimination nécessite un traitement particulier, ce qui peut complexifier le processus (De Bernardez Clark, 1998 ; Clark, 2001 ; Singh and Panda, 2005).

2.3.3. Repliement des protéines recombinantes solubilisées

Cette étape est favorisée par l'élimination de tous les agents dénaturants, réducteurs et chélateurs utilisés lors de la solubilisation de la PtR, ainsi que par l'ajout éventuel de petites molécules (L-arginine) ou de cofacteurs (ions divalents) (Betton and Chaffotte, 2005 ; Lilie et al., 1998 ; Singh and Panda, 2005). Il est nécessaire de contrôler la température, le pH, la force ionique et les conditions redox surtout pour les PtR riches en ponts disulfures (De Bernardez Clark, 1998 ; Clark, 2001 ; Lilie et al., 1998 ; Singh and Panda, 2005).

Les méthodes disponibles pour éliminer ces agents sont la dilution, la dialyse, la diafiltration ou encore la chromatographie (De Bernardez Clark, 1998 ; Betton and Chaffotte, 2005 ; Clark, 2001 ; Lilie et al., 1998 ; Singh and Panda, 2005).

La dilution

La dilution de la PtR directement dans le tampon de renaturation est la solution la plus souvent envisagée pour une production à petite échelle (De Bernardez Clark, 1998 ; Singh and Panda, 2005). Néanmoins elle présente l'inconvénient de nécessiter des gros volumes de tampons et de rajouter des étapes de concentration de la PtR (Clark, 2001 ; Singh and Panda, 2005).

La dialyse

Procédé basé sur la lente diffusion de petites molécules, la dialyse est difficilement transposable à l'échelle industrielle. De plus, du fait de l'exposition de la PtR à des concentrations intermédiaires du tampon de dénaturation pendant des périodes prolongées, celle-ci peut s'agréger de nouveau (De Bernardez Clark, 1998). En outre, il peut arriver que la PtR se fixe à la membrane et ne puisse plus être récupérée (Clark, 2001).

Diafiltration

La diafiltration est un procédé proche de la dialyse car elle permet aussi l'échange de tampon et le désalage de la solution de PtR. Cependant, à la différence de la dialyse, elle présente l'avantage d'être couplée à l'ultracentrifugation, ce qui permet de concentrer l'échantillon et d'en limiter les pertes (Schwartz, 2014, [en ligne]).

Chromatographie

La chromatographie d'affinité est souvent utilisée dans le cas des PtR possédant un partenaire de fusion. Celui-ci permet d'immobiliser la PtR de façon spécifique sur une résine (De Bernardez Clark, 1998; Betton and Chaffotte, 2005). L'avantage de la chromatographie est de permettre simultanément l'élimination des agents dénaturants, le bon repliement et la purification *in situ* de la PtR (Clark, 2001 ; Lilie et al., 1998 ; Singh and Panda, 2005).

2.4. Synthèse sur la solubilité des protéines recombinantes

Il n'est pas toujours possible de prévoir si une PtR sera soluble d'emblée ou produite dans des CI, et donc s'il sera nécessaire de la renaturer *in vitro* ou pas (Palomares et al., 2004). Le repliement *in vitro* est un processus empirique, spécifique à chaque Pt (De Bernardez Clark, 1998 ; Betton and Chaffotte, 2005; Goldberg, 2005), ne permettant pas toujours de recouvrer un bon taux de PtR bioactive (Baneyx, 1999; Palomares et al., 2004 ; Singh and Panda, 2005) et aboutissant parfois à la précipitation de la PtR renaturée. Pour ces raisons, il est souvent préférable d'agir en amont sur le gène codant la Pt ou sur le système d'expression, afin de promouvoir le repliement cellulaire (Betton and Chaffotte, 2005 ; Palomares et al., 2004 ; Sørensen and Mortensen, 2005b).

3. Garantir la stabilité des protéines recombinantes exprimées

En règle générale, les PtR exprimées sont stables quand elles sont solubles, donc correctement repliées. En effet, dans le cas contraire, la bactérie met en place un mécanisme de survie en favorisant la dégradation des PtR agrégées et insolubles (Makrides, 1996). La protéolyse bactérienne est d'autant plus réalisable que la PtR, même soluble, arbore des sites de clivage particuliers ou des acides aminés bien précis en N-terminal (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]).

Pour éviter la protéolyse, plusieurs moyens sont envisageables : réduction de la température de culture pendant l'induction, partenaire de fusion, chaperonnes, adressage des PtR dans le périplasme ou le milieu de culture, inhibiteurs de protéases, souches déficientes en protéases, etc. (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne] ; Baneyx, 1999 ; Hannig and Makrides, 1998 ; Sørensen and Mortensen, 2005a).

4. Synthèse sur l'expression des protéines recombinantes dans *E. coli*

Escherichia coli est un hôte qui permet une production rapide et économique de PtR, en particulier d'intérêt thérapeutique (insuline, hormone de croissance, etc.). L'amélioration des connaissances en génétique, en biologie moléculaire et en biochimie a permis de développer une variété de stratégies pour garantir un haut niveau d'expression, une bonne solubilité et une bonne stabilité protéique (Jana and Deb, 2005). En définitive, avant d'envisager d'exprimer une PtR dans *E. coli*, il faut tenir compte de sa nature, des caractéristiques du plasmide, de la souche bactérienne, et des conditions de culture (Gräslund et al., 2008).

Une fois fortement exprimée, solubilisée et stable, la PtR peut ensuite être purifiée et caractérisée par diverses méthodes exposées dans la section 3 de ce chapitre.

Section 3 - Purification et caractérisation des protéines recombinantes

1. Etape préalable à la purification des protéines recombinantes : clarification

L'étape préalable à la purification consiste à isoler les Pt solubles des constituants bactériens solides. Si la PtR est sécrétée dans le milieu de culture, une simple centrifugation ou une filtration est suffisante pour obtenir un échantillon clarifié prêt à être purifié. Cependant, dans la plupart des cas, la PtR doit être extraite de la bactérie après une lyse physique, mécanique, enzymatique ou thermique. Les conditions de lyse doivent permettre d'éviter l'oxydation et la protéolyse, mais aussi la contamination par l'ADN génomique. Le lysat bactérien obtenu est ensuite centrifugé et le surnageant est recueilli pour la purification (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne] ; Gräslund et al., 2008).

1.1. Lyse physique : sonication

Cette méthode consiste à appliquer plusieurs impulsions courtes d'ultrasons de façon discontinue. Les phénomènes de cisaillement et de cavitation engendrés sont suffisants pour lyser de faibles quantités de bactéries (1-6 L de bouillon). Néanmoins, la chaleur dégagée expose au risque de dégradation de la PtR. La suspension bactérienne doit, par conséquent, être maintenue dans la glace pendant tout le processus de lyse (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne] ; Peti and Page, 2007).

1.2. Lyse mécanique : homogénéisateurs

Les homogénéisateurs permettent d'appliquer plusieurs fois une forte pression aux bactéries, puis à relâcher brutalement cette pression. Ces appareils, en tête desquels la French press, sont adaptés pour lyser de très grandes quantités de bactéries (plusieurs dizaines de litres de bouillon). Ils présentent néanmoins l'inconvénient de dégager de la chaleur et de former de la mousse, ce qui expose au risque d'inactivation de la PtR (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]).

1.3. Lyse enzymatique : lysozyme

Le lysozyme est capable de digérer le peptidoglycane de la paroi bactérienne lorsqu'il est accessible. Chez les bactéries à Gram négatif, il est nécessaire de perméabiliser la membrane externe (**figure 21**) par l'ajout de tampon Tris-EDTA. Pour augmenter l'efficacité de la lyse enzymatique, il est possible de la combiner à la sonication (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]). Cette méthode de lyse est peu rentable pour les grands volumes de culture compte tenu du coût élevé de l'enzyme (Peti and Page, 2007).

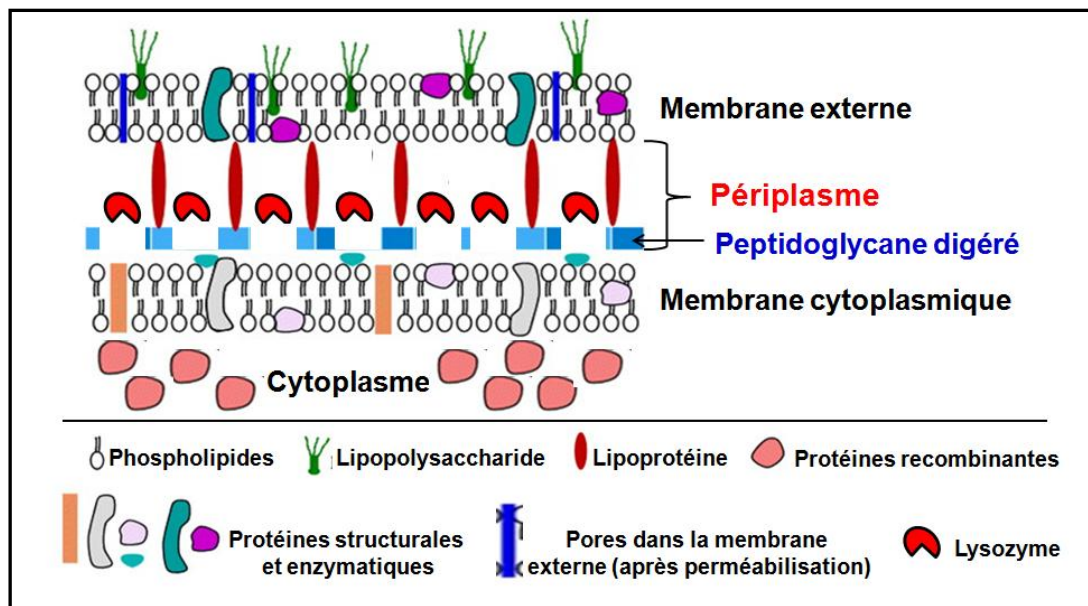


Figure 21. Lyse enzymatique du peptidoglycane bactérien.

(Biologie marine, [en ligne])

1.4. Lyse thermique : cycles congélation-décongélation

La lyse thermique consiste à faire plusieurs cycles de congélation dans de l'azote liquide (puis à -20°C ou -80°C pendant plusieurs heures) et de décongélation des bactéries à température ambiante (Peti and Page, 2007). Pour augmenter l'efficacité de la lyse thermique, il est possible de la combiner à la sonication et/ou à la lyse enzymatique.

2. Purification des protéines recombinantes

La purification d'une PtR permet non seulement d'isoler celle-ci du reste des Pt bactériennes, mais aussi de la concentrer (Costa et al., 2014). Cette séparation est possible grâce à la différence de propriétés physicochimiques entre la PtR et les Pt bactériennes (affinité pour un ligand, charge ionique, taille, hydrophobicité, etc.). La méthode la plus utilisée est la chromatographie d'affinité qui, en général, suffit pour obtenir un bon degré de pureté de la PtR. Néanmoins, si un plus grand degré de pureté est nécessaire, d'autres techniques peuvent être envisagées : chromatographie liquide haute performance, chromatographie d'échange d'ions (CEI), chromatographie d'exclusion stérique (CES) (Costa et al., 2014 ; Jayaraj and Smooker, 2009). Ces techniques qui permettent d'obtenir des rendements supérieurs à 90 % (Arnau et al., 2006 ; Costa et al., 2014), se décomposent en trois étapes : l'adsorption de la PtR sur un ligand spécifique greffé sur une matrice (agarose, sépharose...), l'élimination des autres Pt par des rinçages, et l'élution de la PtR.

2.1. Chromatographie d'affinité

Cette technique permet d'isoler la PtR grâce à son affinité pour un ligand immobilisé sur une matrice solide (**figure 22**). Ce ligand peut être une immunoglobuline, un composé protéique ou osidique, un ion métallique, etc. (Costa et al., 2014 ; Pina et al., 2014). Il interagit avec une partie propre de la PtR ou avec le partenaire de fusion (**tableau XIV**).

Historiquement, le premier couple « tag-ligand » utilisé était basé sur l'affinité entre la protéine A du Staphylocoque (SpA) et le fragment Fc de l'immunoglobuline G (IgG) de mammifère. Ainsi, en 1985, une forme de phosphatase alcaline fusionnée avec SpA fut produite et sa purification sur un support d'IgG fut réalisée (Pina et al., 2014). Le rendement final de ce système de purification est souvent supérieur à 95% (Guan and Chen, 2014).

Concernant les ligands protéiques, les plus connus sont la streptavidine, la calmoduline et le glutathion. Ils permettent de purifier des PtR fusionnées avec la biotine, la *calmodulin binding protein* et la GST, respectivement (Pina et al., 2014 ; Zhao et al., 2013).

Quant aux ligands osidiques (asialofétuine, rhamnose, lactose, amylose...), ils permettent de purifier des lectines (Guan and Chen, 2014 ; Nascimento et al., 2012) ou d'autres Pt fusionnées avec la MBP par exemple (Pina et al., 2014 ; Zhao et al., 2013).

Enfin, certains ligands ioniques (cuivre, nickel, zinc, cobalt) permettent de purifier des PtR fusionnées avec un tag histidine, grâce à leur interaction avec les noyaux imidazole (Arnau et al., 2006 ; Baneyx, 1999 ; Pina et al., 2014 ; Young et al., 2012 ; Zhao et al., 2013).

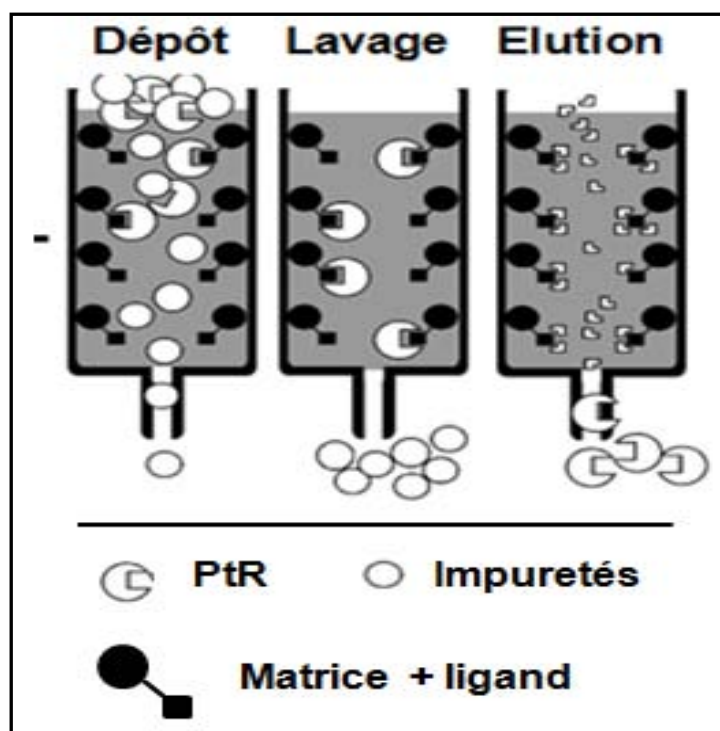


Figure 22. Principe de purification des PtR par chromatographie d'affinité.

(Leblanc B., [en ligne])

Tags	Ligands	Méthodes d'élution
His6 : <i>Tag</i> hexahistidine	Ions métalliques divalents (Cu, Co, Ni, Zn)	Compétition avec de l'imidazole
GST : Glutathion-S-transférase	Glutathion	Compétition avec du glutathion
MBP : <i>Maltose binding protein</i>	Amylose	Compétition avec du maltose
Strep II : <i>Streptavidin binding peptide</i>	Streptavidine	Compétition avec de la biotine
CBP : <i>Calmodulin binding protein</i>	Calmoduline	Chélateurs de calcium (EDTA)
Protéine A du Staphylocoque	IgG	Acidification du milieu

Tableau XIV. Exemples de *tags* d'affinité utilisés pour purifier des PtR.

(Costa et al., 2014)

2.2. Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions permet de séparer les Pt en fonction de leur charge ionique de surface. La phase stationnaire est une matrice chargée positivement (**figure 23**), ou négativement, pour une chromatographie d'échange d'anions, ou de cations, respectivement. Ainsi, les Pt possédant une charge ionique de surface opposée à celle de la matrice pourront s'y fixer (Duong-Ly and Gabelli, 2014a ; *European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]). L'élution des Pt est effectuée grâce à des modifications de la force ionique ou du pH de la solution tampon, de façon à diminuer leurs charges ioniques de surface.

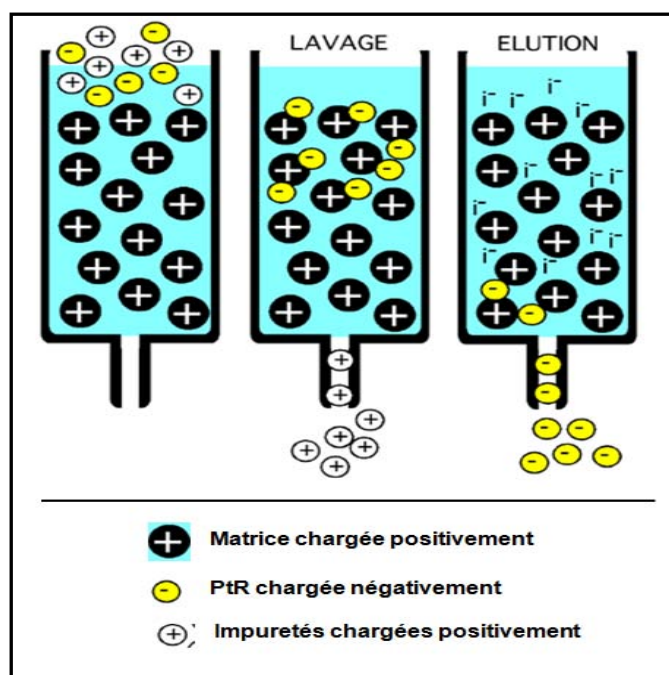


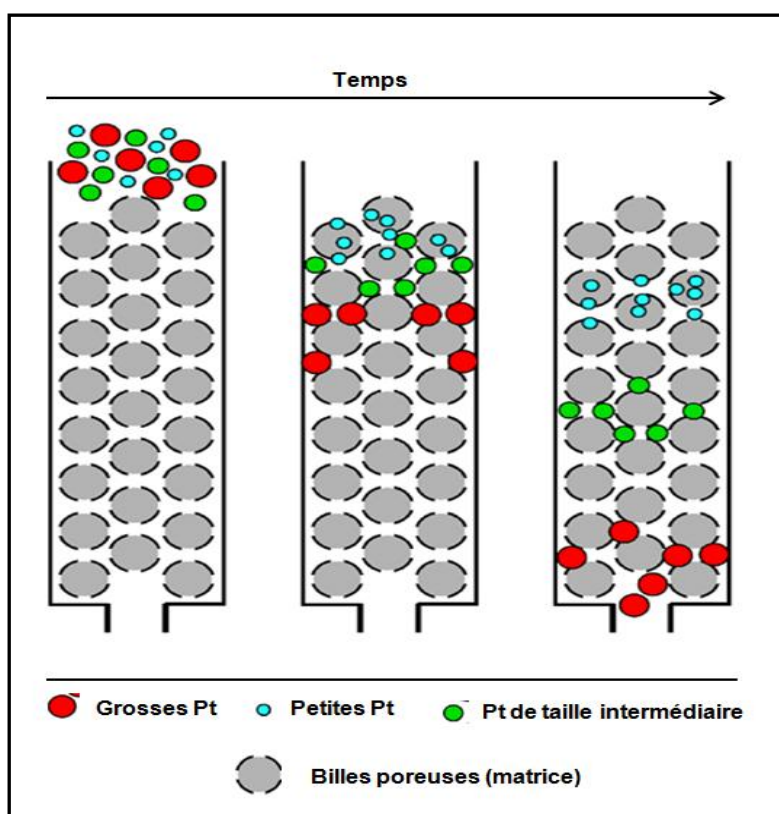
Figure 23. Principe de purification des PtR par chromatographie d'échange d'anions.

(Leblanc B., [en ligne])

Cette chromatographie permet d'obtenir un bon rendement de purification dans la plupart des cas. Cependant, elle nécessite de tester plusieurs valeurs de pH en tenant compte du pI de la PtR, pour déterminer celle qui permet la meilleure séparation. De plus, il peut arriver qu'une Pt bactérienne possède une charge ionique de surface similaire à celle de la PtR et, par conséquent, qu'elle soit co-éluee. Dans ce cas, les deux Pt peuvent ensuite être séparées selon leur taille par la chromatographie d'exclusion stérique par exemple (Duong-Ly and Gabelli, 2014a).

2.3. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer des composés selon leur taille. La matrice est composée de billes poreuses. Les plus grosses Pt passent entre les billes et sortent en premier de la colonne. Les plus petites Pt quant à elles, sont retenues dans les pores des billes et sont donc les dernières à être éluées (**figure 24**).



Cette technique ne doit pas être utilisée dès le début de la purification d'une PtR puisque dans le lysat bactérien plusieurs Pt peuvent avoir la même taille et ne pourront donc pas être correctement séparées. Elle est plus adaptée en complément d'une première chromatographie (affinité ou échange d'ions), pour affiner la purification de la PtR (Duong-Ly and Gabelli, 2014b).

2.4. Chromatographie d'interactions hydrophobes

En solution, les Pt hydrophobes cherchent davantage à s'associer entre elles qu'à s'hydrater (McCue, 2014). Des résines fortement chargées en sels et composées de groupements hydrophobes permettent de retenir de telles Pt. Celles-ci sont ensuite éluées par un gradient décroissant de sel (**figure 25**) (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]). Tout comme la chromatographie d'exclusion stérique, la chromatographie d'interactions hydrophobes est plus adaptée pour affiner la purification d'une PtR.

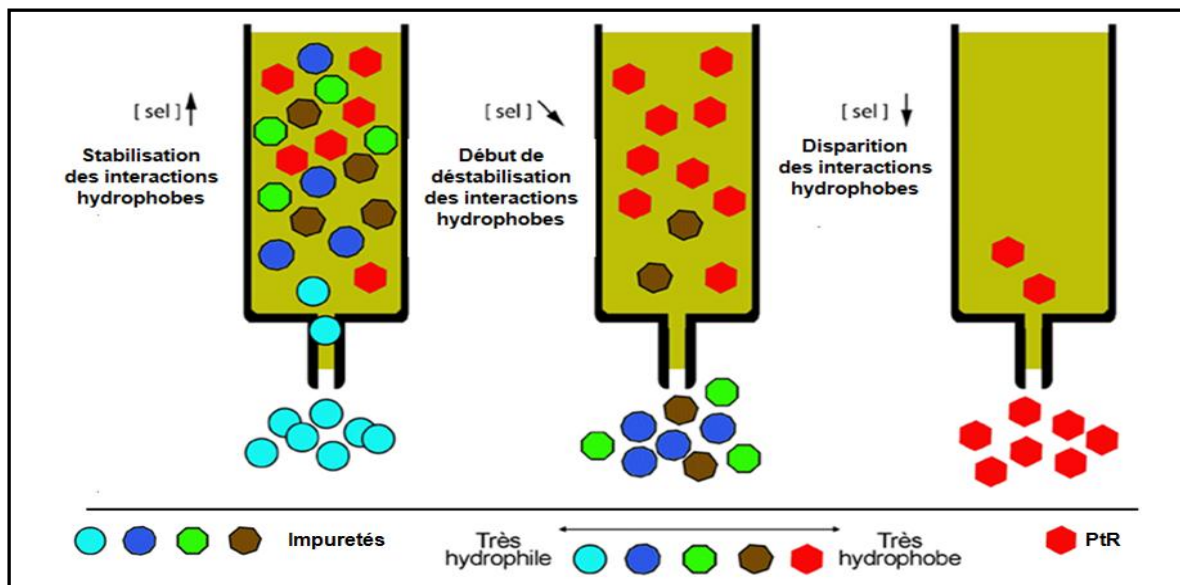


Figure 25. Principe de purification des PtR par chromatographie d'interactions hydrophobes.

(Leblanc B., [en ligne])

2.5. Clivage des partenaires de fusion

Malgré l'utilité des *tags* pour améliorer la purification, ces partenaires de fusion peuvent modifier la solubilité et l'activité biologique des PtR, voire les rendre immunogènes (Arnau et al., 2006 ; Costa et al., 2014 ; Young et al., 2012 ; Zhao et al., 2013). Afin d'éviter cela, il est nécessaire de cliver le *tag* après l'étape de purification, ou si possible, de cloner des séquences sans *tag* (Arnau et al., 2006 ; Frey and Görlich, 2014).

2.5.1. Clivage chimique

Les *tags* peuvent être retirés par réaction chimique simple avec de l'acide iodobenzoïque, du bromure de cyanogène, des ions cuivriques (Cu^{2+}) (Sodoyer, 2004) ou encore de l'acide formique. Cette réaction est néanmoins peu spécifique et peut affecter la stabilité et la solubilité de la PtR (Costa et al., 2014).

2.5.2. Clivage enzymatique classique

Les PtR *taguées* contiennent en N ou C-terminal, une séquence reconnue par des protéases spécifiques telles que l'entérokinase, le facteur X activé, l' α -thrombine, la protéase du virus du tabac (TEV : tobacco etch virus) ou du rhinovirus humain 3C (Arnau et al., 2006 ; Costa et al., 2014 ; Guan and Chen, 2014 ; Young et al., 2012 ; Zhao et al., 2013).

Après sa purification, la PtR *taguée* est incubée avec une protéase spécifique du tag. Une fois clivé, le *tag* est séparé de la PtR par une autre étape de chromatographie d'affinité : alors qu'il se fixe à la résine, la PtR est, quant à elle, éluée par gravité (Costa et al., 2014; Frey and Görlich, 2014). Ce type de clivage, bien que couramment utilisé, présente plusieurs inconvénients. En effet, l'ajout d'une nouvelle étape de purification complexifie le procédé et conduit à la diminution du rendement final d'autant que le clivage peut être incomplet (Baneyx, 1999 ; Costa et al., 2014 ; Guan and Chen, 2014). De plus, les protéases peuvent lyser la PtR de façon non spécifique et sa solubilité, ainsi que son activité, peuvent être affectées (Costa et al., 2014). Enfin, le coût des protéases et tampons est élevé, ce qui rend difficile l'exploitation à l'échelle industrielle (Costa et al., 2014 ; Guan and Chen, 2014 ; Pina et al., 2014).

2.5.3. Clivage enzymatique sur colonne

Afin de réduire les coûts et le nombre de purifications, il est possible de n'utiliser qu'une seule colonne de chromatographie : la PtR *taguée* y est immobilisée via son *tag*, la protéase rajoutée clive le *tag* et libère la PtR (Frey and Görlich, 2014) (**figure 26**). Cette alternative permet d'utiliser l'enzyme en faible quantité et de la réutiliser plusieurs fois, ce qui est un atout à l'échelle industrielle (Arnau et al., 2006 ; Pina et al., 2014). Ce procédé de clivage sur colonne est couramment utilisé, notamment pour les PtR fusionnées avec la GST ou la MBP (Frey and Görlich, 2014).

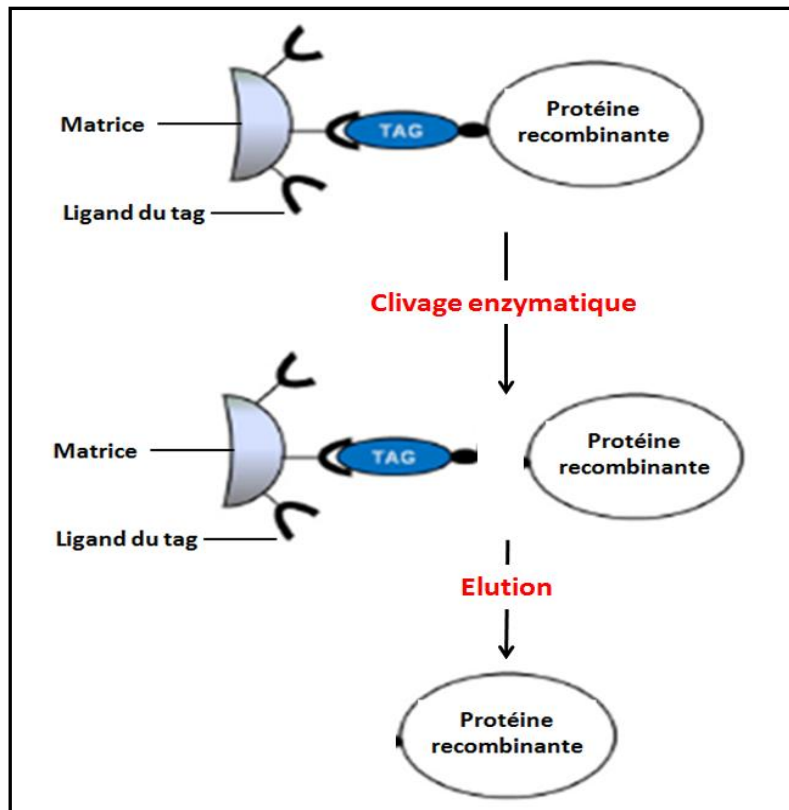


Figure 26. Principe du clivage enzymatique du *tag* sur colonne.

(Adapté de Pina et al., 2014)

2.5.4. Intérêt des protéines recombinantes non *taguées*

Compte tenu des nombreux inconvénients du *tag* (modifications physicochimiques et biologiques, immunogénécité...) et de son clivage (coût, efficacité imprévisible, diminution du rendement...), il est souvent préférable à l'échelle industrielle, de produire des PtRIT non *taguées* et d'en adapter les méthodes de purification (Arnau et al., 2006 ; Pina et al., 2014).

2.6. Elimination des endotoxines

La production de PtR par *E. coli* expose à des risques de contamination des préparations par des endotoxines bactériennes (LPS). Or les préparations de PtRIT étant généralement destinées à l'usage parentéral, il est indispensable qu'elles soient apyrogènes. Plusieurs méthodes sont disponibles pour cela : la chromatographie d'affinité avec immobilisation de polymyxine B ou d'histidine (Lowe et al., 2012), la séparation de phase en présence de Triton X-114 (Liu et al., 1997) ou encore l'adsorption du LPS sur des cristaux de silicate de calcium hydratés (Zhang et al., 2005).

Pour contrôler le niveau d'endotoxines résiduelles, la Pharmacopée Européenne préconise le test du lapin et le *Limulus* test. Le premier consiste à injecter en intraveineuse la solution à tester (X), contenant la PtR, à trois lapins et à mesurer l'augmentation de température qui ne doit pas excéder 1,15 °C. Le deuxième test consiste à mettre la solution X en présence d'un lysat d'amœbocytes de limule (*Limulus polyphemus*) (**figure 27**) : la survenue d'une coagulation traduit la présence d'endotoxines.

D'autres tests rapides et peu coûteux, mais non validés par la Pharmacopée Européenne, peuvent être utilisés. Il s'agit notamment d'observer l'expression de gènes cibles de la PtR et/ou la production de nitrites, par des cellules sensibles aux endotoxines et cultivées en présence de la solution X. Si la PtR d'intérêt peut produire le même signal que le LPS sur ces cellules, il est alors nécessaire de la dénaturer thermiquement (à 100°C) et de re-tester la solution X. Le signal observé après dénaturation ne sera attribuable qu'au LPS, molécule thermostable.



Figure 27. Limule (*Limulus polyphemus*).

(Aquaportail, [en ligne])

3. Caractérisation des protéines recombinantes

3.1. Méthodes qualitatives

Dans le cadre d'une production de PtR pour des applications thérapeutiques, il est indispensable que cette Pt se trouve dans un état natif à la fin du processus. De nombreuses techniques permettent d'analyser l'intégrité, l'homogénéité et la qualité des structures protéiques (Betton and Chaffotte, 2005 ; Gräslund et al., 2008). Certaines d'entre elles sont succinctement évoquées dans les paragraphes suivants. Quant à l'activité biologique des PtR produites, elle est validée par divers tests *in vitro* ou *in vivo* en fonction de la nature même de la Pt (Betton and Chaffotte, 2005).

3.1.1. Electrophorèse

La technique la plus couramment utilisée pour identifier des Pt est l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (**figure 28**). Grâce un champ électrique appliqué dans la cuve d'électrophorèse, les Pt (toutes chargées négativement grâce au SDS), sont séparées en fonction de leur taille. Elles sont ensuite révélées après la coloration du gel (bleu de Coomassie, nitrate d'argent...). Ces méthodes de révélation permettent d'estimer la pureté de la préparation et de vérifier la taille de la PtR.

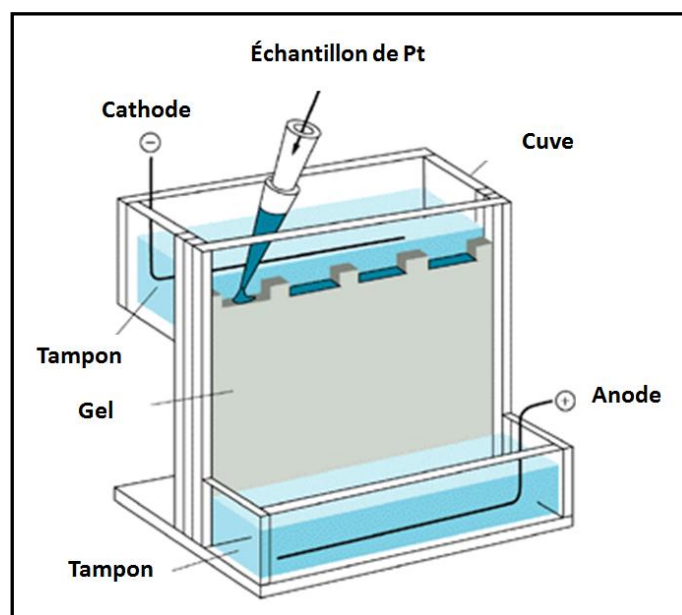


Figure 28. Dispositif d'électrophorèse de protéines.

(Leibniz intitute for age research, [en ligne])

3.1.2. Mesure du dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est un phénomène d'absorption de la lumière par certaines molécules en fonction de leur polarisation. Il concerne donc toute molécule optiquement active et en particulier les molécules biologiques du fait de leur chiralité. Dans le cas des protéines, la mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (180-260 nm) fournit des informations sur leur structure secondaire (hélices α , feuillets β , tours et structures désordonnées). Les signaux dichroïques obtenus dans l'UV proche (250-330 nm) fournissent, quant à eux, des informations sur l'environnement des acides aminés aromatiques (Centre de biophysique moléculaire, [en ligne]).

3.1.3. La diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique d'analyse spectroscopique permettant de mesurer le rayon de particules en suspension dans un liquide (Malvern Instruments, [en ligne] ; Horiba Scientific, [en ligne]). Lorsque la lumière d'un laser atteint des petites particules, la lumière diffuse dans toutes les directions. L'intensité de cette lumière varie en fonction du temps car les particules ne sont pas statiques, mais au contraire elles sont soumises au mouvement Brownien. Ainsi, plus ces particules sont petites, plus elles sont mobiles et plus l'intensité de la lumière diffusée varie rapidement. Le signal obtenu (**figure 29**) permet de définir des indices reflétant le volume des particules de l'échantillon ainsi que leur nombre.

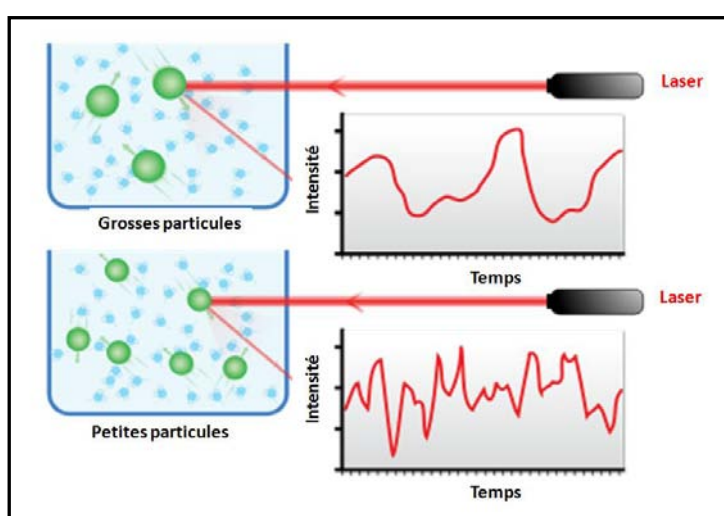


Figure 29. Principe de la diffusion dynamique de la lumière.

(Jones M., [en ligne])

3.1.4. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) est une technique d'analyse permettant d'identifier des molécules grâce à leur masse, de caractériser leur structure chimique et de vérifier leur intégrité ainsi que leur pureté (Goulding and Perry, 2003). Son principe est basé sur la séparation de molécules ionisées en fonction de leur rapport masse/charge (**figure 30**).

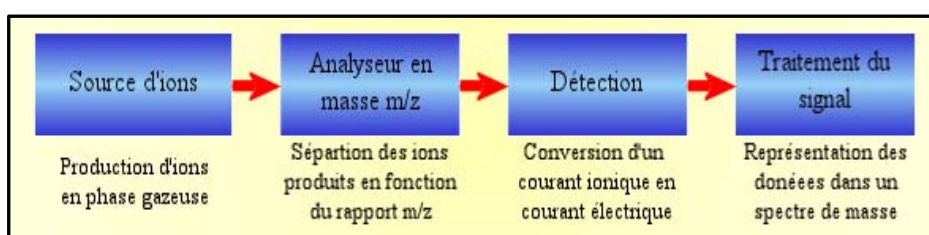


Figure 30. Principe de la spectrométrie de masse.

Il existe plusieurs types de spectromètres de masse, classés en fonction de la technique d'ionisation et de détection du signal (Leblanc, B., [en ligne]). Dans le cas de l'identification des protéines, c'est la SM couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) et un analyseur à temps de vol (TOF, *time-of-flight mass spectrometry*), qui est généralement utilisée. Après digestion de la protéine par de la trypsine, l'échantillon contient des peptides dits « tryptiques » qui sont isolés les uns des autres et immobilisés sur une matrice. Ces peptides sont excités par une lumière laser, ce qui d'une part, provoque leur désorption et, d'autre part, leur ionisation. Les peptides ionisés sont ensuite propulsés vers une électrode de charge opposée puis, vers le détecteur. Le signal ainsi détecté est transformé en spectre de masse représentant l'abondance relative des peptides ionisés détectés, en fonction de leurs rapports m/z .

3.1.5. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie par résonance magnétique (RMN) est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{129}Xe ...). Lorsque ces noyaux sont soumis à un rayonnement électromagnétique, ils peuvent absorber l'énergie du rayonnement puis la relâcher lors de la relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Le phénomène RMN est utilisé en imagerie médicale sous le nom (IRM) mais aussi en biologie structurale pour établir, entre autres, la structure des protéines (Mispelter J., 2007, [en ligne]).

3.1.6. La cristallographie aux rayons X

Cette technique est basée sur la capacité des ions, atomes ou molécules à cristalliser et à diffracter des rayons X. Lorsque le cristal à étudier est irradié par un fin faisceau de rayons X, chacun des atomes du cristal diffuse une onde de faible amplitude qui se propage dans toutes les directions. Les ondes issues des atomes interfèrent et donnent lieu à de la diffraction, faisant apparaître sur le détecteur des taches correspondant à la densité électronique. Cette densité permet de localiser chaque atome et ensuite de reconstituer la structure d'une molécule (**figure 31**) (Kneller G., [en ligne]).

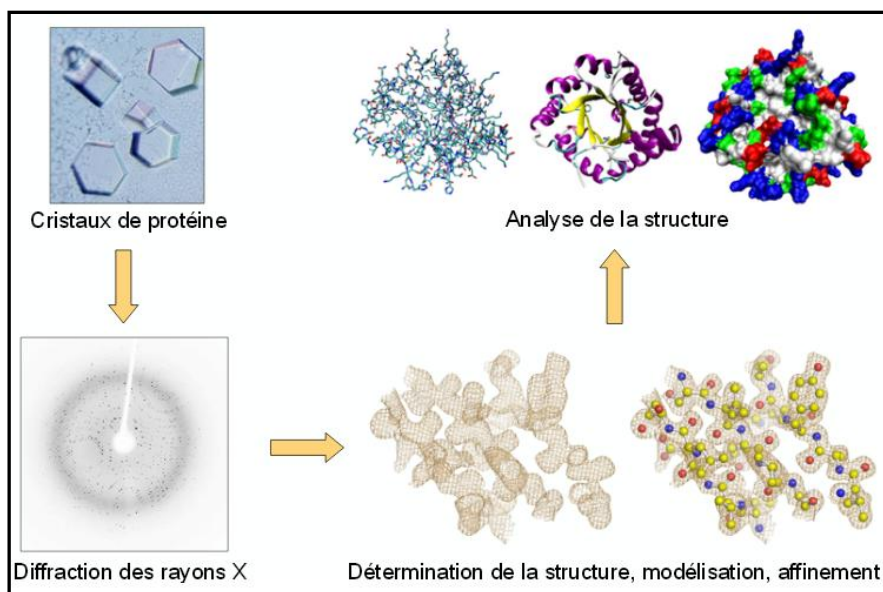


Figure 31. Principe de la détermination de la structure d'une protéine par cristallographie aux rayons X.

(Kneller G., [en ligne])

3.2. Méthodes quantitatives

La quantification directe ou indirecte de la PtR purifiée, est effectuée par spectrométrie d'absorption UV. Soit l'absorbance de la PtR à 280 nm est directement mesurée par un spectrophotomètre et sa quantité est calculée en tenant compte du coefficient d'extinction molaire. Soit la PtR est dosée par des méthodes colorimétriques basées sur l'interaction de certains acides aminés avec un colorant (méthode de Bradford) ou avec des ions cuivreux $\pm$ des réactifs aromatiques (méthode du Biuret, de Lowry, du BCA : acide bicinchoninique) (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne] ; Gräslund et al., 2008). Pour ces dosages, on mesure l'absorbance de chaque point d'une gamme de quantités connues de protéines (albumine, immunoglobulines...) et on établit une droite dont l'équation servira à calculer la quantité (puis la concentration) de la PtR.

4. Conservation de la protéine recombinante

Les conditions de conservation dépendent fortement de la nature même de la PtR mais aussi de la durée de conservation voulue. En général, il faut éviter des conditions proches des limites de stabilité de la Pt (pH extrêmes, tampons peu adaptés...) ainsi que l'ajout de composés susceptibles d'interférer par la suite (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]).

Pour une durée inférieure à 24h, la PtR peut être conservée à 4°C. Au-delà et pour certaines Pt, il est nécessaire de filtrer la solution en condition stérile ou d'y ajouter un agent bactériostatique (*European Molecular Biology Laboratory*, [en ligne]).

Pour une durée de quelques semaines, il est nécessaire de congeler la solution dans de l'azote liquide après y avoir éventuellement ajouté des agents stabilisants comme le glycérol ou de la sérum-albumine bovine. Il est également conseillé de répartir cette solution en petits aliquotes pour éviter les cycles successifs de congélation-décongélation susceptibles d'altérer la structure de la Pt et de réduire son activité (Gräslund et al., 2008).

Pour des périodes excédant plusieurs mois, les Pt sont conservées à -20°C, à -80°C ou dans de l'azote liquide. Bien que ce ne soit pas obligatoire, il est fortement recommandé de rajouter des agents stabilisants. La lyophilisation est une alternative à ces méthodes de conservation ; elle permet non seulement de concentrer la Pt, mais aussi de la conserver à 4°C pendant plusieurs mois (Gräslund et al., 2008).

Lorsqu'elle est à usage thérapeutique, la PtR subira d'autres tests (activité, apyrogénécité, stabilité...) avant d'être mise dans une forme galénique adéquate. L'aspect galénique ne sera volontairement pas abordé dans ce mémoire.

5. Synthèse sur la purification et la caractérisation des protéines recombinantes

Après avoir été exprimée par des bactéries *E. coli*, la PtR doit être séparée des Pt endogènes de l'hôte. Cette purification s'effectue le plus souvent par chromatographie, en mettant à profit l'affinité sélective du partenaire de fusion (*tag*) pour un ligand immobilisé sur une matrice. Dans le cas des PtRIT, le *tag* doit ensuite être clivé pour limiter les éventuelles modifications d'activité des Pt. De plus, les endotoxines bactériennes (pyrogènes) doivent être éliminées des préparations car celles-ci sont généralement destinées à l'usage parentéral. Enfin, les PtR sont caractérisées par diverses méthodes biochimiques et biophysiques, puis quantifiées avant d'être mises dans une forme galénique convenable et conservées de la manière la plus adaptée.

Conclusion sur les stratégies de production des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique

En 2011, parmi les 211 bio-médicaments autorisés par l'Agence Européenne du Médicament et par la Food and Drug Administration (agence sanitaire américaine), 91 (43%) ont été produits dans des cellules de mammifères, 66 (31%) dans des bactéries *E. coli*, 31 (15%) dans des levures et le reste, dans divers hôtes (hybridomes, cellules d'insectes, plantes, animaux transgéniques) (Berlec and Štrukelj, 2013).

Les cellules de mammifères sont les hôtes les plus compliqués et les plus chers à utiliser, mais elles permettent d'exprimer des protéines ayant des modifications post-traductionnelles. Il en est de même pour les levures même si celles-ci ne permettent pas toujours des glycosylations optimales (Berlec and Štrukelj, 2013). Les bactéries *E. coli* quant à elles, sont les plus simples à utiliser en raison de leur faible coût d'utilisation et de leur génétique bien documentée. Néanmoins, elles présentent quelques inconvénients pour l'expression de protéines eucaryotes. En effet, certains codons qu'elles utilisent sont différents de ceux des cellules eucaryotes, ce qui peut affecter la qualité de la traduction. De plus, la PtR produite peut précipiter dans des corps d'inclusion, ce qui complexifie le processus car cela nécessite une étape supplémentaire de solubilisation. En outre, *E. coli* est incapable d'effectuer des modifications post-traductionnelles, ce qui limite son usage à l'expression de PtR simples (hormones, cytokines, facteurs de croissance, etc) (Berlec and Štrukelj, 2013 ; Ferrer-Miralles et al., 2009).

Plusieurs astuces ont été développées pour contrecarrer les principaux inconvénients de la production de PtRIT dans *E. coli* et garantir un haut niveau d'expression, de solubilité et de stabilité des protéines. Ces astuces permettent d'optimiser le transgène (minimisation du nombre de codons, ajout de partenaires de fusion...), le plasmide (origine de réplication, promoteur...), la souche (mutations diverses...) et les conditions de culture (composition du milieu, température...) (Berlec and Štrukelj, 2013). Ainsi, malgré les limites apparentes du système bactérien, 75% des Pt humaines et 90% des Pt répertoriées dans la base de données internationale PDB, ont été produites dans *E. coli* (Costa et al., 2014).

Le présent chapitre a permis de présenter l'ensemble des outils nécessaires à la conception, l'expression, la purification et la caractérisation des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique. Il a constitué une base de travail pour créer et produire une forme tronquée de la galectine 3, dont les propriétés paraissent intéressantes pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose.

Chapitre 2

Physiopathologie de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde

Section 1 - Rappels anatomiques d'une articulation synoviale

Une articulation synoviale est composée de plusieurs éléments interdépendants dont le cartilage, l'os sous-chondral, la membrane synoviale, la capsule articulaire, les ligaments et les tendons (**figure 32**).

Le cartilage est avasculaire et non innervé, rigide mais déformable. Il contient un seul type cellulaire (chondrocytes) et une volumineuse matrice extracellulaire composée de protéines (collagène de type II, majoritairement), de glycoprotéines de structure, de protéoglycanes (agrécanes...), ainsi que des enzymes de dégradation matricielle (métalloprotéases matricielles : MMP-1, 2, 3, 9, 13..., et agrécanases : ADAMTS-4, 5...)

L'os sous-chondral est la surface osseuse située directement sous le cartilage articulaire. Il est composé de cellules responsables de la synthèse de la matrice osseuse et de sa minéralisation (ostéoblastes et ostéocytes), ainsi que de cellules responsables de la résorption de cette matrice (ostéoclastes).

La membrane synoviale est située tout autour de l'articulation et tapisse la capsule articulaire. Elle contient des macrophages et des fibroblastes (synoviocytes de type A et B, respectivement), cellules impliquées dans la nutrition et la mobilité de l'articulation, ainsi que dans la réponse immuno-inflammatoire locale.

Les ligaments et les tendons quant à eux, sont des structures fibreuses assurant la cohésion et le maintien ainsi que la mobilité de l'articulation. Les premiers servent à relier les os entre eux et les seconds, permettent aux muscles de s'insérer sur les os.

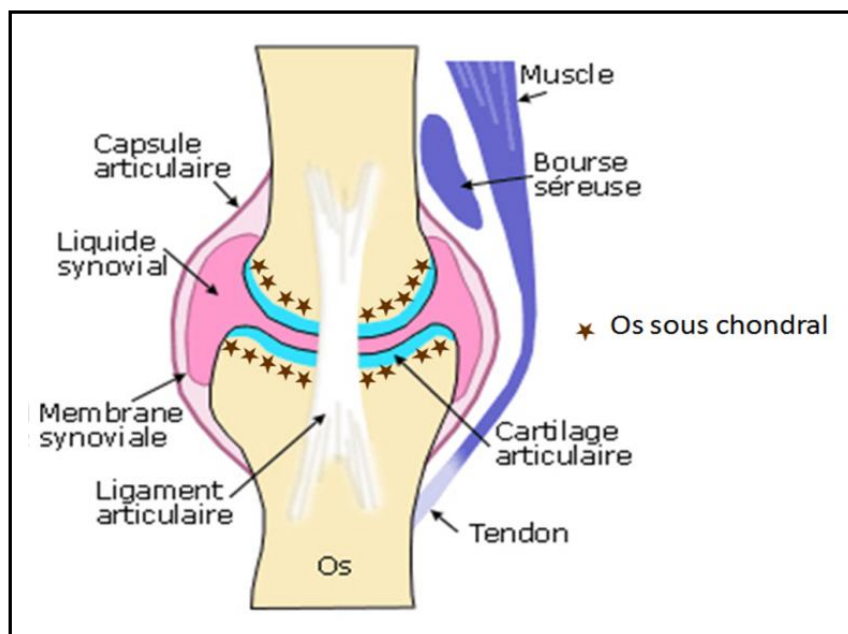


Figure 32. Structure d'une articulation synoviale.

(Sport enseignement APSA, [en ligne])

Section 2 - La polyarthrite rhumatoïde

1. Epidémiologie de la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PAR) est un rhumatisme inflammatoire chronique d'origine auto-immune. En France, la prévalence de la PAR est estimée à 0,25 à 0,50 % et elle peut affecter hommes et femmes de tout âge. Toutefois, cette maladie survient plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes (ratio : 4 pour 1), et particulièrement en période péri-ménopausique (40-60 ans) (Société Française de Rhumatologie, [en ligne]).

Il s'agit d'une pathologie due à la combinaison de plusieurs facteurs :

- psychologiques : survenue suite à un traumatisme émotionnel dans 20-30 % des cas
- hormonaux : survenue prédominante chez les femmes, en péri-ménopause ; rémission quasi constante pendant la grossesse ; poussée au décours de l'accouchement.
- environnementaux : dans certaines zones ou pays, la PAR est plus ou moins fréquente (cependant, aucune preuve scientifique n'a permis d'identifier ces facteurs)
- de prédisposition génétique : implication des molécules du CMH (HLA DR1 et HLA DR4) et de polymorphismes affectant des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et/ou inflammatoire.

2. Signes cliniques de la polyarthrite rhumatoïde

Du point de vue clinique, la PAR se manifeste par des douleurs inflammatoires (intenses, permanentes, nocturnes, indépendantes des mouvements et des changements de position), une raideur articulaire et un épanchement au niveau des articulations bilatérales (poignets, mains, chevilles, pieds...). En absence de traitement, des lésions ostéo-articulaires irréversibles (dégradation du cartilage, érosion osseuse, déformations articulaires, ruptures tendineuses) (**figure 33**) et des atteintes extra-articulaires (sclérite, péricardite, pleurésie, amyloïdose) peuvent survenir.



Figure 33. Différents degrés de déformation de la main dans la PAR.

(NIH Senior Health, [en ligne])

3. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

3.1. Généralités

De nombreuses données épidémiologiques, cliniques et génétiques, suggèrent que la pathogenèse de la PAR peut être divisée en trois phases (Holmdahl et al., 2014) (**figure 34**). La première, biologiquement active mais cliniquement silencieuse, est caractérisée par la production d'auto-anticorps (anti-peptides citrulinés : anti-CCP) suite à une réaction auto-immune contre un antigène inconnu, chez les individus sains mais génétiquement prédisposés. Les anticorps anti-CCP apparaissent dix ans avant les symptômes de la maladie, ce qui explique leur valeur diagnostique et prédictive. La deuxième phase (arthrite subclinique) est caractérisée par une infiltration leucocytaire, l'hyperplasie (pannus) (**figure 35**) et l'inflammation de la synoviale (synovite). Enfin, la troisième phase concerne la chronicisation de l'arthrite et se traduit par la persistance du pannus, l'activation continue des cellules immunitaires, la sécrétion de médiateurs solubles pro-inflammatoires (MSP) dont la Gal-3 (Ohshima et al., 2003), et la dégradation des structures articulaires.

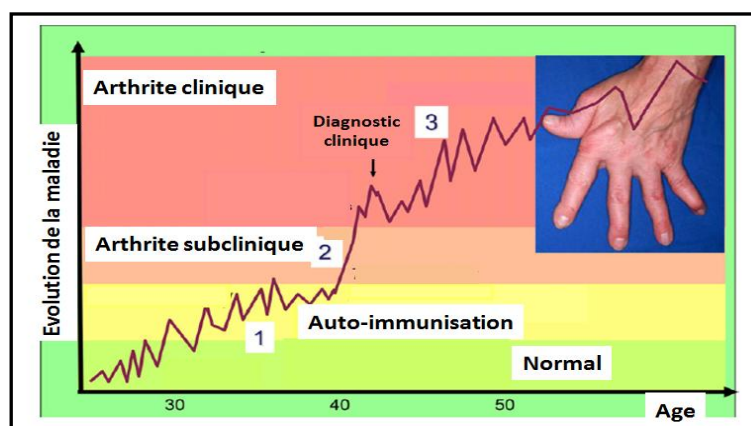


Figure 34. Etapes de la pathogenèse de la PAR.

(Adapté de Holmdahl et al., 2014)

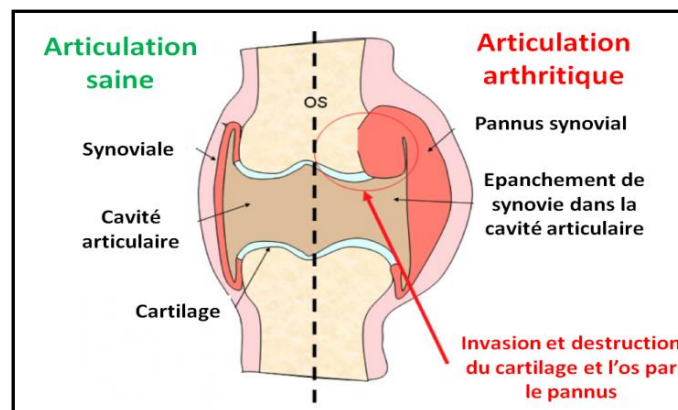


Figure 35. Localisation du pannus synovial.

(Carenity, [en ligne])

3.2. L'arthrite subclinique

Lors du déclenchement de l'arthrite, la synoviale est peu à peu infiltrée par des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes B, des plasmocytes et des macrophages (Agarwal, 2011; Lee and Weinblatt, 2001), ce qui aboutit à la formation du pannus et à l'inflammation synoviale (synovite). Ainsi, les polynucléaires neutrophiles (PN) produisent des espèces réactives de l'oxygène et autres métabolites impliqués dans l'inflammation (acide arachidonique...). Les plasmocytes sécrètent des auto-anticorps caractéristiques de la maladie. Les macrophages et les lymphocytes T CD4+ activent les lymphocytes B qui eux-mêmes activent les T CD4+ en retour. De plus, les lymphocytes B, tout comme les macrophages et les PN, sécrètent de nombreuses chémokines et cytokines pro-inflammatoires capables d'entretenir l'infiltration leucocytaire et l'activation cellulaire et, par conséquent, le pannus et la synovite (García-Hernández et al., 2014) (**figure 36**).

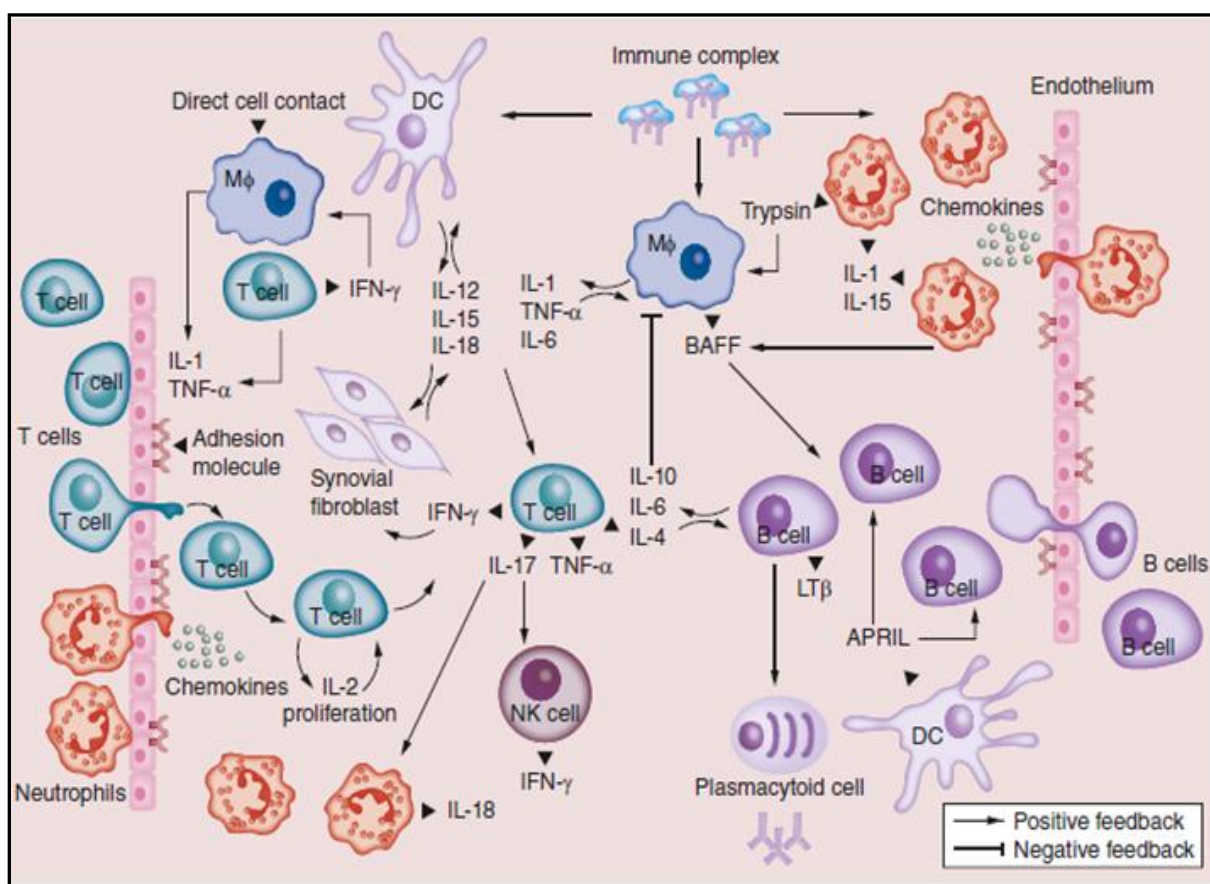


Figure 36. Rôle des cytokines pro-inflammatoires la physiopathologie de la PAR.

Au début de la maladie, la synoviale est peu à peu infiltrée par diverses lignée de leucocytes, ce qui aboutit à l'hyperplasie et à l'inflammation de la synoviale. Celle-ci concourt à l'activation des leucocytes infiltrés qui sécrètent par la suite des chémokines et cytokines pro-inflammatoires responsables de l'entretien de l'inflammation et du pannus synovial. **APRIL** : A Proliferation-Inducing Ligand (ligand du TNF). **BAFF** : B-cell Activating Factor (facteur d'activation des lymphocytes B). **Ltβ** : lymphotoxine β. **DC** : cellules dendritiques. **MΦ** : macrophages. **IL** : interleukine. **IFN** : interféron. **TNF-α** : Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale).

(García-Hernández et al., 2014)

3.3. L'arthrite clinique

Au cours de l'évolution de la maladie, le pannus persistant est responsable de la dégradation des structures articulaires (Lee and Weinblatt, 2001), principalement le cartilage et l'os (**figure 37**). La destruction du cartilage résulte l'action de MSP et de la prolifération des synoviocytes (García-Hernández et al., 2014). Les MSP (Gal-3, TNF- α , IL-1, IL-17...) induisent un changement du phénotype chondrocytaire, de l'état anabolique, caractérisé par la synthèse des composants matriciels, vers l'état catabolique, caractérisé par la production d'agrécánases et de MMP (Lee and Weinblatt, 2001). En parallèle, les synoviocytes finissent par envahir le cartilage (Neidhart et al., 2005) jusqu'à atteindre l'os. De plus, ces mêmes synoviocytes surexpriment de la Gal-3 (Neidhart et al., 2005) et sécrètent des Ck (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17) capables d'activer les ostéoclastes et donc la résorption osseuse (Agarwal, 2011; García-Hernández et al., 2014). Les débris tissulaires résultant de tous ces phénomènes de dégradation activent en retour la production de MSP, ce qui entretient la boucle de l'inflammation articulaire. Certains de ces MSP (TNF- α , IL-1, IL-6) sont des cibles des biothérapies actuelles (García-Hernández et al., 2014).

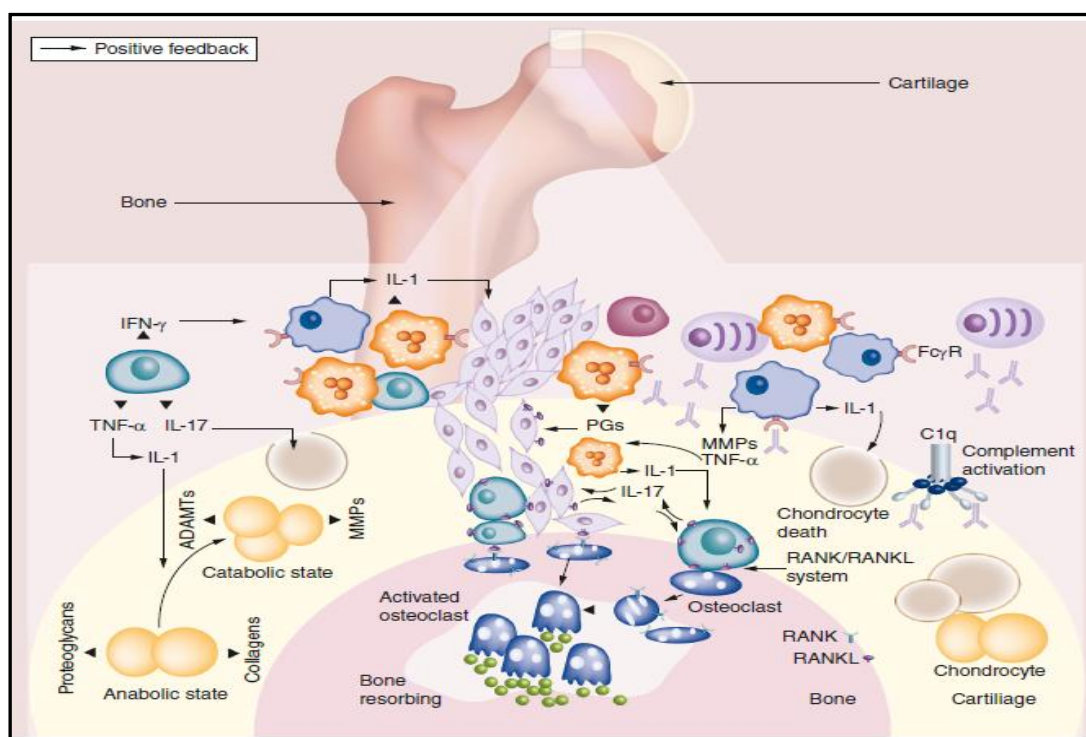


Figure 37. Rôle des cytokines pro-inflammatoires et des métalloprotéases matricielles dans la dégradation du cartilage et l'érosion osseuse au cours de la physiopathologie de la PAR.

La dégradation du cartilage résulte de nombreux phénomènes : l'évolution du phénotype chondrocytaire anabolique vers le phénotype catabolique, l'invasion du cartilage par le pannus, l'activation du complément par des complexes immuns, l'apoptose des chondrocytes, etc. La résorption osseuse résulte de la sécrétion de certaines cytokines et de l'activation du système RANK-RANKL. **RANK** : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B (activateur du récepteur de NFkB). **RANKL** : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand (ligand de l'activateur du récepteur de NFkB). **PGs** : prostaglandines. **MMPs** : métalloprotéases matricielles. **ADAMTS** : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (agrécánases). **IL** : interleukine. **IFN** : interféron. **TNF- α** : Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale).

