

ANNEE 1987

N° 202

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS
(application de l'arrêté du 5 juillet 1984)
MENTION PHARMACIE

Spécialité BIOCHIMIE STRUCTURALE ET METABOLIQUE

par

Marie Geneviève AKELI, épouse OKIEMY

soutenue publiquement le 16 Septembre 1987

**NOUVELLES PROPRIETES DE LA LIGNEE
ERYTHROLEUCEMIQUE HUMAINE K562
Activité collagénolytique et Réversion de la
résistance à l'adriamycine par le tamoxifène**

JURY :

Président	: Mr. Le Professeur	J.C. JARDILLIER
Assesseurs	: Mr. Le Professeur	C. BOHUON
	Mr. Le Professeur	J.P. BOREL
	Mr. Le Professeur	J. DUFER
	Mr. Le Docteur	P. SIRET

UNIVERSITE DE REIMS – CHAMPAGNE ARDENNE
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE

ANNEE 1987

N° 202

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS

(application de l'arrêté du 5 juillet 1984)

MENTION PHARMACIE

Spécialité BIOCHIMIE STRUCTURALE ET METABOLIQUE

par

Marie Geneviève AKELI, épouse OKIEMY

soutenue publiquement le 16 Septembre 1987

**NOUVELLES PROPRIETES DE LA LIGNEE
ERYTHROLEUCEMIQUE HUMAINE K562**

**Activité collagénolytique et Réversion de la
résistance à l'adriamycine par le tamoxifène**

JURY :

Président	: Mr. Le Professeur	J.C. JARDILLIER
Assesseurs	: Mr. Le Professeur	C. BOHUON
	Mr. Le Professeur	J.P. BOREL
	Mr. Le Professeur	J. DUFER
	Mr. Le Docteur	P. SIRE

UNIVERSITE DE REIMS
FACULTE DE PHARMACIE

Doyen	M. J. LEVY
Assesseurs.....	M. M. AUROUSSEAU
	M.J. DUFER

PROFESSEURS

M.F. ARSAC.....	Toxicologie
M.M. AUROUSSEAU.....	Pharmacodynamie
M.PH. BOUCHET.....	Botanique
Mme C. CHOISY	Virologie-Immunologie
M.B. DESOIZE	Biochimie
Mle A. DESPLACES.....	Physiologie
M.J. DUCHENNE	Bactériologie
M.J. DUFER	Hématologie
M.J. GARDENT	Chimie Organique
Mme M.J. HOIZEY.....	Pharmacognosie
M.J.C. JARDILLIER	Biochimie
M.J. LAROCHE	Hygiène-Hydrologie
M.J.H. LARONZE	Chimie Thérapeutique
M.C. LEDOUBLE	Chimie Analytique
Mme N. LEGER	Parasitologie
Mme L. LE MEN-OLIVIER.....	Pharmacognosie
M.J. LEVY	Chimie Thérapeutique
Mme M.C. LEVY	Pharmacie Galénique
M.M. MANFAIT.....	Physique

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Mme A. CHARLES

BIBLIOTHECAIRE

Mle J. JUSTRABO

A Monsieur le Professeur J.C .JARDILLIER,

Qui m'a accueillie dans le groupe de recherche qu'il dirige, m'a fait profiter de sa grande expérience dans le domaine de la biochimie et m'a produite de nombreux conseils et encouragements.

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur C.BOHUON,

Qui a bien voulu accepter de faire partie de notre jury. en raison de sa grande compétence dans le domaine de la cancérologie, nous sommes particulièrement honorée de l'intérêt qu'il a l'obligeance de porter à ce travail.

Qu'il soit assuré de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur I.P.BOREL

Soyez assuré de toute notre gratitude pour le bienveillant intérêt que vous nous avez témoigné en acceptant de faire partie de notre jury.

Recevez le témoignage de notre profond respect et notre plus vive reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.DUFER

Qui nous a fait le grand honneur de bien vouloir accepter de juger cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance, ainsi que l'hommage de notre profond respect.

A Monsieur le Docteur P.SIRET,

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.

Veillez trouver, ici, l'expression de notre profonde et respectueuse gratitude.

Les opinions exprimées dans cette thèse n'engagent que son auteur et en aucun cas la faculté de pharmacie de REIMS.

TABLE DES ABBREVIATIONS

ADM	:	Adriamycine
BSA	:	Bovine Serum Albumine
CPM	:	Coup par minute
De Me-Txf	:	N-deméthyltamoxifène
DI50	:	Dose inhibitrice 50
DMSO	:	Diméthyl sulfoxyde
DNA	:	Acide désoxyribonucléique
DPM	:	Désintégrations par minute
EDTA	:	Acide éthylène diamine tétraacétique
IgG	:	Immunoglobuline G
I-R	:	Indice de résistance
Kd	:	Constante de dissociation
LI	:	Liaison libre
L max.	:	Liaison maximale
LNS	:	Liaison non spécifique
LS	:	Liaison spécifique
LT	:	Liaison totale
NBT	:	Nitro blue tetrazolium
OH-TXF	:	Hydroxytamoxifène
PBS	:	Phosphate buffer saline
PMA	:	Phorbol myristate acétate
PMSF	:	Phénylméthylsulfonyl fluorure
PPO	:	2,5-diphényloxazole
RE	:	Récepteur d'œstrogène
RNA	:	Acide ribonucléique
RT	:	Récepteur de tamoxifène
SBTI	:	Soybean trypsin inhibitor
SDS	:	Dodecyl sulphate de sodium
SVF	:	Sérum de veau fœtal
TEA	:	Tris, EDTA, Azide de sodium
TEMED	:	N,N,N,N-tétra méthylène diamine
TIMP	:	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TPA	:	Phorbol tri acétate
Tris	:	Amino-2 hydroxyméthyl-2 propanediol 1,3
Txf	:	Tamoxifène
U.F.	:	Unité de fluorescence

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>ETUDE THEORIQUE</u>	4
<u>I- CARACTERISTIQUE DE LA K562 ET MODIFICATION MORPHOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES LIEES A LA DIFFERENCIATION</u>	4
<u>II- LA RESISTANCE A L'ADRIAMYCINE</u>	6
1. Les mécanismes d'actions de l'adriamycine	7
a. Au niveau de l'hélice du DNA	7
- Intercalation et propriétés biochimiques	7
- Réduction biologique des anthracyclines	7
b. Action au niveau de la membrane	8
c. Action différenciante	9
2. Les causes de la résistance à l'adriamycine	9
a. Au niveau membranaire	9
- Diminution de l'entrée de l'adriamycine	9
- Augmentation de la sortie de l'adriamycine	9
b. Au niveau cytoplasmique	9
c. Augmentation de l'inactivation de la drogue	10
3. Moyens de lutte contre la résistance	11
<u>III-LES COLLAGENES ET LES COLLAGENASES</u>	12
1. Le collagène	12
a. Structure du collagène I	12
b. Différents types de collagène	17
c. Biosynthèse du collagène	19
d. Catabolisme	19
2. Les collagénases	19
a. Structure des collagénases	19
b. Propriétés des collagénases	20
– Spécificité	20
– Ph optimum	21
– Masse moléculaire	21
– Activation et inhibition de la collagénase	21

3. Rôle des collagénases dans le pouvoir invasif tumoral	21
a. Les stades de l'extension	21
b. Collagénases et métastases	22
c. Enzymes associées au niveau cellulaire : cas du tamoxifène	23
IV- <u>MECANISME D'ACTION DES ANTI-OESTROGENES</u>	24
– Activités du tamoxifène	24
– Mode d'action au niveau cellulaire : cas du tamoxifène	25
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	
1. Cultures Cellulaires	29
1.1 Les cellules	29
1.2 Composition des milieux de culture	29
– Les cellules k 562 et les clones (G et 19)	29
– La lignée promyélocytaire humaine HL 60	29
– Milieu synthétique	30
1.3 Condition de culture	30
1.4 Viabilité cellulaire	30
1.5 Préparation des granulocytes et lymphocytes	30
2. Effecteurs Pharmacologiques	31
2.1 L'hémine	31
2.2 L'adriamycine	32
2.3 Le tamoxifène	33
3. Préparation des extraits enzymatiques intracellulaires	33
3.1 Réactifs	33
3.2 Extrait enzymatique intracellulaire total	34
3.3 Extrait cytoplasmique	34
3.4 Extrait membranaire	34
3.5 Extrait extra – cellulaire	34
3.6 Activation trypsique	35
4. Dosage de l'activité enzymatique	35
4.1 Préparation du collagène	35
4.2 Détermination de l'activité collagénolytique	35
4.3 Détermination de l'activité protéasique non spécifique	38
4.4 Contrôle de l'activité collagénolytique par électrophorèse des produits de dégradation	38
5. Effets biologiques non hormonaux du tamoxifene et de ses metabolites	42
5.1 Actions sur la croissance cellulaire	42
5.2 Actions sur l'activité collagénolytique	42

5.3 Etude de la biosynthèse protéique des cellules K 562 cultivées en présence du tamoxifène et/ou de ses dérivés	42
5.4 Dosage des protéines	43
5.5 Recherche des récepteurs d'oestrogènes (RE) et de tamoxifène (RT)	43
6. Résistance à l'adriamycine	45
6.1 Elaboration et caractéristiques de croissance de la population résistante à l'adriamycine	45
6.2 Caractéristiques de croissance des 2 lignées cellulaires en présence du tamoxifène et de ses dérivés	45
6.3 Accumulation de ¹⁴ C ADM dans les K 562	46
6.4 Etude de la sortie d'ADM hors des cellules	46

RESULTATS

A. <u>ETUDE DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE DES CELLULES K 562</u>	
I. Détermination des conditions optimales de l'activité collagenolytique	48
1. pH optimum	48
2. Les ions Ca ⁺⁺	49
3. Le nombre de cellules K 562 par essai	49
4. La phase de croissance des cellules	50
II. Comparaison de l'activité collagénolytique des cellules k 562 avec celles d'autres cellules	51
III. Inhibition de l'activité collagénolytique par les inhibiteurs classiques des collagenases	52
IV. Activation des extraits enzymatiques de k 562	52
V. Localisation intracellulaire de l'activité collagénolytique	53
VI. Excrétion de l'activité collagénolytique	53
VII. Mesure de l'activité proteasique non spécifique	54
VIII. Profils électrophorétiques des produits de dégradation du collagène	54
IX. Modulation de l'activité collagénolytique au cours de la différenciation érythroïde des cellules K562	55
IX.1 Dans les clones de K 562	55
IX.2 Après hémine	56
– Effet dose	56
– Effet temps et réversibilité	57
B. <u>INHIBITION DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE PAR LE TAMOXIFENE ET SES METABOLITES</u>	
I. Effet dose et temps	59
II. Etude de la biosynthèse protéique	61

III.	Recherche de l'inhibition "in vitro" de l'activité collagénolytique par le tamoxifène et ses dérivés	62
IV.	Recherche d'une éventuelle synthèse d'hémoglobine induite par le tamoxifène et ses dérivés	64
V.	Dosage des récepteurs d'œstrogènes et de tamoxifène	64
Tracé de la courbe de saturation du récupération et de la droite de scatchard		
a.	courbe de saturation du récepteur	64
b.	La méthode de linéarisation de scatchard	64
C.	<u>ACTION DU TAMOXIFENE SUR LA RESISTANCE A L'ADRIAMYCINE</u>	
I.	Détermination de la DI50 de l'adriamycine et de l'indice de résistance (IR)	69
II.	Etude de la réversibilité de la résistance a l'adriamycine par le tamoxifène et ses métabolites dans les cellules K 562/R ⁷	69
1.	Détermination de la sensibilité à l'adriamycine	69
2.	Accumulation intracellulaire de ¹⁴ C ADM	70
3.	Etude de l'adriamycine lié au milieu cellulaire après efflux	71
	DISCUSSION	73
	CONCLUSION GENERALE	81
	BIBLIOGRAPHIE	83

INTRODUCTION

La lignée K 562, établie en 1970 par LOZZIO et LOZZIO à partir du liquide pleural d'une patiente atteinte d'une leucémie myéloïde chronique en crise blastique (66) a été décrite comme un stade précoce de différenciation de la lignée granulocytaire (50). Mais à la suite des travaux de ANDERSON (1) et RUTHERFORD (88), elle a été présentée comme appartenant à une lignée érythroleucémique avant que des travaux plus récents ne démontrent qu'elle était en fait pluripotente et pouvait se différencier vers la lignée granulocytaire, érythrocytaire et même mégacaryocytaire (93).

Plusieurs propriétés de la lignée K 562 ont été déjà étudiées : les caractéristiques de culture, les particularités cytogénétiques, les modifications morphologiques membranaires (récepteurs de surface membranaire Fc pour les IgG, glycoprotéines) et fonctionnelles liées à la différenciation, et enfin certaines activités enzymatiques (cholinestérase, peroxydase plaquettaire, phosphatase acide) (65).

Par ailleurs, nous avons poursuivi des travaux du laboratoire consacrés à la dissémination tumorale et plus particulièrement au rôle des collagénases dans le processus des métastases. Ceci nous a permis de mettre en évidence dans la lignée K 562 une activité collagénolytique importante.

Sous certaines conditions de culture, en maintenant constamment une faible concentration d'adriamycine dans le milieu extracellulaire on peut établir un certain degré de résistance aux anthracyclines dans la cellule K 562. Cette propriété est extrêmement importante car elle permet d'avoir ainsi accès à un modèle d'étude in vitro de cette résistance, l'instauration d'une résistance à la chimiothérapie étant actuellement un des problèmes majeurs de la cancérologie.

Nous avons ainsi la possibilité d'étudier 2 propriétés nouvelles de la K 562, toutes deux pouvant être considérées comme particulièrement cruciales dans le traitement du cancer car elles concernent :

- 1) la principale cause de la mortalité chez le sujet cancéreux :
la dissémination métastatique.
- 2) la principale cause de l'échec de la chimiothérapie :
l'installation d'une résistance au traitement.

Nous avons donc choisi d'étudier ces 2 axes :

- 1) L'étude de l'activité collagénolytique de cette lignée leucémique humaine cultivée in vitro et connue pour avoir des propriétés métastasiantes. En effet les cellules K 562 produisent des métastases chez la souris athymique (64) et il a été démontré que de nombreuses cellules transformées possèdent une activité collagénolytique capable de désorganiser la matrice extracellulaire riche en collagène, facilitant ainsi les infiltrations métastatiques (59).

De plus cette lignée est multipotentielle c'est-à-dire qu'elle possède des caractères à la fois érythroïde, mégacaryocytaire et granulocytaires. Elle est également capable de se différencier sous l'effet de certains inducteurs vers ces différentes voies. Cette capacité à se différencier nous a permis de suivre la modulation de l'activité collagénolytique au cours de la différenciation érythroïde.

La modulation de l'activité enzymatique a été également étudiée avec des agents pharmacologiques comme le tamoxifène et ses dérivés.

2) Les moyens de lever la résistance à l'adriamycine dans les cellules K 562 résistantes en utilisant le tamoxifène. Notre choix s'est porté sur le tamoxifène pour plusieurs raisons :

- La première est qu'il a été montré que le tamoxifène inhibe la protéine kinase C du cerveau de rat. Le vérapamil lui aussi peut inhiber sur cette enzyme (78). Puisque le vérapamil et les inhibiteurs de la calmoduline potentialisent l'action de l'adriamycine et augmentent la concentration intracellulaire en drogue et parallèlement sa cytotoxicité, les deux observations méritent d'être rapprochées. Elles signifient que le tamoxifène, bien connu jusqu'à présent comme antihormonal, pourrait aussi être pris en considération pour son action biologique non hormonale.
- La seconde est qu'il a été montré par Ramu et son équipe (83) que le tamoxifène peut interagir avec la membrane en se complexant à des lipides membranaires et il en résulte une augmentation de la concentration intracellulaire de l'adriamycine.
- La troisième raison est liée aux propriétés anti-enzymatiques du tamoxifène. En effet, Wakeling et ses collaborateurs (99) ont montré que le tamoxifène inhibait l'activateur de plasminogène (PA) qui convertit le plasminogène en plasmine capable d'activer la procollagénase en collagénase.

Le tamoxifène apparaissait ainsi comme une molécule susceptible d'intéresser les 2 axes d'étude que nous avons retenus.

ETUDE THEORIQUE

I. CARACTERISTIQUES DE LA K 562 ET MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES LIEES A LA DIFFERENCIATION

Les cellules K 562 sont des cellules blastiques indifférenciées de taille variable (14 à 20 µm de diamètre). Elles se développent et prolifèrent en suspension dans un milieu de culture.

La cellule K 562 n'est pas colorée par les agents cytochimiques positifs avec les granulocytes et les monocytes. Plusieurs cellules réagissent fortement à la phosphatase acide. 90 % de cellules K 562 forment des rosettes EA, indiquant la présence de récepteurs Fc. Elles présentent une activité cholinestérasique ainsi que l'activité polyoxydasique de plaquettes. La lignée K 562 a été décrite au départ comme un stade précoce de différenciation de la lignée granulocytaire (50) puisqu'elle portait le chromosome philadelphie et des antigènes spécifiques de la lignée granulocytaire. Mais elle possède aussi des caractères phénotypiques autres que ceux de la lignée granulocytaire. Mais elle possède aussi des caractères phénotypiques autres que ceux de la lignée granulocytaire, on trouve :

- des marqueurs de la lignée érythroïde
- des marqueurs de la lignée mégacaryocytaire.

On ne trouve par contre aucun marqueur phénotypique spécifique des lymphocytes.

Les cellules K 562 contiennent dans leur membrane de la glycophorine A et de la spectrine (40). De plus, en présence d'agents différenciants comme l'hémine et le butyrale, elles synthétisent de l'hémoglobine de type embryonnaire et fœtale(40).

la cellule k 562 peut être induite à se différencier par une variété d'inducteurs soit vers la voie granulocytaire ou érythroïde.

- Le TPA (phorbol tri acétate)

Promoteur de tumeur chez les rongeurs, est aussi connu comme agent de différenciation monocyttaire dans les lignées myéloïdes.

Le TPA provoque une inhibition des caractéristiques érythroïdes constitutives ou induites (inhibition de l'expression de la glycophorine A mais pas de la spectrine) et une inhibition de la prolifération (l'inhibition est fonction de la concentration et réversible) (93). Il n'engendre aucun changement morphologique.il bloque la synthèse d'hémoglobine endogène et induite. On observe aussi l'apparition de certaine antigène granulocytaires et monocytaires ainsi qu'une réduction de récepteurs Fc

- L'acide rétinoïque

La glycophorine et la production d'hémoglobine sont inhibés par l'acide rétinoïque (93). Il est bien connu comme agent de différenciation notamment granulocytaire dans d'autre lignées.il inhibe aussi légèrement la prolifération cellulaire.

- Le D.M.S.O. (Dimethylsulfoxyde)

Il déclenche quelques changements dans la K 562 qui peuvent être reliés à une différenciation mégacaryocytaire (93).

Approximativement 80% des cellules sont positives à la 5'-nucléotidase, un marqueur de la différenciation leucémique mégacaryocytaire. Le D.M.S.O. réduit en même temps l'expression de la glycophorine, la production d'hémoglobine et le volume cellulaire.

- Le P.M.A. (Phorbol Myristate Acétate)

Il apparaît comme induisant une différenciation macrophagique des cellules K 562 (93). Après induction, les cellules deviennent adhérentes au plastique et sont capables de réduire le NBT. Le P.M.A. induit la synthèse d'antigène HLA de classe I. Le phénotype érythroïde des cellules est très altéré ; un faible pourcentage seulement de cellules continuent à exprimer la glycophorine sur leurs membranes, la production d'hémoglobine est abolie, la prolifération cellulaire est inhibée. Les changements phénotypiques provoqués par le P.M.A. apparaissent stables.

- Le Butyrate de sodium

En présence d'acide butyrique, les cellules K 562 sont induites à se différencier vers la voie érythroïde (93).

L'acide butyrique inhibe modérément la croissance cellulaire sans affecter la viabilité. On observe une augmentation très significative de la production d'hémoglobine et de l'expression de la glycophorine. Il n'y a pas de changement dans l'expression des antigènes des monocytes ou des mégacaryocytes. Le butyrate de sodium provoque une synthèse préférentielle des chaînes de globines de type Gower I et Portland.

- L'Hémine

L'hémine induit une accumulation réversible d'hémoglobine fœtale et embryonnaire sans affecter la croissance et la viabilité cellulaire. L'expression de la glycophorine augmente. Les cellules K 562 traitées par l'hémine provoquent une synthèse préférentielle des chaînes de globines de type X et Hb Bart mais jamais d'hémoglobine adulte, donc pas de différenciation terminale (93).

- L'Adriamycine (ADM)

L'ADM appartient au groupe des agents anticancéreux de structure anthracyclique. Outre ce noyau anthracyclique plan, avec une structure quinol, elle possède une osamine, la daunosamine, qui a la particularité d'avoir sa fonction aminée portée par le carbone 3 (Figure 1).

L'ADM est actuellement un anticancéreux majeur, elle est utilisée, le plus souvent en polychimiothérapie dans le traitement des leucémies et de nombreuses tumeurs solides (sein,

poumon par ex.). Son usage est donc très fréquent malgré sa toxicité élevée, au niveau du myocarde notamment, qui entraîne une limite dans la posologie cumulée qui est de 600 mg/m².

Les cellules cancéreuses développent une résistance à l'action de l'ADM. Enfin ses mécanismes d'action biologiques sont très complexes et il existe toujours une certaine incertitude sur la ou les propriétés biologiques impliquées directement dans l'activité pharmacologique. Récemment, il a été démontré que l'ADM, outre son activité intercalante, pouvait aussi induire la différenciation des cellules K 562 : le taux d'hémoglobine intracellulaire est augmenté (44, 45). Ces auteurs montrent que dans les cellules K 562 traitées par l'ADM, il y a apparition de nouvelles hémoglobines de type Gower II, X,F et Portland par comparaison avec les cellules non traitées qui ne possèdent que les hémoglobines de type Gower I.

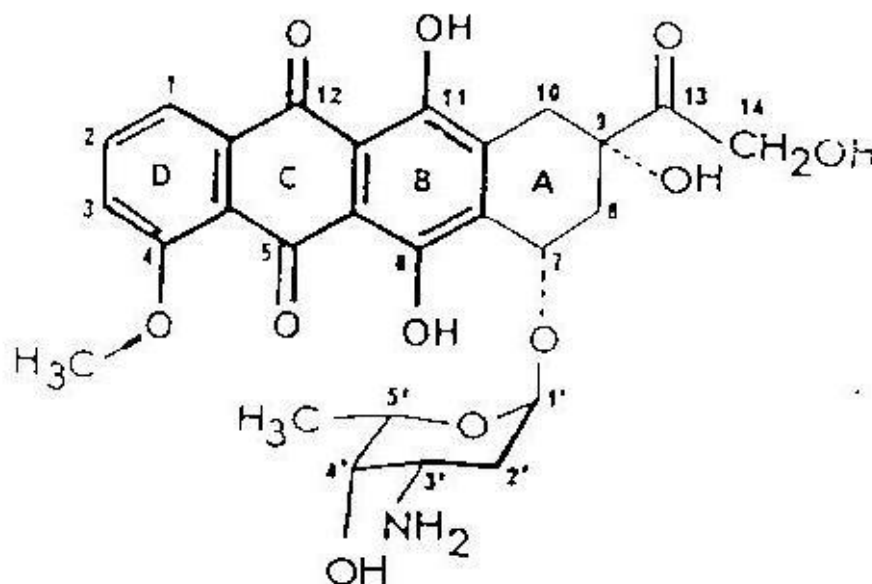


Figure 1 : structure de l'adriamycine

II. LA RESISTANCE A L'ADRIAMYCINE (ADM)

L'un des problèmes posé par la chimiothérapie est l'apparition d'une sous population de cellules tumorales qui présente une résistance vis-à-vis de la drogue anti-tumorale utilisée. Cependant, il a été démontré chez les patients atteints de cancer et dans des systèmes de tumeurs expérimentales qui acquièrent une résistance aux alcaloïdes extraits de plantes (Vinca) ou aux antibiotiques qu'il y a souvent une résistance croisée avec d'autres produits naturels (18).

Il a été remarqué, après une utilisation en clinique de l'adriamycine, que les cellules tumorales des patients traités présentaient une résistance à cette drogue.

Pour comprendre les mécanismes possibles de la résistance à l'ADM, il faut connaître son mode d'action au niveau cellulaire et s'attarder sur les différences entre les cellules sensibles et les cellules résistantes. Cette étude nécessite entre autre la mise au point d'une population résistante.

1. Les mécanismes d'action de l'adriamycine

Plusieurs mécanismes sont proposés pour rendre compte de l'activité antitumorale et de la toxicité de l'ADM.

a) Au niveau de l'hélice de DNA

De nombreuses publications font état d'aberrations chromosomiques, d'échange de chromatide sœur, de la formation de micronoyaux dans des cellules incubées en présence d'anthracyclines (15).

Les anthracyclines s'accumulent dans les cellules tumorales. Une quantité importante de drogue se retrouve dans la fraction nucléaire lorsqu'on étudie la distribution intracellulaire (77). L'addition d'anthracyclines à des cultures de cellules tumorales. une quantité importante de drogue se retrouve dans la fraction nucléaire lorsqu'on étudie la distribution intracellulaire (77). L'addition d'anthracyclines à des cultures de cellules tumorales en croissance se traduit par une inhibition rapide des biosynthèses du DNA et du RNA (73).

- Intercalation et propriétés biochimiques

L'ADM s'intercale dans le DNA préférentiellement entre les paires de bases guanosine-cytosine. L'intercalation provoque une déformation de la structure du DNA et entraîne l'inhibition d'enzymes utilisant le DNA monocaténaire et bicaténaire comme matrice telles les DNA polymérase (108) et la RNA polymérase (108).

- Réduction biologique des anthracyclines

Bachur a montré qu'un élément libre transféré d'un NADPH à une flavo-protéine peut être capté par une anthracycline pour conduire à la formation d'une structure semi-quinonique sous forme d'un radical libre(4).

Cette réaction est schématisée sur la figure 2. Ce radical semi-quinone peut réagir soit directement au DNA, soit subir de nouvelles transformations en fonction de l'état d'oxygénation de la cellule. En présence d'oxygène, il peut y avoir transfert de l'électron sur l'oxygène pour donner un ion superoxyde O_2^- qui par dismutation peut produire H_2O_2 et OH^- , entités capables de provoquer la rupture des liaisons phosphodiester du squelette du DNA (62).

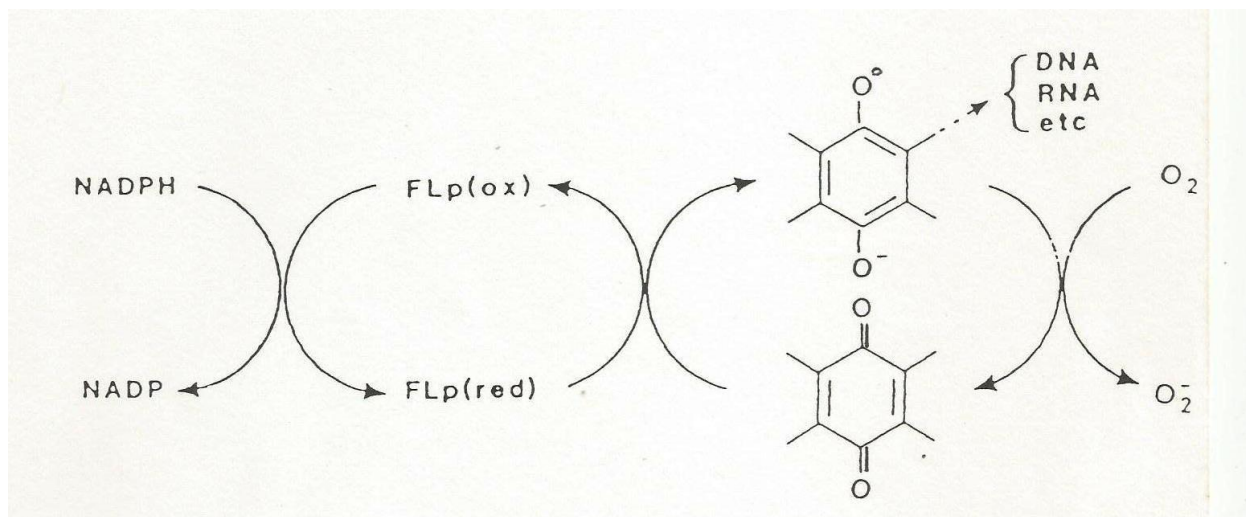


Figure 2 : Schéma de la réaction d'oxydo-réduction du cycle quinonique des anthracyclines d'après Bachur et al. (4)

b) Action au niveau de la membrane

- Les ions superoxydes sont aussi responsables de l'initiation in vitro de la peroxydation des lipides membranaires insaturés qui provoque une altération de la structure membranaire et une modification du transport ionique.