(García-Hernández et al., 2014)

4. Prise en charge médicamenteuse de la polyarthrite rhumatoïde

4.1. Généralités

4.1.1. Recommandations de la Haute Autorité de Santé

Jusqu'en 2011, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommandait, en première intention, d'associer un traitement symptomatique antalgique ou anti-inflammatoire, à un traitement de fond comprenant du méthotrexate (MTX) (ou en cas de contre-indication, du léflunomide ou de la sulfasalazine), seul ou associé à des biothérapies ciblant le TNF- α (adalimumab, étanercept ou infliximab). En deuxième intention, la HAS préconisait d'adjoindre un traitement local (injections intra-articulaires de corticoïdes, synoviorthèses) au traitement de fond. Celui-ci pouvait être une bithérapie par méthotrexate + anti-TNF- α ou + tocilizumab (anti récepteurs de l'IL-6), ou une monothérapie par rituximab ou abatacept, des biothérapies ciblant les lymphocytes B ou T, respectivement. En dernier recours, la HAS recommandait d'utiliser des immunosuppresseurs tels que la ciclosporine ou l'azathioprine.

Compte tenu de la mise sur le marché de nouvelles thérapies, la HAS a lancé, en début 2014, un programme de travail pour l'actualisation de ses recommandations. L'aboutissement de ce travail est prévu au deuxième trimestre de l'année 2015 (Haute Autorité de Santé, [en ligne]).

4.1.2. Recommandations de l'*European League Against Rheumatism*

En juillet 2014, l'*European League Against Rheumatism* (EULAR) a publié ses nouvelles recommandations pour le traitement de la PAR (Smolen et al., 2014). Selon l'EULAR, il n'y a plus lieu de hiérarchiser l'usage des biothérapies. Ainsi, les anti-TNF- α , le tocilizumab, l'abatacept et le rituximab sont désormais placés au même niveau dans la stratégie thérapeutique. De plus, l'EULAR recommande une corticothérapie à faible dose dès le début du traitement, ce qui concourt au retardement de l'altération de l'articulation. Enfin, l'EULAR maintient sa position, publiée en 2010, quant à l'éviction de l'azathioprine et de la ciclosporine de la stratégie de traitement de la PAR (Kissin, 2014).

La **figure 38** illustre la nouvelle stratégie thérapeutique publiée par l'EULAR : en première intention, il faudrait utiliser le MTX (ou en cas de contre-indication, le léflunomide et/ou la sulfasalazine), en association avec une corticothérapie à faible dose. En cas d'échec, l'EULAR recommande d'ajouter une biothérapie (anti-TNF- α , tocilizumab, abatacept ou rituximab) à la précédente association. En cas d'énième échec, l'EULAR préconise de remplacer la biothérapie préalablement utilisée par une autre, voire de recourir au tofacitinib (nouvelle biothérapie, inhibitrice de la voie de signalisation JAK) (Smolen et al., 2014).

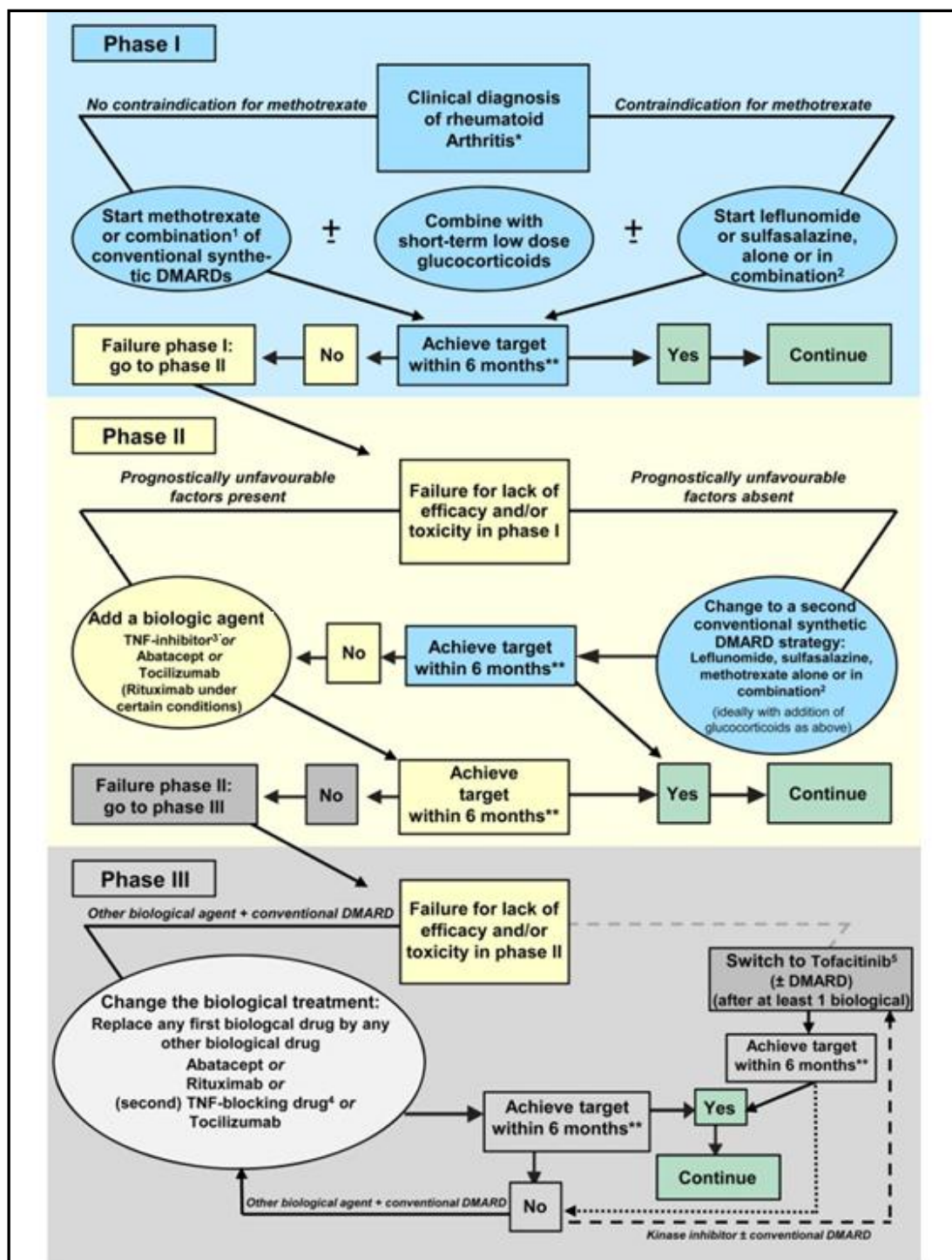


Figure 38. Stratégie thérapeutique de la prise en charge de la PAR (proposée par l'EULAR).

* selon les critères de l'American College of Rheumatology (ACR) et de l'EULAR. ** L'objectif du traitement est la rémission clinique (selon la définition de l'ACR et de l'EULAR) ou, au moins une diminution de l'activité de la maladie. Cet objectif doit être atteint en 6 mois, mais si aucune amélioration n'est observée au bout de 3 mois, le traitement doit être adapté ou changé. **DMARDs** : Disease-Modifying Antirheumatic Drug (agents antirhumatismaux modificateurs de la maladie : traitements de fond).

¹L'association la plus fréquente comprend le méthotrexate, la sulfasalazine et l'hydroxychloroquine. ²L'association du léflunomide et de la sulfasalazine (sauf avec le MTX), n'a pas été bien étudiée. ³L'anti-TNF- α utilisé peut être l'adalimumab, le certolizumab pégo, l'étanercept, le golimumab ou l'infliximab. ⁴Le tofacitinib n'est pas autorisé dans tous les pays.

Traits pleins noirs : options recommandées. **Trait discontinu gris** : option recommandée après échec des biothérapies (idéalement deux). **Trait discontinu noir** : option recommandée après échec de deux biothérapies, mais l'efficacité et la sécurité d'emploi après l'échec de l'abatacept, du rituximab ou du tocilizumab n'est pas suffisamment étudiée. **Pointillés noirs** : option recommandée, mais l'efficacité et la tolérance des biothérapies utilisées après le tofacitinib n'ont pas été étudiées.

(Smolen et al., 2014)

4.2. Biothérapies indiquées dans la polyarthrite rhumatoïde

Les biothérapies autorisées en France pour le traitement de la PAR ciblent des cytokines ou leurs récepteurs : TNF- α (étanercept, infliximab, adalimumab, golimumab, certozilumab pégol), IL-1 (anakinra), IL-6 (tocilizumab), mais aussi les lymphocytes B (rituximab) ou T (abatacept) (**figure 39**).

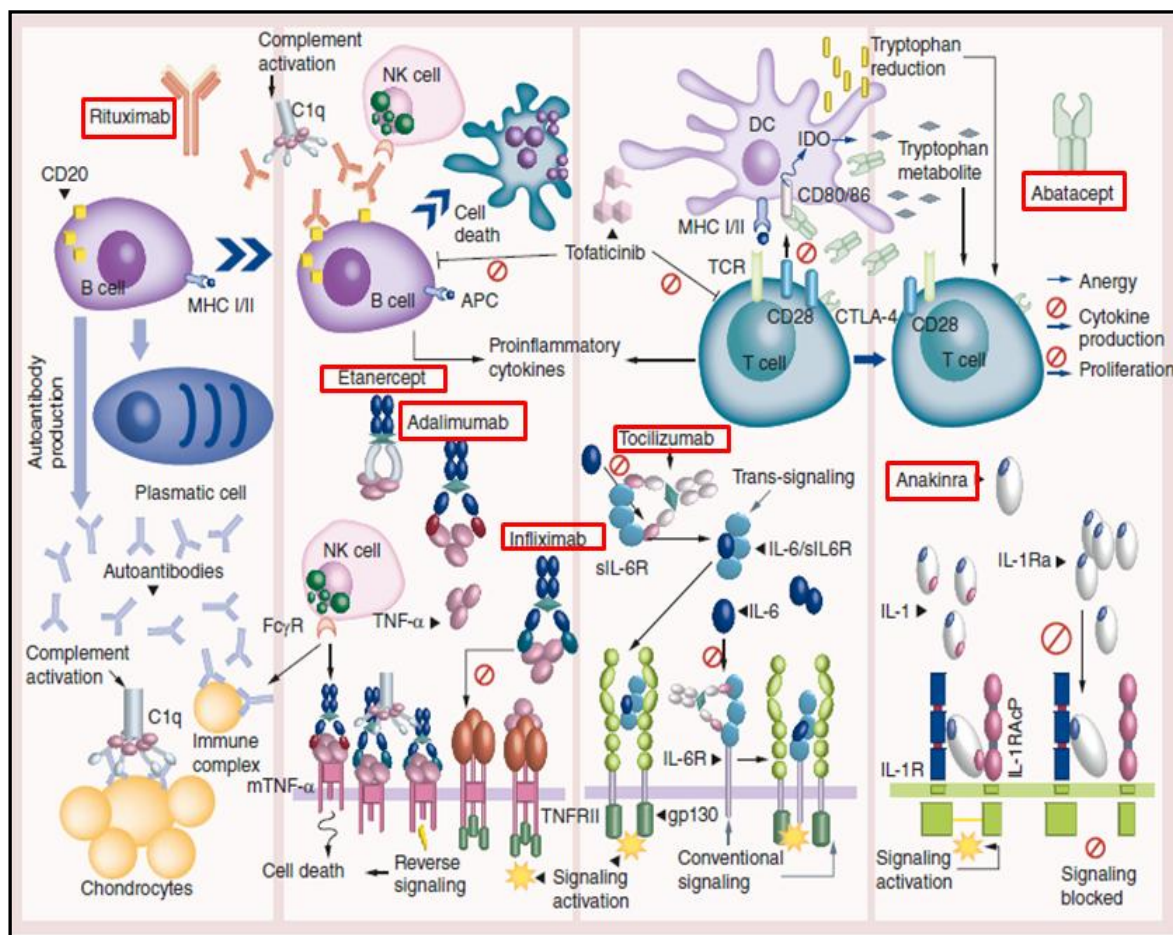


Figure 39. Mécanisme d'action des principales biothérapies indiquées dans la PAR.

Le **rituximab** cible les lymphocytes B CD20+ et provoque leur lyse par le mécanisme de cytotoxicité dépendante de l'anticorps. Les **anti-TNF** (étanercept, infliximab, adalimumab) neutralisent le TNF- α ou ses récepteurs, induisent la lyse cellulaire (via le système complément ou le mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps) et l'apoptose. Le **tocilizumab** est un antagoniste des récepteurs solubles et membranaires de l'IL-6. L'**anakinra** est un analogue de l'antagoniste endogène du récepteur de l'IL-1 (IL-1 Ra) : il empêche la liaison de l'IL-1 à son récepteur. L'**abatacept** est un analogue du CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*), protéine transmembranaire associée aux lymphocytes T et qui régule leur activation par sa liaison au CD80/CD86 des cellules présentatrices d'antigènes. **TNF- α** : *Tumor Necrosis Factor* (facteur de nécrose tumorale). **IL** : interleukine. **R** : récepteur. **m** : membranaire. **s** : soluble. **MHC** : complexe majeur d'histocompatibilité. **TCR** : récepteur des lymphocytes T. **CD** : cluster de différenciation (marqueurs phénotypiques).

(García-Hernández et al., 2014)

4.2.1. Biothérapies ciblant des cytokines ou leurs récepteurs

Les inhibiteurs du TNF- α améliorent la physiopathologie de la PAR par la neutralisation directe de la cytokine soit par l'action d'anticorps monoclonaux (adalimumab, infliximab, certozilumab, golimumab), soit par mimétisme de son récepteur soluble (étanercept : protéine de fusion, analogue du récepteur soluble du TNF- α). Grâce leur fragment Fc d'immunoglobuline G1 (IgG1), ces composés permettent la lyse cellulaire médiée par le système complément ainsi que le mécanisme ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps) (García-Hernández et al., 2014). De nombreux essais cliniques ont démontré que les inhibiteurs du TNF- α ont une meilleure efficacité lorsqu'ils sont associés au méthotrexate (Agarwal, 2011), car il prévient des immunisations secondaires.

L'anakinra est un antagoniste recombinant du récepteur de l'IL-1 : il inhibe la liaison de l'IL-1 à son récepteur, ce qui aboutit à la réduction de la production intra-articulaire d'IL-6 et de MMP. L'anakinra protège donc contre la dégradation du cartilage et l'érosion osseuse. Néanmoins, en raison de sa demi-vie courte (4-6 h), des administrations répétées à fortes doses sont nécessaires pour maintenir une efficacité clinique suffisante. Cette molécule est par conséquent, rarement utilisée pour traiter la PAR ; en revanche, elle a démontré son efficacité dans le traitement de l'arthrite juvénile et d'autres maladies inflammatoires auto-immunes (García-Hernández et al., 2014 ; Vivar and Van Vollenhoven, 2014).

Le tocilizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre les récepteurs de l'IL-6 (Agarwal, 2011 ; Vivar and Van Vollenhoven, 2014). Cette neutralisation empêche l'IL-6 de se fixer à ses récepteurs : la cytokine ne peut donc plus exercer ses effets pro-inflammatoires et pro-cataboliques (activation des lymphocytes T et B, différenciation terminale des B en plasmocytes, sécrétion d'auto-anticorps, activation des ostéoclastes, etc).

4.2.2. Biothérapies ciblant les lymphocytes T ou B

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le marqueur CD20 des lymphocytes B. Son mécanisme d'action n'a pas été clairement identifié, mais il impliquerait le mécanisme ADCC, la lyse cellulaire médiée par le système du complément et/ou l'apoptose des lymphocytes B CD20+ (Agarwal, 2011 ; García-Hernández et al., 2014). Ces cellules étant moins nombreuses, la production de Ck pro-inflammatoires ainsi que l'activation des lymphocytes T sont réprimées (Vivar and Van Vollenhoven, 2014).

L'abatacept est une protéine de fusion analogue du CTLA-4 (protéine membranaire des lymphocytes T régulant leur activation) (Agarwal, 2011). Cette molécule se lie aux marqueurs CD80/CD86 des cellules présentatrices d'antigènes et les empêche d'interagir avec le CD28 des lymphocytes T, ce qui bloque leur activation et donc la production de Ck pro-inflammatoires (García-Hernández et al., 2014 ; Vivar and Van Vollenhoven, 2014).

Le **tableau XV** récapitule quelques caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des principales biothérapies indiquées dans le traitement de la PAR.

DCI	Nature	Mécanisme d'action	Demi-vie	Fréquence d'administration	Voie d'administration
Adalimumab (Humira®)	Acm humain	Neutralisation du TNF- α Lyse cellulaire (complément) Cytotoxicité (ADCC)	13 jours	Tous les 14 jours	Sous-cutanée
Infliximab (Rémicade®)	Acm chimérique	Neutralisation du TNF- α Lyse cellulaire (complément) Cytotoxicité (ADCC)	9 jours	Toutes les 4 à 8 semaines	Intraveineuse
Certolizumab (Cimzia®)	Fab humanisé	Neutralisation du TNF- α	14 jours	Tous les 14 jours	Sous-cutanée
Golimumab (Simponi®)	Acm humain	Neutralisation du TNF- α Lyse cellulaire (complément) Cytotoxicité (ADCC)	13 jours	Tous les 28 jours	Sous-cutanée
				J0, J28 puis toutes les 8 semaines	Intraveineuse
Etanercept (Enbrel®)	PtT de fusion (Fc d'IgG1 + sTNFR)	Liaison au TNF- α soluble par mimétisme avec son récepteur soluble (stratégie de leurre) Lyse cellulaire (complément) Cytotoxicité (ADCC)	3 - 6 jours	1 à 2 fois / semaine	Sous-cutanée
Anakinra (Kinéret®)	PtT (analogue IL-1Ra)	Inhibition de la liaison de l'IL-1 à son récepteur	4 - 6 heures	1 fois / jour	Sous-cutanée
Tocilizumab (Roactemra®)	Acm humanisé	Neutralisation de l'IL-6	10 - 13 jours	Tous les 28 jours	Intraveineuse
Rituximab (Mabthéra®)	Acm chimérique	Neutralisation du CD20 des lymphocytes B Lyse cellulaire (complément) ? Cytotoxicité (ADCC) ?	18 jours	J0, J14 puis au moins tous les 6 mois en fonction de l'évolution de la PR	Intraveineuse
Abatacept (Orencia®)	PtT de fusion (Fc d'IgG1 + CTLA-4)	Liaison aux CD80 et CD86 des CPA donc inhibition leur liaison avec le CD28 des LyT : blocage de l'activation des LyT	13 jours	Tous les 28 jours	Intraveineuse
				1 fois / semaine	Sous-cutanée

Tableau XV. Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des biothérapies indiquées dans la PAR.

Acm : anticorps monoclonal. **Fab** : fragment Fab d'immunoglobuline. **Fc d'IgG1** : fragment Fc d'immunoglobuline G1. **sTNFR** : soluble Tumor Necrosis Factor Receptor (récepteur soluble du TNF- α). **PtT** : protéine thérapeutique. **IL-1Ra** : antagoniste du récepteur de l'IL-1. **CTLA-4** : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 (protéine transmembranaire associée aux lymphocytes T et qui régule leur activation par sa liaison au CD80/CD86 des cellules présentatrices d'antigènes). **CPA** : cellules présentatrices d'antigènes. **LyT** : lymphocytes T.

(Lee and Weinblatt, 2001; Vivar and Van Vollenhoven, 2014)

4.2.3. Inconvénients des biothérapies indiquées dans la polyarthrite rhumatoïde

Les biothérapies indiquées dans la polyarthrite rhumatoïde sont efficaces chez un grand nombre de patients, mais elles présentent quelques inconvénients.

D'une part, ce ne sont que des traitements suspensifs qui doivent donc être administrés à vie ; or leur administration se fait par voie parentérale à des fréquences plus ou moins élevées (à l'échelle d'une vie) ce qui, à la longue, peut être une contrainte pour le patient. Il serait donc intéressant de pouvoir allonger les demi-vies de ces molécules afin de permettre d'espacer leur administration (de les réduire à 2 ou 3 injections / an par exemple).

D'autre part, les biothérapies exposent à des risques infectieux (tuberculose, zona, septicémies...) voire carcinogènes (Agarwal, 2011; Vivar and Van Vollenhoven, 2014), ce qui impose une surveillance clinique rapprochée.

Par ailleurs, certains patients peuvent ne pas du tout répondre à ces traitements d'emblée, ou ne plus du tout y répondre au bout d'un certain temps, à cause notamment de la production d'anticorps neutralisants (Agarwal, 2011; García-Hernández et al., 2014). Ce phénomène est particulièrement vrai pour les inhibiteurs du TNF- α , ce qui peut conduire à faire une rotation des biothérapies ou à utiliser d'anciennes molécules chimiques (sels d'or, etc.). Ces arguments justifient la nécessité de poursuivre la recherche de nouvelles cibles en vue d'agrandir l'arsenal thérapeutique, d'autant qu'il est probable que les patients ne répondant pas (ou plus) à une biothérapie pourraient mieux répondre à une autre. Récemment, une nouvelle biothérapie, le tofacitinib (inhibiteur de la voie de signalisation JAK), a été autorisée par la FDA (*Food and Drugs Administration*) mais pas par l'Agence Européenne du Médicament. D'autres molécules ciblant l'IL-15, l'IL-17 et l'IL-20 font actuellement l'objet d'essais cliniques (Vivar and Van Vollenhoven, 2014). Enfin, d'autres cibles potentielles comme la Gal-3 (Li et al., 2011) ou les acteurs des voies de signalisation impliquées dans la PAR (Vivar and Van Vollenhoven, 2014) n'ont pas encore fait l'objet d'études cliniques, mais les résultats de certaines études précliniques sont encourageants.

Section 3 - L'arthrose

1. Epidémiologie de l'arthrose

L'arthrose (OA) est une maladie dégénérative du cartilage pouvant affecter diverses articulations (**figure 40**), principalement le rachis cervico-lombaire, les mains, la hanche (coxarthrose), le genou (gonarthrose) et les pieds. L'épaule, le coude, le poignet, la cheville sont plus rarement atteints (Société Française de Rhumatologie, [en ligne]).

L'arthrose rachidienne est la plus fréquente (70-75%), mais elle est aussi le plus souvent silencieuse. L'arthrose digitale est la seconde localisation la plus fréquente (60%) ; elle se caractérise par des douleurs intermittentes et par des déformations irréversibles. La coxarthrose et la gonarthrose sont moins fréquentes (10% et 30%, respectivement), mais ce sont les plus invalidantes (Société Française de Rhumatologie, [en ligne]).

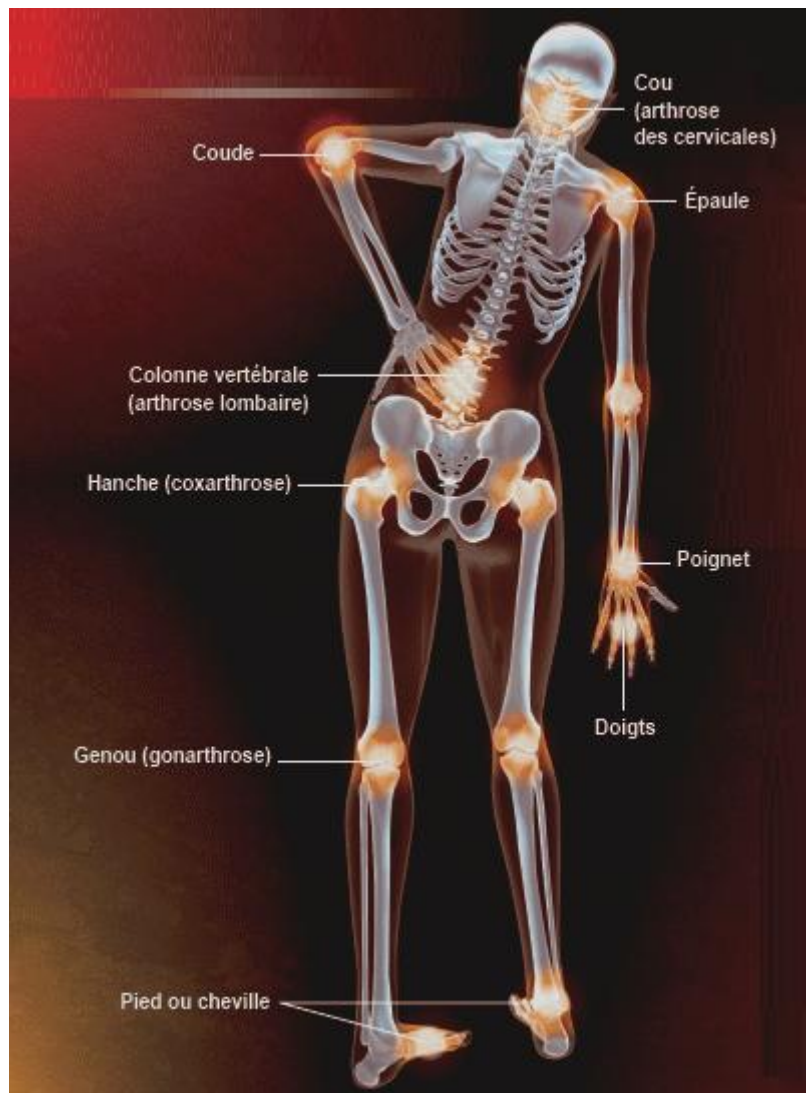


Figure 40. Principales localisations de l'OA.

(Haute Autorité de la Santé, [en ligne])

Les facteurs de risque de l'OA sont nombreux (Société Française de Rhumatologie, [en ligne] ; (Haq et al., 2003)) :

- l'âge : la prévalence de cette maladie augmente avec l'âge (**tableau XVI**)
- le sexe : l'OA digitale et la gonarthrose sont plus fréquentes chez les femmes.
- les hormones : la fréquence de l'OA augmente après la ménopause.
- l'hérédité : des facteurs génétiques ont été établis pour l'OA de la main et la gonarthrose
- les anomalies architecturales congénitales (dysplasies, subluxations)
- les traumatismes : fractures, luxations, ménisectomies...
- les activités professionnelles impliquant la manutention de charges lourdes, la flexion répétée des genoux, etc.
- les activités sportives exercées de manière brutale et/ou abusive
- l'obésité : son rôle est indéniable dans la gonarthrose mais aussi dans l'OA digitale.

Age de la population générale	Prévalence des sujets arthrosiques (toutes localisations confondues)
< 45 ans	3%
> 65 ans	65%
> 80 ans	80%

Tableau XVI. Prévalence de l'OA en fonction de la tranche d'âge.

(Société Française de Rhumatologie, [en ligne])

2. Signes cliniques de l'arthrose

En fonction de sa localisation et de son évolution, l'arthrose peut ne pas être symptomatique, mais uniquement « radiographique » : les lésions visibles par imagerie ne sont pas responsables de symptômes. Lorsqu'elle devient symptomatique, l'arthrose se manifeste principalement par une douleur mécanique (diurne, intermittente, provoquée par les mouvements et changements de position, disparaissant au repos) ou parfois inflammatoire (par poussées). Après plusieurs années d'évolution, l'articulation malade peut être déformée, ce qui contribue, avec la douleur, au caractère handicapant de la maladie. (Société Française de Rhumatologie, [en ligne]).

3. Physiopathologie de l'arthrose

3.1. Généralités

Au cours de la pathogenèse de l'arthrose, un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme des composants tissulaires, en faveur de ce dernier, survient au sein du cartilage mais aussi de l'os sous-chondral (Lambert et al., 2014; Reboul et al., 2004). Ce déséquilibre se traduit par la dégradation protéolytique du cartilage, son érosion et une inflammation synoviale généralement secondaire (Martel-Pelletier, 2004) (**figure 41**). La synovite, qui est corrélée avec la sévérité de l'OA (Krasnokutsky et al., 2011; Scanzello and Goldring, 2012), est caractérisée par la sécrétion de cytokines (Ck) pro-inflammatoires (**tableau XVII**) activant diverses cellules capables à leur tour de sécréter des Ck pro-inflammatoires ou des facteurs pro-cataboliques comme les MMP. Tous ces facteurs sont étroitement associés à des altérations fonctionnelles et structurales de la synoviale (Scanzello and Goldring, 2012), du cartilage et de l'os sous-chondral (Pelletier et al., 2001). Ce dernier peut se scléroser et parfois, des excroissances osseuses (ostéophytes) apparaissent en périphérie des surfaces articulaires portantes, ce qui peut provoquer des déformations. Celles-ci, en plus de la synovite, sont responsables des douleurs ressenties par le patient.

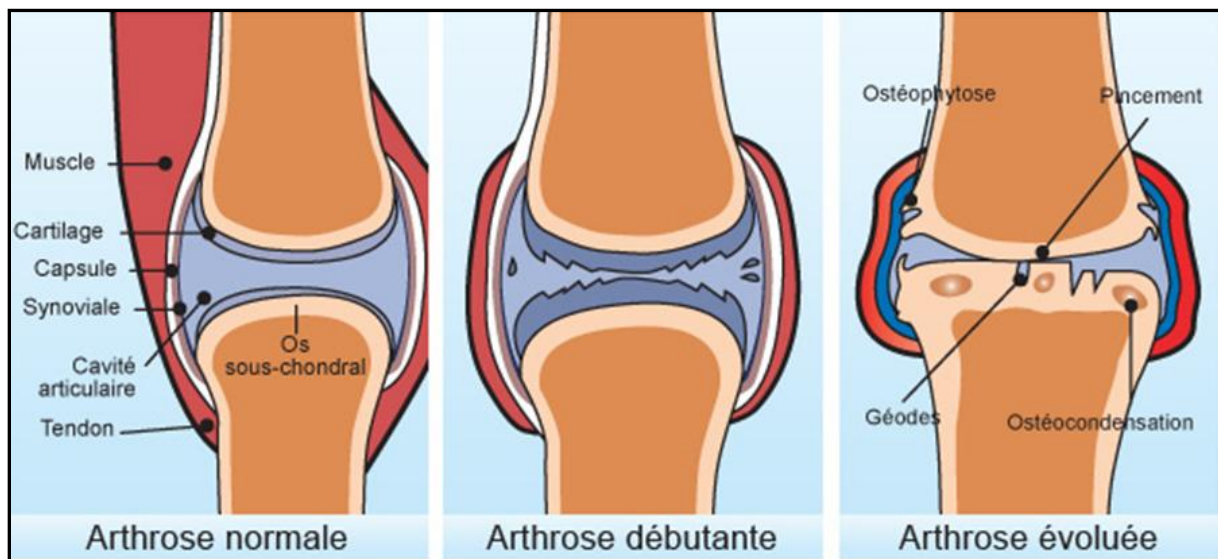


Figure 41. Structure d'une articulation au cours de l'évolution de l'OA.

Au début de l'arthrose, le cartilage se fissure peu à peu et libère des débris qui sont responsables de l'inflammation synoviale. Dans les stades avancés, le cartilage disparaît totalement ou en partie, et les os rentrent en contact, ce qui avec la synovite, contribue à la douleur du patient. De plus, on observe une modification de la structure et de la densité de l'os sous-chondral, et la formation d'excroissances osseuses (ostéophytes) responsables de la déformation de l'articulation et de la douleur.

(Recchia C., [en ligne])

TNFα, IL-1	Concentrations élevées dans le liquide synovial, la synoviale, le cartilage et l'os sous-chondral
	Inhibe la synthèse des protéoglycanes et du collagène II
	Stimule la sécrétion de MMP (1, 3 et 13)
	Induit la production d'IL-6 et IL-8
IL-6	Concentrations élevées dans le liquide synovial et le sérum
	Inhibe l'expression de collagène II
	Stimule la sécrétion de MMP (1 et 13) en combinaison avec l'IL-1
IL-15	Concentrations élevées dans le liquide synovial en début d'arthrose
	Potentiellement inducteur de la production de MMP (1 et 3)
IL-17	Induit la production d'IL-1 et de TNF α , de monoxyde d'azote (médiateur inflammatoire) et de MMP
	Inhibe la synthèse des protéoglycanes
IL-18	Fortement exprimés dans les chondrocytes
	Concourt au déséquilibre métabolique des chondrocytes via ou indépendamment des voies de l'IL-1

Tableau XVII. Principales cytokines impliquées dans la physiopathologie de l'OA.

(Adapté de Kapoor et al., 2011)

3.2. L'arthrose débutante à modérée

Au cours des stades précoces de l'OA, les changements structuraux du cartilage sont associés à une importante activation des chondrocytes qui surexpriment des facteurs cataboliques (MMP-1, -8 et -13, ADAMTS-4 et -5) (Martel-Pelletier et al., 2008; Tchetina, 2011). Ces protéases dégradent petit à petit les principaux constituants de la matrice du cartilage (collagènes et protéoglycanes) aboutissant ainsi à son érosion progressive. Par ailleurs, ces chondrocytes produisent également des médiateurs pro-inflammatoires comme l'oxyde nitrique, des prostaglandines, l'IL-1, le TNF- α , l'IL-6 ou l'IL-8 qui, par action autocrine ou paracrine, favorisent aussi cet état catabolique (Pelletier et al., 2001).

Les débris de cartilage issus de sa dégradation agressent la synoviale et celle-ci libère aussi de l'IL-1, de l'IL-6, de l'IL-17 et du TNF- α qui, en plus de leur effet pro-catabolique ont un effet anti-anabolique (inhibition de la synthèse de collagène et protéoglycanes matriciels) sur les chondrocytes (**figure 42**) (Haq et al., 2003; Kapoor et al., 2011; Martel-Pelletier, 2004). Par un rétrocontrôle positif, l'IL-1 et le TNF- α peuvent induire leur propre sécrétion par les synoviocytes, mais aussi celle d'autres Ck comme l'IL-6, l'IL-17 et l'IL-18 (Lambert et al., 2014; Pelletier et al., 2001). Ces trois Ck participent aussi à l'induction de signaux cataboliques responsables de la dégradation du cartilage, ce qui crée une boucle d'amplification du phénomène (Martel-Pelletier et al., 2008). Par ailleurs, les synoviocytes activés libèrent également de la Gal-3 (Ohshima et al., 2003; Reboul et al., 2004) et des MMP (Haq et al., 2003; Lambert et al., 2014; Martel-Pelletier, 2004) qui contribuent à la dégradation du cartilage et à l'auto-entretien du phénomène.

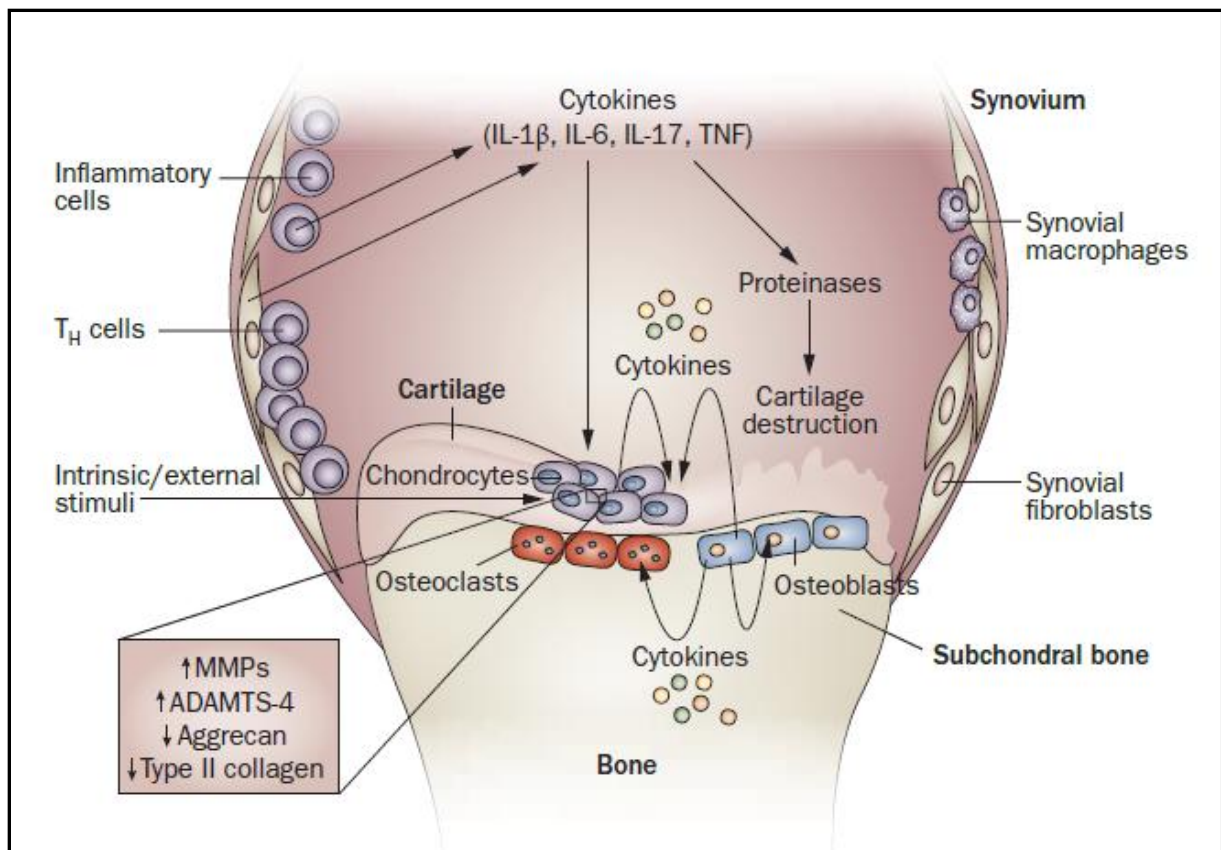


Figure 42. Rôle des cytokines pro-inflammatoires dans la physiopathologie de l'OA.

L'OA est caractérisée par un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme, en faveur de ce dernier. Ce déséquilibre est le résultat de l'action de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-7, TNF- α) capables d'induire l'inhibition de la synthèse des constituants de la matrice du cartilage et l'augmentation des enzymes responsables de sa dégradation. **ADAMTS-4** : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 4 (aggrécane 1). **MMPs** : métalloprotéases matricielles. **IL** : interleukine. **TNF- α** : Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale).

(Kapoor et al., 2011)

3.3. L'arthrose évoluée

Au cours des stades sévères d'OA, on observe une apoptose marquée des chondrocytes, une déplétion importante de protéoglycanes en surface du cartilage, l'apparition de fissures étendues, de structures fibreuses, et la perturbation globale de l'organisation structurale de ce tissu (Haq et al., 2003; Tchetina, 2011). Par ailleurs, l'absence de cartilage par endroit pousse l'organisme à tenter de combler ce vide ; cette tentative de réparation se manifeste par un remodelage de l'os sous-chondral, une sclérose et/ou la formation d'ostéophytes (Haq et al., 2003). A ce stade, la douleur et les déformations articulaires sont responsables du handicap des patients.

4. Prise en charge médicamenteuse de l'arthrose des membres inférieurs

4.1. Traitements actuels

4.1.1. Généralités

La prise en charge médicamenteuse de l'arthrose symptomatique des membres inférieurs comprend principalement :

- des traitements systémiques :
 - antalgiques opioïdes ou non : paracétamol, tramadol, codéine
 - anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : diclofénac, ibuprofène, kétoprofène, méloxicam, piroxicam
 - anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL) : glucosamines (sulfate, chlorhydrate), diacéréine, insaponifiables d'avocat et de soja
- et des traitements locaux :
 - AINS topiques : diclofénac, ibuprofène, kétoprofène, méloxicam, piroxicam
 - corticoïdes en infiltration : bétaméthasone, cortivazol, méthylprednisolone acétate, triamcinolone hexacétone
 - acide hyaluronique en injection intra-articulaire (en cours de réévaluation)

4.1.2. Recommandations de la Haute Autorité de Santé

Au cours des poussées douloureuses de l'arthrose, le traitement médicamenteux comporte en premier lieu le paracétamol, puis, seulement en cas d'inefficacité, des AINS *per os*. Les traitements locaux peuvent aussi être utilisés simultanément.

En 2013, la HAS a réévalué la pertinence de l'usage des AASAL dans la prise en charge de l'arthrose. Ces molécules ont plusieurs propriétés bénéfiques démontrées *in vitro* ou *in vivo* (anti-inflammatoires, anti-cataboliques et pro-anaboliques au niveau de la matrice extracellulaire des chondrocytes, etc.) (Henrotin et al., 2014a), mais leur efficacité clinique reste très controversée. En effet, comme l'ont relevé Lopes Júnior et Inácio dans une revue (2013), l'intérêt des AASAL pour le soulagement de la douleur et de la gêne fonctionnelle est minime et de pertinence clinique discutable. De plus, ils n'empêchent pas la dégradation articulaire et, ne permettent pas non plus de réduire la consommation d'AINS. Enfin, en ce qui concerne la diacéréine, son rapport bénéfice/risque a été estimé défavorable, en raison d'effets indésirables tels que diarrhées, manifestations cutanées de nature allergique et cytolysé hépatique (Haute Autorité de Santé, [en ligne], Bruyère et al., 2014). Compte tenu de ces arguments, la HAS a conclu que « le service médical rendu par ces médicaments est insuffisant pour justifier leur prise en charge par la solidarité nationale ».

Que ce soient les antalgiques, anti-inflammatoires ou les AASAL, ces traitements n'ont qu'un effet suspensif. Seuls des traitements chondroprotecteurs (capables de prévenir et/ou de ralentir les lésions du cartilage) seraient à même de guérir l'arthrose mais, pour l'instant, il n'en existe aucun (Société Française de Rhumatologie, [en ligne]). Actuellement, seul le remplacement l'articulation par une prothèse (arthroplastie) permet de guérir de l'arthrose des membres inférieurs. Cette opération lourde est réservée aux arthroses douloureuses, invalidantes et réfractaires aux mesures thérapeutiques habituelles (Haute Autorité de Santé, [en ligne]).

4.1.3. Recommandations des sociétés savantes

Face à la diversité des pratiques médicales en Europe et dans le monde, pour le traitement de l'arthrose des membres inférieurs, l'*European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis* (ESCEO) a récemment proposé d'harmoniser ces pratiques (Bruyère et al., 2014). Elle a ainsi publié des recommandations (**figure 43**) tenant compte de celles déjà proposées par l'EULAR, l'*American College of Rheumatology* (ACR), l'*Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) (McAlindon et al., 2014) et l'*United Kingdom National Institute Health and Clinical Excellence* (NICE).

En première intention, l'ESCEO recommande de prescrire le paracétamol ou, contrairement à l'HAS, ou encore à l'OARSI, l'ACR et au NICE (Henrotin et al., 2014b), des AASAL (uniquement glucosamine sulfate ou chondroïtine sulfate). En cas d'inefficacité, il est possible d'administrer des antalgiques/anti-inflammatoires topiques (AINS, capsaïcine).

En deuxième intention, les AINS *per os* sont préconisés par l'ESCEO et, s'ils sont inefficaces ou contre-indiqués, ils peuvent être remplacés par de l'acide hyaluronique ou des corticoïdes, en injection intra-articulaire.

En troisième intention, face à une douleur résistante, l'ESCEO recommande d'utiliser des antalgiques opioïdes faibles (tramadol) seuls, ou en association avec le paracétamol ($\pm$ un AINS *per os*). En alternative et, chez les patients ayant des douleurs majoritairement de type neuropathique, l'ESCEO propose d'utiliser de la duloxétine, un antidépresseur inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.

Enfin, en dernier recours, dans les stades très avancés et réfractaires aux précédentes alternatives thérapeutiques, l'arthroplastie s'impose. Dans le cas où celle-ci serait contre-indiquée, l'usage des opioïdes classiques *per os* ou en percutané, est proposé, mais doit néanmoins faire l'objet d'études cliniques pour être validé scientifiquement.

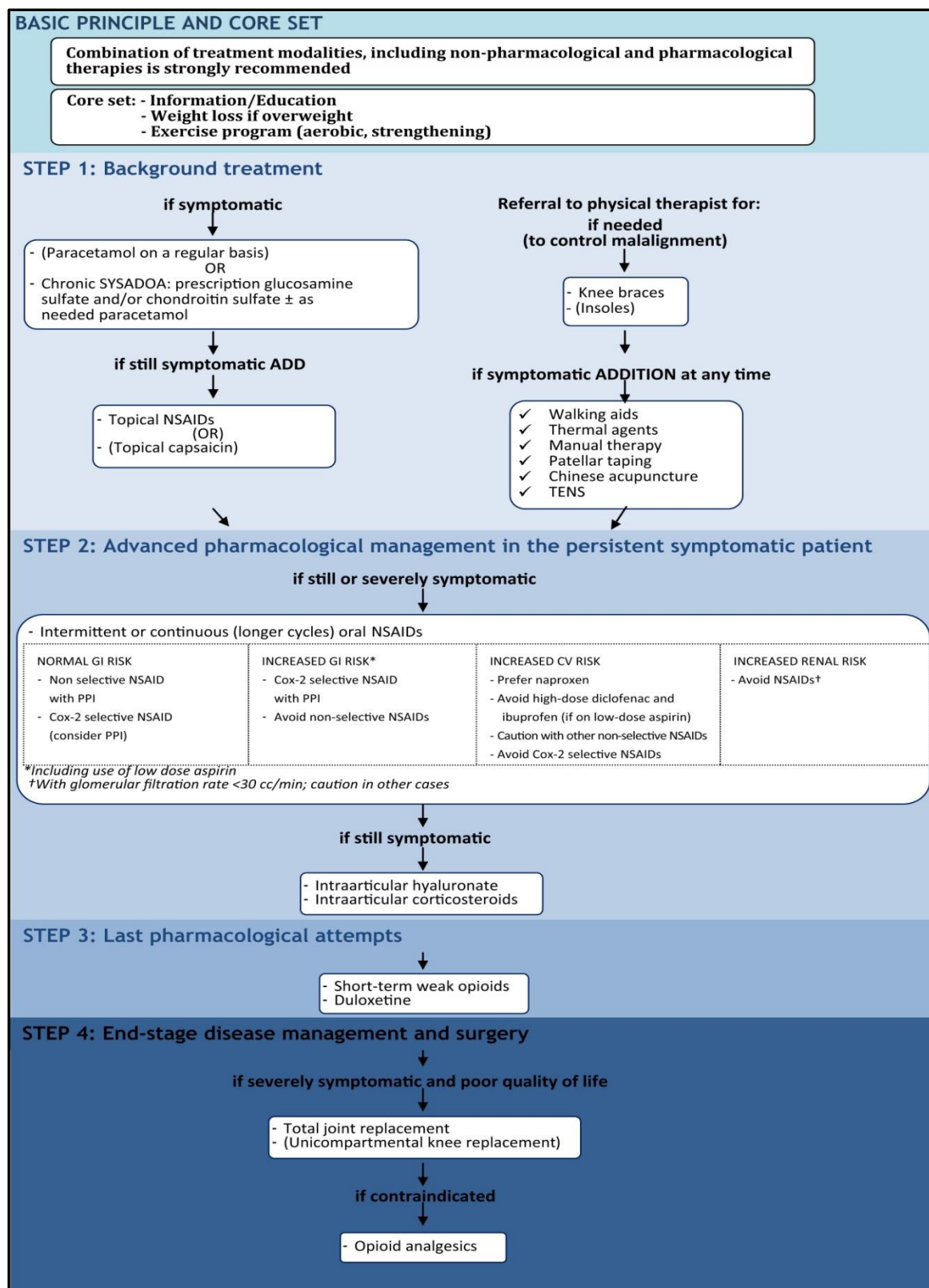


Figure 43. Stratégie thérapeutique de la prise en charge de l'OA (proposée par l'ESCEO).

Cet algorithme, publié par l'ESCEO, tient compte des résultats de plusieurs études cliniques et méta-analyses, ainsi que des recommandations de différentes sociétés savantes, européenne (EULAR), britannique (NICE) et américaines (ACR, OARSI). **COX-2** : cyclo-oxygénase 2. **CV** : cardiovasculaire. **GI** : gastro-intestinal. **NSAIDs** : *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (anti-inflammatoires non stéroïdiens). **PPI** : *proton pump inhibitor* (inhibiteur des pompes à protons). **SYSADOA** : *Symptomatic Slow Acting Drugs in OsteoArthritis* (anti-arthrosiques symptomatiques d'action lente).

(Bruyère et al., 2014)

4.2. Les perspectives thérapeutiques

Au cours de ces dernières années, plusieurs études précliniques et cliniques ont permis d'évaluer l'efficacité de traitements inhibant des cytokines pro-inflammatoires et des protéases matricielles, ralentissant le remodelage tissulaire et, favorisant la régénération du cartilage. En général, leurs résultats sont variables, ce qui justifie la nécessité de continuer à mener d'autres études (Kapoor et al., 2011; Martel-Pelletier et al., 2012).

4.2.1. Inhibition des cytokines pro-inflammatoires

Anti-IL-1. Une étude préclinique a démontré qu'une administration unique locale de l'antagoniste endogène du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) inhibe les modifications structurales caractéristiques de l'OA. En revanche, une étude clinique a montré que l'injection unique d'IL-1Ra n'a pas suffi à soulager les symptômes. Cependant une autre étude clinique, au cours de laquelle l'IL-1Ra était injecté quotidiennement pendant 3 mois à 3 patients atteints d'OA érosive de la main, a conclu que ce traitement est capable de soulager les symptômes de la maladie (Kapoor et al., 2011).

Anti-TNF- α . Les quelques essais réalisés, tous de courte durée, incluaient peu de patients. Néanmoins, on peut citer le cas d'un patient de 68 ans souffrant de gonarthrose bilatérale dont le traitement par adalimumab a complètement soulagé ses douleurs. De la même façon, un essai clinique sur 10 patients souffrant d'OA digitale et traités par infliximab, a démontré que cet anti-TNF- α réduit les symptômes de la maladie (Kapoor et al., 2011). Il faut noter que cette forme d'arthrose est volontiers inflammatoire et érosive, ce qui pourrait expliquer l'efficacité de l'infliximab et de l'IL-1Ra (cf. paragraphe précédent).

Anti-IL-6. Malgré le rôle important de cette cytokine dans la physiopathologie de l'OA, aucune molécule la ciblant n'a été étudiée en clinique (Kapoor et al., 2011).

4.2.2. Inhibition des protéases matricielles

Les résultats des études précliniques évaluant les potentialités thérapeutiques des inhibiteurs de MMP fournissent des données variables. En effet, certains de ces inhibiteurs sont jugés inefficaces, tandis que d'autres ont montré une efficacité en réduisant l'interligne du pincement articulaire, sans pour autant réduire la sévérité de la maladie. De plus, plusieurs d'entre elles induisent des troubles musculo-squelettiques (TMS), ce qui a justifié l'arrêt des études. Néanmoins l'espoir subsiste avec un anti MMP-13 qui dans un modèle d'OA chez le rat, a des effets chondroprotecteurs sans induire de TMS. De la même façon, dans ce même modèle, un inhibiteur d'agrécases (l'AGG-523) est capable de ralentir la dégradation des protéoglycanes (Martel-Pelletier et al., 2012). L'AGG-523 a fait l'objet d'un essai clinique de phase I dont les résultats ne sont toujours pas communiqués.

4.2.3. Inhibition ou ralentissement du remodelage tissulaire

Cette approche pharmacologique permet de limiter l'activité anormale du métabolisme du cartilage et/ou, de l'os sous-chondral, en particulier dans les stades précoces de la maladie. Plusieurs axes d'intervention peuvent être envisagés : la prévention de la résorption osseuse (Martel-Pelletier et al., 2012), ainsi que l'inhibition de la dégradation du cartilage articulaire.

Biphosphonates (BPP). Plusieurs études menées chez différents modèles animaux d'arthrose montrent que l'alendronate inhibe le remodelage osseux et la dégradation du cartilage (Roman-Blas et al., 2014). En effet, il supprime la résorption osseuse, en inhibant le recrutement des ostéoclastes et, réduit l'incidence de la formation des ostéophytes et des lésions médullaires osseuses. De plus, il inhibe l'expression de facteurs pro-cataboliques dans le cartilage (MMP-9 et -13, IL-1, collagène de type X : marqueur d'hypertrophie du chondrocyte, etc.). Par ailleurs, une étude clinique montre que les femmes atteintes de gonarthrose, traitées par l'alendronate, présentent moins d'œdèmes osseux et d'usure de l'os sous-chondral, que les femmes non traitées.

D'autres études cliniques ou précliniques évaluant l'efficacité d'autres BPP montrent que ces molécules sont capables (Roman-Blas et al., 2014) :

- de préserver la matrice de collagène et de diminuer l'expression de MMP-1 et -3 dans le cartilage (tiludronate, dans un modèle d'arthrose chez le chien)
- d'améliorer la microstructure de l'os sous-chondral, de prévenir la perte osseuse, d'atténuer la dégradation du cartilage et de réduire la douleur (zolédronate et acide zolédronique, dans des modèles d'arthrose chez le rat)
- de réduire la douleur et l'incidence des œdèmes médullaires osseux (acide zolédronique et risédronate, dans des études cliniques randomisées)

Calcitonine (CT). La CT inhibe le remodelage osseux et la dégradation du cartilage. En effet, dans un modèle canin d'arthrose, il a été démontré que, d'une part, la CT prévient la résorption de l'os trabéculaire et l'amincissement de l'os sous-chondral, et d'autre part, elle réduit la dégradation du cartilage. De plus, une étude chez des patients arthrosiques montre que la CT réduit les taux sériques et urinaires des marqueurs de résorption osseuse (CTX-I) et de dégradation du cartilage (CTX-II) (Roman-Blas et al., 2014).

Ranélate de strontium (RS). Le RS présente un bénéfice structural et clinique (Roman-Blas et al., 2014). En effet, il inhibe l'expression de plusieurs facteurs pro-cataboliques pour le cartilage (IL-1, MMP-1, -3, -13) et, atténue le remodelage de l'os sous-chondral dans un modèle canin d'arthrose. En outre, des études cliniques rapportent que le traitement par RS est associé à une diminution de l'incidence du pincement de l'interligne articulaire et, à une réduction de la douleur, comparé au *placebo*.

Inhibiteurs de la cathepsine K. Evalués dans des modèles d'OA chez le chien et le cobaye, ces composés ralentissent la progression de la maladie (Roman-Blas et al., 2014).

Hormone parathyroïdienne [1-34] (PTH [1-34]). Différentes équipes ont évalué les effets de la PTH [1-34] dans des modèles animaux d'OA et, ont conclu que cette hormone a un effet bénéfique contre la dégradation du cartilage et le remodelage de l'os sous-chondral. Ainsi, les travaux de Chang et coll. (2009) et de Sampson et coll. (2011) ont montré que la PTH [1-34], injectée en intra-articulaire chez le rat et en sous-cutané (SC) chez la souris, respectivement, inhibe la progression de la dégradation du cartilage articulaire. En plus de ces effets bénéfiques sur le cartilage, la PTH [1-34] SC prévient la détérioration de l'os sous-chondral dans un modèle d'arthrose chez le cobaye (Yan et al., 2014).

4.2.4. Activation de la régénération du cartilage par ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire permet de reconstituer le cartilage lésé, en favorisant la différenciation et la prolifération des chondrocytes. Plusieurs approches thérapeutiques ont été évaluées : administration locale de facteurs de croissance, implantation autologue de chondrocytes sains ou de cellules souches mésenchymateuses (CSM) capables de se différencier en chondrocytes. D'autres techniques d'ingénierie tissulaire appliquée aux lésions ostéochondrales, sont largement décrites dans la revue de Musumeci et coll. (2014).

Sprifermine (rhFGF-18 : *recombinant human Fibroblast Growth Factor 18*). La sprifermine, agoniste du FGFR-3 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 3*), est un facteur de croissance qui stimule la prolifération des chondrocytes, l'anabolisme et la réparation de la matrice extracellulaire du cartilage, *in vitro* et *in vivo*. Une étude clinique préliminaire, randomisée, en double aveugle et contrôlée *versus placebo*, chez 192 patients atteints de gonarthrose, a été réalisée par Lohmander et coll. (2014). Elle révèle que le traitement par la sprifermine, injectée dans le genou, améliore des symptômes structuraux (épaisseur du cartilage, pincement de l'interligne articulaire) et cliniques (douleur). Bien qu'encourageante, cette étude nécessite d'être complétée car seuls les critères secondaires de l'étude ont été démontrés et, aucune donnée sur la toxicité de la sprifermine n'a pu être obtenue.

Platelet Rich Plasma (PRP : plasma riche en plaquettes). Le PRP est riche en divers facteurs de croissance impliqués dans la réparation de tissus lésés. Il permettrait, en théorie, de prévenir la dégradation du cartilage ou, de le réparer, d'inhiber la sécrétion d'IL-1, de réduire les processus inflammatoires et, de stimuler les cellules chondrogéniques quiescentes et orienter leur différenciation en chondrocytes matures. En pratique, l'injection de PRP autologue dans les genoux de 72 patients atteints de gonarthrose, atténue la douleur et la gêne fonctionnelle, immédiatement après l'injection et durant au moins un an (Mangone et al., 2014).

Pour l'instant, cette approche thérapeutique ne peut être utilisée massivement car, non seulement elle est coûteuse et techniquement difficile à mettre en œuvre, mais en plus, aucune donnée structurale n'a été évaluée.

Implantation autologue de chondrocytes sains (IACS). L'IACS a pour but de permettre aux chondrocytes sains implantés, de recoloniser et combler les lésions du cartilage et ainsi, de le restaurer (Mobasheri et al., 2014). La procédure se déroule en trois phases (Musumeci et al., 2014). Premièrement, des biopsies de cartilage sain, effectuées au niveau des zones non portantes d'une articulation du patient, sont effectuées par arthroscopie. Deuxièmement, ce cartilage est digéré *in vitro*, de façon à isoler puis cultiver les chondrocytes, pendant plusieurs semaines. Enfin, lorsque ceux-ci sont suffisamment nombreux, ils sont réimplantés, avec ou sans matrice artificielle, dans la lésion du patient.

La plupart des études cliniques menées sur l'IACS montrent que cette technique permet de réduire la douleur et, que la formation d'un tissu de type cartilagineux, n'est pas uniforme (Mobasheri et al., 2014).

Malgré des résultats cliniques encourageants, l'IACS présente plusieurs limites dont, son caractère invasif, la faible capacité de prolifération des chondrocytes et, le risque de dédifférenciation de ces cellules *in vitro*. Ces limites ont justifié l'évaluation des CSM qui, elles, sont relativement plus faciles à obtenir que des chondrocytes et, ont des capacités de prolifération et de différenciation plus importantes (Musumeci et al., 2014).

Implantation autologue de cellules souches mésenchymateuses (IACSM). Les CSM sont des cellules souches présentes dans le mésenchyme embryonnaire, mais aussi dans certains tissus adultes (moelle osseuse, tissu adipeux, etc.). Elles sont capables de se différencier en de nombreux types cellulaires, dont les chondrocytes (*in vitro*, ou, *in situ* au niveau des lésions du cartilage).

Quelques résultats d'études, effectuées sur un faible nombre de patients atteints de gonarthrose, ne sont certes pas spectaculaires, mais restent encourageants. Ainsi, une étude préliminaire, effectuée sur quatre patients, montre que l'injection de CSM, améliore des paramètres subjectifs (ressenti du patient vis-à-vis de la douleur et de la mobilité), mais très peu les paramètres objectifs (radiographie). Davatchi et coll. (2011), auteurs de cette étude, soulignent la nécessité de poursuivre des expériences *in vitro* / *in vivo*, afin d'identifier le mécanisme exact des CSM dans la prétendue réparation du cartilage et, de déterminer les modalités optimales d'administration de ces cellules (stade de la maladie auquel il faut traiter, doses et rythme d'administration des CSM, addition de co-stimulants...).

4.2.5. Synthèse sur les perspectives thérapeutiques dans l'arthrose

Le ciblage des cytokines pro-inflammatoires, des agrécanases et du remodelage tissulaire, ainsi que l'activation de la régénération du cartilage, sont des approches thérapeutiques justifiées pour le traitement de l'arthrose. En théorie, elles permettraient de prévenir la progression des modifications structurales de l'articulation malade, voire de régénérer les tissus lésés. Néanmoins, en pratique, le bilan des résultats des expériences *in vivo* et des essais précliniques et cliniques menés à ce jour, est mitigé. En effet, dans certains cas, les molécules testées n'ont eu que peu d'effet significatif sur les symptômes de la maladie ou alors, elles avaient une toxicité trop importante, justifiant l'arrêt des études. Dans d'autres cas, les études n'étaient pas complètes ni suffisamment robustes, pour pouvoir tirer des conclusions claires. Enfin, dans le cas de l'ingénierie tissulaire, plusieurs auteurs s'accordent à dire que cette approche ne serait adaptée qu'aux stades précoces de l'arthrose (Davatchi et al., 2011; Mobasheri et al., 2014), au cours desquels les lésions du cartilage sont isolées. Or, en règle générale, le diagnostic de cette maladie est porté quand elle devient symptomatique, par conséquent, quand elle est déjà à un stade postérieur à la simple lésion isolée et, que d'autres composantes physiopathologiques sont présentes.

En conclusion, il est nécessaire d'approfondir les recherches sur les approches thérapeutiques présentées et, en parallèle, de poursuivre la recherche de nouvelles cibles pour le traitement de l'OA (Kapoor et al., 2011). Comme pour le traitement de la PAR, la Gal-3 peut être une de ces cibles.

Chapitre 3

La galectine 3 : une cible potentielle pour le traitement de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde

Section 1 - Présentation des galectines

1. Nomenclature des galectines

Les galectines sont des lectines animales ayant une affinité pour des résidus β -galactosides et une similitude structurale au niveau du site de liaison du glucide (CRD : *carbohydrate recognition domain*). Cette définition consensus a permis de classer une grande variété de lectines dont les noms avaient été donnés en fonction des conditions de leur découverte. Ainsi, l'électrolectine a été découverte chez l'anguille et les lectines L-14, L-29, L-31 et CBP35 (*carbohydrate binding protein*) ont été nommées ainsi à cause de leur poids moléculaire de 14, 29, 31 et 35 kDa, respectivement. L' ϵ BP (*epsilon binding protein*) et la Mac-2 (*macrophage associated lectin*) quant à elles, ont été nommées ainsi car elles ont été découvertes associées aux immunoglobulines E et aux macrophages, respectivement. Grâce à l'avènement du séquençage, des analyses comparatives ont montré qu'un certain nombre de lectines nommées différemment étaient, en fait, identiques ou similaires du point de vue de leur capacité de liaison aux résidus β -galactosides. Ces analyses ont permis de proposer le terme « galectine » pour unifier la nomenclature de ces lectines. Ainsi, les lectines L-29, L-31, CBP35, ϵ BP et Mac-2 sont en fait la même protéine, la galectine 3 (Gal-3) de différentes espèces animales (Barondes et al., 1994; Leffler et al., 2004).

En fonction de l'organisation de leurs domaines peptidiques, les galectines peuvent être classées en trois familles : les proto, les unités répétées en tandem (*tandem-repeat*) et les chimères (**figure 44**) (Hirabayashi and Kasai, 1993). Les proto-galectines (1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15) sont des monomères ou des homodimères de CRD. Les galectines de la famille des *tandem-repeat* (4, 6, 8, 9, 12) sont constituées de deux CRD différents, reliés par une chaîne peptidique. Enfin, la famille des chimères, dont la Gal-3 est la seule représentante, est caractérisée par l'association d'un CRD et d'une longue chaîne peptidique.

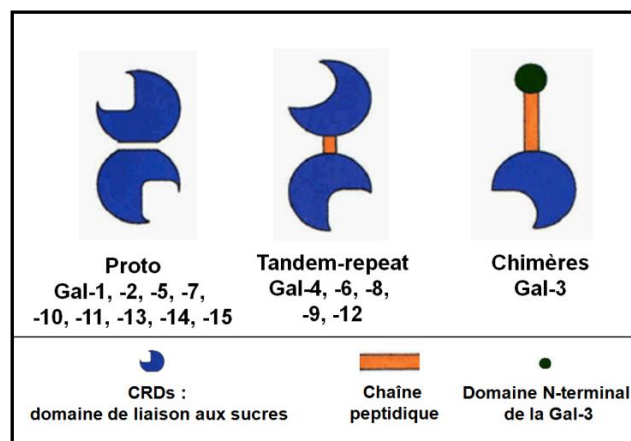


Figure 44. Structures schématiques des différentes la galectines.

(Adapté de Barondes et al., 1994)

2. Expression des galectines

Certaines galectines (Gal-1, Gal-3) sont ubiquitaires et d'autres sont plutôt « tissu - spécifique ». Les Gal-2, Gal-4 et Gal-6 par exemple, ne sont retrouvées que dans le tractus gastro-intestinal, la Gal-5, dans les réticulocytes et la Gal-7, dans l'épiderme (Chiariotti et al., 2002; Cooper, 2002; Liu et al., 2002). La modification de leur niveau d'expression est souvent associée à des conditions pathologiques (Cooper, 2002) (**tableau XVIII**).

Galectines	Expression (cellules/tissus)	Conditions pathologiques associées à une surexpression	Conditions pathologiques associées à une inhibition
1	Ubiquitaire	Tumeurs, pancréatite chronique, infections parasitaires	Tumeurs (tête et cou)
2	Tractus gastro-intestinal	-	-
3	Ubiquitaire (macrophages +++)	Tumeurs (thyroïde, colon : stades avancés, estomac, vessie), insuffisance rénale, pancréatite chronique, ischémie cérébrale	Tumeurs (colon : stades précoces, sein, ovaire, prostate, tête et cou)
4	Tractus gastro-intestinal	Tumeurs (foie, estomac)	Tumeurs (colon)
5	Blastocytes, réticulocytes	-	-
6	Tractus gastro-intestinal	-	-
7	Epithélium	Tumeurs (sein)	Tumeurs (vessie, peau)
8	Foie, reins, myocarde, poumons, colon, cerveau	Tumeurs (pancréas, foie, peau, larynx)	Tumeurs (colon)
9	Eosinophiles, macrophages, tractus gastro-intestinal, reins, naevi mélanocytaires	Lymphomes de Hodgkin, réactions immunitaires (allergiques et antiparasitaires)	Tumeurs : mélanomes
10	Eosinophiles, basophiles	-	-
11	Cristallin	-	-
12	Adipocytes	-	-
13	Placenta	-	-
14	Eosinophiles	Réactions immuno-allergiques	-

Tableau XVIII. Distribution tissulaire et cellulaire des galectines et exemples de pathologies associées à la modification de leur niveau expression.

(Adapté de Chiariotti et al., 2002)

Après leur synthèse, les galectines ne subissent pas de modification post-traductionnelle, hormis des phosphorylations éventuelles (Gal-3). En fonction des cellules et des rôles biologiques qu'elles auront à y jouer, les galectines peuvent être ensuite adressées vers le noyau, un organite ou encore le milieu extracellulaire (Leffler et al., 2004). Du fait de l'absence de peptide signal, ces protéines sont sécrétées par une voie non classique : l'ectocytose. Ce phénomène est caractérisé par le bourgeonnement de la membrane plasmique pour former des vésicules contenant la lectine. Une fois dans le milieu extracellulaire, ces vésicules sont lysées, probablement sous l'action de protéases, libérant ainsi leur contenu (Cooper and Barondes, 1990; Hughes, 1999).

3. Rôles biologiques des galectines

Les galectines n'ont pas de récepteurs spécifiques mais elles reconnaissent diverses glycoprotéines arborant des résidus β -galactosides. Elles peuvent donc être impliquées dans la régulation d'une multitude de fonctions inhérentes à l'homéostasie cellulaire à différents niveaux (**figure 45**). En effet, selon leur niveau d'expression, leur localisation intra ou extracellulaire, et la cellule qui les exprime, les galectines régulent l'adhésion, le cycle, la croissance, la prolifération et la migration cellulaires ainsi que l'apoptose (Hsu and Liu, 2002). De ce fait, ces protéines peuvent influencer les processus de tumorigénèse et de métastases, d'autant plus qu'elles interviennent aussi dans la régulation de l'angiogénèse et des réponses immunitaires (Almkvist and Karlsson, 2004; Liu and Rabinovich, 2010). Par ailleurs, certaines galectines (Gal-1, Gal-3) sont positivement impliquées dans l'épissage de l'ARN (Liu et al., 2002) et d'autres (Gal-3, Gal-4), dans le transport de protéines dans les cellules épithéliales (Delacour et al., 2009). En outre, il faut noter qu'une même galectine peut jouer deux rôles opposés en fonction de sa localisation intra ou extracellulaire et/ou du type cellulaire, ce qui est notamment le cas de la Gal-3.

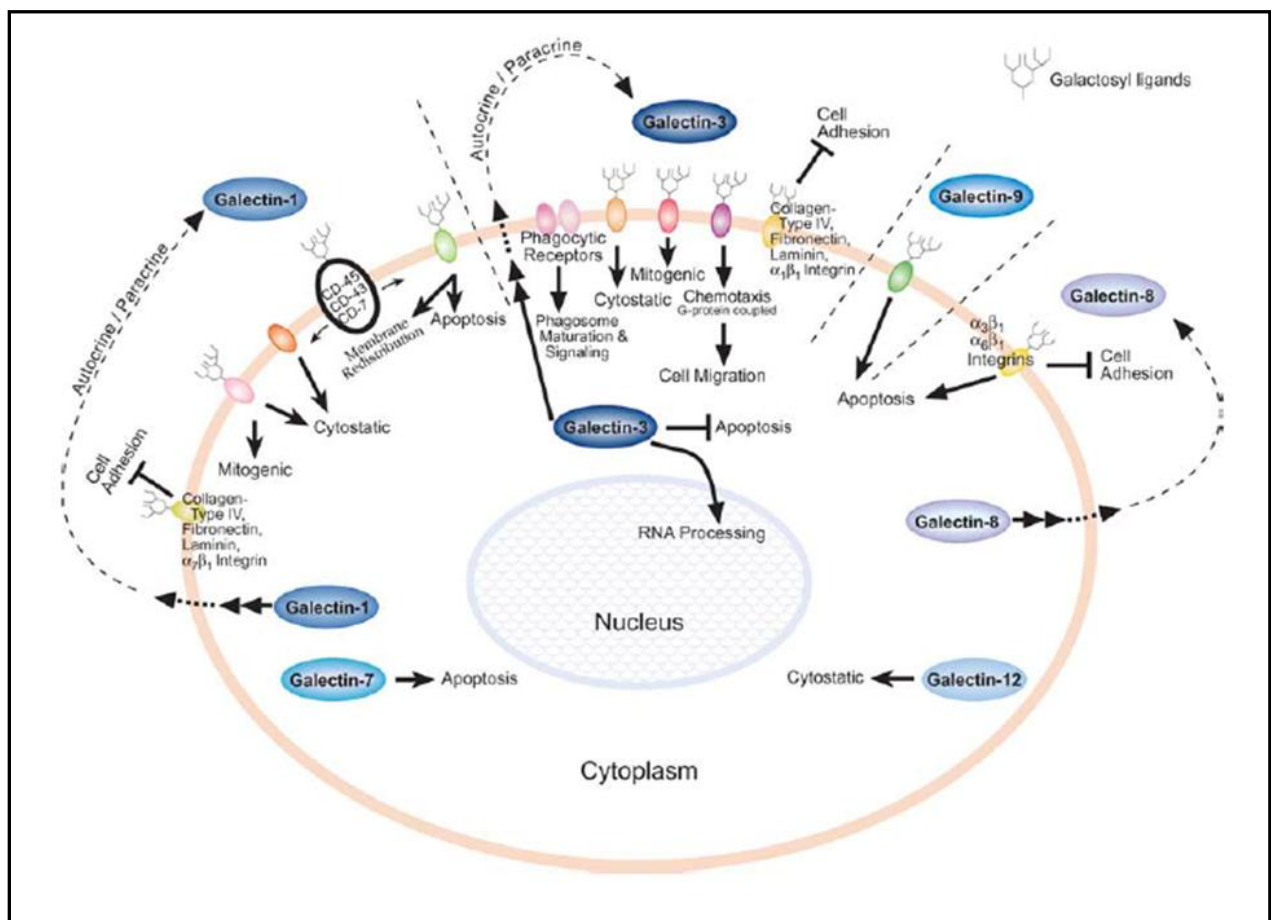


Figure 45. Rôles de quelques galectines dans l'homéostasie cellulaire.

(Hsu and Liu, 2002)

Section 2 - La galectine 3

1. Structure de la galectine 3

La galectine 3 est une lectine animale de 243 à 286 acides aminés, en fonction de l'espèce (Cooper, 2002). D'environ 30 kDa, elle est composée d'un petit domaine N-terminal, d'une chaîne latérale et d'un domaine lectinique C-terminal (CRD : *carbohydrate recognition domain*) (**figure 46**) (Leffler et al., 2004; Liu et al., 2002; Ochieng et al., 1998).

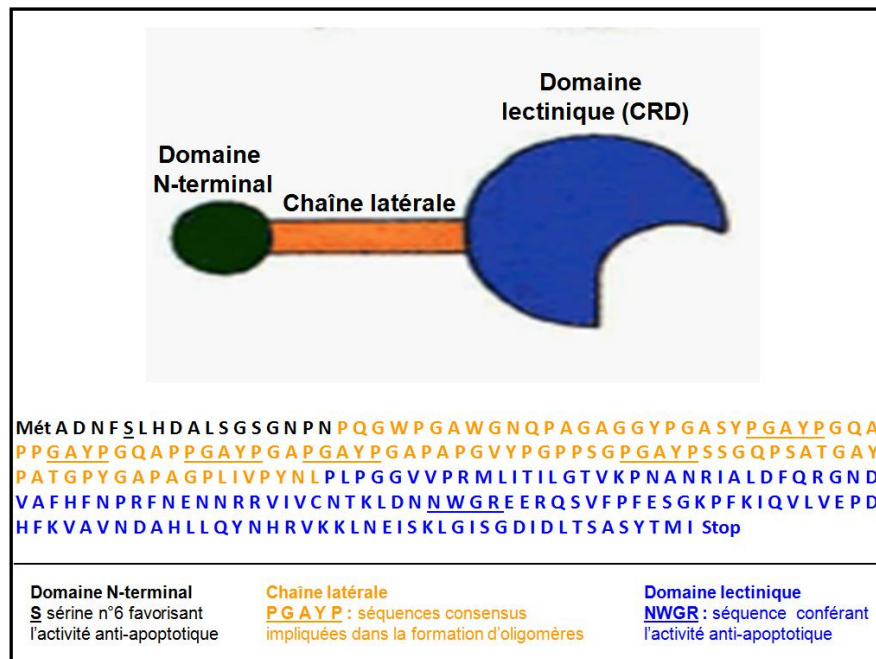


Figure 46. Structure schématique et séquence protéique de la Gal-3 humaine.

(Adapté de Barondes et al., 1994)

1.1. Le domaine N-terminal

Constitué de 18 acides aminés conservés chez tous les mammifères (Cooper, 2002) (**figure 46**), le domaine N-terminal est impliqué dans la sécrétion de la protéine : la délétion des 11 premiers acides aminés inhibe cette sécrétion (Gong et al., 1999). De plus, la phosphorylation de la sérine n°6 est indispensable à l'effet anti-apoptotique de la Gal-3, et toute mutation de cet acide aminé supprime cet effet (Yoshii et al., 2002).

1.2. La chaîne latérale

La chaîne latérale contient la séquence consensus PGAYP (Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro) (**figure 46**) répétée plusieurs fois en fonction de l'espèce et expliquant l'homologie de la Gal-3 avec les collagènes (Cooper, 2002; Domic et al., 2006).

Du fait de cette homologie, la chaîne latérale est impliquée dans la formation de dimères voire de pentamères de Gal-3 (Ahmad et al., 2004; Hsu et al., 1992; Ochieng et al., 1993) (**figure 47**). La présence de certains acides aminés sur cette chaîne et la phosphorylation d'autres, régissent la translocation de la Pt dans les différents compartiments cellulaires (Gong et al., 1999; Menon et al., 2000), ainsi que sa sécrétion (Menon and Hughes, 1999; Menon et al., 2011).

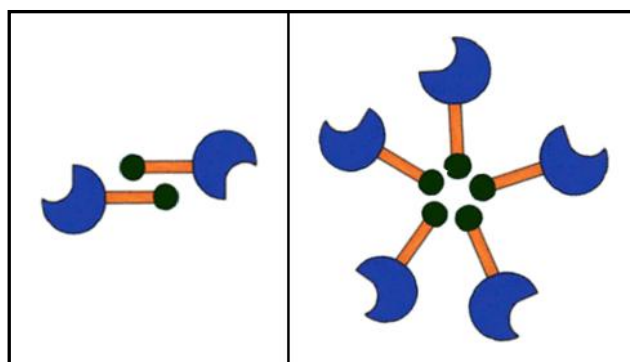


Figure 47. Structure schématique d'un dimère et d'un pentamère de Gal-3.

(Adapté d'Ahmad et al., 2004; Ochieng et al., 1993)

1.3. Le domaine lectinique

Formé de plusieurs feuillets bêta (Salomonsson et al., 2010; Seetharaman et al., 1998), le domaine lectinique permet à la Pt d'interagir avec des molécules contenant des résidus β -galactosides, particulièrement le lactose et la N-acétyl-lactosamine. L'affinité de la Gal-3 pour ces molécules, endogènes ou synthétiques, est d'autant plus importante qu'elles possèdent des motifs répétés, ramifiés ou substitués (**tableau XIX**) (Hirabayashi et al., 2002; Ochieng et al., 2004). L'interaction entre la Gal-3 et diverses glycoprotéines (**tableau XX**) explique son implication dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (Morris et al., 2004). En outre, la présence de la séquence NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg) au cœur du domaine lectinique (**figure 46**) confère sa propriété anti-apoptotique à la protéine (Yang et al., 1996).

Ligands osidiques de la galectine 3	Affinité relative
Lac	1,0 (**)
2'-aFuc-Lac	3,0 (*)
LacNAc	6,6 (*)
3'-NAc-LacNAc	11,6 (**)
3-aGalNAc-(2'-aFuc)-Gal	16,7 (*)
3-aGalNAc-(2'-aFuc)-Lac	17,3 (*)
3-aGal-LacNAc	23,3 (*)
3,6-LacNAc ₂ -Lac	29,1 (*)
3'-NBzl-LacNAc	97,6 (**)

Tableau XIX. Affinité de la Gal-3 pour quelques ligands osidiques.

L'affinité de la Gal-3 pour ces différents sucres a été déterminée à 25°C soit par interaction directe (microcalorimétrie) (*) soit par étude de compétition (ELISA (**)). **Lac** : lactose. **Fuc** : fucose. **LacNAc** : N-acétyl-lactosamine. **Gal** : galactose. **GalNAc** : N-acétyl-galactosamine. **NBzl** : N-benzyl.

(Adapté d'Ochieng et al., 2004)

Ligands glycoprotéiques de la galectine 3	Fonctions cellulaires associées
Lamine, fibronectine, intégrine $\alpha 1\beta 1$...	Régulation de l'adhésion des cellules à la matrice
M1 β 1 (macrophages)	
CD 66a/b (neutrophiles)	Activation de la NADH oxydase et de la cascade du stress oxydatif
CD 98 (lignée cellulaire T : Jurkat)	Internalisation du Ca^{2+} extracellulaire
CD4/CD8 (lymphocytes)	Régulation de l'adhésion des cellules à la matrice
Protéines membranaires associées aux lysosomes Lamp-1, -2 (cellules tumorales)	Régulation de l'adhésion des cellules entre elles et à la matrice
Pt de liaison des macrophages (Mac-2 BP)	Induction de l'adhésion des cellules entre elles et à la matrice
Mucines exprimées dans le cancer du colon	
Antigène carcino-embryonnaire	
Cubiline	Induction de l'adhésion cellulaire et de l'endocytose
Elastine	Induction de l'adhésion des cellules à l'élastine
Hensine	Maintien de la différenciation terminale des cellules épithéliales
Produits terminaux de la glycation (AGE)	Endocytose des AGE
IgE (basophiles)	Dégranulation et sécrétion de sérotonine
Fc γ RII (éosinophiles leucémiques)	Répression de l'expression génique d'IL-5
Lipopolysaccharides bactériens	Adhésion de la bactérie aux cellules et matrices de l'hôte

Tableau XX. Exemples de ligands glycoprotéiques de la Gal-3.

(Adapté d'Ochieng et al., 2004)

2. Expression de la galectine 3

2.1. Cellules exprimant la galectine 3

Pendant le premier trimestre de l'embryogenèse humaine, l'expression de cette lectine est limitée aux épithéliums de la peau, des voies respiratoires, digestives et urinaires, aux myocytes et aux chondrocytes hypertrophiques. Chez l'adulte, la Gal-3 est ubiquitaire mais surtout exprimée dans certains types cellulaires (Dumic et al., 2006; Liu et al., 2002) :

- cellules endothéliales vasculaires
- cellules épithéliales de divers organes ou tissus : cornée, épithélium olfactif, glandes salivaires, thymus, poumons, sein, intestin grêle, colon, pancréas, voies biliaires intra-hépatiques, reins, prostate...
- cellules de tissus conjonctifs : kératinocytes, fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, ostéoclastes...
- cellules immunitaires : monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles ou basophiles, mastocytes, cellules dendritiques...

La Gal-3 n'est pas exprimée physiologiquement par les lymphocytes. Elle apparaît lorsque ces cellules sont activées par des micro-organismes au cours d'une infection (par *Trypanosoma cruzi* pour les lymphocytes B ; par le virus de l'immunodéficience humaine -VIH- ou le virus T-lymphotropique humain -HTLV-1- pour les lymphocytes T). Par ailleurs, elle est différemment exprimée par diverses tumeurs en fonction de leur progression et de leur potentiel métastatique (Cooper, 2002; Dumic et al., 2006).

Au niveau subcellulaire, la Gal-3 peut être retrouvée autant dans le noyau que dans le cytosol (Guévremont et al., 2004 ; Patterson et al., 2002) ou dans la membrane plasmique (Gorski et al., 2002). Dans un contexte inflammatoire, elle peut être sécrétée par certaines cellules, particulièrement les macrophages et les fibroblastes synoviaux.

2.2. Régulation de l'expression de la galectine 3

La Gal-3 est codée par le gène *LGALS3* situé sur le chromosome 14, chez l'Homme. La régulation de son expression dépend des stimuli extérieurs ainsi que du type et de l'éventuel état tumoral des cellules. Elle implique l'action de différents facteurs de transcription ainsi que des modifications épigénétiques (Dumic et al., 2006).

Ainsi, le promoteur du gène *LGALS3* contient plusieurs éléments de réponse (**figure 48**) à des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la croissance, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (**tableau XXI**) (Dumic et al., 2006; Kadrofske et al., 1998). Parmi ces facteurs figurent les facteurs CREB (*cAMP response element binding factor*), Sp-1 (*specificity protein*), SIF-A/B/C (*sis-inducible factor*), AP-1, AP-2, AP-4 (*activating protein*), NFkB (*nuclear factor kappa B*), la protéine *nucling*, les protéines de structure bHLH (helice-boucle-hélice) et la protéine p53.

Par ailleurs, le promoteur du gène *LGALS3* peut aussi faire l'objet d'une régulation épigénétique par des phénomènes de méthylation ou de déméthylation. Ainsi, par rapport à des cellules saines, les cellules de tumeurs pituitaires, de carcinomes du sein ou de la thyroïde, présentent une déméthylation du promoteur du gène *LGALS3* (Ruebel et al., 2005). Or, des travaux ont démontré que cette déméthylation induit la transcription du gène et que la Gal-3 produite favorise la migration cellulaire, ce qui pourrait expliquer son rôle clé dans la progression tumorale et le potentiel métastatique (Margadant et al., 2012).

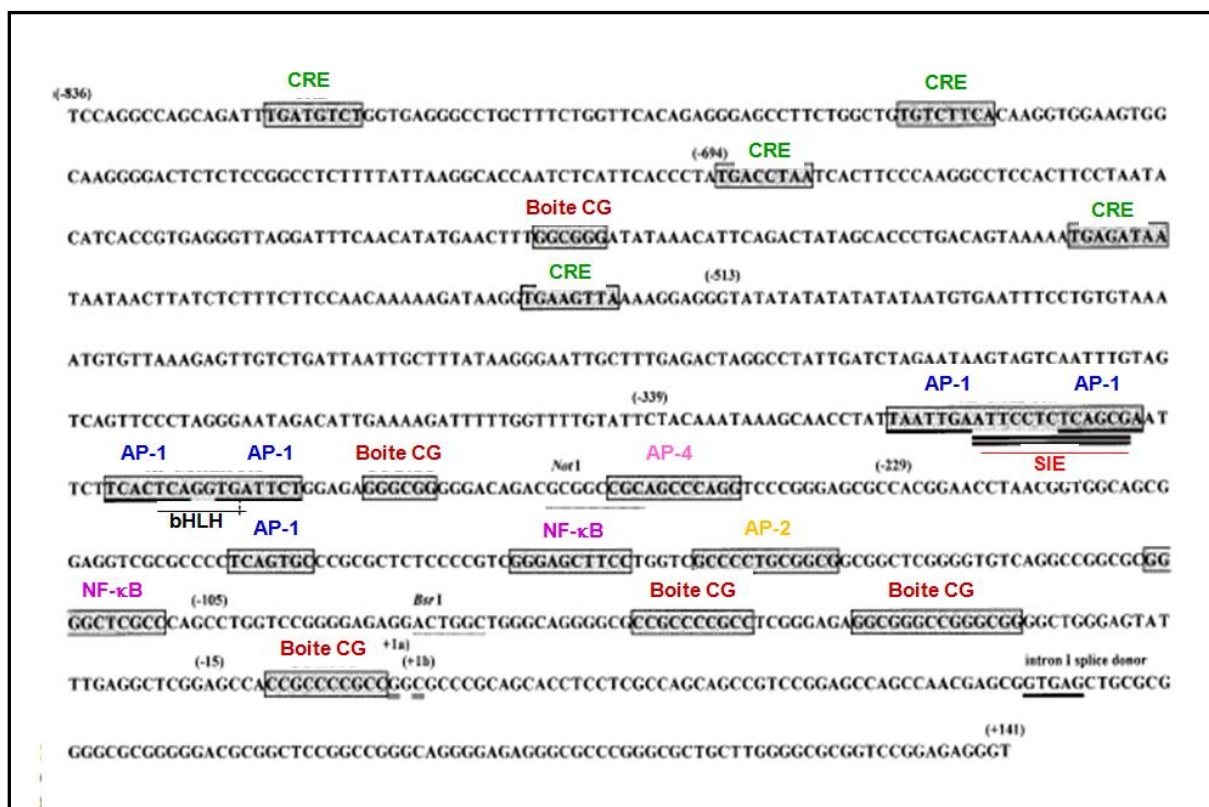


Figure 48. Promoteur du gène *LGALS3* et localisation des éléments de régulation.

CRE : C-AMP Response Element: (éléments de réponse dépendants de la voie de signalisation de l'AMP cyclique). **Boite CG** : sites de liaison du facteur de transcription Sp-1 (*Specificity Protein 1*). **SIE** : *Sis-Inducible Element* (site analogue de l'élément de réponse au sérum). **bHLH** : *basic Helix-Loop-Helix* (site de liaison des facteurs de transcription de structure hélice - boucle - hélice). **AP-1, 2, 4** (*Activating Protein*) / **NFkB** (*Nuclear Factor kappa B*) : sites de liaison analogues de ceux des facteurs de transcription AP-1, 2, 4 / NFkB, respectivement.

(Adapté de Kadrofske et al., 1998)

Facteurs de transcription du gène LGALS3	Fonctions biologiques régulées par ces facteurs de transcription	Exemple de conséquences de l'activation ou de l'inhibition de la transcription du gène LGALS3
CREB Activateur de la transcription (Hsu et al., 1996)	Prolifération cellulaire, hématopoïèse, plasticité synaptique, survie neuronale...	Expression de Gal-3 par les lymphocytes T infectés par le virus HTLV-1, activation de leur prolifération et contribution à leur transformation tumorale (Hsu et al., 1996)
Sp-1 Activateur de la transcription (Li et al., 2006)	Expression de gènes de ménage (impliqués dans le métabolisme cellulaire de base)	Expression de Gal-3 par des lymphocytes infectés par le VIH (Fogel et al., 1999)
SIF-A, B, C Activateur de la transcription (Dumic et al., 2006)	Expression des gènes de réponse précoce (au cours du cycle cellulaire)	Expression de la Gal-3 en réponse à certains facteurs de croissance sériques Expression précoce au cours du cycle cellulaire (Dumic et al., 2006)
AP-1 Activateur de la transcription	Prolifération, différenciation et survie cellulaire	
AP-2 Activateur de la transcription	Développement embryonnaire	
AP-4 Activateur de la transcription	Division et prolifération cellulaire	
NFκB Activateur de la transcription (Dumic et al., 2000; Hsu et al., 1996)	Réponse immuno-inflammatoire, apoptose...	Fibrose hépatique résultant de la phagocytose des cellules stellaires hépatiques (Jiang et al., 2012)
Nucling Inhibiteur de la transcription par inhibition de l'activation de NFκB	Apoptose	Induction de l'apoptose (Liu et al., 2004)
p53 Inhibiteur de la transcription (Cecchinelli et al., 2006; Gaudin et al., 1997; Lavra et al., 2011; Raimond et al., 1995)	Apoptose, cancérogenèse ...	Induction de l'apoptose (Cecchinelli et al., 2006) Surexpression dans les carcinomes papillaires thyroïdiens (Lavra et al., 2011)
p53 muté Activateur de la transcription (Gaudin et al., 1997; Lavra et al., 2009; Raimond et al., 1995)		Chimiorésistance des carcinomes thyroïdiens anaplasiques résultant de la résistance à l'apoptose (Lavra et al., 2009)
RunX2 Activateur de la transcription (Li et al., 2006; Stock et al., 2003; Zhang et al., 2009)	Différenciation ostéoblastique Morphogenèse du squelette ...	Expression dans le squelette (Stock et al., 2003) Contribution à la progression des tumeurs pituitaires (Zhang et al., 2009) et des gliomes (Vladimirova et al., 2008)
HIF (Zeng et al., 2007)	Développement embryonnaire Survie des chondrocytes en hypoxie	Survie des chondrocytes dans leur milieu physiologiquement hypoxique, résultant de l'inhibition de leur apoptose (Risbud et al., 2010; Zeng et al., 2007)

Tableau XXI. Principales fonctions biologiques régulées par certains facteurs de transcription du gène LGALS3.

CREB : C-AMP Response Element-Binding protein (facteur de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc). **Sp-1** : specificity protein. **SIF-A, B, C** : Sis-Inducible Factor. **AP-1, 2, 4** : Activating Protein 1, 2, 4. **NFκB** : Nuclear Factor kappa B. **Runx2** Runt-related transcription factor. **HIF** : Hypoxia Inducible Factor. **HTLV-1** : Human T-Lymphotropic Virus (virus T-lymphotropique humain). **VIH** : virus de l'immunodéficience humaine.

3. Rôles biologiques de la galectine 3

Comme précédemment expliqué, la Gal-3 est une protéine clé dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. La plupart de ses fonctions biologiques découlent de sa propriété lectinique puisqu'*in vitro*, le lactose peut les inhiber de façon compétitive. Néanmoins, l'intégrité du domaine N-terminal et de la chaîne latérale est nécessaire pour moduler ces fonctions (Hsu and Liu, 2002; Ochieng et al., 1998). Selon sa localisation intra ou extracellulaire, selon les stimuli et les types cellulaires, cette lectine peut jouer des rôles différents.

3.1. Rôles biologiques de la galectine 3 intracellulaire

La Gal-3 intracellulaire (Gal-3 IC) régule l'expression de certains gènes, de même que le cycle, la croissance et la survie cellulaires (figure 49).

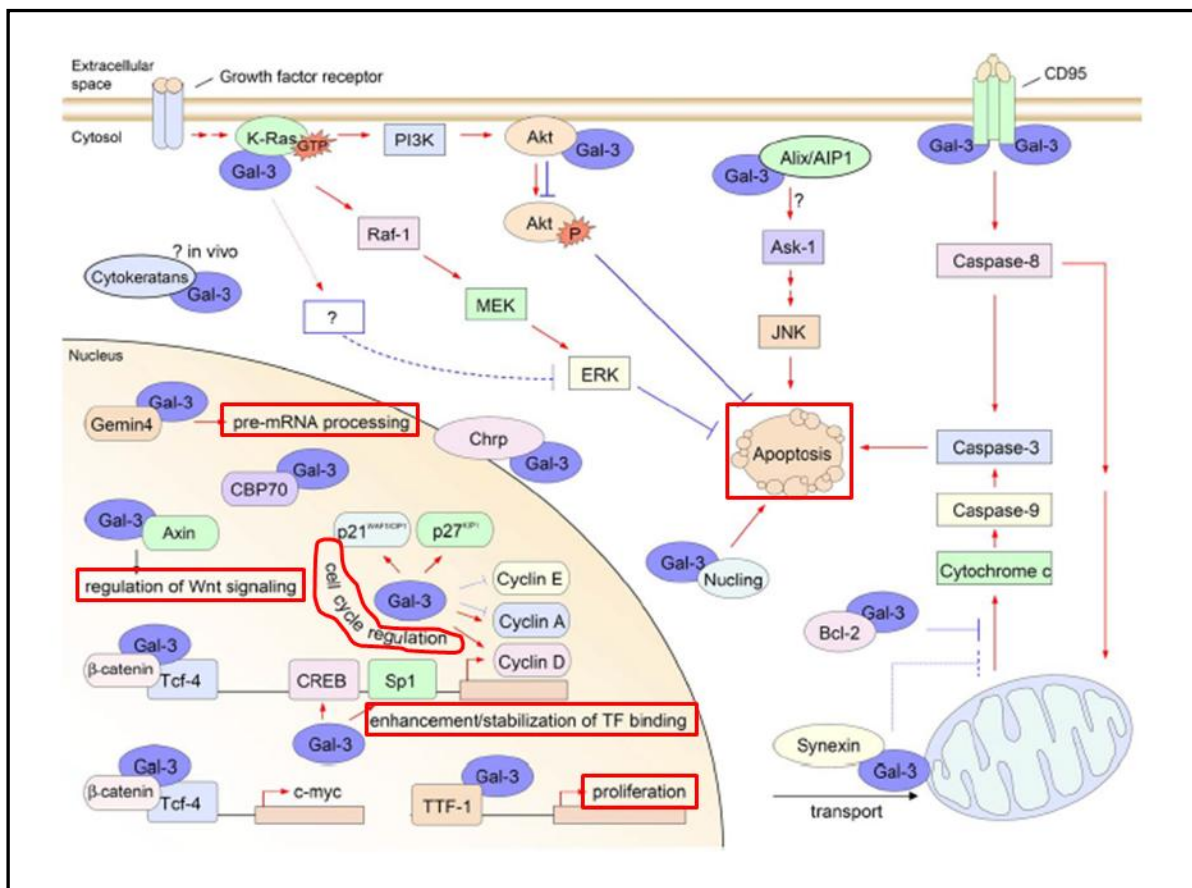


Figure 49. Fonctions de la Gal-3 intracellulaire.

Les principales fonctions de la Gal-3 intracellulaire sont encadrées / entourées en rouge. Les flèches rouges désignent les effets induits et les lignes bleues, les effets inhibés par la Gal-3. **Akt** : the serine/threonine kinase Akt. **Ask-1** : Apoptosis signal-regulating Kinase 1. **CBP70** : Carbohydrate Binding Protein 70. **Chrp** : Cystein and histidine-rich protein. **CREB** : C-AMP Response Element-Binding protein (facteur de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc). **ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase. **GTP** : Guanosine TriPhosphate. **JNK** : c-Jun NH2-terminal Kinase. **MEK** : Mitogen-activated protein ERK Kinase. **PI3K** : Phosphatidy-Inositol 3-Kinase. **Raf-1** : the serine/threonine kinase Raf-1. **Sp-1** : Specificity Protein. **Tcf-4** : T-cell Factor 4. **TF** : Transcription Factor. **TTF** : Thyroid-specific Transcription Factor (facteur de transcription spécifique de la thyroïde).

(Dumic et al., 2006)

3.1.1. Régulation de l'expression de gènes

La Gal-3 IC est un facteur clé intervenant au moment de la transcription et de la maturation des ARN. En effet, cette lectine est un trans-activateur de nombreux facteurs de transcription dont CREB, Sp-1, TTF-1 (spécifique de la thyroïde) et la β -caténine (impliquée dans la cancérogénèse) (**figure 49**). C'est à ce titre qu'elle peut, par exemple, induire sa propre expression et celle d'autres gènes régulant l'homéostasie cellulaire, et qu'elle joue un rôle clé dans la cancérogénèse de la thyroïde, de l'oropharynx, du colon, etc. (Dumic et al., 2006; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2013). Par ailleurs, la Gal-3 se lie au spliceosome (particules ribonucléoprotéiques) pour favoriser le bon déroulement de l'épissage des pré-ARNm (**figure 49**) (Dagher et al., 1995; Liu et al., 2002; Patterson et al., 2002).

3.1.2. Régulation du cycle, de la croissance et de la survie cellulaires

La Gal-3 est exprimée dès les phases précoces du cycle cellulaire et contribue à la progression de celui-ci vers l'interphase, en induisant l'expression des cyclines A et D (**figure 49**). En condition pathologique et selon le stimulus, la Gal-3 peut causer l'arrêt du cycle ou, au contraire, promouvoir la prolifération cellulaire, notamment pour les lymphocytes T (Dumic et al., 2006).

De plus, cette lectine est un facteur anti-apoptotique dans différents types de cellules saines (lymphocytes T, chondrocytes, macrophages) ou tumorales (lymphocytes B dans le lymphome de Burkitt, cellules épithéliales de carcinome mammaire) (Ahmad et al., 2004; Dumic et al., 2006; Hsu and Liu, 2002; Liu et al., 2002; Yang et al., 1996). Sa fonction anti-apoptotique s'explique par son homologie structurale avec le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Cecchinelli et al., 2006; Dumic et al., 2006). En effet, ces deux protéines sont riches en proline, glycine et alanine en position N-terminale, et contiennent le motif « anti-apoptotique » NWGR (Yang et al., 1996) en position C-terminale (**figure 50**).

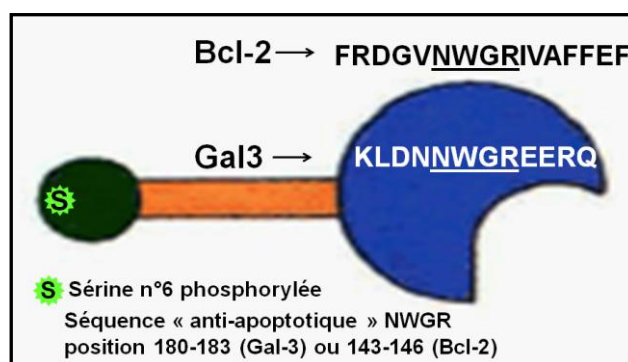


Figure 50. Homologie de structure entre la Gal-3 et Bcl-2.

La fonction anti-apoptotique de la Gal-3 IC s'explique par l'homologie de sa structure avec celle du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (séquence NWGR en C-terminal), et elle nécessite la phosphorylation de la sérine n°6. **NB** : le schéma n'est pas à l'échelle.

(Adapté d'Akahan et al., 1997; Yoshii et al., 2002)

Pour jouer son rôle de facteur anti-apoptotique, la Gal-3 doit également être phosphorylée au niveau de sa sérine n°6 (Yoshii et al., 2002). Sous cette forme, elle peut constituer un hétérodimère avec Bcl-2 (Cecchinelli et al., 2006), et ainsi bloquer l'homodimérisation des protéines pro-apoptotiques. Celles-ci ne peuvent donc plus déclencher la cascade de caspases responsables de la mort cellulaire (**figure 49**).

3.2. Rôles biologiques de la galectine 3 extracellulaire

La Gal-3 extracellulaire (Gal-3 EC) module l'adhésion, l'activation, la migration et la mort cellulaires (Dumic et al., 2006) et intervient ainsi dans de nombreux processus biologiques comme l'apoptose, l'adhésion et l'activation cellulaires, l'angiogénèse, l'invasion tumorale, etc. (**figure 51**).

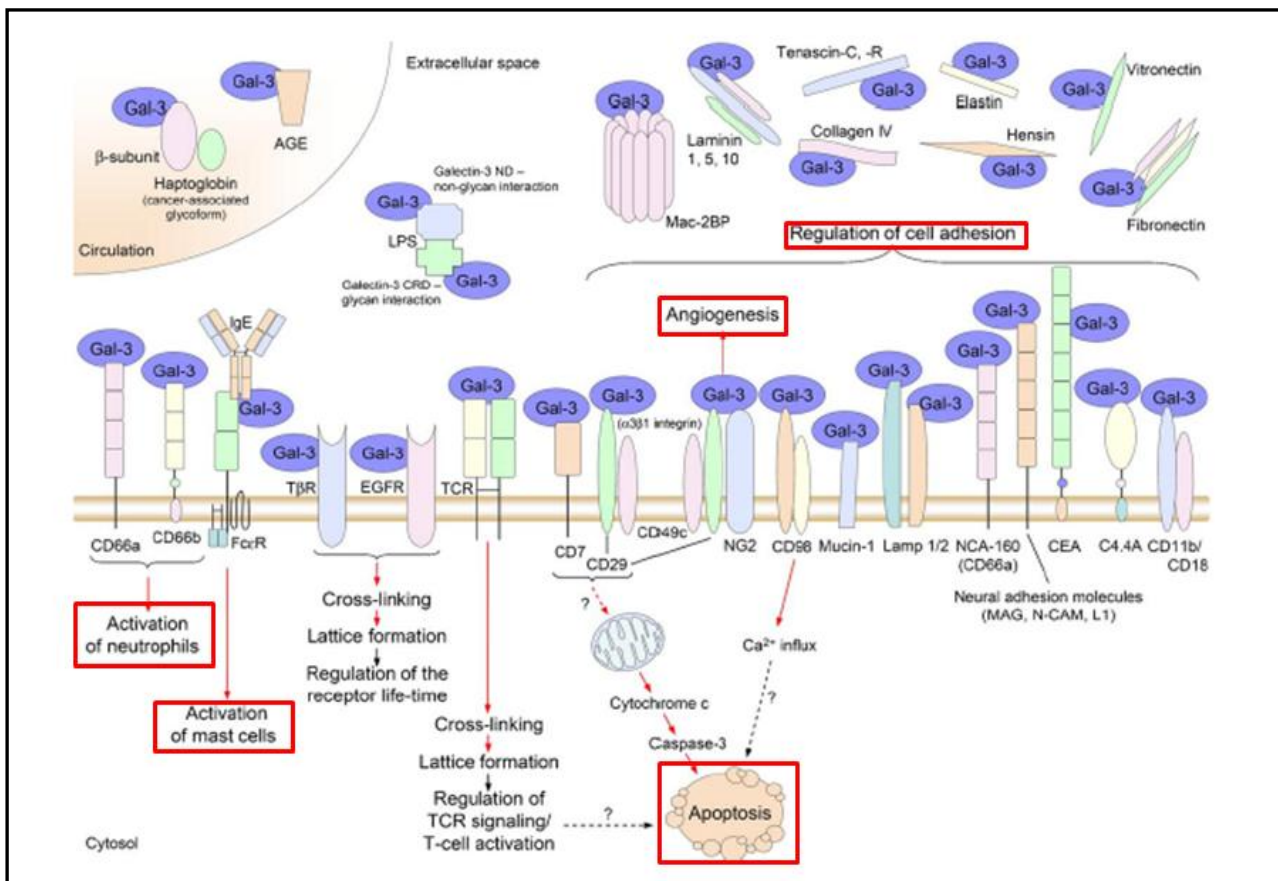


Figure 51. Rôles biologiques de la Gal-3 extracellulaire.

Les flèches rouges désignent les effets induits par la Gal-3. **AGE** : Advanced Glycation End products. **C4.4A** : the GPI-anchored glycoprotein C4.4A. **CEA** : Carcino Embryonic Antigen. **CRD** : Carbohydrate Recognition Domain. **EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor. **Fcγ** : Fcγ Receptor. **IgE** : immunoglobuline E. **L1** : neural adhesion molecule L1. **Lamp 1/2** : Lysosome Associated Membrane Protein 1/2. **LPS** : lipopolysaccharide. **Mac-2P** : Mac-2 Binding Protein. **MAG** : Myelin Associated Glycoprotein. **N-CAM** : Neural cell adhesion molecule. **NCA-160** : Non specific Cross reacting Antigen 160. **ND** : N-terminal domain. **NG2** : the transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan NG2. **TβR** : Transforming growth factor β Receptor. **TCR** : T-Cell receptor.

(Dumic et al., 2006)

3.2.1. Induction de l'apoptose

Contrairement à la Gal-3 IC, la Gal-3 EC joue un rôle pro-apoptotique, en particulier dans les lymphocytes T (**figure 51**) (Yang et al., 1996). La lectine interagit avec ces cellules par liaison au CD95 (Fas), une protéine transmembranaire impliquée dans l'apoptose (Dumic et al., 2006; Liu and Rabinovich, 2010).

3.2.2. Modulation de l'adhésion cellulaire

La Gal-3 EC module l'adhésion des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire (MEC) (**figure 51**) grâce à son interaction lectinique avec des glycoprotéines de la surface cellulaire ou de la MEC (**tableau XX**), mais aussi grâce à sa capacité à former des oligomères via son extrémité N-terminale (**figure 52**) (Dumic et al., 2006; Hughes, 2001; Nieminen et al., 2006; Ochieng et al., 2004). Cette fonction de la Gal-3 explique notamment qu'elle est capable de promouvoir l'adhésion des cellules tumorales à la MEC et de favoriser ainsi leur implantation (Dumic et al., 2006).

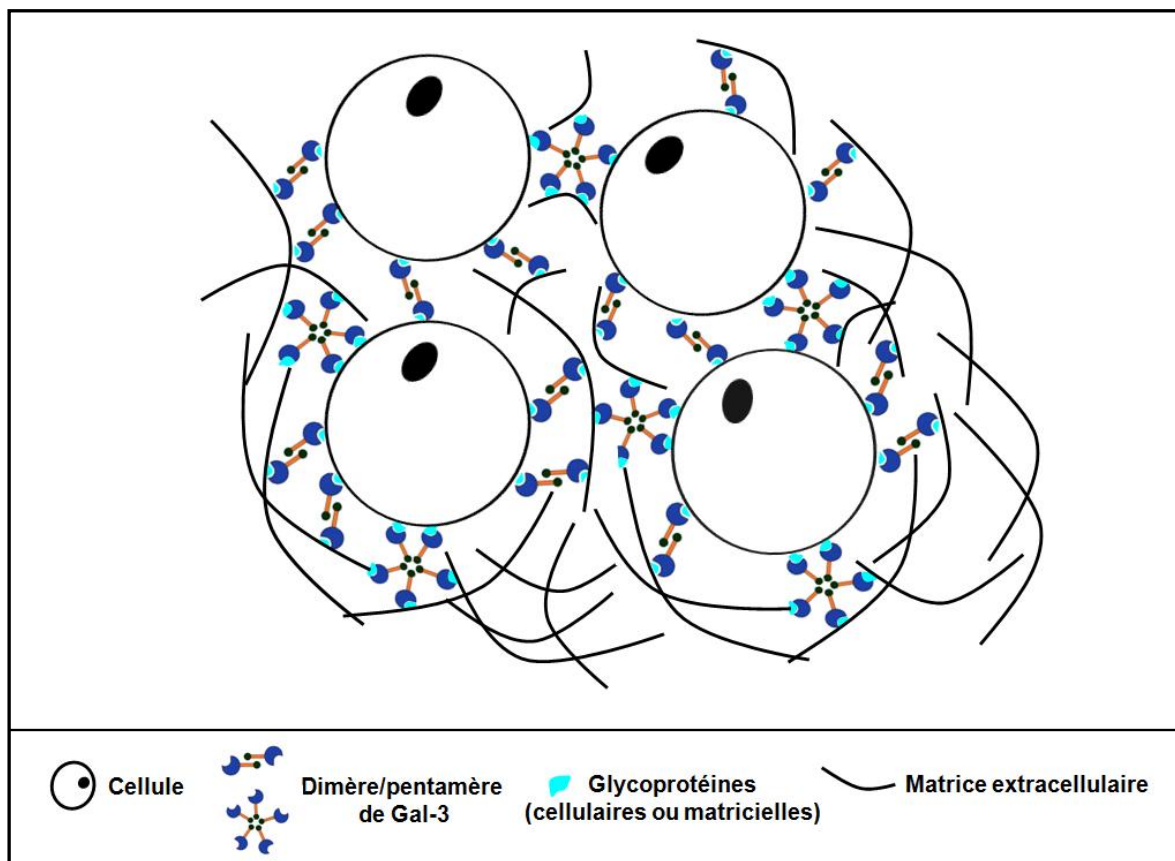


Figure 52. Modélisation de l'adhésion cellulaire médiée par la Gal-3.

La Gal-3 permet l'adhésion des cellules entre elles, mais aussi avec leur matrice extracellulaire. Cette adhésion fait intervenir la fonction lectinique de la protéine mais aussi sa capacité à former des oligomères en N-terminal. Ainsi, le CRD se lie aux glycoprotéines de la surface cellulaire ou de la matrice, tandis que les extrémités N-terminales de chaque monomère de Gal-3 interagissent avec un autre pour former des dimères ou des pentamères.

(Adapté d'Ahmad et al., 2004; Nieminen et al., 2006; Ochieng et al., 1993)

3.2.3. Activation cellulaire au cours de la réponse immuno-inflammatoire

Plusieurs études ont montré l'implication de la Gal-3 dans l'activation des cellules du système immunitaire (**figure 53**) (Dumic et al., 2006). Certaines d'entre elles, principalement les macrophages (MacKinnon et al., 2008), sécrètent de la Gal-3 en réponse à divers stimuli inflammatoires ou infectieux (Dumic et al., 2006). La Gal-3 sécrétée agit de façon auto ou paracrine pour promouvoir l'adhésion des polynucléaires neutrophiles aux cellules endothéliales (via des intégrines), la migration des monocytes vers le tissu lésé (Henderson and Sethi, 2009; Sano et al., 2000) et l'activation des macrophages dans ces tissus (MacKinnon et al., 2008). La Gal-3 joue ainsi un rôle positif dans l'immunité innée mais elle est aussi capable de favoriser l'évolution vers une inflammation chronique en activant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par différentes cellules immunitaires (Filer et al., 2009; Jeng et al., 1994; Silverman et al., 2012). Le rôle de la Gal-3 dans l'inflammation chronique est particulièrement important dans la physiopathologie de l'OA et de la PAR.

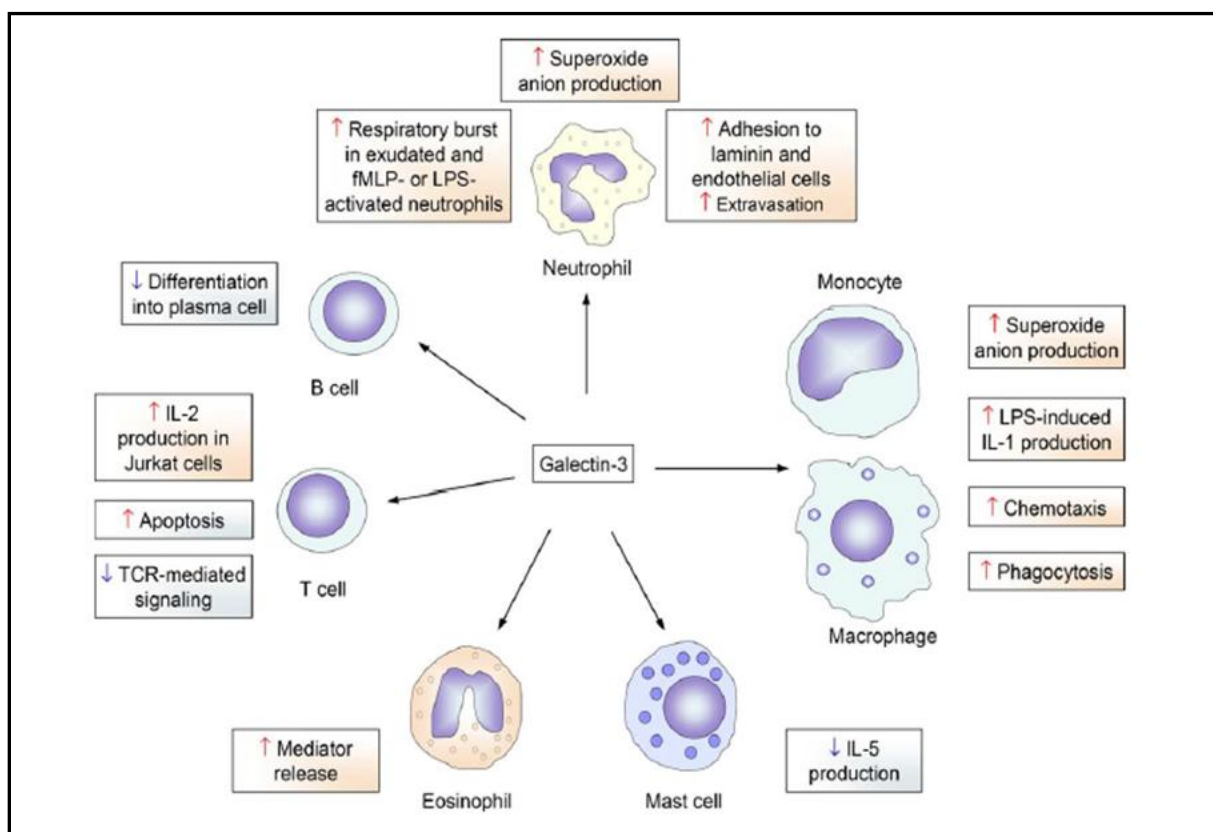


Figure 53. Effets de la Gal-3 sur les cellules immunitaires.

Les flèches rouges désignent les effets induits et les bleues, les effets inhibés par la Gal-3. Les rectangles colorés en rouge représentent les effets pro-inflammatoires et ceux colorés en bleu, les effets anti-inflammatoires de la Gal-3. **fMLP** : formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine. **LPS** : lipopolysaccharide. **IL** : interleukine. **TCR** : T-Cell Receptor.

(Dumic et al., 2006)

4. Rôles de la galectine 3 dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose

4.1. Données cliniques obtenues chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou d'arthrose

4.1.1. Expression intra-articulaire de la galectine 3

Comparés à des sujets sains, les patients atteints de PAR ou d'OA expriment plus de Gal-3 dans le cartilage (**figure 54**) et la synoviale (Guévremont et al., 2004; Ohshima et al., 2003). L'expression de Gal-3 par les fibroblastes (FS) et macrophages synoviaux (MS) (Dasuri et al., 2004; Sato and Hughes, 1994) est augmentée suite à un stimulus pro-inflammatoire puisque, chez les patients OA, la lectine n'est fortement exprimée dans la synoviale qu'en cas d'infiltration leucocytaire (Ohshima et al., 2003; Reboul et al., 2004). Cette surexpression se traduit par une accumulation intracellulaire de la lectine entraînant une résistance des FS et MS pathologiques à l'apoptose ainsi que leur prolifération. Les FS sont ainsi capables d'envahir le cartilage, en se liant à une protéine matricielle (COMP : *cartilage oligomeric matrix protein*), ce qui leur fait exprimer encore plus de Gal-3 (Neidhart et al., 2005). La surexpression protéique de cette lectine est, par conséquent, associée au contexte inflammatoire de l'OA et de la PAR, et à l'invasion du cartilage par la synoviale.

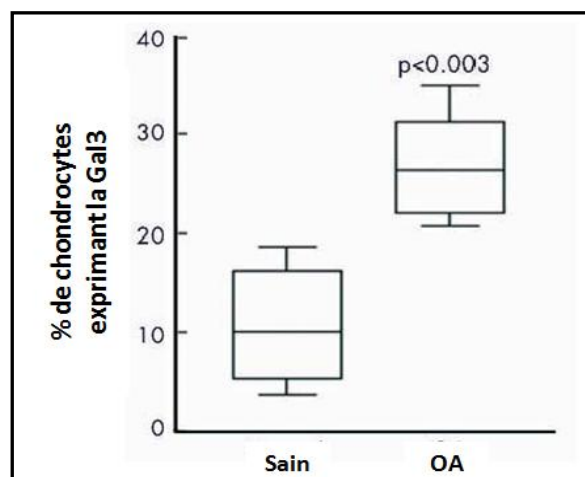


Figure 54. Expression de Gal-3 dans le cartilage de patients arthrosiques.

Le pourcentage de chondrocytes exprimant de la Gal-3 a été déterminé par immuno-histochimie.

(Guévremont et al., 2004)

4.1.2. Sécrétion synoviale et sérique de la galectine 3

Les FS et MS activés par des stimuli inflammatoires sont capables de sécréter des Ck pro-inflammatoires et des MMP (Filer et al., 2009; Pap et al., 2000), ainsi que de la Gal-3 (Neidhart et al., 2005; Ohshima et al., 2003).

Les concentrations synoviales et sériques de la lectine sont significativement plus élevées chez des patients atteints d'OA (Alturfan et al., 2008) ou de PAR (Ohshima et al., 2003) que chez des sujets sains (**figure 55**). De plus, ces concentrations sont corrélées à celles de la protéine C-réactive (Ohshima et al., 2003), ainsi qu'à l'indice de Larsen (score radiologique) (Ezzat et al., 2011). Ces travaux suggèrent un rôle pro-inflammatoire de la Gal-3 dans physiopathologie de l'OA et de la PAR.

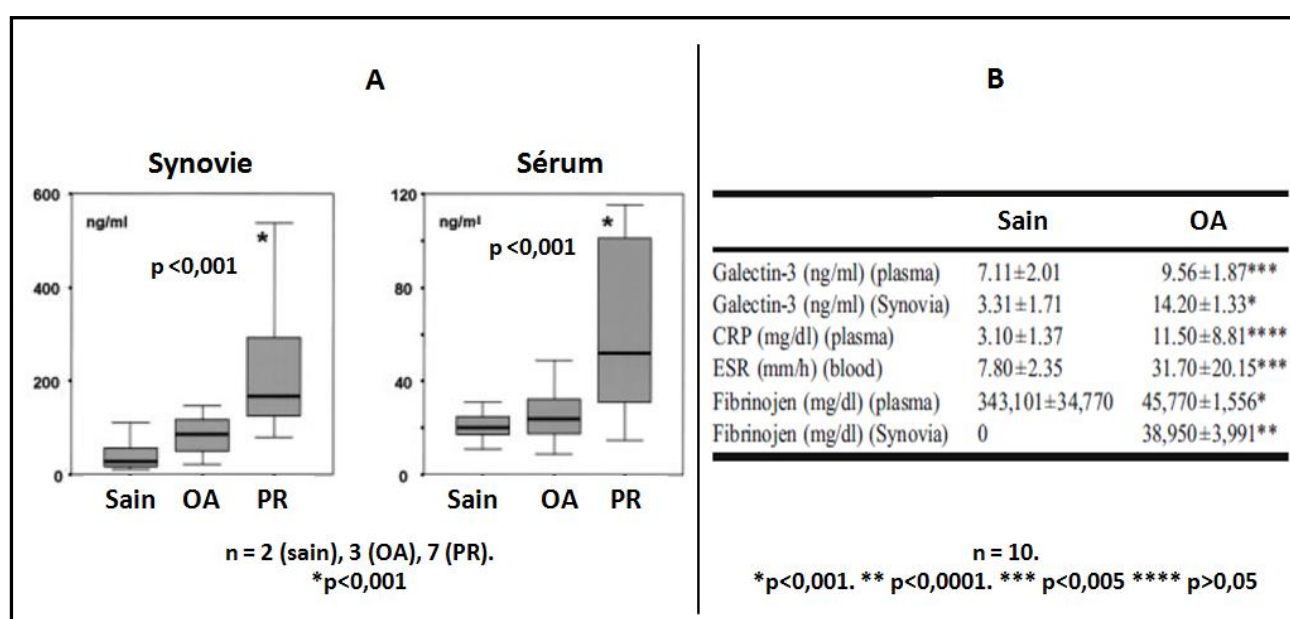


Figure 55. Concentrations synoviales et sériques de la Gal-3 chez des patients atteints d'OA ou de PAR.

CRP : C-Reactive Protein (protéine C-réactive). **ESR** : Erythrocyte Sedimentation Rate (vitesse de sédimentation des érythrocytes).

(Ohshima et al., 2003 (A) ; Alturfan et al., 2008 (B))

4.1.3. Synthèse des données cliniques

Les données cliniques suggèrent que la Gal-3, exprimée et sécrétée au niveau intra-articulaire, pourrait être impliquée dans la physiopathologie de l'OA et de la PAR, en modulant les phénomènes inflammatoires et de dégradation du cartilage. Plusieurs travaux expérimentaux sur l'animal ou des cellules articulaires humaines ont permis d'identifier le rôle exact de la Gal-3 dans ces phénomènes.

4.2. Données expérimentales obtenues chez l'animal

4.2.1. Injection de galectine 3 recombinante chez la souris saine

Chez des souris WT (*wild type* : sauvages) saines, la Gal-3 injectée dans un genou induit l'inflammation de la patte ainsi que des lésions de type arthrosique (Janelle-Montcalm et al., 2007). En effet, l'analyse histologique d'une section du genou montre des modifications structurales du cartilage et de l'os sous-chondral (**figure 56**). Le cartilage est aminci par endroits, appauvri en protéoglycanes matriciels et en chondrocytes, et ces derniers sont regroupés en *clusters* et non plus alignés verticalement. L'os sous-chondral quant à lui, fait l'objet d'un remodelage. L'ensemble de ces données met en évidence un rôle délétère de la Gal-3 EC sur l'articulation.

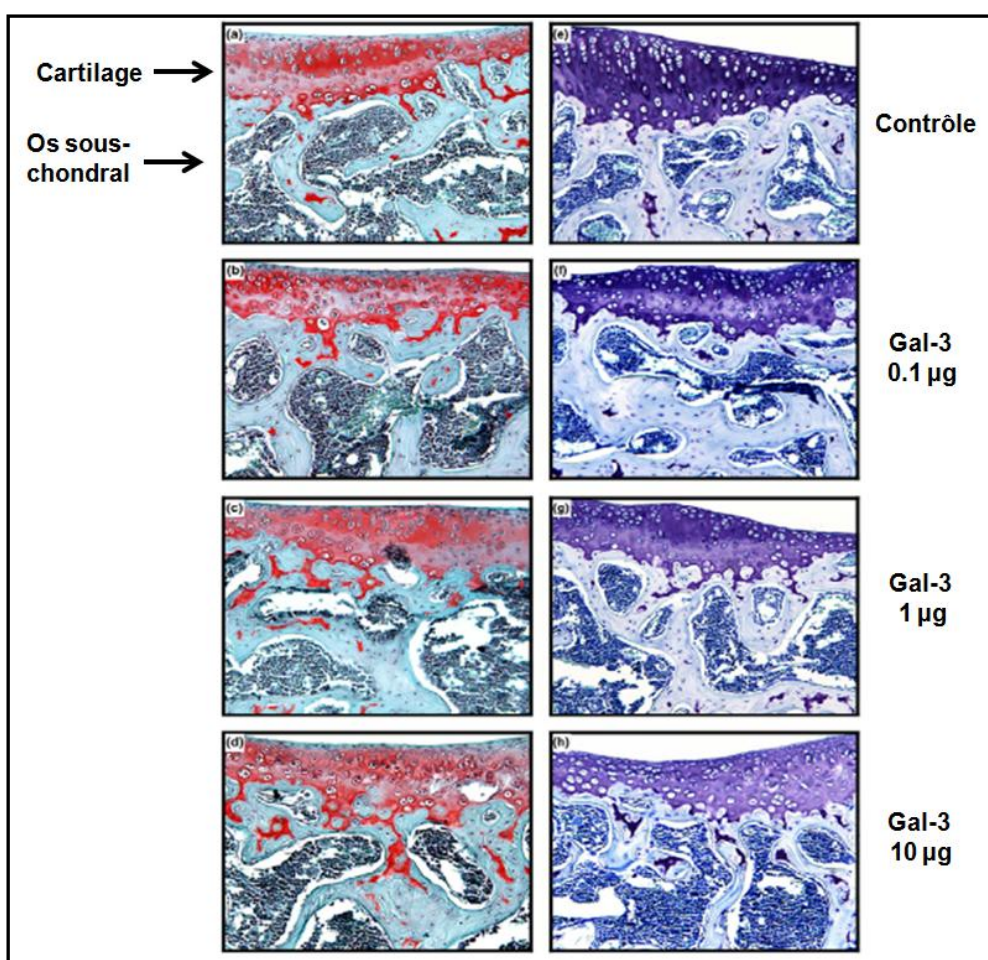


Figure 56. Effets de la Gal-3 injectée dans les genoux de souris WT.

Quatre jours après l'injection de Gal-3 dans les genoux de souris WT, des sections de ces genoux ont été colorées par la safranine O (coloration rose des protéoglycanes, à gauche) ou par le bleu de toluidine (coloration bleue des glycosaminoglycanes, à droite). Au niveau du cartilage, la Gal-3 injectée provoque un amincissement, une perte des protéoglycanes (colorations moins denses), une hypocellularité et une modification de la disposition des chondrocytes (regroupés en *clusters* et non plus alignés verticalement). Elle provoque également un épaissement et un remodelage de l'os sous-chondral.

(Janelle-Montcalm et al., 2007)

4.2.2. Invalidation permanente de la galectine 3 chez la souris

Chez l'animal sain

Chez des souris saines, l'invalidation génique permanente de la Gal-3 (Gal-3 KO : *knock-out*) engendre des lésions de type arthrosique au niveau du cartilage (irrégularité de sa surface, amincissement, perte des protéoglycanes matriciels, hypocellularité...) et de l'os sous-chondral (remodelage) (**figure 57**).

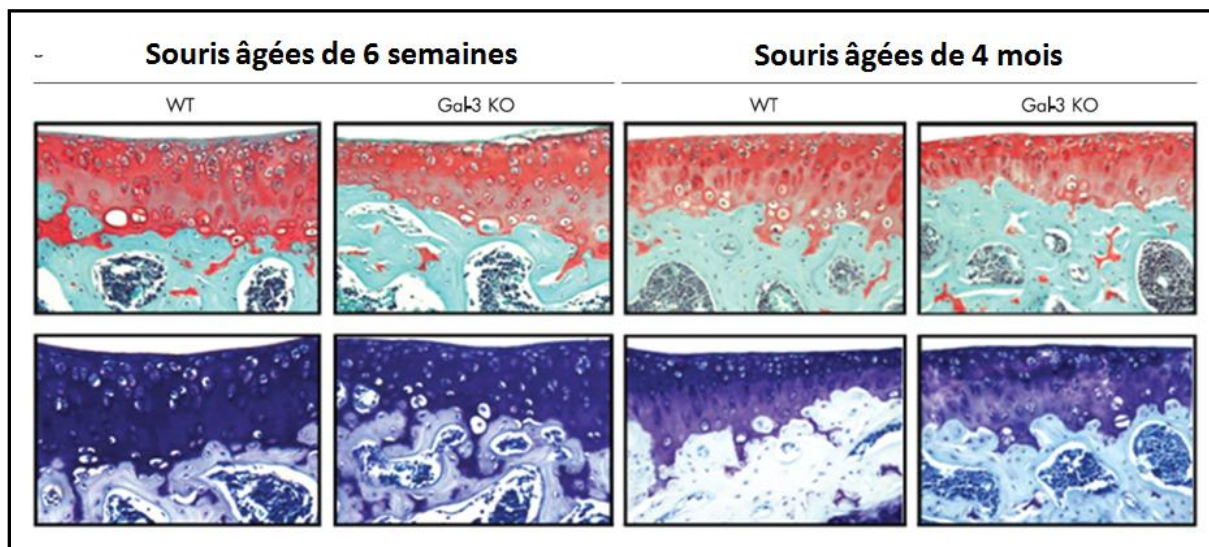


Figure 57. Effets articulaires de l'invalidation génique permanente de la Gal-3 chez des souris.

Des coupes histologiques de l'articulation de souris sauvages (WT) ou invalidées pour la Gal-3 (Gal-3 KO) ont été colorées par safranine O (coloration rose des protéoglycanes, en haut) ou par bleu toluidine (coloration bleue des glycosaminoglycanes, en bas). Comparé à celui des souris WT, le cartilage des souris Gal-3 KO est un peu moins épais, les protéoglycanes moins nombreux (colorations moins denses), les chondrocytes sont moins nombreux et leur disposition est différentes (ils sont regroupés en « clusters » et non plus alignés verticalement).

(Boileau et al., 2008)

En complément de ces expériences d'invalidation, des cellules ATDC5 (lignée chondrogénique murine n'exprimant pas de Gal-3 endogène) ont été transfectées avec un vecteur d'expression de Gal-3, puis incubées avec un inducteur d'apoptose. Les résultats montrent que la mortalité des cellules ATDC5 surexprimant la Gal-3 est inférieure à celle des cellules ATDC5 transfectées avec un vecteur vide (**figure 58**), ce qui confirme le rôle anti-apoptotique connu de la Gal-3 intracellulaire (Liu et al., 2002).

Les données obtenues chez l'animal sain et à l'issue de la transfection des cellules ATDC5 suggèrent que la Gal-3 IC joue un rôle bénéfique dans l'homéostasie du cartilage et la survie des chondrocytes. Ainsi, toute inhibition de son expression induit des lésions articulaires de type arthrosique (Boileau et al., 2008).

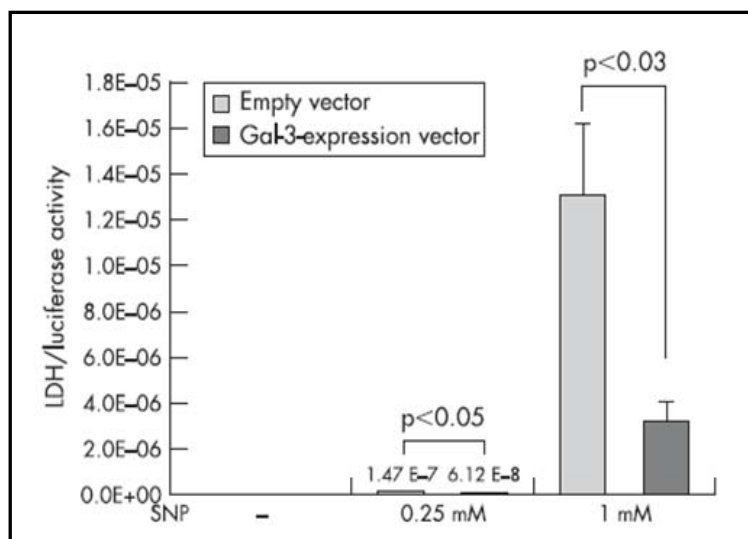


Figure 58. Rôle de la Gal-3 intracellulaire dans la survie de cellules chondrogéniques.