- L'ADM interagit également avec les phospholipides membranaires chargés négativement comme la cardiolipine. L'interaction avec les membranes mitochondriales est souvent invoquée pour rendre compte de la toxicité cardiaque.

Il a été montré que l'ADM module de nombreuses activités membranaires. En effet, les résultats des tests d'agglutination par la concanavaleine A pratiqués sur les cellules traitées par l'ADM sont fortement augmentés, laissant suggérer une modification des sites membranaires des lectines (75). De plus, l'ADM induit une augmentation de la fluidité membranaire et de la synthèse des glycoprotéines (46). Une hypersialylation des glycoprotéines membranaires ainsi qu'une modification de l'activité des sialyls transférases et des sialidases ont été également rapportées dans les cellules traitées à l'ADM (71).

- Sur la membrane existaient des sites de liaison pour l'ADM. Après fixation membranaire, l'ADM déclenche des phénomènes de cytotoxicité. En effet, même immobilisée sur des microsphères, elle garde son activité cytostatique sans pénétrer dans la cellule (95).

Certains auteurs ont montré l'apparition d'une glycoprotéine de masse moléculaire 180 (la gp 180 uniquement dans les cellules résistantes). La phosphorylation de la gp 180 joue un rôle important dans le mécanisme de résistance aux drogues.

c) Action différenciante

Comme nous l'avons dit plus haut l'ADM possède aussi une action différenciante puisqu'elle induit une synthèse d'hémoglobine dans les cellules K 562, avec apparition de nouveaux types d'hémoglobine (44).

2. Les causes de la résistance à l' Adriamycine

a) Au niveau membranaire

une altération du mécanisme de transport de la drogue est observée à savoir :

Diminution de l'entrée de l'ADM

La modification de la concentration intracellulaire en ADM est due à une diminution du passage de la drogue au travers de la membrane plasmique des cellules résistantes. La démonstration a été faite grâce à une étude en spectroscopie de fluorescence (94) qui utilise les propriétés de fluorescence de l'ADM pour en mesurer l'incorporation dans les cellules résistantes et sensibles exposées à 1 et 10 microgrammes /ml de drogue.

De plus, BIDLER et PETERSON (8) ont montré que plus le degré de résistance est élevé, moins la drogue est captée par cellule.

Augmentation de la sortie de l'ADM

Des études sur le devenir de l'ADM dans les cellules montrent que les cellules résistantes rejettent une quantité importante de drogue dans le milieu extracellulaire (42).

Cet efflux est énergie-dépendante

Avec l'ADM (17) il a été montré que dans les cellules résistantes, la gp 180 faiblement phosphorylée peut empêcher l'accumulation de la drogue . Par contre, si cette gp 180 est sous forme superphosphorylée, elle est inactive et la cellule exprime un phénotype sensible .

Elle décroît la fluidité membranaire et il en résulte une augmentation de la résistance.

– Une autre glycoprotéine de membrane de 170-180 Kilodaltons, la gp 170 vient d'être mise en évidence. Son taux est fortement augmenté dans les lignées résistantes (85). Or il est admis que l'absorption de drogue par la cellule se fait par diffusion passive, leur expulsion au contraire implique un processus actif de pompage contre un gradient de concentration. La structure de la gp 170 (figure 3) est compatible avec un rôle dans cette expulsion.

Son augmentation dans la cellule résistante expliquerait que la concentration des drogues soit inférieure à celle des cellules sensibles : l'énergie nécessaire serait fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

b) Au niveau cytoplasmique

Sous l'action des cytochromes P450, le métabolisme de l'ADM en forme active ne se fait pas.

Bachur a montré que c' est le NADPH cytochrome P 450 réductase qui est responsable de la biotransformation des anthracyclines qu' entraîne l'apparition de radicaux libres (4) . Les cellules résistantes seraient déficientes en P 450 réductase et/ou auraient un système de détoxification important via la glutathion transférase, enzyme majeure dans le système d'élimination des radicaux libres.

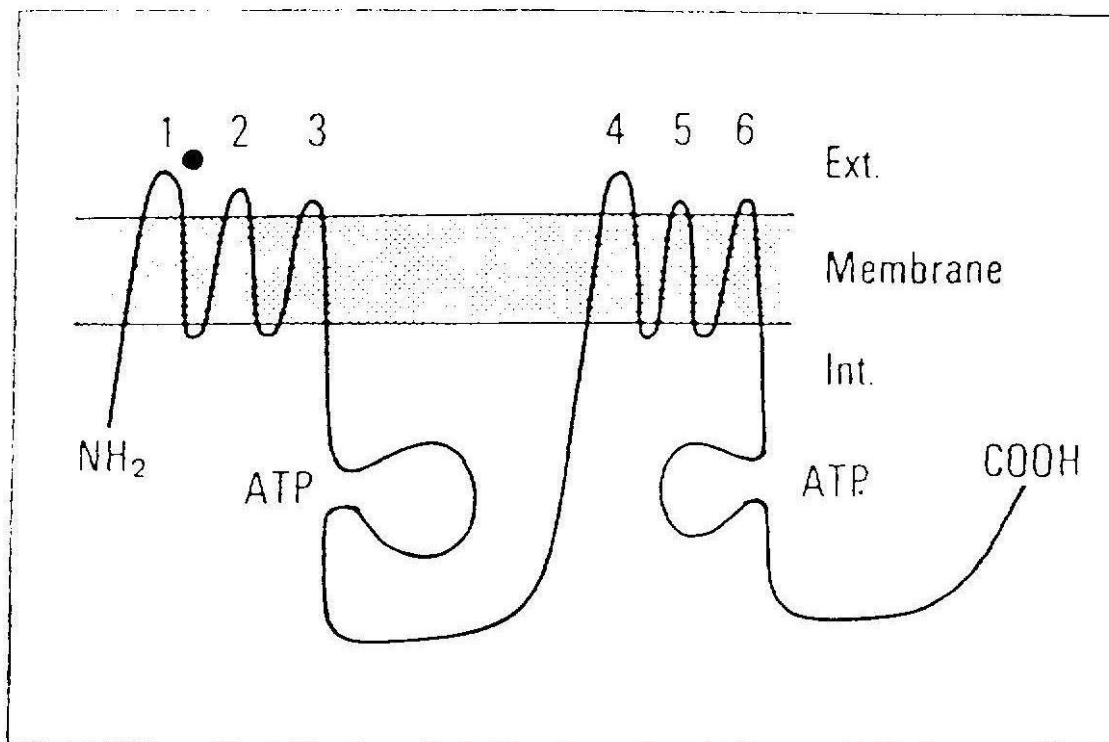


Figure 3 : Modèle schématique de la gp170. EXT : zone extracellulaire ; INT : zone intracellulaire ; • : région riche en sites de glycosylation. Les sites de fixation de l'ATP sont également montrés.

c) Augmentation de l'inactivation de la drogue

La dégradation de l'ADM passe par une scission de la molécule au niveau de la liaison aglycone-sucre (Figure 4). Ce clivage se fait grâce à une glycosidase dont l'activité est intense au niveau des microsomes (3). Le cofacteur de la glycosidase est le NADPH^+ . L'aglycone obtenu est inactif. La résistance à l'ADM pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'activité de ces glycosidases.

D'autre part, dans les cellules résistantes, les radicaux libres qui peuvent réduire la molécule d'oxygène en ion superoxyde seraient davantage inactivés par des enzymes microsomiales normalement présents comme la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase (21).

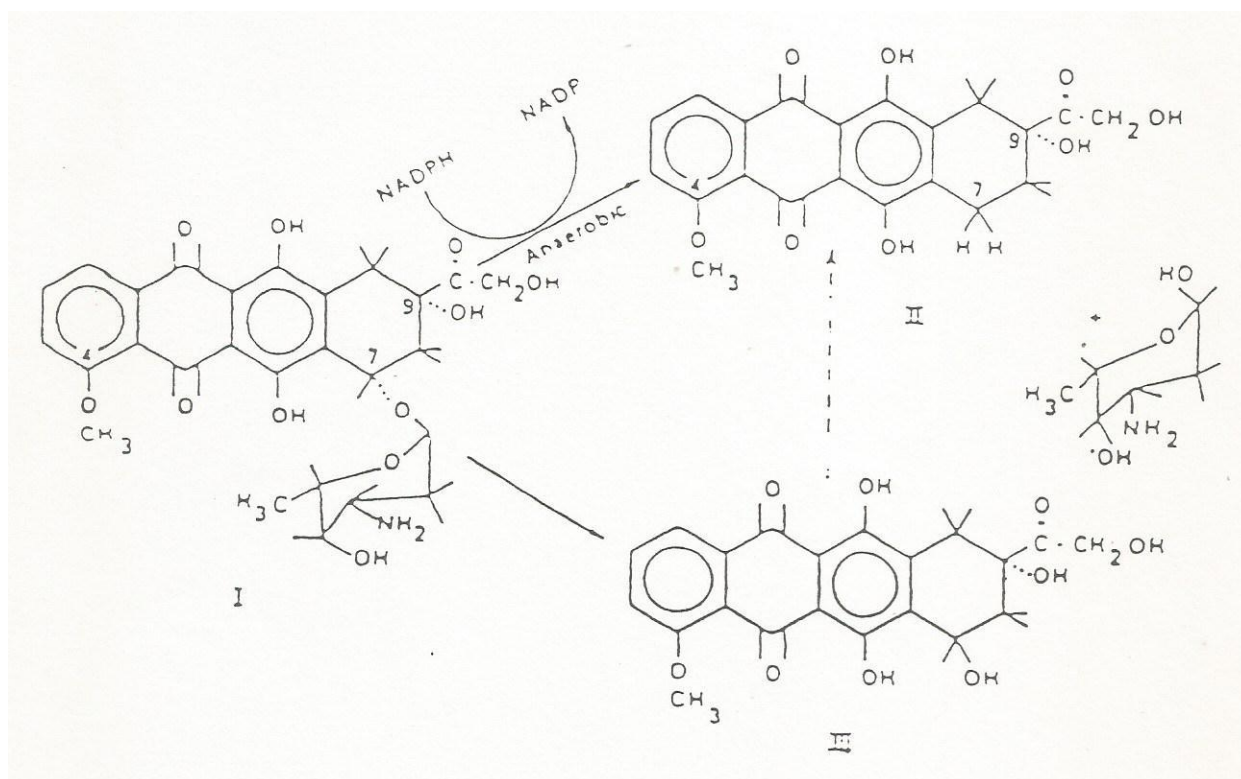


Figure 4 : Dégradation de l'ADM par une glycosidase d'après Bachur et Gee (3).

3. Moyens de lutte contre la résistance

Actuellement, l'étude des mécanismes de résistance aux drogues cytotoxiques s'oriente vers les moyens de lever le phénomène de résistance.

En effet, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs calciques tels que le Verapamil, le diltiazem, la nifedipine, augmente la concentration intracellulaire en drogue et parallèlement sa cytotoxicité (97). L'EDTA et les inhibiteurs de la calmoduline potentialisent également l'action de la drogue.

D'autres composés comme le maléate de perhexiline, le tamoxifène et d'autres analogues triparanols (dans le cas particulier des cellules P388 résistantes) modifient le métabolisme lipidique et sont capables de diminuer la résistance *in vitro*, n'ont pas été toujours suivies d'expérimentations valables en clinique, c'est le cas notamment avec les inhibiteurs calciques.

III. LES COLLAGENES ET LES COLLAGENASES

1. Le collagène

a. Structure du collagène I

La molécule élémentaire de collagène, avant polymérisation est formée de trois polypeptides appelés chaînes α et enroulée en triple hélice, les uns autour des autres (figure 5).

Structure primaire

Ces chaînes α sont des polypeptides constitués d'un enchaînement d'acides aminés unis les uns aux autres par des liaisons peptidiques.

La structure primaire de ces chaînes α est connue pour certains types de collagène, en particulier le type I extrait de peau de veau.

Les chaînes α sont constituées d'une séquence de 1050 acides aminés environ. Chaque chaîne a une masse moléculaire d'environ 95 000.

La connaissance de la séquence des acides aminés a permis de noter quelques points particuliers à la molécule de collagène.

Dans la zone hélicoïdale, il existe un résidu de glycolle tous les trois résidus, de sorte qu'on peut schématiser sa séquence par GLY-X-Y, X et Y représentant les deux autres acides aminés du triplet. Ceci nous permet donc de constater que le glycolle représente environ un tiers des acides aminés.

En position X, on rencontre fréquemment la proline et, en position Y, l'hydroxyproline, acide aminé caractéristique du collagène auquel il sert de marqueur qu'on peut doser dans les liquides biologiques comme index du métabolisme du collagène. La proline et l'hydroxyproline représentent environ 15 à 30% des résidus d'acides aminés.

Parmi les autres acides aminés de ce triplet, on rencontre également l'hydroxylysine. Celle-ci se trouve en position Y.

Les positions X et Y non occupées par la proline, l'hydroxyproline ou l'hydroxylysine le sont par les autres acides aminés. Ces derniers sont présents en moins grande quantité.

On note un taux particulièrement bas en tyrosine et une absence de tryptophane.

La structure cyclique de la proline et de l'hydroxyproline confère à la molécule sa stabilité tandis que la nature compacte du glycolle lui procure sa rigidité.

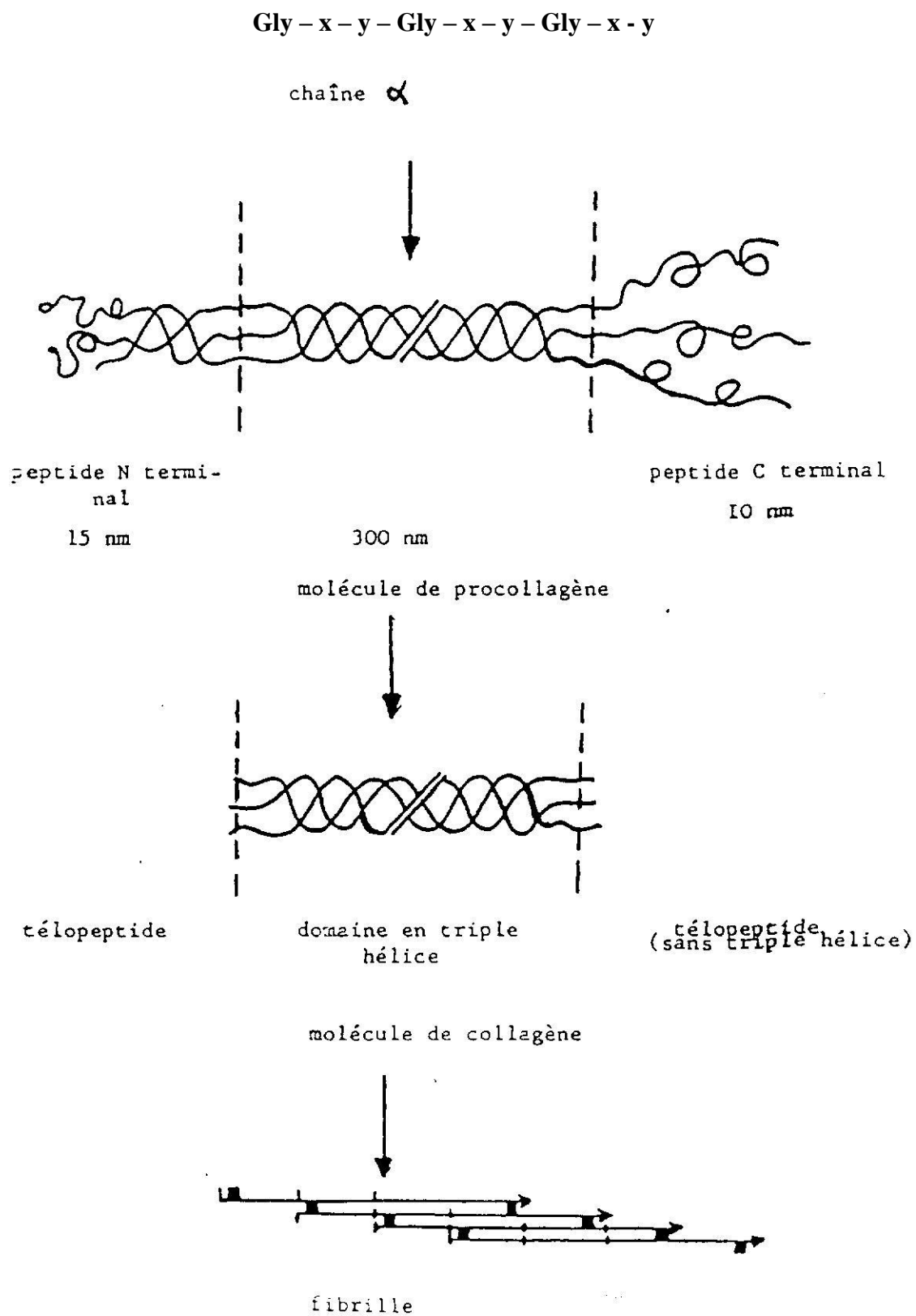


Figure 5 : Structure du collagène

Structures secondaires et tertiaires

Les chaînes α , enroulées sur elles-mêmes en hélice, sont unies entre elles par des liaisons hydrogènes en particulier entre les radicaux hydroxyles des hydroxyprolines. La stabilité de la molécule est ainsi accrue. Sa structure est alors celle d'une triple hélice. Seules les extrémités N et C terminales de la molécule ne sont pas sous forme de triple hélice et sont appelées télépeptides.

Structure quaternaire

Les triples hélices s'assemblent les unes aux autres formant alors des fibrilles et confèrent ainsi aux tissus leur solidité et leur résistance. Cette solidité est due aux liaisons croisées unissant entre elles les molécules de collagènes. Il existe différents types de liaisons croisées. Les plus fréquemment étudiées sont les liaisons formées à partir de la lysine et de l'hydroxylysine.

Glycosylation de la molécule

Comme nous l'avons dit plus haut, la molécule de collagène est une glycoprotéine. Elle comporte, en effet, des résidus glucidiques. Les oses rencontrés sont le galactose et le glucose.

Ceux-ci sont liés aux hydroxylysines, par des liaisons covalentes O. glycosidiques, sous forme de monosaccharides (galactose) ou de disaccharides (glucosyl-galactose).

Le contenu en glucides varie selon les tissus. Les oses semblent se lier préférentiellement aux hydroxylysines situées entre des résidus d'arginine et d'acides aminés hydrophobes (figure 5').

b. Les différents types de collagène

1. Type I : Le premier type de collagène rencontré dans la peau, et appelé type I, est constitué de deux chaînes identiques que l'on nomme $\alpha 1$ et d'une chaîne appelée $\alpha 2$ différente de la première. En effet, ses propriétés physico-chimiques sont distinctes ainsi que sa composition en acides aminés bien que sa masse moléculaire soit identique.

Le type I est rencontré dans la peau adulte, l'os, les tendons, les ligaments, la dentine, les vaisseaux sanguins mais également dans le tissu interstitiel.

Il est donc constitué de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. Sa formule est la suivante :

$\alpha 1(I) \alpha 2(I)$.

Le taux d'hydroxylation de la lysine est de 15% et son contenu en glucides est bas.

2. Type II : On le rencontre dans le cartilage, il est constitué de 3 chaînes identiques entre elles. Sa formule est la suivante : $[\alpha 1 (II)]_3$.

Le taux d'hydroxylation de la lysine est plus élevé : 50%. Toutes les hydroxylysines sont glycosylées.

3. Type III : On le trouve, comme le type I, dans les vaisseaux sanguins, le tissu conjonctif et la peau embryonnaire. Il existe également dans le tractus gastro-intestinal. Il est absent dans l'os et les tendons.
Il est constitué par des chaînes α 1 différentes de celles des types I et II. Sa formule est : $[\alpha 1 \text{ (III)}]_3$. Il contient des résidus de cystéine, ce qui explique la présence dans le type III de ponts disulfure.
Son contenu en hydroxyproline est supérieur à son contenu en proline. On rencontre fréquemment des résidus de glycocholé en position X. Il existe ainsi un taux de glycine plus élevé que dans les autres types. La stabilité de la molécule ainsi diminuée par les glycines est contrebalancée par une augmentation de l'hydroxyproline. Le taux de l'hydroxylation de la lysine est bas : 15%.

4. Le type IV : On le trouve dans les membranes basales. Il est constitué de 3 chaînes dont la structure en triple hélice est souvent interrompue par des zones non hélicoïdales. Ces chaînes α appelées initialement C et D, ont été actuellement identifiées respectivement aux chaînes α 1 (IV) et α 2 (IV) dont la structure primaire diffère de celles des chaînes précédemment décrites.
Le plus souvent, la molécule résulte de l'association de 2 types de chaînes différentes. Sa formule sera alors : $[\alpha \text{ (IV)}]_2 \alpha \text{ (IV)}$. Mais les 3 chaînes constituant le type IV peuvent être identiques. Nous aurons alors une molécule de formule : $[\alpha 1 \text{ (IV)}]_3$ ou $[\alpha 2 \text{ (IV)}]_3$.
Il possède des résidus de cystéine. La plupart des lysines sont hydroxylées et toutes les hydroxylysines sont glycosylées.

5. Le Type V : Isolé pour la première fois du placenta, on le trouve en quantité plus importante dans le muscle. Des examens en immuno-fluorescence ont permis de déterminer sa localisation péricellulaire : sa formule est : $[\alpha 1 \text{ (V)}]_2 \alpha 2 \text{ (V)}$

6. Les autres types de collagène : D'autres types de collagène ont été identifiés récemment (Tableau I).

Tableau I : Les différents types de collagènes d'après Robert et al. (86).

Type	Nombre de chaînes	Organisation du Monomère	Masse Moléculaire	Tissus
I	$\alpha 1$ (I) $\alpha 2$ (I)	$\alpha 1$ (I) ₂ $\alpha 2$ (I)	300.000	Peau, tendon, os ligaments
I Trimère	$\alpha 1$ (I)	$[\alpha 1$ (I)] ₃	300.000	
II	$\alpha 1$ (II)	$[\alpha 1$ (II)] ₃	300.000	Cartilage
III	$\alpha 1$ (III)	$[\alpha 1$ (III)] ₃	300.000	Peau, vaisseaux
IV	$\alpha 1$ (IV) $\alpha 2$ (IV)	$[\alpha 1$ (IV)] ₂ $\alpha 2$ (IV) $[\alpha 1$ (IV)] ₃ $[\alpha 2$ (IV)] ₃	450.000	Lames basales
V	$\alpha 1$ (V) $\alpha 2$ (V) $\alpha 3$ (V) $\alpha 4$ (V)	$[\alpha 1$ (V)] ₂ $\alpha 2$ (V) $\alpha 1$ (V) $\alpha 2$ (V) $\alpha 3$ (V) $[\alpha 1$ (V)] ₃ $[\alpha 3$ (V)] ₃	350.000	Pericellulaire
VI	$\alpha 1$ (VI) $\alpha 2$ (VI) $\alpha 3$ (VI)	$\alpha 1$ (VI) $\alpha 2$ (VI) $\alpha 3$ (VI)	420.000	Vaisseaux
VII	$\alpha 1$ (VII)	$[\alpha 1$ (VII)] ₃	500.000	Fibres d'ancrage dermo-épidermique
VIII	$\alpha 1$ (VIII)	$[\alpha 1$ (VIII)] ₃	180.000	Vaisseaux
IX	$\alpha 1$ (IX)	$\alpha 1$ (IX) $\alpha 2$ (IX) $\alpha 3$ (IX) $\alpha 2$ (IX) $\alpha 3$ (IX)	270.000	Cartilage
X	$\alpha 1$ (X)	$[\alpha 1$ (X)] ₃ (?)	210.000	Cartilage
XI	1 α 2 α 3 α	(1 α 2 α 3 α) (3 α) ₂ 1 α (?) (3 α) ₂ 1 α	300.000	Cartilage

c. Biosynthèse du procollagène (Cas du type I le mieux connu)

1. La biosynthèse s'effectue au niveau des ribosomes par la traduction des acides ribonucléiques (ARN) messagers, codant pour chaque type de chaîne α et dont le but est la synthèse des molécules polypeptidiques.

Cette biosynthèse débute à l'extrémité N. terminale de la protéine et se poursuit vers l'extrémité C. terminale. Les chaînes polypeptidiques synthétisées sont plus longues que les chaînes correspondantes et sont appelées chaînes pro α .

Les 25 premiers acides aminés de l'extrémité N. terminale synthétisée sont hydrophobes et constituent ce que l'on appelle la séquence signal lui permettant de traverser la membrane du réticulum endoplasmique. Après la synthèse peptidique, la chaîne polypeptidique est hydroxylée sur certains résidus de proline et de lysine. Cette étape de la biosynthèse, effectuée avec l'aide de prolyl et lysyl hydroxylases, nécessite des cofacteurs tels que l'acide ascorbique, les ions ferreux, l'acide cétooglutarique, l'oxygène moléculaire.

La glycosylation de la chaîne polypeptidique s'effectue en même temps.

La synthèse des chaînes pro α est alors terminée. Leurs séquences correspondent à celles des chaînes α prolongées de chaque côté d'une séquence d'acides aminés dont le rôle est encore inconnu.

2. L'assemblage des chaînes se fait alors à l'intérieur de la vacuole dite cisterna, avec formation de ponts disulfures au niveau de l'extrémité C terminale et enroulement des trois chaînes en triple hélice.

3. Ensuite s'effectue la translocation intracellulaire. Pendant cette étape, il se produit la glycosylation des zones non hélicoïdales dans le Golgi. Le procollagène est alors excrété hors de la cellule.

4. Le procollagène se transforme en collagène par protéolyse limitée de ses extensions N et C terminales par l'intervention de procollagène peptidases.

Ces peptides terminaux possèdent des régions en triple hélice mais également des résidus de cystéine permettant ainsi la formation de ponts disulfures intra et interchaînes. On y note également la présence de mannose et de N. acétyl glucosamine.

5. Après l'exocytose de la molécule de collagène, il se forme les fibres de collagène et les liaisons croisées. Il s'agit alors de l'assemblage moléculaire après désamination oxydative des groupements aminés de certains résidus de lysine par l'intermédiaire d'une enzyme : la lysine sous la dépendance des ions cuivriques et de pyridoxal phosphate. Il se forme alors une liaison croisée entre les deux subunités. La biosynthèse du collagène est schématisée par la figure 5'.

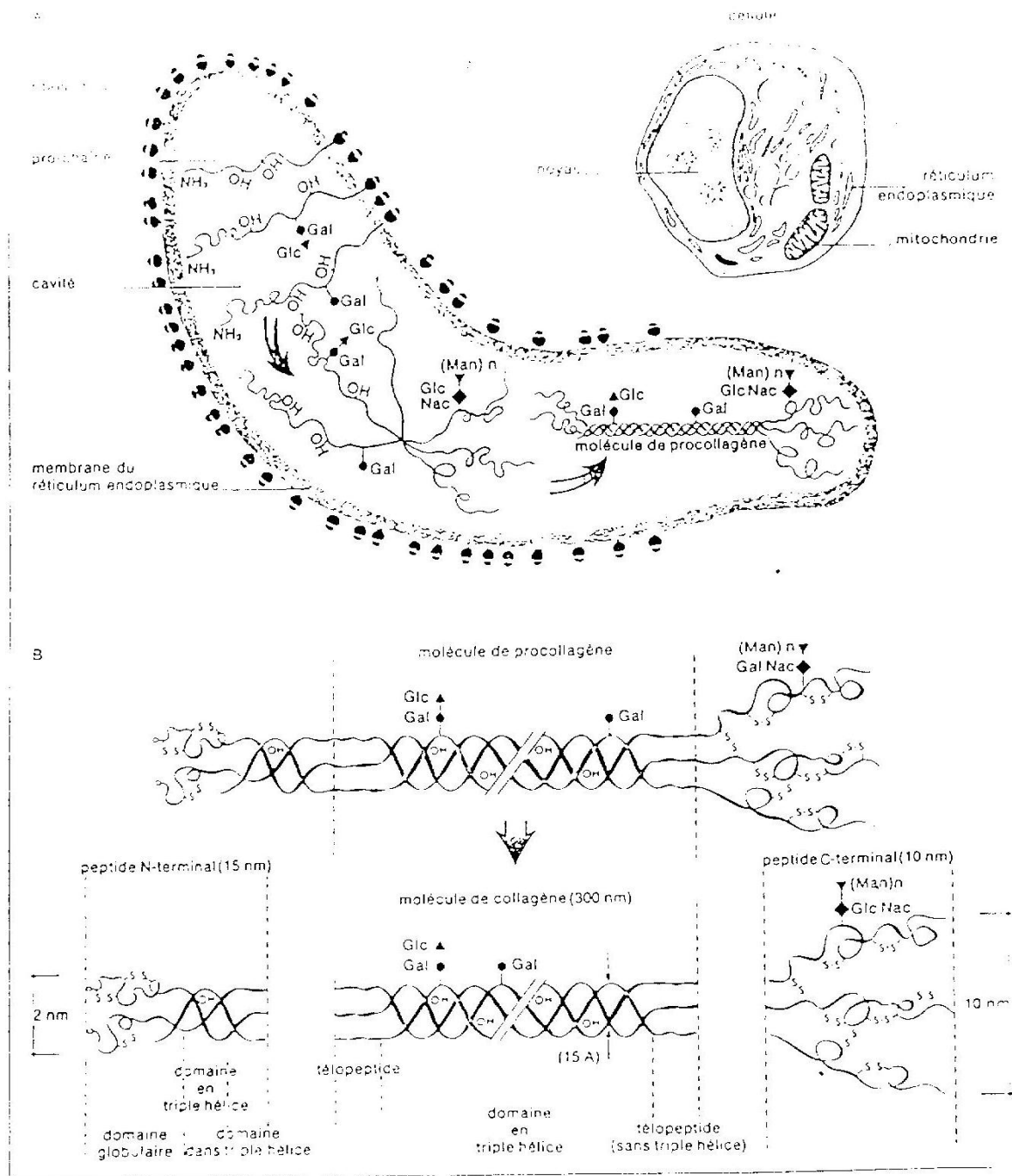


Figure 5² : Biosynthèse du collagène

- Cellule avec ses organites et le lieu de synthèse du collagène : les ribosomes et une cavité du réticulum endoplasmique.
- Structure des molécules de procollagène et de collagène.

d) Catabolisme (Figure 6 et 7)

Les enzymes chargées de cliver la molécule de collagène sont appelées collagénases. Ensuite interviennent des enzymes non spécifiques qui dégradent les produits issus de la lyse primaire, en fragments de masse moléculaire plus faible. Tant que les fibres de collagène ne sont pas dénaturées, les protéases ordinaires n'agissent pas (12).