Des cellules ATDC5 (lignée chondrogénique murine n'exprimant pas de Gal-3 endogène) ont été transfectées avec un vecteur d'expression de la Gal-3 ou un vecteur vide (*empty vector*). Toutes les cellules ont été co-transfectées par un vecteur d'expression de la luciférase pour permettre de normaliser l'efficacité de transfection. Les cellules transfectées ont ensuite été incubées avec 0.25 à 1 mM de nitroprussiate de sodium (inducteur de mort cellulaire) et, la mortalité cellulaire a été évaluée et exprimée en activité de la lactate déshydrogénase rapportée à l'activité de la luciférase).

(Boileau et al., 2008)

Dans un modèle d'arthrose induite par le mono-iodoacétate

Le mono-iodoacétate (MIA) est un composé chimique permettant de générer des arthroses expérimentales par injection intra-articulaire, notamment chez la souris (**figure 59**).

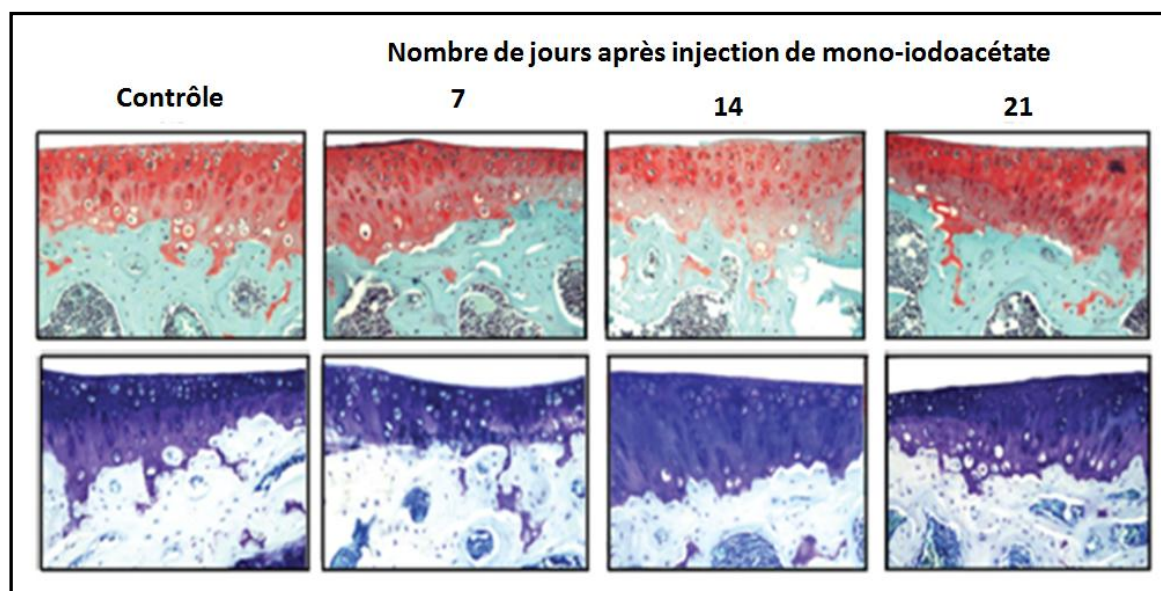


Figure 59. Effets articulaires d'une injection de mono-iodoacétate à des souris WT.

L'injection de 10 µg de mono-iodoacétate dans le genou de souris WT permet de créer un modèle d'arthrose expérimentale. Les coupes histologiques des genoux traités ont été colorées par la safranine O (en haut) ou par le bleu de toluidine (en bas).

(Boileau et al., 2008)

Chez les souris Gal-3 KO, le MIA n'aggrave pas les lésions déjà générées par l'invalidation génique (**figure 60**) (Boileau et al., 2008), probablement du fait de l'inhibition de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires liée à la déplétion de Gal-3. En effet, les travaux de Hsu et coll. (2000) ont démontré que les souris Gal-3 KO développent moins d'inflammation que les souris WT, ce qui suggère que la Gal-3 IC pourrait concourir à l'inflammation observée au cours de l'OA.

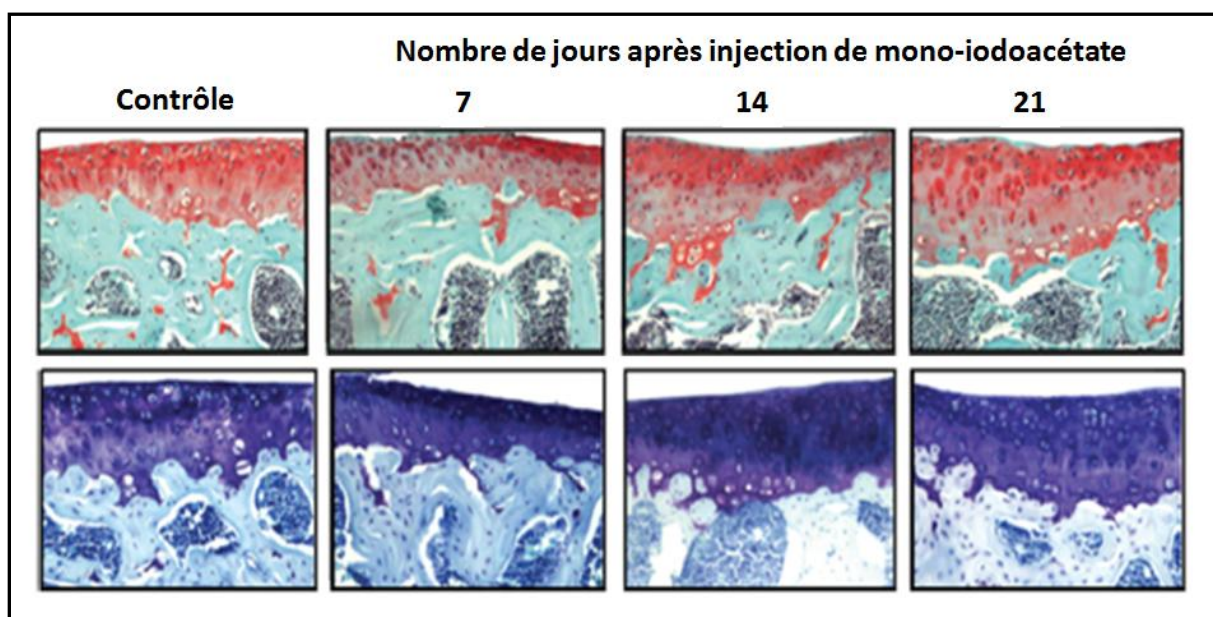


Figure 60. Effets articulaires d'une injection de mono-iodoacétate à des souris Gal-3 KO.

L'injection de mono-iodoacétate dans le genou de souris Gal-3 KO n'engendre pas plus de lésions de type arthrosique que l'invalidation permanente elle-même. Colorations par la safranine O (en haut) ou par le bleu de toluidine (en bas).

(Boileau et al., 2008)

Dans le modèle d'arthrite induite à l'antigène (modèle AA)

Chez des souris Gal-3 KO, lorsqu'une arthrite est induite, celle-ci est moins sévère que chez les souris WT (Forsman et al., 2011). En effet, l'hyperplasie synoviale, l'altération du cartilage et l'érosion osseuse sont moins prononcées (**figure 61, A et B**). De plus, les concentrations sériques de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-17, TNF- α) sont inférieures (**figure 62, A et B**), et le nombre de lymphocytes T est plus faible. Lorsque de la Gal-3 recombinante exogène est injectée par voie intra-péritonéale à des souris Gal-3 KO, la sévérité des lésions articulaires et le niveau de production de Ck pro-inflammatoires deviennent similaires à ceux observés chez les souris WT (**figures 61, C et 62, C**).

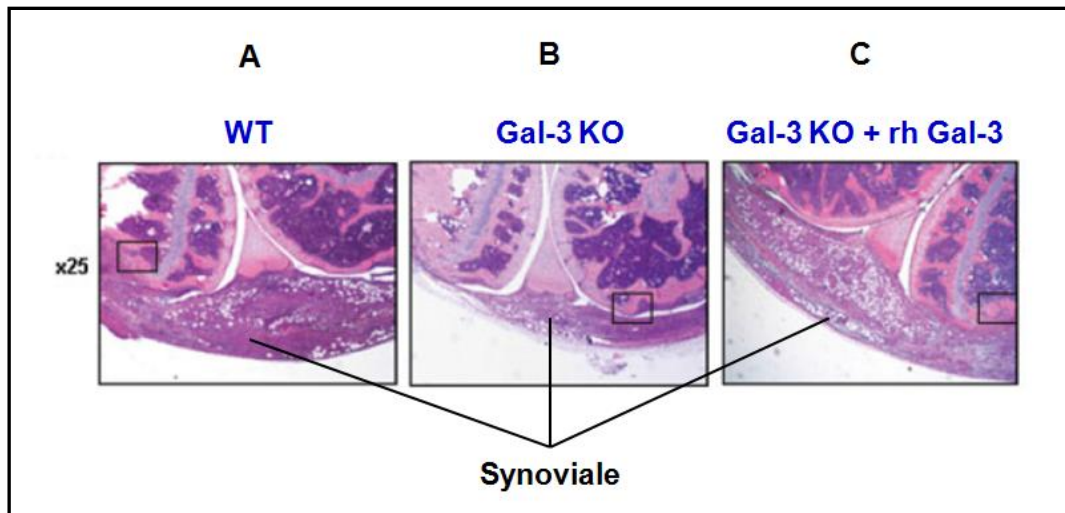


Figure 61. Effets articulaires de l'invalidation permanente de la Gal-3 chez des souris arthritiques (modèle AA).

Chez des souris Gal-3 KO (B), l'arthrite est moins sévère que chez des souris WT (A) : l'inflammation synoviale (et l'érosion osseuse) sont moindres. Lorsque de la Gal-3 recombinante humaine (rh Gal-3) est injectée dans les genoux des souris Gal-3 KO (C), la sévérité de l'arthrite devient comparable à celle observée chez les souris WT (A).

(Forsman et al., 2011).

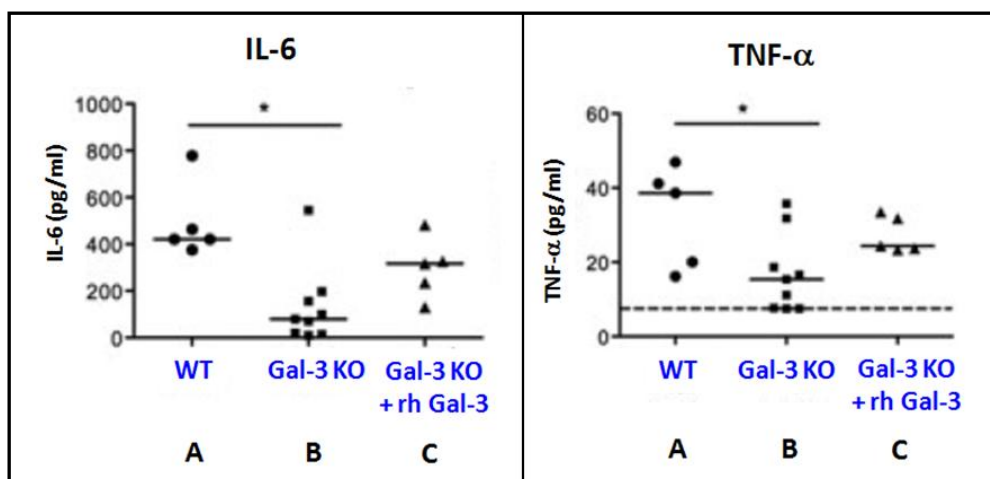


Figure 62. Effets de l'invalidation permanente de la Gal-3 sur les concentrations sériques d'IL-6 et de TNF-α produites par des souris arthritiques (modèle AA).

Chez des souris Gal-3 KO (B), les concentrations sériques d'IL-6 et de TNF-α sont significativement inférieures à celles mesurées chez les souris WT (A). Lorsque de la Gal-3 recombinante humaine (rh Gal-3) est injectée dans les genoux des souris Gal-3 KO (C), ces concentrations tendent à augmenter vers celles observées chez les souris WT (A).

(Forsman et al., 2011).

Les travaux réalisés chez la souris Gal-3 KO arthritique démontrent que la Gal-3 participe activement à la physiopathologie de l'arthrite à l'antigène et donc, probablement de la PAR. En effet, l'invalidation permanente de la Gal-3 diminue la sévérité de l'arthrite tandis que l'ajout de Gal-3 exogène restaure partiellement sa gravité.

4.2.3. Invalidation transitoire de la galectine 3 chez le rat, dans un modèle d'arthrite au collagène

Les travaux de Wang et coll. (2010) ont mis en évidence la surexpression de la protéine Gal-3 dans la synoviale des rats WT arthritiques (comparés aux rats sains), ce qui a permis de déduire que la Gal-3 pourrait être impliquée dans la pathogenèse de l'arthrite au collagène. Par la suite, cette équipe a cherché à identifier le rôle exact de cette lectine en inhibant son expression par la technique d'ARN interférence (shGal-3). Les résultats ont montré que chez des rats déplétés transitoirement en Gal-3, l'arthrite est moins sévère que chez des rats sauvages, en termes de manifestations clinique, radiologique et histologique (Wang et al., 2010). En effet, le score artulaire, calculé selon l'intensité de l'inflammation et des déformations articulaires, diminue de façon dose-dépendante chez les rats shGal-3 (**figure 63, A**). De plus, la radiographie des pattes arthritiques montre que les rats shGal-3 ont significativement moins d'érosion osseuse que les rats WT (résultats objectivés par le score radiologique (**figure 63, B**)).

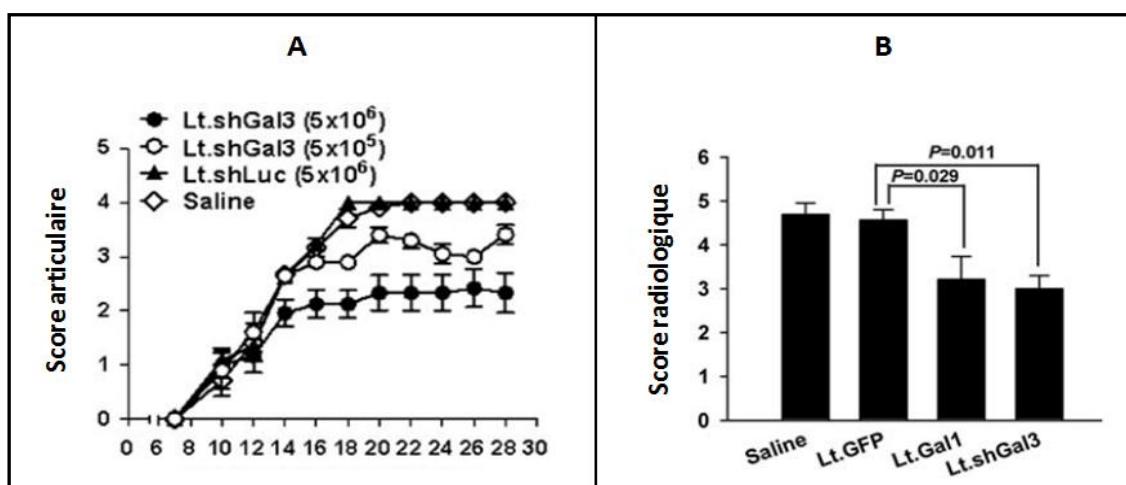


Figure 63. Effets de l'invalidation transitoire de la Gal-3 sur les scores artulaire et radiologique calculés au niveau des chevilles de rats arthritiques (modèle CIA).

Des lentivirus vectorisant des shARN Gal-3 (ou l'ARN Gal-1) ont été injectés localement dans des chevilles de rats (concentrations en unités de transduction) arthritiques (arthrite au collagène). Les scores artulaire et radiologique ont ensuite été calculés : la déplétion en Gal-3 diminue ces scores, ce qui traduit une moindre atteinte articulaire. **Saline** : tampon PBS (contrôle). **Lt** : Lentivirus. **Lt.shLuc** : sh luciférase (contrôle). **Lt.shGFP** : sh GFP (protéine de fluorescence verte : contrôle). **Lt.shGal-3** : sh Gal-3. **Lt.Gal-1** : Gal-1.

(Wang et al., 2010).

Par ailleurs, les analyses histologiques ont également montré que chez les rats shGal-3, l'infiltration leucocytaire et l'hyperplasie synoviale sont plus modérées et qu'il n'y a pas d'invasion du cartilage par la synoviale (**figure 64, A et B**). De plus, chez ces rats, la densité des micro-vaisseaux synoviaux est inférieure à celle des rats WT (**figure 64, C**), ce qui va dans le sens d'une atténuation de l'inflammation synoviale.

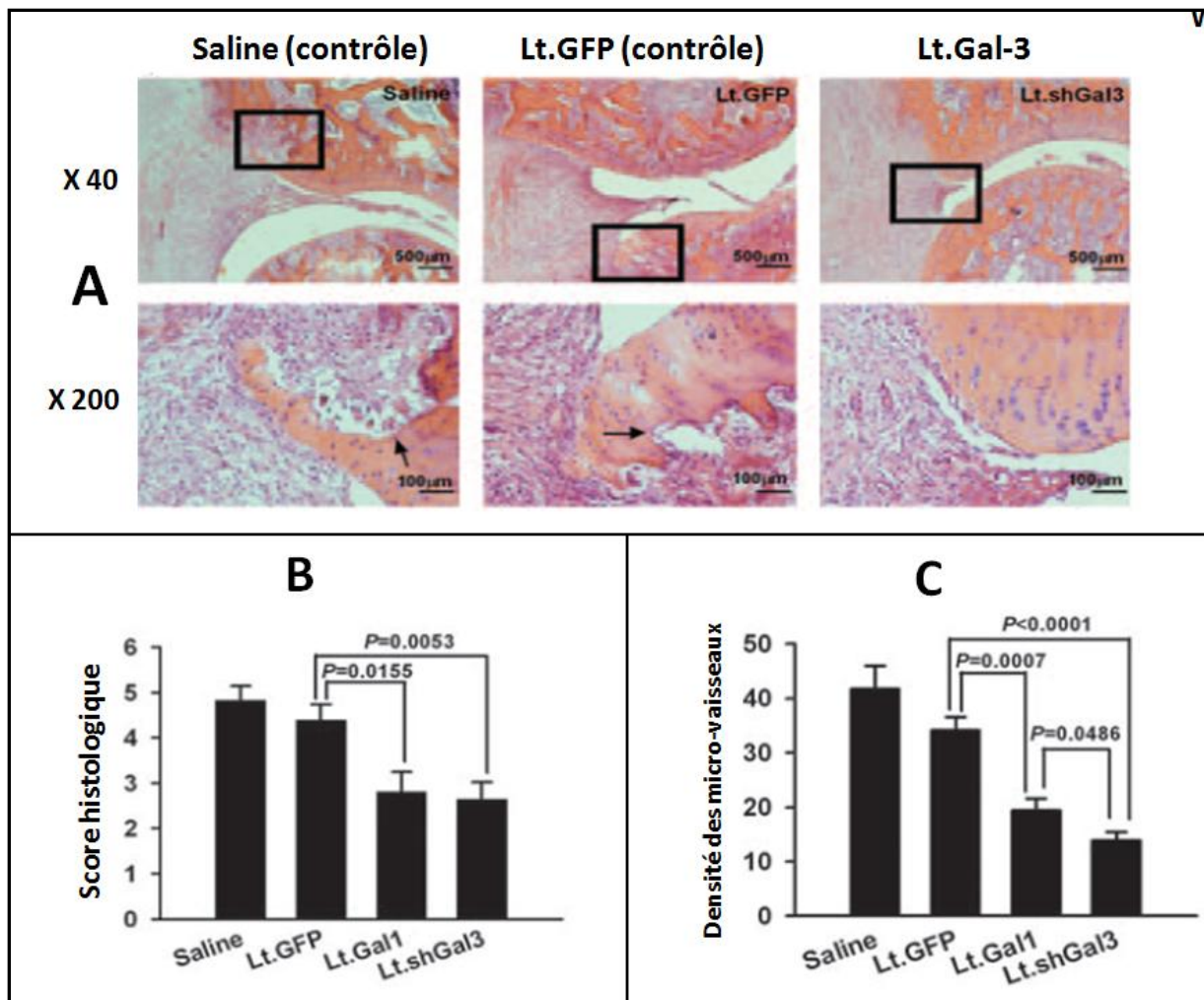


Figure 64. Effets histologiques de l'inactivation transitoire de la Gal-3 observés au niveau des chevilles de rats arthritiques (modèle CIA).

A : coupes histologiques de chevilles. Les zones encadrées (grossissement 40) et les flèches (grossissement 200) situent l'interface entre membrane synoviale, cartilage et os sous-chondral. Chez les rats sh Gal-3, il n'y a ni pannus synovial ni invasion du cartilage ou de l'os sous-chondral, comparés aux rats contrôles. **B** : score histologique (calculé au niveau de la membrane synoviale, en tenant compte de l'inflammation de l'invasion des tissus alentours). De manière cohérente avec les résultats des coupes histologiques, le score histologique est significativement inférieur chez les rats sh Gal-3 comparés aux rats contrôles. **C** : Densité des micro-vaisseaux. Dans l'articulation des rats sh Gal-3, il y a moins de micro-vaisseaux, donc moins d'angiogénèse synoviale que chez les rats contrôles. **Saline** : tampon PBS (contrôle). **Lt** : Lentivirus. **Lt.shGFP** : sh GFP (protéine de fluorescence verte : contrôle). **Lt.shGal-3** : sh Gal-3. **Lt.Gal-1** : Gal-1.

(Wang et al., 2010).

En outre, des analyses immuno-histochimiques ont révélé une diminution du nombre de lymphocytes T dans l'infiltrat leucocytaire de la synoviale des rats shGal-3 (**figure 66**). Ce résultat s'explique sûrement par le fait que la déplétion de Gal-3 IC provoque l'apoptose de ces cellules (Yang et al., 1996).

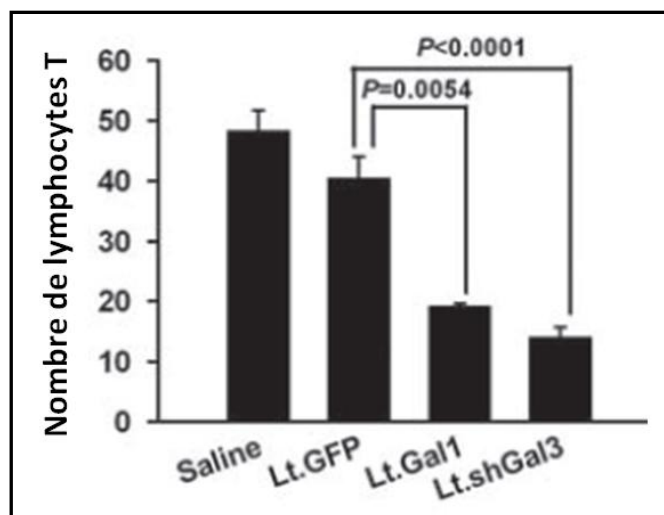


Figure 65. Effets de l'inactivation transitoire de la Gal-3 sur le nombre de lymphocytes T synoviaux des chevilles de rats arthritiques (modèle CIA).

Les coupes de la synoviale illustrées sur la figure 65, A nt été soumises à des analyses immuno-histochimiques pour pouvoir déterminer le nombre de cellules T CD3+ présentes dans l'infiltrat synovial. La déplétion en Gal-3 s'accompagne d'une diminution de plus de moitié du nombre de lymphocytes T dans la synoviale. **Saline** : tampon PBS (contrôle). **Lt** : Lentivirus. **Lt.shGFP** : sh GFP (protéine de fluorescence verte : contrôle). **Lt.shGal-3** : sh Gal-3. **Lt.Gal-1** : Gal-1.

(Wang et al., 2010).

En résumé, l'inactivation transitoire de la Gal-3 dans la membrane synoviale améliore les symptômes de l'arthrite expérimentale, ce qui suggère que cette lectine participerait au développement de l'inflammation au cours de la polyarthrite rhumatoïde.

4.2.4. Synthèse des données expérimentales

L'ensemble des données expérimentales met en évidence une différence du rôle de la Gal-3 dans l'articulation, en fonction des cellules concernées et de sa localisation intra ou extracellulaire. Ainsi, en intracellulaire, la Gal-3 protège les chondrocytes et les lymphocytes T contre l'apoptose. Dans le cas des chondrocytes, l'activité anti-apoptotique de la Gal-3 IC est bénéfique puisqu'elle permet de maintenir l'homéostasie du cartilage. En revanche dans le cas des lymphocytes T, cette activité n'est pas forcément bénéfique car elle contribue à la survie de cellules impliquées dans la physiopathologie de l'arthrite. Par ailleurs, dans le milieu extracellulaire, la Gal-3 concourt à la production de Ck pro-inflammatoires et au développement de lésions de type arthrosique ou arthritique.

4.3. Effets de la galectine 3 recombinante sur les cellules articulaires humaines

En présence de Gal-3 recombinante humaine (10 µg), les fibroblastes synoviaux (FS) des patients atteints de PAR produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α), un facteur de croissance des lignées leucocytaires (GM-CSF), ainsi que des facteurs chémo-attractants pour les polynucléaires neutrophiles (CXCL8), les monocytes, les lymphocytes T et les cellules dendritiques (CCL2, CCL3, CCL5) (Filer et al., 2009) (**figure 66**). Tous ces facteurs peuvent induire leur propre synthèse en activant les FS et les macrophages synoviaux (MS) (Sweeney and Firestein, 2004), ce qui engendre une boucle d'amplification de l'inflammation.

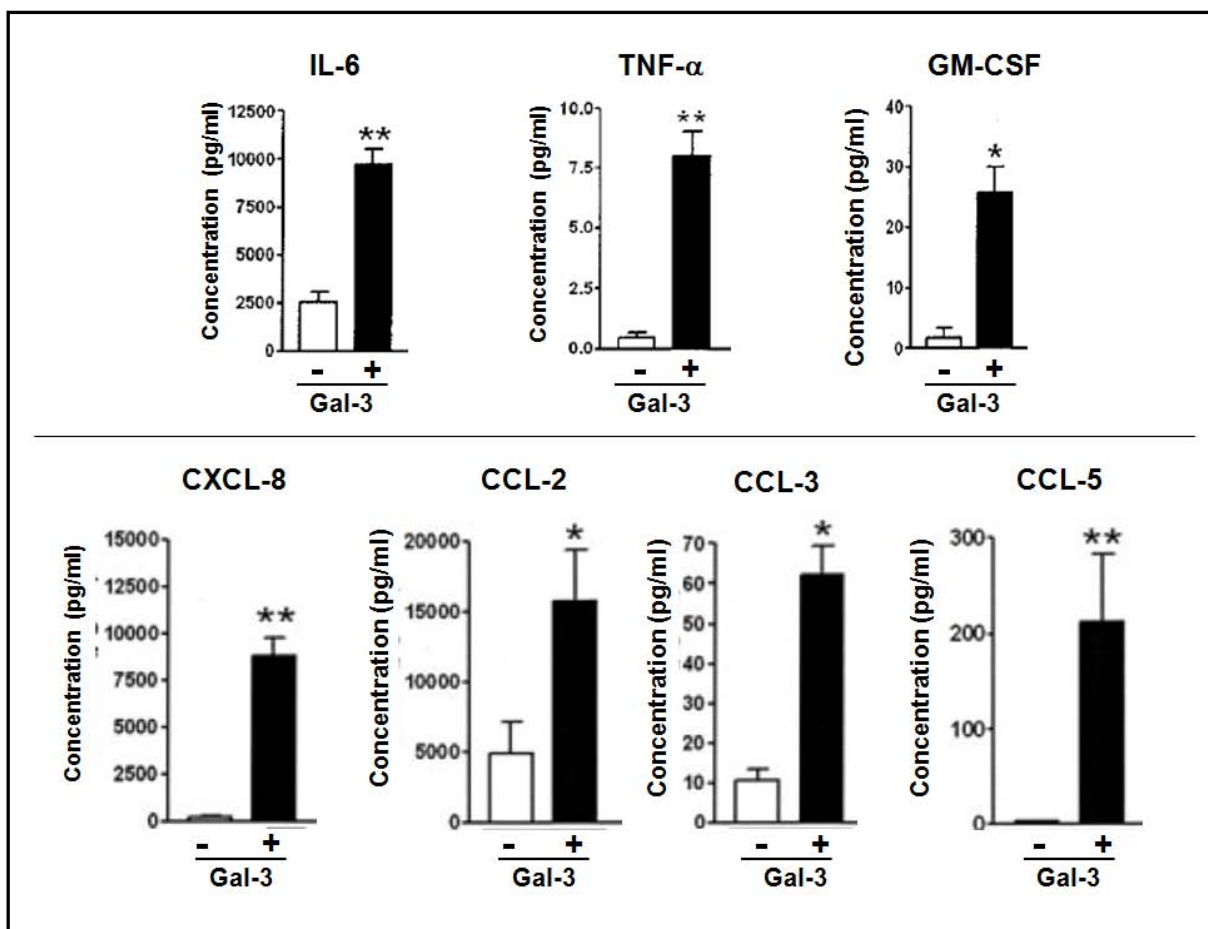


Figure 66. Production *in vitro* de cytokines par des fibroblastes synoviaux de patients atteints de PAR.

Les FS de patients atteints de PR ont été cultivés en présence ou en absence de Gal-3, et les Ck sécrétées dans le surnageant de culture ont été dosées par une méthode immuno-enzymatique (ELISA). **IL-6** : interleukine 6. **TNF- α** (*Tumor Necrosis Factor*) : facteur de nécrose tumorale. **GM-CSF** (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) : facteur de croissance des leucocytes. **CXCL-8** (*chemokine (C-X-C motif) ligand 8*) : facteur chémo-attractant des neutrophiles. **CCL-2/CCL-3/CCL-5** (*chemokine (C-C motif) ligand 2/3/5*) : facteurs chémo-attractants des monocytes, lymphocytes et cellules dendritiques.

(Filer et al., 2009)

Par ailleurs, la Gal-3 recombinante induit la surexpression d'enzymes de dégradation du cartilage (MMP-3, ADAMTS-5) par les FS de patients atteints de PAR (Filer et al., 2009) ou par les chondrocytes de patients atteints d'OA (Janelle-Montcalm et al., 2007) (**figure 67**).

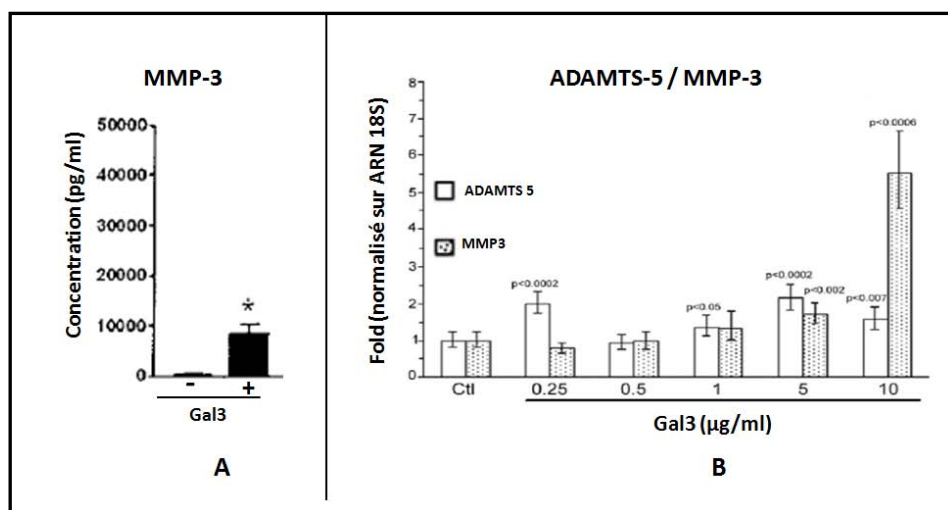


Figure 67. Production *in vitro* d'enzymes de dégradation du cartilage par des fibroblastes synoviaux de patients atteints de PAR et par des chondrocytes de patients atteints d'OA.

Les fibroblastes synoviaux de patients atteints de PAR (A) et les chondrocytes de patients atteints d'OA (B) ont été cultivés en présence ou en absence de Gal-3 (10 µg et 0.25 à 10 µg, respectivement). **A** : les concentrations de la protéine MMP-3 ont été mesurées par méthode immuno-enzymatique (ELISA) à partir des surnageants de culture des fibroblastes synoviaux. **B** : le niveau d'expression génique de MMP-3 et d'ADAMTS-5 dans les chondrocytes a été déterminé par qPCR. **MMP-3** : métalloprotéase matricielle 3. **ADAMTS-5** (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 5) : agrécanase 2.

(Filer et al., 2009 (A); Janelle-Montcalm et al., 2007 (B)).

5. Synthèse sur le rôle de la glectine 3 dans la physiopathologie de polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose

Que ce soit dans des modèles animaux (Forsman et al., 2011; Wang et al., 2010) ou chez des patients (Filer et al., 2009; Janelle-Montcalm et al., 2007; Ohshima et al., 2003), la Gal-3 apparaît comme une protéine clé de la réaction inflammatoire au cours de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose (**figure 68**).

En localisation intracellulaire, elle empêche l'apoptose de nombreuses cellules articulaires, ce qui est bénéfique pour les chondrocytes, mais pas pour les lymphocytes T, ni les synoviocytes activés (Neidhart et al., 2005). En effet, ces derniers ont une survie prolongée et, par conséquent, sécrètent des Ck pro-inflammatoires, des chémokines mais aussi de la Gal-3, pendant longtemps.

Une fois sécrétées, Ck et Gal-3 entretiennent la synovite en maintenant l'activation des FS et des MS (Filer et al., 2009). En plus d'induire la production de médiateurs pro-inflammatoires, la Gal-3 EC induit aussi l'expression et la sécrétion de protéases matricielles par les FS, les MS et les chondrocytes (Filer et al., 2009; Janelle-Montcalm et al., 2007), ce qui contribue à la dégradation articulaire.

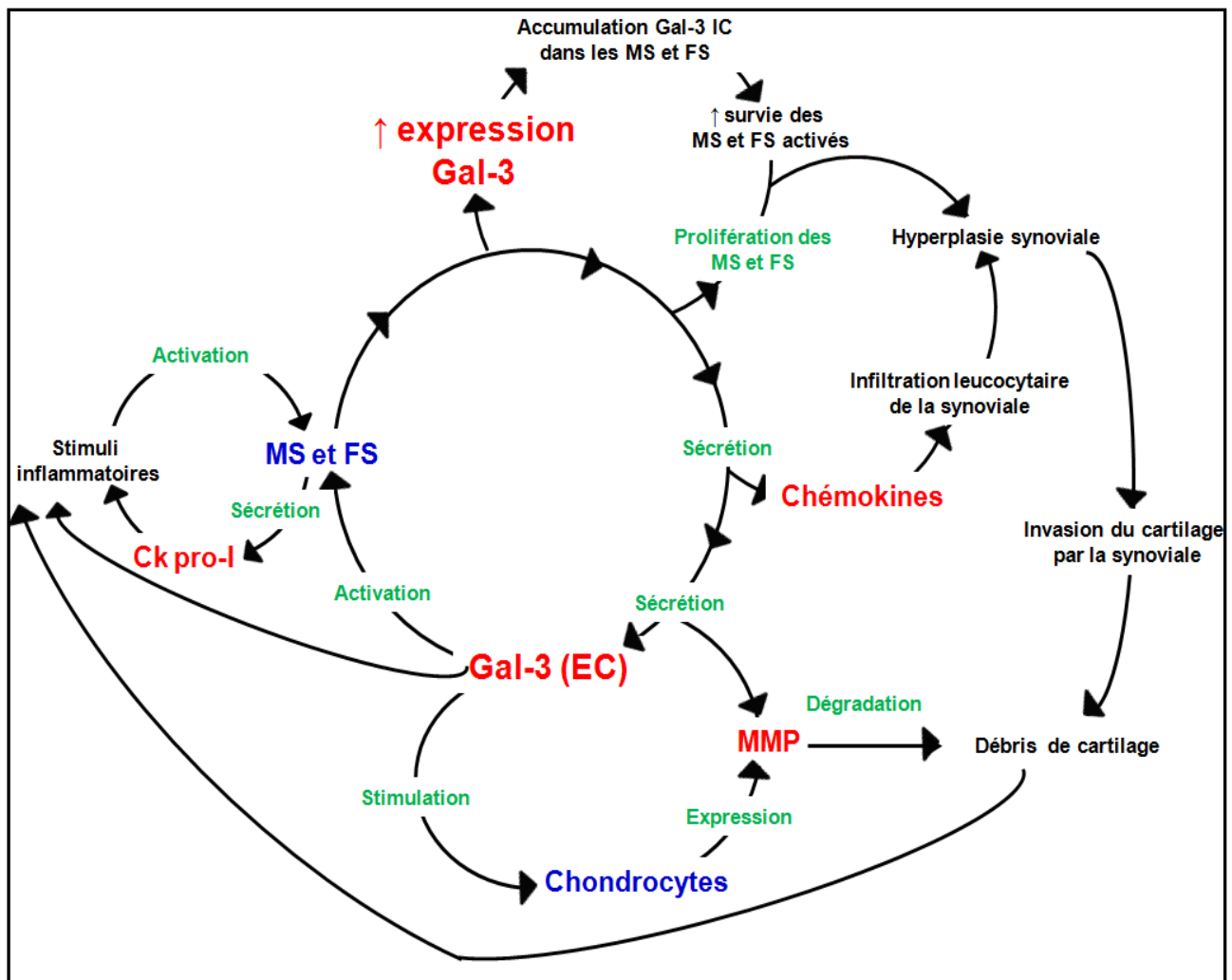


Figure 68. Rôles de la Gal-3 dans l'inflammation articulaire au cours de la PAR ou de l'OA.

Plusieurs données cliniques et expérimentales suggèrent qu'au cours de la PAR et de l'OA, la Gal-3 participe à l'entretien de l'inflammation et à la dégradation du cartilage, en favorisant la sécrétion de Ck pro-inflammatoires, de chémokines et de MMP. **Ck pro-I** : cytokine pro-inflammatoire. **FS** : fibroblastes synoviaux. **Gal-3 IC** : Gal-3 intracellulaire. **Gal-3 EC** : Gal-3 extracellulaire. **MMP** : métalloprotéases matricielles. **MS** : macrophages synoviaux.

(Adapté de Filer et al., 2009; Janelle-Montcalm et al., 2007; Neidhart et al., 2005; Pap et al., 2000)

D'après les résultats des données cliniques et expérimentales, la Gal-3 EC constitue une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la PAR ou de l'OA. Dès lors, il convient de s'interroger sur son mécanisme d'action dans ces pathologies, afin d'élaborer une stratégie d'inhibition.

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Hypothèse de travail

La Gal-3 est sécrétée dans la cavité articulaire au cours de la PAR et des poussées inflammatoires de l'OA (Ohshima et al., 2003; Alturfan et al., 2008). Dans le milieu extracellulaire, l'activité biologique de cette protéine résulte d'une part, de son interaction lectinique avec diverses glycoprotéines membranaires des cellules cibles et, d'autre part, de son oligomérisation via sa chaîne latérale (Ahmad et al., 2004; Nieminen et al., 2006; Ochieng et al., 2004). Ainsi, vraisemblablement au cours de l'OA et de la PAR, la Gal-3 sécrétée sous forme de monomères se fixe aux glycoprotéines membranaires des FS, MS et chondrocytes, puis forme des oligomères à la surface des cellules. Cela aboutit à leur activation et, par conséquent, à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et de protéases matricielles (**figure 69**).

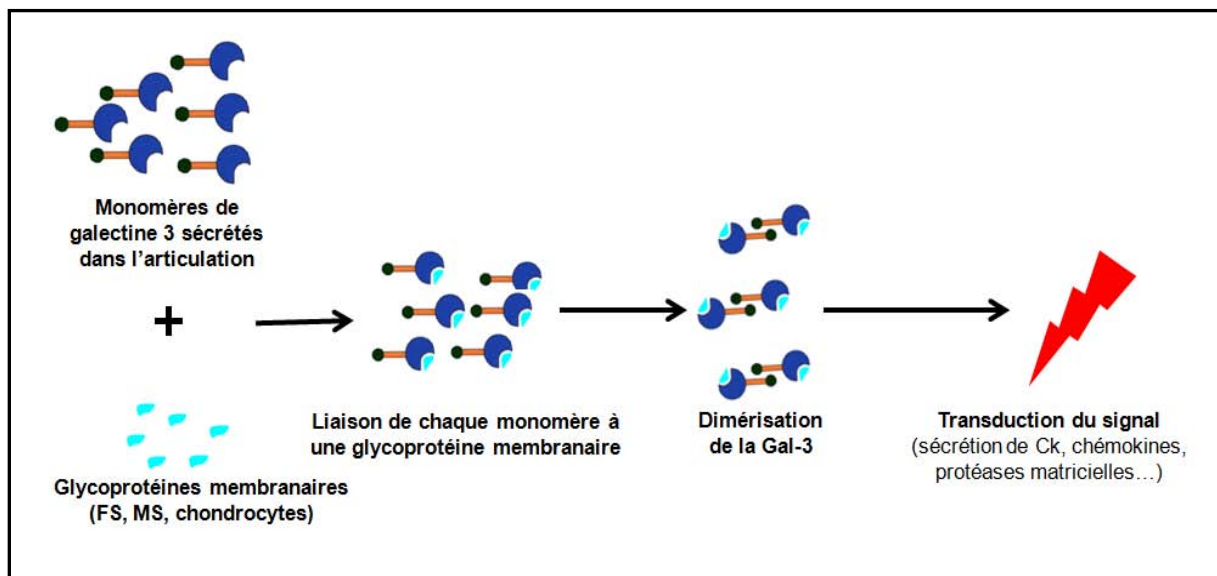


Figure 69. Modélisation du mécanisme d'action de la Gal-3 EC au cours de la physiopathologie de la PAR ou de l'OA

Le mécanisme d'action de la Gal-3 EC mettrait en jeu 2 étapes : une interaction lectinique avec des glycoprotéines membranaires (de fibroblastes et macrophages synoviaux, et de chondrocytes) et ensuite la dimérisation de la Pt grâce à sa chaîne latérale. Sous forme de dimères, la Gal-3 activerait les cellules à la surface desquelles elle se trouve, induisant ainsi la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et de protéases matricielles.

(Adapté de Nieminen et al., 2006)

Pour bloquer les effets délétères de la Gal-3 EC, il est donc nécessaire d'empêcher sa dimérisation. *In vitro*, des métalloprotéases (MMP-2, -3, -9) (Guévremont et al., 2004; Ochieng et al., 1994) sont capables de cliver la chaîne latérale de Gal-3 entre l'alanine en position 62 et la tyrosine en position 63, de façon à supprimer les domaines d'oligomérisation de la protéine (séquences PGAYP). Il en résulte une inhibition des activités biologiques découlant de ce phénomène. Ainsi, les formes de Gal-3 tronquées à l'extrémité N-terminale, incapables de former des oligomères, mais dont le domaine lectinique reste intact et fonctionnel (**figure 70**), sont incapables d'engendrer les mêmes signaux cellulaires que la forme entière de la Gal-3 (Nieminen et al., 2005, 2006; Ochieng et al., 1998). Par exemple, ces formes tronquées ne peuvent pas engendrer d'hémagglutination (Hsu et al., 1992; Ochieng et al., 1998), ni activer les polynucléaires neutrophiles (Nieminen et al., 2006), contrairement à la forme entière de la protéine.

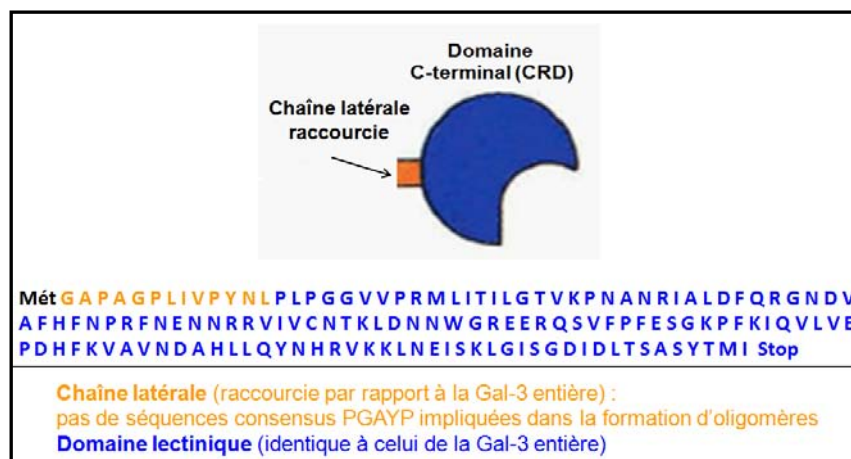


Figure 70. Structure schématique et séquence protéique d'une forme tronquée de la Gal-3.

(Adapté de Nieminen et al., 2006)

Dans le contexte de la PAR ou de l'OA, ces formes tronquées constitueraient donc un moyen de « neutraliser » la Gal-3 EC par antagonisme compétitif, pour l'empêcher de jouer son rôle délétère dans l'articulation (**figure 71**). En effet, elles resteraient capables d'entrer en compétition avec la Gal-3 EC via leur fonction lectinique intacte, et empêcheraient ainsi sa liaison aux glycoprotéines membranaires des FS, MS et chondrocytes. De plus, ne pouvant former des oligomères, ces formes tronquées seraient incapables d'engendrer les effets pro-inflammatoires et pro-cataboliques de la Gal-3 EC. Par ailleurs, des travaux préliminaires non publiés, ont démontré l'innocuité d'une de ces formes tronquées qui, contrairement à la Gal-3 EC, n'induit pas de lésions de type arthrosique chez l'animal sain (Janelle-Montcalm et al., 2007). Ces résultats encourageants justifient l'intérêt d'approfondir l'étude des potentialités antirhumatismales des formes tronquées de la Gal-3.

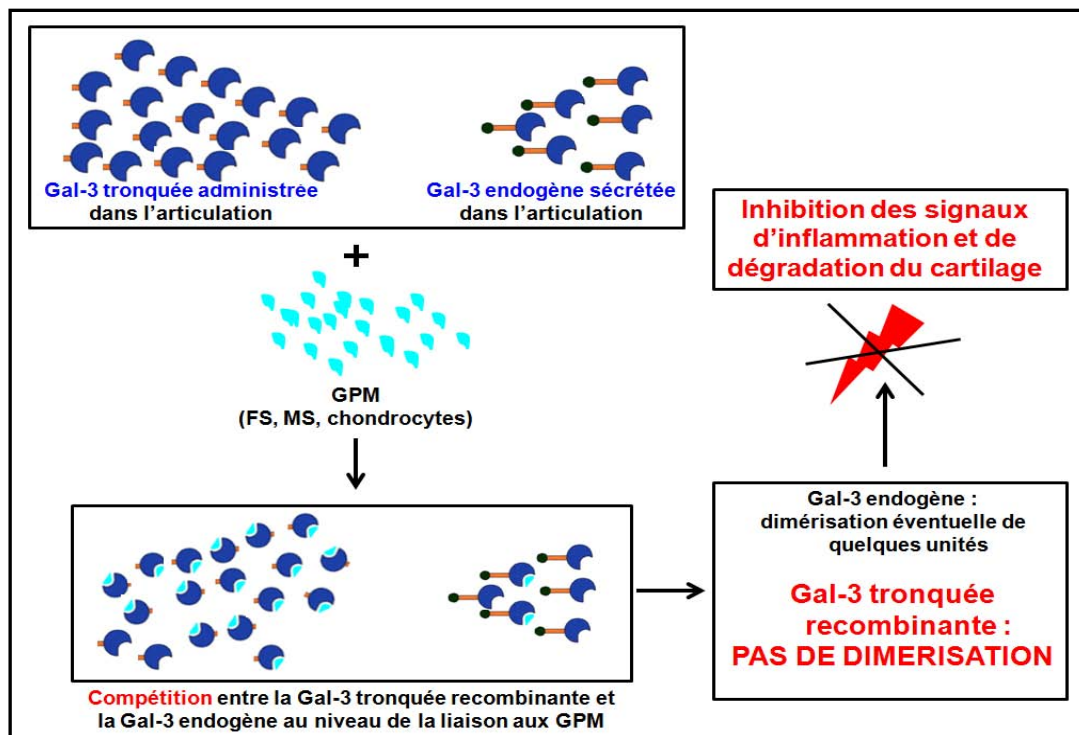


Figure 71. Modélisation du mécanisme d'action d'une forme tronquée de la Gal-3 administrée en intra-articulaire chez des patients atteints de PAR ou d'OA.

Dans une articulation arthrosique ou arthritique, les formes tronquées de Gal-3 seraient capables d'entrer en compétition avec la Gal-3 en occupant ses sites de liaison au niveau des glycoprotéines membranaires (GPM) des fibroblastes et macrophages synoviaux (FS, MS), ainsi que des chondrocytes. Incapables de se dimériser, elles ne pourraient engendrer les effets délétères de la Gal-3 EC dans l'articulation (inflammation et dégradation du cartilage).

(Adapté de Janelle-Montcalm et al., 2007; Nieminen et al., 2006)

Objectifs du travail

Le premier objectif du travail expérimental a été de concevoir et produire, par technique d'ADN recombinant, de la Gal-3 ainsi qu'une de ses formes tronquées qui, par la suite, sera désignée par l'acronyme « CRD », par souci de simplification. Les deux protéines ont été exprimées dans des bactéries *E. coli* car elles ne subissent aucune modification post-traductionnelles majeures, puis purifiées par chromatographie d'affinité pour le lactose, compte tenu de leur nature lectinique.

Le deuxième objectif quant à lui, a été d'évaluer l'effet antirhumatismal potentiel du CRD recombinant (CRDr), à travers des études de compétition vis-à-vis de la Gal-3 recombinante (Gal-3R). Pour cela, des chondrocytes de patients arthrosiques ont été incubés avec les deux protéines recombinantes dans différentes conditions expérimentales, puis l'expression génique de Ck pro-inflammatoires et de protéases matricielles a été mesurée. Les méthodes, les résultats et la discussion de ces résultats sont présentés dans la partie expérimentale de ce mémoire.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1

Gal-3R et CRDr *tagués* : conception, production et évaluation de leur activité biologique

Section 1 - Matériels et méthodes

1. Production de la Gal-3R et du CRDr *tagués*

1.1. Clonage moléculaire

1.1.1. Isolement des fragments d'ADN

L'ADN codant la Gal-3 a été obtenu après extraction d'ARN de chondrocytes de patients arthrosiques, puis rétrotranscription. Celui du CRD lui, a été « néo-synthétisé » par PCR, en se servant de l'ADNc de la Gal-3 comme matrice (cf. paragraphe PCR).

Extraction des ARN chondrocytaires totaux

L'extraction des ARN a été réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne de silice, à l'aide du kit *RNeasy Plus* (Qiagen). Au début de la procédure, du thiocyanate de guanidium (350 µl pour $5 \cdot 10^6$ cellules au maximum) est ajouté directement sur les tapis cellulaires. Cet agent chaotropique permet de lyser les chondrocytes et, d'inhiber l'activité des RNases (enzymes de dégradation des ARN). L'ADN génomique libéré lors de la lyse cellulaire est ensuite séparé des ARN totaux, par rétention sur une colonne en silice, après une centrifugation (8000 g, 1 minute, 25°C). L'éluat récupéré contient les ARN totaux, mais aussi des débris et protéines cellulaires. Une deuxième chromatographie sur colonne en silice, mettant en jeu plusieurs lavages et éluions, permet d'isoler définitivement les ARN totaux. Ces derniers sont élués par de l'eau distillée, puis dosés par spectrophotométrie UV à 260 nm (Appareil Nanodrop®, Thermo Scientific).

Rétrotranscription

La composition du mélange réactionnel (20 µl) est la suivante :

- ARN totaux (seuls les ARNm seront reconnus par l'enzyme) : 500 ng
- ADN polymérase ARN dépendante : 2,5 µU/ml
(MMLV-RT : *Moloney Murine Leukemia Virus RetroTranscriptas* ; Invitrogen)
- dNTP -A, T, G, C- (Invitrogen) : 0,5 mM
- amorces de séquence aléatoire (Gibco) : 10 ng/µl
- tampon de la rétro-transcriptase First Strand 1X (Invitrogen) : 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, pH 8,3 à 25°C
- DTT (Invitrogen) : 10m M

La réaction se déroule dans un « thermocycleur » (Mastercycler®, Eppendorf), selon le programme : 37°C pendant 2 min, 25°C pendant 10 min, 37°C pendant 50 min et enfin, 70°C pendant 15 min. Les ADNc obtenus sont dilués au dixième, utilisés comme matrice pour les PCR, puis, conservés à -20°C.

Amplification génique par PCR

L'ADN codant la Gal-3 a servi de matrice, d'une part, pour sa propre amplification (**figure 72**) et, d'autre part, pour la « néo-synthèse » puis l'amplification de l'ADN codant le CRD (**figure 73**).

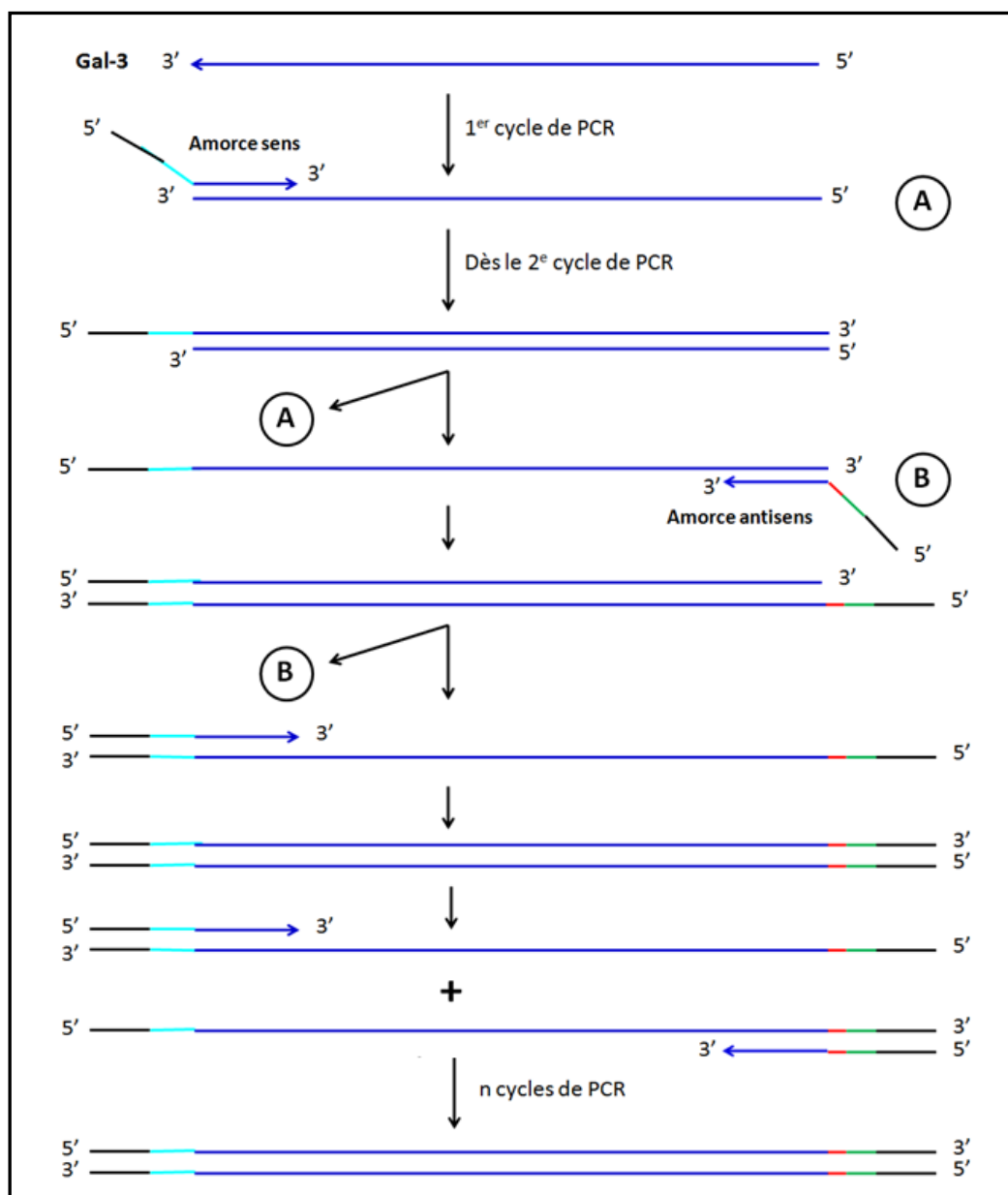


Figure 72. Principe de l'amplification du fragment d'ADN codant la Gal-3R.

Noir : nucléotides utiles à la stabilisation des enzymes de restriction lors de l'insertion de l'ADN dans un plasmide. **Turquoise** : site de restriction *Bam*HI. **Bleu** : séquence de la Gal-3. **Rouge** : triplet d'arrêt de la transcription. **Vert** : site de restriction *Eco*RI.

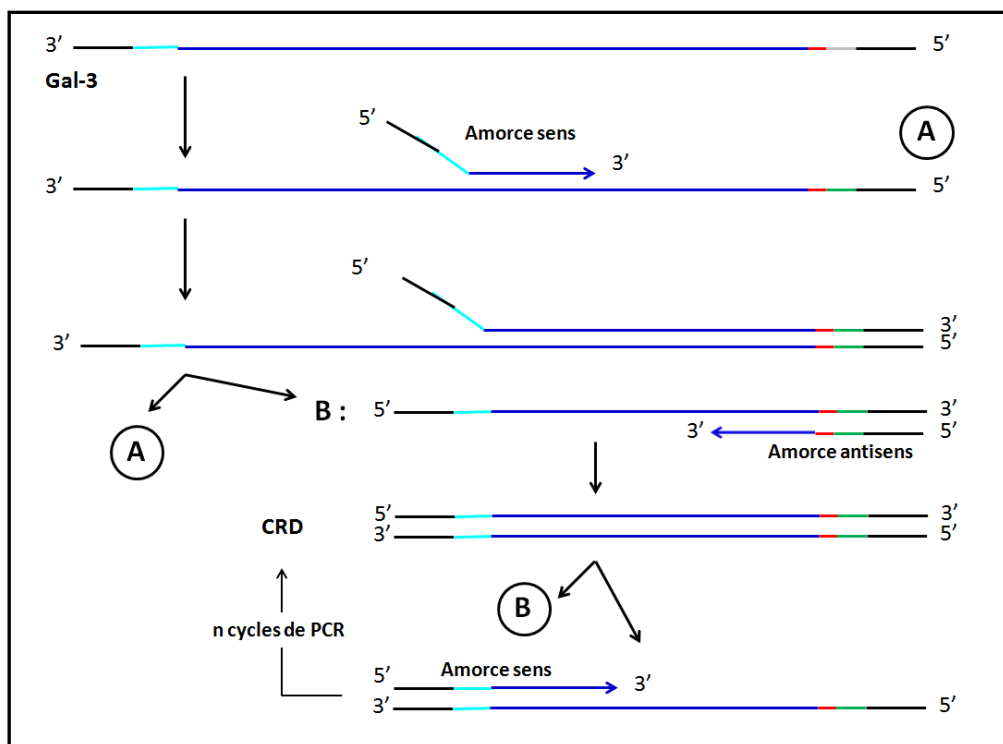


Figure 73. Principe de l'amplification du fragment d'ADN codant le CRDr.

Noir : nucléotides utiles à la stabilisation des enzymes de restriction lors de l'insertion de l'ADN dans un plasmide. **Turquoise** : site de restriction *Bam*HI. **Bleu** : séquence du CRD. **Rouge** : triplet d'arrêt de la transcription. **Vert** : site de restriction *Eco*RI.

Le milieu réactionnel de PCR (25 µl) est composé de quelques nanogrammes d'ADN (Gal-3), de 0,5 µl d'amorces à 20 µM (sens et antisens) et de 12,5 µl du mélange HotStarTaq Master Mix (Qiagen), contenant de la Taq polymérase (0,5 U/µl), son tampon et des dNTP. Les amorces utilisées (**tableau XXII**) ont été conçues de façon à rajouter un triplet d'arrêt de la transcription, ainsi que des sites de restriction pour faciliter l'insertion de l'ADN dans le plasmide pTrcHis. L'amorce antisens, qui s'hybride en 3', est identique pour la Gal-3 et le CRD qui, au niveau protéique, sont identiques à l'extrémité C-terminale (codée par l'extrémité 3' de l'ADN). En revanche, l'amorce sens, qui s'hybride en 5', diffère puisque Gal-3 et CRD n'ont pas la même extrémité N-terminale.

	Séquence de l'amorce	Fournisseur
Amorce sens Gal-3	5' - TAGTTA GGATCC ATGGCAGACAATTTTCGCTCCA - 3'	Alpha DNA (Canada)
Amorce sens CRD	5' - ATCAAT GGATCC GGCGCCCCTGCTGGGCCACTGATT - 3'	Invitrogen
Amorce antisens	5' - GCAGG GAATTC AGATTCTTATATCATGGTATAT - 3'	Keystone Labs (Canada)

Tableau XXII. Séquences des amorces de clonage de la Gal-3 dans le vecteur pTrcHis.

Les nucléotides écrits en **bleu** s'hybrident spécifiquement avec la séquence ADN (Gal-3 ou CRD), celui en **rouge**, correspond au triplet d'arrêt de la transcription. Les séquences surlignées en **bleu turquoise** ou en **vert** sont les sites de restriction spécifiques des enzymes *Bam*HI ou *Eco*RI, respectivement. Enfin, les nucléotides écrits en noir, permettent la stabilisation des amorces lors de leur hybridation à la matrice et, celle des enzymes de restriction, lors des digestions enzymatiques. Par convention, les séquences sont écrites de l'extrémité 5' à la 3'.

Le programme de PCR utilisé débute par l'activation de la polymérase (94°C, 10 min), se poursuit par 30 cycles d'amplification (dénaturation de l'ADNc : 94°C, 20 sec ; hybridation des amorces : 60°C, 30 sec et, élongation des brins néo- synthétisés : 72°C, 1 min). Il se termine par une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

1.1.2. Insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pTrcHis

Le plasmide pTrcHis (Invitrogen) (**figure 74**) permet d'exprimer des PtR avec un *tag* histidine en position N-terminale, en vue de faciliter leur purification par chromatographie d'affinité pour le nickel.

Avant la *ligation*, les produits de PCR (Gal-3/CRD) et le plasmide pTrcHis, ont été purifiés (kit *PCR Purification*, Qiagen) puis, digérés par le couple d'enzymes *Bam*HI/*Eco*RI (*New England Biolabs*), à 37°C pendant 2 h. Le mélange réactionnel (10 µl) était composé de :

- produits de PCR purifiés ou plasmide pur : 500 ng à 1 µg
- enzymes *Bam*HI et *Eco*RI : 2 U/µl chacune
- tampon NEB4 (*New England Biolabs*) : CH₃COOK 5 mM, Tris-acétate 2 mM, Mg(CH₃COO)₂ 1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,9 à 25°C
- BSA : 10 µg/ml

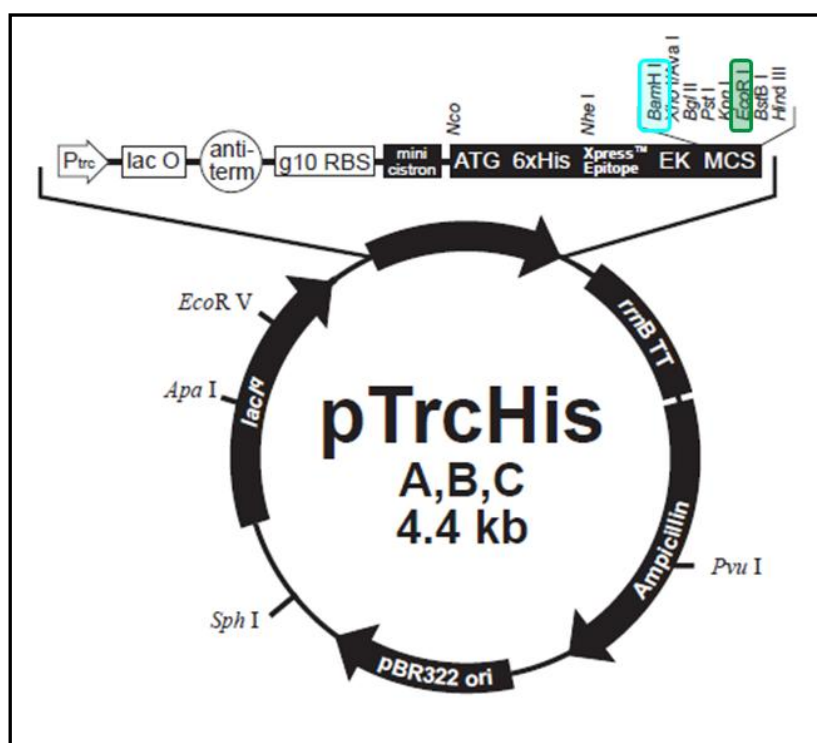


Figure 74. Cartographie du plasmide pTrcHis.