1. Les collagénases

a) Structure des collagénases

– Collagénases de type Clostridial

Elles ont la propriété de dégrader le collagène en très petits fragments, essentiellement des di ou tri peptides. Elles reconnaissent la séquence pro – X – gly – pro - Y et le clivage se fait entre X et Y.

– Collagénases type queue de têtard dites de mammifères.

Elles clivent les sous-unités de tropocollagène en un point situé à l'union des $\frac{3}{4}$ N. terminaux et du $\frac{1}{4}$ C. terminal, sur des liaisons spécifiques gly - ileu pour les chaînes 1 et gly - leu pour 2. Elles interviennent dans divers processus normaux (33) comme l'ovulation, l'implantation utérine de l'œuf et pathologiques tels que : l'inflammation (72), l'arthrite rhumatoïde (81), le R.D.E.B. (Recessive Dystrophie Epidermolysis Bullosa) (7) et le pouvoir invasif tumoral (57).

Jusqu'en 1959, seule l'existence d'une collagénase a été décrite chez *Clostridium histolyticum* (90). C'est seulement en 1962 que Gross et Lapierre (34) isolent la première collagénase de vertébrés à partir du milieu de culture de tissus de têtards.

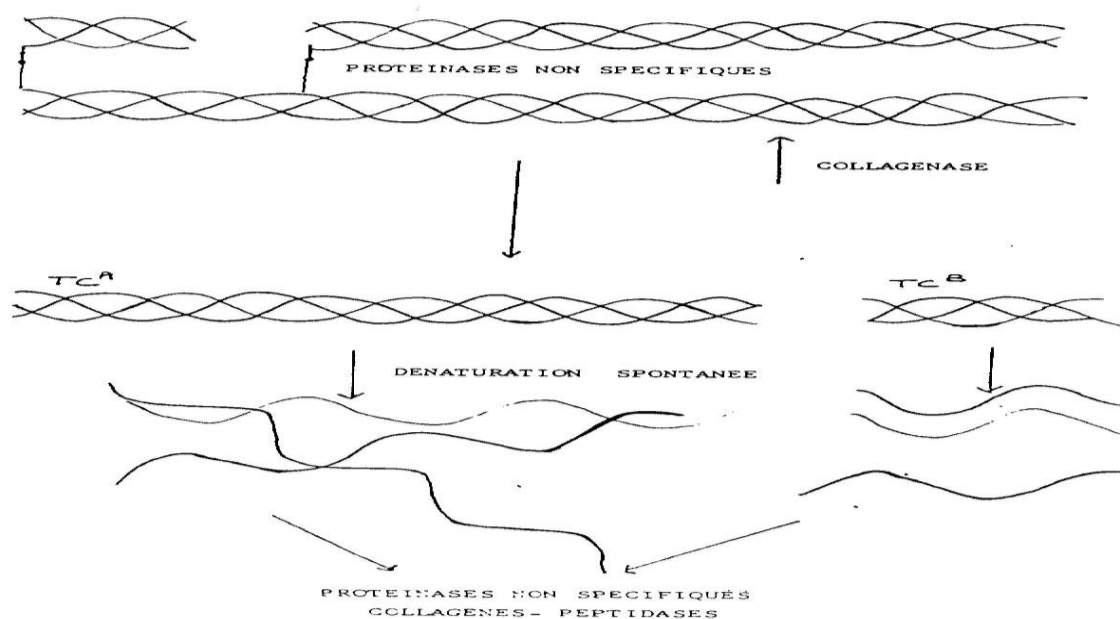


Figure 6 : Catabolisme du collagène.

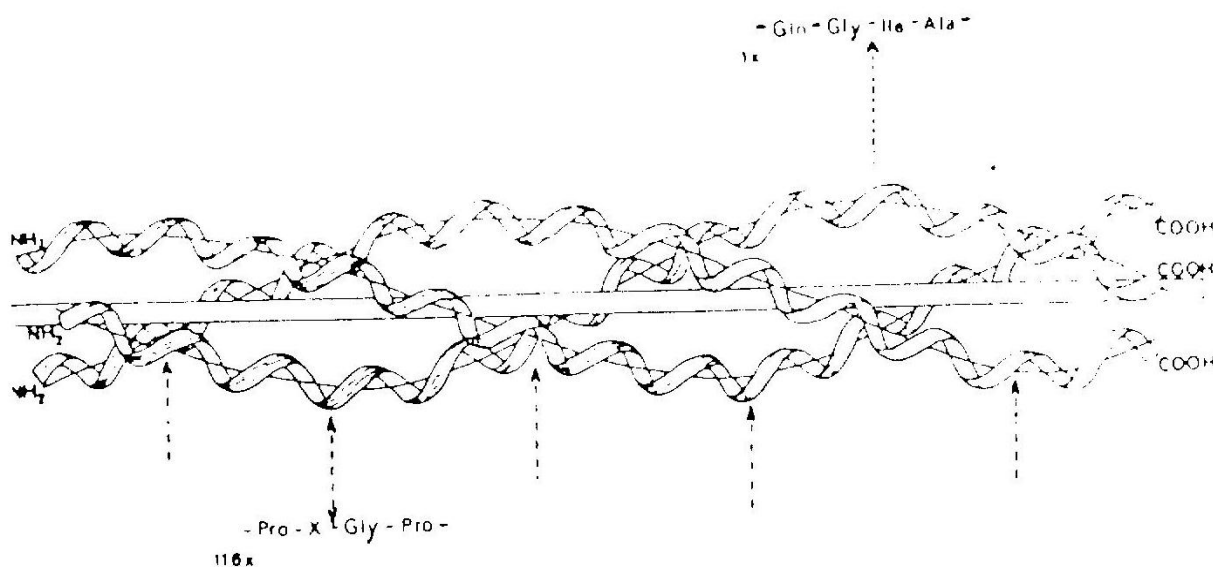


Figure 7 : Coupure unique du collagène type I par la collagénase de vertébrés (au-dessus de la triple hélice) et coupure multiples par la collagénase bactérienne (au-dessous).

Depuis, de nombreux travaux ont démontré qu'un grand nombre de tissus comme la peau, l'utérus, le cartilage (36) et les cellules qui en dérivent, telles que les fibroblastes, les chondrocytes (101 - 31), synthétisent et secrètent des collagénases quand ils sont mis en culture.

L'activité collagénolytique a été également mise en évidence dans des milieux de culture de néoplasmes (23) soit directement à partir d'extraits tumoraux animaux (91) ou humains (38).

L'existence d'une collagénase capable de dégrader le collagène non dénaturé à partir d'homogénats de granulocytes normaux a été montrée par Lazarus et ses collaborateurs en 1968 (54).

D'autres travaux ont suivi, démontrant la présence dans les granulocytes de patients atteints de diverses affections hépatiques comme l'hépatite active chronique, la cirrhose du foie (41). Récemment, Kao et Stern (45) ont rapporté que les lignées cellulaires des carcinomes mammaires possédaient une activité collagénolytique.

b) Propriétés des collagénases

Les collagénases sont des métalloprotéases (Ca-Zn), activées à pH neutre.

- Spécificité

La grande majorité des études sur la spécificité des collagénases a été réalisée sur le collagène de type I. Les travaux de Liotta (58) ont montré qu'il existait des collagénases dégradant

préférentiellement le collagène de type IV du réseau réticulé des membranes basales, notamment dans les cellules cancéreuses.

pH optimum

Suivant leur origine, les collagénases ont leur pH optimum d'activité à température physiologique entre 6 et 9,5, par exemple le pH optimum de la collagénase de fibroblastes humains est compris entre 7,5 et 9 (101) ; celui des granulocytes entre 7,6 et 7,8 (80).

- Masse moléculaire

L'hétérogénéité des collagénases se retrouve également dans la masse moléculaire, par exemple Ohlsson et Ohlsson (79) ont déterminé que la procollagénase des granulocytes humains a une masse moléculaire de 76.000 et est composée de deux sous-unités de masse moléculaire 42.000 et 33.000 alors que celle de la peau humaine a une masse moléculaire de 60.000 (49) ;

- Activation et inhibition de la collagénase

Les collagénases sont secrétées sous forme latente (proenzyme) ce qui implique qu'elles doivent être activées. Parmi les nombreux activateurs connus, (fluide synovial rhumatoïde) (35), le milieu de culture de peau de têtard, cathepsine B et G (61). Il est possible que la plasmine activée par l'activateur de la plasmine (PA) ait, in vivo un rôle important (16).

In vitro, les activateurs les plus utilisés sont la trypsine (6) et les composés organiques mercuriels tels que : l'acétate de 4aminophénylmercurique (84), le p. chloromercuribenzoate (67).

La notion de collagénase latente, sous forme de complexe enzyme / inhibiteur, correspond à la présence d'inhibiteurs sériques (87).

- L' α 2 macroglobuline (α 2 M) non spécifique de la collagénase. Le β anticollagénase (β AC), spécifique de la collagénase.
- Des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases comme le (TIMP) (tissue inhibitor of metalloprotéinases) sont aussi présents dans la synoviale, lez cartilage et l'os (107).
- In vitro, les collagénases sont inhibées par l'EDTA, le dithiothréitol, la L-leucine, le 1. 10 phénanthroline et les protéines du sérum (16). L'inhibition par l'EDTA est réversible après dialyse contre une solution de CaCl₂ (70).

2. Rôle des collagenases dans le pouvoir invasif tumoral

a) Les stades de l'extension

L.A. Liotta et son équipe (60) ont montré qu'il existe une relation entre l'activité collagénolytique et l'invasion tumorale. Il distingue plusieurs étapes au cours de l'invasion métastatique d'une membrane basale.

- La première étape est l'attachement de la cellule tumorale à la basale. Il correspond à la fixation sur la laminine (protéine caractéristique des membranes basales) de la membrane

basale sous endothéliale des cellules tumorales qui expriment un récepteur pour cette laminine. Ce récepteur a été isolé et purifié sur colonne de laminine à partir de cellules en culture issues d'une tumeur du sein. Son poids moléculaire est d'environ 70.000 D.

L'affinité de la laminine pour ce récepteur est élevée, de l'ordre de 10^{-9} M. Des anticorps monoclonaux antirécepteurs ont été préparés et l'un d'eux semble spécifique du site de liaison à la laminine. Cet anticorps bloque in vitro l'attachement des cellules tumorales à une basale humaine.

Chez l'animal, un fragment de laminine reconnu par cet anticorps inhibe le développement de colonies pulmonaires après injection intraveineuse de cellules tumorales colonisantes. Une étude préliminaire réalisée sur plusieurs tumeurs du sein suggère que la densité du récepteur sur les cellules tumorales est corrélée à l'envahissement ganglionnaire.

- La dissolution de la membrane basale constitue la deuxième étape. Elle est médiée en partie par une collagénase IV, de masse moléculaire voisine de 70.000 D (la collagénase IV est la seule capable de dégrader le collagène de type IV spécifique des membranes basales). Une autre enzyme importante est l'héparanase.
- La troisième étape est le déplacement de la cellule métastatique à travers une basale dégradée. Cette locomotion serait, selon L.A. Liotta, lié à un facteur autocrine de mobilité de masse moléculaire 50.000 D qu'il a isolé. Ce facteur augmente *in vitro* l'invasivité de cellules tumorales.

b) Collagénase et métastase

Leur rôle in vivo a été confirmé par des études en microscopie électronique et en immunofluorescence (104-105).

Grâce aux travaux de Liotta (57), on sait que les cellules tumorales ont une collagénase qui paraît plus spécifique du collagène de type IV, celui de la membrane basale qui fait barrière à l'invasion tumorale et de nombreux auteurs ont mis en évidence la relation existant entre le pouvoir métastasant d'une tumeur et son activité collagénolytique (28). Ceci n'est toutefois pas une règle générale car dans les carcinomes pulmonaires de LEWIS et les sarcomes T 10 hautement métastatiques et non métastatiques respectivement, aucune corrélation n'existe entre l'activité dégradative et le pouvoir métastasant (27).

Si les études en immunofluorescence ont permis de localiser la collagénase au niveau des sites d'extension de la tumeur (105), elles n'ont pas permis toujours d'identifier la cellule responsable de la sécrétion : cellule tumorale en voie de migration, fibroblastes de l'hôte, ou macrophage ? de même les facteurs activant la production de collagénase ne sont pas connus.

On a montré qu'*in vitro* l'activité collagénolytique est augmentée par l'addition d'héparine (107) ou de colchicine (37) et que la production de collagénase dans les cancers du sein est oestrogénodépendante (39).

In vivo, il est probable que des facteurs généraux humoraux agissent (9), ainsi que des facteurs locaux de microenvironnement qui expliqueraient l'hétérogénéité de production de collagénase par les tumeurs, parmi lesquels interviendraient les macrophages et les lymphocytes qui infiltrent les tissus tumoraux (105). Un facteur stimulant la sécrétion de collagénase et de prostaglandines par les cellules synoviales (20) a été mis en évidence dans les cellules mononucléées sanguines.

c) Enzymes associées aux collagénases

- Dans le cas du collagène I, les peptides TCA et TCB issues de l'attaque du collagène par la collagénase sont ensuite dégradés par des protéases neutres ou phagocytés et détruits par les enzymes lysosomiales (61).
- Sur le collagène dénaturé, agissent les gélatinases dont il existe un représentant dans les polynucléaires et dans l'os. Cette enzyme peut agir en synergie avec une collagénase (76 bis).
- D'autres enzymes sont capables de dégrader les protéoglycannes, constituants principaux avec le collagène, de la matrice extracellulaire, c'est le cas en particulier de l'héparanase (98) et de la stromélysine (18 bis). On a aussi mis en évidence :
 - ❖ La cathepsine B qui dégrade les collagènes insolubles de type I et II provenant respectivement du tendon d'Achille de bœuf et du cartilage à pH 7 (103). En plus de son action directe sur le collagène, elle contribue également à la collagénolyse par sa capacité d'activer la collagénase latente (24).

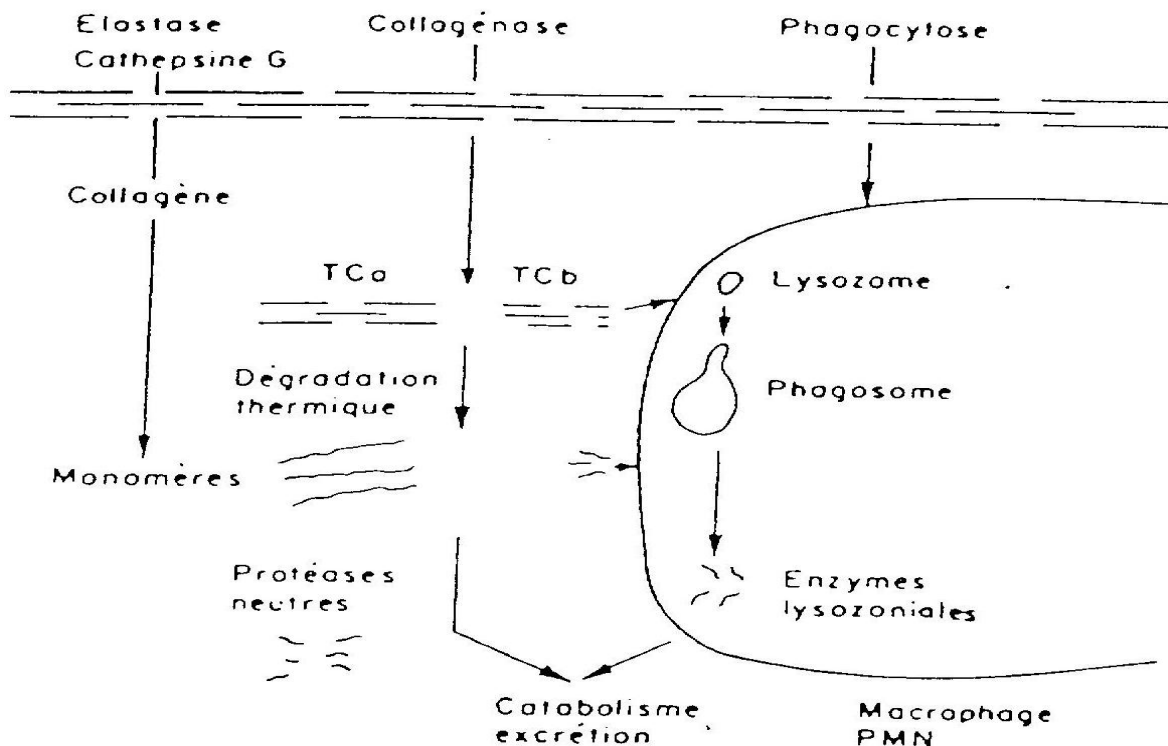


Figure 8 : Catabolisme du collagène par la collagénase et d'autres enzymes d'après Loyau *et al.* (61).

- ❖ L'élastase et la cathepsine G produites par les polymorphonucléaires sont également capables de dégrader le collagène natif à pH neutre (36).
- L'élastase attaque le collagène de type II et le collagène des membranes basales.
- La cathepsine G a une activité sur le collagène de type II.

Ces 2 enzymes sont capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire.

- a) La stromélysine, enzyme qui attaque le collagène de type IV, V, l'élastine, les glycoprotéines, la caséine et la fibronectine.
- b) La thrombine dégrade collagène de type V.
- c) Les cellules transformées possèdent une enzyme activateur de plasminogène (PA) capable de convertir ce plasminogène en plasmine (104). Cette plasmine activée transforme la procollagénase en collagénase capable d'hydrolyser le collagène.

En conclusion, les collagénases provoquent la fragmentation des collagènes polymères, permettant à des enzymes non spécifiques de libérer des acides aminés (Figure 8).

Tout au long de notre travail nous distinguerons une collagénase vraie des enzymes correspondant à une activité collagénolytique.

Dans le premier cas, ce terme doit être réservé à des enzymes purifiées agissent spécifiquement sur du collagène fibrillaire. L'exemple en est la collagénase de mammifère qui dégrade le collagène de type I en fragments TC^A et TC^B.

Dans le deuxième cas il s'agit d'un ensemble de protéase qui renferment au moins une enzyme capable d'initier la dégradation d'autres protéases. Dans ce cas l'activité collagénolytique est la résultante de plusieurs enzymes. C'est cet aspect que nous avons étudié dans nos cultures cellulaires.

IV. MECANISME D'ACTION DES ANTI-OESTROGENES

Un anti-œstrogène est un composé qui inhibe spécifiquement les effets des œstrogènes dans un tissu cible.

Les anti-œstrogènes agissent principalement dans les cellules sensibles aux œstrogènes (RE⁺) (cellules mammaires, utérines, vaginales, hypothalamohypophysaire), en bloquant leur action au niveau des sites récepteurs. Plus récemment, il a été montré que les anti-œstrogènes se lient également à une protéine distincte des récepteurs d'œstrogènes contenue dans la fraction microsomale des cellules cibles et même dans certaines lignées de

cellules tumorales qui ne sont pas des cibles pour les oestrogènes (93). On désigne cette protéine par le nom de protéine de liaison des anti-oestrogènes (AEBS). Par exemple, le Txf se lie avec une grande affinité à des récepteurs non reconnus par les oestrogènes (13-89). L'existence des récepteurs spécifiques du Txf pourrait alors expliquer son action sur les cellules des lignées qui n'ont pas de récepteurs d'oestrogènes (RE⁻).

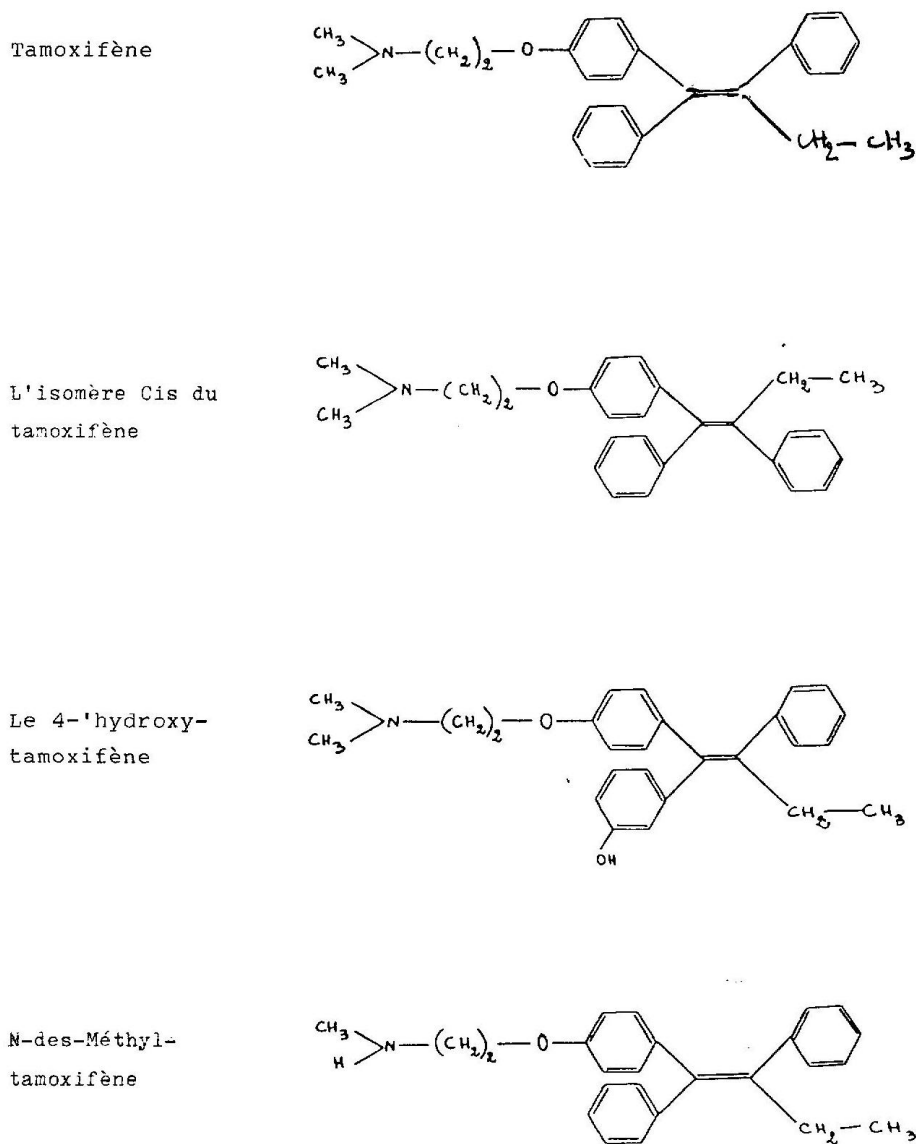


Figure 9 :

MODE D'ACTION AU NIVEAU CELLULAIRE : Cas du Tamoxifène (Txf)

Au niveau de la cellule cancéreuse, le Txf entre en compétition avec l'estradiol E. Il va venir se fixer sur les récepteurs d'oestrogènes RE contenus dans le cytoplasme, mais l'activation

nucléaire ne se produit pas. Il en résulte une inhibition de la prolifération maligne des cellules hormonodépendantes. Cette fixation est spécifique mais réversible.

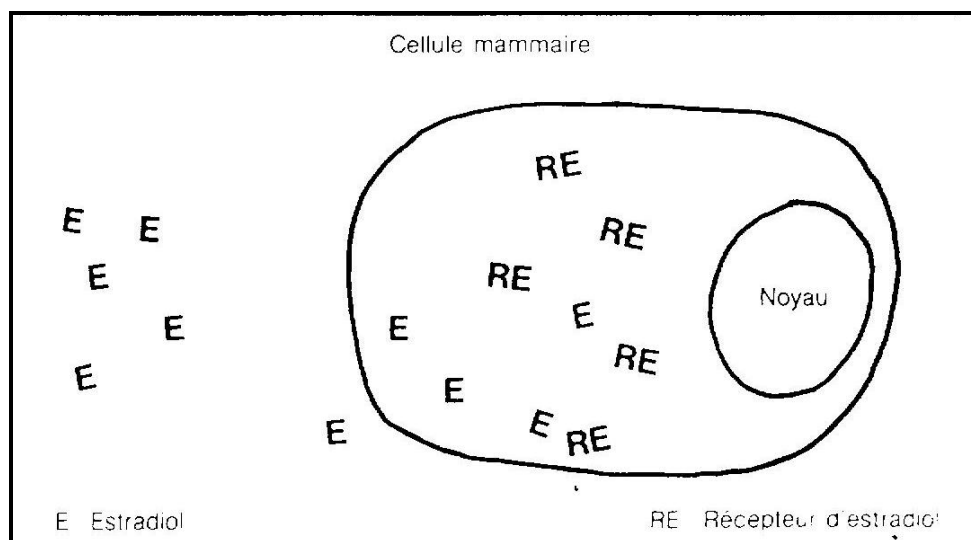


Figure 10 : mécanisme d'action à l'échelle cellulaire

1. Compétition entre le Txf et l'œstradiol pour la fixation aux récepteurs d'œstradiol.

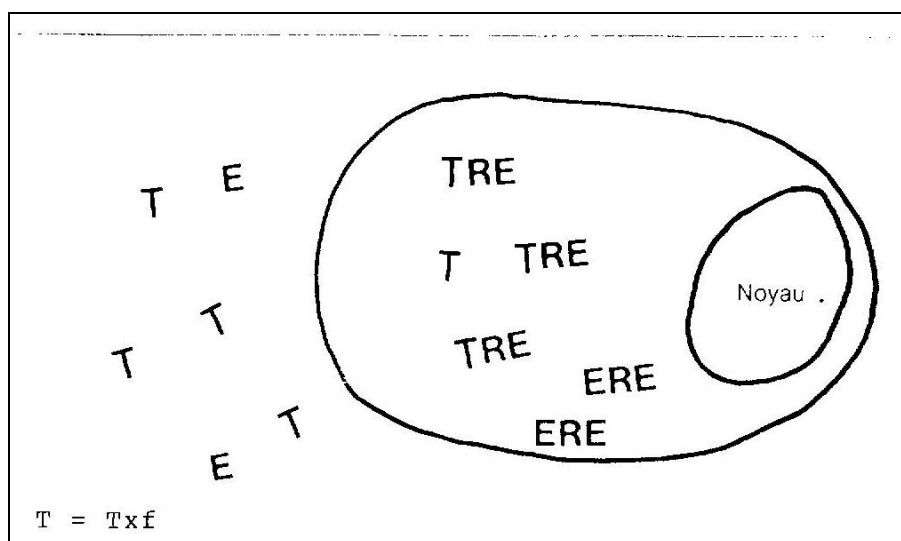


Figure 11 : la molécule de Txf traverse la membrane cellulaire et vient se fixer sur les récepteurs d'œstradiol libres dans le cytoplasme pour former avec eux un complexe Txf-

récepteur d'estradiol. Elle empêche ainsi les molécules d'estradiol de venir se lier sur leurs propres récepteurs cytoplasmiques.