Sites de restriction **Bam**HI ou **Eco**RI.

Manuel d'utilisation du vecteur pTrcHis, [en ligne].

Après la digestion enzymatique, le plasmide et l'insert (Gal-3 ou CRD, amplifiés par PCR) ont été purifiés (kit *Gel Extraction*, Qiagen) puis, recombines (**figure 75**) grâce à l'enzyme T4 ligase à 40 µU/µl (*New England Biolabs*), dans du tampon NEB ligase (Tris-HCl 0,5 mM, MgCl₂ 0,1 mM, ATP 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,5 à 25°C), à 16°C pendant 16h.

Les quantités respectives de plasmide ou d'insert, mises dans les 10 µl de milieu réactionnel, ont été calculées de façon à obtenir un ratio moléculaire optimal (1 : 40 dans nos conditions). En effet, pour que la *ligation* soit optimale, il faut plus de molécules d'insert que de plasmide et, dans une proportion suffisante, mais pas excessive.

Les vecteurs ainsi obtenus sont désignés pTrcHis Gal-3 et pTrcHis CRD.

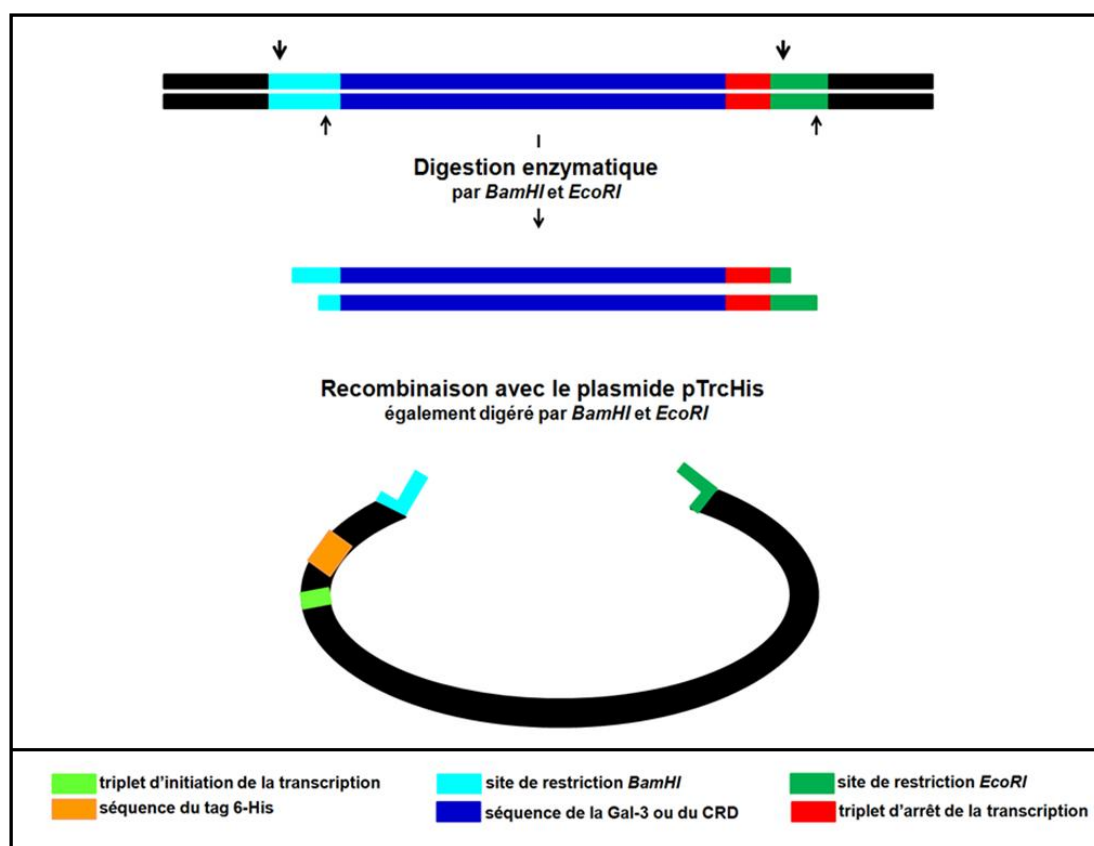


Figure 75. Principe de recombinaison des séquences de la Gal-3 ou du CRD avec le plasmide pTrcHis.

1.1.3. Transformation de bactéries compétentes

Cinq microlitres de chaque milieu de *ligation* ont été ajoutés à 50 µl de bactéries *E.coli* compétentes (souche K12 (NEB β10), *New England Biolabs*), et le tout a été incubé pendant 30 min dans de la glace pilée. Par la suite, les bactéries ont subi un choc thermique (1 min à 42°C puis 2 min dans de la glace) avant d'être cultivées dans 250 µl de milieu nutritif SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM), à 37°C et sous agitation (200 rpm : *round per minute* - tours/min -) pendant 1 h.

Enfin, les bactéries transformées ont été ensemencées sur une gélose sélective (ampicilline 100 µg/ml) et incubées à 37°C pendant 16h. Un clone positif de chaque construction plasmidique a été sélectionné et mis en culture dans 250 ml de milieu LB sélectif (tryptone 1% (m/v), extrait de levure 0.5% (m/v), NaCl 10 g/L, ampicilline 100 µg/ml), dans le but d'amplifier puis de purifier (kit *MaxiPrep*, Qiagen) les deux plasmides clonés. En parallèle, un aliquote de chaque clone positif a été conservé à -80°C et a également servi pour l'expression des PtR.

1.1.4. Validation du clonage moléculaire

Les deux plasmides clonés ont été séquencés par la société Beckman Coulter Genomics et les résultats ont été comparés, *in silico*, à la base de données *Nucleotide BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, développé par le NCBI : *National Center for Biotechnology Information*). Les séquences protéiques correspondantes ont ensuite été déterminées, *in silico*, grâce au logiciel *ExPASy Translate Tool* (SIB : Swiss Institute of Bioinformatics). Pour chaque séquence nucléotidique, cet outil propose trois séquences protéiques, en fonction du cadre de lecture. Naturellement, la bonne séquence est celle qui commence par une méthionine et se termine par un « stop ». Enfin, cette séquence a été comparée à la base de données *Protein BLAST* (NCBI), puis, nous avons utilisé le logiciel *ExPASy ProtParam Tool* (SIB), pour calculer la masse molaire et le coefficient d'extinction molaire de nos protéines recombinantes.

1.2. Expression de la Gal-3R et du CRDr tagués

Les bactéries *E. coli* transformées avec pTrcHis Gal-3 ou avec pTrcHis CRD, ont été cultivées, en parallèle, dans 3 ml de milieu LB sélectif, pendant 6 à 8h puis, dans 150 ml de ce même milieu, pendant 16h, à 37°C et sous agitation (200 rpm) pour chacune de ces étapes. Par la suite, 100 ml de ce bouillon de culture ont été répartis équitablement dans 4 erlenmeyers dans lesquels ont été rajoutés 475 ml de milieu LB sélectif. Ces erlenmeyers ont ensuite été incubés à 37°C sous agitation (150 rpm) jusqu'à l'obtention d'une absorbance, à 600 nm (A_{600nm}), égale à 0,6 (en général au bout de 2 à 4h). A cette valeur d'absorbance, de l'isopropyl β -D-galactopyranoside (IPTG 1 mM, Euromédex) a été rajouté aux bouillons bactériens pour induire l'expression des protéines recombinantes. Enfin, les 2 L de culture ont été incubés à 37°C sous agitation (150 rpm), pendant 20 à 24h (**figure 76**).

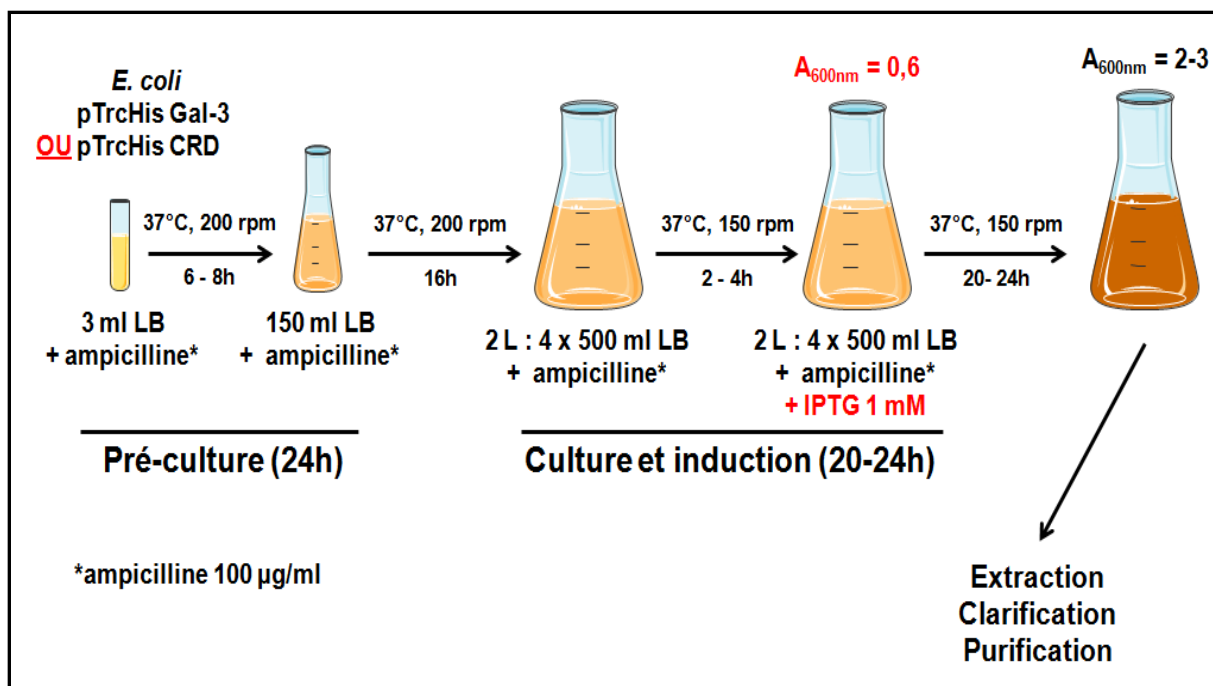


Figure 76. Etapes de la production bactérienne de Gal-3R et du CRDr tagués.

rpm : rounds per minute (tours/min). IPTG : l'isopropyl β -D-galactopyranoside. A_{600nm} : absorbance à 600 nm.

1.3. Clarification

Après 24h d'induction, les 2 L de bouillon bactérien ont été centrifugés (6000 tours/min, 4°C, 5 min) et les surnageant obtenus, éliminés. Les culots, quant à eux, ont été dissous par 40 ml de tampon de lyse (Tris 20 mM, Na₂EDTA 5,5 mM, DTT 1 mM, pH 7,5 à 25°C) puis, la suspension obtenue a été soumise à trois cycles de sonication (1 min) / agitation (1 min) suivis de trois cycles de congélation (-80°C, 20 min) / décongélation (25°C). Du chlorure de sodium (150 mM au final) a été rajouté à la suspension dont le volume a été complété à 400 ml avec du tampon de lyse. Enfin, ces 400 ml de suspension bactérienne ont été centrifugés (8000 rpm, 4°C, 45 min) et le surnageant, contenant les PtR, a été réservé pour la purification par chromatographie d'affinité.

1.4. Purification de la Gal-3R et du CRDr tagués

1.4.1. Etapes de la purification

L'extrait brut contenant la PtR a été incubé avec une résine recouverte de lactose (Sigma-Aldrich) préalablement équilibrée avec du « tampon d'équilibration » (tampon de lyse + NaCl 150 mM) : la PtR est retenue par affinité entre son domaine lectinique et le sucre.

La résine a ensuite été rincée plusieurs fois avec du « tampon d'équilibration » puis, avec du tampon PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4 à 25°C), avant d'éluer la PtR par 25 ml de tampon PBS + lactose (150 mM).

Par la suite, ce premier éluât a été alcalinisé (NaOH 0,5 M, pH 8), puis incubé avec une résine recouverte par des ions nickel (Probond®, Invitrogen). Ces ions interagissent avec le *tag* 6-histidine rajouté à l'extrémité N-terminale de la PtR, du fait de l'utilisation du vecteur pTrcHis pour le clonage.

Après un rinçage de la résine avec du tampon PBS pH 8, d'abord sans, puis avec 20 mM d'imidazole, la PtR a été éluée par 15 ml de tampon PBS pH8 250 mM d'imidazole.

Enfin, ce deuxième éluât a été dialysé contre du tampon PBS, pour éliminer l'imidazole, toxique pour les cellules ; le dialysat obtenu a été passé, en milieu stérile, sur une colonne d'élimination d'endotoxines (ActiClean Etox®, Stérogen). L'ensemble des principales étapes de cette purification est schématisé sur la **figure 77**.

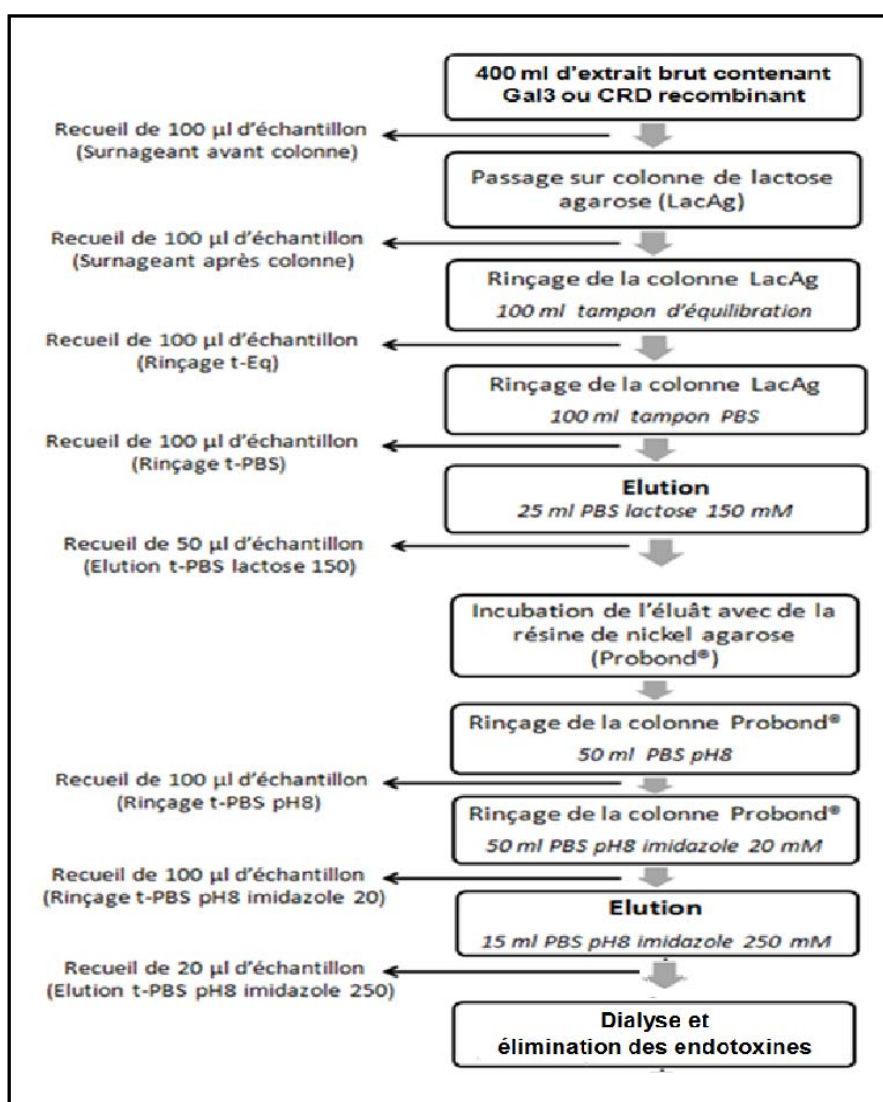


Figure 77. Principales étapes de la purification de la Gal-3R et du CRDr tagués.

1.4.2. Contrôle de la purification

Identification des protéines recombinantes : coloration par le nitrate d'argent

Tout au long de la purification, des échantillons ont été prélevés. A la fin du processus, ils ont été dilués au demi dans du tampon Laemmli 2X (SDS 4% (m/v), glycérol 20% (v/v), 2-mercapto-éthanol 10% (v/v), bleu de bromophénol 0,004% (m/v), Tris HCl 0,125 M, pH 6,8 à 25°C), puis chauffés à 95°C pendant 5 min. Ensuite, ils ont été déposés sur des gels de polyacrylamide à 12 % dans lesquels ils ont migré sous une tension électrique de 100 V, pendant 1h30.

A la fin de la migration, les gels ont été trempés dans une solution de fixation des protéines (CH₃OH 30% (v/v), CH₃COOH 10% (v/v)), pendant 2 h, puis, successivement, dans une solution de thiosulfate de sodium (0,02% (m/v)), pendant 1 min, et dans une solution d'imprégnation argentique (AgNO₃ 0,1% (m/v), CH₂O 0,075% (v/v)), pendant 1h30.

Enfin, les protéines ont été révélées en milieu réducteur et basique (K₂CO₃ 3% (m/v), Na₂S₂O₃ 0,00125% (m/v), CH₂O (0,025% (m/v)) et, la réaction de révélation a été stoppée par une solution d'acide acétique à 1% (v/v).

Quantification des protéines : méthode BCA (acide bicinchoninique)

La méthode BCA est un dosage colorimétrique permettant de déterminer la concentration de protéines dans une solution (intervalle de quantification : 0,5 µg/ml à 1500 µg/ml). Elle est basée sur la formation d'un complexe coloré entre le BCA et les ions cuivreux Cu⁺ issus de la réduction des ions cuivriques Cu²⁺ par les protéines, en milieu alcalin. Le complexe coloré, variant du vert au pourpre, possède une absorption optique maximale à 562 nm et, son intensité est proportionnelle à la concentration des protéines à doser. L'absorbance de ces protéines est comparée à celle d'une gamme de protéine de référence, en général la BSA.

Dans notre cas, un échantillon des PtR purifiées, dialysées et exemptées d'endotoxines, a été mélangé à une solution de sulfate de cuivre (4 % (m/v)) et d'acide bicinchoninique (20 µl pour 1 ml). Une gamme de BSA (0 à 200 µg/ml) a été réalisée en parallèle et, traitée dans les mêmes conditions que l'échantillon. Le tout a été incubé à 37°C pendant 30 minutes puis, l'absorbance de la gamme de BSA et de l'échantillon a été lue à 562 nm. Enfin une droite d'étalonnage a été tracée grâce à la gamme de BSA et, son équation, de type $y = a.x + b$ ($A = \epsilon.l.c$), a permis de calculer la concentration de la PtR.

Contrôle de l'absence d'endotoxines : méthode de Griess (dosage des nitrites)

Trois lots de chondrocytes humains arthrosiques ont été incubés séparément, pendant 24h, avec l'une ou l'autre des PtR ou avec de l'IL-1, choisi comme contrôle positif.

En effet, cette cytokine induit, dans les chondrocytes, l'expression de la *nitric oxide synthase* (iNOS), une enzyme permettant la production d'oxyde nitrique (Palmer et al., 1993).

Les surnageants de culture ont été recueillis pour y doser les ions nitrites issus de l'oxydation de l'oxyde nitrique. Leur concentration est corrélée à celle de l'iNOS présente dans le milieu. Nous avons, pour ce dosage, employé la méthode de Griess, qui repose sur la formation d'un sel de diazonium résultant de la réaction entre l'acide sulfanilique et des ions nitrites. Ce sel réagit ensuite avec une amine aromatique pour former un composé rosé dont l'absorbance à 550 nm est proportionnelle à la concentration des ions nitrites produits. La limite de détection de cette méthode est 2 μ M et, la gamme étalon de NaNO₂ que nous avons utilisée va de 0 à 50 μ M.

1.5. Conservation de la Gal-3R et du CRDr tagués

Une fois quantifiées, la galectine 3 et le CRD recombinants ont été lyophilisés puis concentrés dix fois avant d'être conservés à -80°C.

2. Etude du potentiel antirhumatismal du CRDr tagué

2.1. Culture primaire de chondrocytes humains arthrosiques

Des chondrocytes ont été isolés de plateaux tibiaux de 12 patients arthrosiques (8 femmes et 4 hommes, âgés de 54 à 70 ans) ayant bénéficié d'une arthroplastie totale du genou. Pour ce faire, le cartilage a d'abord été pelé au scalpel et les fragments engendrés, digérés par de la protéase de *Streptomyces griseus* (3,5 U/ml, Sigma-Aldrich), à 37°C pendant 1 h, puis par de la collagénase de *Clostridium hystolyticum* (0,484 U/ml, Roche) à 37°C, de façon séquentielle pendant 4 h puis 16 h. Les chondrocytes isolés ont ensuite été cultivés en flacons de 75 cm², dans du milieu complet [DMEM 4,5 g/L de glucose (Invitrogen) + 10% de SVF + 1% d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 μ g/ml ; Gibco)], à 37°C et sous une atmosphère humidifiée (21% O₂, 5% CO₂), pendant 10 à 14 jours. Enfin, ils ont été réensemencés dans des plaques de culture (12 ou 24 puits, 10⁵ cellules/cm²), cultivés en milieu complet pendant 24 h, puis en milieu de sevrage (0,5 % de SVF) pendant 24h. Le lendemain de la période de sevrage, les chondrocytes ont été incubés avec les PtR dans différentes conditions expérimentales (oxygénation, concentration des PtR, durée d'incubation, etc.), en fonction des objectifs souhaités.

2.2. Etude du rôle de la Gal-3R et du CRDr *tagués* sur des chondrocytes humains arthrosiques

2.2.1. Stratégie générale

Dans cette partie du travail, nous avons effectué trois séries d'expériences différentes, en fonction des objectifs souhaités (**figure 78**). La première a consisté à vérifier l'activité de la Gal-3 recombinante produite, sur les chondrocytes humains arthrosiques. La deuxième a servi à caractériser les effets de cette Gal-3 recombinante, sur l'expression de certains gènes du métabolisme chondrocytaire. Enfin, la troisième expérience a eu pour but de déterminer si le CRD recombinant produit était capable de contrecarrer les effets de la Gal-3R sur l'expression de ces mêmes gènes. Celle-ci a été calculée par PCR quantitative (cf. § 2.2.3.) après extraction des ARN totaux et rétrotranscription. Les protéines codées par ces gènes, quant à elles, font actuellement l'objet d'une quantification par des méthodes biochimiques et immuno-enzymatiques. Ces expériences étant à peine entamées, elles ne seront volontairement pas abordées dans ce mémoire.

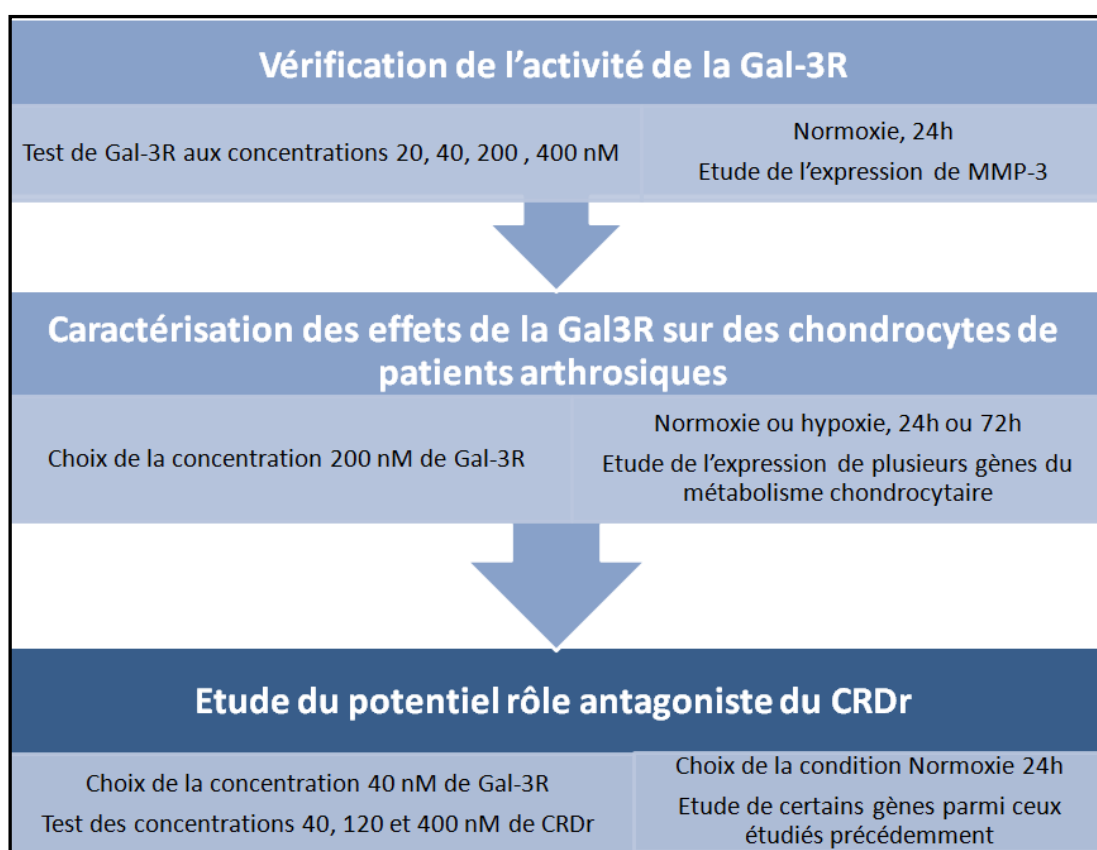


Figure 78. Stratégie de l'étude des propriétés biologiques de la Gal-3R et du CRDr produits.

2.2.2. Conditions d'incubation des chondrocytes humains arthrosiques avec la Gal-3R ou le CRDr *tagués*

Objectif 1 : Vérification de l'activité biologique de la Gal-3R *taguée*

Les chondrocytes d'un patient arthrosique ont été incubés dans des plaques de 12 puits (10^5 cellules/cm²), en normoxie (21% O₂) pendant 24h, avec de la Gal-3 recombinante à 20, 40, 200 ou 400 nM (0,5 - 1 - 5 - 10 µg/ml), dénaturée (100°C, 30 min), ou non (**figure 79**). Les concentrations de Gal-3R testées et la condition d'oxygénation du milieu de culture, ont été choisies sur la base des travaux de Janelle-Montcalm et coll. (2007). La dénaturation thermique de la Gal-3R permet, de façon indirecte, de vérifier que le signal produit par la PtR lui est propre et ne provient pas d'une contamination par des endotoxines. Chaque condition a été traitée en duplicata et, l'expression de MMP-3, gène cible connu de la Gal-3 impliqué dans la dégradation du cartilage (Jiang et al., 2013 ; Sun et al., 2014), a été évaluée.

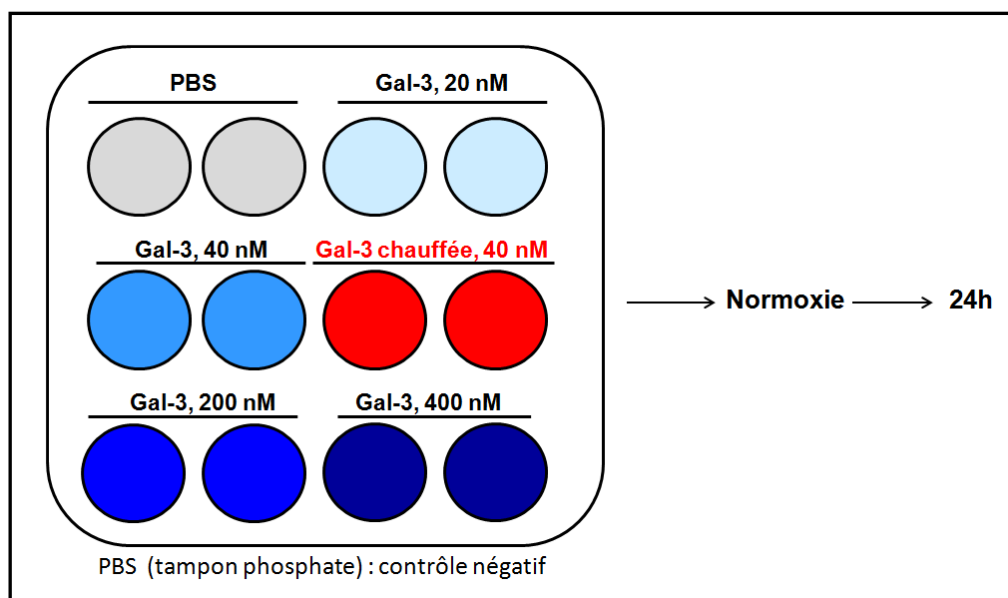


Figure 79. Exemple de plan de plaque de culture de chondrocytes humains arthrosiques en vue de l'évaluation de l'activité biologique de la Gal-3R.

Objectif 2 : Caractérisation des effets biologiques de la Gal-3R *taguée*

La plupart des travaux publiés visant à caractériser les effets de la Gal-3 sur l'expression de ses gènes cibles ont été menés en condition de normoxie pendant 24h. Nous avons, par conséquent, reproduit cette condition pour étudier les effets de notre Gal-3.

Par ailleurs, le cartilage étant physiologiquement en hypoxie (Schipani, 2006 ; Schipani et al., 2001), nous avons voulu vérifier si l'effet de la Gal-3 EC était comparable dans cette condition. En outre, nous avons voulu déterminer si ces effets étaient durables.

Ainsi, nous avons incubé des chondrocytes (10^5 cellules/cm² en plaques de 12 puits) provenant de 7 patients arthrosiques, en présence ou non de Gal-3R à 200 nM (5 µg/ml), en normoxie (21% O₂) ou en hypoxie (2% O₂), pendant 24 ou 72h (**figure 80**). Chaque condition a été traitée en duplicata et, par la suite, l'expression de certains gènes pro-inflammatoires (IL-1, IL-6), cataboliques (MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5) ou anaboliques (Col-2, ACAN : agrécan) pour le cartilage, a été analysée.

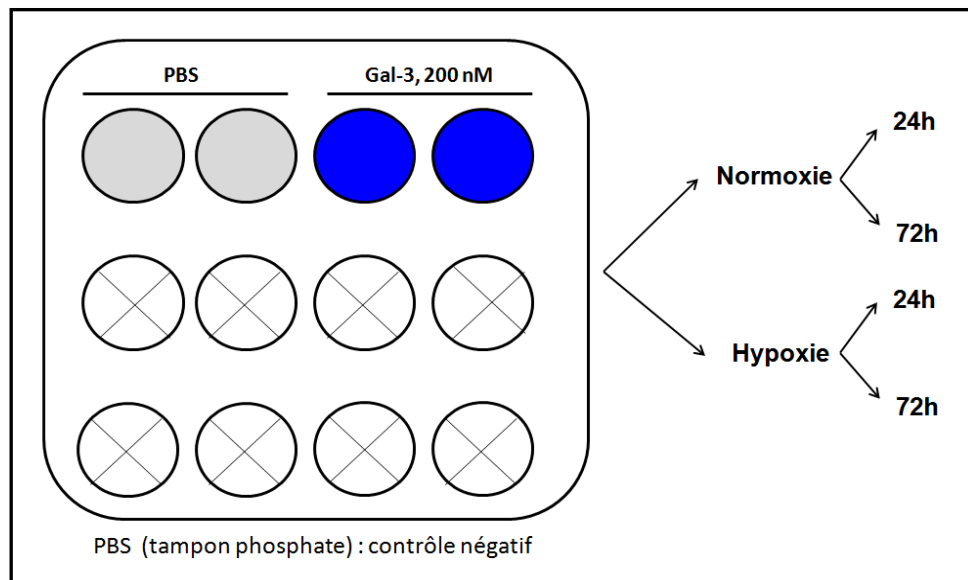


Figure 80. Exemple de plan de plaque de culture de chondrocytes humains arthrosiques en vue de la caractérisation des effets de la Gal-3R sur leur métabolisme.

Objectif 3 : Evaluation des effets biologiques du CRDr *tagué*

Pour cette expérience, les chondrocytes articulaires provenant de 4 patients arthrosiques ont été incubés en normoxie (21% O₂), pendant 24h avec de la Gal-3R seule, du CRDr seul ou, avec l'association des deux PtR (**figure 81**). La concentration de Gal-3R choisie (40 nM) est suffisante pour produire un effet significatif, sans être maximale, et donc, adaptée pour mettre en évidence un effet inhibiteur. Le CRDr, quant à lui, a été utilisé à 40, 120 ou 400 nM, des concentrations représentant 1, 3 ou 10 équivalents molaires de la Gal-3R. Chaque condition a été traitée en duplicata et l'expression de certains gènes parmi ceux étudiés précédemment (IL-1, IL-6, MMP-3, Col-2, ACAN), a été évaluée.

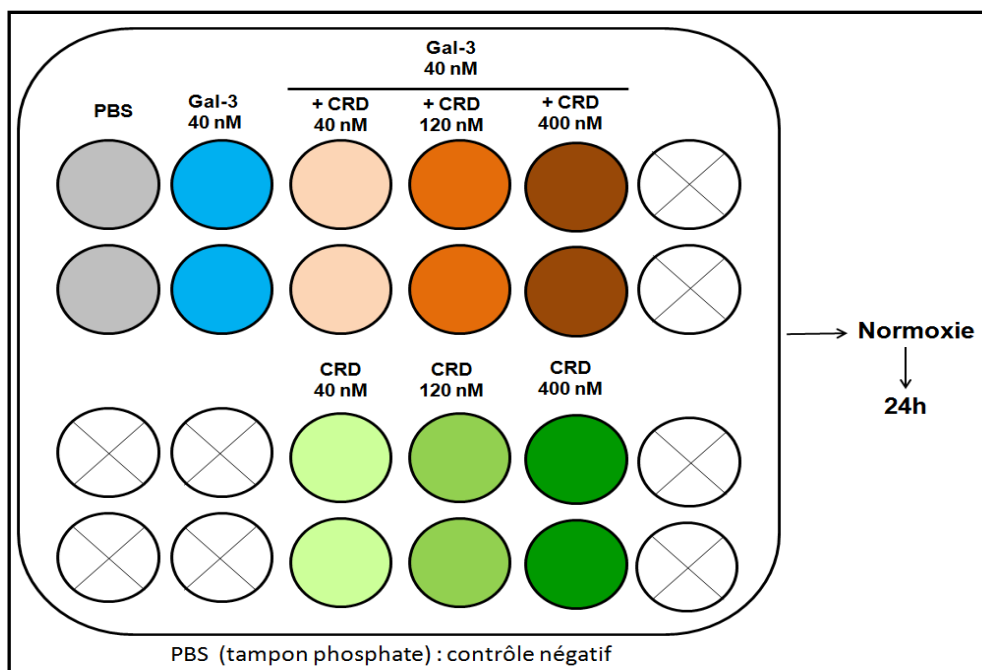


Figure 81. Exemple de plan de plaque de culture de chondrocytes humains arthrosiques en vue de l'étude des effets biologiques du CRDr sur leur métabolisme.

2.2.3. Recueil et analyse des échantillons issus de la culture cellulaire

Les surnageants de culture (800 µl) recueillis ont permis d'une part, de doser les nitrites (méthode de Griess), pour vérifier l'absence de contamination des PtR par des endotoxines et, d'autre part, de doser des MMP, interleukines et protéoglycanes produits par les chondrocytes en réponse aux stimulations par la Gal-3 (expériences en cours, non présentées dans ce mémoire).

Les tapis cellulaires, quant à eux, ont servi à analyser l'expression des gènes du métabolisme chondrocytaire, cibles de la Gal-3. Nous avons d'abord extrait les ARN totaux de ces chondrocytes et effectué une rétrotranscription, comme expliqué précédemment (§1.1.1.), puis nous avons procédé à des PCR quantitative (PCRq) en temps réel, en utilisant les amorces répertoriées dans le **tableau XXIII**.

Amorces	Séquences	Fournisseur
IL-1 (Interleukine 1)	sens : TCG TTA TCC CAT GTG TCG AA	Eurogentec
	antisens : GGA CAA GCT GAG GAA GAT GC	
IL-6 (Interleukine 6)	sens : GGC TGA AA AGA TGG ATG CT	
	antisens : GCT CTG GCT TGT TCC TCA CT	
MMP-3 (Métalloprotéase matricielle 3)	sens : GCA GTT TGC TCA GCC TAT CC	
	antisens : GAG TGT CGG AGT CCA GCT TC	
MMP-13 (Métalloprotéase matricielle 13)	sens : TGG TGG TGA TGA AGA TGA TTT G	
	antisens : TCC AAG CCG AAG AAA GAC TGC	
ADAMTS-4 (Agrécanase 1)	sens : ATC CAC ATG AGC CAT CAC AG	
	antisens : TCC AGT CAG CCT TCA CTG C	
ADAMTS-5 (Agrécanase 2)	sens : TGC ATA TTT GGG AAC CCA TT	
	antisens : GCT ACT GCA CAG GGA AGA GG	
Col-2 (Collagène 2)	sens : AGG GCC AGG ATG TCC GGC AA	
	antisens : TCT GCC ACG AGG TCC AGG GG	
ACAN (Agrécanine)	sens : TCG AGG ACA GCG AGG CC	
	antisens : TCG AGG GTG TAG CGT GAG A	
RP29 (gène de « ménage »)	sens : GGG TCA CCA GCA GCT GTA CT	
	antisens : CCG ATA TCC TTC GCG TAC TG	

Tableau XXIII. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes potentiellement ciblés par la Gal-3.

Amplification des gènes étudiés (PCRq)

Le principe de la PCRq repose sur la détection «en temps réel» d'un signal de fluorescence grâce à un agent intercalant (*SYBR® Green*), dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des produits PCR générés au cours de l'amplification.

Dans nos conditions, effectuées en duplicata, le mélange réactionnel de PCRq (20 µl) contient une solution commerciale de Taq polymérase, de dNTP et de *SYBR® Green* (iTaQ Universal SYBR® Green Supermix, BioRad), les ADNc issus de la rétrotranscription des ARN chondrocytaires (500 ng), et les amorces sens et antisens (1 µM chacune). Le mélange est mis dans un thermocycleur (StepOne®, Applied Biosystems), et le programme de PCR débute par la dénaturation de l'ADNc (95°C, 15 sec) et, se poursuit par 40 cycles d'hybridation des amorces suivie de l'élongation des brins néo-synthétisés (60°C, 60 sec, pour les deux étapes).

A chaque fin de cycle, le *SYBR® Green* s'intercale dans l'ADN double brin néoformé, ce qui génère un signal de fluorescence proportionnel à la quantité de cet ADN. Ce signal augmente à chaque cycle et, lorsqu'il dépasse le seuil de détection programmé, un numéro de cycle de PCR est établi et s'affiche sur le thermocycleur : c'est le Ct (*Cycle threshold*).

La valeur du Ct est déterminée pour le gène cible étudié, mais aussi pour le gène de référence choisi (dont l'expression reste stable quelles soient les conditions : RP29 dans notre cas). Elle est d'autant plus faible que le gène est détecté tôt, et donc, fortement exprimé et, elle permet de quantifier l'ADN grâce à la méthode dite des « delta-delta-Ct : $\Delta\Delta Ct$ » (Livak and Schmittgen, 2001). Pour chaque échantillon, les valeurs de ΔCt (Ct (gène cible) - Ct (RP29)) et de $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt (échantillon) - ΔCt (contrôle)), sont calculées. Le $\Delta\Delta Ct$ de chaque échantillon permet de calculer, grâce à la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$, un facteur (*fold*) reflétant la quantité relative d'ADN présente au départ dans cet échantillon, par rapport à la quantité présente dans l'échantillon contrôle (« PBS », dans notre cas).

Analyse statistique de l'expression des gènes étudiés

De la culture cellulaire jusqu'à la PCRq, les échantillons provenant de chaque patient (chondrocytes, ARN, ADNc) ont été traités de façon indépendante. Les résultats de PCRq sont exprimés sous la forme d'une moyenne ($\pm$ écart-type) des *folds* calculés pour chaque patient (n). Pour l'analyse statistique, nous avons utilisé le test de Student (logiciel GraphPad®) et considéré les valeurs comme significatives lorsque $p < 0,05$.

Section 2 - Résultats expérimentaux

1. Production de la Gal-3R et du CRDr *tagués*

1.1. Validation du clonage moléculaire

Les résultats du séquençage des vecteurs pTrcHis Gal-3 et pTrcHis CRD, transmis par la société *Beckman Coulter Genomics*, sont présentés sur la **figure 82**. La comparaison *in silico* de ces séquences à la base de données *Nucléotide BLAST*, montre une identité parfaite entre la séquence soumise (*Query* : Gal-3 ou CRD) et celle du transcrit de la Gal-3 humaine enregistrée dans la base de données (*Objet* : *Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 3*) (**figures 83 et 84**). Par conséquent, il n'y a ni mutations, ni délétions dans la séquence nucléotidique de la Gal-3R *taguée*, ni dans celle du CRDr *tagué*.

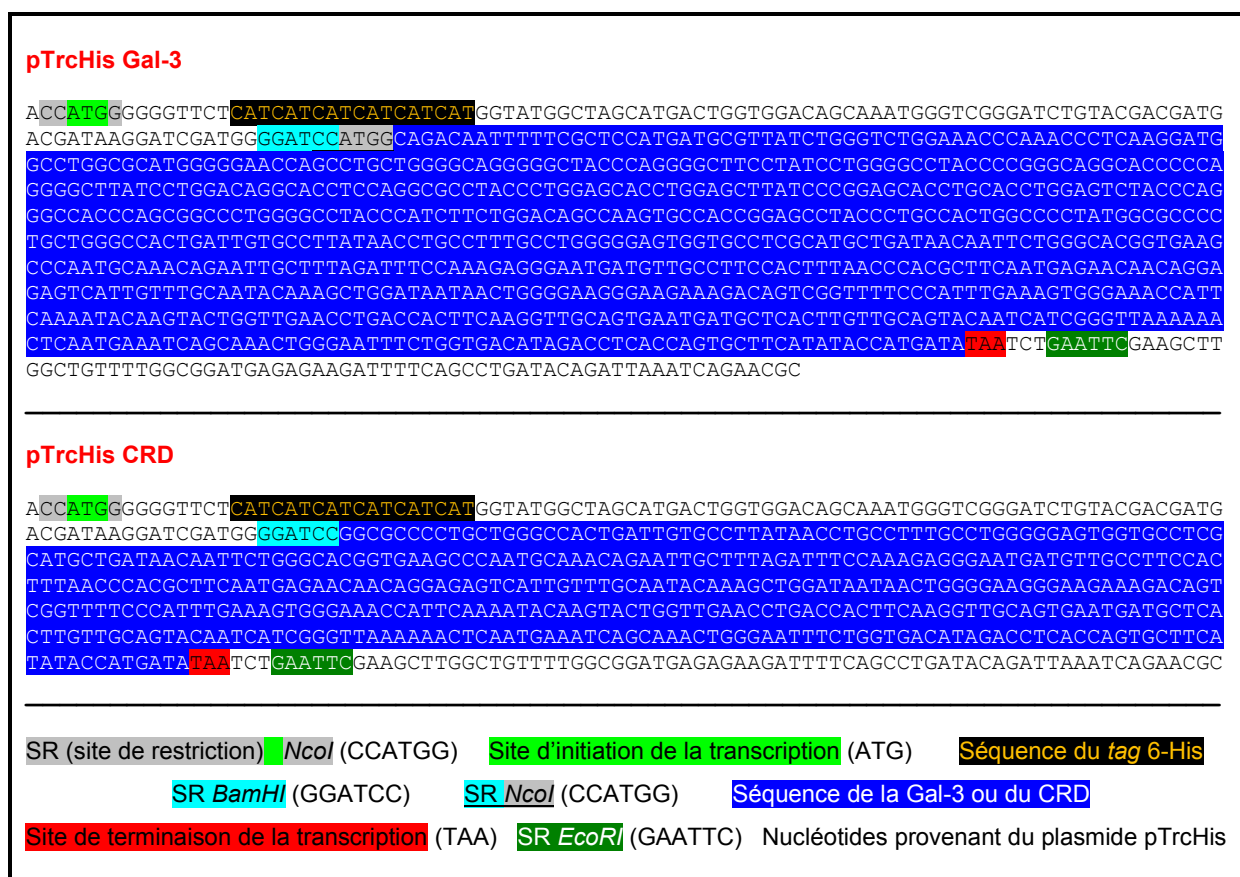


Figure 82. Résultats du séquençage des vecteurs pTrcHis Gal-3 et pTrcHis CRD.

La société Beckman Coulter Genomics nous a transmis les résultats du séquençage des plasmides pTrcHis Gal-3 et pTrcHis CRD, sous forme de séquences nucléotidiques « brutes ». Pour une meilleure compréhension, les éléments clés de ces séquences ont été identifiés par un code couleur.

Gal-3

Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (LGALS3), transcript variant 1, mRNA
 Référence n° NM002306.3 Longueur : 1017 nucléotides Identité : 100 % (759/759)

Query	110	ATGGCAGACAATTTTCGCTCCATGATGCGTTATCTGGGTCTGGAAACCCAAACCTCAA	169
Sbjct	89	ATGGCAGACAATTTTCGCTCCATGATGCGTTATCTGGGTCTGGAAACCCAAACCTCAA	148
Query	170	GGATGGCCTGGCGCATGGGGAACCGCCTGCTGGGGCAGGGGGCTACCCAGGGGCTTCC	229
Sbjct	149	GGATGGCCTGGCGCATGGGGAACCGCCTGCTGGGGCAGGGGGCTACCCAGGGGCTTCC	208
Query	230	TATCCTGGGGCTACCCCGGGCAGGCACCCCGAGGGGCTTATCCTGGACAGGCACCTCCA	289
Sbjct	209	TATCCTGGGGCTACCCCGGGCAGGCACCCCGAGGGGCTTATCCTGGACAGGCACCTCCA	268
Query	290	GGCGCCTACCTGGAGCACCTGGAGCTTATCCCGAGCACCTGCACCTGGAGTCTACCCA	349
Sbjct	269	GGCGCCTACCTGGAGCACCTGGAGCTTATCCCGAGCACCTGCACCTGGAGTCTACCCA	328
Query	350	GGGCCACCCAGCGGCCCTGGGGCTACCCATCTTCTGGACAGCCAAGTGCCACCGGAGCC	409
Sbjct	329	GGGCCACCCAGCGGCCCTGGGGCTACCCATCTTCTGGACAGCCAAGTGCCACCGGAGCC	388
Query	410	TACCTGCCACTGGCCCTATGGCGCCCTGCTGGGCCACTGATTGTGCCTTATAACCTG	469
Sbjct	389	TACCTGCCACTGGCCCTATGGCGCCCTGCTGGGCCACTGATTGTGCCTTATAACCTG	448
Query	470	CCTTTGCCTGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAACAATTCTGGGCACGGTGAAGCCC	529
Sbjct	449	CCTTTGCCTGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAACAATTCTGGGCACGGTGAAGCCC	508
Query	530	AATGCAAACAGAATTGCTTTAGATTTCCAAAGAGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAAC	589
Sbjct	509	AATGCAAACAGAATTGCTTTAGATTTCCAAAGAGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAAC	568
Query	590	CCACGCTTCAATGAGAACAACAGGAGAGTCATTGTTTGAATACAAAGCTGGATAAATAAC	649
Sbjct	569	CCACGCTTCAATGAGAACAACAGGAGAGTCATTGTTTGAATACAAAGCTGGATAAATAAC	628
Query	650	TGGGGAAGGGAAGAAAGACAGTCGGTTTCCCATTTGAAAGTGGGAAACCATTCAAATA	709
Sbjct	629	TGGGGAAGGGAAGAAAGACAGTCGGTTTCCCATTTGAAAGTGGGAAACCATTCAAATA	688
Query	710	CAAGTACTGGTTGAACCTGACCACTTCAAGGTTGCAGTGAATGATGCTCACTTGTGTCAG	769
Sbjct	689	CAAGTACTGGTTGAACCTGACCACTTCAAGGTTGCAGTGAATGATGCTCACTTGTGTCAG	748
Query	770	TACAATCATCGGGTTAAAAAACAATGAAATCAGCAAACCTGGGAATTTCTGGTGACATA	829
Sbjct	749	TACAATCATCGGGTTAAAAAACAATGAAATCAGCAAACCTGGGAATTTCTGGTGACATA	808
Query	830	GACCTCACCAGTGTTCATATACCATGATA	868
Sbjct	809	GACCTCACCAGTGTTCATATACCATGATA	847

Début de la séquence de la Gal-3

Séquence de la Gal-3

Début de la séquence commune avec le CRD

Site de terminaison de la transcription

Figure 83. Comparaison de la séquence nucléotidique de la Gal-3 obtenue, avec la base de données *Nucleotide BLAST*.

La base de données *Nucleotide BLAST* permet de calculer le degré d'identité d'une séquence nucléotidique donnée (Query), avec des séquences connues et répertoriées (Sbjct). Elle ne prend pas en compte les nucléotides provenant du plasmide, et situés en 5' de l'ATG ou en 3' du STOP. C'est pour cette raison que le site d'initiation de la transcription, les sites de restriction, la séquence du tag 6-His et les nucléotides provenant du plasmide pTrcHis, ne sont pas représentés dans ces résultats. Les nombres encadrant les séquences « Query » et « Sbjct » représentent la position des nucléotides sur ces mêmes séquences. La séquence nucléotidique de la Gal-3 clonée possède une identité parfaite (759 nucléotides/759) avec celle du transcrit de la Gal-3 humaine enregistrée dans la base de données.

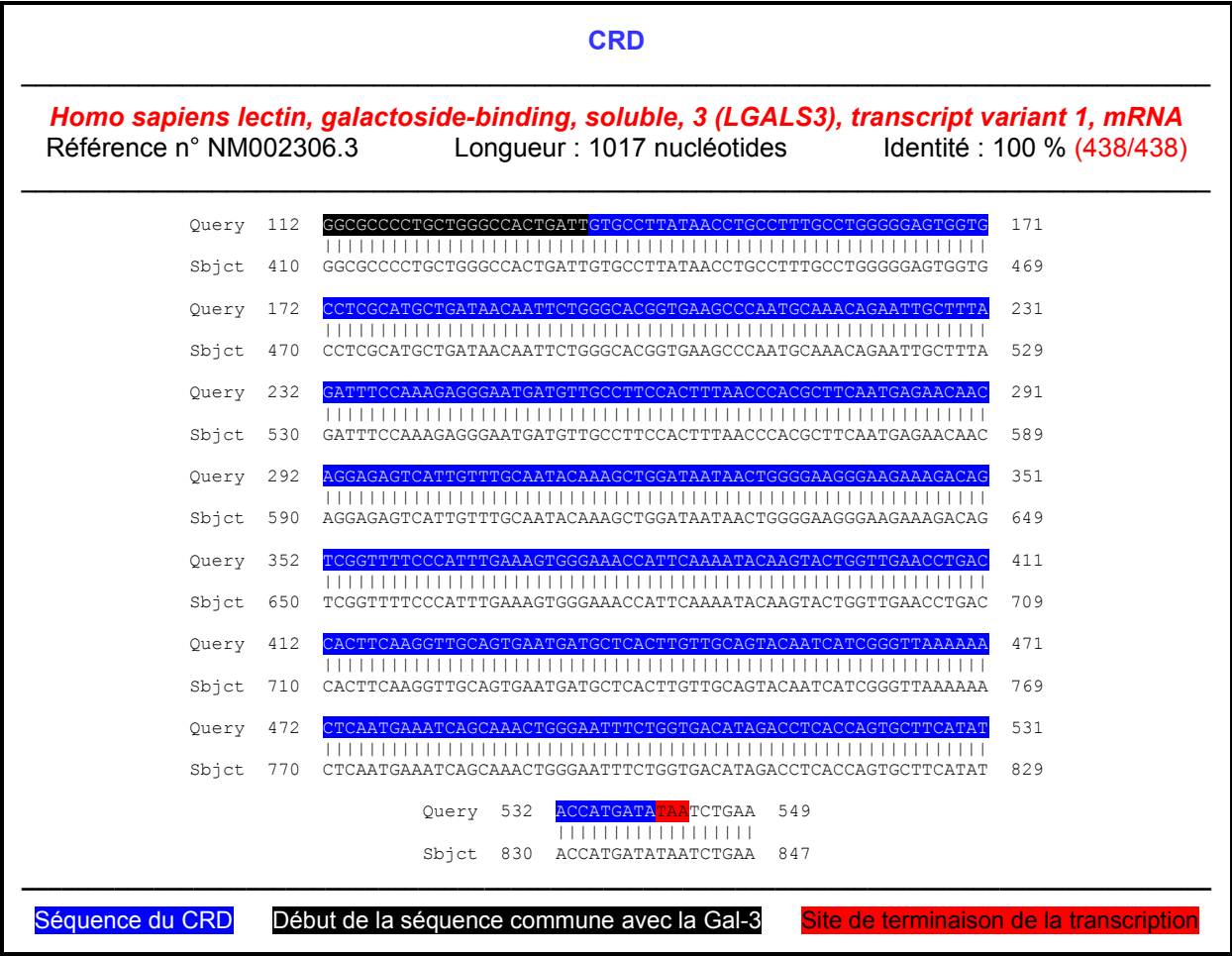


Figure 84. Comparaison de la séquence nucléotidique du CRD obtenue, avec la base de données *Nucleotide BLAST*.

La séquence nucléotidique du CRD cloné possède une identité parfaite (438 nucléotides/438) avec une partie de celle du transcrit de la Gal-3 humaine enregistré dans la base de données *Nucleotide BLAST*. En effet, le CRD étant une forme tronquée de la Gal-3, à son extrémité N-terminale, l'alignement des séquences n'a été effectué qu'à partir du nucléotide n°410, marquant le début de la séquence du CRD. Pour les autres informations, se référer à la légende de la figure précédente.

Le séquençage ayant ainsi été validé, chacune des séquences nucléotidiques complètes (incluant celles du plasmide) a ensuite été traduite, *in silico*, grâce au logiciel *ExPASy Translate Tool*, en 3 séquences protéiques correspondant aux 3 cadres de lecture possibles (**figure 85**). Pour chaque échantillon, la bonne séquence protéique est celle qui commence par une méthionine, se termine par un « stop » et, possède le bon nombre d'acides aminés, ainsi que le tag 6-His à l'extrémité N-terminale. Cette séquence a ensuite été comparée à la base de données *Protein BLAST* ; l'analyse révèle une identité parfaite entre la séquence protéique de chaque échantillon (Query), et celle de la base de données (Sbjct) (**figure 86**). Les séquences clonées dans le plasmide pTrcHis correspondent donc bien à la Gal-3 humaine et à sa forme tronquée. Une dernière analyse des séquences protéiques, grâce au le logiciel *ExPASy ProtParam Tool*, a permis de calculer que la masse molaire de notre Gal-3R est égale à 30 kDa, et que celle de notre CRDr vaut 20 kDa.

Gal-3

1^{er} cadre de lecture

T Met G G S H H H H H H G M A S M T G G Q Q M G R D L Y D D D D K D R W G S M A D N F S L H D A L S
G S G N P N P Q G W P G A W G N Q P A G A G G Y P G A S Y P G A Y P G Q A P P G A Y P G Q A P P G A
Y P G A P G A Y P G A P A P G V Y P G P S G P G A Y P S S G Q P S A T G A Y P A T G P Y G A P A G
P L I V P Y N L P L P G G V V P R M L I T I L G T V K P N A N R I A L D F Q R G N D V A F H F N P R
F N E N N R R V I V C N T K L D N N W G R E E R Q S V F P F E S G K P F K I Q V L V E P D H F K V A
V N D A H L L Q Y N H R V K K L N E I S K L G I S G D I D L T S A S Y T M I Stop S E F E A W L F W R

2^e cadre de lecture

P W G V L I I I I I Met V W L A Stop L V D S K W V G I C T T Met T I R I D G D P W Q T I F R S Met
Met R Y L G L E T Q T L K D G L A H G G T S L L G Q G A T Q G L P I L G P T P G R H P Q G L I L D R
H L Q A P T L E H L E L I P E H L H L E S T Q G H P A A L G P T H L L D S Q V P P E P T L P L A P
Met A P L L G H Stop L C L I T C L C L G E W C L A C Stop Stop Q F W A R Stop S P Met Q T E L L Stop
I S K E G Met Met L P S T L T H A S Met R T T G E S L F A I Q S W I I T G E G K K D S R F S H L K V
G N H S K Y K Y W L N L T T S R L Q Stop Met Met L T C C S T I I G L K N S Met K S A N W E F L V T
Stop T S P V L H I P Stop Y N L N S K L G C F G G Stop E K I F S L I Q I K S E R

3^e cadre de lecture

H G G F S S S S S S W Y G Stop H D W W T A N G S G S V R R Stop R Stop G S Met G I H G R Q F F A P
Stop C V I W V W K P K P S R Met A W R Met G E P A C W G R G L P R G F L S W G L P R A G T P R G L S
W T G T S R R L P W S T W S L S R S T C T W S L P R A T Q R P W G L P I F W T A K C H R S L P C H W
P L W R P C W A T D C A L Stop P A F A W G S G A S H A D N N S G H G E A Q C K Q N C F R F P K R E
Stop C C L P L Stop P T L Q Stop E Q Q E S H C L Q Y K A G Stop Stop L G K G R K T V G F P I Stop K
W E T I Q N T S T G Stop T Stop P L Q G C S E Stop C S L V A V Q S S G Stop K T Q Stop N Q Q T G N F
W Stop H R P H Q C F I Y H D I I Stop I R S L A V L A D E R R F S A Stop Y R L N Q N

CRD

1^{er} cadre de lecture

T Met G G S H H H H H H G M A S M T G G Q Q M G R D L Y D D D D K D R W G S G A P A G P L I V P Y N
L P L P G G V V P R M L I T I L G T V K P N A N R I A L D F Q R G N D V A F H F N P R F N E N N R R
V I V C N T K L D N N W G R E E R Q S V F P F E S G K P F K I Q V L V E P D H F K V A V N D A H L L
Q Y N H R V K K L N E I S K L G I S G D I D L T S A S Y T M I Stop S E F E A W L F W R

2^e cadre de lecture

P W G V L I I I I I Met V W L A Stop L V D S K W V G I C T T Met T I R I D G D P A P L L G H Stop L
C L I T C L C L G E W C L A C Stop Stop Q F W A R Stop S P Met Q T E L L Stop I S K E G Met Met L P
S T L T H A S Met R T T G E S L F A I Q S W I I T G E G K K D S R F S H L K V G N H S K Y K Y W L N
L T T S R L Q Stop Met Met L T C C S T I I G L K N S Met K S A N W E F L V T Stop T S P V L H I P
Stop Y N L N S K L G C F G G Stop E K I F S L I Q I K S E R

3^e cadre de lecture

H G G F S S S S S S W Y G Stop H D W W T A N G S G S V R R Stop R Stop G S Met G I R R P C W A T D C
A L Stop P A F A W G S G A S H A D N N S G H G E A Q C K Q N C F R F P K R E Stop C C L P L Stop P T
L Q Stop E Q Q E S H C L Q Y K A G Stop Stop L G K G R K T V G F P I Stop K W E T I Q N T S T G Stop
T Stop P L Q G C S E Stop C S L V A V Q S S G Stop K T Q Stop N Q Q T G N F W Stop H R P H Q C F I Y
H D I I Stop I R S L A V L A D E R R F S A Stop Y R L N Q N

Méthionine d'initiation

Tag 6-His

Séquence provenant des nucléotides du plasmide pTrcHis

Début de la séquence de la Gal-3

Gal-3 ou CRD

Début de la séquence commune avec le CRD

Figure 85. Traduction des séquences nucléotidiques de la Gal-3 et du CRD obtenues.

Le logiciel *ExPASy Translate Tool* permet de traduire des séquences nucléotidiques en séquences protéiques. En fonction du cadre de lecture, ce logiciel propose 3 séquences protéiques. Naturellement, une seule correspond à la protéine fonctionnelle : celle qui commence par une méthionine, se termine par un « stop », comporte le nombre d'acides aminés attendus et, possède le tag 6-His à l'extrémité N-terminale. Pour la Gal-3R comme pour le CRD, la bonne séquence correspond à celle du premier cadre de lecture.

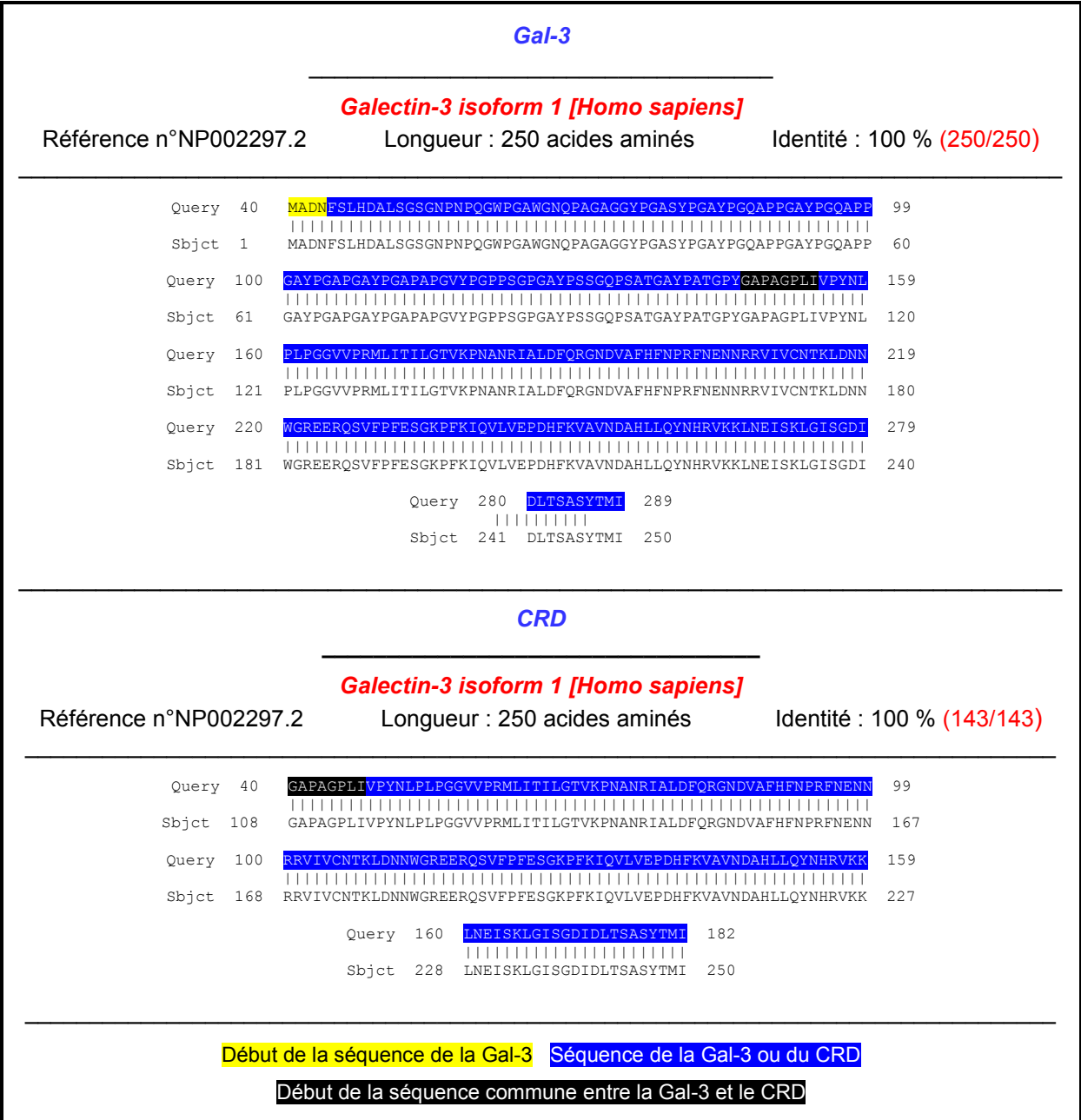


Figure 86. Comparaison de la séquence protéique de la Gal-3 ou du CRD obtenue, avec la base de données *Protein BLAST*.

La base de données *Protein BLAST* permet de calculer le degré d'identité d'une séquence protéique donnée (Query), avec des séquences connues et répertoriées (Sbjct). Elle ne prend pas en compte les acides aminés codés par les nucléotides provenant du plasmide, et situés en N-ter de la méthionine d'initiation, ou en C-ter du dernier acide aminé de la séquence. Les nombres encadrant les séquences « Query » et « Sbjct » représentent la position des acides aminés sur ces mêmes séquences. La séquence protéique de la Gal-3 clonée possède une identité parfaite (250 acides aminés/250) avec celle de la Gal-3 humaine enregistrée dans la base de données. La séquence protéique du CRD cloné possède une identité parfaite (143 acides aminés/143) avec celle de la Gal-3 humaine enregistré dans la base de données. Le CRD étant une forme tronquée de la Gal-3, à son extrémité N-terminale, l'alignement des séquences n'a été effectué qu'à partir de l'acide aminé n°108, marquant le début de la séquence du CRD.