2. Translocation

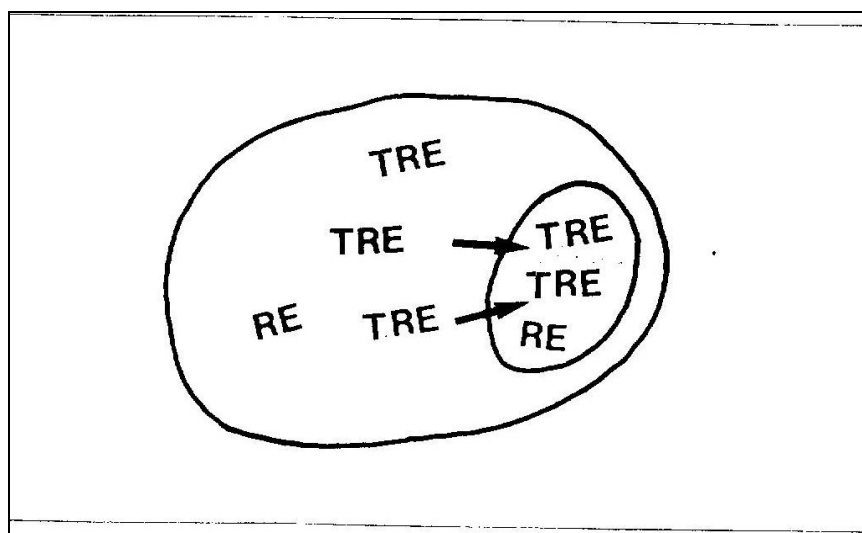


Figure 12 : ce complexe Txf-récepteur "activé" est alors soumis à une "translocation" (pénétration dans le noyau à travers la membrane nucléaire).

3. Conséquences

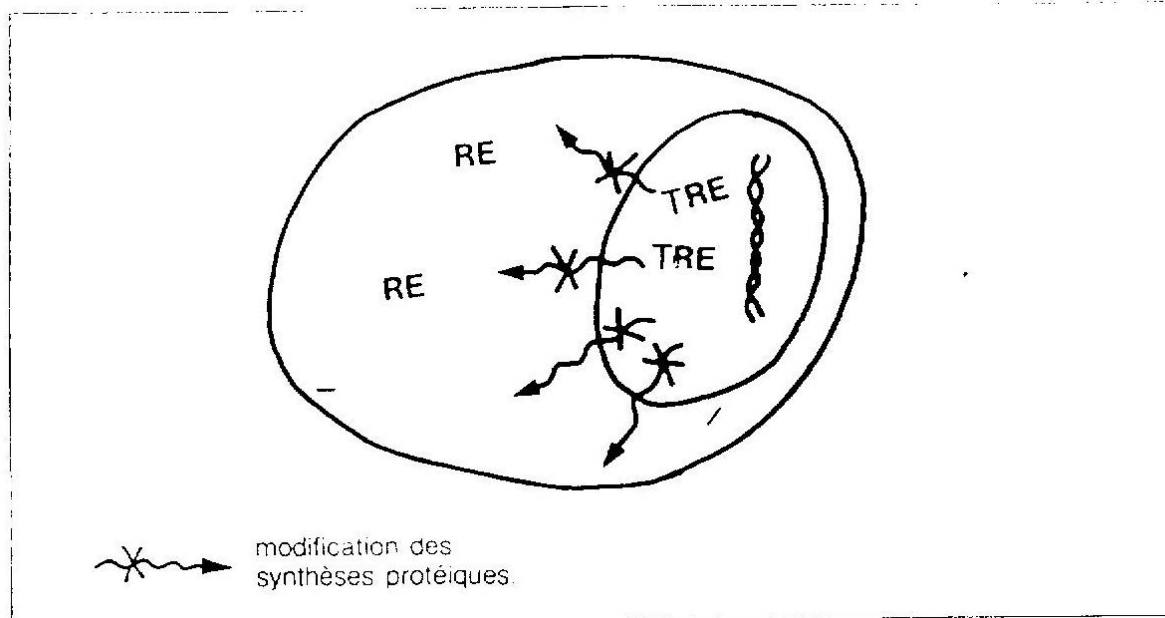


Figure 13 : au niveau de la cellule hormonodépendante, il en résulte une modification dans les synthèses protéiques qui ne s'effectuent plus normalement, entraînant :

- un arrêt de la division cellulaire ;

- la mort cellulaire.

La synthèse des protéines cellulaires stimulée physiologiquement par l'œstradiol est perturbée lorsque les récepteurs sont occupés par le Txf.

Activités du tamoxifène

Parmi tous les médicaments utilisés pour leur action anti-œstrogène dans l'hormonothérapie des cancers, principalement du sein, c'est le Tamoxifène (ou Nolvadex^R) qui est le plus largement prescrit.

Il est utilisé sous forme de citrate (figure 9). Il appartient à la famille des triphenyléthylènes. C'est l'isomère trans du N,N-déméthyl (diphényl-1,2 butane-1 yl-1)-4 phénoxyéthylamine.

Il est métabolisé en un dérivé hydroxylé et un dérivé déméthylé qui ont une activité anti-œstrogénique. L'isomère cis est une impureté de la synthèse, il a une activité œstrogénique.

L'activité biologique du Txf qui a été jusqu'à présent la plus analysée et qui est à l'origine de son utilisation dans le traitement des tumeurs est celle qui s'exerce au niveau des cellules cibles des œstrogènes contenus dans ces cellules. Dans les cellules cibles cancéreuses, le Txf peut entraîner :

- Une inhibition compétitive de la liaison de l'œstradiol avec les récepteurs œstrogéniques cytoplasmiques.
- Une stimulation de la synthèse des récepteurs de la progestérone.

Ainsi s'explique :

- Le blocage de la prolifération des cellules malignes.
- La diminution de la croissance de la tumeur cancéreuse et des métastases éventuellement présentes.

MATERIEL ET METHODES

1- Cultures cellulaires

1.1- Les cellules

- La lignée cellulaire humaine K562 a été isolée par LOZZIO et LOZZIO (66) à partir du liquide pleural d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique en crise blastique aigüe.

La souche de cellules K562 a été fournie par le professeur ZAGURY de l'Institut Jean Godinot à Reims.

- Les clones dérivant des cellules K562 (clone G et 19) ont été isolés par micromanipulation après clonage des K562 formant des rosettes EA (106) qui permettent de mettre en évidence les cellules possédant les récepteurs pour les IgG à la surface cellulaire.
- Les cellules leucémiques promyélocyaires humaines, HL60 proviennent du Laboratoire d'Hématologie de l'Institut Jean Godinot de Reims et ont été données par le Professeur DUFER.
- Les granulocytes et les lymphocytes sont obtenus à partir du sang hépariné de donneurs volontaires. Ils sont préparés selon la méthode de Böyum (14).

1.2- Composition des milieux de culture

- Les cellules k 562 et les clones (G et 19)

Ils sont entretenus en suspension dans le milieu (DMEM) (Gibco) contenant :

- 5,5 mmol/l de glucose
2 mmol/l de L-glutamine
26,2 mmol/l de bicarbonate de sodium
- Les antibiotiques :
500 000u/l de pénicilline (SPECIA)
40 mg/l de streptomycine (SARBACH)
50 mg/l de kanamycine (THERAPLIX)
3 mg/l de fungizone (SQUIBB) et additionné de 10% de sérum de veau foetal préalablement décomplémenté à 56° c pendant 30 minutes.
- La lignée promyélocytaire humaine

Les HL60 sont maintenues dans le milieu RPMI-1640 (seromed) additionné de :

- 10% de sérum de veau foetal décomplémenté à 56° c pendant 30 minutes.
- 3 mg/l de fungizone.

- Streptomycine à 40 mg/l.
- Glutamine à 2 mM.

1.3- Milieu synthétique

Pour étudier l'activité collagénolytique extracellulaire, les cellules k 562 sont entretenues dans du milieu synthétique parce que nous avons montré que le sérum de veau fœtal inhibait l'activité.

Sa composition est la suivante :

- Milieu (DMEM)
- Les antibiotiques :
 - Penicilline 500 000u/l
 - Streptomycine 40 mg/l
 - Kanamycine 50 mg/l
 - Fungizone 3 mg/l et
- 4% de sérum artificiel Ultrosor (IBF).

1.4- Conditions de culture

Les cellules sont cultivées en flacons NUNC dans une étuve à 37° C, saturée en atmosphère humide et contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Les manipulations s'effectuent stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical. Les cellules k 562 sontensemencées à une concentration de 5 x 10⁴/ml. Elles sont changées quand elles atteignent 600 000 cellules/ml.

1.5- Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules est déterminée par numération des cellules sur un hématimètre de Malassez au microscope optique à contraste de phase. Les cellules vivantes sont rondes et réfringentes alors que les cellules mortes apparaissent sombres ou noires.

1.6- Préparation des granulocytes et lymphocytes

3 ml de dextran T 250 à 5% dans du sérum physiologique sont ajoutés à 10 ml de sang humain hépariné. Après 30 min à 37° c, le sérum contenant les polynucléaires et les mononucléaires est récupéré, lavé 1 fois au PBS et on dépose délicatement 4 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Les cellules sont centrifugées à 650 g pendant 15 minutes à 4° c. On obtient un culot contenant les polynucléaires et un anneau à l'interface Ficoll-tampon PBS qui contient les lymphocytes.

La fraction des cellules mononuclées est recueillie par aspiration à l'aide d'une pipette pasteur, et lavée 2 fois au PBS.

- Le lavage, centrifugation à 400 g pendant 10 min, à 4° C.
- 2^{ème} lavage, centrifugation à 200 g pendant 7 min, à 4° C.

Le culot est remis en suspension dans 1 l de PBS et le nombre de lymphocytes est évalué.

Le culot contenant les polynucléaires est lavé 2 fois au PBS.

- Le lavage, centrifugation à 450 g pendant 5 min, à 4°C.
- 2^{ème} lavage, centrifugation à 300 g pendant 5 min, à 4°C.

Les globules blancs sont ensuite repris par 1 ml de tampon PBS et numérés.

2- Effecteurs pharmacologiques

2.1- L'hémine

Structure chimique (figure 14)

L'hémine d'origine équine (sigma), est utilisée comme inducteur type de la différenciation érythroïde des cellules k 562 (11). Sa structure de base est constituée par un noyau porphyrinique.

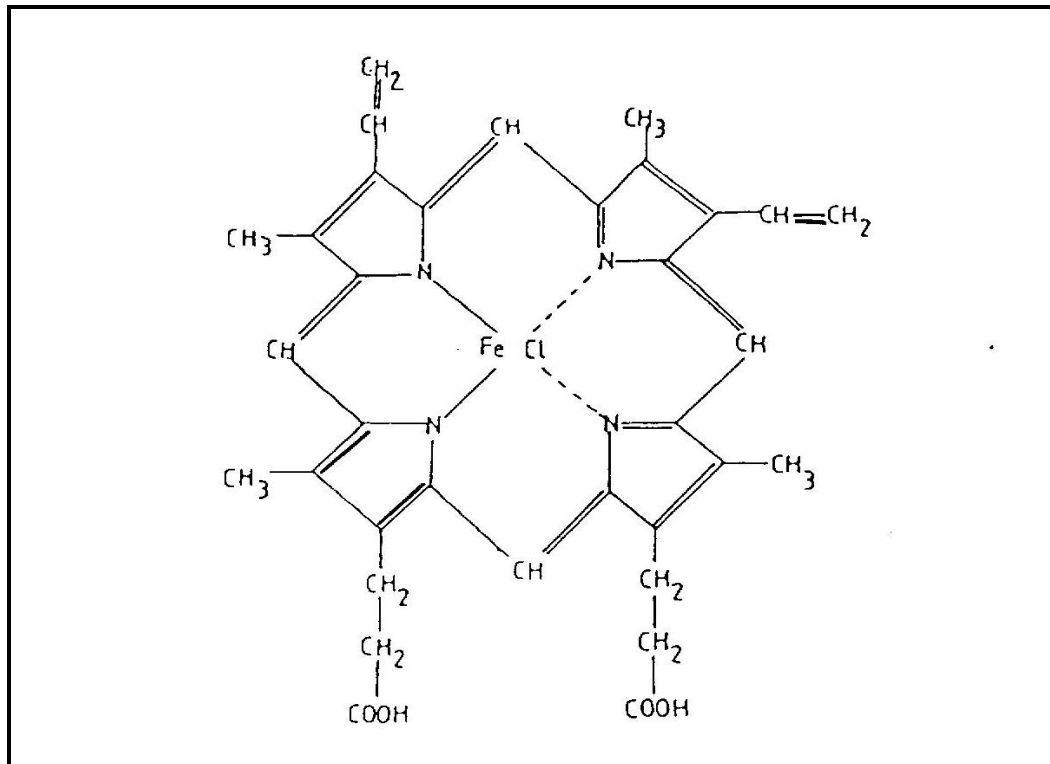


Figure 14 : structure de l'hémine.

Préparation

Une solution mère d'hémine 1 mmol/l est préparée par dissolution de 19 mg d'hémine dans 10 ml d'eau distillée et 100 µl de NaOH de 0,5 mol/l. après agitation pendant 1 heure puis addition de 15 ml de tampon PBS (Mérieux) à pH 7,4, la solution est soumise à une filtration stérilisante sur filtre Millipore 0,22 µ et répartie en aliquotes de 1 ml puis conservée à - 20° C. dans ces conditions, l'hémine est établie.

Dans toutes nos expériences, l'hémine est utilisée à la concentration finale de 30 µ moles/l. Cette concentration induit un processus de différenciation maximal sans affecter la croissance et la viabilité cellulaires (43).

Action différenciante

La différenciation érythroïde des cellules K562 par l'hémine est obtenue comme suit :

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont mises en suspension dans du milieu neuf à la concentration de 5×10^4 cellules/ml et incubées pendant 3 à 4 jours avec l'hémine de façon à avoir une concentration finale de 30 µmol/l. La synthèse d'hémoglobine est mise en évidence par le test de coloration à la benzidine, spécifique de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine.

Protocole

Dans un tube à essai contenant 1×10^6 cellules en culot, on ajoute 100 µl de NaCl à 9 g/l et 50 µl d'une solution de benzidine.

Après 30 minutes à la température ambiante et à l'obscurité, le pourcentage de cellules benzidine-positives (cytoplasme coloré en bleu) est déterminé sur 200 cellules.

Solution de benzidine (à préparer extemporanément)

- 1 ml d'une solution stock de benzidine à 0,2 % dans l'acide acétique 0,5 mol/l.
- 20 µl d'H₂O₂ à 110 volumes.

2.2- L'adriamycine

La structure chimique

L'adriamycine (ADM) ou doxorubicine, est commercialisée sous le nom d'Adriblastine (Lab. Roger Bellon). Les caractéristiques ont été exposées précédemment.

Préparation

Nous avons utilisé une solution mère d'ADM à 10^{-3} mol/l obtenue en dissolvant 10 mg de chlorhydrate d'adriamycine dans 17,2 ml de NaCl à 9 g/l stérile. Cette solution se conserve congelée à -20°C . Par dilutions successives dans un milieu de culture avec SVF 10%, nous avons obtenu les concentrations désirées à savoir 10, 20, 40 mmol/l dans les flacons de culture ensemencées avec 200 000 cellules/ml.

2.3- Le tamoxifène

Structure chimique

Le tamoxifène ou Nolvadex (ICI Pharma) a été décrit précédemment.

Préparation

Les solutions mères du tamoxifène et de ses métabolites sont préparées à 10^{-2} M en dissolvant :

- 112 mg de citrate de tamoxifène dans 10 ml d'éthanol absolu,
- 77,6 mg de 4-OH-Txf dans 10 ml d'éthanol absolu,
- 78,7 mg de d-MeTxf dans 10 ml d'éthanol absolu,
- 74,2 mg de cisTxf dans 10 ml d'éthanol absolu.

Par dissolutions successives de la solution mère dans du milieu de Eagle Dulbecco additionnée de 10% de sérum de veau fœtal, nous avons obtenu les concentrations désirées : 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M et 10^{-8} M.

Toutes ces opérations se font à l'obscurité.

3- Préparation des extraits enzymatiques intracellulaires

3.1- Réactifs

- Tampon d'homogénéisation – tampon (1)
 - Tris-HCl pH 7,5 50 mmol/l
 - NaCl 150 mmol/l
 - CaCl_2 10 mmol/l
 - PMSF 1 mmol/l
- Tampon de lyse – tampon (2)
 - Tris-HCl pH 7,5 50 mmol/l

- NaCl 150 mmol/l
- CaCl₂ 10 mmol/l
- PMSF 1 mmol/l
- Triton X 100 (v/v) 1%

3.2- Extrait enzymatique intracellulaire total

Pour déterminer l'activité collagénolytique totale, les lysats cellulaires sont préparés en mettant en suspension dans le tampon de lyse (tampon (2)) à raison de 1×10^5 cellules par μ l, les cellules lavées 3 fois au PBS. Après 3 cycles de congélation-décongélation, le lysat cellulaire est centrifugé à 12 000 g pendant 15 min à 4° C. Le surnageant représente l'extrait total.

3.3- Extrait cytoplasmique

La fraction cytoplasmique est extraite de la même manière que l'extrait total, excepté que le tampon de lyse ne contient pas de Triton. Le lysat cellulaire est centrifugé à 100 000 g pendant 60 min à 4°C.

Après 3 lavages au PBS, les cellules en phase exponentielle de croissance sont homogénéisées dans le tampon (1) puis congelées 3 fois. Elles sont ensuite centrifugées à 100 000 g pendant 60 min à 4°C. Le surnageant est recueilli, il sert à la mesure de l'activité de la fraction cytoplasmique.

3.4- Extrait membranaire

Pour l'extrait membranaire, le culot cellulaire obtenu précédemment est remis en suspension dans le même tampon additionné de 1% de Triton X-100 et ensuite centrifugé à 100 000 g pendant 60 min à 4°C. Le surnageant obtenu sert à évaluer l'activité collagénolytique membranaire.

3.5- Extrait extracellulaire

L'extrait enzymatique est préparé suivant la technique de Werb et Burleigh (100).

Les cellules K562 sont entretenues dans du milieu Eagle Dulbecco contenant 4% de sérum artificiel Ultrosor G (IBF) et additionné d'antibiotiques. La suspension de cellules en phase exponentielle est centrifugée à 400 g pendant 10 min, à 4°C. 10 ml de surnageant sont récupérées, on y ajoute du Tris 50 mmol/l et du CaCl₂ 5 mmol/l, puis la solution est ajustée à

pH 7,6 avec HCl 1N. Cette solution est ensuite dialysée 1 nuit à 4°C contre le tampon Tris/HCl pH 7,6, 100 mmol/l contenant du CaCl₂. La solution enzymatique est répartie en aliquotes de 500 µl puis congelée à -20°C avant le dosage de l'activité collagénolytique.

3.6- Activation trypsique

Elle est réalisée avec de la trypsine. L'extrait cellulaire total est préincubé avec des concentrations variables de trypsine (5-10-20, 40 µg/ml) pendant 10, 20 et 30 min à 25°C. Ensuite, l'action de la trypsine est neutralisée par l'inhibiteur trypsique, le Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) pendant 10, 20 et 30 min à 25°C. La solution obtenue représente l'extrait total activé.

4- Dosage de l'activité enzymatique

4-1- Préparation du collagène

Nous utilisons comme substrat du collagène insoluble de type I provenant du tendon d'Achille de bœuf (Sigma). 100 mg de collagène sont mis en solution dans 10 ml d'acide acétique à 0,2% ajusté à pH 4 avec NaOH 1N. On dialyse ensuite 6 heures contre ce même tampon. La suspension de collagène est de nouveau dialysée dans un deuxième bain contenant le tampon Tris HCl 50 mmol/l pH 7,6 additionné de NaCl 0,2 mol/l. Après dialyse, 1 nuit à 4°C, la suspension de collagène insolubilisé est répartie en fractions de 200 µl puis congelée à -20°C.

4.2- Détermination de l'activité collagenolytique

L'activité collagénolytique est mesurée en utilisant la méthode à la fluorescamine, 4-phénylspiro – furan-2 (3H), 1-phthalan 3,3 (Sigma) (68).

Principe

La fluorescamine forme des dérivés très fluorescents avec des fonctions amines primaires des peptides provenant de l'hydrolyse du collagène par la collagénase et les enzymes associés.

La fluorescamine est utilisée pour mesurer l'activité protéolytique de la collagénase vis-à-vis de la solution de collagène par accroissement d'émission de fluorescence par unité de temps.

Réactifs

- Tampon dosage :

- | | |
|-------------------|------------|
| Tris-HCl pH 7,5 | 100 mmol/l |
| CaCl ₂ | 33 mmol/l |
- Tampon phosphate pH 7 0,2 mol/l
 - Fluorescamine 0,1 mg/ml dans l'acétone.

Dosage

Le milieu réactionnel comprend :

- 200 µl de suspension de collagène de type I à 10 mg/ml dans le tampon Tris-HCl pH 7,5 50 mmol/l contenant du NaCl 0,2 mol/l,
- 190 µl de tampon dosage,
- 10 µl d'extrait enzymatique.

Immédiatement après que l'enzyme ait été mis en contact avec le substrat, on prélève 20 µl du surnageant. On y ajoute :

- 4 ml de tampon 0,2 mol/l pH7
- 2 ml de fluorescamine 0,1 mg/ml.

Cette fraction représente le témoin d'activité aux temps 0 (T₀). Après 3 heures d'incubation à 30°C, la réaction est arrêtée par centrifugation à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. On prélève 20 µl du surnageant qui subit le même traitement que l'échantillon au temps 0. Ceci constitue l'activité au bout de 3 heures (T₃). L'émission de fluorescence à 475 nm est mesurée en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 390 nm sur un spectrofluorimètre (Perkin-Elmer).

La différence entre les deux émissions de fluorescence (T₃-T₀) constitue l'activité collagénolytique de la fraction considérée. Chaque dosage est effectué en triple.

Gamme d'étalonnage

L'émission de fluorescence en unité de fluorescence (U.F) est mesurée en fonction des concentrations croissantes de glycine. On prépare une solution mère de glycine (figure 15).

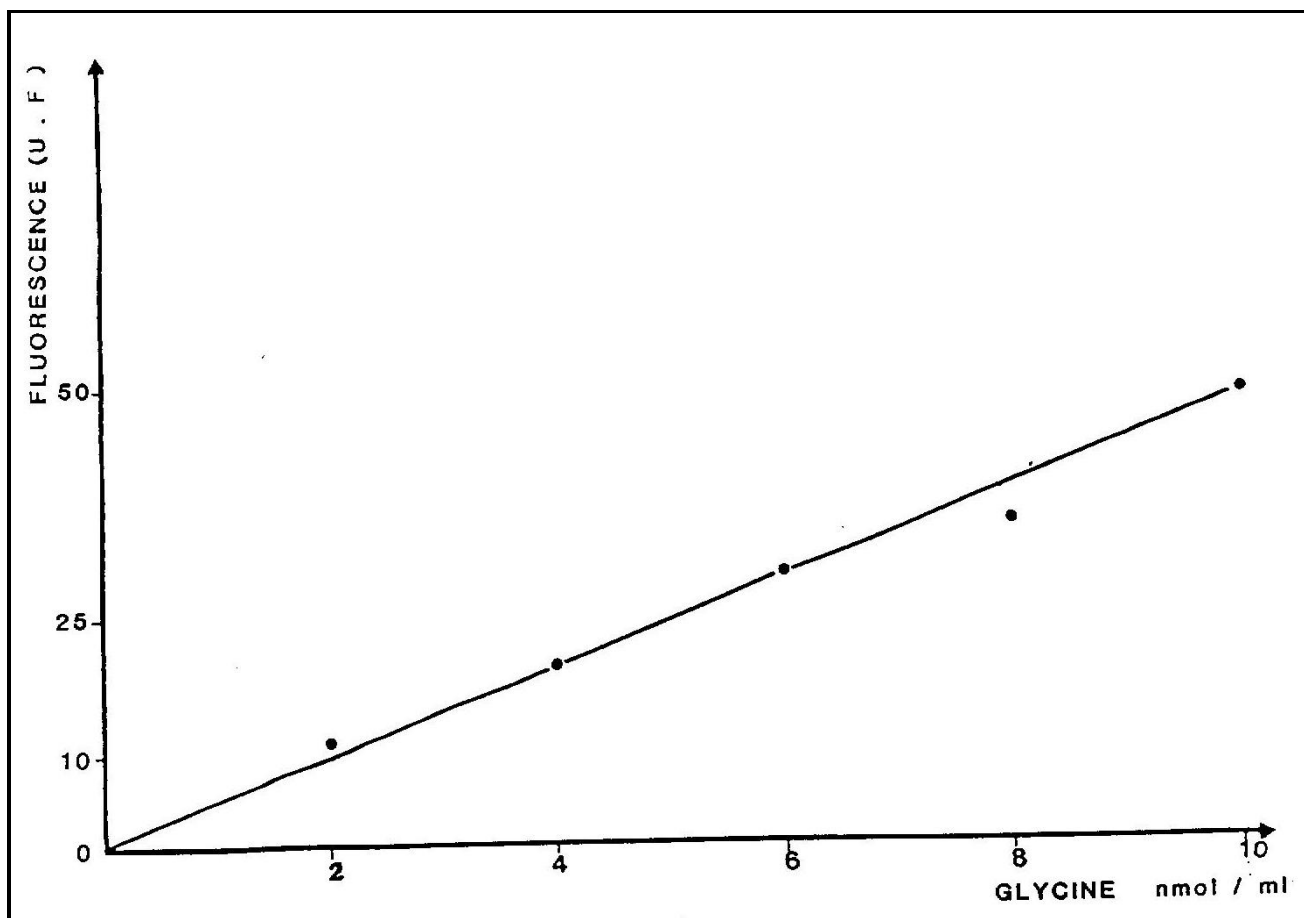


Figure 15 : Intensité de fluorescence (en unités arbitraires U.F.) en fonction des concentrations de glycine.

Expression des résultats

L'activité collagénolytique est exprimée en $\text{mU}/10^6$ cellules : une unité enzymatique (U) représentant la quantité d'enzyme qui libère $1\ \mu\text{M}$ d'équivalent glycine/mn à 30°C .

L'activité collagénolytique des extraits enzymatiques est calculée grâce à la droite d'étalonnage (figure 15).

Si $(n \times 10^{-9})$ est le nombre de moles de glycines libérées pendant l'incubation, l'activité A de l'extrait enzymatique mis à incuber pendant 3 heures et exprimée en $\text{mU}/10^6$ cellules est donnée par la formule suivante :

$$A = \frac{(n \times 10^{-9}) \times 4 \times 400}{20 \times 180}$$

Où 180 représente le temps d'incubation en minutes.

400 correspond au volume réactionnel final en μl .

20 correspond à la prise d'essai qui a servi pour la lecture au spectrofluorimètre (en μl).

4 correspond au volume du tampon phosphate ajouté en ml.

4.3- Détermination de l'activité protéasique non spécifique

Dosage

L'activité protéasique est mesurée en utilisant la méthode à la fluorescamine avec le sérum albumine bovine (BSA) fraction v 10 mg/ml dans le tampon dosage comme substrat.

Le milieu réactionnel comprend :

- 200 μl de solution de BSA
- 190 μl de tampon dosage
- 10 μl d'extrait enzymatique.

4.4- Contrôle de l'activité collagenolytique par électrophorèse des produits de dégradation

Une enzyme est reconnue pour être une collagénase vraie si elle clive la molécule de collagène au niveau d'un site spécifique situé au $\frac{3}{4}$ de la molécule à partir de l'extrémité N-terminale, en donnant les fragments caractéristiques TCA : 75% de la molécule contenant l'extrémité N-terminale et TCB : 25% de la molécule ayant l'extrémité C-terminale.

Pour visualiser ce clivage, nous avons dosé l'activité collagénolytique en utilisant comme substrat du collagène radiomarqué NEN et nous ensuite réalisé une électrophorèse en gel de polyacrylamide sur les produits solubles et insolubles provenant de l'hydrolyse de la molécule de collagène radiomarqué par l'extrait enzymatique total de k 562.

Principe de l'électrophorèse

Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leurs masses moléculaires par migration électrophorétique en gel de polyacryamide, en présence d'un détergent anionique, le SDS, qui donne la même charge à toutes les protéines.

Tampon et solutions

La composition des tampons et solutions que nous avons utilisés pour réaliser l'électrophorèse est présenté sur le tableau II.

Mise en évidence de l'activité collagénolytique en utilisant le collagène radiomarqué comme substrat

Principe

L'activité collagénolytique est mesurée en quantifiant la radioactivité des peptides tritiés solubles, libérés par dégradation du collagène marqué au tritium.

Tableau II : préparation des gels

	Gel à 10%	Gel de concentration 4,5%
Solution tampon gel de concentration		2,5 ml
Solution tampon gel de résolution	5 ml	
Acryl – stock	6,6 ml	1,5 ml
TEMED	10 µl	10 µl
Persulfate d'ammonium	100 µl	100 µl
Eau distillée	8,37 ml	6 ml

Protocole

Dans un premier temps, le collagène I radiomarqué (10 µl) est laissé au contact avec 80 µl de tampon dosage : Tris-HCl 20 mol/l pH 7,2 contenant NaCl 5 mmol/l pendant 4 heures à 0°C pour la fibrillation. Les fibres de collagène ainsi formées sont incubées avec l'enzyme 24 heures à 25°C. La radioactivité est ensuite mesurée dans le surnageant en prélevant 10 µl après centrifugation du milieu réactionnel à 10 000 g, pendant 10 min.

Les 90 µl de milieu réactionnel restant comprenant les peptides libérés solubles et le collagène non hydrolysé sont lyophilisés. L'attaque enzymatique est réalisée par l'extrait obtenu à partir des cellules k 562 ou par des préparations étalons de collagénase bactérienne ou animale (NEN)

Préparation des échantillons

Le lyophilisat est repris avec le tampon échantillon pour obtenir une concentration protéique allant de 2 à 5 mg/ml. L'échantillon est ensuite incubé à 100°C pendant 2 à 3 minutes afin de dénaturer les protéines.

Préparation du gel de polyacrylamide

On réalise une électrophorèse verticale en plaque :

- On assemble les plaques de façon à construire un moule et on coule 3 à 5 mm d'agarose à 2% entre les plaques de manière à éviter les fuites dans la partie inférieure ;
- On coule le gel de polyacrylamide à 10% (tableau II). La partie supérieure du gel est recouverte par un film d'isobutanol saturé en eau et on laisse la préparation se polymériser pendant 30 minutes. Ensuite, l'alcool est éliminé et le gel est bien rincé à l'eau ;
- Le gel de concentration à 4,5% (tableau II) est coulé, il permet d'introduire le peigne pour faire les puits nécessaires aux dépôts et aussi de concentrer les échantillons déposés.

Dépôt des échantillons et électrophorèse (52)

- Les échantillons sont déposés dans le puits à l'aide d'une seringue Hamilton. Les volumes à appliquer sont fonction de la quantité de radioactivité présente. En général, nous déposons 10 à 30 µl (5 000 à 10 000cpm).
- L'électrophorèse est conduite à 30 mA/gel (ampérage constant) jusqu'à ce que le front de migration (visualisé par le bleu de bromophénol) arrive à 2 cm du bas de la plaque (environ 3 heures).

Coloration-décoloration

Après l'arrêt de l'électrophorèse, le gel est démoulé avec précaution, pour se repérer une entaille est réalisée en bas et à droite du gel. Il est coloré par le bleu de coomassie 0,1% dans le décolorant puis décoloré par le mélange acétique-éthanol (80/250).

Fluorographie (53)

Principe

La fluorographie permet d'obtenir une impression de films : dans le cas de tritium (^3H) qui a une faible énergie, en convertissant les particules émises par le tritium en photon lumineux, par l'intermédiaire d'un liquide scintillant (PPO).

Réactifs

- Diméthyl sulfoxyde (DMSO) pur.
- Dyphényl 2-5 oxazone (PPO) à 20% (P/P) dans du DMSO.

Mode opératoire

- 1) Après la décoloration, tremper le gel 30 min dans environ 20 fois en DSMO.
- 2) 2^{ème} bain de DSMO pur, 30 min.
- 3) Tremper le gel dans 4 volumes de PPO à 20% (P/P) dans du DSMO pendant une nuit ou 3 heures minimum.
- 4) Placer le gel dans un bain à 50% d'eau et 50% de DSMO pendant 10 min.
- 5) Immerger le gel dans de l'eau pure pendant 1 heure.
- 6) Dessécher le gel sous vide.
- 7) Le gel desséché et le film sont maintenus étroitement en contact dans une "cassette spéciale film radiologique" 13 x 18 cm (CGR). Le tout est emballé dans du papier aluminium et exposé pendant 3 à 7 jours à -80°C , en fonction de la quantité de radioactivité déposée.

Révélation

Après les délais d'exposition, les films sont révélés comme en photographie classique :

- 1) Le bain : révélateur (1/5) (Kodak L x 24) 5 min.
- 2) Bain d'arrêt acide acétique 1%/H₂O 30 secondes.
- 3) 3^{ème} bain : fixateur (1/5) (Kodak AL4) 10 min.
- 4) Lavage abondant à l'eau du robinet 20 à 30 min.
- 5) Séchage à température ambiante.

5- Effets biologiques non hormonaux du tamoxifène et ses métabolites

5.1- Action sur la croissance cellulaire

Les cellules K562 sensibles et résistantes à l'ADM 10^{-7} M (k 562/g⁻⁷) sont incubées pendant 2 jours en présence de concentrations croissantes (10^{-8} – 10^{-7} – 10^{-6} M) de tamoxifène et de ses métabolites. L'incubation est réalisée en macropuits de 2 ml. On ajoute à 1 ml de suspension cellulaire (1×10^5 cellules /ml pour les k 562/R⁻⁷) 1 ml de T x f et de ses dérivés, le nombre de cellules est mesuré à l'hématimètre et comparé à des cultures témoins sans effecteur.

5.2- Action sur l'activité collagénolytique

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont mises en suspension dans du milieu neuf à la croissance de 5×10^5 cellules/ml pour les k 562/R⁻⁷. Elles sont incubées pendant 1, 2 et 3 jours en présence du T x f et/ou de ses dérivés. Chaque jour, le nombre de cellules est déterminé et l'activité collagénolytique est évaluée sur l'extrait total brut (cf. Matériel et méthodes).

5.3- Etude de la biosynthèse protéique des cellules k 562 cultivées en présence du Txf et/ou de ses dérivés

La synthèse des protéines intracellulaires est suivie en incubant les cellules k 562 pendant avec $1 \mu\text{Ci/ml}$ de $4,5^{-3}$ H leucine (activité spécifique de 130 Ci/mM, Amersham) dans un milieu sans leucine (Gibco).

La technique utilisée (récolte par filtration) permet de mesurer la radioactivité intracellulaire. Les cellules cultivées avec ou sans tamoxifène et/ou ses dérivés sont transférées dans des micropuits (Titertek, Flow Lab.) sous un volume de 0,2 ml à la concentration de 2×10^5 cellules/ml avec les précurseurs radioactifs pendant 3 jours à 37°C.

Les cultures cellulaires sont ensuite aspirées à l'aide d'un récolteur automatique (M.A.S.H., Flow Lab.), les cellules ainsi déposées sur un filtre en fibre de verre sont lavées puis lysées par une solution d'acide trichloracétique à 5%, ce lavage ayant pour but de précipiter les macromolécules contenant les protéines. Le précipité est ensuite abondamment avec du NaCl 9 g/l. Après séchage des filtres, ceux sont passés au compteur à scintillation (Bétamatic, Kontron, France) après dissolution 2 heures à 50°C par 250 μl de solubilisateur de tissu (Lumasolve, Beckman). Les résultats sont rendus en dpm par 10^6 cellules et par heure d'incubation avec l'élément radioactif.

5.4- Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry (63). Les résultats sont exprimés en mg de protéines par 10^6 cellules.

5.5- Recherche des récepteurs d'œstrogènes (RE) et de Tamoxifene (RT)

Substitution des hormones endogènes

A 100 ml de sérum de veau fœtal, on additionne le charbon dextran dans les proportions suivantes :

0,5% charbon

0,005 % dextran

Le mélange est laissé sous agitation une nuit à 4°C.

Préparation du cytosol pour le dosage des RE

Les cellules K562 sont entretenues dans le milieu de Eagle Dulbecco additionné d'antibiotiques et 10% de sérum de veau fœtal dont les hormones endogènes ont été constituées.

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont lavées 3 fois dans le PBS (centrifugation 200 g, 10 min à 4°C) et homogénéisées dans du tampon phosphate contenant du KCl 0,4 M. La détermination des RE est faite sur le cytosol après une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 60 min à 4°C.

Préparation de la fraction microsomale pour le dosage des récepteurs spécifiques de tamoxifène

Les cellules K562 sensibles cultivées comme précédemment sont lavées 3 fois avec le tampon PBS (centrifugation à 200 g, pendant 10 min à 4°C). Elles sont ensuite homogénéisées dans le tampon TEA pH 7,4 (Tris/HCl pH 7,4 10 mM, EDTA 1,5 mU, acide de Na 0,2%) puis centrifugées à 12 000 g, 30 min à 4°C.

Le surnageant obtenu renferme la fraction microsomale qui sert à déterminer les récepteurs de tamoxifène.

Détermination des récepteurs d'œstrogènes et de tamoxifène

La méthode actuellement la plus utilisée est la technique au charbon-dextran (69).

Le cytosol est incubé une nuit à 4°C avec des concentrations variables d'hormones radiomarquées (H*) (Tableau III).

La liaison non spécifique est mesurée en ajoutant au cytosol un large excès d'hormone froide qui déplace l'équilibre en sa faveur et inhibe pratiquement toute liaison de l'hormone fixée sur le récepteur est séparée de l'excès d'hormone libre par absorption sur le charbon-dextran. Le milieu réactionnel est ensuite centrifugé à 650 g pendant 15 min à 4°C, puis 150 µl du surnageant sont délicatement prélevés et la radioactivité est mesurée grâce à un compteur de scintillation (Kontron).

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en tenant compte de la courbe de saturation du récepteur et de la droite de Scatchard.

La courbe de saturation du récepteur

- Le cytosol avec le seul ligand spécifique radiomarqué permet la mesure de la liaison totale = LT
- L'addition d'un excès de compétiteur spécifique non radiomarqué permet la mesure de la liaison non spécifique = LNS
- La différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique représentera la liaison spécifique = LS

$$LS = LT - LNS.$$

On peut également calculer LS/LI qui est le rapport de la liaison spécifique/la liaison libre.

Tableau III : incubation du cytosol avec l'hormone (H)*.

Récapitulatif du dosage des récepteurs d'œstrogènes ou de tamoxifène

	Radioactivité totale		Radioactivité non spécifique	
	Dosage	Témoin	Dosage	Témoin
Cytosol	100 µl	-	100 µl	-
Tampon d'incubation	-	100 µl	-	100 µl
H*	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H froide	-	-	10 µl	10 µl

La méthode de linéarisation de Scatchard

Elle nous donne de façon précise le nombre maximum de sites de liaison spécifiques n et la constante de dissociation à l'équilibre k_d .

En utilisant cette méthode, la relation entre LS/l et le LS peut être représentée par une équation linéaire.

$$LS/Ll = 1/k_d (LS - L \text{ max})$$

Où k_d est la constante de dissociation hormone-récepteur et le n le nombre maximum de sites récepteurs. n est exprimé en fmol/mg protéines.

$$n \text{ [fmol/mg protéines]} = \frac{L \text{ max}}{C f V_c A_k} \times 10^{15}$$

Où C = concentration des protéines

F = prise d'essai pour le comptage

V_c = volume du cytosol

A = activité spécifique de l'hormone radiomarquée (Ci/mol)

K = $2,2 \times 10^{12}$ (dpm/Ci).

6- Résistance à l'adriamycine

6.1- Elaboration et caractéristiques de croissance de la population résistante à l'ADM

Les cellules K562 sensibles ont été cultivées avec des doses croissantes d'ADM allant de 10 nM à 100 nM. L'élaboration de la population résistante a été faite à quatre temps différents J 179, J 267 et J 412 correspondant à la durée, en jours, des cellules en présence d'ADM. Les doses auxquelles ces cellules résistent à ces étapes sont respectivement : 10 nM, 50 nM et 100 nM.

6.2- Caractéristiques de croissance des 2 lignées cellulaires en présence du tamoxifène et de ses dérivés

Les cellules K562 sensibles et résistantes à 10^{-7} M (K562/R⁻⁷) sont incubées pendant 2 jours en présence du Txf et de ses métabolites à la base de 10^{-7} M et de concentration d'ADM variant de 10^{-8} à 10^{-7} M.

Le taux de croissance des cellules traitées est déterminé et comparé à des cultures témoins sans effecteur. Ensuite, les D150 et indices de résistance sont calculés.

- La D150 est la concentration de drogue nécessaire pour inhiber de 50% la croissance tumorale après 48 h de culture.
- L'indice de résistance (I.R.) correspond au rapport entre la D150 des cellules résistantes et celles des cellules sensibles.

6.3- Accumulation de ^{14}C ADM dans les K562

L'effet du Txf sur l'incorporation de ^{14}C ADM (29 mCi/nM) a été étudié sur les cellules K562 sensibles et résistantes à l'ADM comme il a été décrit par plusieurs auteurs (83). Les cellules des 2 lignées sont co-incubées 1 heure en présence de 100 μl de milieu DMEM + 10% SVF contenant 2.10^{-7} M Txf et 100 μl de ^{14}C ADM à 2.10^{-6} M.

Une autre série d'expériences dans lesquelles les cellules sont pré-traitées par le Txf pendant 2 heures à la dose de 10^{-7} M a été entreprise. Après ce temps, les cellules sont lavées 2 fois au PBS puis remises en culture dans 100 μl de milieu DMEM + 10% de ^{14}C ADM à 2.10^{-6} M.

Après 1 heure d'incubation, 100 μl de chaque suspension cellulaire (en triplicate) sont prélevés et transférés dans des tubes contenant 300 μl de mélange dinonylphtal dibutyphthalat (10/25) + 300 μl de PBS.

Ces fractions sont immédiatement centrifugées 30 secondes à 12 000 g. Le milieu et l'huile sont aspirés, le culot cellulaire est récupéré et dissous dans 250 μl de solubilisateur de tissu Lumasolve (Beckman) 1 nuit à 50°C . La radioactivité intracellulaire est ensuite déterminée après avoir ajouté dans chaque fiole à scintillation 4 ml de scintillant non aqueux NA (7 ml d'acide acétique glacial/l litre de scintillant NA).

Les résultats sont exprimés en pmol/ 10^6 cellules.

6.4- Etude de la sortie d'ADM dans les cellules

Pour étudier la sortie d'ADM dans les k 562 sensibles et résistantes, 2×10^6 cellules dans 200 μl de milieu DMEM sont incubées 1 heure avec 1 μM ^{14}c ADM. Après incubation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et remises en culture pendant 30 minutes dans :

- 200 μl de milieu DMEM + 10% SVF
- 200 μl de milieu DMEM + 10% SVF contenant du TXF 10^{-7} M et de l'ADM 10^{-6} M
- 200 μl de milieu DMEM + SVF additionnés de Txf 10^{-7} M.

Après 30 minutes d'incubation, la radioactivité intracellulaire est déterminée. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à ceux trouvés après 1 heure d'accumulation intracellulaire de l'ADM.

RESULTATS

**A.ETUDE DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE
DES CELLULES K562**

A- ETUDE DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE DES CELLULES K562

I- DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE DETECTION DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE

Afin de définir les conditions optimales pour la détection de l'activité collagénolytique, nous avons étudié les différents paramètres susceptibles d'influencer cette activité.

1. pH optimum (figure 16)

L'activité collagénolytique est fonction du pH. Elle est mesurée sur des milieux réactionnels différemment tamponnés :

- Tampon Tris-HCl pour des pH de 7 à 9.
- Tampon Tris-maléate pour des pH de 6 à 7.

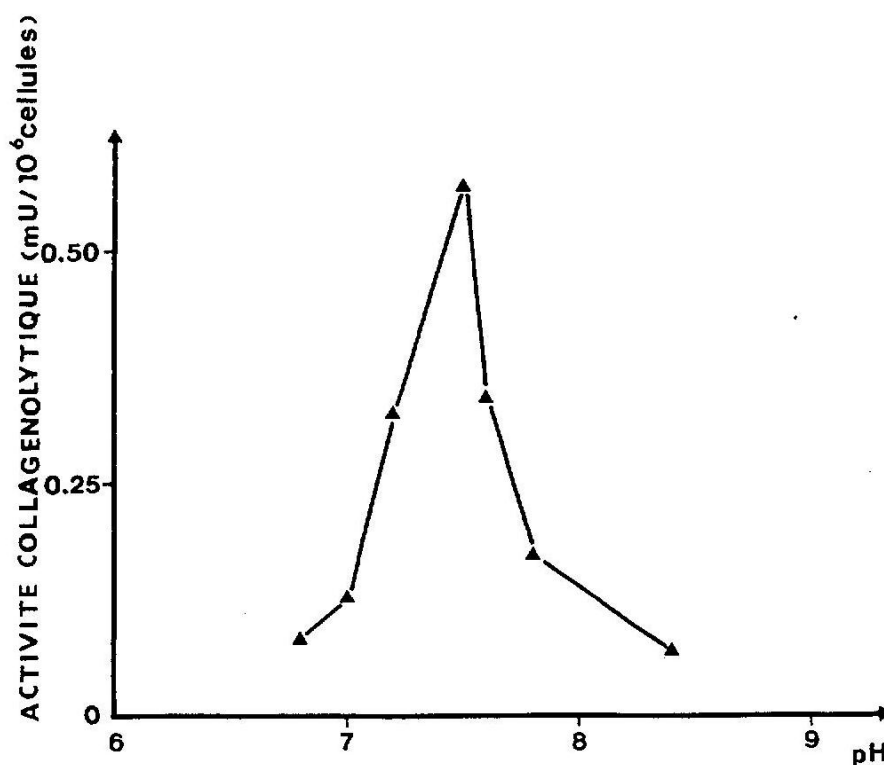


Figure 16 : Activité collagénolytique des cellules K562 en fonction du pH. Après incubation pendant 3 heures à 30°C en présence de différents tampons : Tris-maléate (pH 6,0 - 7,0) et Tris-HCl (pH 7,2 - 9,0). L'activité collagénolytique est déterminée par une méthode à la fluorescamine (Matériels et Méthodes).

Dans ces conditions, le pH optimum est de 7,5. L'activité collagénolytique n'est pas significative aux pH < 7 et pH > 8.

2. Les ions Ca^{++} (figure 17)

L'activité collagénolytique dépend également de la concentration en ions Ca^{++} . Pour tester l'influence de ces ions, nous avons préparé le tampon dosage avec des concentrations variables de CaCl_2 entre 10 et 80 mmol/l. L'activité collagénolytique est maximale en présence de 33 mmol/l de CaCl_2 .

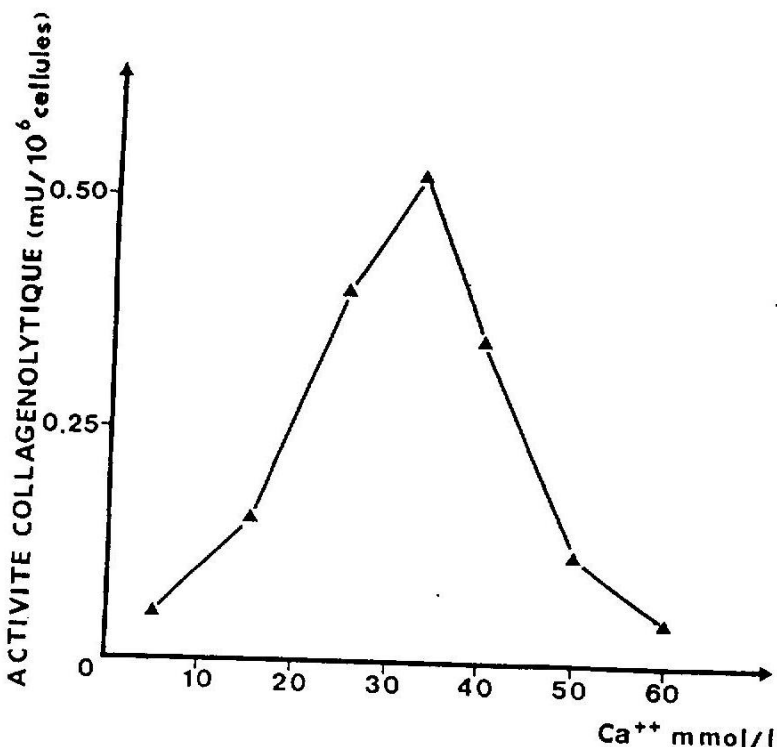


Figure 17 : Activité collagénolytique des cellules K562 en fonction de la concentration en Ca^{++} .

3. Le nombre de cellules K562 par essai (figure 18)

L'activité enzymatique est mesurée sur l'extrait total de cellules K562 (de $2,2 \times 10^4$ à 20×10^4 cellules /essai).

On constate que l'activité collagénolytique croît linéairement jusqu'à 5×10^4 cellules /essai ce qui correspond à une activité de 66 mU/ml, et atteint un plateau entre 1 et 2×10^5 cellules /essai.

Pour s'assurer du maximum de sensibilité, l'activité collagénolytique est mesurée avec 5×10^4 cellules K562. Par conséquent, toutes les activités supérieures à 66 mU/ml sont écartées et les dosages sont repris avec des concentrations cellulaires plus basses ; c'est le cas du clone G, des cellules promyélocyaires humaines HL60 et des granulocytes.

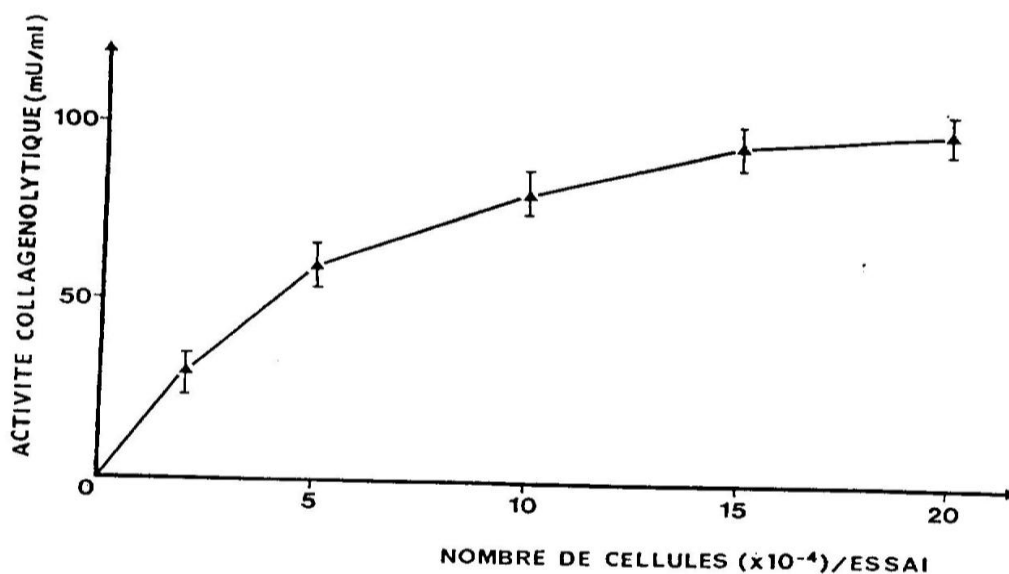


Figure 18 : Variation de l'activité collagénolytique en fonction du nombre de cellules érythroleucémiques K562.

4. La phase de croissance des cellules

Les cellules K562 en phase exponentielle de croissance sont mises en suspension dans du milieu neuf à la concentration de 5×10^4 cellules/ml et maintenues en culture pendant 5 jours. Chaque jour, la numération cellulaire est effectuée et l'activité collagénolytique déterminée. Comme nous le montre la figure 19, une légère augmentation de l'activité est observée pendant la phase exponentielle entre le 1^{er} jour et le 4^{ème} jour, mais quand les cellules rentrent dans la phase de plateau, l'activité enzymatique commence à diminuer.

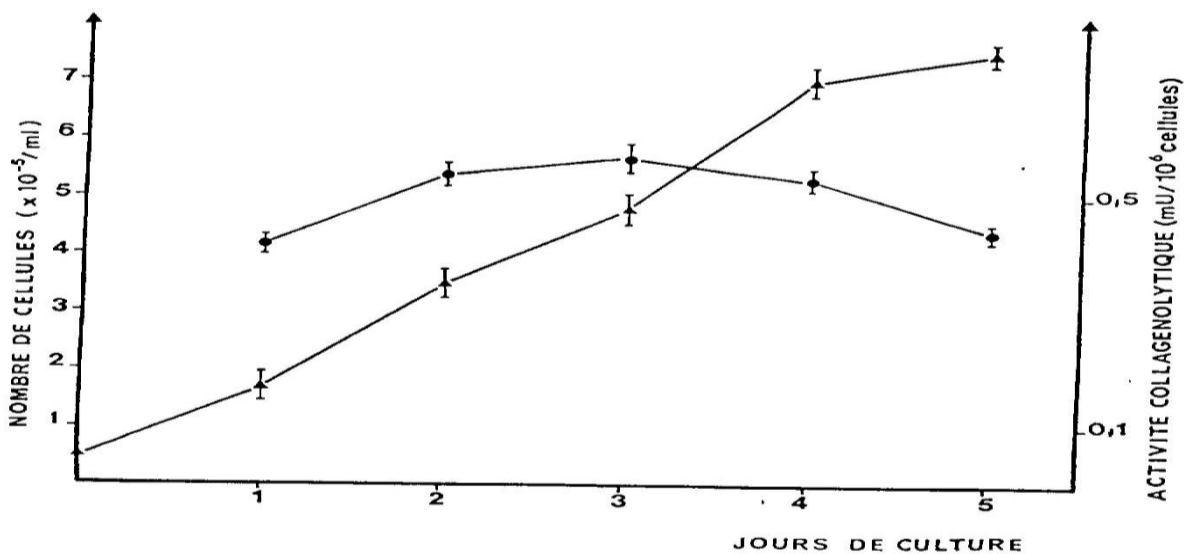


Figure 19 : Activité collagénolytique (●) en fonction de la croissance cellulaire (▲).

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont mises en suspension dans du milieu neuf à la concentration de 5×10^4 cellules/ml et maintenues en culture pendant 5 jours. Chaque jour, les cellules sont énumérées et l'activité collagénolytique est mesurée.

II- COMPARAISON DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE DES CELLULES K562 AVEC CELLES D'AUTRES CELLULES

Puisque les cellules K562 expriment des caractères granulocytaires, nous avons comparé leur activité collagénolytique avec celle des cellules sanguines circulantes humaines, les granulocytes et les lymphocytes ainsi que les cellules provenant de la lignée promyélocytaire humaine, les HL60.

On observe dans le tableau IV que l'activité collagénolytique des cellules K562 représente respectivement 27% et 57% de celle trouvées dans les granulocytes et les cellules HL60. Par contre, elle est 10 fois moins importante dans les lymphocytes.

Tableau IV : Comparaison de l'activité collagénolytique des cellules K562 avec celle d'autres lignées cellulaires.

Cellules	Activité collagénolytique (ml/10 ⁶ cellules)
K562	0,60 ± 0,06 ^a
Granulocytes	2,20 ± 0,08
HL 60	1,05 ± 0,05
Lymphocytes	0,06 ± 0,02
^a : Moyenne des expériences M ± SD (n = 3)	

III- INHIBITION DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE PAR LES INHIBITEURS CLASSIQUES DES COLLAGENASES

Plusieurs effecteurs ont été utilisés pour tester leur influence sur l'activité collagénolytique. Les résultats sont indiqués dans le tableau V.

Tableau V : Inhibition de l'activité collagénolytique par divers effecteurs.

Effecteurs	Concentration dans l'essai	Activité (% de témoin)
Sérum humain normal	0,25%	38
Sérum de veau fœtal	0,25%	40
Cystéine	0,1mM	52
EDTA	1mM	60

Les inhibiteurs sont ajoutés au tampon dosage et l'activité collagénolytique est mesurée. Elle est mesurée en pourcentage par rapport au témoin en absence des effecteurs.

On remarque que le sérum de veau fœtal (0,25%), le sérum humain normal (0,25%) et la cystéine (0,1 M) diminuent d'environ 60% l'activité collagénolytique des cellules K562. L'EDTA (1 mM) inhibe de 40% l'activité.

IV- ACTIVATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES DE K562 (tableau VI)

Le but de cette expérimentation était de rechercher la présence de proenzyme.

On constate que la trypsine à 25°C active l'activité enzymatique de façon dose dépendante. Par contre, l'activité collagénolytique est diminuée en cas d'une incubation prolongée avec la trypsine. C'est le cas à 20 min où on assiste déjà à une diminution de l'intensité de l'activation et quand on atteint 30 min de préincubation, la trypsine ne réagit pratiquement plus.

Tableau VI : Action de la trypsine sur l'activité collagénolytique des cellules K562.

Activité collagénolytique (mU/10 ⁶ cellules)				
Temps de Préincubation				
	0 min	10 min	20 min	30 min
Trypsine ±				
5	0,52 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,26 ± 0,04	0,35 ± 0,09
10	0,52 ± 0,02	0,79 ± 0,03	0,66 ± 0,04	0,44 ± 0,05
20	0,52 ± 0,02	1,18 ± 0,1	0,79 ± 0,01	0,52 ± 0,04

Le lysat cellulaire est préincubé avec différentes concentrations de trypsine pendant 10, 20 et 30 minutes à 25°C.