L'étape de clonage étant validée, nous avons ensuite utilisé les vecteurs pTrcHis Gal-3 et pTrcHis CRD pour exprimer la Gal-3R et le CRDr *tagués*, dans des bactéries *E. coli* (souche K12, NEBβ10).

1.2. Expression et purification de la Gal-3R et du CRDr *tagués*

En raison de leur nature lectinique et de la présence d'un *tag* 6-His dans leur séquence, la Gal-3R et le CRDr ont été purifiés par deux chromatographies d'affinité, une pour le lactose puis une pour le nickel.

La **figure 87** présente la coloration, par le nitrate d'argent, des Pt contenues dans les divers échantillons prélevés tout au long des étapes de purification.

L'échantillon A (extrait bactérien clarifié, avant son passage sur la colonne de lactose) contient les protéines bactériennes et la PtR. L'échantillon B (extrait bactérien clarifié, après son passage sur la colonne de lactose) ne contient plus que les Pt bactériennes puisque la PtR est restée fixée au lactose.

Les échantillons C et D proviennent des rinçages de la colonne et contiennent une faible quantité de CRDr. Ce phénomène de perte n'a pas été observé pour la Gal-3R.

L'échantillon E correspond au premier éluât et contient uniquement la PtR (poids moléculaires attendus : 30 kDa pour la Gal-3R ; 20 kDa pour le CRD). Cet éluât a été incubé avec la résine Probond® dont le nickel a retenu la PtR via son *tag* 6-His. La colonne de nickel a été rincée par du tampon PBS pH8 (F) puis, les PtR ont été éluées par du tampon du PBS pH8 + imidazole 250 mM (G).

Au terme de ces deux chromatographies d'affinité, il est certain qu'il s'agit bien des deux lectines *taguées* « 6-His» qui ont été purifiées. Pour confirmer cela, une analyse a été réalisée au sein de la plateforme de spectrométrie de masse de la fédération de recherche FR 3209 et, le rapport de cette analyse conclut à l'identification de la Gal-3. Le résultat de cette analyse a été extrapolé au CRDr, car il n'était pas possible de l'identifier dans les conditions expérimentales de cette analyse.

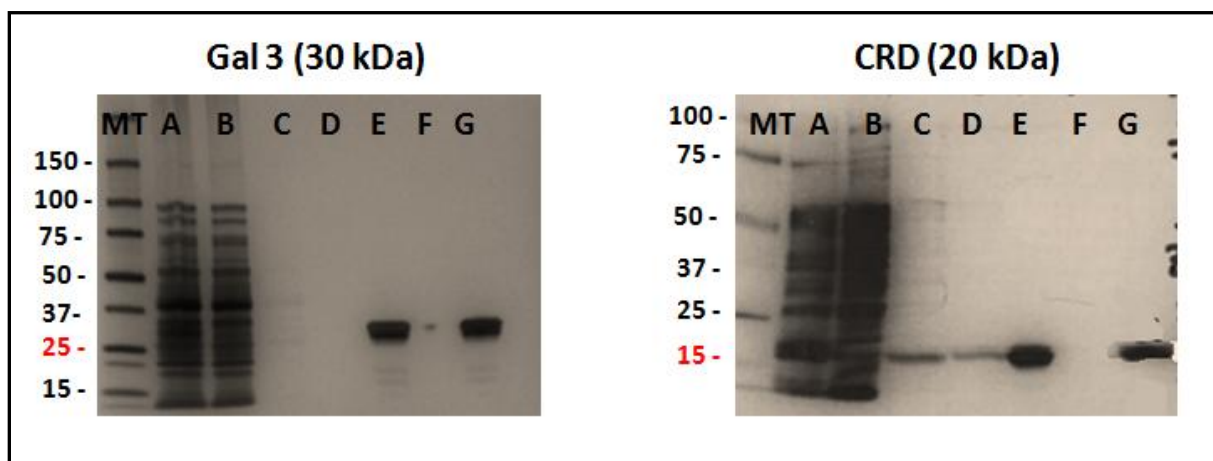


Figure 87. Contrôle de l'efficacité de la purification de Gal-3R ou de CRDr *tagués*.

Les gels ont été colorés par du nitrate d'argent. **A** : extrait bactérien clarifié, avant passage sur la colonne de lactose. **B** : extrait bactérien clarifié, après passage sur la colonne de lactose. **C** : rinçage de la colonne de lactose par du « tampon d'équilibration ». **D** : rinçage de la résine de lactose par du tampon PBS. **E** : PtR éluée par du tampon PBS + lactose (150 mM). **F** : rinçage de la colonne de nickel par du tampon PBS pH8. **G** : PtR éluée par du tampon PBS pH8 + imidazole (250 mM).

1.3. Quantification de la Gal-3 et du CRDr tagués

Au terme de la purification, nous avons obtenu 975 µg de CRDr et 394,5 µg de Gal-3R (figure 88) et ce, pour 2 L de culture de départ.

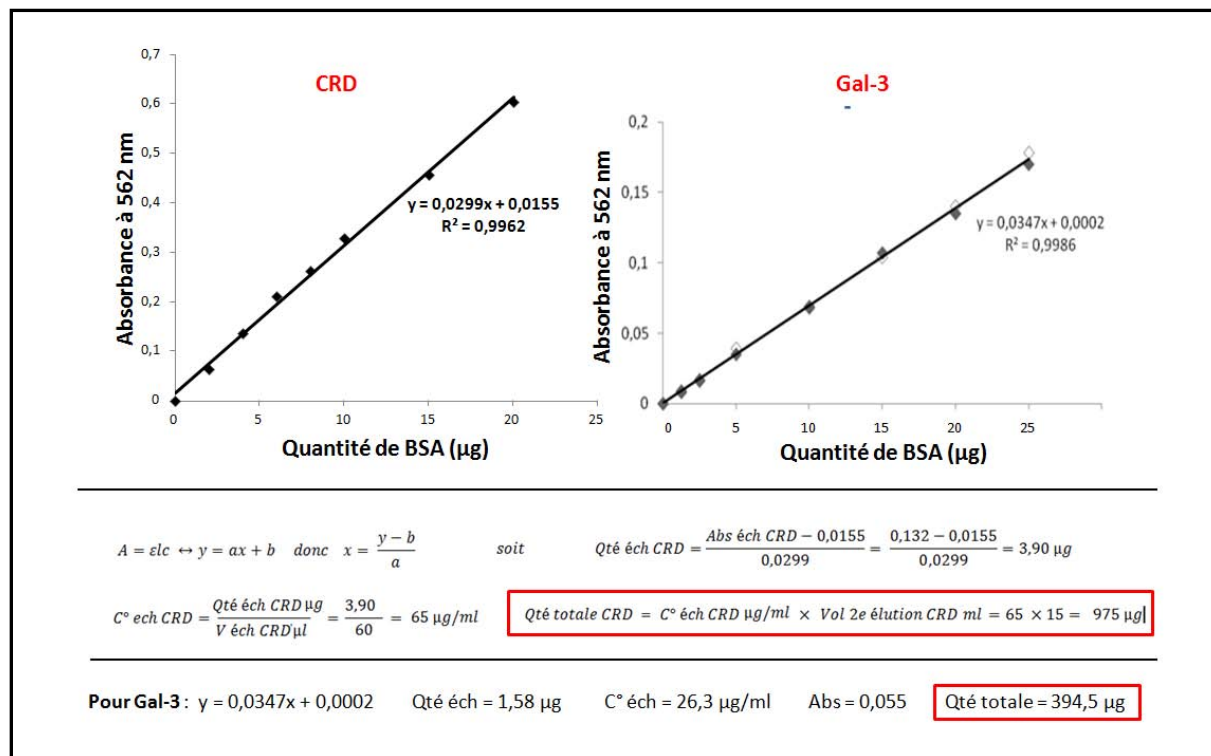


Figure 88. Quantification de la Gal-3R et du CRDr tagués.

1.4. Contrôle de l'absence d'endotoxines

L'absorbance des échantillons de PtR est similaire à celle du contrôle négatif (PBS) et inférieure à celle du contrôle positif (IL-1). Grâce à l'équation de la droite d'étalonnage de nitrites, nous avons calculé les concentrations correspondantes. Il ressort que, pour le contrôle négatif et les PtR, la concentration de nitrites est inférieure au seuil de détection de la méthode (2 µM). Par conséquent, les PtR purifiées sont considérées comme exemptées d'endotoxines.

	PBS	Gal-3 40 nM	CRD 40 nM	CRD 120 nM	CRD 400 nM	IL-1 100 pg/ml
Lot de chondrocytes arthrosiques N°1	< 1 µM	< 1 µM	< 1 µM	< 1 µM	< 1 µM	11,89 µM
Lot de chondrocytes arthrosiques N°2	< 0,5 µM	< 0,5 µM	< 2 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM	4,69 µM
Lot de chondrocytes arthrosiques N°3	< 0,5 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM	9,03 µM

Tableau XXIV. Dosage des nitrites dans les surnageants de culture de chondrocytes humains arthrosiques stimulés par de la Gal-3R ou du CRDr tagués.

Les concentrations des PtR utilisées correspondent à celles qui ont été utilisées ensuite sur les cellules pour les tests d'activité et les expériences de compétition CRDr vs Gal-3R.

2. Résultats préliminaires de l'étude du potentiel antirhumatismal du CRDr *tagué*

2.1. Vérification de l'activité biologique de la Gal-3R *taguée*

Nous avons étudié l'expression du gène MMP-3, un marqueur connu du catabolisme chondrocytaire. Dans nos conditions expérimentales, la Gal-3R induit l'expression de MMP-3 dans les chondrocytes arthrosiques, de façon dose dépendante et avec une concentration minimale active de 20 nM (0,5 µg/ml) (**figure 89**). En effet, à cette concentration, les chondrocytes stimulés expriment le gène MMP-3 environ quatre fois plus que les cellules contrôles (PBS). Lorsque la concentration de Gal-3R est doublée ou multipliée par 10, le niveau d'expression de MMP-3 est multiplié par environ 1,5 ou 4, respectivement.

Lorsqu'elle est dénaturée thermiquement (Δ), la Gal-3 recombinante n'a plus aucun effet sur l'expression de MMP-3 par les chondrocytes traités. Ce résultat permet d'affirmer que la surexpression dose-dépendante de MMP-3 précédemment décrite, est attribuable à la seule Gal-3R et que celle-ci n'est pas contaminée par des endotoxines, ce qui conforte les résultats du dosage des nitrites.

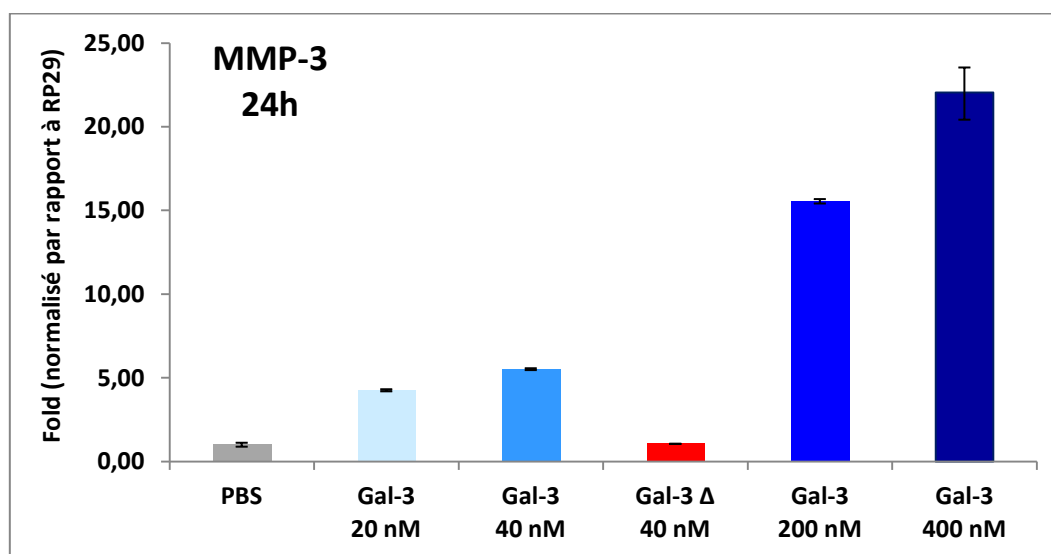


Figure 89. Vérification de l'activité biologique de la Gal-3R *taguée*, sur l'expression génique de la MMP-3 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

2.2. Caractérisation des effets biologiques de la Gal-3R *taguée*

En nous basant sur les résultats de (Janelle-Montcalm et al., 2007) nous avons retenu la concentration de 200 nM (5 µg/ml) pour les expériences de caractérisation des effets de la Gal-3R sur l'expression de certains gènes du métabolisme chondrocytaire.

2.2.1. Gènes de l'inflammation

Après 24h de stimulation par la Gal-3 recombinante, en normoxie, l'expression de l'IL-1 dans les chondrocytes humains arthrosiques est multipliée par quinze, de façon significative, par rapport à l'expression dans les cellules contrôles (**figure 90**). L'expression de l'IL-1 n'a pu être étudiée à 72h, ni en hypoxie, en raison de la forte mortalité cellulaire observée dans ces conditions expérimentales.

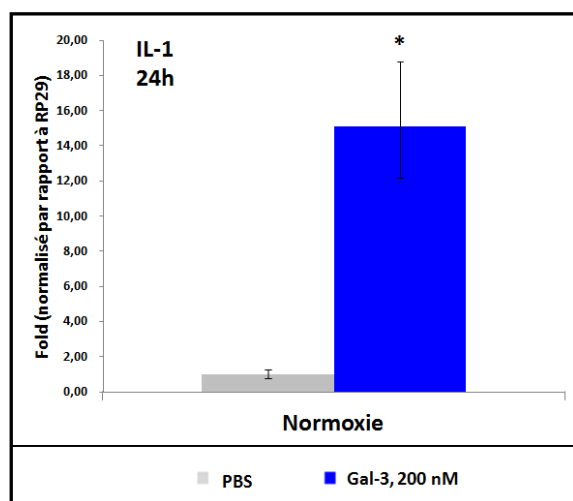


Figure 90. Effet de la Gal-3R *taguée*, sur l'expression génique de l'IL-1 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

PBS : contrôle. Normoxie : 21% O₂. n = 3.

En normoxie et en hypoxie, les chondrocytes arthrosiques stimulés par de la Gal-3R pendant 24h, expriment deux fois plus d'IL-6, que les cellules contrôles. Aucune différence d'expression n'a été observée à 72h entre les cellules stimulées et les contrôles (**figure 91**).

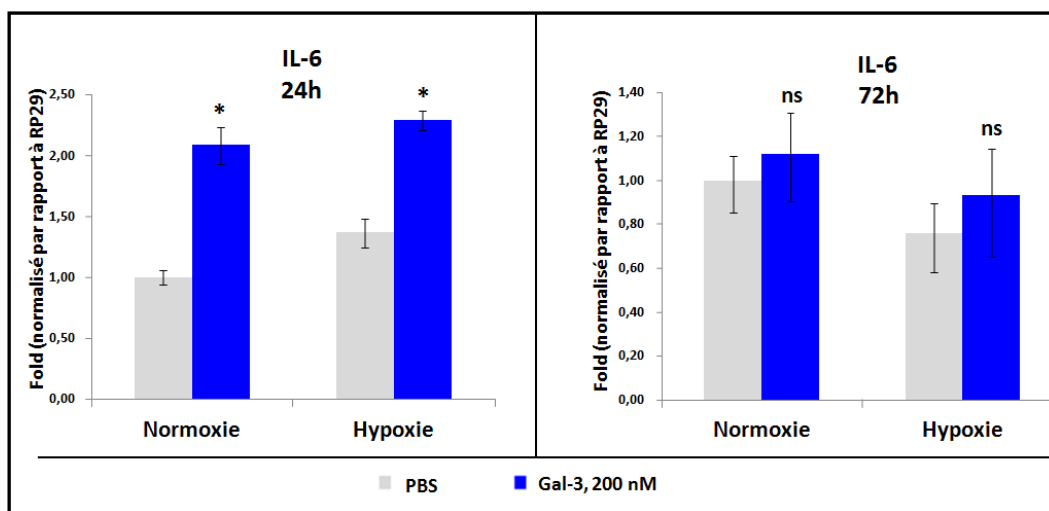


Figure 91. Effet de la Gal-3R *taguée*, sur l'expression génique de l'IL-6 dans des chondrocytes arthrosiques.

PBS : contrôle. Normoxie / Hypoxie : 21% / 2,2% O₂. n = 6 (24h). n = 7 (72h). ns : non significatif.

2.2.2. Gènes du catabolisme matriciel

Après 24 ou 72h de stimulation par la Gal-3R, le niveau d'expression de MMP-3 est presque doublé dans les chondrocytes arthrosiques, par rapport aux cellules contrôles, quelles que soient les conditions d'oxygénation (**figure 92, A**). En outre, à 24 comme à 72h, la Gal-3R n'a aucun effet significatif sur l'expression d'ADAMTS-4 en normoxie, mais elle induit une faible surexpression (33%) de ce gène en hypoxie (**figure 92, B**). Enfin, aucun effet significatif de la Gal-3R sur l'expression de MMP-13 et d'ADAMTS-5 n'a été observé quelles que soient les conditions expérimentales (résultats non présentés).

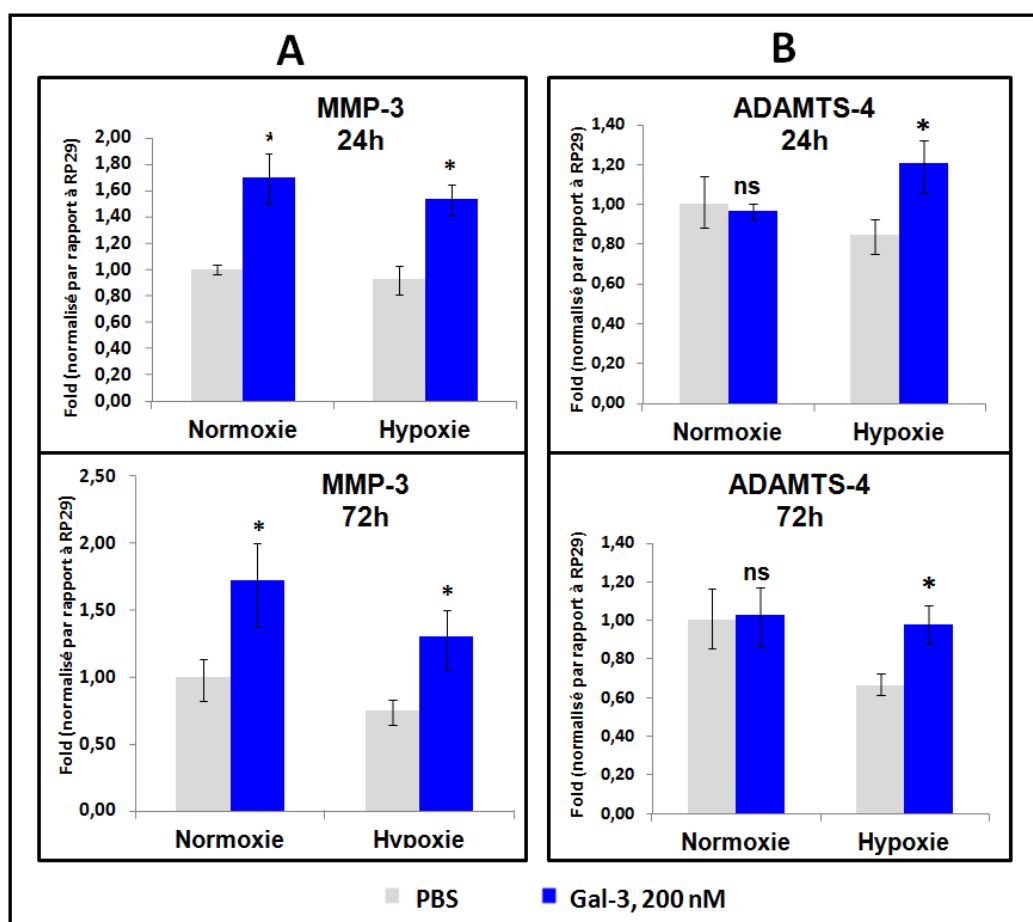


Figure 92. Effet de la Gal-3R taguée, sur l'expression génique de la MMP-3 et de l'ADAMTS-4 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

PBS : contrôle. Normoxie / Hypoxie : 21% / 2,2% O₂ n = 6. ns : non significatif.

2.2.3. Gènes de l'anabolisme matriciel

En normoxie, à 24h comme à 72h, la Gal-3R inhibe, l'expression chondrocytaire du collagène 2, de 40%, et de l'agrécan, de 20%, de façon significative (**figure 93, A**).

En hypoxie, elle n'a pas d'effet significatif sur l'expression de ces gènes, sauf sur celle du collagène 2, qu'elle inhibe uniquement à 72h, de 22% (**figure 93, B**).

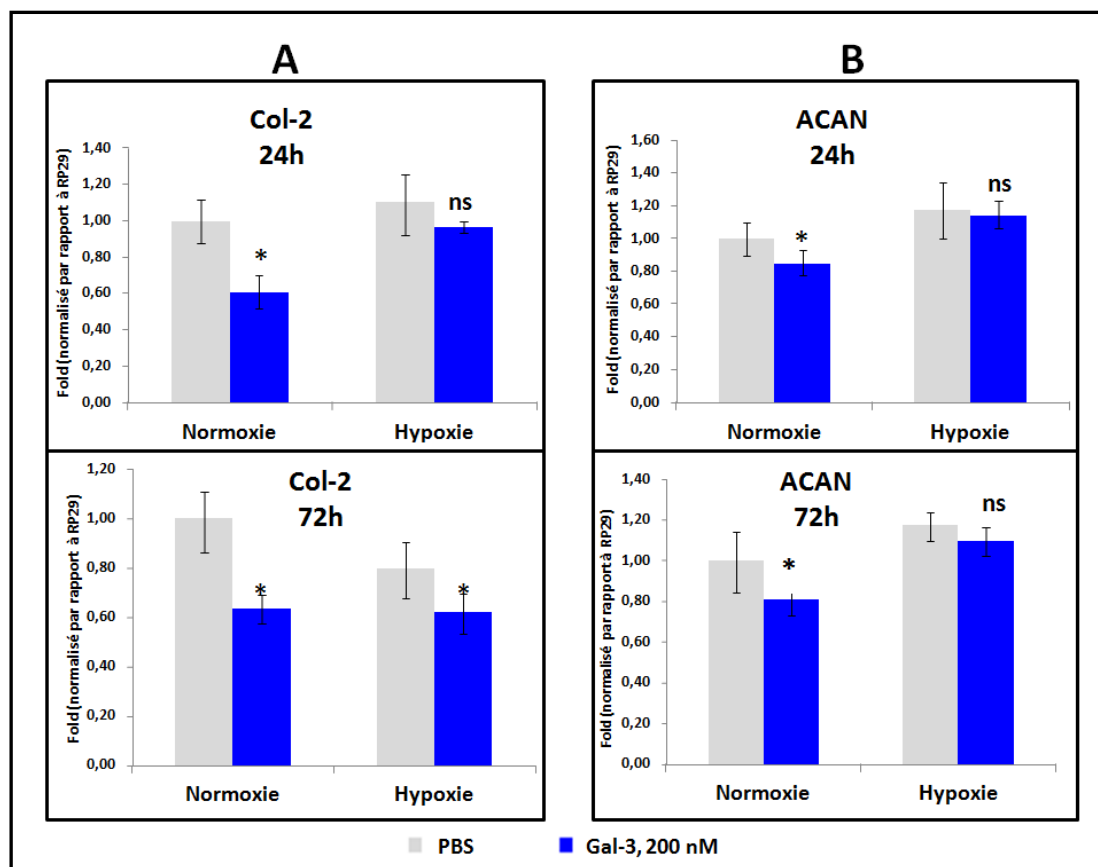


Figure 93. Effet de la Gal-3R *taguée* sur l'expression génique du collagène 2 et de l'agrécane dans des chondrocytes humains arthrosiques.

PBS : contrôle. Normoxie / Hypoxie : 21% / 2,2% O₂. n = 6 (24h). n = 7 (72h). ns : non significatif.

2.2.4. Synthèse sur la caractérisation des effets de la Gal-3R *taguée*

Dans ces expériences, seul le gène MMP-3 est surexprimé dans les chondrocytes stimulés avec de la Gal-3R, dans les quatre conditions expérimentales testées.

L'expression de l'IL-1 n'a pu être étudiée que pour une seule condition expérimentale (normoxie, 24h), en raison de la mortalité cellulaire observée dans les trois autres, et qui demeure inexpliquée.

L'inhibition de l'expression du gène Col-2 a été observée dans trois conditions expérimentales : 24 ou 72h en normoxie, et 72h en hypoxie.

Quant aux autres gènes, ils sont répondeurs à la Gal-3R uniquement en normoxie, pour l'agrécane, en hypoxie pour ADAMTS-4 ou, après stimulation de 24h pour l'IL-6.

La condition pour laquelle la plupart des gènes (IL-1, IL-6, MMP-3, Col-2 et ACAN) répondent à la Gal-3R, est la normoxie pendant 24h. Pour les expériences de compétition, nous avons donc choisi d'étudier l'expression de ces gènes dans cette condition.

2.3. Evaluation du rôle antagoniste du CRDr *tagué*

Pour cette étude, notre objectif était de choisir une concentration de Gal-3R suffisante pour produire un effet significatif sans être maximal, et donc adaptée à mettre en évidence un effet inhibiteur. Compte tenu de ces critères, nous avons choisi d'utiliser la Gal-3R à une concentration de 40 nM (1,2 µg/ml). Pour le CRDr, nous avons choisi des concentrations représentant respectivement 1, 3 ou 10 équivalents molaires de Gal-3R, soit 40 nM (0,8 µg/ml), 120 nM (2,4 µg/ml) et 400 nM (8 µg/ml).

2.3.1. Gènes de l'inflammation

Les chondrocytes stimulés par la Gal-3R (40 nM), expriment 15 fois plus d'IL-1 (**figure 94**) et 8 fois plus d'IL-1 (**figure 95**), que les chondrocytes contrôles (PBS).

Pour l'expression de l'IL-1, comparé au contrôle, le CRDr n'a aucun effet significatif, à 40 nM ou à 120 nM, mais, lorsqu'il est à 400 nM, il induit l'expression du gène d'environ 12 fois. Dans les expériences de co-stimulation, le CRDr est incapable, à 40 ou à 120 nM, d'inhiber les effets de la Gal-3R. En revanche, à 400 nM, il agit de façon additive avec elle pour stimuler l'expression de l'IL-1.

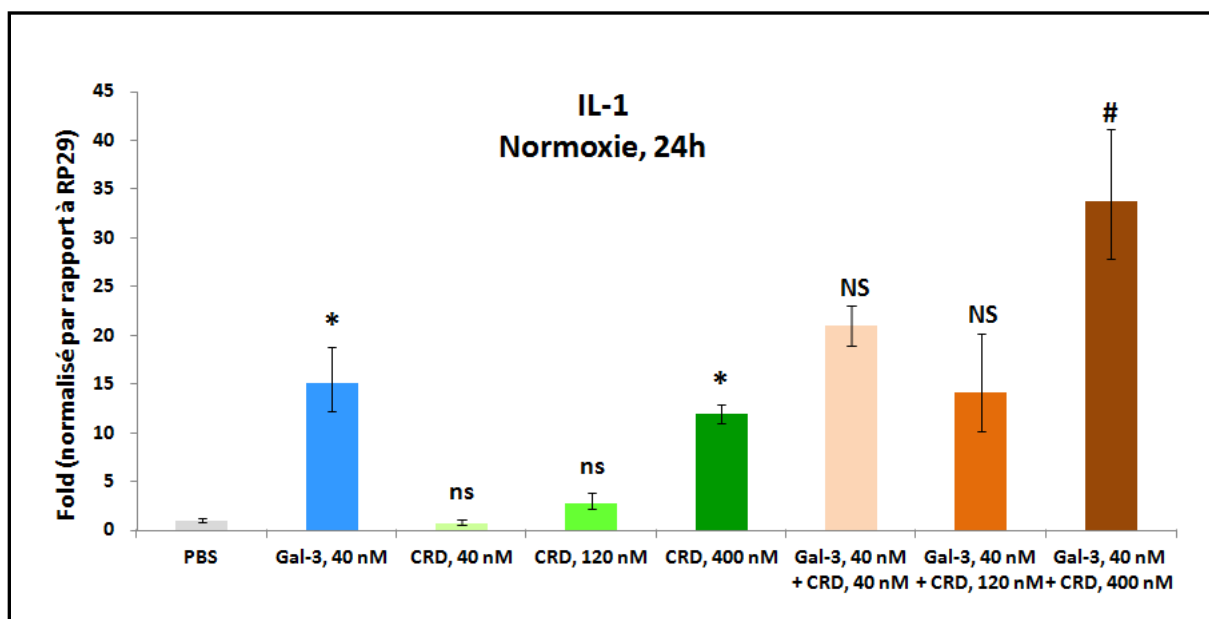


Figure 94. Effet du CRDr *tagué*, sur l'expression génique de l'IL-1 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

Les conditions « Gal-3 » ou « CRD » sont comparées à la condition contrôle (PBS). Les conditions « Gal-3 + CRD » sont comparées à la condition « Gal-3 ». n = 3. * : vs PBS. # : vs Gal-3. ns / NS : non significatif vs PBS / vs Gal-3, respectivement.

Pour l'expression de l'IL-6, comparé au contrôle, le CRDr a un effet stimulant, quelle que soit sa concentration, et ce, de façon dose-dépendante (**figure 96**). Dans les expériences de co-stimulation, il potentialise l'effet stimulant de la Gal-3R, à toutes les concentrations testées.

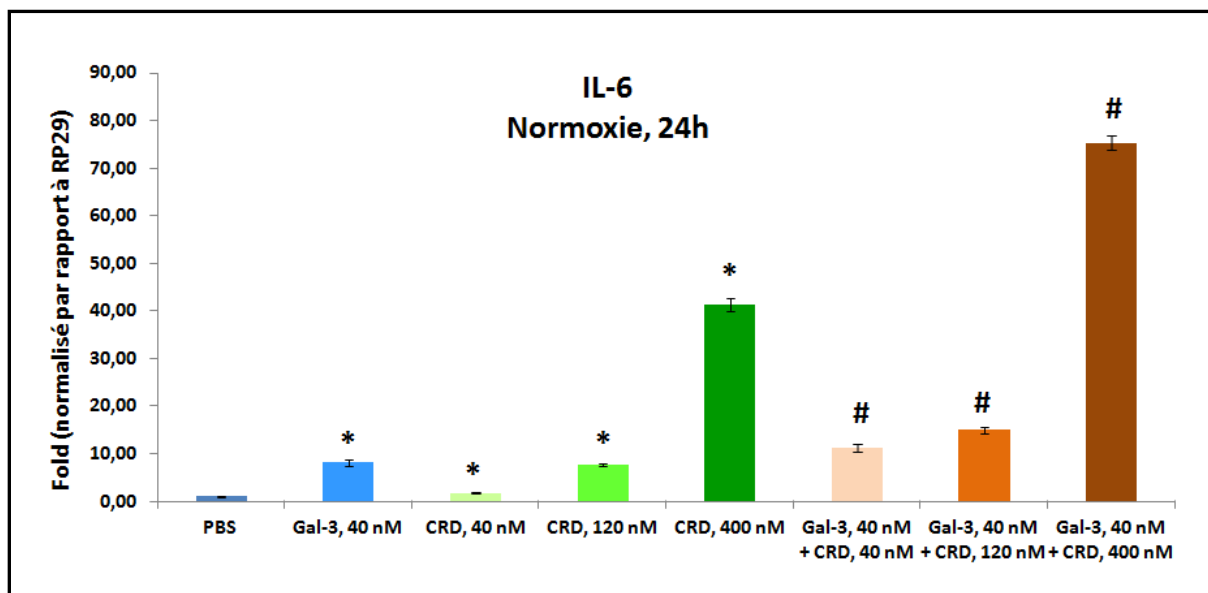


Figure 95. Effet du CRDr *tagué*, sur l'expression génique de l'IL-6 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

Les conditions « Gal-3 » ou « CRD » sont comparées à la condition contrôle (PBS). Les conditions « Gal-3 + CRD » sont comparées à la condition « Gal-3 ». **n = 4**. * : vs PBS. # : vs Gal-3.

2.3.2. Gène du catabolisme matriciel

Les chondrocytes stimulés par la Gal-3 recombinante (40 nM) expriment 4 fois plus de MMP-3 que les cellules non stimulées (**figure 96**). A 120 nM et à 400 nM, le CRDr induit significativement l'expression de MMP-3. Cependant, lorsqu'il est associé à la Gal-3R, son effet varie en fonction de sa concentration. En effet à 40 nM, l'expression de MMP-3 est inchangée, à 120 nM, elle est inhibée de moitié et enfin, à 400 nM, l'effet du CRDr s'ajoute à celui de la Gal-3R pour augmenter l'expression de MMP-3.

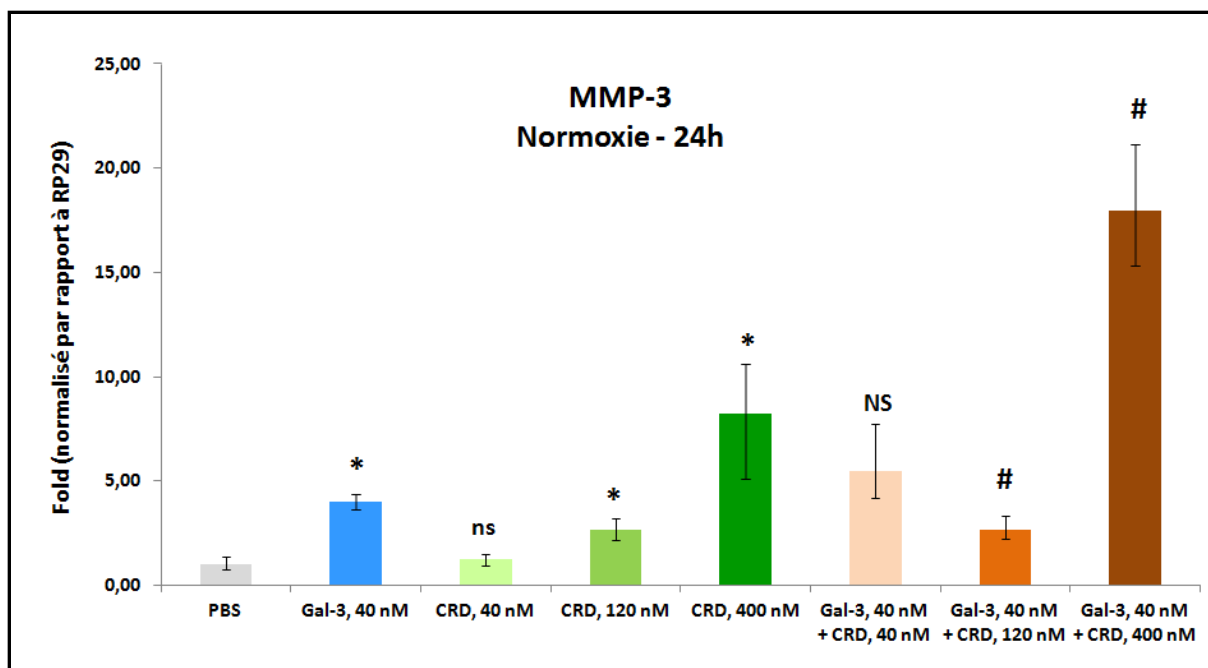


Figure 96. Effet du CRDr tagué, sur l'expression génique de la MMP-3 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

Les conditions « Gal-3 » ou « CRD » sont comparées à la condition contrôle (PBS). Les conditions « Gal-3 + CRD » sont comparées à la condition « Gal-3 ». $n = 4$. *: vs PBS. #: vs Gal-3. ns / NS : non significatif vs PBS / vs Gal-3, respectivement.

2.3.3. Gènes de l'anabolisme matriciel

La Gal-3R inhibe significativement l'expression de Col-2 de 30% (**figure 97**) et de l'agrécan de 20% (**figure 98**), par rapport au contrôle. Le CRD, quelle que soit sa concentration, est aussi capable d'inhiber significativement l'expression de Col-2 et de l'agrécan, et ce, de façon dose-dépendante. Quand le CRD est associé à la Gal-3, ses effets dépendent de sa concentration et du gène étudié. Ainsi pour Col-2, le CRD à 40 ou 120 nM ne modifie pas l'effet inhibiteur de la Gal-3R ; en revanche, à 400 nM, il le potentialise. Pour l'agrécan, à 120 nM et à 400 nM, le CRD aggrave l'effet inhibiteur de la Gal-3, mais n'a aucun effet à 40 nM.

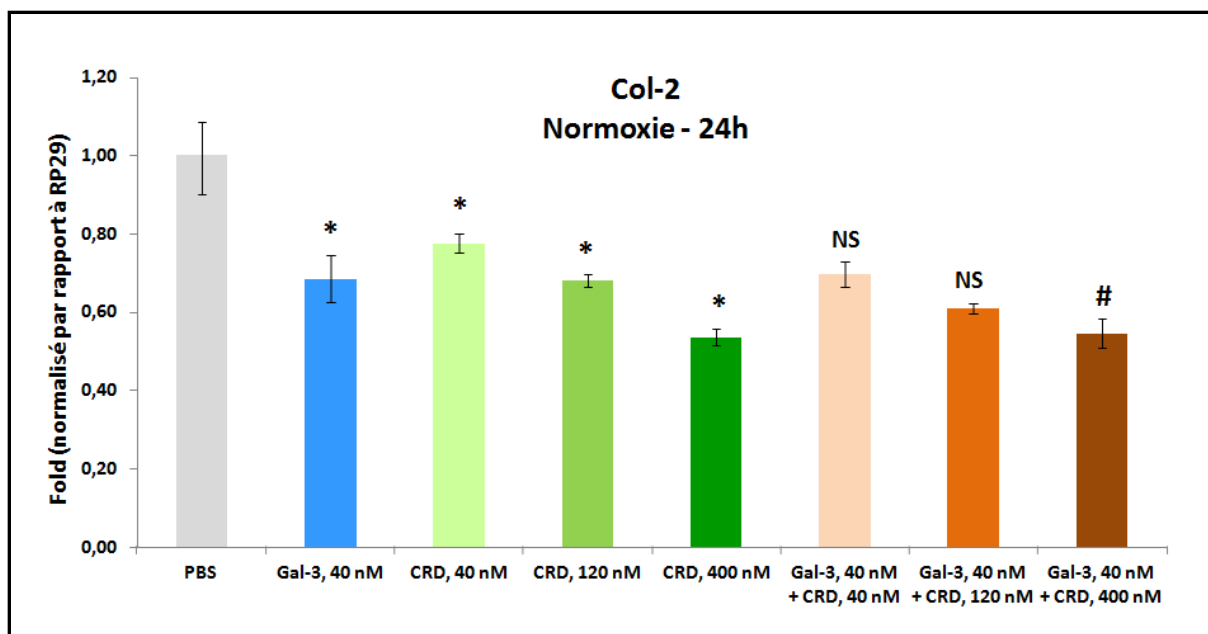


Figure 97. Effet du CRDr *tagué*, sur l'expression génique du collagène 2 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

Les conditions « Gal-3 » ou « CRD » sont comparées à la condition contrôle (PBS). Les conditions « Gal-3 + CRD » sont comparées à la condition « Gal-3 ». **n = 4**. *: vs PBS. #: vs Gal-3. **NS** : non significatif vs Gal-3.

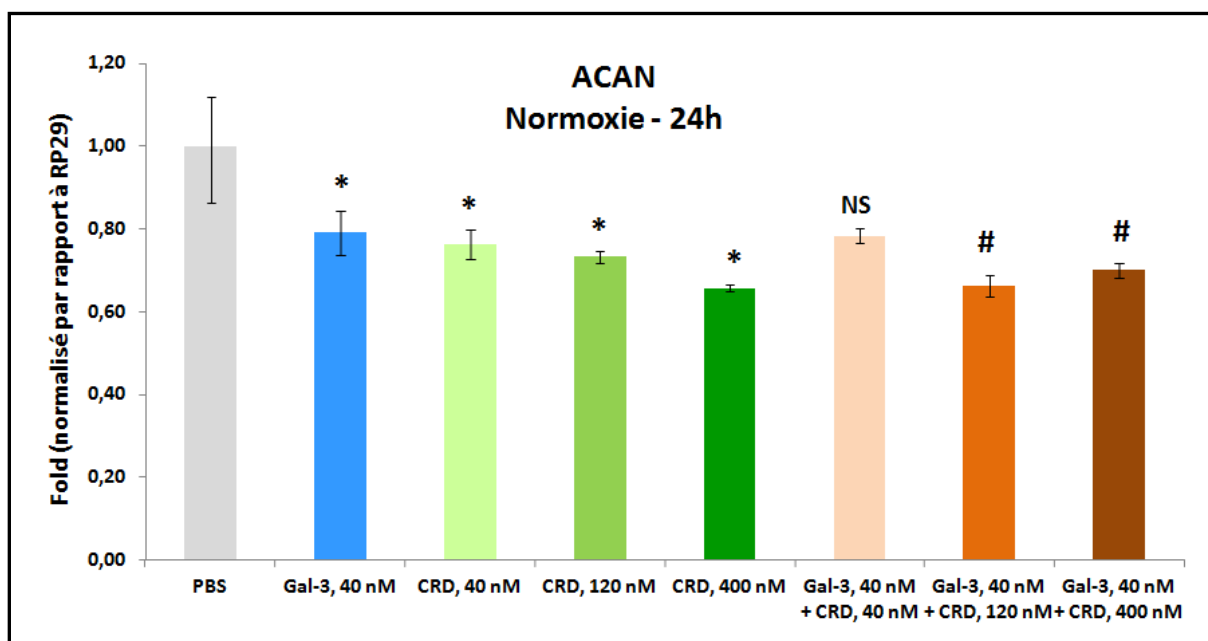


Figure 98. Effet du CRDr *tagué*, sur l'expression génique de l'agrécane dans des chondrocytes humains arthrosiques.

Les conditions « Gal-3 » ou « CRD » sont comparées à la condition contrôle (PBS). Les conditions « Gal-3 + CRD » sont comparées à la condition « Gal-3 ». **n = 4**. *: vs PBS. #: vs Gal-3. **NS** : non significatif vs Gal-3.

Section 3 - Discussion

1. Production de la Gal-3R et du CRDr *tagués*

1.1. Stratégie de purification

La purification des lectines peut être réalisée par différentes méthodes de chromatographie dont la plus utilisée reste la chromatographie d'affinité sur résine recouverte de saccharides (Guan and Chen, 2014). En fonction de l'affinité de la lectine pour le ligand, une à plusieurs étapes de chromatographie peuvent être nécessaires pour augmenter le degré de spécificité (Arnau et al., 2006; Nascimento et al., 2012). Nous avons opté pour cette stratégie pour purifier la Gal-3 et le CRD recombinants.

L'utilisation d'une seule étape de chromatographie d'affinité pour le lactose exposerait *a priori* à la contamination des lectines recombinantes par des lectines bactériennes éventuellement présentes dans l'extrait brut. Par conséquent, dans le but d'affiner la purification, nous avons choisi d'ajouter une étape de chromatographie d'affinité pour le Ni²⁺.

Tout comme pour la chromatographie d'affinité pour le lactose, l'utilisation de la chromatographie d'affinité pour le nickel exposerait au risque de co-purification d'impuretés (Arnau et al., 2006; Pina et al., 2014; Young et al., 2012). L'une d'entre elles est la SlyD, une peptidyl-prolyl isomérase (Hochuli et al., 1988) qui, de surcroît, a un poids moléculaire proche de celui de la Gal-3. Ainsi, une contamination de la préparation de Gal-3R par la SlyD aurait été difficile à identifier et, une étape supplémentaire de chromatographie d'affinité, pour le lactose, aurait été nécessaire pour séparer ces deux protéines.

Dans le cas de nos protéines recombinantes, l'ordre des chromatographies a également son importance. En effet, il nous est apparu judicieux d'utiliser la chromatographie d'affinité pour le nickel en dernier, car l'imidazole du deuxième tampon d'élution des PtR a une masse moléculaire inférieure à celle du lactose du premier tampon d'élution (60 g/mol vs 342 g/mol, respectivement), donc est, *a priori*, plus facilement dialysable. Or, il est indispensable de ne plus avoir de lactose dans les préparations de PtR car ce sucre pourrait empêcher la liaison des lectines aux glycoprotéines membranaires des chondrocytes lors des tests d'activité fonctionnelle.

1.2. Méthode de contrôle de l'absence d'endotoxines

Le dosage des nitrites nous est apparu simple à mettre en œuvre et pertinent car nous travaillons sur des chondrocytes, cellules qui répondent à une stimulation par des endotoxines en exprimant la *nitric oxide synthase inductible* (iNOS) (Palmer et al., 1993).

Cette isoforme produit une grande quantité d'oxyde nitrique (de l'ordre du μM) qui, dans le milieu de culture, est oxydé en ions nitrites. De plus, ce dosage est beaucoup plus rapide, moins contraignant et moins coûteux que les tests préconisés par la Pharmacopée Européenne (test du lapin, limulus test).

1.3. Résultats de la purification

A la différence de la Gal-3R, une fraction de CRDr est retrouvée dans les liquides de rinçage de la résine recouverte de lactose, ce qui traduit, soit la saturation de la résine, soit la capacité des tampons de rinçage à perturber l'interaction lactose-lectine tronquée.

Dès la première élution (lactose), pour chacune des PtR attendues, une seule bande est visible au bon poids moléculaire sur le gel. Par conséquent, la chromatographie d'affinité pour le lactose seule aurait probablement été suffisante pour isoler ces PtR et limiter les pertes accentuées par l'ajout d'une autre chromatographie (Nascimento et al., 2012). Néanmoins, comme expliqué précédemment, il nous a semblé prudent d'envisager une étape supplémentaire de purification par chromatographie d'affinité pour le nickel.

Les rendements de production restent cependant très modestes (environ 200 μg de Gal-3R et 400 μg de CRDr par litre de bouillon bactérien de départ) au regard de ce qu'il est possible d'obtenir avec un système bactérien (plusieurs grammes / litre) (Demain and Vaishnav, 2009). Nous avons, par la suite, vérifié plusieurs éléments importants pour l'expression de PtR dans *E. coli* et identifié trois d'entre eux qui pourraient expliquer ces faibles rendements. Le premier, est la souche utilisée (K12 (NEB 10 β)), qui est, en fait, beaucoup plus adaptée au clonage qu'à l'expression de PtR. Le deuxième élément, est la proportion du volume de bouillon bactérien dans le contenant de culture (50% au lieu des 25 % recommandés par Studier (2005)). Enfin, le troisième élément, est la température de culture pendant l'induction (37°C alors que plusieurs travaux rapportés dans la littérature décrivent une température optimale de 20°C (Gräslund et al., 2008 ; Studier, 2005)).

Pour résumer, le clonage, l'expression et la purification de la Gal-3R et du CRDr ont été effectifs mais nécessitent quelques optimisations pour améliorer le rendement de production. Concernant le clonage et l'expression, il faudrait envisager de changer de plasmide et/ou de souche bactérienne et de cultiver ces bactéries dans un volume adapté à la verrerie employée et à une basse température pour limiter la formation de corps d'inclusion. Quant à la purification, il faudrait modifier les étapes de rinçage (changer la composition des tampons, diminuer le nombre de rinçages), mais pas celle de l'élution qui est suffisamment efficace puisque la totalité des PtR est retrouvée dans l'éluat.

En conclusion, la quantité de PtR purifiées, bien qu'imparfaite, nous a tout de même permis d'effectuer des tests d'activité sur des chondrocytes humains arthrosiques.

2. Etude du potentiel antirhumatismal du CRDr *tagué*

2.1. Caractérisation des effets biologiques de la Gal-3R *taguée*

2.1.1. Choix de la concentration de Gal-3R *taguée*

A la concentration de 200 nM (5 µg/ml), nous étions sûrs de pouvoir mettre en évidence des effets spécifiques de la Gal-3R sur les chondrocytes étudiés. A des concentrations supérieures (10 µg/ml), même si certains travaux (Filer et al., 2009) ont montré une activité de Gal-3R sur l'expression et la sécrétion de Ck et de MMP, il se peut que ces effets ne soient plus spécifiques de la Gal-3R. En outre, compte tenu de nos faibles rendements de production, nous n'aurions de toute façon pas eu suffisamment de Gal-3R d'un même lot pour réaliser la totalité des expériences.

2.1.2. Choix des conditions expérimentales

Nous avons étudié l'expression de certains gènes du métabolisme chondrocytaire en normoxie ou en hypoxie, et pour une incubation de 24 ou 72h. Il en ressort qu'en hypoxie, les effets de la Gal-3R ne sont pas significativement différents de ceux observés en normoxie (excepté pour ADAMTS-4). De même, la durée de l'incubation ne semble pas influencer les variations d'expression de ces gènes puisque les résultats obtenus à 24h sont similaires à ceux obtenus à 72h (excepté pour IL-6 et Col-2). Tout cela justifie notre choix d'étudier l'expression de ces gènes en normoxie à 24h, pour la suite des expériences.

2.1.3. Effets biologiques de la Gal-3R *taguée*

Nous avons confirmé le rôle pro-inflammatoire et pro-catabolique de la Gal-3R, également démontré dans d'autres types cellulaires. De plus, nous avons mis en évidence des effets anti-anaboliques de cette Pt, ce qui n'avait jamais été démontré.

Effets pro-inflammatoires

Tout comme les monocytes humains (Jeng et al., 1994), nos échantillons de chondrocytes stimulés par la Gal-3R surexpriment l'IL-1 et, comme les fibroblastes synoviaux de patients atteints d'OA ou de PAR (Filer et al., 2009), ils surexpriment l'IL-6.

Effets pro-cataboliques

Comme ce qui a été démontré par Janelle-Montcalm et coll., (2007), nos échantillons de chondrocytes surexpriment MMP-3, fortement impliqué dans la dégradation du cartilage et la synovite (Jiang et al., 2013 ; Sun et al., 2014).

Dans les chondrocytes humains arthrosiques, le gène ADAMTS-4 est inductible par des cytokines pro-inflammatoires (Naito et al., 2007; Sylvester et al., 2012; Xue et al., 2013) et, donc possiblement, dans un contexte d'hypoxie, puisque la réaction inflammatoire et l'hypoxie sont deux phénomènes interdépendants (Barrels et al., 2013). Cela pourrait expliquer que, dans nos conditions expérimentales, la Gal-3R, médiateur pro-inflammatoire, induit l'expression d'ADAMTS-4 uniquement en hypoxie.

Les gènes MMP-13 et ADAMTS-5, quant à eux, semblent plutôt insensibles à la Gal-3R, ce qui, pour le premier, confirme les résultats des travaux antérieurs de Janelle-Montcalm et coll. (2007). En revanche, nos résultats sur ADAMTS-5 sont différents de ceux précédemment rapportés (Janelle-Montcalm et al., 2007). Nous proposons trois explications à cela. Soit, le gène ADAMTS-5 n'est pas réellement une cible de la Gal-3. Soit ce gène était déjà exprimé dans nos échantillons à un niveau très élevé, de sorte qu'une stimulation par la lectine était insuffisante pour le faire varier significativement. Pour en être sûr, il aurait fallu disposer de chondrocytes sains comme contrôle mais, pour des raisons éthiques et réglementaires, cela n'a pas été possible. Soit enfin, son rôle dans la physiopathologie de l'OA est discutable. En effet, d'une part, le gène ADAMTS-5 est connu pour être constitutivement exprimé dans les chondrocytes humains arthrosiques, et d'autre part, l'expression de ce gène ne varie pas entre un cartilage humain sain et un cartilage humain arthrosique (Naito et al., 2007). Ces résultats poussent à remettre en question l'implication réelle d'ADAMTS-5 dans la physiopathologie de l'arthrose. D'autres travaux, menés chez la souris, rapportent au contraire, qu'ADAMTS-5 joue un rôle dans la dégradation du cartilage (Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005) et donc, la physiopathologie de l'OA. En réalité, le rôle controversé d'ADAMTS-5 s'explique par des spécificités d'espèces : cette enzyme joue un rôle important dans la physiopathologie de l'arthrose chez le rongeur et peu chez l'Homme, et *vice versa* pour ADAMTS-4 (Fosang et al., 2008).

Effets anti-anaboliques

Dans nos conditions expérimentales, la Gal-3R inhibe l'expression génique de deux constituants majeurs de la matrice extracellulaire, le collagène de type II et l'agrécan. Cet effet anti-anabolique de la Gal-3R concorde avec ses effets pro-inflammatoires et pro-cataboliques, et constitue un argument supplémentaire pour expliquer la physiopathologie de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde. A notre connaissance, cet effet anti-anabolique de la Gal-3R, n'a jamais été rapporté.

2.1.4. Synthèse

Nos résultats préliminaires mettent en évidence des effets délétères de la Gal-3R sur des chondrocytes humains arthrosiques, et d'autre part, ils suggèrent un impact possible de cette protéine sur la synthèse de composants matriciels du cartilage.

Néanmoins, il conviendra de vérifier si ces effets observés au niveau génique, ont une répercussion significative au niveau protéique. Il faudrait, par exemple, réaliser des tests d'activité enzymatique (pour MMP-3 et ADAMTS-4), des dosages immuno-enzymatiques (pour MMP-3 et IL-6), des *western-blots*, des dosages colorimétriques de constituants de protéoglycanes (glycosamino-glycanes : GAG), des colorations sélectives des protéoglycanes (bleu alcian, safranine O) ou des collagènes (rouge Sirius).

Il est à noter que nous avons essayé de mesurer, par fluorimétrie, l'activité enzymatique de MMP-3 dans les surnageants de culture, mais nous avons rencontré des difficultés techniques (protocole inefficace). Nous nous sommes donc résolus à réaliser un dosage immuno-enzymatique de cette protéine. Les analyses préliminaires de ces dosages semblent démontrer que la Gal-3R induit la sécrétion de MMP-3 par les chondrocytes stimulés. Nous avons également entrepris une série de dosages colorimétriques de GAG (avec du *diméthylméthylène blue*) dans les surnageants de culture, et les résultats sont en cours d'exploitation.

2.2. Evaluation du rôle antagoniste du CRDr *tagué*

Après avoir caractérisé les effets de la Gal-3R sur des chondrocytes humains arthrosiques, nous avons voulu étudier la capacité du CRDr à les inhiber.

Nos résultats montrent, de façon inattendue, que sur des chondrocytes humains arthrosiques, le CRDr possède un effet mimant celui de la Gal-3R, sur l'expression de l'IL-6, du collagène 2 et de l'agrécan, dès 40 nM, sur celle de MMP-3, dès 120 nM, et sur celle de l'IL-1, à 400 nM. Par ailleurs, quand il est associé à la Gal-3R, dans les expériences de co-stimulation, le CRD synthétisé est incapable d'inhiber les effets de la Gal-3R, voire même, potentialise ces effets. Seule l'expression de MMP-3 induite par la Gal-3R a pu être inhibée de moitié par le CRDr à 120 nM. Globalement, dans nos conditions expérimentales, le CRDr se comporte plus comme un mimétique de la Gal-3R, que comme un antagoniste.

Ces observations vont à l'encontre de notre hypothèse de travail selon laquelle le CRD étant théoriquement incapable de se dimériser, il ne pourrait pas reproduire les mêmes effets que la Gal-3 (Janelle-Montcalm et al., 2007; Nieminen et al., 2006) et constituerait, par la même occasion, un inhibiteur compétitif (John et al., 2003; Ochieng et al., 1998). Il est vraisemblable que, dans nos conditions expérimentales, le CRDr mime les effets de la Gal-3R, suite la formation d'oligomères.

Ces effets inattendus pourraient résulter de l'interaction du *tag* 6-His avec les ions Ca^{2+} du milieu de culture des chondrocytes, selon le schéma proposé en **figure 99**. En effet, ces cations divalents sont connus pour leur capacité à lier les noyaux imidazole de l'histidine (Pedersen, 1972), de façon similaire aux ions Ni^{2+} de la colonne de chromatographie utilisée lors de la seconde étape de purification des PtR.

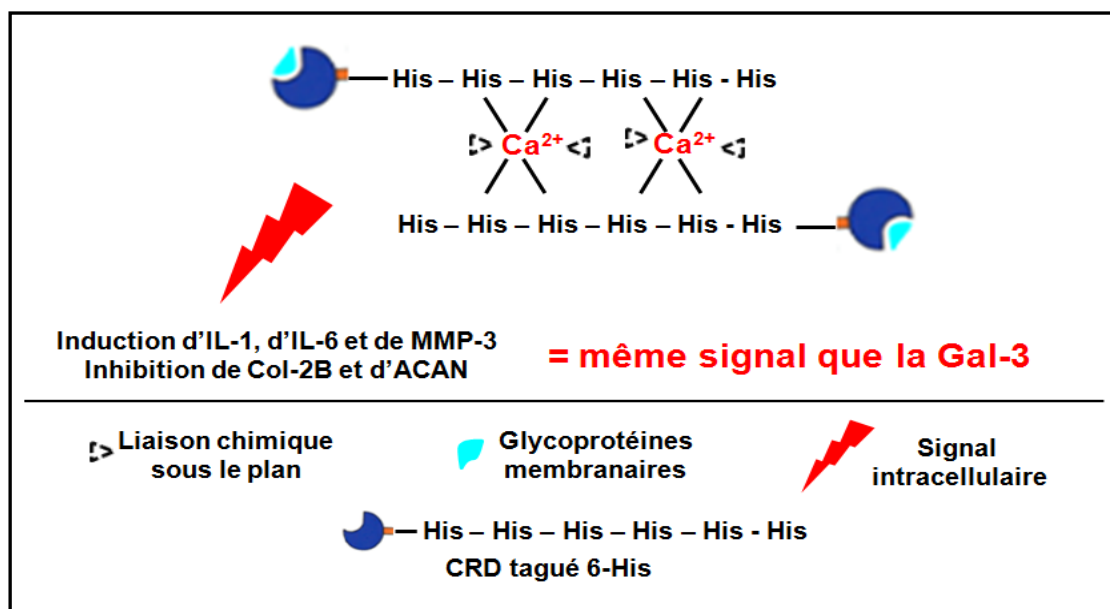


Figure 99. Hypothèse de la dimérisation artificielle du CRDr tagué.

Tout comme le nickel de la colonne de chromatographie d'affinité, le calcium est un ion bivalent susceptible d'interagir avec les noyaux imidazole des histidines du *tag* (Pedersen, 1972). Cette interaction engendrerait des oligomères de CRD capables de générer un signal intracellulaire mimant celui de la Gal-3 recombinante, au niveau des chondrocytes arthrosiques en culture.

Comme rapporté dans la littérature (Costa et al., 2014; Zhao et al., 2013), les *tags* peuvent modifier l'activité biologique d'une PtR. La présence d'un *tag* 6-His sur le CRD, pouvant être responsable des effets inattendus observés, 4 solutions ont été envisagées pour nous affranchir de cet artefact.

La première, consistant à cultiver les chondrocytes dans du milieu sans chlorure de calcium, n'a pas été testée car ces milieux contiennent tout de même d'autres sels de calcium et d'autres cations divalents (Mg^{2+}). Même si ces ions sont en quantité infime, nous n'étions pas à l'abri d'une interférence éventuelle avec le tag histidine.

La deuxième solution a consisté à cliver le *tag* His par une entérokinase (EK Max®, Invitrogen). Pour des raisons purement techniques (optimisation insuffisante de la méthode, quantité insuffisante de PtR, etc.), ce clivage n'a pas été effectif et nous avons perdu une grande partie du lot de CRDr produit.

La troisième solution possible aurait été le clivage enzymatique, d'une partie de la Gal-3R à disposition, par des élastases ou de la collagénase de *Clostridium hystolyticum*.

Nous n'avons pas testé cette solution pour trois raisons. D'une part, la quantité résiduelle de Gal-3R disponible après toutes les séries d'expériences n'aurait pas été suffisante et, il aurait fallu envisager la production d'un nouveau lot. D'autre part, les fragments engendrés par le clivage (14, 16 et 22 kDa, par les élastases (Nieminen et al., 2005) ; 10 kDa et 16 kDa, par la collagénase (John et al., 2003)) doivent être séparés par chromatographie d'affinité, ce qui rajouterait une étape supplémentaire dans tout le processus de production. De plus, le fragment de 22 kDa, issu du clivage entre l'alanine en position 62 et la tyrosine en position 63 (Ochieng et al., 1998), contient encore quelques motifs PGAYP impliqués dans la formation d'oligomères.

La quatrième solution envisagée a été de cloner le CRD, mais aussi la Gal-3 dans un plasmide sans *tag* His, ce qui suppose que les lectines produites ne pourront être purifiées que par chromatographie d'affinité pour le lactose. Cela ne posera *a priori* pas de problème, puisque dans nos conditions expérimentales, cette chromatographie semble suffisante pour atteindre un degré de pureté intéressant (**figure 87**).

3. Synthèse

Nous avons réussi à produire de la Gal-3R et du CRDr, mais avec un faible rendement, probablement à cause de conditions expérimentales (souche bactérienne, volume d'inoculum, température de croissance) non optimales. Cependant, nous avons confirmé que, lorsque la Gal-3R est présente dans le milieu extracellulaire, elle induit l'expression de gènes de l'inflammation et du catabolisme matriciel par des chondrocytes humains arthrosiques. Nous avons également mis en évidence, pour la première fois, qu'elle induit l'inhibition de gènes de l'anabolisme matriciel, ce qui renforce son rôle délétère connu au niveau des tissus articulaires.

Par ailleurs, nous n'avons démontré que très épisodiquement, le rôle antagoniste du CRD vis-à-vis de la Gal-3R sur des chondrocytes humains arthrosiques. Dans nos conditions expérimentales, en effet, nous avons majoritairement observé un effet mimétique du CRDr, plutôt que compétiteur. Cet effet inattendu pourrait être la conséquence de la présence du *tag* histidine à l'extrémité N-terminale du CRDr. C'est pour cette raison qu'actuellement, nous recommençons ces expériences en utilisant des PtR non *tagués*. Dans cet objectif, nous avons conçu d'autres vecteurs contenant la séquence de Gal-3 ou celle du CRD, mais pas celle du *tag* 6-His. Nous avons aussi apporté des modifications dans le procédé de production des PtR, en vue d'améliorer leur taux d'expression et leur rendement de purification. Les résultats de ces travaux sont rapportés dans le deuxième chapitre de cette partie expérimentale.

Chapitre 2

Gal-3R et CRDr non tagués : conception, production et évaluation de leur activité biologique

Section 1 - Matériels et méthodes

1. Clonage moléculaire de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*

1.1. Stratégie spécifique à la Gal-3R non *taguée*

La stratégie de clonage de la Gal-3R non *taguée* se décompose en quatre étapes :

- la digestion enzymatique du vecteur pTrcHis Gal-3, afin d'isoler le fragment de la Gal-3
- l'amplification de ce fragment
- la digestion du plasmide pTrcHisA, pour éliminer la séquence du *tag* 6-His
- la recombinaison du fragment de la Gal-3 avec le plasmide pTrc

1.1.1. Digestion enzymatique du vecteur pTrcHis Gal-3

Le vecteur pTrcHis Gal-3 a été digéré dans des conditions similaires à celles qui sont décrites au premier chapitre de cette partie (section 1, §1.1.2.). Néanmoins, à la place du couple d'enzymes de restriction *BamHI/EcoRI*, et du tampon NEB4, nous avons utilisé le couple *NcoI/EcoRI*, et le tampon NEB3 (NaCl 10 mM, Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,9 à 25°C).

En raison de la présence de deux sites de restriction *NcoI* dans le vecteur pTrcHis Gal-3, la digestion de ce vecteur par les enzymes *NcoI/EcoRI* génère trois fragments (**figure 100**) : un de 107 paires de bases (pb), correspondant à la séquence située entre les deux sites *NcoI*, un de 757 pb, correspondant au fragment Gal-3 (encadré par les sites *NcoI* et *EcoRI* : *NcoI* Gal-3 *EcoRI*), et un de 3536 pb, étant le reste du vecteur. Ces trois fragments ont été séparés par une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1,2%, à 75 volts, dans du tampon TBE (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, Na₂EDTA 2 mM, pH 8 à 25°C) et pendant 1h30. Le fragment *NcoI* Gal-3 *EcoRI* a ensuite été extrait du gel d'agarose puis, purifié grâce au kit *Gel Extraction* (Qiagen), avant d'être amplifié par PCR.

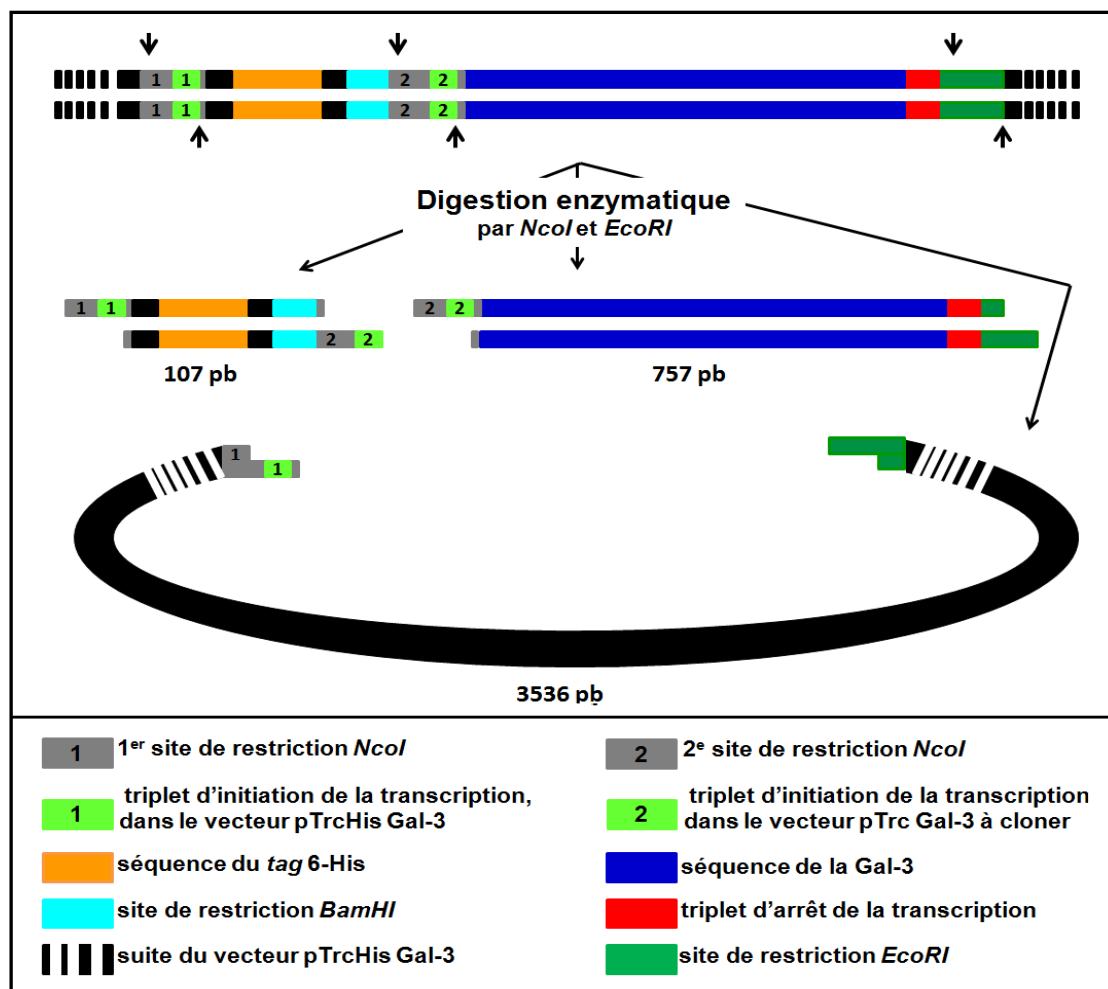


Figure 100. Fragments obtenus après la digestion du vecteur pTrcHis Gal-3 par *NcoI* et *EcoRI*.

1.1.2. Amplification du fragment *NcoI* Gal-3 *EcoRI*

Les conditions expérimentales de la PCR sont similaires à celles qui sont décrites au premier chapitre (section 1, §1.1.1.), à la seule différence de la séquence de l'amorce sens. Celle-ci contient un site *NcoI* confondu avec un triplet ATG, et 15 pb complémentaires des 15 premières pb de la Gal-3. L'amorce antisens reste la même que celle décrite précédemment (tableau XXII).

	Séquence de l'amorce	Fournisseur
Amorce sens Gal-3	5' - TAAA CCATGG CAGACAATTTTCG - 3'	Eurogentec
Amorce antisens	5' - GCAGG GAATTC AGATTCTTATATCATGGTATAT - 3'	Keystone Labs (Canada)

Tableau XXV. Séquences des amorces de clonage de la Gal-3 dans le vecteur pTrc.

Les nucléotides écrits en **bleu** s'hybrident spécifiquement avec la séquence ADN de la Gal-3, celui en **rouge**, correspond au triplet d'arrêt de la transcription. Les séquences surlignées en **gris** ou en **vert** sont les sites de restriction spécifiques des enzymes *NcoI* ou *EcoRI*, respectivement. Le triplet d'initiation de la transcription est confondu avec le site *NcoI*. Enfin, les nucléotides écrits en noir, permettent la stabilisation des amorces lors de leur hybridation à la matrice et, celle des enzymes de restriction, lors des digestions enzymatiques. Par convention, les séquences sont écrites de l'extrémité 5' à la 3'.

Le fragment *NcoI* Gal-3 *EcoRI* amplifié a été purifié (kit *PCR Purification*, Qiagen) puis, digéré par le couple *NcoI/EcoRI*, de façon à générer des extrémités cohésives et complémentaires de celles du plasmide pTrcHis digéré par le même couple d'enzymes.

1.1.3. Digestion enzymatique du plasmide pTrcHisA

Le plasmide pTrcHisA a été digéré dans les mêmes conditions que le vecteur pTrcHis Gal-3. Cette digestion, par *NcoI* et *EcoRI*, permet de supprimer la séquence du tag 6-His (**figure 101**), et de générer des extrémités cohésives complémentaires de celles du fragment *NcoI* Gal-3 *EcoRI*. Le plasmide ainsi obtenu, et désigné *NcoI* pTrc *EcoRI*, a été conservé à -20°C, en attendant la *ligation*.

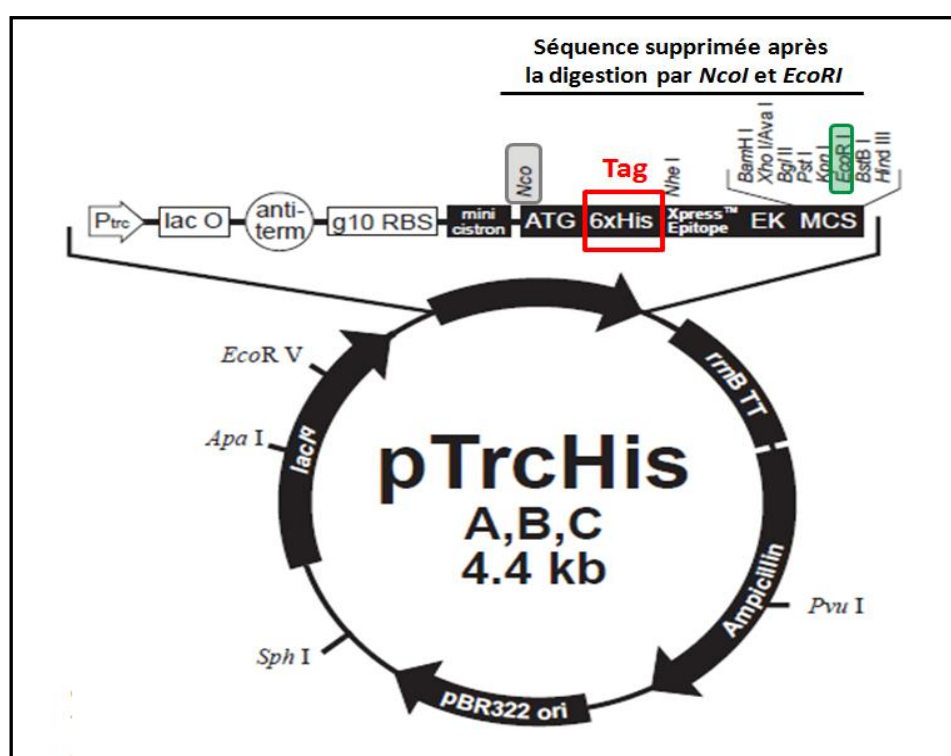


Figure 101. Cartographie du plasmide pTrcHisA.

Sites de restriction *NcoI* ou *EcoRI*.

Manuel d'utilisation du vecteur pTrcHis, [en ligne].

1.2. Stratégie spécifique au CRDr non tagué

La stratégie de clonage du CRDr non *tagué* se décompose en trois étapes :

- la digestion enzymatique du vecteur pTrcHis CRD, générant le fragment du CRD (contenant la séquence du tag 6-His) et, le reste du vecteur (pTrc)
- l'amplification du fragment du CRD, de façon à retirer la séquence du tag
- la recombinaison du fragment CRD avec le vecteur pTrc

1.2.1. Digestion enzymatique du vecteur pTrcHis CRD

Contrairement au vecteur pTrcHis Gal-3, le pTrcHis CRD ne contient qu'un seul site de restriction *NcoI*. Sa digestion par les enzymes *NcoI*/*EcoRI* génère, par conséquent, deux fragments (**figure 102**) : un de 443 pb, correspondant au fragment CRD contenant la séquence du *tag* 6-His (*NcoI* His CRD *EcoRI*), et un de 4022 pb, correspondant au reste du vecteur (*NcoI* pTrc *EcoRI*). Ces deux fragments ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % puis, extraits et purifiés grâce au kit *Gel Extraction* (Qiagen). Le fragment *NcoI* His CRD *EcoRI* a ensuite été amplifié par PCR, de façon à éliminer la séquence du *tag* et, à obtenir le fragment *NcoI* CRD *EcoRI*. Quant au fragment *NcoI* pTrc *EcoRI*, il a été conservé à -20°C en attendant la *ligation*.

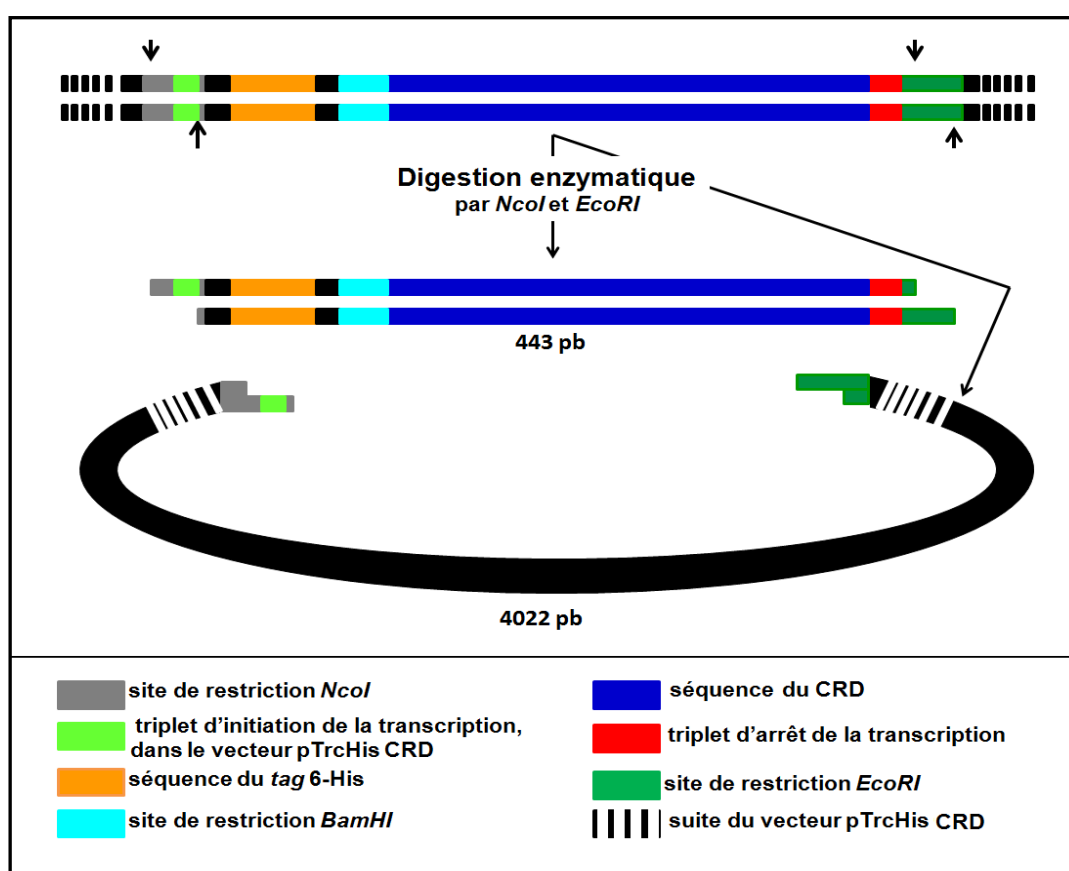


Figure 102. Fragments obtenus après la digestion du vecteur pTrcHis CRD par *NcoI* et *EcoRI*.

1.2.2. Amplification du fragment *NcoI* CRD *EcoRI*

Les conditions expérimentales de la PCR sont similaires à celles qui sont décrites au premier chapitre (section 1, §1.1.1.), à la seule différence de la séquence de l'amorce sens. Celle-ci contient un site *NcoI* confondu avec un triplet ATG, et 18 pb complémentaires des 18 premières pb du CRD. L'amorce antisens reste la même que celle utilisée précédemment (**tableau XXVI**).

	Séquence de l'amorce	Fournisseur
Amorce sens CRD	5' - TAAGCTAGCACCATGGGCGCCCCCTGCTGGGCCA - 3'	Eurogentec
Amorce antisens	5' - GCAGGGAATTCAGATTCCTATATCATGGTATAT - 3'	Keystone Labs (Canada)

Tableau XXVI. Séquences des amorces de clonage de la Gal-3 dans le vecteur pTrc.

Les nucléotides écrits en **bleu** s'hybrident spécifiquement avec la séquence ADN du **CRD**, celui en **rouge**, correspond au triplet d'arrêt de la transcription. Les séquences surlignées en **gris** ou en **vert** sont les sites de restriction spécifiques des enzymes *NcoI* ou *EcoRI*, respectivement. Le triplet d'initiation de la transcription est confondu avec le site *NcoI*. Enfin, les nucléotides écrits en noir, permettent la stabilisation des amorces lors de leur hybridation à la matrice et, celle des enzymes de restriction, lors des digestions enzymatiques. Par convention, les séquences sont écrites de l'extrémité 5' à la 3'.

Lors des premiers cycles de PCR, l'amorce sens ne peut s'hybrider qu'en 3' du fragment *NcoI* His CRD *EcoRI*, et pas en 5', à cause de la séquence du tag. C'est uniquement lors des cycles suivants, quand il y a suffisamment de fragments *NcoI* CRD *EcoRI*, que l'amorce sens s'hybride totalement sur la matrice. La **figure 103** décrit brièvement ce phénomène.

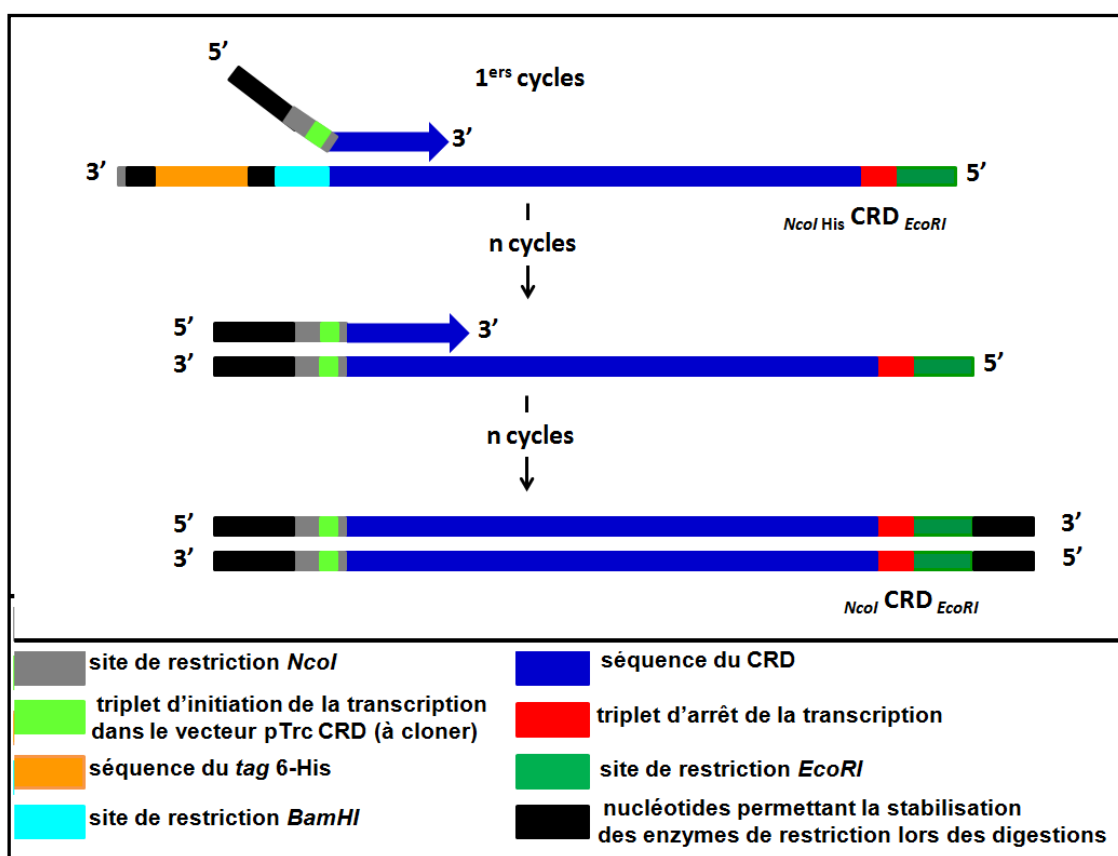


Figure 103. Sites d'hybridation de l'amorce sens lors de l'amplification du fragment *NcoI* CRD *EcoRI*.

Au cours des premiers cycles de PCR, l'amorce sens s'hybride partiellement avec le fragment *NcoI* His CRD *EcoRI*. Ce n'est qu'au bout de quelques cycles que l'hybridation totale est possible. A la fin de l'amplification, le fragment du CRD ne contient plus la séquence du tag His, ni le site *BamHI*. En revanche, un triplet d'initiation de la transcription a été ajouté au cours du processus. NB : de détail des différentes combinaisons d'hybridation amorce/matrice, n'ont volontairement pas été représentés.

Le fragment *NcoI* CRD *EcoRI* amplifié, a été purifié (kit *PCR Purification*, Qiagen) puis, digéré par le couple *NcoI/EcoRI*, de façon à générer des extrémités cohésives et complémentaires de celles du fragment *NcoI* pTrc *EcoRI* conservé à -20°C.

1.3. Etapes de clonage communes à la Gal-3 et au CRD non *tagués*

La *ligation*, l'amplification des vecteurs clonés, et la validation du clonage moléculaire, ont été effectuées de la même façon, pour la Gal-3 et pour le CRD, tel que décrit dans le premier chapitre (section 1). Les vecteurs obtenus, désignés pTrc Gal-3 et pTrc CRD, permettent d'exprimer de la galectine 3 ou du CRD recombinants, sans *tag* 6-His.

2. Expression de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*

En raison des faibles rendements de production des PtR précédemment obtenus, nous avons décidé d'apporter deux modifications à notre procédé. Premièrement, nous avons utilisé des souches bactériennes plus adaptées à l'expression de PtR, notamment la souche C41(DE3). Deuxièmement, nous avons abaissé la température de croissance bactérienne pendant l'induction, à 20°C, au lieu de 37°C.

2.1. Préparation de bactéries compétentes

Des bactéries *Escherichia coli* non compétentes (souche C41(DE3)), gracieusement fournies par Mr Alexandre Kriznik (laboratoire IMoPA, UMR CNRS-UL 7365), ont étéensemencées dans 5 ml de milieu LB, pendant 16 h à 37°C. Deux millilitres de cette pré-culture ont ensuite été mis dans 100 ml de milieu LB, et le tout, incubé à 37°C jusqu'à l'obtention A_{600nm} égale à 0,5. Le bouillon bactérien ainsi obtenu, a été centrifugé (2500 rpm, 4°C, 15 min), le surnageant, éliminé et, le culot, repris dans 30 ml de tampon TfbI (CH_3COOK 30 mM, KCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, glycérol 15% (v/v), $MnCl_2$ 50 mM ajouté extemporanément). Cette suspension a ensuite été incubée dans la glace pendant 10 minutes puis, centrifugée (2500 rpm, 4°C, 10 minutes). Le surnageant a été éliminé et, le culot, repris dans 4 ml de tampon TfbII (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM, glycérol 15% (v/v), pH 7,0 à 25°C). Ces bactéries ont été transformées avec le vecteur pTrc Gal-3 ou le pTrc CRD, selon le protocole décrit au chapitre 1 (section 1, § 1.1.3.).

2.2. Vérification de l'expression de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*, dans la souche C41(DE3)

Nous avons effectué des tests préliminaires dans un faible volume de culture, pour vérifier que la souche de C41(DE3) utilisée exprimait bien les PtR souhaitées.

Pour cela, nous avons effectué une culture dans 10 ml de milieu LB sélectif, jusqu'à obtenir une A_{600nm} de 0,6. A ce moment, chaque bouillon bactérien a été divisé en deux parts égales : l'une, dans laquelle nous avons rajouté 1 mM d'IPTG, et l'autre, que nous avons laissée telle quelle. Toutes les deux ont ensuite été incubées, en parallèle, à 20°C pendant 24h. Nous avons prélevé des échantillons de 1000 μ l à différents temps, déterminé les A_{600nm} correspondantes et, effectué une électrophorèse des protéines directement à partir des culots bactériens correspondants. L'objectif était de s'assurer que l'ajout de l'IPTG n'avait pas d'impact négatif sur la croissance de cette souche, et qu'il permettait une augmentation du niveau d'expression des PtR au fil du temps.

2.3. Production de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*, dans la souche C41(DE3)

Pour la production de PtR non *tagués*, nous avons utilisé le même protocole que pour celle des PtR *tagués*, décrit au premier chapitre (section 1, § 1.2.). La seule différence est la température de culture utilisée pendant l'induction, qui est désormais de 20°C.

3. Purification de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*

Pour cette étape, ainsi que les suivantes (dialyse, élimination des endotoxines, électrophorèse de contrôle, dosage des PtR, dosage des nitrites et test d'activité biologique des PtR, chauffées ou non, sur les chondrocytes, pour vérifier l'absence d'endotoxines), nous avons procédé de la même façon que précédemment décrit pour les PtR *tagués*. Toutefois, pour le dosage des nitrites, nous avons aussi utilisé du lipopolysaccharide (LPS) comme contrôle positif, car, au même titre que l'IL-1, il induit la production d'oxyde nitrique par les chondrocytes stimulés (Benton et al., 2002).

Néanmoins, lors de la purification, nous avons supprimé l'étape de chromatographie d'affinité pour le nickel, désormais inutile puisque les PtR produites ne possèdent plus de *tag* 6-His. Leur purification s'arrête donc à l'étape d'élution par 25 ml de tampon PBS + lactose 150 mM. Par ailleurs, pour la coloration des gels d'électrophorèse, nous avons utilisé le bleu de Coomassie (0,2% (m/v), CH₃COOH 10% (v/v) CH₃OH 30% (v/v)).

Enfin, les PtR produites ont été aliquotées puis conservées à -80°C.

Section 2 - Résultats

1. Clonage moléculaire de la Gal-3R et du CRDr non tagués

Les résultats du séquençage des plasmides pTrc Gal-3 et pTrc CRD, transmis par la société *Beckman Coulter Genomics*, sont présentés sur la **figure 104**. La comparaison de ces séquences à la base de données *Nucleotide BLAST*, montre que, de manière inattendue, pour la Gal-3, il y a une substitution d'une guanine par une adénine, en position 739 (739G>A) (**figure 105**). En revanche, l'analyse révèle une identité parfaite entre la séquence du CRD cloné et celle du transcrit de la Gal-3 humaine enregistrée dans la base de données (**figure 106**).

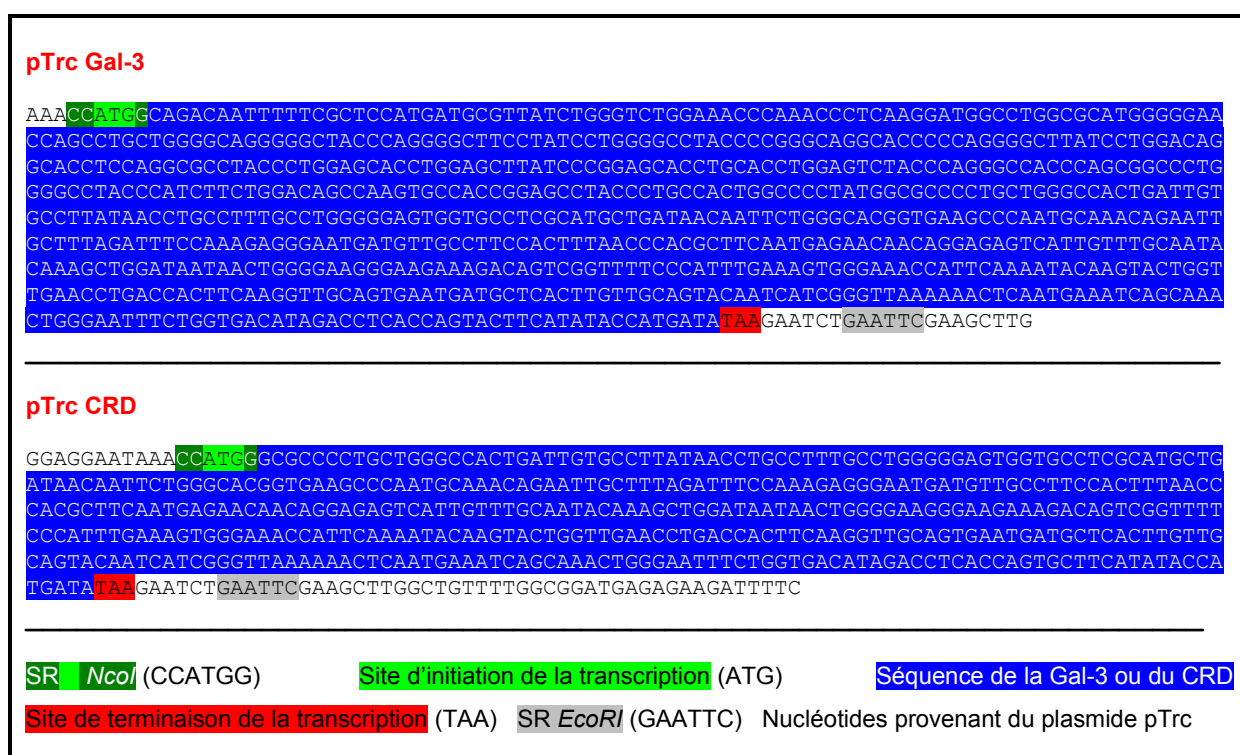


Figure 104. Résultats du séquençage des vecteurs pTrc Gal-3 et pTrc CRD.

La société Beckman Coulter Genomics nous a transmis les résultats du séquençage des plasmides pTrc Gal-3 et pTrc CRD, sous forme de séquences nucléotidiques « brutes ». Pour une meilleure compréhension, les éléments clés de ces séquences ont été identifiés par un code couleur.

Gal-3

Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (LGALS3), transcript variant 1, mRNA
Référence n° NM002306.3 Longueur : 1017 nucléotides Identité : 99 % (752/753)

Query	7	ATGGCAGACAATTTTCGCTCCATGATGCGTTATCTGGGTCTGGAAACCCAAACCCCTCAA	66
Sbjct	89	ATGGCAGACAATTTTCGCTCCATGATGCGTTATCTGGGTCTGGAAACCCAAACCCCTCAA	148
Query	67	GGATGGCCTGGCGCATGGGGGAACAGCCTGCTGGGGCAGGGGGCTACCCAGGGGGCTTCC	126
Sbjct	149	GGATGGCCTGGCGCATGGGGGAACAGCCTGCTGGGGCAGGGGGCTACCCAGGGGGCTTCC	208
Query	127	TATCCTGGGGCCTACCCCGGGCAGGCACCCCGAGGGCTTATCCTGGACAGGCACCTCCA	186
Sbjct	209	TATCCTGGGGCCTACCCCGGGCAGGCACCCCGAGGGCTTATCCTGGACAGGCACCTCCA	268
Query	187	GGCGCCTACCTGGAGCACCTGGAGCTTATCCGGAGCACCTGCACCTGGAGTCTACCCA	246
Sbjct	269	GGCGCCTACCTGGAGCACCTGGAGCTTATCCGGAGCACCTGCACCTGGAGTCTACCCA	328
Query	247	GGGCCACCCAGCGGCCCTGGGGCCTACCCATCTTCTGGACAGCCAAGTGCACCGGAGCC	306
Sbjct	329	GGGCCACCCAGCGGCCCTGGGGCCTACCCATCTTCTGGACAGCCAAGTGCACCGGAGCC	388
Query	307	TACCCTGCCACTGGGCCCTATGGCGCCCTGCTGGGCCACTGATTGTGCCTTATAACCTG	366
Sbjct	389	TACCCTGCCACTGGGCCCTATGGCGCCCTGCTGGGCCACTGATTGTGCCTTATAACCTG	448
Query	367	CCTTTGCCTGGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAACAATTCTGGGCACGGTGAAGCCC	426
Sbjct	449	CCTTTGCCTGGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAACAATTCTGGGCACGGTGAAGCCC	508
Query	427	AATGCAAAACAGAATTGCTTTAGATTCCAAAGAGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAAC	486
Sbjct	509	AATGCAAAACAGAATTGCTTTAGATTCCAAAGAGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAAC	568
Query	487	CCACGCTTCAATGAGAACAACAGGAGAGTCATTGTTTGCAATACAAAGCTGGATAATAAC	546
Sbjct	569	CCACGCTTCAATGAGAACAACAGGAGAGTCATTGTTTGCAATACAAAGCTGGATAATAAC	628
Query	547	TGGGGAAGGGAAGAAAGACAGTCGGTTTTCCCATTTGAAAGTGGGAAACCATTCAAATA	606
Sbjct	629	TGGGGAAGGGAAGAAAGACAGTCGGTTTTCCCATTTGAAAGTGGGAAACCATTCAAATA	688
Query	607	CAAGTACTGGTTGAACCTGACCACTCAAGGTTGCAGTGAATGATGCTCACTTGTTCAG	666
Sbjct	689	CAAGTACTGGTTGAACCTGACCACTCAAGGTTGCAGTGAATGATGCTCACTTGTTCAG	748
Query	667	TACAATCATCGGGTTAAAAAATCAATGAAATCAGCAAACCTGGGAATTTCTGGTGACATA	726
Sbjct	749	TACAATCATCGGGTTAAAAAATCAATGAAATCAGCAAACCTGGGAATTTCTGGTGACATA	808
Query	727	GACCTCACCAGTCTTCATATACCATGATATAA	759
Sbjct	809	GACCTCACCAGTCTTCATATACCATGATATAA	841

Début de la séquence de la Gal-3

Séquence de la Gal-3

Début de la séquence commune avec le CRD

Site de mutation ponctuelle d'une guanine en une adénine

Site de terminaison de la transcription

Figure 105. Comparaison de la séquence nucléotidique de la Gal-3 obtenue, avec la base de données *Nucleotide BLAST*.

La base de données *Nucleotide BLAST* permet de calculer le degré d'identité d'une séquence nucléotidique donnée (Query), avec des séquences connues et répertoriées (Sbjct). Elle ne prend pas en compte les nucléotides provenant du plasmide, et situés en 5' de l'ATG ou en 3' du STOP. Les nombres encadrant les séquences « Query » et « Sbjct » représentent la position des nucléotides sur ces mêmes séquences. La séquence nucléotidique de la Gal-3 clonée possède une identité presque parfaite (752 nucléotides/753) avec celle du transcrit de la Gal-3 humaine enregistrée dans la base de données : il y a une substitution de la guanine n°739 par une adénine.

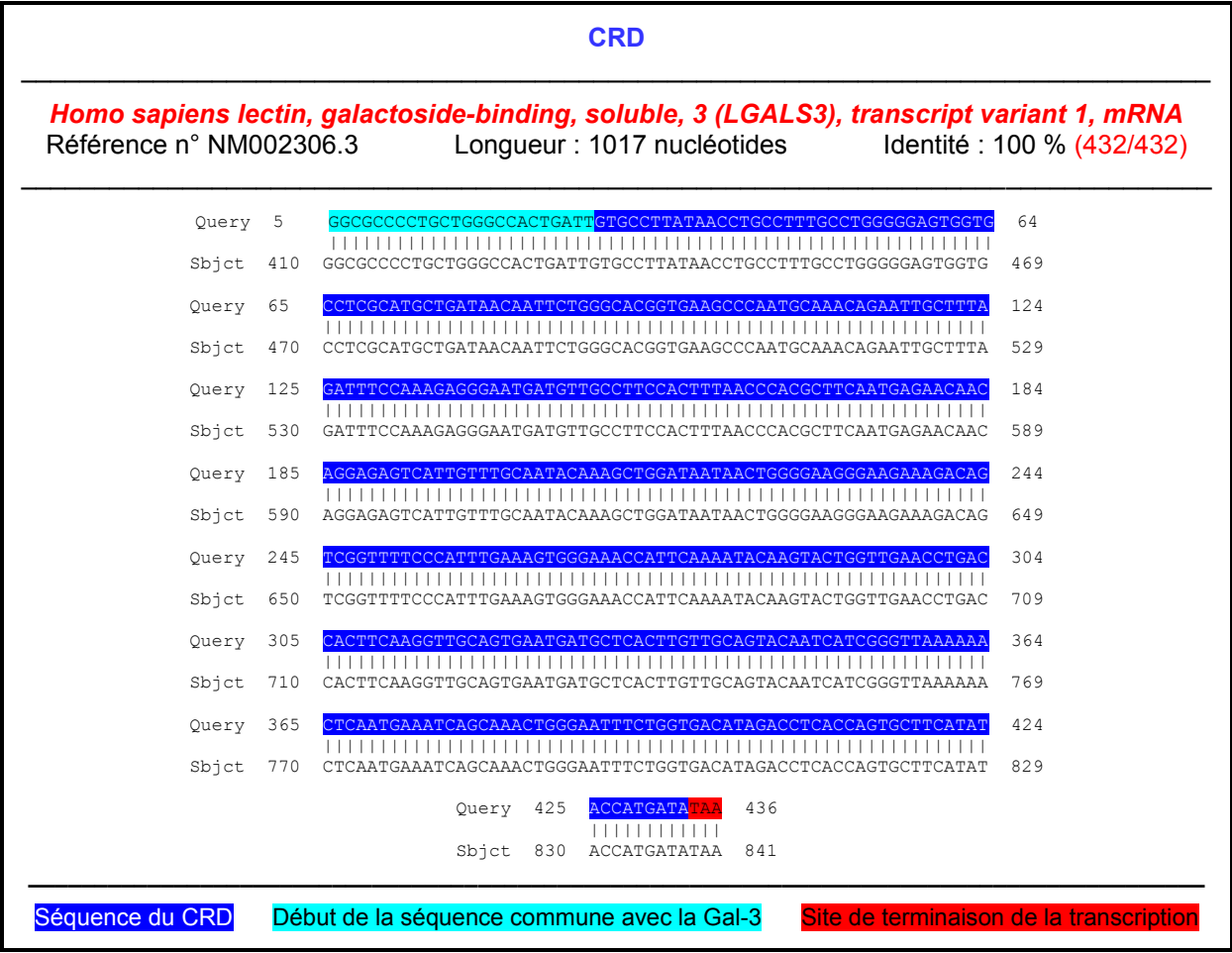


Figure 106. Comparaison de la séquence nucléotidique du CRD obtenue, avec la base de données *Nucleotide BLAST*.

La base de données *Nucleotide BLAST* permet de calculer le degré d'identité d'une séquence nucléotidique donnée (Query), avec des séquences connues et répertoriées (Sbjct). Elle ne prend pas en compte les nucléotides provenant du plasmide, et situés en 5' de l'ATG ou en 3' du STOP. Les nombres encadrant les séquences « Query » et « Sbjct » représentent la position des nucléotides sur ces mêmes séquences. La séquence nucléotidique du CRD cloné possède une identité parfaite (432 nucléotides/432) avec une partie de celle du transcrit de la Gal-3 humaine enregistré dans la base de données *Nucleotide BLAST*. En effet, le CRD étant une forme tronquée de la Gal-3, à son extrémité N-terminale, l'alignement des séquences n'a été effectué qu'à partir du nucléotide n°410, marquant le début de la séquence du CRD.

Par la suite, grâce au logiciel *ExPASy Translate Tool*, nous avons traduit les séquences nucléotidiques obtenues en séquences protéiques correspondantes (**figure 108**). La comparaison de chacune des deux séquences protéiques, à la base de données *Protein BLAST*, révèle une identité parfaite pour le CRD, et une substitution de l'alanine en position 245 par une thréonine (A245T), pour la Gal-3 (**figure 109**). Cette substitution traduit la mutation adénine (739G>A), observée dans la séquence nucléotidique de la Gal-3. Théoriquement, cette substitution n'a pas d'influence majeure sur l'activité lectinique de la Gal-3, puisqu'elle n'affecte pas le site de liaison des résidus lactosidiques.

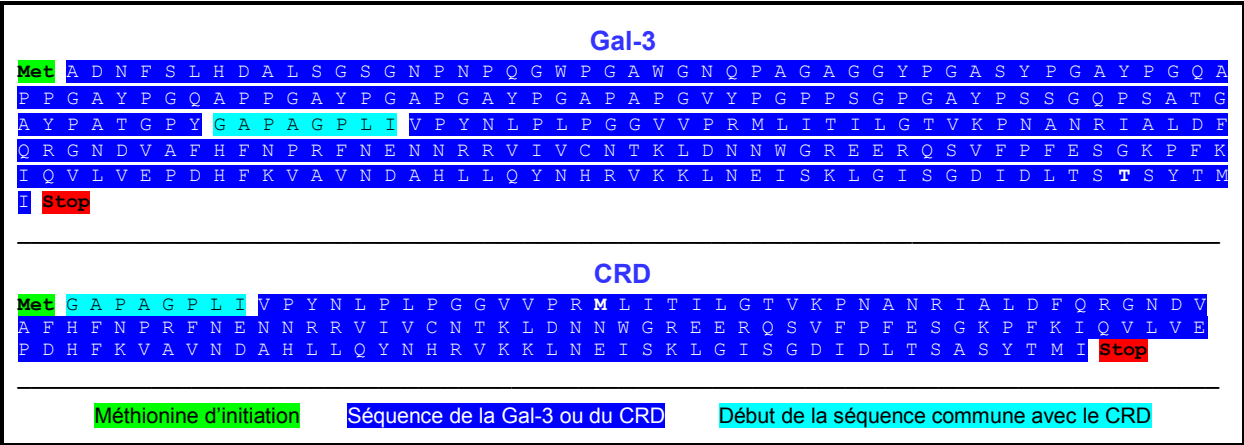


Figure 107. Traduction des séquences nucléotidiques de la Gal-3 et du CRD obtenues.

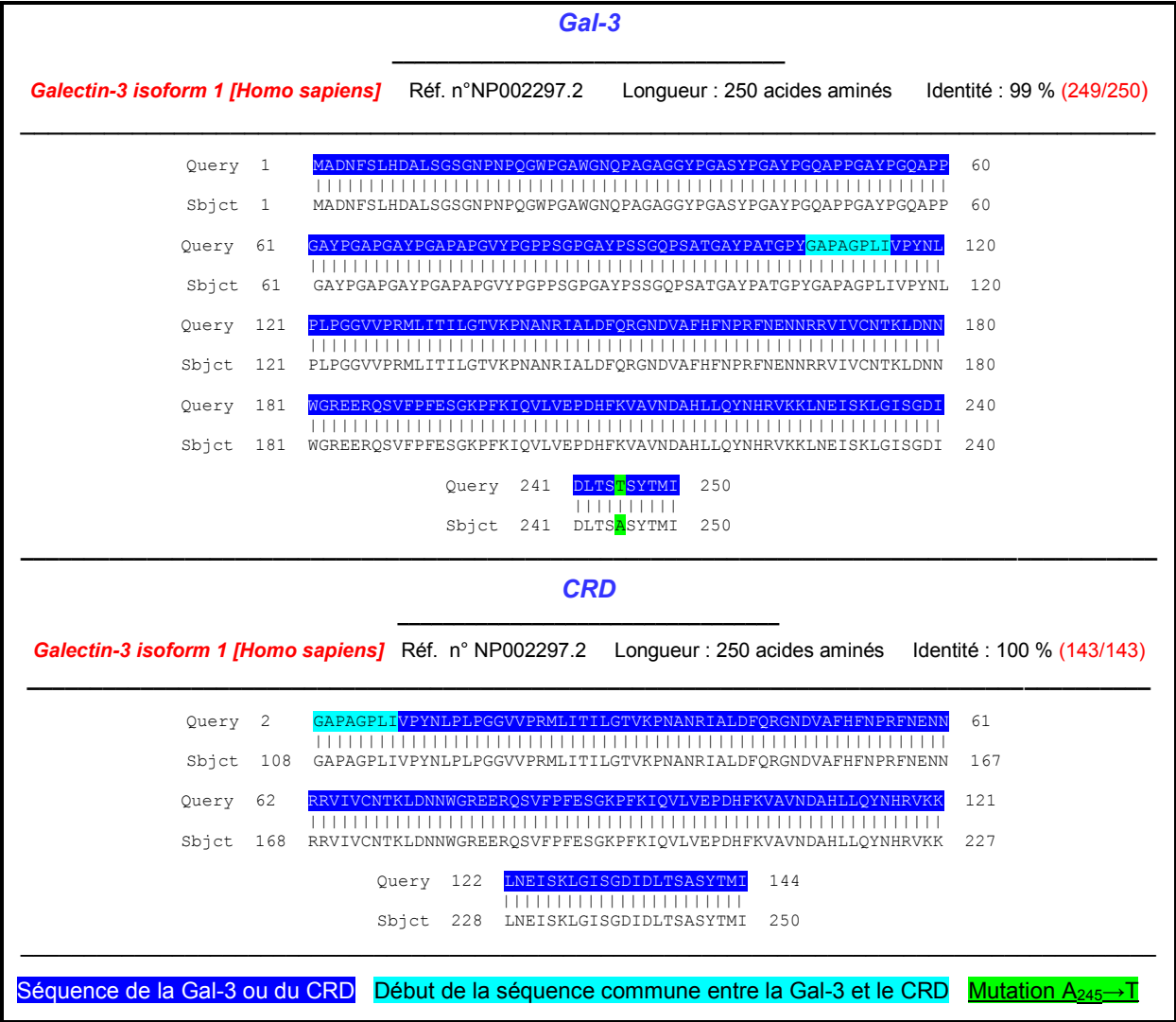


Figure 108. Comparaison de la séquence protéique de la Gal-3 ou du CRD obtenue, avec la base de données *Protein BLAST*.

La séquence protéique du CRD cloné est strictement identique à celle d'une partie de la Gal-3 humaine de la base de données *Protein BLAST*, contrairement à celle de la Gal-3R qui elle, est mutée en position 245 (alanine remplacée par thréonine).

Une dernière analyse des séquences protéiques, grâce au logiciel *ExPASy ProtParam Tool*, a permis de calculer que la masse molaire de la Gal-3R non *taguée* est égale à 26 kDa, et que celle du CRDr non *tagué* vaut 16 kDa.

L'étape de clonage étant validée, nous avons, par la suite, utilisé les vecteurs pTrc Gal-3 et pTrc CRD pour exprimer les PtR, Gal-3 et CRD, respectivement, dans des bactéries *E. coli* C41(DE3).

2. Expression de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*, dans la souche C41(DE3)

2.1. Vérification de l'expression de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*, dans la souche C41(DE3)

2.1.1. Suivi de la croissance bactérienne de la souche C41(DE3)

Nous avons voulu justifier expérimentalement l'intérêt d'utiliser une autre souche que la K12 (NEB β 10), pour l'expression de nos PtR. Par la même occasion, nous avons voulu vérifier que l'induction de l'expression protéique ne modifiait pas la croissance de la nouvelle souche testée. Pour ce faire, nous avons comparé la croissance, avant et après ajout d'IPTG, de la souche K12 (NEB β 10) à celle de la C41(DE3), toutes deux transformées avec les vecteurs pTrc Gal-3 ou pTrc CRD.

Nous avons observé que la croissance des C41(DE3) est plus élevée que celle des K12 (NEB β 10), pour le CRD comme pour la Gal-3R (**figure 110**). De plus, l'induction de l'expression de la Gal-3R ne modifie pas la croissance des C41(DE3), contrairement à celle des K12 (NEB β 10), qui elle, est ralentie. Nous pensons que cet effet s'explique par les propriétés bactériostatiques de la lectine (Farnworth et al., 2008), auxquelles les C41(DE3) sont probablement résistantes. En effet, cette souche est connue pour sa résistance à la toxicité de certaines protéines (Dumon-Seignovert et al., 2004; Miroux et Walker, 1996). Le CRDr, en revanche, n'a pas d'effet bactériostatique, et ce, quelque soit la souche testée. Cette observation nous a confortés dans notre hypothèse de travail, selon laquelle le CRD ne produit pas les mêmes effets que la Gal-3.

Au vu de ces observations, nous avons vérifié que l'augmentation de la biomasse des bactéries C41(DE3) au cours du temps, reflétait l'expression des PtR souhaitées.

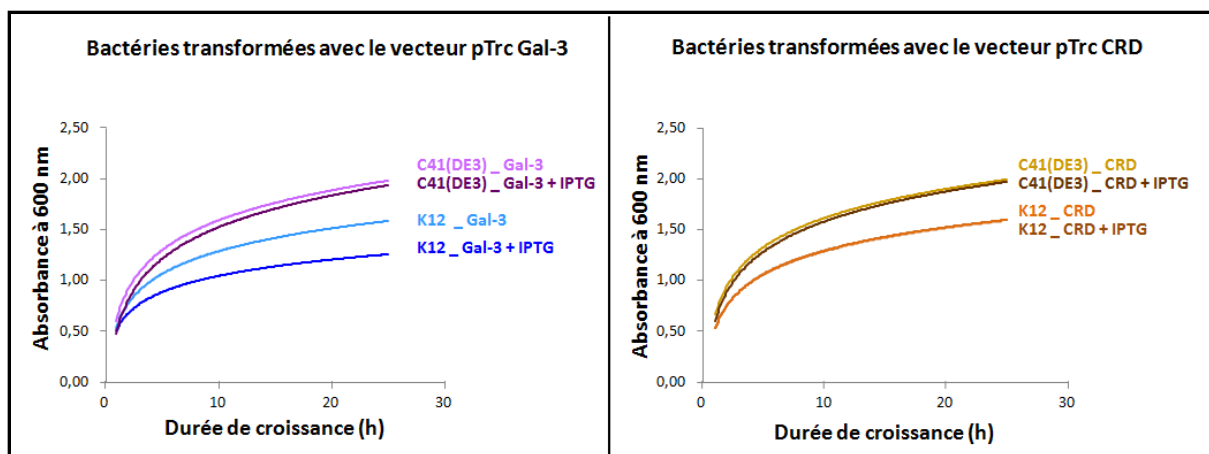


Figure 109. Croissance des bactéries transformées par les plasmides pTrc Gal-3 ou pTrc CRD.

Autant pour la Gal-3R que pour le CRDr, la croissance bactérienne est meilleure dans la souche C41(DE3) que dans la K12 (NEB β 10) qui en fait, est plus adaptée au clonage moléculaire qu'à l'expression protéique. De plus, la souche C41(DE3), résistante à la toxicité des PtR exprimées (Dumon-Seignovert et al., 2004; Miroux and Walker, 1996) est plus adaptée à l'expression de la Gal-3R puisque l'ajout d'IPTG ne modifie pas la croissance bactérienne contrairement au cas des bactéries K12. Ces dernières semblent plus sensibles aux propriétés bactériostatiques, connues, de la Gal-3 (Farnworth et al., 2008), puisque leur croissance est ralentie après induction de l'expression de la lectine recombinante. En revanche, le CRDr ne possède pas d'effet bactériostatique puisque l'induction de son expression par de l'IPTG ne modifie pas la courbe de croissance quelque soit la souche bactérienne.

2.1.2. Test d'expression de la Gal-3R et du CRDr non *taguées*, dans la souche C41(DE3)

Des échantillons des 4 bouillons bactériens de 10 ml (Gal-3 ou CRD / avec ou sans IPTG) ont été prélevés à différents temps de culture : t_0 (juste avant l'induction), 30 min, 1h, 3h, 6h et 24h. Ils ont été centrifugés et, les culots bactériens ont été lysés par du tampon Laemmli 1X puis chauffés à 95°C, pendant 5 minutes. Nous avons ensuite effectué une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12%, puis coloré le gel par le bleu de Coomassie.

L'expression de la Gal-3R n'est effective que lorsque l'on ajoute de l'IPTG dans le bouillon de culture (**figure 110**). La quantité de Gal-3R produite augmente au fil du temps, comme l'illustre l'augmentation de l'intensité des bandes correspondantes à la Pt, de t_0 à $t+6h$ (flèches rouges). Quant au CRDr, son expression est également induite par l'IPTG (**figure 111**), néanmoins, la quantité produite semble stagner au cours du temps. En effet, l'intensité de la bande correspondante est semblable, de t_0 à $t+6h$.

Globalement, l'induction de l'expression semble plus marquée pour la Gal-3R, que pour le CRDr. En effet, sur un premier gel concernant le CRDr (non présenté), nous ne pouvions distinguer aisément les échantillons avec, ou sans IPTG. C'est pour cette raison que nous avons purifié le CRDr, à partir des micro-culots bactériens, avant de refaire l'électrophorèse illustrée sur la **figure 111**. Ainsi, nous avons pu distinguer les échantillons et voir que l'expression du CRDr était bien induite par l'IPTG. Nous avons aussi observé que le niveau de production de la PtR semble faible et constant au cours du temps.

En résumé, la souche C41(DE3) transformée avec le vecteur pTrc Gal-3 ou pTrc CRD, exprime bien la Gal-3 et le CRD recombinants non *tagués*. Nous l'avons, par conséquent, mise en culture dans 2L, pour produire les PtR souhaitées en grande quantité.

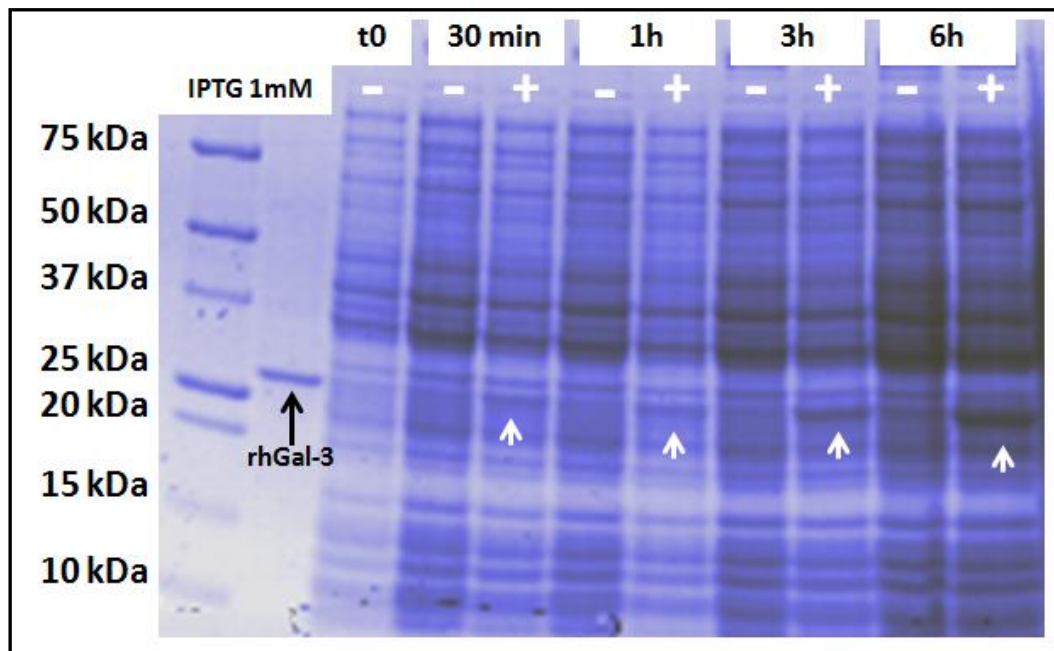


Figure 110. Test d'expression de la Gal-3R non *taguée*, dans la souche C41(DE3).

rhGal 3 : contrôle Gal-3 recombinante humaine commerciale (non *taguée* ; 500 ng; 26 kDa). En absence d'IPTG les bactéries recombinantes n'expriment pas la Gal-3R. Lorsque l'on rajoute de l'IPTG, l'expression de la Gal-3R est induite (flèches blanches), et la quantité de la PtR augmente en fonction du temps.

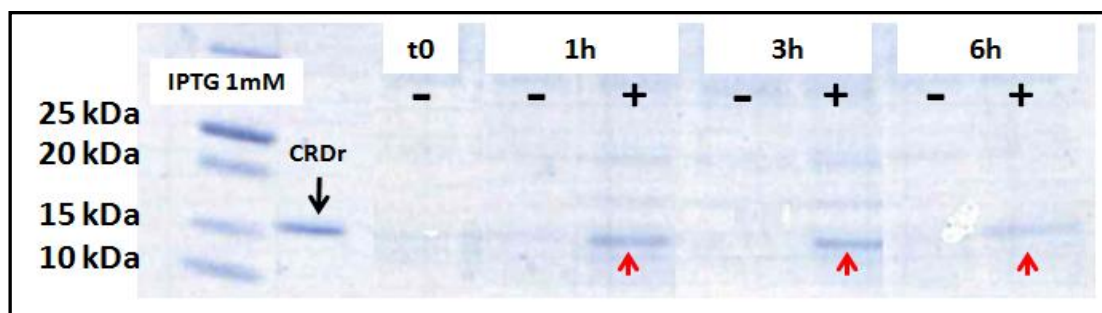


Figure 111. Test d'expression du CRDr non *taguée*, dans la souche C41(DE3).

CRDr : contrôle CRDr (non *tagué* ; 200 ng; 16 kDa). En absence d'IPTG les bactéries recombinantes n'expriment pas le CRDr. Lorsque l'on rajoute de l'IPTG, l'expression du CRDr est induite (flèches rouges). Cependant, la quantité de la PtR produite semble être constante au fil du temps.

2.2. Production la Gal-3R et du CRDr non *tagués*, par la souche C41(DE3) : contrôle de la purification

2.2.1. Gal-3R non *taguée*

La **figure112** présente la coloration, par le bleu de Coomassie, des Pt contenues dans les divers échantillons prélevés tout au long des étapes de purification de la Gal-3R.

Les échantillons A et A' correspondent à l'extrait bactérien brut (A) ou clarifié (A'), avant son passage sur la colonne de lactose : ils contiennent les protéines bactériennes et la PtR, identifiée par une flèche rouge.

L'échantillon B correspond à l'extrait bactérien clarifié, après son passage sur la colonne de lactose. Les échantillons C et D proviennent des rinçages de la colonne de lactose. De ce fait, il est tout à fait normal de ne plus retrouver de Gal-3R dans ces échantillons, puisqu'elle est restée fixée au lactose.

L'échantillon E, quant à lui, correspond à la Gal-3R éluée avec du tampon PBS + lactose 150 mM, et le F, à la Gal-3R retrouvée après dialyse de la préparation. Enfin, l'échantillon G, correspond à la Gal-3R récupérée après le passage sur la colonne ActiClean Etox® (Stérogen), en vue de l'élimination des endotoxines bactériennes.

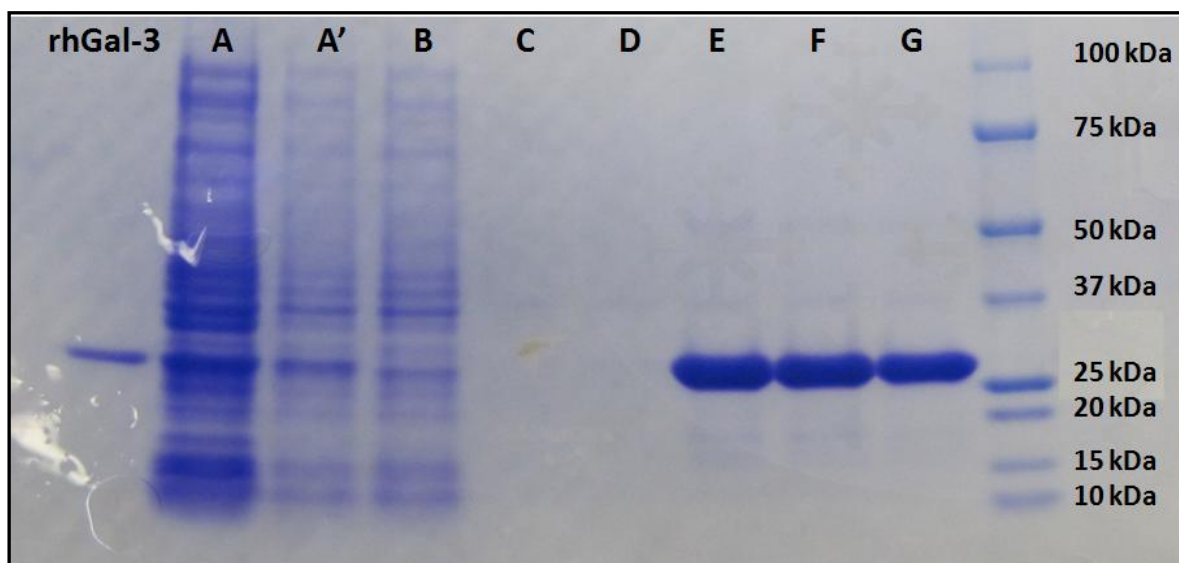


Figure 112. Contrôle de la purification de la Gal-3R non *taguée*, produite dans *E. coli* C41(DE3).

Le gel a été coloré par du Bleu de Coomassie. **rhGal 3** : contrôle Gal-3 recombinante humaine commerciale (non *taguée* ; 500 ng; 26 kDa). **A** : extrait bactérien brut, avant son passage sur la colonne de lactose. **A'** : extrait bactérien clarifié, avant son passage sur la colonne de lactose. **B** : extrait bactérien clarifié, après son passage sur la colonne de lactose. **C et D** : liquides de rinçage de la colonne de lactose. **E** : Gal-3 éluée avec du tampon PBS + lactose 150 mM.

Non seulement la Gal-3R non *taguée* a été intégralement purifiée, mais en plus, nous avons réussi à en obtenir 25 mg (12,5 mg/L de bouillon), ce qui représente une quantité très intéressante pour nos applications en culture cellulaire.

2.2.2. CRDr non *tagué*

Concernant le CRDr, le gel d'électrophorèse était similaire à celui de la Gal-3R (résultat non présentés) ; néanmoins, les bandes correspondantes à la PtR étaient de plus faible intensité, ce qui traduit le faible rendement de production que nous avons obtenu. En effet, dans les conditions expérimentales précédemment décrites, la souche C41(DE3) n'a pu produire que 415 µg/L de bouillon, soit 30 fois moins que la Gal-3R non *taguée* produite dans la même souche.

Nous avons, par conséquent, fait des tests d'expression dans 10 ml de culture, avec les souches C43(DE3) et Rosetta(DE3). La première a des similitudes avec la C41(DE3), et la seconde est appropriée pour exprimer des PtR hétérologues car elle exprime des codons rares pour *E. coli*. De manière inattendue, aucune de ces deux souches, n'a exprimé le CRDr dans les conditions expérimentales testées.

La quantité du CRDr, bien qu'étant plus faible (830 µg) que ce que nous attendions, était suffisante pour effectuer les expériences de compétition avec la Gal-3R. Avant de recommencer ces expériences, nous avons vérifié l'absence d'endotoxines dans les préparations de PtR, en stimulant des chondrocytes de cinq patients arthrosiques avec, puis en dosant les nitrites dans les surnageants de culture.

3. Tests d'activité biologique de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*

3.1. Gal-3R non *taguée*

3.1.1. Contrôle de l'absence d'endotoxines

Tout comme pour le contrôle négatif (PBS), la concentration de nitrites présents dans les solutions de Gal-3R, dénaturée thermiquement (Δ) ou non, est inférieure au seuil de détection de la méthode (2 µM) (**tableau XXVII**). Dès lors, nous avons considéré que la solution de Gal-3R non *taguée* est exemptée d'endotoxines et, qu'elle pouvait être utilisée sans risque, pour les applications de culture cellulaire.

	Lot de chondrocytes n°1	Lot de chondrocytes n°2	Lot de chondrocytes n°3	Lot de chondrocytes n°4
PBS	< 0,5 µM	< 2 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM
Gal-3, 40 nM	< 0,5 µM	< 2 µM	< 0,5 µM	< 1 µM
Gal-3, 40 nM, Δ	< 0,5 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM
Contrôle positif (IL-1 100 pg/ml ou LPS 10 µg/ml)	8,69 µM (IL-1)	9,86 µM (IL-1)	4,91 µM (LPS)	14,04 µM (LPS)

Tableau XXVII. Dosage des nitrites dans les surnageants de culture de chondrocytes humains arthrosiques stimulés par de la Gal-3R non *taguée*.

Les chondrocytes de quatre patients arthrosiques ont été stimulés pendant 24h, en normoxie, par de la Gal-3 recombinante non *taguée*, dénaturée thermiquement (Δ) ou non, ou par de l'IL-1 ou du LPS, tous deux connus pour induire la production de nitrites par les chondrocytes (Benton et al., 2002; Palmer et al., 1993). La préparation de Gal-3R non *taguée* obtenue, est considérée comme exemptée d'endotoxines, puisque dénaturée ou non, la PtR n'induit pas de production de nitrites par les chondrocytes stimulés.

3.1.2. Vérification de l'activité biologique de la Gal-3R non *taguée*

Dans le but de vérifier que la Gal-3R non *taguée* produite avait bien une activité biologique, nous avons analysé l'expression du gène MMP-3, dans des chondrocytes arthrosiques (n=3) stimulés avec la PtR, dénaturée thermiquement ou non. La **figure 114** montre que les chondrocytes stimulés par la Gal-3R (40 ou 200 nM) expriment 5 ou 20 fois plus le gène MMP-3 que les chondrocytes stimulés par la Gal-3R dénaturée (40 nM), qui eux-mêmes, expriment le gène MMP-3 au même niveau que les cellules contrôles. En plus de confirmer l'absence d'endotoxines dans la préparation de Gal-3R non *taguée*, ces résultats démontrent que la PtR possède une activité biologique sur les chondrocytes arthrosiques.

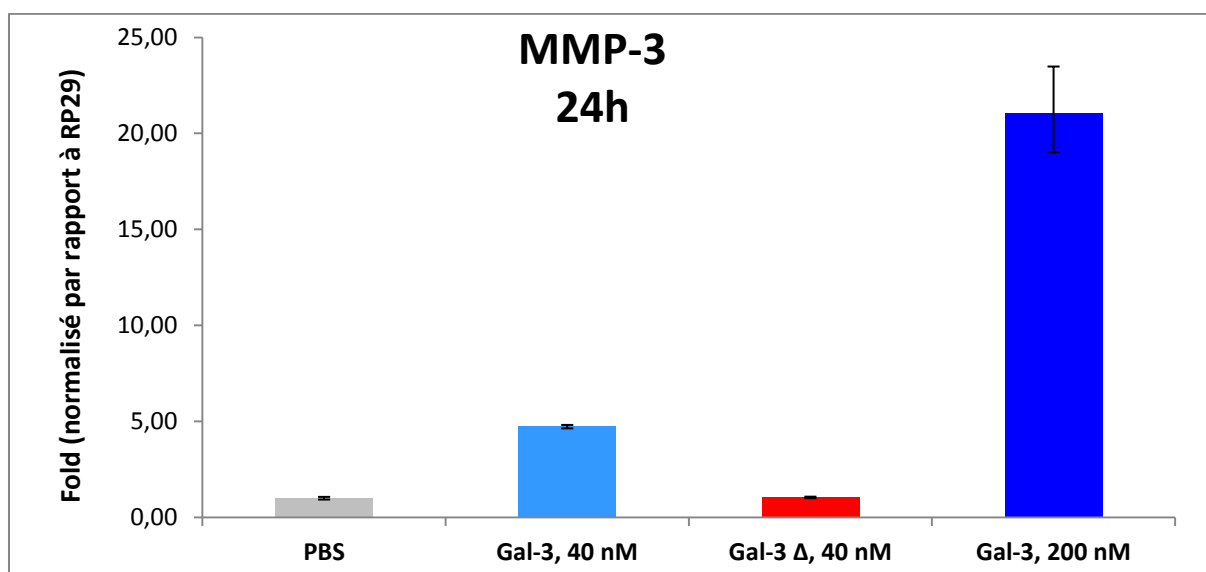


Figure 113. Effet de la Gal-3R non *taguée* sur l'expression génique de la MMP-3 dans des chondrocytes humains arthrosiques.