L'action de la trypsine est neutralisée avec l'inhibiteur trypsique, le Soy-Bean Trypsin Inhibitor (SBTI) pendant 10, 20 et 30 minutes à 25°C. L'hydrolysate trypsique est ajouté au milieu réactionnel et le dosage de l'activité collagénolytique est effectué.

^a : Moyenne des expériences $M \pm SD$ (n= 3)

V- LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE

Puisque la collagénase peut être soit libre (26), soit liée aux membranes (19) dans plusieurs modèles cellulaires, nous avons analysé l'activité enzymatique des extraits cytoplasmiques et membranaire obtenus à partir des K562. Les résultats que nous avons obtenus (tableau VII) montre que par comparaison avec l'activité collagénolytique totale déterminée en parallèle l'activité collagénolytique représente 57% dans la fraction cytoplasmique tandis que 43% sont associés aux membranes. Ces résultats représentent la moyenne de 3 expériences au 3^e jour.

Tableau VII : Localisation intracellulaire de l'activité collagénolytique.

	Activité collagénolytique (mU/10⁶ cellules).
Fraction totale	0,64 ± 0,04
Cytoplasmique	0,38 ± 0,01
Membranaire	0,29 ± 0,01

VI- EXCRETION DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE

Après avoir caractérisé la présence d'une activité collagénolytique à l'intérieur des cellules, nous avons recherché si une partie de cette activité était aussi excrétée dans le milieu extracellulaire. Ce fait est important dans le contexte d'une dissémination tumorale car dans ce cas, les enzymes de destruction de la matrice intracellulaire, notamment les collagénases, doivent être libérées dans l'espace extracellulaire.

Une activité collagénolytique dans le milieu synthétique en absence de sérum de veau fœtal a pu être mise en évidence. Elle représente 75 à 100% de l'activité totale (tableau VIII). Dans ce cas, les essais d'activation par la trypsine ont toujours été négatifs ce qui indique l'absence de sécrétion de proenzyme dans le milieu.

Tableau VIII : Mesure de l'activité collagénolytique dans le compartiment intracellulaire et extracellulaire des cellules K562.

Activité collagénolytique (mU/10⁶ cellules)		
Temps de culture (jours)	Intracellulaire	Extracellulaire
1	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,03
2	0,53 ± 0,03	0,41 ± 0,03
3	0,63 ± 0,03	0,50 ± 0,04

^a : Moyenne des expériences M ± SD (n = 3)

VII- MESURE DE L'ACTIVITE PROTEASIQUE NON SPECIFIQUE

Pour savoir quelle est la part d'autres protéases dans le processus de collagénolyse, nous avons recherché l'activité protéasique non spécifique sur l'extrait total.

L'activité protéasique est déterminée en utilisant la méthode à la fluoescamine avec une petite modification ; le substrat utilisé est le sérum- albumine bovine (BSA).

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les cellules K562 ont une activité protéasique non spécifique qui n'est pas négligeable (0,40 mU/106 cellules) au 3^e jour, mais elle reste toutefois inférieure à l'activité collagénolytique qui est de 0,60 mU/106 cellules.

VIII- PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES PRODUITS DE DEGRADATION DU COLLAGENE (figure 20)

Sur la figure, on constate que dans le témoin où le collagène n'a pas été incubé avec l'extrait enzymatique, il n'apparaît que les bandes spécifiques du collagène c'est-à-dire les bandes monomériques (α) et dimériques (β). L'incubation du collagène avec la collagénase purifiée de tétard montre bien une seule coupure au niveau d'un site spécifique situé au $\frac{3}{4}$ de la molécule à partir de l'extrémité N terminale, en donnant les fragments caractéristiques TCA : 75% de la molécule contenant l'extrémité N terminale et TCB : 25% de la molécule contenant l'extrémité C terminale. Par contre, sur le profil électrophorétique obtenu après incubation avec l'extrait brut de K562, on relève de nombreuses bandes indiquant une protéolyse très complète de la molécule, due vraisemblablement à la présence de protéases non spécifiques.

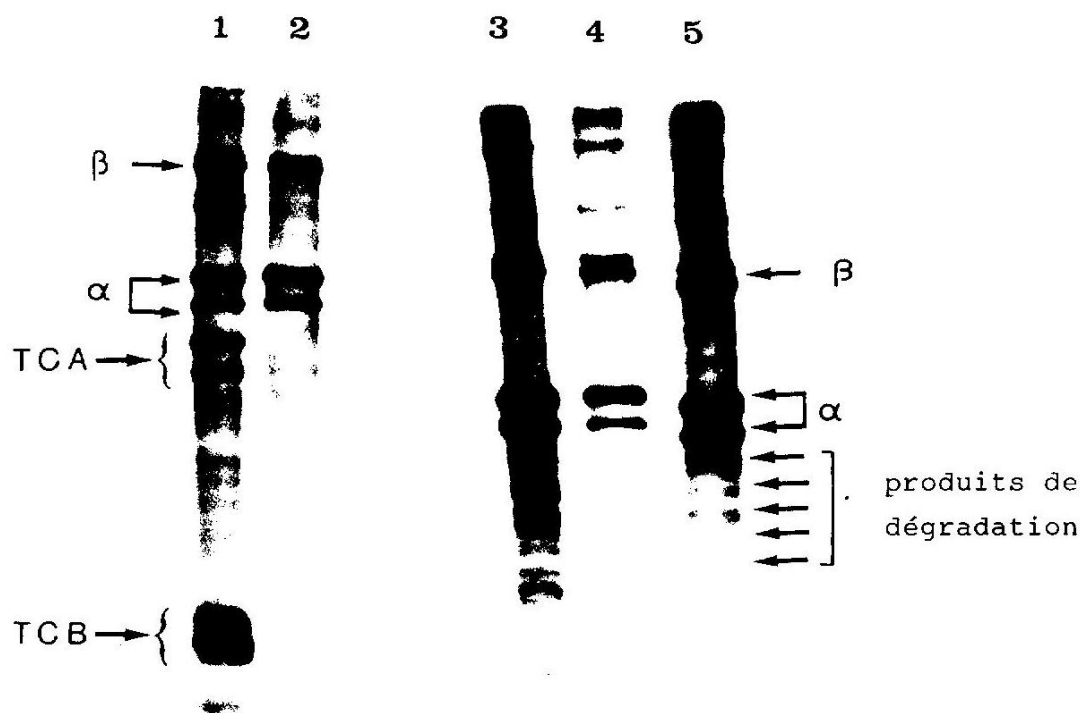


Figure 20 : Electrophorèse en gel de polycrylamide du collagène après incubation avec la collagénase purifiée de tétard l'extrait total de K562.

- 1- Collagène incubé avec la préparation étalon de collagénase de tétard (gel à 7,5%)
- 2- Collagène (gel à 7,5%)
- 3- Collagène incubé avec l'extrait de granulocyte (gradient 6-16%)
- 4- Collagène (gradient 6-16%)
- 5- Collagène incubé avec l'extrait total de K562 (gradient 6-16%).

IX- MODULATION DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE AU COURS DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROÏDE DES CELLULES K562

1- Dans les clones de K562 (Tableau IX)

L'activité collagénolytique dans le clone 19 à caractère érythroïde très élevé (57% de cellules benzidine-positives) est très faible ($0,17 \text{ mU}/10^6$ cellules) par rapport à la valeur trouvée dans la population totale de K562 ($0,57 \text{ mU}/10^6$ cellules), mais identique à celle qu'on trouve avec les cellules K562 traitées avec l'hémine pendant 3 jours de culture à la dose de $40 \mu\text{mol/l}$. Par contre, cette activité est élevée ($0,75 \text{ mU}/10^6$ cellules) et bien supérieure à celle des cellules K562 dans le clone G à caractère granulocytaire (95% de cellules porteuses de récepteurs Fc pour les IgG).

Tableau IX : Comparaison de l'activité collagénolytique de clones de cellules K562 vis-à-vis d'une population de cellules K562 témoin et induite par l'hémine.

	Activité collagénolytique (mU/10 ⁶ cellules)	Benzidine positives % de cellules	Hémoglobine (pg/cellule)	Cellules FcR ⁺ (%)
K562	0,57 ± 0,06	5	1,6	55
K562 + hémine	0,15 ± 0,04	65	3,5	52
Clone 19	0,17 ± 0,04	57	5,1	2
Clone G	0,75 ± 0,05	3	0,5	95

Activité collagénolytique dans les clones de cellules K562 et après induction après l'hémine.

- L'hémoglobine est mesurée dans le lysat cellulaire par une technique spectroscopique (43).
- Cellules FcR⁺ : Cellules possédant des récepteurs Fc membranaires pour les IgG détectées par la technique des rosettes EA.
- Les cellules K562 sont induites avec 40 µM d'hémine pendant 3 jours.

a : Moyenne des expériences M ± SD (n = 3)

2- Après hémine

Puisque les cellules K562 peuvent être différenciées vers la voie érythroïde en présence d'hémine comme inducteur, nous avons suivi la modulation de l'activité collagénolytique durant la différenciation érythroïde.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activité en fonction de différentes doses d'hémine après 3 jours d'induction.

Effet dose (Figure 21)

Quand les cellules K562 sont incubées en présence de concentrations d'hémine (10-60 µmol/l), on constate qu'après 3 jours de culture, l'activité collagénolytique diminue au fur et à mesure qu'on augmente la dose en inducteur et reste constante après 40 µmol/l.

Dans un deuxième temps, nous avons suivi l'activité collagénolytique en présence continue d'hémine 40 µmol/l et étudié la réversibilité lorsqu'on retire l'inducteur.

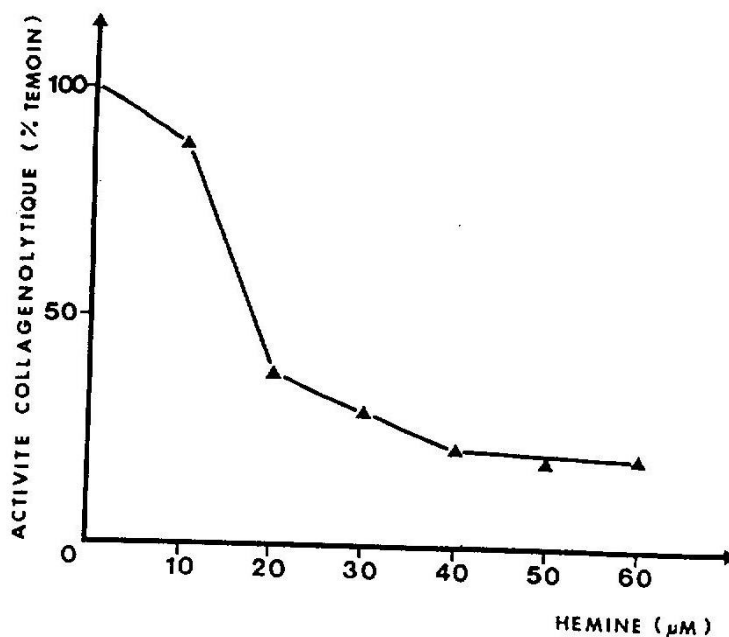


Figure 21 : Action inhibitrice de l'hémine sur l'activité collagénolytique des cellules K562.

Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes d'hémine pendant 3 jours, l'activité collagénolytique est ensuite dosée.

Effet temps et réversibilité (figure 22)

On remarque que lorsque le pourcentage de cellules benzidine positives (cellules produisant de l'hémoglobine) augmente, l'activité collagénolytique diminue en parallèle. Après 6 jours d'induction par l'hémine, lorsque le nombre de cellules produisant de l'hémoglobine atteint un plateau, l'activité collagénolytique est stabilisée, elle reste constante tout au long de la réponse et correspond seulement à 25% de l'activité initiale. Quand on retire l'hémine du milieu de culture, le pourcentage de cellules benzidine positives diminue jusqu'à rejoindre le taux des cellules témoins (5%) 9 jours plus tard. En même temps, l'activité collagénolytique est progressivement restaurée pour retrouver au 29^e jour l'activité initiale des cellules non induites.

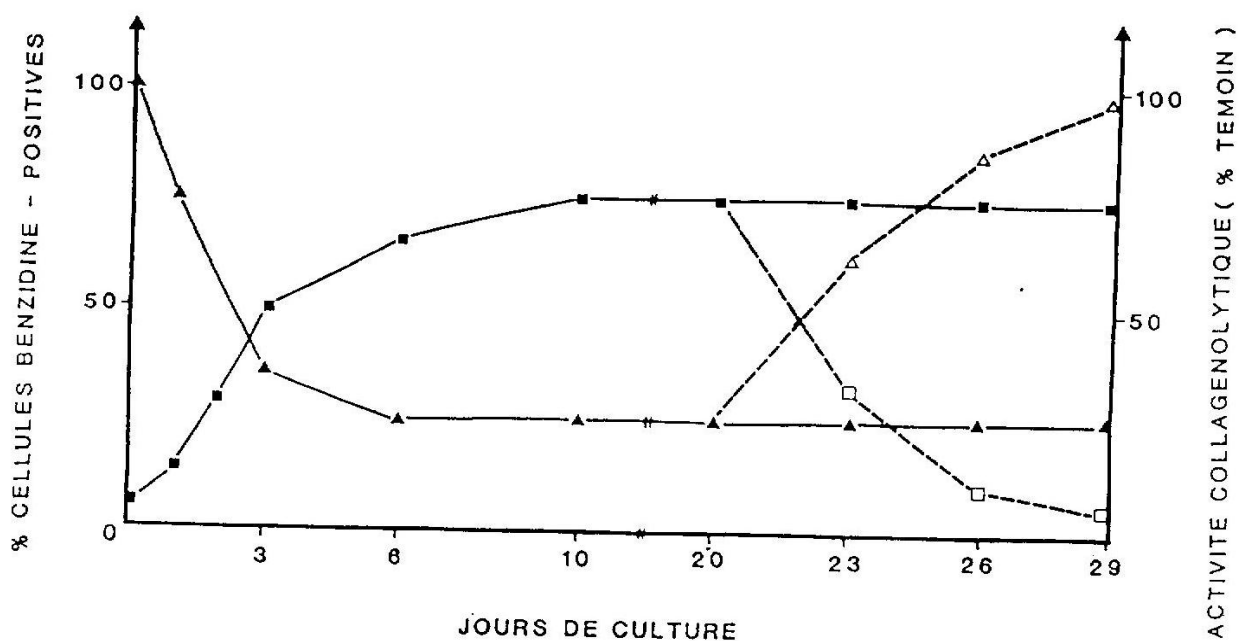


Figure 22 : Modulation de l'activité collagénolytique des K562 au cours de l'induction de la différenciation érythroïde par l'hémine.

Les cellules K562 sont activées en présence de $40 \mu\text{M}$ d'hémine (—) pendant 29 jours. Pour chaque point expérimental, l'activité collagénolytique (\blacktriangle) et le pourcentage de cellules benzidine-positives (\blacksquare) sont évalués.

Lorsqu'on retire l'hémine (---), l'activité collagénolytique (Δ) et le pourcentage de cellules benzidine-positives (\square) sont également déterminés.

**B - INHIBITION DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE
PAR LE TAMOXIFENE ET SES METABOLITES**

I- EFFET DOSE ET TEMPS

Nous avons étudié l'action du tamoxifène et de ses dérivés sur l'activité collagénolytique des K562. Ces résultats montrent entre 10^{-6} et 10^{-8} M, une nette inhibition de l'activité collagénolytique (effet-dose et effet-temps). Sur les figures 23, 24, 25 sont représentées les activités collagénolytiques en pourcentage (par rapport au témoin non traité) en fonction des doses au cours du temps.

Nous remarquons que (Figure 23) dès le jour 1, une diminution de l'activité collagénolytique à 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} M pour le Txf, l'OH-Txf, le deMe-Txf.

Au 2^e jour (Figure 24), l'inhibition est de l'ordre de 75 % à 10^{-6} , 50% à 10^{-7} et de 30% à 10^{-8} M pour le Txf, l'OH-Txf, le deMe -Txf. Mais elle reste faible à ces doses pour le cis-Txf.

Au 3^e jour (Figure 25), on observe une diminution importante de l'activité enzymatique pour le Txf, l'OH-Txf, le deMe -Txf à 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} M. Quand au cis-Txf, le pouvoir inhibiteur reste faible (58% à 10^{-6} M, 42% à 10^{-7} M et 24% à 10^{-8} M).

L'action du Txf et de ses dérivés sur la croissance cellulaire a été étudié en parallèle. Aucune inhibition de la croissance cellulaire n'est observée pendant les deux premiers jours de culture en présence de ces composés. Par contre, au 3^e jour, une inhibition de la croissance des cellules mais sans léthalité est observée avec 4 produits à la dose de 10^{-6} M uniquement (Figure 26). On remarque aussi qu'à 10^{-7} M, la croissance cellulaire n'est pas affectée et qu'à 10^{-8} M, il y a dans la plupart des cas une stimulation de la croissance.

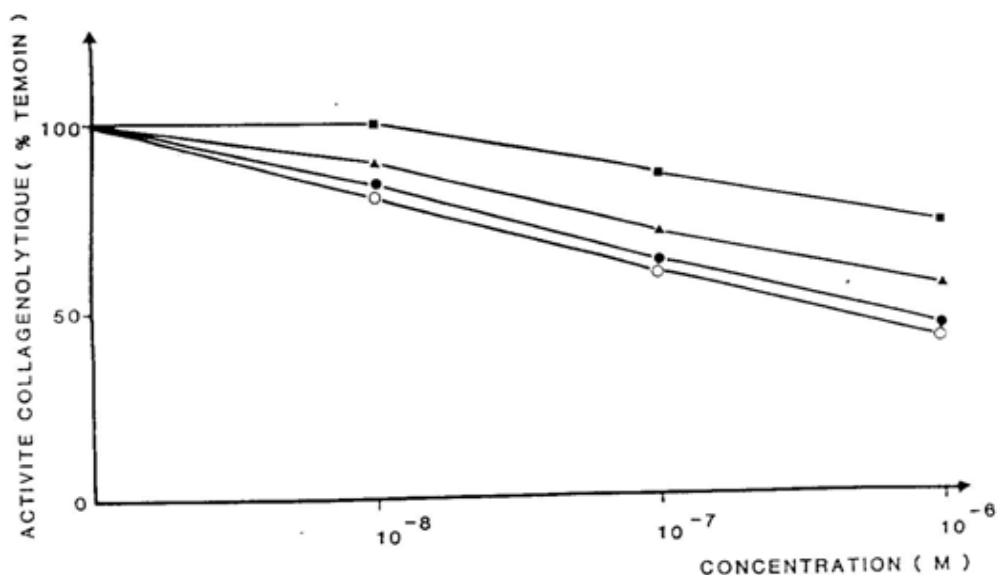


Figure 23 : Effet du Txf (●) et de ses métabolites, l'OH-Txf (o), le d-MeTxf (▲) et le cis-Txf (■) sur l'activité collagénolytique des cellules K562 sensibles cultivées pendant 1 jour.

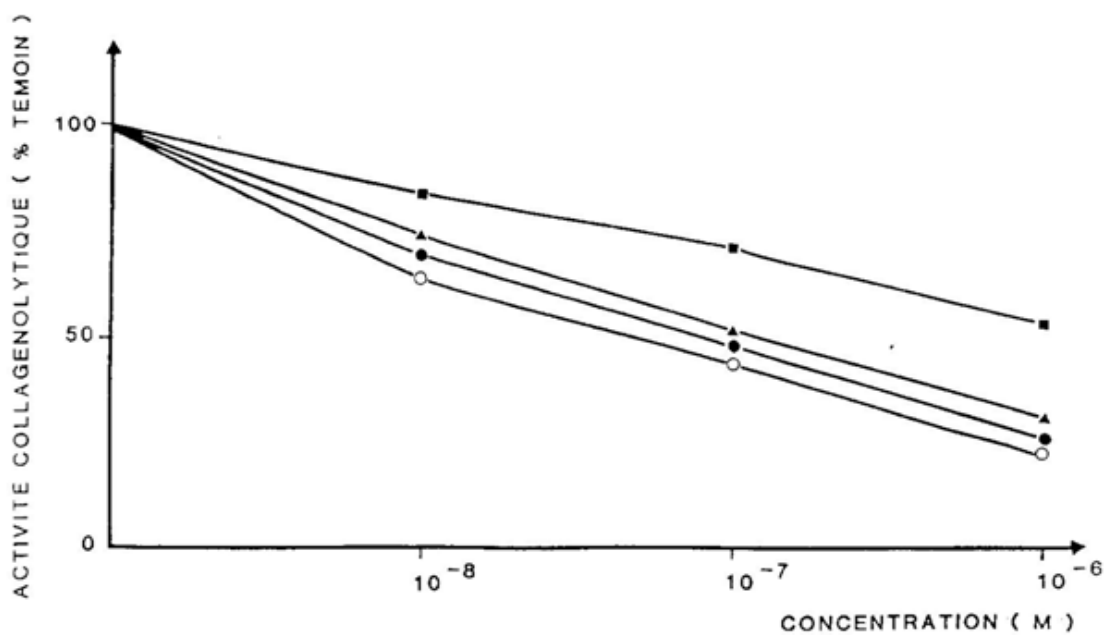


Figure 24 : Effet du Txf (●) et de ses métabolites ; l'OH-Txf (o), le d-MeTxf (▲) et le cis-Txf (■) sur l'activité collagénolytique des cellules K 562 sensibles cultivées pendant 2 jours.

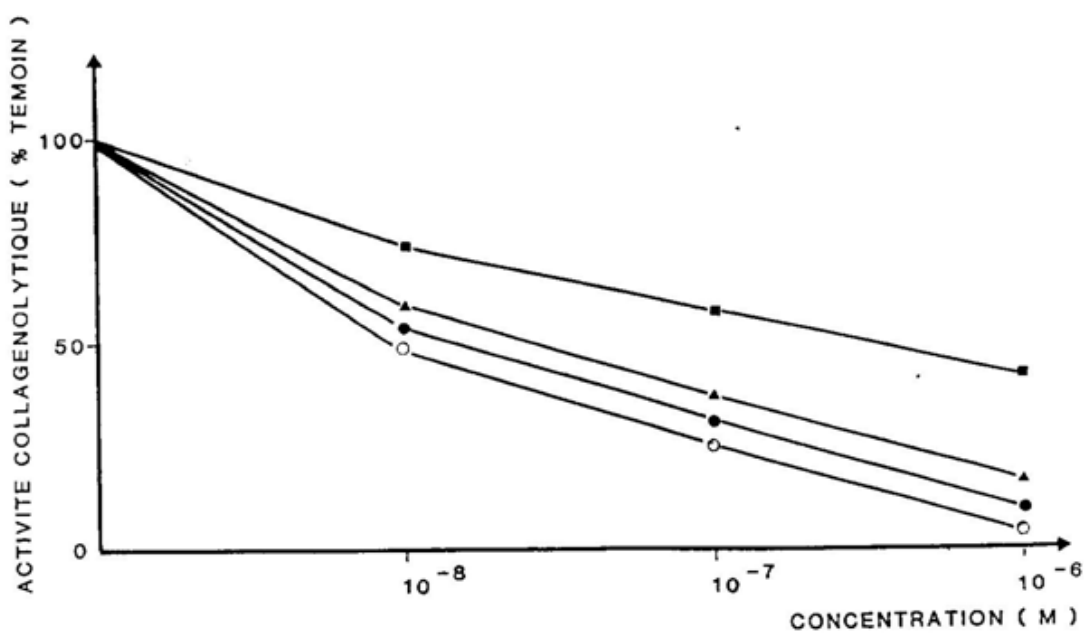


Figure 25 : Effet du Txf (●) et de ses métabolites ; l'OH-Txf (o), le d-MeTxf (▲) et le cis-Txf (■) sur l'activité collagénolytique des cellules K 562 sensibles cultivées pendant 3 jours.

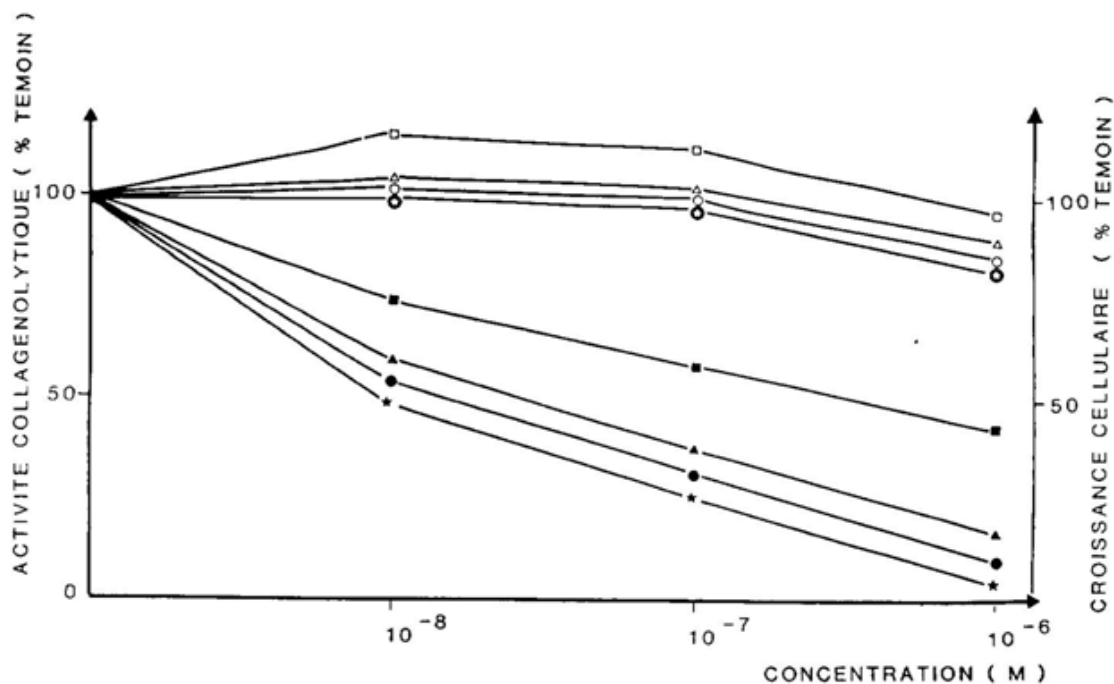


Figure 26 : Inhibition de l'activité collagénolytique des cellules K562 sensibles cultivées pendant 3 jours avec le Txf (●), l'OH-Txf (★), le d-MeTxf (▲) et le cis-Txf (■) en fonction de la croissance des K562 cultivées en présence du Txf (○), l'OH-Txf (◊), le d-MeTxf (△) et le cis-Txf (□).

II- ETUDE DE BIOSYNTHESE PROTEIQUE

Pour déterminer si l'inhibition de l'activité collagénolytique par le Txf et ses dérivés est spécifique, nous avons suivi la biosynthèse protéique totale en incorporant la leucine radiomarquée dans les cellules traitées et témoins (tableau X) et nous avons comparé cette inhibition de la synthèse protéique totale avec celle de l'activité collagénolytique. Les résultats sont représentés sur la figure 27 et exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au témoin.

On constate qu'au 3^e jour à la dose de 10⁻⁷ M, la synthèse protéique n'est inhibée que de 20% par le Txf, 30% par l'OH-Txf, 13% par le de Me-Txf et 11% par le cis-Txf ; alors que l'activité collagénolytique est fortement diminuée dans les mêmes conditions par le Txf, l'OH-Txf, le de Me-Txf, le cis-Txf, respectivement de 70%, 74%, 66%, 42%.

III- RECHERCHE DE L'INHIBITION " IN VITRO" DE L'ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE PAR LE TXF ET SES DERIVES

Nous avons vérifié qu'il n'y a pas d'inhibition in vitro de l'activité collagénolytique avec ces produits. Pour cette étude, l'extrait total de cellules K562 normales est incubé avec le Txf et ses dérivés à la concentration finale de $10^{-7}M$ dans le milieu réactionnel. L'activité collagénolytique est ensuite mesurée. Aucune inhibition directe de la collagénase n'est observée dans ce cas, comme nous l'avons indiqué sur le tableau XI.

Tableau X : Incorporation de la leucine radiomarquée dans les cellules K562 sensible traitées par le Txf et ses métabolites.

	³ H leucine incorporée dpm /10 ⁶ cellules/h	³ H leucine incorporée exprimée en % des témoins
Te	639.487	100
Txf	506.687	79
OH-Txf	436.525	68
de Me-Txf	561.291	87
cis-Txf	571.501	89

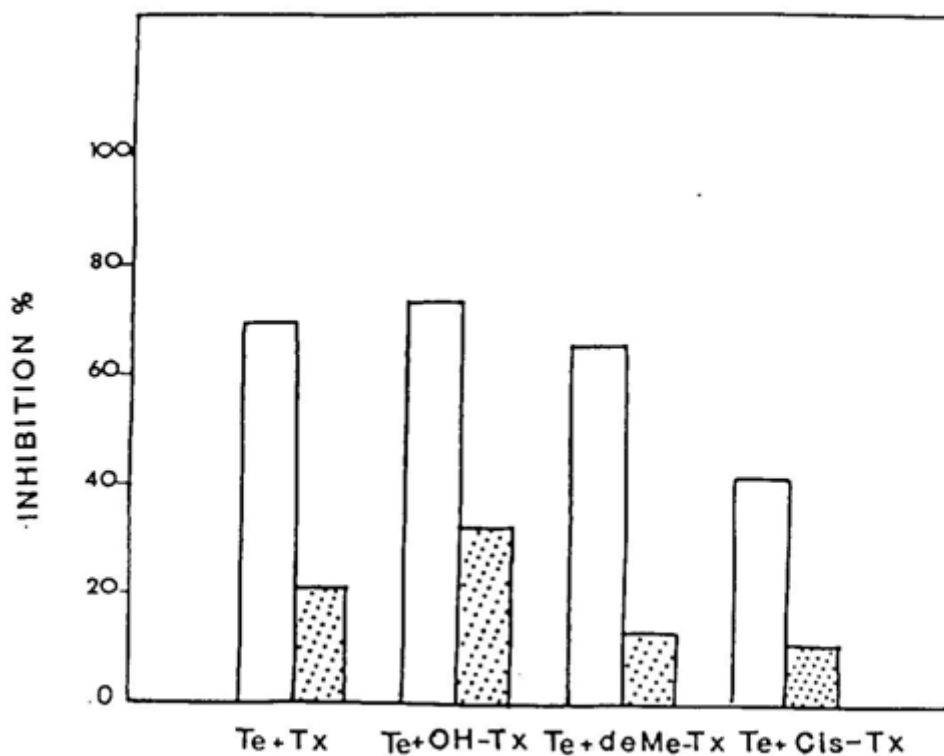


Figure 27 : Etude comparée de l'activité collagénolytique et de la synthèse protéique des cellules K562 sensibles après traitement par le tamoxifène et ses dérivés.

- Inhibition de l'activité collagénolytique
- Inhibition de la synthèse protéique totale

Tableau XI : Effet du Txf et de ses dérivés sur l'activité collagénolytique *in vitro* et sur la synthèse d'hémoglobine

	Activité collagénolytique (%)	Cellules benzidine positives (%)
Te	100	6
Txf	82	9
OH-Txf	88	9
de Me-Txf	84	10
cis-Txf	96	9

IV-RECHERCHE D'UNE EVENTUELLE SYNTHÈSE D'HEMOGLOBINE INDUITE PAR LE Txf ET SES METABOLITES

Nous avons vérifié que le Txf, par lui-même, n'induisait pas une différenciation érythroïde.

Les cellules K562 sensibles sont cultivées en présence du Txf et ses métabolites à la dose de 10^{-7} M pendant 3 jours et le pourcentage de cellules benzidine-positives est déterminé. Les résultats que nous obtenons sur le tableau XI montre que ces composés n'induisent pas une production d'hémoglobine.

V- DOSAGE DES RECEPTEURS D'OESTROGENE ET DE TAMOXIFENE

Puisque le Txf a une action biologique, il nous fallait rechercher si cela pouvait être dû à la présence de récepteurs d'oestrogènes.

Les récepteurs d'oestrogènes ont été dosés dans la fraction cytosolique. Par contre, les récepteurs de tamoxifène le sont dans la fraction microsomale des cellules K562.

1- Tracé de la courbe de saturation du récepteur et de la droite de Scatchard

Il tient compte des trois caractéristiques de la liaison type récepteur.

- Affinité élevée exprimée par la constante de dissociation à l'équilibre : K_d
- Spécificité hormonale
- Nombre de sites de liaisons limité : (n) et du principe de dosage qui est une compétition spécifique pour le site de liaison.

a) La courbe de saturation du récepteur (figure 28a et 29a)

- Le cytosol avec le seul ligand spécifique radiomarqué permet la mesure de la liaison totale (Lt).
- L'addition d'un excès de compétiteur spécifique non radiomarqué permet la mesure de la liaison non spécifique représentera la liaison spécifique (LSN) .
- La différence entre liaison totale et la liaison non spécifique représentera la liaison spécifique(LS).

b) La méthode de la linéarisation de Scatchard (Figure 28b et 29b)

Elle donne de façon précise le nombre maximum de sites de liaisons spécifiques n et la constante de dissociation à l'équilibre K_d .

Nous montrons que le tamoxifène se lie avec une affinité à une protéine présente dans la fraction microsomale de la lignée cellulaire dépourvue de récepteurs d'œstrogènes (K562) (Tableau XII).

L'affinité (K_d 0,25 nM et 0,35 nM dans les cellules sensibles et résistantes respectivement) et le nombre de sites (235 et 477 fmoles par mg de protéines dans les cellules sensibles et résistantes respectivement) ont été évalués par la méthode de Scatchard (Figure 28b et 28b).

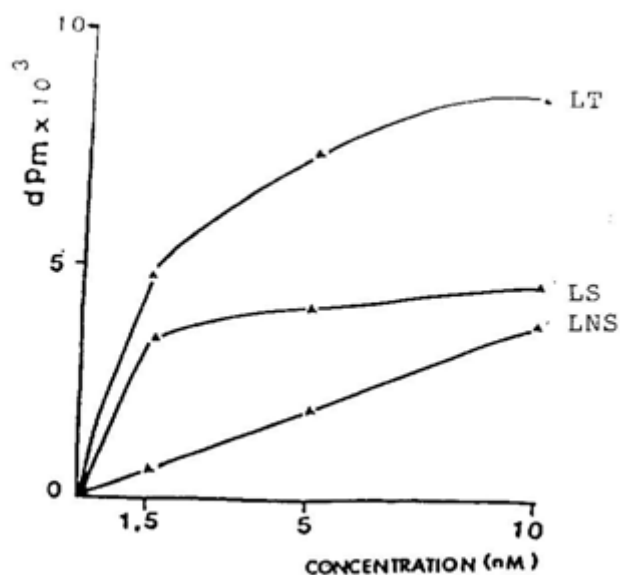


Figure 28 a : Courbe de saturation du récepteur de Txf des cellules K562 sensibles par des concentrations croissantes de tamoxifène froid.

LT= Liaison totale

LS= Liaison spécifique

LNS= Liaison non spécifique

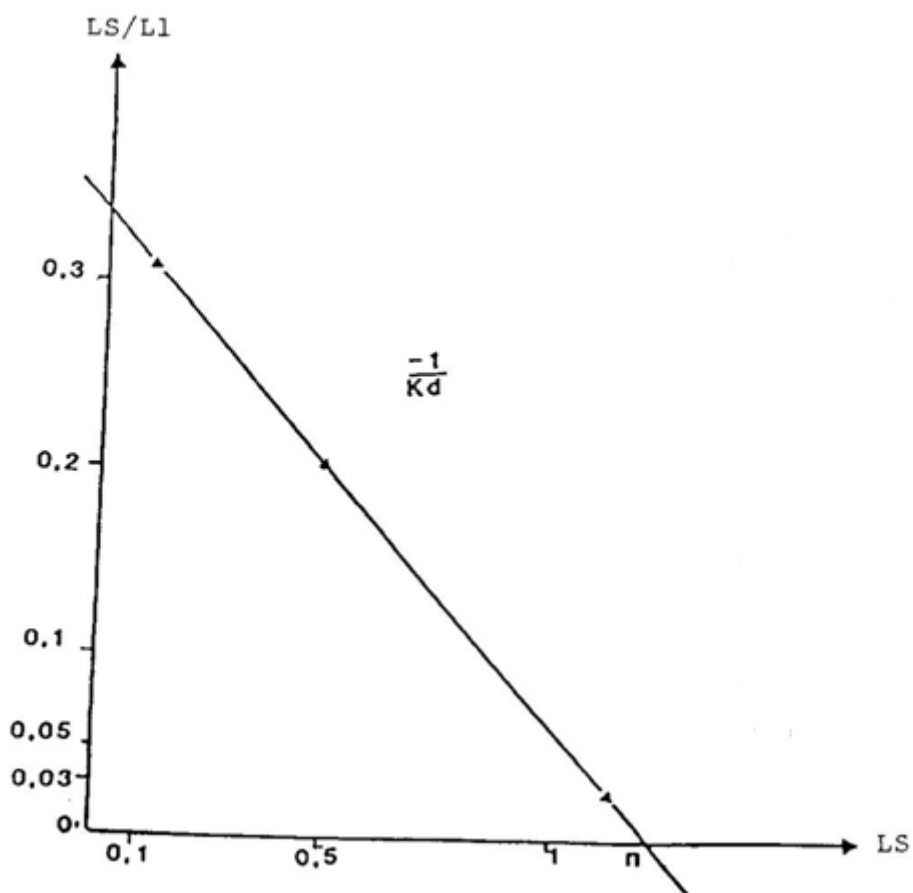


Figure 28 b : Détermination de la constante de dissociation (K_d) des sites récepteurs du tamoxifène par la méthode de Scatchard.

$$K_d = 0.25 \text{ Nm}$$

$$n = 295 \text{ fmol/mg protéines}$$

Abcisse = liaison spécifique

Ordonnée = Rapport lié/libre

K_d = Constante de dissociation

n = nombre de sites de liaison

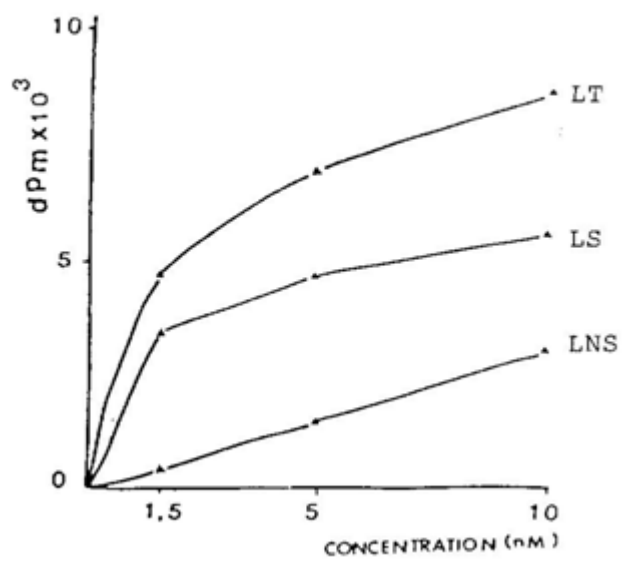


Figure 29 a : Courbe de saturation du récepteur de Txf des cellules K562 résistantes par des concentrations croissantes de tamoxifène froid.

LT= Liaison totale

LS= Liaison spécifique

LNS= Liaison non spécifique

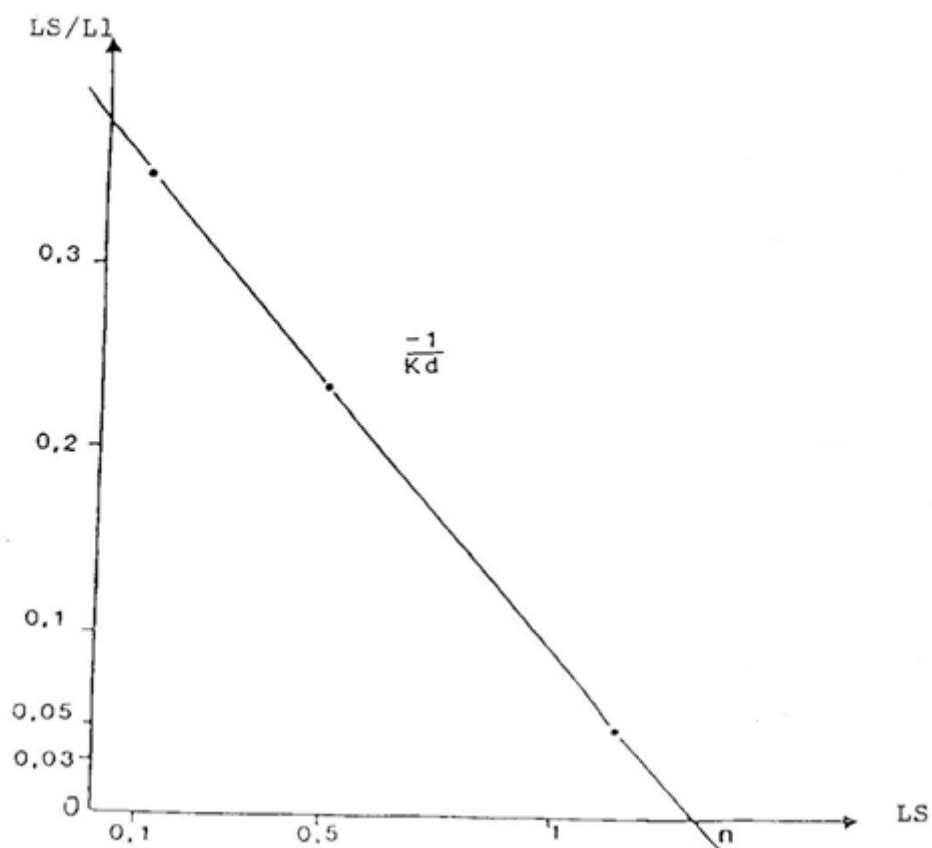


Figure 29b : Détermination de la constante de dissociation (Kd) des sites récepteurs du tamoxifène par la méthode de Scatchard.

$Kd = 0.35 \text{ nm}$

$n = 477 \text{ fmol/mg protéines}$

Abcisse = liaison spécifique

Ordonnée = Rapport lié/libre

Kd = Constante de dissociation

n = nombre de sites de liaison.

TABLEAU XII : Quantification du nombre de sites liant les oestrogènes et le tamoxifène dans les cellules K562 sensibles et résistantes à 10^{-7} M d'ADM.

	Récepteurs (fmol/mg protéines)	
	Oestrogènes	Tamoxifène
K562	0.02	295
K562/R ⁻⁷	0.015	477

C-ACTION DU TAMOXIFENE SUR LA RESISTANCE A L'ADRIAMYCINE

I- DETERMINATION DE LA DI50 DE L'ADN ET DE L'INDICE DE RESISTANCE (IR)

Une étude de la DI50 et de l'indice de résistance (IR) a été effectuée sur les cellules sensibles et résistantes à différents temps d'élaborations de la souche résistante (Tableau XII) la DI50 des cellules sensibles est relativement stable (6nM à 48 heures) alors que celle des cellules résistantes augmente en fonction du temps, elle passe de 80nM (les cellules résistent à la dose de 10nM) à 2500 nM (la souche est résistante à une dose de 10^{-7} M) ce qui correspond à des IR de 18 et 479 respectivement.

II- ETUDE DE LA REVERSIBILITE DE LA RESISTANCE A L'ADM PAR LE TAMOXIFENE ET SES METABOLITES DANS LES CELLULES K562/R-7

L'effet du Txf et de ses métabolites a été étudié dans les cellules K562 sensibles et résistantes à l'ADM. Nous observons qu'à des concentrations qui n'inhibent pas la croissance cellulaire (10^{-7} M) le Tx , l'hydroxy-Txf et déméthyl-Txf augmentent la sensibilité à l'ADM des cellules résistantes, mais sans aucun effet sur les cellules sensibles.

1. Détermination de la sensibilité à l'ADM

La sensibilité des 2 lignées cellulaires à l'ADM est déterminée en cultivant les cellules en présence de concentrations variables d'ADM et de Txf et de ses métabolites (10^{-7} M).

Dans le tableau XIV, les doses inhibitrices 50 (DI50) des cellules sensibles sont comparées à celles des cellules résistantes. On constate qu'en présence des doses non Inhibitrices de Txf et de ses dérivés, il y a une remarquable augmentation de la sensibilité à l'ADM des cellules K562 résistantes. La DI50 des cellules résistantes à l'ADM est réduite de 2400 nM en absence de :

- Txf à 1000 nM en sa présence ;
- L'OH-Txf à 400 nM en sa présence ;

- deMe-Txf à 2000 nM en sa présence.

Tableau XIII : Etablissement de la population de cellules K562 résistantes à l'ADN

Evolution de la DI50 à 48 heures mesurées en fonction du temps et calcul de l'indice de résistance (IR) comme décrit dans Matériels et Méthodes.

Age de la souche résistante	DI50 (nM à 48 heures)		IR
	Cellules sensible	Cellules résistantes	
J 179	4.5	80	18
J 267	7	280	40
J 383	7.2	1600	222
J412	6	2500	479

Tableau XIV : Réversibilité de la résistance à l'ADN des cellules K562 après traitement par le tamoxifène et ses métabolites

Drogues	DI50 (nM à 48 heures)		IR
	Cellules sensibles	Cellules résistantes	
ADM	6	2400	400
ADM + OH -Txf (10^{-7} M)	8	400	50
ADM + Txf (10^{-7} M)	8	1000	125
ADM + deMe-Txf (10^{-7} M)	10	2000	200
ADM + cis-Txf (10^{-7} M)	10	3000	300

2. Accumulation intracellulaire de ^{14}C ADM (Figure 30)

Les résultats de l'incorporation de ^{14}C ADM sont représentés sur la Figure 30. L'accumulation en 1 heure de ^{14}C ADM à 10^{-6} M est de 15 ± 5 pmol/ 10^6 cellules dans les K 562/R⁻⁷ contre 32 ± 5 pmol/ 10^6 cellules dans les K562 sensibles.

Quand les 2 lignées cellulaires sont co-incubées avec le Txf à 10^{-7} M et la ^{14}C ADM à 10^{-6} M, l'accumulation intracellulaire de l'ADN dans les cellules résistantes augmente elle passe à 29 ± 5 pmol/ 10^6 cellules mais reste inchangée dans les cellules K562 sensibles.

Enfin, lorsque ces cellules sont pré-incubées 2 heures avec le Txf à la dose de 10^{-7} M et traitées ensuite avec l'ADM radiomarquée à 10^{-6} M, l'accumulation de ^{14}C ADM dans les cellules K562 /R⁻⁷ (28 ± 3 pmol/ 10^6 cellules) reste stable.

Il n'y a toujours aucun changement dans les cellules sensibles.

3. Etude de l'ADM lié au milieu cellulaire après efflux (Figure 31)

La sortie de l'ADM est étudiée en incubant d'abord pendant 1 heure les 2 lignées cellulaires avec ^{14}C ADM est étudiée en incubant d'abord pendant 1 heure les 2 lignées cellulaires avec ^{14}C ADM à 10^{-6} M. Les cellules sont lavées 2 fois au PBS et laissées dans du milieu ne contenant pas l'ADM pendant 30 min. Après cette période, la radioactivité intracellulaire est mesurée. On constate que l'ADM retenue dans les K562 sensibles et résistantes après 30 min d'incubation dans du milieu sans ADM est de 51% et 38% respectivement (Figure 31).

La coincubation avec le Txf (10^{-7} M) et l'ADM froide 10^{-6} M augmente la rétention intracellulaire de la drogue à 70% dans les cellules sensibles. Par contre, après 30 min d'incubation dans le milieu contenant de Txf (10^{-7} M), la concentration intracellulaire d'ADM retenu par les cellules résistantes est de 50%.

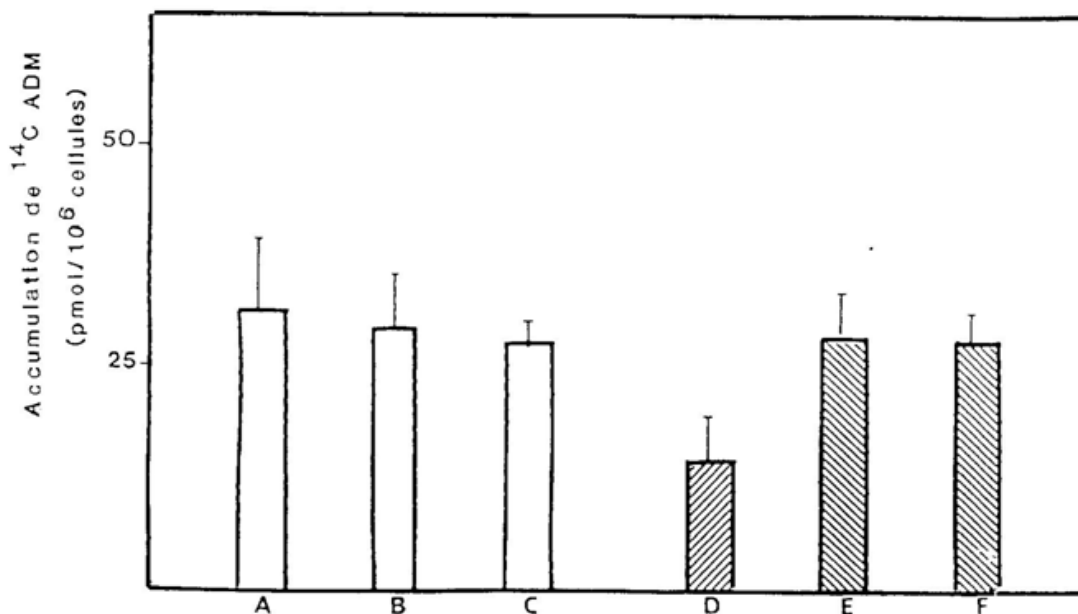


Figure 30 : Etude de l'accumulation de l'ADM* dans les cellules K562 sensibles et résistantes incubées 1h en présence d'ADM (^{14}C).

Cellules sensibles A : ADM* seule

B : Coïncubation ADM* 10^{-6} Met Txf 10^{-7} M

C : Préincubation Txf 2 heures

Cellules résistantes D : ADM* seule

E : Coïncubation ADM* 10^{-6} Met Txf 10^{-7} M

F : Préincubation Txf 2 heures

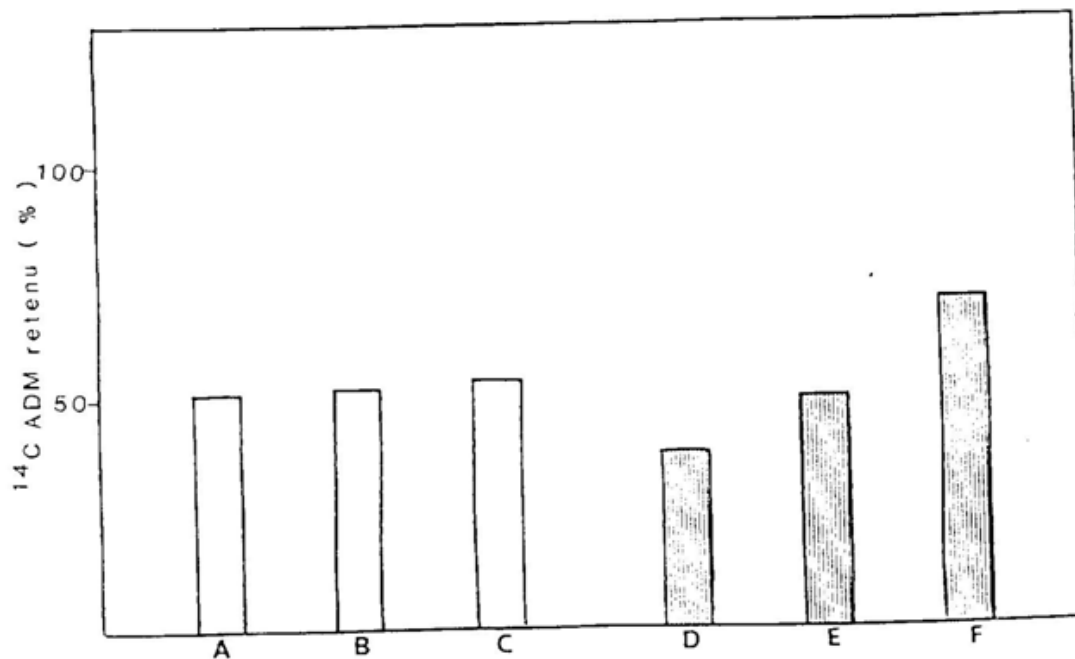


Figure 31 : Etude de l'accumulation de l'ADM dans les cellules K562 sensibles et résistantes incubées 1h en présence d'ADM puis traitées 30 minutes selon les modalités suivantes :

Cellules sensibles A : Milieu de culture seul

B : Txf 10^{-7} M dans le milieu de culture

C: Co-incubation ADM 10^{-6} M et Txf 10^{-7} M

Cellules résistantes D : Milieu de culture seul

E : Txf 10^{-7} M dans le milieu de culture

F: Co-incubation ADM 10^{-6} M et Txf 10^{-7} M

DISCUSSION

L'ensemble de notre travail peut se résumer en 2 thématiques qui suscitent actuellement un nombre important de travaux en cancérologie :

- La dissémination tumorale et le rôle que peuvent y jouer certains enzymes de dégradation de la matrice intercellulaire et en particulier les collagénases.
- La résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie par les anthracyclines et les manœuvres pharmacologiques qui permettraient de retarder ou de contrecarrer cette résistance.

Dans ces deux cas, nous avons pu utiliser un effecteur pharmacologique commun, le tamoxifène et y caractériser des propriétés nouvelles et prometteuses. Nous avons ainsi apporté une meilleure connaissance de ce produit dont les activités biologiques débordent largement les seuls mécanismes anti-hormonaux.

I- ACTIVITE COLLAGENOLYTIQUE

1- Choix d'une méthode de dosage

Le dosage d'une activité enzymatique dans des cultures cellulaires nécessite une méthode sensible car le nombre et la diversité des expériences ne permet pas d'envisager des cultures de masse. Deux possibilités peuvent être envisagées : une méthode utilisant le collagène radiomarqué ou une méthode spectrofluorimétrique. La première solution a été écartée car elle nécessite :

- Soit un marquage in vivo du collagène suivi du sacrifice de l'animal, de l'extraction et de la purification du collagène. Nous avons écarté cette méthode en raison de sa complexité.
- Soit le recours à des réactifs commerciaux dont le coût est très important.

De plus la reproductibilité de cette méthode ne nous est pas apparue toujours parfaite, en raison du fait notamment que nous n'avons pas un système binaire simple Enzyme-Substrat, Collagénase-Collagène, mais que d'autres protéases étaient aussi présentes (ce point sera revu plus loin).

Nous avons finalement retenu la méthode spectrofluorimétrique proposée par H.W. Macartney et H. Tschesche (67). Cette méthode est suffisamment sensible pour ne nécessiter qu'une quantité réduite de cellules (10^6 cellules pour une détermination). Elle se prête bien aux dosages en série nécessités par notre expérimentation, de ce fait nous avons pu toujours effectuer les dosages en triplicate ce qui assure une bonne reproductibilité, les données qui illustrent de l'ordre de 2- 9 % ce qui peut être considéré comme satisfaisant.

Nous avons fait le choix d'un étalonnage par une gamme de glycine, amino-acide abondant du collagène, l'intensité de la dégradation de substrat étant exprimé arbitrairement par référence à cette gamme.

Nous avons montré que la linéarité de la technique avait une limite et dans ce cas, avec les cellules ayant une activité élevée (leucocytes par exemple), nous avons opéré une prise d'essai cellulaire réduite. Toutefois pour l'ensemble des dosages effectués avec les cellules K 562, nous n'avons jamais rencontré de difficultés.

2- Caractéristiques de l'activité collagénolytique

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les cellules K562 possèdent des enzymes qui dégradent le collagène de type I à pH 7,5. Ce pH optimum exclut la participation d'enzymes lysosomiales dans la dégradation du collagène car dans ce cas, le pH optimum se serait situé en zone acide.

Le rôle favorisant des ions Ca^{++} est conforme à ce qui a déjà été décrit dans le cas d'autres collagénases tissulaires, en particulier pour celles étudiées dans le cancer du sein (21) où la même concentration optimum a été trouvée.

Ces enzymes sont extraits facilement à partir des cellules elles mêmes comme pour les granulocytes (55). L'activité collagénolytique a été caractérisée dans 2 fractions cellulaires.

La première, cytoplasmique ou soluble, est présentée dans un surnageant à 100.000 g.

La deuxième, d'origine membranaire, triton extractible est obtenue après extraction du culot de centrifugation à 100.000g.

En outre, une activité est présente dans le milieu de culture extracellulaire.

La présence d'une activité d'une activité liée à la membrane a déjà été décrite par d'autres auteurs (21). D'autres travaux menés dans notre laboratoire avaient également mis en évidence une activité dans le cytosol d'un homogénat de tumeurs du sein. Toutefois,

Dans notre cas, en hoimogénéisant en l'absence de triton et en utilisant des congélations et décongélations successives, nous ne pouvons pas exclure totalement qu'une partie de l'activité collagénolytique ne soit associée à des granules, c'est pourquoi dans ce cas, nous préférons proposer le terme de localisation cytoplasmique plutôt que cytosolique.

Ces activités membranaires et cytoplasmiques représentent environ 40 % et 60 % l'activité cellulaire totale. Les résultats obtenus soit sur cellules totales, soit après fractionnement satisfaisant ses résultats (Tableaux XVI).