Nous avons voulu confirmer l'activité biologique la Gal-3R non *taguée*, en étudiant l'expression d'autres gènes. Ainsi, nous avons démontré que les chondrocytes arthrosiques stimulés par de la Gal-3R non *taguée*, expriment 336 fois plus d'IL-6, et environ deux fois moins de Col-2 ou d'agrécane, que les cellules contrôles (PBS) (**figure 114**).

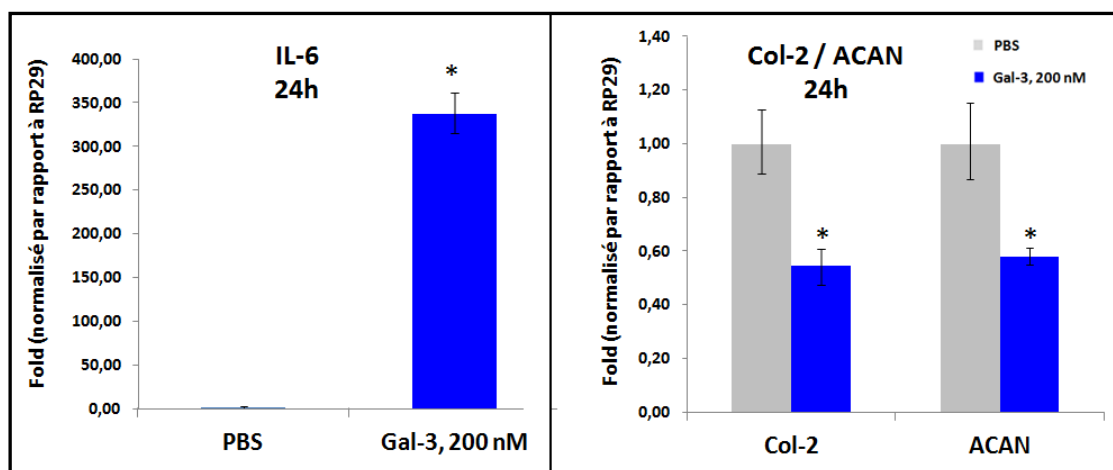


Figure 114. Effet de la Gal-3R non *taguée* sur l'expression génique de l'IL-6, du collagène 2 et de l'agrécane dans des chondrocytes humains arthrosiques.

PBS : contrôle. Normoxie : 21% O₂ n = 4. p < 0,05.

En conclusion, la lectine recombinante produite conserve une activité pro-inflammatoire, pro-catabolique et, anti-anabolique, sur les chondrocytes humains arthrosiques. Par conséquent, nous pourrions l'utiliser pour les expériences de compétition avec le CRDr.

3.2. CRDr non *tagué*

De façon inattendue, les résultats du dosage des nitrites montrent que la préparation de CRDr est contaminée par des endotoxines (**tableau XXVIII**). En effet, les chondrocytes stimulés par du CRDr (40, 120 ou 400 nM), produisent des nitrites dont la concentration est, non seulement détectable par la méthode de Griess, mais en plus, similaire, voire largement supérieure, à celle obtenue avec les cellules stimulées par de l'IL-1 ou du LPS. De plus, les chondrocytes stimulés par le CRDr dénaturé thermiquement (lots n°3 à 5), produisent des quantités similaires de nitrites que les chondrocytes stimulés par le CRDr non dénaturé. Par conséquent, les nitrites produits sont le résultat de l'effet des endotoxines présentes dans la préparation de CRDr. Celle-ci ne peut donc pas être utilisée telle quelle, pour les expériences de culture cellulaire et, c'est pour cette raison que nous avons décidé de la faire passer, une seconde fois, dans une colonne d'élimination d'endotoxines (ActiClean Etox®, Stérogen).

Malgré cette seconde tentative, la préparation de CRDr contenait toujours des endotoxines. De plus, à cause de ce second passage sur colonne, nous avons perdu les deux tiers de la PtR, d'où la nécessité d'en produire de nouveau et, en très grande quantité, pour la suite du projet. Ainsi, nous avons recommencé deux fois la production de CRDr dans les bactéries C41(DE3), mais à chaque fois, les bactéries exprimaient très peu la PtR.

	Lot de chondrocytes n°1	Lot de chondrocytes n°2	Lot de chondrocytes n°3	Lot de chondrocytes n°4	Lot de chondrocytes n°5
PBS	< 0,5 µM	< 2 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM	< 0,5 µM
CRD 40 nM	2,43 µM	6,69 µM	5,77 µM	Non déterminé*	Non effectué
CRD 120 nM	5,20 µM	9,03 µM	5,34 µM	4,62 µM	Non effectué
CRD 400 nM	10,54 µM	11,14 µM	9,97 µM	13,07 µM	7,73 µM
CRD 400 nM, Δ	Non effectué	Non effectué	7,40 µM	15,21 µM	8,18 µM
Contrôle (IL-1 100 pg/ml ou 10 µg/ml LPS)	8,69 µM (IL-1)	9,86 µM (IL-1)	4,91 µM (LPS)	14,04 µM (LPS)	4,98 µM (LPS)

Tableau XXVIII. Dosage des nitrites dans les surnageants de culture de chondrocytes humains arthrosiques stimulés par du CRDr non *tagué*.

Les concentrations des PtR utilisées correspondent à celles qui ont été utilisées ensuite sur les cellules pour les tests d'activité et les expériences de compétition CRD vs Gal-3.

Section 3 - Discussion

1. Clonage moléculaire de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*

Nous avons réussi à cloner la Gal-3 et le CRD recombinants, dans le plasmide pTrcHis modifié, de façon à retirer le *tag* His des séquences protéiques correspondantes. Néanmoins, tandis que le séquençage du vecteur pTrc CRD a montré que la séquence du CRD était conforme à celle qu'on attendait, celui du vecteur pTrc Gal-3 a révélé une mutation ponctuelle (739G>A) dans la séquence de la Gal-3R. Au niveau de la protéine, cette mutation se traduit par la substitution de l'alanine en position 245, en thréonine. En théorie, elle ne devrait pas affecter l'activité lectinique de la Gal-3R, puisque alanine en position 245 ne fait pas partie des cinq acides aminés impliqués dans la liaison de la protéine aux résidus lactosidiques (Seetharaman et al., 1998) (**figure 115**). En pratique, nous avons démontré que cette Gal-3R mutée conserve son activité biologique sur les chondrocytes humains arthrosiques (**figures 113 et 114**).

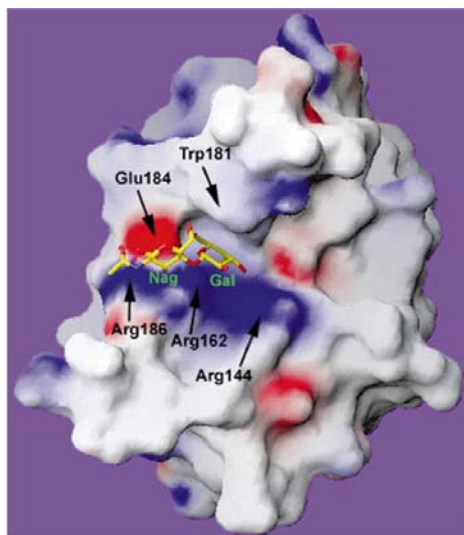


Figure 115. Modélisation de la liaison lectinique entre la LacNAc et la Gal-3R.

Cinq acides aminés sont impliqués dans la liaison lectinique : 3 arginines (en position 144, 162 et 186, dans la structure primaire de la protéine), l'acide glutamique en position 184, et le tryptophane en position 181. Dans la structure tertiaire de la Gal-3, ils forment une poche capable d'accueillir les résidus lactosidiques (ici la N-acétyl-lactosamine, en jaune).

(Seetharaman et al., 1998)

2. Production de la Gal-3R et du CRDr non *tagués*

2.1. Gal-3 R non *taguée*

En raison des propriétés bactériostatiques de la Gal-3, rapportées dans la littérature (Farnworth et al., 2008), et démontrées par nos travaux (**figure 109**), nous avons choisi de la produire dans la souche C41(DE3) car elle est résistante à la toxicité des PtR exprimées (Dumon-Seignovert et al., 2004; Miroux and Walker, 1996). Dès l'induction de l'expression de la Gal-3R, les bactéries recombinantes ont été cultivées à 20°C, température optimale pour limiter la formation de corps d'inclusion (Gräslund et al., 2008; Studier, 2005). Ainsi, la PtR produite se retrouve majoritairement dans la fraction soluble et, par conséquent, il est aisé de la purifier à partir de l'extrait bactérien clarifié.

La Gal-3R produite, n'ayant plus de *tag* 6-His, a été purifiée uniquement par chromatographie d'affinité pour le lactose. Cette seule étape de purification était suffisamment spécifique et efficace, puisque la Gal-3R produite était pure, et concentrée dans la fraction éluée, et qu'on ne l'a pas retrouvée dans les liquides de rinçage de la colonne (**figure 112**).

Grâce au changement de la souche d'expression, à l'abaissement de la température de culture pendant l'induction, et à la suppression d'une étape de chromatographie, nous avons réussi à améliorer considérablement le rendement de production de la Gal-3R. En effet, avec les nouvelles conditions expérimentales, nous avons obtenu 63 fois plus de Gal-3R non *taguée* (12,5 mg/L), que de Gal-3R *taguée* (200 µg/L).

Par la suite, nous avons pu effectuer plusieurs tests d'activité biologique sur des chondrocytes humains arthrosiques. Nos résultats montrent que, malgré la mutation 739G>A, la Gal-3R non *taguée* produite, conserve son activité biologique sur les chondrocytes humains arthrosiques. En effet, elle induit l'expression des gènes de l'inflammation et du catabolisme matriciel, et inhibe celle des gènes de l'anabolisme matriciel. Nous pourrions, par conséquent, l'utiliser pour les expériences de complétion avec le CRD recombinant.

2.2. CRDr non *tagué*

Parmi les trois souches bactériennes utilisées (C41(DE3), C43(DE3), Rosetta(DE3)), seule la C41(DE3) a exprimé le CRDr. Nous ne parvenons pas expliquer pourquoi la souche C43(DE3), semblable à la C41(DE3), et la souche Rosetta(DE3), adaptée à l'expression de PtR hétérologues dans *E. coli* (Peti and Page, 2007), n'ont pas exprimé le CRD recombinant.

Au terme de la purification, nous avons obtenu 415 µg de CRDr recombinant par litre de bouillon bactérien, soit 30 fois moins que le Gal-3R non *taguée*. Or, compte tenu du changement de la souche d'expression C41(DE3), de la température de culture pendant l'induction (20°C), et du rendement de production de la Gal-3R non *taguée*, nous nous attendions à un meilleur rendement. Ce faible rendement peut avoir plusieurs explications :

- soit, l'absence de *tag* rend le CRDr moins soluble et donc, difficile à purifier. Néanmoins, cette explication semble peu probable puisque la culture à 20°C, pendant l'induction, est censée limiter le phénomène d'insolubilité. De plus, nous avons analysé le culot bactérien issu de la clarification et, il ne contient pas de CRDr non plus, ce qui nous fait plus penser à un problème d'expression ou de protéolyse.
- soit, ces bactéries produisent une quantité raisonnable de CRDr, mais que celui-ci est dégradé au fil du temps dans le milieu de culture. En effet, lorsque certaines PtR produites sont laissées dans le bouillon bactérien trop longtemps, elles peuvent être dégradées à cause des modifications physicochimiques du milieu. Néanmoins, la température de 20°C devrait, normalement, inhiber cette protéolyse.
- soit, les bactéries C41(DE3) ne sont simplement pas adaptées à l'expression du CRDr.

Il nous est difficile d'expliquer pourquoi il y a une telle différence d'expression, entre la Gal-3R et le CRDr, alors qu'ils ont été clonés dans les mêmes conditions. La seule différence réside dans leur taille, et nous pensons, par conséquent, que c'est ce paramètre qui peut expliquer que le CRDr est moins exprimé que la Gal-3R. Ces observations soulignent le fait que, même si deux PtR ont une structure primaire, voire secondaire, similaire, elles ne sont pas pour autant exprimées de la même manière.

En plus du faible rendement de production du CRDr, celui-ci était contaminé par des endotoxines et donc, inutilisable sur des cellules. Nous avons, par conséquent, essayé d'éliminer ces endotoxines, mais en vain. Nous avons également recommencé la production de la PtR, notamment en diminuant la température de la culture en phase d'induction (15°C). Cependant, les deux tentatives effectuées se sont avérées infructueuses.

Désormais, nous envisageons 3 solutions pour obtenir du CRDr non *tagué* :

- la poursuite de l'optimisation des conditions de production dans la souche C41(DE3) : diminution de durée de la phase d'induction (6-8h au lieu de 20-24h), utilisation d'un milieu auto-inductible (ZYM5052)

- le clivage d'une partie de la Gal-3R non *taguée* résiduelle, par de la collagénase de *Clostridium hystolyticum*, suivi d'une étape de chromatographie d'affinité pour le lactose (John et al., 2003). L'avantage de ce clivage est qu'il permet d'obtenir un fragment de 16 kDa en tout point identique à notre forme tronquée (GAPAGPLI...) et donc, sans aucun motif d'oligomérisation (PGAYP).
- l'expression du CRDr *tagué* His en grande quantité (dans les C41(DE3)), suivie du clivage du *tag*, en gardant à l'esprit que ce clivage peut ne pas être total, et nécessiter des optimisations.
- en dernier recours, l'expression du CRDr fusionné avec un *tag* GST, suivie le clivage de ce *tag*. Néanmoins cela nécessite de cloner la séquence d'intérêt dans un nouveau plasmide et de disposer de réactifs spécifiques pour ce *tag* (résine, enzymes, etc.), ce qui rajoute de la complexité à nos travaux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons réussi à cloner et produire de la Gal-3R avec un rendement intéressant et, à caractériser plusieurs de ses effets délétères sur le métabolisme des chondrocytes humains arthrosiques. Quant au rôle antagoniste du CRDr, il n'a été démontré que partiellement, à cause de l'interférence du *tag* histidine situé en position N-terminale de la protéine. C'est pour cette raison, que nous avons décidé de concevoir, de produire et d'utiliser une forme non *taguée* de CRDr. Cependant, à ce stade du projet, nous n'avons pas encore pu étudier le rôle biologique du CRDr non *tagué*, en raison des difficultés techniques inhérentes à sa production.

Actuellement, nous envisageons plusieurs solutions pour améliorer le rendement de production de cette PtR et, une fois qu'elle aura été produite en quantité suffisante, nous recommencerons les expériences de compétition. Cette fois-ci, nous ne limiterons plus l'analyse à l'expression génique seule, car elle est peu informative, mais nous l'étendrons à l'expression protéique (dosage d'activité de MMP, dosage de Ck pro-inflammatoires, de constituants matriciels...). Grâce à ces données géniques et protéiques, nous pourrions déterminer si le CRD recombinant, apporté de manière « exogène », s'oppose réellement aux effets délétères de la Gal-3R sur des chondrocytes humains arthrosiques. Si tel est le cas, alors nous pourrions envisager de développer des moyens d'apport « pseudo-endogène » de cette PtR.

Dans cette optique, nous avons conçu des outils moléculaires permettant l'expression et la sécrétion du CRDr, par des cellules eucaryotes. Ainsi, nous avons cloné la séquence du CRD dans le plasmide pSecTag2Hygro, ce qui permet à la cellule hôte d'exprimer la PtR avec un peptide signal en position N-terminale, et donc, de la sécréter. Pour la suite du travail, nous envisageons de transfecter une lignée de fibroblastes synoviaux (FS) avec le vecteur pSecTag2Hygro CRD, puis de doser la concentration du CRDr sécrété dans le surnageant de culture. Enfin, nous co-stimulerons des chondrocytes arthrosiques avec ce surnageant et, avec de la Gal-3R. Le but de cette expérience est de vérifier que, le CRDr apporté de façon « pseudo-endogène », *in vitro*, s'oppose bien aux effets de la Gal-3R.

Nous avons également conçu d'autres outils moléculaires permettant l'apport « pseudo-endogène » du CRDr, au moyen de particules virales. En effet, à partir du vecteur pSecTag2Hygro CRD, nous avons sous-cloné la séquence du CRD « sécrétable » dans le plasmide pLenti6lacZ, qui nous a ensuite permis de produire des lentivirus recombinants. En parallèle, le Dr Magali Cucchiari (Université de Saarland, Allemagne), avec qui nous collaborons, nous a gracieusement fourni des adénovirus associés (AAV), vectorisant cette même séquence de CRD « sécrétable ». Nous projetons, dans un premier temps, d'utiliser ces virus recombinants pour la transduction de fibroblastes synoviaux, et nous vérifierons que le taux de CRDr sécrété est supérieur à celui obtenu après la transfection des FS.

En effet, en règle générale, le rendement de transfert d'un ADNc par des vecteurs viraux, est supérieur à celui du transfert par transfection. De même que précédemment, nous comptons effectuer des co-stimulations de chondrocytes arthrosiques avec de la Gal-3R et du CRDr sécrété par les FS « infectés ». Dans un second temps, nous prévoyons d'injecter ces virus recombinants dans les genoux de modèles murins d'arthrite. Ce projet a d'ailleurs été validé par le Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale en novembre 2012.

Les virus « thérapeutiques » infecteront majoritairement les fibroblastes et macrophages synoviaux qui, par la suite, seront capables de sécréter continuellement du CRDr. Cette sécrétion « endogène » de CRDr permettrait une inhibition rapide et efficace des effets de la Gal-3 endogène. Le principal avantage de ces virus, notamment les lentivirus, est qu'ils permettent la persistance du transgène au site d'administration pendant cinq à six mois (Gouze et al., 2007). Ainsi, deux administrations annuelles de CRDr sous cette forme seraient suffisantes pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ou de l'arthrose. En effet, ce rythme d'administration constituerait une bonne alternative aux biothérapies administrées dans la PAR avec une fréquence plus élevée (hebdomadaire à bimestrielle) (Vivar and Van Vollenhoven, 2014), ainsi qu'aux traitements antalgiques administrés quotidiennement dans l'arthrose. Toutefois, nous n'en sommes actuellement qu'à l'étape de preuve de concept. Il nous faut encore surmonter plusieurs difficultés techniques concernant la production et la validation, *in vitro* et *in vivo*, de l'activité antagoniste du CRDr, avant de démontrer qu'il possède de réelles potentialités antirhumatismales. La **figure 116** récapitule les perspectives de travail que nous envisageons dans notre projet de recherche.

Le développement d'une protéine recombinante d'intérêt thérapeutique est un long processus avec une place importante de la recherche fondamentale. Celle-ci met en jeu les étapes de conception, de production, de caractérisation et de validation d'activité biologique de la protéine, *in vitro* et *in vivo*, avant de la soumettre à des études précliniques puis cliniques. Or chacune de ces étapes fait l'objet de mises au point spécifiques, ce qui allonge et complexifie encore plus le processus de développement du projet.

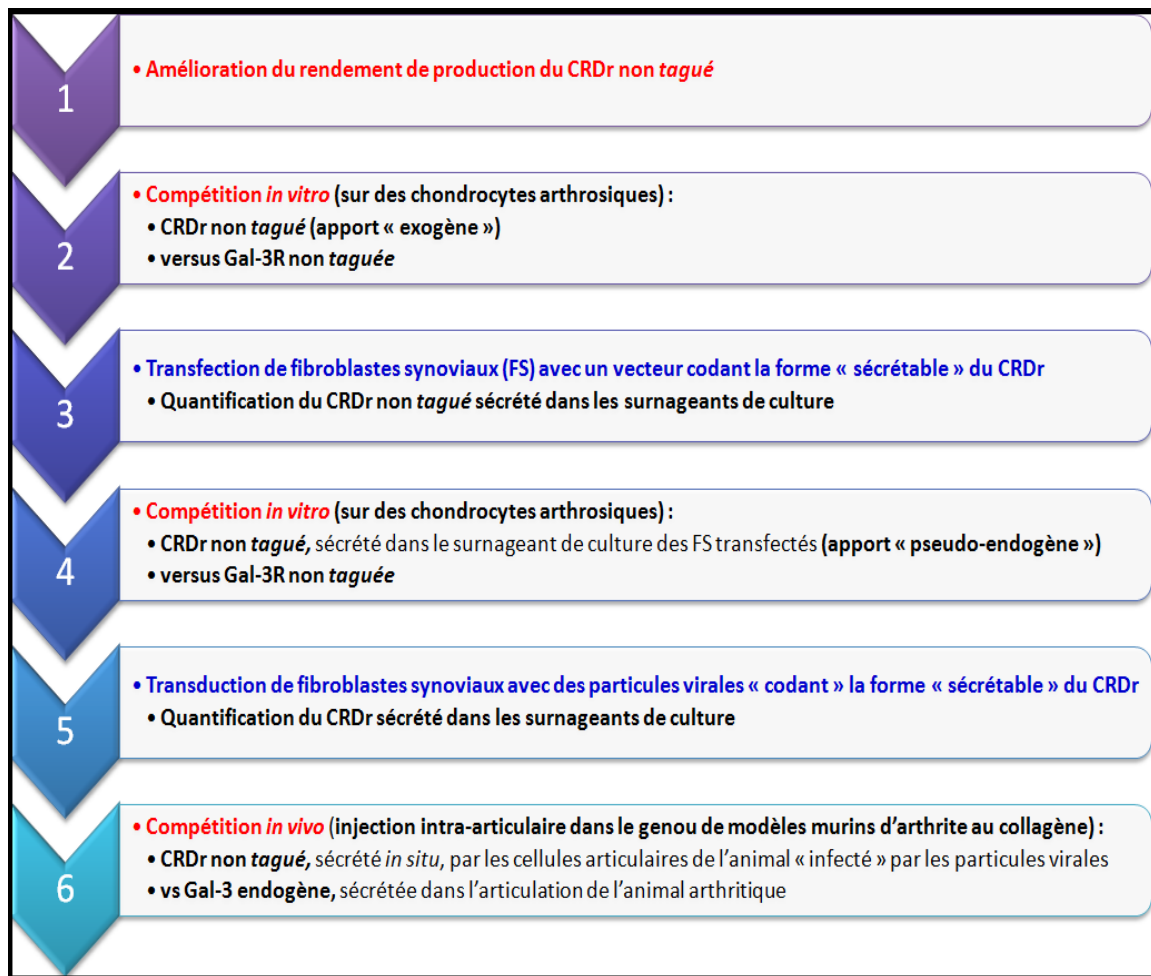


Figure 116. Perspectives de travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Articles et revues scientifiques

Agarwal, S.K. (2011). Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm* 17, S14–18.

Ahmad, N., Gabius, H.-J., André, S., Kaltner, H., Sabesan, S., Roy, R., Liu, B., Macaluso, F., and Brewer, C.F. (2004). Galectin-3 Precipitates as a Pentamer with Synthetic Multivalent Carbohydrates and Forms Heterogeneous Cross-linked Complexes. *J Biol Chem* 279, 10841–10847.

Akahani, S., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Kim, H.-R.C., and Raz, A. (1997). Galectin-3: A Novel Antiapoptotic Molecule with A Functional BH1 (NWGR) Domain of Bcl-2 Family. *Cancer Res* 57, 5272–5276.

Almkvist, J., and Karlsson, A. (2004). Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 19, 575–581.

Alturfan, A.A., Eralp, L., and Emekli, N. (2008). Investigation of inflammatory and hemostatic parameters in female patients undergoing total knee arthroplasty surgery. *Inflammation* 31, 414–421.

Andersen, D.C., and Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotech* 13, 117–123.

Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., and Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expres Purif* 48, 1–13.

Arrigo, A.-P. (2005). Chaperons moléculaires et repliement des protéines : L'exemple de certaines protéines de choc thermique. *M S-Med Sci* 21, 619–625.

Assenberg, R., Wan, P.T., Geisse, S., and Mayr, L.M. (2013). Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Curr Opin Struct Biol* 23, 393–402.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech* 10, 411–421.

Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., and Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269, 20807–20810.

Berlec, A., and Štrukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* 40, 257–274.

De Bernardez Clark, E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotech* 9, 157–163.

Betton, J.-M., and Chaffotte, A. (2005). Repliement et production de protéines recombinantes. *M S-Med Sci* 21, 613–617.

Boileau, C., Poirier, F., Pelletier, J.-P., Guevremont, M., Duval, N., Martel-Pelletier, J., and Reboul, P. (2008). Intracellular localisation of galectin-3 has a protective role in chondrocyte survival. *Ann Rheum Dis* 67, 175–181.

- Bruyère, O., Cooper, C., Pelletier, J.-P., Branco, J., Luisa Brandi, M., Guillemin, F., Hochberg, M.C., Kanis, J.A., Kvien, T.K., Martel-Pelletier, J., et al. (2014). An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin. Arthritis Rheum.*
- Cecchinelli, B., Lavra, L., Rinaldo, C., Iacovelli, S., Gurtner, A., Gasbarri, A., Ulivieri, A., Del Prete, F., Trovato, M., Piaggio, G., et al. (2006). Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 4746–4757.
- Chiariotti, L., Salvatore, P., Frunzio, R., and Bruni, C.B. (2002). Galectin genes: Regulation of expression. *Glycoconj J* 19, 441–449.
- Clark, E.D. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* 12, 202–207.
- Cooper, D.N.W. (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1572, 209–231.
- Cooper, D.N., and Barondes, S.H. (1990). Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* 110, 1681–1691.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., and Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol* 5, 63.
- Dagher, S.F., Wang, J.L., and Patterson, R.J. (1995). Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92, 1213–1217.
- Dasuri, K., Antonovici, M., Chen, K., Wong, K., Standing, K., Ens, W., El-Gabalawy, H., and Wilkins, J.A. (2004). The synovial proteome: analysis of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 6, R161–168.
- Delacour, D., Koch, A., and Jacob, R. (2009). The role of galectins in protein trafficking. *Traffic* 10, 1405–1413.
- Demain, A.L., and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27, 297–306.
- Dumas, J., and Robert, B. (2009). Bioproduction de protéines thérapeutiques : Revue et perspectives. *M S-Med Sci* 25, 18–26.
- Dumic, J., Lauc, G., and Flögel, M. (2000). Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB. *Cell Physiol Biochem* 10, 149–158.
- Dumic, J., Dabelic, S., and Flögel, M. (2006). Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta (BBA) - General Subjects* 1760, 616–635.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., and Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif* 37, 203–206.
- Duong-Ly, K.C., and Gabelli, S.B. (2014a). Using ion exchange chromatography to purify a recombinantly expressed protein. *Meth Enzymol* 541, 95–103.

Duong-Ly, K.C., and Gabelli, S.B. (2014b). Chapter Nine - Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins. In *Methods in Enzymology*, Jon Lorsch, ed. (Academic Press), pp. 105–114.

Dyck, M.K., Lacroix, D., Pothier, F., and Sirard, M.-A. (2003). Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. *Trends Biotechnol* 21, 394–399.

Ezzat, M.H.M., El-Gammasy, T.M.A., Shaheen, K.Y.A., and Osman, A.O.Y. (2011). Elevated production of galectin-3 is correlated with juvenile idiopathic arthritis disease activity, severity, and progression. *Int J Rheum Dis* 14, 345–352.

Farnworth, S.L., Henderson, N.C., Mackinnon, A.C., Atkinson, K.M., Wilkinson, T., Dhaliwal, K., Hayashi, K., Simpson, A.J., Rossi, A.G., Haslett, C., et al. (2008). Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol* 172, 395–405.

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espin, J., Corchero, J.L., Vazquez, E., and Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* 8, 17.

Filer, A., Bik, M., Parsonage, G.N., Fitton, J., Trebilcock, E., Howlett, K., Cook, M., Raza, K., Simmons, D.L., Thomas, A.M.C., et al. (2009). Galectin 3 induces a distinctive pattern of cytokine and chemokine production in rheumatoid synovial fibroblasts via selective signaling pathways. *Arthritis Rheum* 60, 1604–1614.

Fogel, S., Guittaut, M., Legrand, A., Monsigny, M., and Hébert, E. (1999). The tat protein of HIV-1 induces galectin-3 expression. *Glycobiology* 9, 383–387.

Forsman, H., Islander, U., Andréasson, E., Andersson, A., Önnheim, K., Karlström, A., Sävman, K., Magnusson, M., Brown, K.L., and Karlsson, A. (2011). Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 445–454.

Fosang, A.J., Rogerson, F.M., East, C.J., and Stanton, H. (2008). ADAMTS-5: the story so far. *Eur Cell Mater* 15, 11–26.

Frey, S., and Görlich, D. (2014). Purification of protein complexes of defined subunit stoichiometry using a set of orthogonal, tag-cleaving proteases. *J Chromatogr A* 1337, 106–115.

García-Hernández, M.H., González-Amaro, R., and Portales-Pérez, D.P. (2014). Specific therapy to regulate inflammation in rheumatoid arthritis: molecular aspects. *Immunotherapy* 6, 623–636.

Gaudin, J.C., Arar, C., Monsigny, M., and Legrand, A. (1997). Modulation of the expression of the rabbit galectin-3 gene by p53 and c-Ha-ras proteins and PMA. *Glycobiology* 7, 1089–1098.

Goldberg, M.E. (2005). Le repliement des protéines : seconde traduction du message génétique. *M S-Med Sci* 21, 563–568.

Gong, H.C., Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Hogan, V., Mazurak, N., Bresalier, R.S., and Raz, A. (1999). The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res* 59, 6239–6245.

Gorski, J.P., Liu, F.-T., Artigues, A., Castagna, L.F., and Osdoby, P. (2002). New alternatively spliced form of galectin-3, a member of the beta-galactoside-binding animal lectin family, contains a predicted transmembrane-spanning domain and a leucine zipper motif. *J Biol Chem* 277, 18840–18848.

Goulding, C.W., and Perry, L.J. (2003). Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. *J Struct Biol* 142, 133–143.

Gouze, E., Gouze, J.-N., Palmer, G.D., Pilapil, C., Evans, C.H., and Ghivizzani, S.C. (2007). Transgene Persistence and Cell Turnover in the Diarthrodial Joint: Implications for Gene Therapy of Chronic Joint Diseases. *Mol Ther* 15(6), 1114–20.

Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., et al. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods* 5, 135–146.

Guan, D., and Chen, Z. (2014). Challenges and recent advances in affinity purification of tag-free proteins. *Biotechnol Lett* 36(7), 1391–406.

Guévremont, M., Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Liu, F.-T., Richard, M., Fernandes, J.-C., Pelletier, J.-P., and Reboul, P. (2004). Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3. *Ann Rheum Dis* 63, 636–643.

Gustafsson, C., Govindarajan, S., and Minshall, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22, 346–353.

Hannig, G., and Makrides, S.C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 16, 54–60.

Haq, I., Murphy, E., and Dacre, J. (2003). Osteoarthritis. *Postgrad Med J* 79, 377–383.

Henderson, N.C., and Sethi, T. (2009). The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 230, 160–171.

Henrotin, Y., Lambert, C., and Richette, P. (2014a). Importance of synovitis in osteoarthritis: evidence for the use of glycosaminoglycans against synovial inflammation. *Semin Arthritis Rheum* 43, 579–587.

Henrotin, Y., Marty, M., and Mobasheri, A. (2014b). What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas* 78, 184–187.

Hirabayashi, J., and Kasai, K. (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3, 297–304.

Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E.G., et al. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1572, 232–254.

Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., and Stüber, D. (1988). Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nat Biotech* 6, 1321–1325.

Holmdahl, R., Malmström, V., and Burkhardt, H. (2014). Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation — The three stages of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 44, 1593–1599.

Houdebine, L.-M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32, 107–121.

Hsu, D.K., and Liu, F.-T. (2002). Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J* 19, 507–515.

Hsu, D.K., Zuberi, R.I., and Liu, F.T. (1992). Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 267, 14167–14174.

Hsu, D.K., Hammes, S.R., Kuwabara, I., Greene, W.C., and Liu, F.T. (1996). Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am J Pathol* 148, 1661–1670.

Hsu, D.K., Yang, R.Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D.R., Fung-Leung, W.P., and Liu, F.T. (2000). Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 156, 1073–1083.

Hughes, R.C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1473, 172–185.

Hughes, R.C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667–676.

Jana, S., and Deb, J.K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 289–298.

Janelle-Montcalm, A., Boileau, C., Poirier, F., Pelletier, J.-P., Guévremont, M., Duval, N., Martel-Pelletier, J., and Reboul, P. (2007). Extracellular localization of galectin-3 has a deleterious role in joint tissues. *Arthritis Res Ther* 9, R20.

Jayaraj, R., and Smooker, P.M. (2009). So you Need a Protein - A Guide to the Production of Recombinant Proteins. *The Open Veterinary Science Journal* 3, 28–34.

Jeng, K.C., Frigeri, L.G., and Liu, F.T. (1994). An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol Lett* 42, 113–116.

Jiang, J.X., Chen, X., Hsu, D.K., Baghy, K., Serizawa, N., Scott, F., Takada, Y., Takada, Y., Fukada, H., Chen, J., et al. (2012). Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G439–446.

Jiang, Q., Qiu, Y.-T., Chen, M.-J., Zhang, Z.-Y., and Yang, C. (2013). Synovial TGF- β 1 and MMP-3 levels and their correlation with the progression of temporomandibular joint osteoarthritis combined with disc displacement: A preliminary study. *Biomed Rep* 1, 218–222.

John, C.M., Leffler, H., Kahl-Knutsson, B., Svensson, I., and Jarvis, G.A. (2003). Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin. Cancer Res* 9, 2374–2383.

Kadrofske, M.M., Openo, K.P., and Wang, J.L. (1998). The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys* 349, 7–20.

Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P., and Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 33–42.

Kissin, E.Y. (2014). The “Dirty Little Secret” Exposed in the 2013 EULAR Recommendations for Rheumatoid Arthritis Therapy. *Clin Ther* 36, 1114–1116.

Krasnokutsky, S., Belitskaya-Levy, I., Bencardino, J., Samuels, J., Attur, M., Regatte, R., Rosenthal, P., Greenberg, J., Schweitzer, M., Abramson, S.B., et al. (2011). Quantitative MRI Evidence of Synovial

Proliferation is Associated with Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 63, 2983–2991.

Lambert, Cécile, Jean-Emile Dubuc, Eulàlia Montell, Josep Vergés, Carine Munaut, Agnès Noël, et Yves Henrotin. 2014. « Gene Expression Pattern of Cells From Inflamed and Normal Areas of Osteoarthritis Synovial Membrane ». *Arthritis Rheum* 66 (4) (avril 1): 960-968

Lavra, L., Ulivieri, A., Rinaldo, C., Dominici, R., Volante, M., Luciani, E., Bartolazzi, A., Frasca, F., Soddu, S., and Sciacchitano, S. (2009). Gal-3 is stimulated by gain-of-function p53 mutations and modulates chemoresistance in anaplastic thyroid carcinomas. *J Pathol* 218, 66–75.

Lavra, L., Rinaldo, C., Ulivieri, A., Luciani, E., Fidanza, P., Giacomelli, L., Bellotti, C., Ricci, A., Trovato, M., Soddu, S., et al. (2011). The loss of the p53 activator HIPK2 is responsible for galectin-3 overexpression in well differentiated thyroid carcinomas. *PLoS ONE* 6, e20665.

Lee, D.M., and Weinblatt, M.E. (2001). Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 358, 903–911.

Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., and Poirier, F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj J* 19, 433–440.

Li, F., Kato, I., Kawaguchi, H., Takasawa, K., Hibino, Y., and Hiraga, K. (2006). The galectin-3 gene promoter binding proteins in the liver of rats 48-h post-treatment with CCl₄. *Gene* 367, 46–55.

Li, X., Zhao, Q.-Y., and Yuan, F.-L. (2011). Galectin 3 as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis: Comment on the article by Forsman et al. *Arthritis Rheum* 63, 3179–3180.

Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotech* 9, 497–501.

Liu, F.-T., and Rabinovich, G.A. (2010). Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 158–182.

Liu, F.-T., Patterson, R.J., and Wang, J.L. (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1572, 263–273.

Liu, L., Sakai, T., Sano, N., and Fukui, K. (2004). Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. *Biochem J* 380, 31–41.

Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q., and Jackowski, G. (1997). Removal of Endotoxin from Recombinant Protein Preparations. *Clin Biochem* 30, 455–463.

Liu, Z., Tyo, K.E.J., Martínez, J.L., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2012). Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 109, 1259–1268.

Lopes Júnior, O.V., and Inácio, A.M. (2013). Use of glucosamine and chondroitin to treat osteoarthritis: a review of the literature. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)* 48, 300–306.

Lowe, A.J., Bardliving, C.L., and Batt, C.A. (2012). Methods for chromatographic removal of endotoxin. *Methods Mol Biol* 899, 265–275.

- MacKinnon, A.C., Farnworth, S.L., Hodgkinson, P.S., Henderson, N.C., Atkinson, K.M., Leffler, H., Nilsson, U.J., Haslett, C., Forbes, S.J., and Sethi, T. (2008). Regulation of Alternative Macrophage Activation by Galectin-3. *J Immunol* 180, 2650–2658.
- Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60, 512–538.
- Margadant, C., van den Bout, I., van Boxtel, A.L., Thijssen, V.L., and Sonnenberg, A. (2012). Epigenetic regulation of galectin-3 expression by $\beta 1$ integrins promotes cell adhesion and migration. *J Biol Chem* 287, 44684–44693.
- Martel-Pelletier, J. (2004). Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 12, 31–33.
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.-P., and Roughley, P.J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 351–384.
- Martel-Pelletier, J., Wildi, L.M., and Pelletier, J.-P. (2012). Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone* 51, 297–311.
- McAlindon, T.E., Bannuru, R.R., Sullivan, M.C., Arden, N.K., Berenbaum, F., Bierma-Zeinstra, S.M., Hawker, G.A., Henrotin, Y., Hunter, D.J., Kawaguchi, H., et al. (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 22, 363–388.
- McCue, J.T. (2014). Chapter Five - Use and Application of Hydrophobic Interaction Chromatography for Protein Purification. In *Methods in Enzymology*, Jon Lorsch, ed. (Academic Press), pp. 51–65.
- Menon, R.P., and Hughes, R.C. (1999). Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem* 264, 569–576.
- Menon, R.P., Strom, M., and Hughes, R.C. (2000). Interaction of a novel cysteine and histidine-rich cytoplasmic protein with galectin-3 in a carbohydrate-independent manner. *FEBS Lett.* 470, 227–231.
- Menon, S., Kang, C.-M., and Beningo, K.A. (2011). Galectin-3 secretion and tyrosine phosphorylation is dependent on the calpain small subunit, Calpain 4. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 91–96.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260, 289–298.
- Morris, S., Ahmad, N., André, S., Kaltner, H., Gabius, H.-J., Brenowitz, M., and Brewer, F. (2004). Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. *Glycobiology* 14, 293–300.
- Nascimento, K.S., Cunha, A.I., Nascimento, K.S., Cavada, B.S., Azevedo, A.M., and Aires-Barros, M.R. (2012). An overview of lectins purification strategies: an overview of lectins purification strategies. *J Mol Recognit* 25, 527–541.
- Neidhart, M., Zaucke, F., von Knoch, R., Jüngel, A., Michel, B.A., Gay, R.E., and Gay, S. (2005). Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. *Ann Rheum Dis* 64, 419–424.
- Nieminen, J., St-Pierre, C., and Sato, S. (2005). Galectin-3 interacts with naïve and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol* 78, 1127–1135.

- Nieminen, J., Kuno, A., Hirabayashi, J., and Sato, S. (2006). Visualization of Galectin-3 Oligomerization on the Surface of Neutrophils and Endothelial Cells Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* 282, 1374–1383.
- Ochieng, J., Platt, D., Tait, L., Hogan, V., Raz, T., Carmi, P., and Raz, A. (1993). Structure-function relationship of a recombinant human galactoside-binding protein. *Biochemistry* 32, 4455–4460.
- Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D.E., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G., and Raz, A. (1994). Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry* 33, 14109–14114.
- Ochieng, J., Green, B., Evans, S., James, O., and Warfield, P. (1998). Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta (BBA)* 1379, 97–106.
- Ochieng, J., Furtak, V., and Lukyanov, P. (2004). Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 19, 527–535.
- Ohshima, S., Kuchen, S., Seemayer, C.A., Kyburz, D., Hirt, A., Klinzing, S., Michel, B.A., Gay, R.E., Liu, F.-T., Gay, S., et al. (2003). Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2788–2795.
- Pacheco, B., Crombet, L., Loppnau, P., and Cossar, D. (2012). A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. *Protein Express Purif* 81, 33–41.
- Palmer, R.M.J., Hickery, M.S., Charles, I.G., Moncada, S., and Bayliss, M.T. (1993). Induction of Nitric Oxide Synthase in Human Chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 398–405.
- Palomares, L.A., Estrada-Moncada, S., and Ramírez, O.T. (2004). Production of Recombinant Proteins. In *Recombinant Gene Expression*, P. Balbás, and A. Lorence, eds. (Humana Press), pp. 15–51.
- Pap, T., Müller-Ladner, U., Gay, R.E., and Gay, S. (2000). Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2, 361–367.
- Patterson, R.J., Wang, W., and Wang, J.L. (2002). Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconj J* 19, 499–506.
- Pedersen, K.O. (1972). Binding of Calcium to Serum Albumin II. Effect of pH via Competitive Hydrogen and Calcium Ion Binding to the Imidazole Groups of Albumin. *Scand J Clin Lab Invest* 29, 75–83.
- Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J., and Abramson, S.B. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 44, 1237–1247.
- Perrin-Schmitt, F. (2011). *Biotechnologies et applications : génie génétique* (Paris: Ellipses).
- Peti, W., and Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr Purif* 51, 1–10.
- Pignon, J.M. (1998). Translocation bcr-abl : méthodes diagnostiques et intérêt clinique. *Annales de Biologie Clinique* 56, 57–63.

- Pina, A.S., Lowe, C.R., and Roque, A.C.A. (2014). Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. *Biotechnol Adv* 32, 366–381.
- Raimond, J., Rouleux, F., Monsigny, M., and Legrand, A. (1995). The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53. *FEBS Lett.* 363, 165–169.
- Reboul, P., Martel-Pelletier, J., and Pelletier, J.-P. (2004). Galectin-3 in osteoarthritis: when the fountain of youth doesn't deliver its promises. *Curr Opin Rheumatol* 16, 595–598.
- Risbud, M.V., Schipani, E., and Shapiro, I.M. (2010). Hypoxic Regulation of Nucleus Pulposus Cell Survival. *Am J Pathol* 176, 1577–1583.
- Ruebel, K.H., Jin, L., Qian, X., Scheithauer, B.W., Kovacs, K., Nakamura, N., Zhang, H., Raz, A., and Lloyd, R.V. (2005). Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors. *Cancer Res* 65, 1136–1140.
- Salomonsson, E., Carlsson, M.C., Osla, V., Hendus-Altenburger, R., Kahl-Knutson, B., Öberg, C.T., Sundin, A., Nilsson, R., Nordberg-Karlsson, E., Nilsson, U.J., et al. (2010). Mutational Tuning of Galectin-3 Specificity and Biological Function. *J Biol Chem* 285, 35079–35091.
- Sano, H., Hsu, D.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., and Liu, F.-T. (2000). Human Galectin-3 Is a Novel Chemoattractant for Monocytes and Macrophages. *J Immunol* 165, 2156–2164.
- Sato, S., and Hughes, R.C. (1994). Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 269, 4424–4430.
- Scanzello, C.R., and Goldring, S.R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51, 249–257.
- Schipani, E. (2006). Hypoxia and HIF-1alpha in chondrogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 66–73.
- Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., and Johnson, R.S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15, 2865–2876.
- Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S.H., and Rini, J.M. (1998). X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem* 273, 13047–13052.
- Silverman, A.M., Nakata, R., Shimada, H., Sposto, R., and DeClerck, Y.A. (2012). A galectin-3-dependent pathway upregulates interleukin-6 in the microenvironment of human neuroblastoma. *Cancer Res* 72, 2228–2238.
- Singh, S.M., and Panda, A.K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci* 99, 303–310.
- Smolen, J.S., Landewé, R., Breedveld, F.C., Buch, M., Burmester, G., Dougados, M., Emery, P., Gaujoux-Viala, C., Gossec, L., Nam, J., et al. (2014). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 73, 492–509.

- Sodoyer, R. (2004). Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *Bio Drugs* 18, 51–62.
- Song, R.-H., Tortorella, M.D., Malfait, A.-M., Alston, J.T., Yang, Z., Arner, E.C., and Griggs, D.W. (2007). Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum* 56, 575–585.
- Sørensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005a). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115, 113–128.
- Sørensen, H.P., and Mortensen, K.K. (2005b). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4, 1.
- Stock, M., Schäfer, H., Stricker, S., Gross, G., Mundlos, S., and Otto, F. (2003). Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *J Biol Chem* 278, 17360–17367.
- Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207–234.
- Sun, S., Bay-Jensen, A.-C., Karsdal, M.A., Siebuhr, A.S., Zheng, Q., Maksymowych, W.P., Christiansen, T.G., and Henriksen, K. (2014). The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases. *BMC Musculoskelet Disord* 15, 93.
- Swartz, J.R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 12, 195–201.
- Sweeney, S.E., and Firestein, G.S. (2004). Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 372–378.
- Tchetina, E.V. (2011). Developmental Mechanisms in Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Arthritis* 2011, 1–16.
- Vivar, N., and Van Vollenhoven, R.F. (2014). Advances in the treatment of rheumatoid arthritis. *F1000Prime Rep* 6.
- Vladimirova, V., Waha, A., Lückerrath, K., Pesheva, P., and Probstmeier, R. (2008). Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3. *J Neurosci Res* 86, 2450–2461.
- Wang, C.-R., Shiao, A.-L., Chen, S.-Y., Cheng, Z.-S., Li, Y.-T., Lee, C.-H., Yo, Y.-T., Lo, C.-W., Lin, Y.-S., Juan, H.-Y., et al. (2010). Intra-articular lentivirus-mediated delivery of galectin-3 shRNA and galectin-1 gene ameliorates collagen-induced arthritis. *Gene Ther* 17, 1225–1233.
- Wang, L.-P., Chen, S.-W., Zhuang, S.-M., Li, H., and Song, M. (2013). Galectin-3 accelerates the progression of oral tongue squamous cell carcinoma via a Wnt/ β -catenin-dependent pathway. *Pathol Oncol Res* 19, 461–474.
- Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22, 1393–1398.
- Yang, R.Y., Hsu, D.K., and Liu, F.T. (1996). Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93, 6737–6742.

Yoshii, T., Fukumori, T., Honjo, Y., Inohara, H., Kim, H.-R.C., and Raz, A. (2002). Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 277, 6852–6857.

Young, C.L., Britton, Z.T., and Robinson, A.S. (2012). Recombinant Protein Express. Purif.: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J* 7, 620–634.

Zeng, Y., Danielson, K.G., Albert, T.J., Shapiro, I.M., and Risbud, M.V. (2007). HIF-1 α Is a Regulator of Galectin-3 Expression in the Intervertebral Disc. *J Bone Miner Res* 22, 1851–1861.

Zhang, D., Chen, Z., Liu, S., Dong, Z., Dalin, M., Bao, S., Hu, Y., and Wei, F. (2013). Galectin-3 gene silencing inhibits migration and invasion of human tongue cancer cells in vitro via downregulating β -catenin. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 176–184.

Zhang, H.-Y., Jin, L., Stilling, G.A., Ruebel, K.H., Coonse, K., Tanizaki, Y., Raz, A., and Lloyd, R.V. (2009). RUNX1 and RUNX2 upregulate Galectin-3 expression in human pituitary tumors. *Endocrine* 35, 101–111.

Zhang, J.P., Wang, Q., Smith, T.R., Hurst, W.E., and Sulpizio, T. (2005). Endotoxin removal using a synthetic adsorbent of crystalline calcium silicate hydrate. *Biotechnol Prog* 21, 1220–1225.

Zhao, X., Li, G., and Liang, S. (2013). Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *J Anal Methods Chem* 2013 : 581093.

Ouvrage

Schmid, R. (2005). Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique (Paris: Flammarion Médecine-Sciences), 335 pp.

Brevets

Ripoll JP. Lapins transgéniques producteurs de facteur VII humain. Brevet EP2271206 A1 [En ligne]. 12-01-11.

Disponible sur <http://www.google.com/patents/EP2271206A1?cl=fr>

Page consultée le 06/06/14

Biteau, F., Bourgaud, F., Gontier, E., and Fevre, J.-P. Process for the production of recombinant proteins using carnivorous plants. Brevet WO/2008/040599. [En ligne] 10-04-08.

Disponible sur <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2008040599>

Page consultée le 06/06/14

Ressources en ligne

Aquaportail. *Limulus polyphemus*: limule, crabe sabot de cheval. [En ligne]

Disponible sur <http://www.aquaportail.com/fiche-invertebre-961-limulus-polyphemus.html>

Page consultée le 06/06/14

Association Française des polyarthrites. Les nouvelles biothérapies et l'avenir dans la polyarthrite rhumatoïde. [En ligne]

Disponible sur

http://www.rumatologie.asso.fr/04-Rhumatismes/stop-rhumatismes/pdf-upload/GP_polyarthrite_rhumatoide_7.pdf

Page consultée le 05/06/14

Audic Y., Vecteurs et banques. [En ligne]

Disponible sur https://facmed.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20091021061450yaudicVecteurs_banques_2009.pdf

Page consultée le 17/01/14

Biologimarine.com. La paroi. [En ligne]

Disponible sur <http://www.biologimarine.com/micro/paroi.htm>

Page consultée le 12/06/14

Carenity. La polyarthrite rhumatoïde. [En ligne]

Disponible sur <http://www.carenity.com/pathologies/polyarthrite-rhumatoide/definition-de-la-polyarthrite-rhumatoide>

Page consultée le 12/06/14

Centre de biophysique moléculaire - UPR4301. Le dichroïsme circulaire. [En ligne]

Disponible sur <http://cbm.cnrs-orleans.fr/spip.php?article126>

Page consultée le 06/08/14

Créa'rt. Les protéodides. [En ligne]

Disponible sur <http://creatpe.webnode.fr/musique/les-proteodies/>

Page consultée le 06/06/14

Diaz Martinez V., Martos M.C., (BiotechSpain). Expression systems for recombinants proteins. Producing organisms. [En ligne]

Disponible sur

http://biotechspain.com/en/technique.cfm?iid=expresion_proteinas_recombinantes_ii

Page consultée le 20/01/14

European Molecular Biology Laboratory. Bacterial expression vectors.

In EMBL / Strains and vectors / Vectors. [En ligne]

Disponible sur

https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/choice_vector/ecoli/commercial/popp_commercialvectors/index.html

Page consultée le 25/03/14

European Molecular Biology Laboratory. Bacterial strains.

In EMBL / Strains and vectors / Strains. [En ligne]

Disponible sur

https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/strains_vectors/strains/bacterial_strains/index.html

Page consultée le 26/03/14

European Molecular Biology Laboratory. Concentration measurement.
In EMBL / Protein expression / Protein Express Purifcore facility. [En ligne]
Disponible sur http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/concentration_measurement/index.html
Page consultée le 11/04/14

European Molecular Biology Laboratory. Storage of purified proteins.
In EMBL / Protein expression / Protein Express Purifcore facility. [En ligne]
Disponible sur http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/storage_purified_proteins/index.html
Page consultée le 11 avril 2014

European Molecular Biology Laboratory. Improving protein solubility.
In EMBL / Protein expression / E.coli. [En ligne]
Disponible sur https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/improving_protein_solubility/index.html
Page consultée le 02/04/14

European Molecular Biology Laboratory. Improving protein stability.
In EMBL / Protein expression / E.coli. [En ligne]
Disponible sur https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/improving_protein_stability/index.html
Page consultée le 04/04/14

European Molecular Biology Laboratory. Preparation of cell lysates from E. coli.
In EMBL / Protein purification / Extraction and clarification. [En ligne]
Disponible sur http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/cell_lyses_ecoli/index.html
Page consultée le 13/04/14

Fédération Française des Diabétiques. Les 90 ans de la découverte de l'insuline. [En ligne]
Disponible sur <http://www.afd.asso.fr/diabete-recherche/insuline-histoire-decouverte>
Page consultée le 04/06/14

Forum pour les plantes carnivores. Les plantes carnivores. [En ligne]
Disponible sur <http://plantescarnivores.cultureforum.net/t637-fiche-drosera-rotundifolia>
Page consultée le 06/06/14

Futura sciences. Biologie cellulaire. *In Futura sciences : les forums de la science.*
Disponible sur <http://forums.futura-sciences.com/biologie/363644-questions-annales.html>
Page consultée le 06/08/14

HAS (Haute Autorité de Santé). Art 50, Zondar, Chondrosulf, Piasclédine, Dolenio, Flexea, Osaflexan, Structoflex et Voltaflex : service médical rendu insuffisant dans le traitement symptomatique de l'arthrose. *In Evaluation et recommandation / Médicaments / Synthèse d'avis et fiches de bon usage* [En ligne]
Disponible sur

http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1621213/fr/art-50/-zondar-chondrosulf-et-piascledine-service-medical-rendu-insuffisant-dans-le-traitement-de-larthrose%3Fxtmc%3D%26xtcr%3D1

Page consultée le 11/08/14

HAS (Haute Autorité de Santé). Prise en charge de l'arthrose : le paracétamol en première intention lors des crises douloureuses. *In Votre pratique* [En ligne]

Disponible sur

http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1725979/fr/prise-en-charge-de-larthrose-le-paracetamol-en-premiere-intention-lors-des-cris-douloureuses

Page consultée le 11/08/14

HAS (Haute Autorité de Santé). Programme de travail de la HAS 2014. [En ligne]

Disponible sur

http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-12/programme_de_travail_has_2014.pdf

Page consultée le 08/08/14

Horiba Scientific. Technologie de diffusion dynamique de la lumière. *In Sommaire / Scientifique / Produits pour la caractérisation des particules / Technologie*. [En ligne]

Disponible sur

<http://www.horiba.com/fr/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/>

Page consultée le 06/08/14

Index des médicaments vétérinaires autorisés en France [En ligne]

Disponible sur <http://www.ircp.anmv.anses.fr/>

Page consultée le 22/01/14

Jones Mike. Le dichroïsme circulaire. *In Wikipédia*. [En ligne]

Disponible sur http://fr.wikipedia.org/wiki/Diffusion_dynamique_de_la_lumi%C3%A8re

Page consultée le 06/08/14

Kneller Gérald (Université d'Orléans). Eléments de biocristallographie. [En ligne]

Disponible sur <http://dirac.cnrs-orleans.fr/~kneller/ThematiqueActuelle/PointsClef.pdf>

Page consultée le 06/08/14

L'Express. Le procès d'un scandale. [En ligne]

Disponible sur

http://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/hormone-de-croissance-le-proces-d-un-scandale_473571.html

Page consultée le 04/04/14

Leblanc B (Université de Sherbrooke). Analyse des protéines purifiées. *In Biochimie des protéines*. [En ligne]

Disponible sur <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/6a.html>

Page consultée le 06/08/14

Leblanc B (Université de Sherbrooke). La purification des protéines. *In Biochimie des protéines*. [En ligne]

Disponible sur <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e1.html>

Page consultée le 05/06/14

Les entreprises du médicament. Bioproduction 2008, état des lieux et recommandations pour l'attractivité de la France. [En ligne]

Disponible sur http://www.leem.org/sites/default/files/import/presse/communiques/150_Rapport%20de%20synth%25C3%25A8se.pdf

Page consultée le 13/01/14

Les entreprises du médicament. Biomédicaments en France, état des lieux en 2013. [En ligne].

Disponible sur <http://www.leem.org/sites/default/files/V3%20biom%C3%A9dicament%202013%2023.09.13%20maj%2001.10.13.pdf>

Page consultée le 13/01/14

Les entreprises du médicament. Les biotechnologies au cœur de l'innovation. [En ligne]

Disponible sur http://www.leem.org/sites/default/files/import/presse/discours/76_1134.pdf

Page consultée le 13/01/14

Légifrance. Code de la Santé Publique. Article L5121-1. [En ligne]

Disponible sur

http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do;jsessionid=3906559C180CEB26D8D4602A5FB19C31.tpdjo01v_3?idArticle=LEGIARTI000023755039&cidTexte=LEGITEXT000006072665&categorieLien=id&dateTexte=22220222

Page consultée le 04/06/14

Leibniz intitute for age research. Bioinformatics. [En ligne].

Disponible sur http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html

Page consultée le 12/06/14

Malvern Instruments. Diffusion dynamique de la lumière. *In Produits / Technology*. [En ligne].

Disponible sur <http://www.malvern.com/fr/products/technology/dynamic-light-scattering/>

Page consultée le 06/08/14

Manuel d'utilisation du vecteur pTrcHis. [En ligne].

Disponible sur http://users.path.ox.ac.uk/~ciu/methods/protein/ptrchis_man.pdf

Page consultée le 16/06/14

Mispelter Joël (Institut Curie). Principes de la détermination de la structure tridimensionnelle de protéines en solution par résonance magnétique nucléaire (RMN). [En ligne]

Disponible sur <http://u759.curie.fr/sites/u759/files/document/intro-rmn.pdf>

Page consultée le 06/08/14

NEB (New Englands Biolabs). PCR. [En ligne]

Disponible sur

<https://www.neb.com/sitecore/content/nebsg/home/applications/dna-amplification-and-pcr/pcr>

Page consultée le 05/06/14

NIH Senior Health. Rheumatoid Arthritis. *In Health topics A-Z*. [En ligne]

Disponible sur <http://nihseniorhealth.gov/rheumatoidarthritis/whatisrheumatoidarthritis/01.html>

Page consultée le 07/08/14

Philippe S., Dolard F., Dieu B., Varin R. Biothérapies et maladies rares- Dossier paru dans Le moniteur HOSPITALIER n°229, 2009. [En ligne]

Disponible sur <http://www.wkpharma.fr/elearning/upload/DossierMH229.pdf>

Page consultée le 22/11/13

Pirre F. SVT220, le site des Sciences de la Vie et de la Terre de M. PIRRE. [En ligne]

Disponible sur <http://svt220.free.fr/spip.php?article40>

Page consultée le 23/01/14

Plan Advanced Technologies. La technologie PAT Vendredi®. [En ligne]

Disponible sur

http://www.plantadvanced.com/expertises_50_procedes-de-production_pat-vendredi-.html#%20return%20false

Page consultée le 05/06/14

Potocki-Véronèse Gabrielle. INSA-Laboratoire biotechnologie-bioprocédés Toulouse

Produire une protéine recombinante - Principes et méthodes de biologie moléculaire. [En ligne]

Disponible sur

<http://www7.inra.fr/gdrbiopolymeres/pointpdf/pdfversailles/produireproteinererecombinante.pdf>

Page consultée le 04/12/13

Pronovost M., Chapitre 4 – La génétique – Biotechnologies [En ligne]

Disponible sur http://mpronovost.ep.profweb.qc.ca/BIONP1/bionp1_biotechnologie.html

Page consultée le 17/01/14

PubMed. Galectin-3 [Homo sapiens]. [En ligne]

Disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAA22164.1?feature=any>

Page consultée le 23/06/14

Recchia Christian. L'arthrose : une maladie du cartilage. In Arthrose / Santé AZ. [E ligne]

Disponible sur

<http://sante-guerir.notrefamille.com/sante-a-z/l-arthrose/l-arthrose-une-maladie-du-cartilage-o53723.html>

Page consultée le 07/08/14

Rinderknecht F-A, Zufelt M. Transgenic animals: models for diseases [En ligne]

Disponible sur <http://transgenictransgenicmodelsforhumandisease.yolasite.com/methods.php>

Page consultée la 23/01/14

Schwartz Larry. Desalting and buffer exchange by dialysis, gel filtration, or diafiltration.

In Life Science / Laboratory/ Litterature library. [En ligne]

Disponible sur <http://www.pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=42217#42220>

Page consultée la 06/08/14

Site d'information pour les plantes carnivores. Les Nepenthes. [En ligne]

Disponible sur <http://www.infoscarnivores.com/nepenthes.htm#haut>

Page consultée le 06/06/14

Société Française de Rhumatologie. L'arthrose. [En ligne]

Disponible sur <http://www.rhumatologie.asso.fr/04-Rhumatismes/grandes-maladies/08-dossier-arthrose/sommaire-arthrose.asp>

Page consultée le 05/06/14

Société Française de Rhumatologie. La polyarthrite rhumatoïde. [En ligne]

Disponible sur <http://www.rhumatologie.asso.fr/04-Rhumatismes/grandes-maladies/0D-dossier-polyarthrite/sommaire-polyarthrite.asp>

Page consultée le 05/06/14

Sport enseignement APSA. Articulations. In Sport enseignement APSA. [En ligne]
Disponible sur <http://sporteps.e-monsite.com/pages/articles/articulations.html>
Page consultée le 12/06/14

The official web site of the Nobel Prize. The Nobel Prize in chemistry 1980. [En ligne]
Disponible sur http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/
Page consultée le 04/06/14

University of Arizona. The biology project. [En ligne]
Disponible sur http://www.biology.arizona.edu/molecular_bio/problem_sets/nucleic_acids/15t.html
Page consultée le 06/08/14

Vidal [En ligne]
Disponible sur <http://www.vidal.fr/>
Page consultée entre le 20/01/14 et le 10/06/14

TITRE

Ingénierie des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique : conception d'une forme tronquée de la galectine 3 à potentialités antirhumatismales.

Thèse soutenue le 06/10/14 par Mélissa YELEHE-OKOUMA

RESUME :

Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique sont des bio-médicaments obtenus par génie génétique. Les procédés de leur fabrication sont standardisés, rentables et présentent une sécurité d'emploi pour le patient. Plusieurs systèmes biologiques permettent de produire ces protéines, des cellules procaryotes aux animaux ou plantes transgéniques, en passant par les levures et champignons, les cellules de mammifères ou d'insectes. De nos jours, les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique constituent la quasi totalité des 168 bio-médicaments commercialisés en France. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines thérapeutiques, dont la rhumatologie, où certaines sont indiquées dans la polyarthrite rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde est un rhumatisme inflammatoire dont la prise en charge médicamenteuse est symptomatique mais aussi étiologique, grâce à l'avènement des biothérapies ciblant les cytokines pro-inflammatoires ou les cellules immunitaires. Néanmoins, de plus en plus de cas de non réponse, d'échappement aux traitements ou de toxicité sont décrits, ce qui justifie la nécessité de rechercher d'autres cibles thérapeutiques. L'une de ces cibles potentielles est la galectine 3, une lectine sécrétée dans l'articulation au cours de la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde, mais aussi de l'arthrose, un rhumatisme dégénératif. Dans ces rhumatismes, la galectine 3 sécrétée localement, interagit avec ses ligands à la surface des cellules articulaires, ce qui engendre des réactions inflammatoires et des phénomènes de catabolisme matriciel au niveau des tissus ostéo-articulaires. Ce rôle de médiateur pro-inflammatoire et procatabolique, met en évidence l'intérêt de cibler la galectine 3 pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose.

L'objectif de notre projet de recherche, est de développer une stratégie d'inhibition des effets délétères de la galectine 3 dans l'articulation. La stratégie choisie est celle de la compétition de la galectine 3 par une de ses formes tronquées, qui a une affinité similaire pour ses ligands, mais serait incapable d'engendrer les mêmes effets biologiques.

Dans ce mémoire, nous montrons que nous avons réussi, grâce à différents outils de génie génétique, à produire cette forme tronquée recombinante. De plus, nos tests préliminaires d'activité biologique, démontrent que, dans certaines conditions, la lectine tronquée recombinante inhibe partiellement les effets biologiques de la galectine 3, sur des cellules articulaires humaines. A ce stade du projet, plusieurs optimisations techniques sont néanmoins nécessaires, dans le but de confirmer nos résultats préliminaires, et de déterminer si cette forme tronquée de la galectine 3 présente de réelles potentialités antirhumatismales.

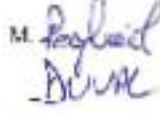
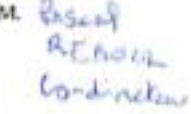
MOTS CLES : protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique - bio-médicament - ADN recombinant - génie génétique - ingénierie des protéines - purification de protéines - galectine 3 - rhumatologie - articulation - cartilage - chondrocyte - arthrose - polyarthrite rhumatoïde

Directeurs de thèse	Libellé du laboratoire	Nature de la thèse
Pr Jean-Yves JOUZEAU Dr Pascal REBOUL	UMR 7365 CNRS UL IMoPA (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire)	Expérimentale

Thème **Biologie**

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soumission : 06/09/2014

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE présenté par : YELEHL-OKOUMA Mélissa Sujet : Ingénierie des procédés vaccinalisantes d'intérêt thérapeutique : conception d'une forme trepanée de la galactine 3 à priorités autorisatives. Jury : Président : M. DUTVAT, Professeur des Universités Directeur : M. JOUZEAT, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier Co-directeur : M. REBOUL, Maître de Conférences Juges : Mme THIEBAUD-SEQUIER, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier M. ATTWT, Pharmacien Praticien Hospitalier M. KRIZNIK, Ingénieur d'études	Vu Nancy, le 3 Septembre 2014  Le Président du Jury  Directeur de Thèse P/a  M.  M.  Co-directeur
Vu et approuvé, Nancy, le 9.09.2014  Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,  Francine KEDZIEREWICZ Vice-doyen	Vu Nancy, le 19 SEP. 2014 Le Président de l'Université de Lorraine,  Pierre MUTZENHARDT N° d'enregistrement : 6642