De plus une partie importante de cette quantité est variable, notamment en fonction de la croissance cellulaire, mais elle peut représenter une activité égale à celle présente à l'intérieur de la cellule (tableau XVI). Dans l'hypothèse d'un rôle de ces enzymes dans la dissémination, le potentielle agressif de la K562 serait donc assez important.

Nous avons également montré que, in vitro, l'activité collagénolytique est augmentée par la trypsine. Ce résultat est conforme à ce qui a déjà été observe avec d'autre modèles cellulaires (35).

Deux interprétations ont été discutées : soit dégradation d'un inhibiteur soit activation d'un proenzyme par protéolyse ménagée. C'est cette dernière hypothèse qui est généralement acceptée. Les enzymes relargués ne sont pas activés par la trypsine, ce qui suggère que la cellule K 562 a une partie de son activité sous forme d'un précurseur qui est activé et libéré dans le milieu extracellulaire.

Dans toutes nos expérimentations nous n'avons jamais pu mettre en évidence de précurseurs dans le milieu de culture qui, pour ce type de mesure, est toujours un milieu synthétique afin d'éviter l'effet inhibiteur du sérum bovin fœtal. Il semblerait donc que l'étape d'activation soit toujours un événement concomitant de l'excrétion de l'activité enzymatique.

Les extraits enzymatiques des K 562 ne scindent pas en un point spécifique la triple hélice du collagène en 2 peptides : TCB (75 % de la molécule), TCA (25%) ; mais en plusieurs points libérant de nombreux polypeptides et provoquant une hydrolyse très complète du collagène. Cette observation est un accord avec les travaux de Lazarus et ses collaborateurs (54) sur les extraits de K562 laissent penser que les fragments spécifiques provenant de l'hydrolyse du collagène par une collagénase sont ensuite rapidement dégradés par des protéases neutres. *In vivo*, ils peuvent être aussi phagocytés et détruits dans d'autre système (24). Cette hypothèse semble se vérifier car des expériences réalisées en remplaçant le collagène de type I par la sérum albumine bovine (BSA) comme substrat, elles montrent que les cellules K562 ont une activité protéolytique de $0,33\text{mU}/10^6$ cellules alors que si on utilise le collagène I, l'activité collagénolytique est de $0,66\text{ mU}/10^6$ cellules. La présence inévitable de ces protéases complique évidemment l'utilisation de notre modèle expérimental.

Notre but étant d'évaluer une activité agressive, globale, de la cellule cancéreuse vis-à-vis d'un substrat naturel. De plus, le suivi de la cinétique de cette activité dans diverses situations physiologiques ou pharmacologiques impliquait un très grand nombre de mesures. Il était donc impossible d'envisager, à chaque fois, une extraction et une purification de la collagénase. Pour ces deux raisons, nous avons donc plus mesuré une activité collagénolytique globale que dosé une collagénase pure.

La présence de ces diverses protéases pose aussi le problème de la stabilité des extraits cellulaire en raison du risque d'autolyse. Le tableau VI qui indique les résultats de l'activation tryptique montre bien aussi que les protéases en excès peuvent faire disparaître une partie de l'activité protéolytique. C'est pour cette raison que, comme d'autres auteurs (16) nous avons choisie de stabiliser l'homogénat cellulaire par l'addition d'un inhibiteur des protéases, ici le PMSF qui inhibe les serine-protéases. Son action permet, d'une part d'éviter la dégradation des enzymes collagénolytiques lors de leur préparation et d'autre part, de diminuer l'interférence des protéases non spécifiques lors de la dégradation du collagène. En l'absence de PMSF, la dégradation du collagène paraît augmentée artificiellement de 50 % ($0,90\text{ mU}/10^6$ cellules au lieu de $0,60$, ceci traduisant la dégradation plus poussée des peptides issus du collagène). Pour nous l'addition de PMSF a assuré des mesures toujours reproductibles et permettant de mettre en évidence l'action de divers effecteurs pharmacologiques ou biologiques.

En conclusion, notre propos était de mesurer la totalité du pouvoir agressif de la cellule K562 vis-à-vis du collagène fibrillaire. Nos mesures ne reflètent pas l'action d'une collagénase pure mais celle d'un ensemble d'enzymes : collagénase + protéase (s). C'est pourquoi nous avons utilisé le terme d'activité collagénolytique. Parmi ces enzymes il pourrait se trouver une gélatinase, non inhibée par le PMSF et qui peut agir en synergie avec une collagénase (76bis).

Une autre enzyme qui appartient au même groupe de métalloprotéinase que la collagénase et la gélatinase est la stromélysine (18bis) qui est activable par la trypsine et non inhibée par le PMSF. Son activité sur le collagène I paraît limitée à 37° C, il est peu probable qu'elle ait pu interférer notamment.

3- Modification au cours de la différenciation érythroïde

L'activité collagénolytique est modifiée au cours de la différenciation érythroïde des cellules K562. En effet, plus la cellule est différenciée vers la voie érythroïde, moins elle produit les enzymes collagénolytiques. Cette relation est confirmée en utilisant 2 types de clones différemment hémoglobinisés. Les clones 19 et G qui sont respectivement très fortement et très faiblement hémoglobinisés. On constate que l'activité collagénolytique dans le clone 19 à caractère érythroïde marquée est faible par rapport aux cellules témoins. Par contre, l'activité enzymatique est augmentée dans le clone G à caractère érythroïde faible mais qui est plus orientée vers la voie granulocytaire comme le montre son taux élevé de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines. Dans l'ensemble de la lignée K562, c'est vraisemblablement la sous population plus orientée vers la lignée granulocytaire qui est responsable de l'essentiel de l'activité.

L'altération de l'activité collagénolytique peut aussi être obtenue après induction de la différenciation érythroïde par l'hémine. A la dose de 40 uM la pendant 3 jours, on obtient sur la totalité d'une population de cellules K562 des résultats analogues à ceux du clone 19. D'autre part, l'expérience de longue durée décrite dans la figure 22 montre que l'on peut atteindre une limite inférieure de l'activité collagénolytique mais que les effets de l'hémine sont totalement réversibles, tant sur la différenciation que sur l'activité collagénolytique.

Par contre, il faut signaler que stimulation de la synthèse d'hémoglobine et inhibition de l'activité collagénolytique ne sont pas obligatoirement associés puisque avec l'adriamycine, connue pour son activité différenciante (43), on n'observe aucune action vis-à-vis des enzymes.

4- Inhibition par le tamoxifène et ses dérivés

L'activité collagénolytique est inhibée par des effecteurs classiques tels que la cystéine ou le sérum mais c'est le pouvoir inhibiteur du Txf et de ses métabolites qui nous paraît le plus intéressant.

A des concentrations faibles, de l'ordre de 10^{-8} M à 10^{-6} M, le Txf diminue l'activité collagénolytique totale des cellules K 562. Pour un temps de culture donné, cette propriété est

dépendant de la dose. Pour une concentration donnée, elle est dépendante de la durée d'incubation.

Des dérivés métaboliques du Txf tels l'hydroxy-Txf ou le N-déméthyl-Txf, présentent cette même propriété mais le dérivé cis est lui beaucoup moins actif, ce qui indiquerait que le phénomène est surtout lié à la configuration stérique des noyaux aromatiques.

Nous avons développé nos expériences principalement avec le tamoxifène puisque c'est la forme qui est utilisée en clinique actuellement et qui, in vivo, conduit aux deux autres composés actifs.

Le tamoxifène n'agit pas sur les cellules par un mécanisme anti-hormonal comme dans certains cancers du sein puisque les cellules K562 ne renferment pas de récepteurs d'œstrogènes.

Le mécanisme d'action ne peut pas être non plus cytotoxique puisque le tamoxifène et ses dérivés, à la concentration de 10^{-7} M pendant 3 jours, n'inhibent pas la croissance cellulaire alors que les activités enzymatiques sont diminuées de 65 à 75 %.

Il ne peut s'agir non plus d'une inhibition in vitro du Txf sur les protéases puisqu'il a été vérifié que, dans les conditions du dosage en tube à essai, le Txf et ses dérivés à la concentration finale de 10^{-6} M sont dépourvu d'action significative.

Une autre hypothèse serait que les produits accélèrent le relargage des enzymes dans le milieu extracellulaire, diminuant ainsi les résultats trouvés dans les cellules. Mais en fait, aucun résultat de ce type n'a pu être mis en évidence puisque les activités trouvées dans le milieu extracellulaire sont, elle aussi, diminuées en présence des effecteurs.

Cette variation de l'activité collagénolytique n'est pas non plus la conséquence d'une induction de la différenciation comme ce qui est observé dans le cas l'hémine. Nous avons vérifié en effet que le tamoxifène et ses dérivés n'ont aucune action différenciante pendant toute la durée de leur contact avec les effecteurs (presque 3 jours), le nombre de cellules benzidine-positives n'est pas augmenté.

Nous avons aussi envisagé l'hypothèse d'une inhibition globale des synthèses protéiques mais la dose non cytotoxique de Txf, OH-Txf, cis-Txf (10^{-7} M) produit une inhibition de l'activité collagénolytique de 70 %, 74 %, 66 % respectivement au bout de 3 jours de culture alors que dans les mêmes conditions, la synthèse protéique totale n'est inhibée que de 20 %, 30%, 13 %, et 11% .

Il y a donc une discordance très grande entre les deux effets mesurés.

Finalement, et si on ne peut exclure une action sélective du niveau de la synthèse enzymatique, l'explication la plus vraisemblable pourrait être trouvée dans une observation de wakeling (99) qui a montré que le tamoxifène pouvait inhiber l'activateur tissulaire du plasminogène. La formation de plasmine pourrait se trouver ainsi inhibée, or il a été décrit que

cette plasmine pouvait, dans les cellules tumorales notamment, activer la conversion de procollagénase en collagénase.

II – RESISTANCE A L'ADRIAMICINE

1- Diminution de l'index de résistance

Nous avons montré que dans la sous population de cellules K562 ayant acquis une résistance à l'ADM, le Txf et l'OH-Txf peuvent augmenter la sensibilité de cette drogue. Cet effet est observé à des concentrations qui n'affectent pas la croissance cellulaire et est limité aux cellules résistantes ; elle ne peut être obtenu dans les cellules sensibles.

Les DI50 de l'adriamycine sur des cellules sensibles ne sont pas changées alors que les index de résistance des cellules, sur lesquelles l'ADM devient efficace, retourne vers des valeurs plus faibles.

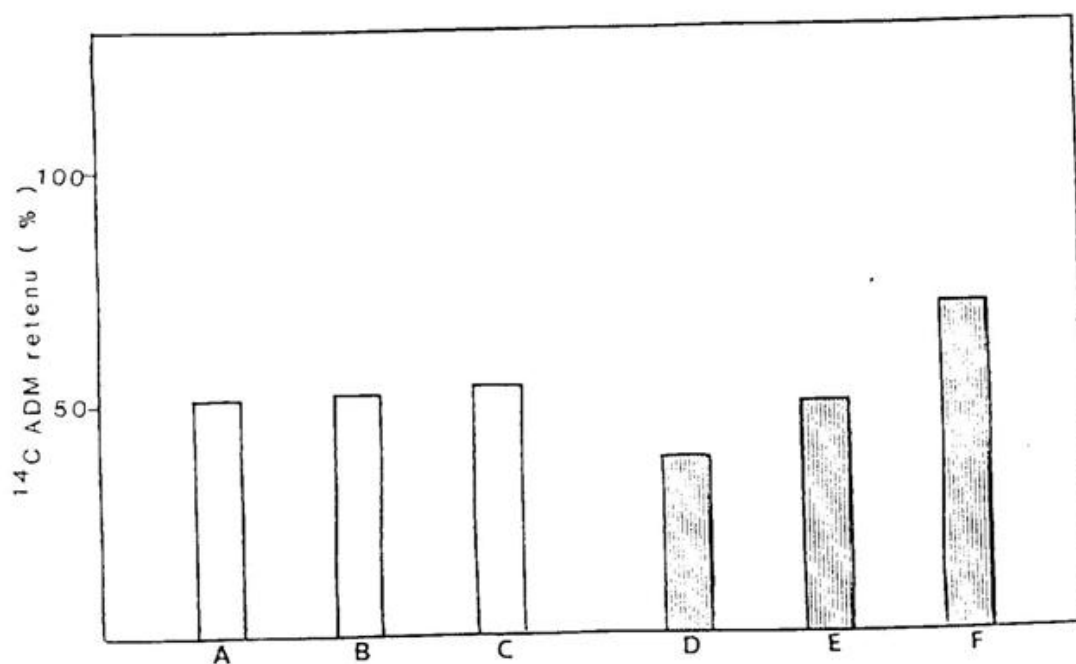
Nous obtenons ainsi des résultats comparables avec ceux des inhibiteurs calciques comme le vérapamil. Toutefois, il faut souligner que les médicaments de ce type n'ont pu être utilisés en clinique car les concentrations actives étaient trop élevées. Par contre, les quantités nécessaires de tamoxifène pourraient d'après notre étude, être facilement reproduites chez l'Homme. L'application clinique paraît ainsi parfaitement réalisable.

2- Actions sur l'incorporation de l'adriamycine radiomarquée

La raison la plus logique pour expliquer la levée de la résistance est d'envisager une augmentation de la concentration intracellulaire en ADM. Pour vérifier cela, nous avons incubé des cellules K562 sensibles et résistantes en présence d'adriamycine radiomarquée. Nous avons utilisé des temps d'incubation longs car notre but n'était pas de mesurer un transport membranaire mais de vérifier la concentration de médicament dans un état d'équilibre avec le milieu extérieur.

Nos résultats montrent que le tamoxifène augmente l'incorporation de l'adriamycine mais uniquement dans les cellules résistantes. Les concentrations intracellulaires qui sont alors atteintes sont proches de celles trouvées dans les cellules sensibles et ce résultat peut être rapproché de ceux trouvés pour l'effet cytotoxique : seule la réponse des cellules résistantes est modifiée par le tamoxifène qui reste sans action sur les cellules sensibles.

Les expériences faites en pré-incubant des cellules résistantes avec le tamoxifène n'apportent aucune amélioration sur l'entrée d'ADM dans la cellule. Ceci peut s'expliquer soit par le fait que le tamoxifène agit très rapidement sur un système d'influx, soit qu'il agit sur une étape postérieure à cet influx. Comme plusieurs effecteurs, tels le vérapamil, sont réputés agir sur l'efflux (97), nous avons voulu vérifier ceci pour le tamoxifène.



3- Action du tamoxifène sur l'efflux de l'ADM

Après avoir chargé les cellules sensibles et résistantes en ADM radiomarquée, nous avons mesuré la quantité d'ADM résiduelle dans les cellules après 30 mn d'incubation dans des milieux sans effecteurs, ou en présence de tamoxifène ou d'adriamycine.

Nous avons constaté que les quantités d'ADM retenue par les cellules sensibles étaient, en pourcentage, 2 fois plus importantes que dans les cellules résistantes. Mais en fait, comme ces dernières avaient incorporé moins de médicament, le rapport des concentrations S/R, après 30 minutes d'efflux est voisin de 4.

Nos résultats sur les mesures d'efflux sont tout à fait comparables à ceux de K. ROSS au laboratoire de Z.A.TOKES, USA ; Los Angeles, avec lequel nous collaborons. Ses résultats sur les cellules L 1210 sont du même ordre de grandeur (communication personnelle, thèse ph. D en cours).

Le mécanisme exact de l'action du tamoxifène sur la résistance paraît ainsi être encore difficile à préciser. Une explication pourrait se trouver dans l'action inhibitrice du tamoxifène sur la protéine kinase C (78). Il pourrait en résulter l'inhibition de phosphorylations intracellulaires dont celle de la GP. 180, glycoprotéine phosphorylée qui est impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses à l'ADM.

Quoi qu'il en soit, nos résultats sont encourageants pour de futures applications cliniques, et notamment on peut espérer que dans les cancers du sein, l'administration combinée d'ADM et de tamoxifène pourrait retarder l'apparition d'une résistance. Les données pharmacocinétique des 2 produits et notamment la demie-vie beaucoup plus longue du tamoxifène (4-7 heures au lieu de quelques minutes pour l'ADM) permettraient de réaliser

un environnement favorisant l'influx et inhibant l'efflux d'adriamycine des cellules résistantes.

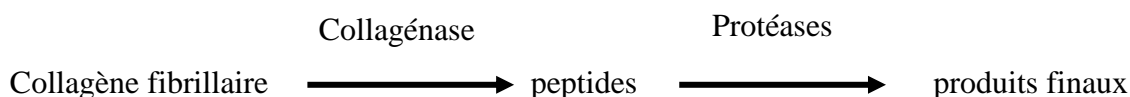
Il faut toutefois signaler que le problème de l'adriamycino-résistance ne peut se résumer à un simple phénomène d'efflux membranaire. Les résultats des expériences menées actuellement dans notre laboratoire démontrent qu'au moins deux autres faits doivent être pris en considération :

- Une distribution intracellulaire différente dans les populations sensibles et résistantes.
- Une morphologie différente avec notamment une texture chromatinienne particulière des cellules résistantes qui peut être révélée par l'analyse d'image quantitatives.

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, chez les cellules leucémiques humaines K562, nous pouvons affirmer :

- Qu'il existe une activité collagénolytique déterminée par une technique à la fluorescamine.
- Que d'autres protéases participent à l'hydrolyse de la molécule de collagène jusqu'au stade des produits finaux.
- Pour le moment le schéma qui suit est proposé :



L'enzyme existe sous une forme latente activable par la trypsine, et est relarguée à l'extérieur.

Cette activité est intermédiaire entre les cellules exprimant des caractères granulocytaires comme les granulocytes du sang circulants, les cellules promyelocytaires humaines HL60, le clone de K562 possédant des récepteurs Fc pour les IgG (clone G) et les cellules à caractères érythroïde marqué (clone 19). Les résultats obtenus suggèrent que c'est la sous population de cellules K562 préférentiellement engagée vers la voie granulocytaire qui est responsable de l'activité collagénolytique.

Après induction par l'hémine, on observe dans la K562 une stimulation de la synthèse d'hémoglobine et une diminution de l'activité collagénolytique. Cet effet est réversible. Par contre, l'activité enzymatique n'est pas affectée par l'ADM ce qui confirme l'aspect "pseudodifférenciant" de la drogue. Pour nos futurs travaux sur des drogues anticancéreuses différenciantes, il paraît intéressant d'utiliser le dosage de l'activité collagénolytique des cellules K562 comme critère d'évaluation.

En plus, ces résultats suggèrent que l'induction d'un processus de différenciation des cellules tumorales peut aider à la régression de certaines propriétés indésirables telles que le processus d'invasion. Cela souligne l'intérêt de la chimiothérapie différenciante qui induit la différenciation de la cellule maligne plutôt que la destruction de celle-ci.

La Txf connu pour ces propriétés antioestrogéniques et ne stimulant pas la synthèse d'hémoglobine dans la K562 exerce un fort pouvoir inhibiteur de l'activité collagénolytique. Ses métabolites l'hydroxy-Txf et le N-demethyl-Txf sont également des puissants inhibiteurs. Ces effecteurs pourraient donc être utilisés pour leur propriétés anti-collagénolytique dans une visée antimétastasiante.

En plus de ses propriétés anti-hormonales et anti-enzymatique, le Txf agit en augmentant la concentration d'ADM dans les cellules K562 résistantes à l'ADM et cet effet est limité aux cellules résistantes et paraît dû à un ralentissement de l'efflux de la drogue.

La mise e évidence de nouvelles propriétés du tamoxifène nous paraît importante puisqu'elle ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques. On peut d'ailleurs se demander si certaines réponses favorables rapportées dans la littérature sur des patientes sans récepteurs

hormonaux dans leurs tumeurs ne pourraient pas être rapportées aux propriétés que nous avons décrites.

Des découvertes toutes récentes permettent d'ailleurs de proposer une théorie unitaire pour toutes les propriétés du tamoxifène.

Le tamoxifène agirait sur les cellules oestrogéno-dépendantes comme le MCF 7 en induisant la maturation d'une forme inactive de TGF β en une forme active (51).

Le TGF β est connu pour son action antiprotéasique, notamment en favorisant la libération de Plasminogene Activator Inhibitor (PAI).

Cette diminution du "potentiel protéolytique" de la cellule pourrait diminuer l'activité de la protéine Kinase C qui, on le sait, peut être activée : par le diacylglycérol, par les esters du phorbol, ou par une protéolyse.

Le vérapamil et les inhibiteurs de la calmoduline augmentent la concentration intracellulaire des anthracyclines dans les cellules résistantes, les deux observations méritent d'être rapprochées. Elles signifient que le tamoxifène peut entraîner une accumulation des anthracyclines dans les cellules résistantes.

Une telle théorie n'est encore bien évidemment qu'une hypothèse mais il nous paraissait important de citer ces données qui pourraient ouvrir la voie à des nouvelles chimiothérapies anticancéreuses.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON L.C., NILSON K., GAHMBERG C.G.,
K 562 – A human erythroleukemic cell line.
Int. J. Cancer, 1979, 23, 143-147.
2. BARSON J.R., ABELL N.S., REED D.J.,
Protective role of the glutathiol redox cycle against adriamycine-mediated cytotoxicity
in isolated hepatocytes.
Biochem. Pharmacol., 1981, 30, 2299-2304.
3. BACHUR N.R., GEE M.V.,
Microsomal reductive glycosidase.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1976, 197, 681-686.
4. BACHUR N.R., GORDON S.L., GEE. M.V.,
A general mechanism for microsomal activation of quinine
Cancer Res., 1978, 38, 1745-1750.
5. BAICI A., COHEN G., FEHR K., BONI A.,
A handy assay for collagenase using reconstituted
Anal. Biochem., 1980, 108, 230-232.
6. BAUER E.A., STRICKLIN G.P., JEFFREY J.J.,
Collagenase production by human skin fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 64, 232-240.
7. BAUER E.A.,
Abnormalities in collagenase expressions as in vitro markers for recessive dystrophic
epidermolysis bullosa.
J. Invest. Dermatol., 1982, 79, 105-108.
8. BIEDLER J.L., PETERSON R.H.F.,
Altered plasma membrane glycoconjugates of Chinese hamster cells with acquired
resistance to actinomycine D, daunorubicin, and vincristine.
In: Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents.
New-York: Academic press, Inc., 1981. pp 453-482.
9. BISWAS C., MORAN W.P., BLOCH K.J., GROSS J.,
Collagenolytic activity of rabbit V₂ carcinoma growing at multiple sites.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1978, 80, 33-38.
10. BLACK P.H.,
Shedding from the cell surface of normal and cancer cells.
Adv. Cancer Res., 1980, 32, 76-80.

11. BONAZOU-TZEDAKI S.A., SOHI M. , ARNSTEIN H.R.V. ,
Regulation of erythroid cell differentiation by haemin.
Cell Diff., 1981, 10, 267-270.
12. BOREL J.P., RANDOUX A., LE PEUCH C., VALEYRE J.,
Catabolisme des collagène.
In : Biochimie dynamique.
Paris : Maloine ; Montréal ; decarrie, 1987, pp 522-523
13. BORGA J.L., ROCHEFORT H.,
Effets et mécanismes d'action des anti-oestrogènes dans les cancers du sein.
Pathol. Biol., 1983, 31, 775-781.
14. BOYUM A.,
Isolations of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 1968, 21, 77-89.
15. CALENDI E., DI MARCO A., REGGIANI B., SCARPINATO B., VALENTINI L.,
On physic-chemical interactions between daunomycin and nucleic acids.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 103, 25-49.
16. CAWSTON T.E., MURPHY G.,
Mammalian collagenases.
In: Methods in Enzymology, Ed. By G.E. Perlmann.
New-York, London: academic Press, 1981, pp 712-723.
17. CENTER M.S.,
Evidence that adriamycin-resistance in Chinese hamster lung cells is regulated by
phosphorylation of a plasma membrane glycoprotein.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1983, 115, 159-166.
18. CHABNER B.A., CLENDENINN N.J., CURT G.A.,
Introduction to the symposium on cellular resistance to anticancer drugs.
Cancer Treat. Rep., 1983, 67, 855-857.
- 18 bis . CHIN J.R., MURPHY G., WERBZ.,
Stromelysin, a connective tissue degrading metallo endopeptidase secreted by
stimulated Rabbit Synovial Fibroblasts in parallel with Collagenase. Biosynthesis,
isolation, characterization and substrats.
J. Biol. Chem. 1985, 260, 12367-12376.
19. DABBOUS M.K., ROBERTS A.N., BRIKLEY B.,
Collagenases and neutral protease activities in cultures of rabbit VX-2 carcinoma.
Cancer Res., 1977, 37, 3537-3544.

20. DAYER J.M., BREAR D J., CHESS L., STEPHEN M.,
Participation of monocyte-macrophages and lymphocytes in the production of a factor that stimulates collagenase and prostaglandin release by rheumatoid synovial cells.
J. Clin. Invest., 1979, 64, 1386-1392.
21. DELVINCOURT C., JARDILLIER J.C.,
Hétérogénéité des collagène-peptidases dans les cancers du sein: action inhibitrice du tamoxifène.
Ann. Biol. Clin., 1982, 40, 605-606.
22. DI MARCO A., ARCAMONE F.,
Adriamycin and its mechanism of action.
In: International symposium on Adriamycin. Ed. By: Staquet M., Tagnon H., Kenis Y.,
Brussels: European Press Edikon, 1975. pp 11-24.
23. DERSDEN M.H., HEILMAN S.A., SCHMIDT S.D.,
Collagenolytic enzymes in human neoplasms.
Cancer Res., 1972, 32, 993-996.
24. DUANCE U.C., BAILEY A.,
Biosynthesis and degradation of collagen.
In: Glynn L.E., Tissue repair and regeneration.
Edinburgh; New York: Churchill Livingstone, 1981. pp 51-109.
25. EDMONDS-ALT X., QUISPUATER E., VAES G.,
Proteoglycan and fibrin degrading neutral proteinase activities of Lewis Lung Carcinoma cells.
Eur. J. Cancer, 1980, 16, 1257-1261.
26. EISEN A.Z., JEFFREY J.J., GROSS J.,
Human skin collagénase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 637-645.
27. EISENBACH L., SEGAL S., FELDMAN M.,
Proteolytic enzymes in tumor metastasis. Collagenase type IV activity in subcellular fractions of cloned tumor cell populations.
J. Natl. Cancer Inst., 1985, 74, 83-93.
28. GARBISA S., KNISKA K., RYGGVASON K., FOLTZ C., LIOTTA L.A.,
Quantitation of basement membrane collagen degradation by living tumor cells in vitro.

Cancer Lett., 1980, 9, 359-366.

29. GOODMAN J., HOCHSTEIN P.,
Generation of free radicals and lipid peroxydation by redox cycling of adriamycine and daunomycin.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 77, 797-803.
30. GOORMAGHTIGH E., CHATELAIN P., CASPERS J., RUYSSCHAERT J. M.,
Evidence of a specific complex between adriamycine and negatively charged phospholipids.
Biochim. Biophys. Acta, 1980, 597, 1-14.
31. GOWEN N., WOOD D.D., IHRIE E. J., MEATS J.E., RUSSEL G.G.,
Stimulations by human interleukin-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro.
Biochim. Biophys. Acta, 1984, 797, 186-193.
32. GRANT G.A., HENDERSON K.O., HEISEN A.Z., BRADSHAW R.A.,
Amino acid sequence of a collagenolytic protease from the hepatopancreas of a collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab, UCA Pugilator.
Biochemistry, 1980, 19, 4653-4659.
33. GRILLO H. C., Gross J.,
Collagenolytic activity during mammalian wound repair.
Dev. Biol., 1967, 15, 300-317.
34. GROSS j., LAPIERRE C.M.,
Collagenolytic activity in amphibians tissues. A tissue culture assay.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1962, 48, 1014-1022.
35. HARPER E.,
Collagenases.
Annu. Rev. Biochem., 1980, 49, 1063-1078.
36. HARRIS E. D. Jr., CARTWRIGHT E.L.,
Mammalian collagenases. In: Proteinases in mammalian cells and tissues, ed. By A. J. Barret., Amsterdam: North-Holland, 1980. pp 250-283.
37. HARRIS E.D., KRANE S.M.,
An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 258, 566-576.

38. HASHIMOTO K., YAMANISHI Y., MAEYENS E., DABBOUS M.K., KANZAKI T.,
Collagenolytic activities of squamous cell carcinoma of the skin.
Cancer Res., 1973, 33, 2790-2801.
39. HEUSON J.C., PASTEELS J., LEGUS N., HEUSON J., LECLERCQ G.,
Estradiol dependent collagenolytic enzyme activity in long term organ culture of human breast cancer.
Cancer Res., 1975, 35, 2039-2048.
40. HORTON M.A., CEDAR S.H., EDWARDS P.A.,
Expression of red cell specific determinants during differentiation in the K562 erythroleukaemia cell line.
Scand. J; Haematol., 1981, 27, 231-240.
41. IKEDA F., MURAWAKI Y., HIRAYAMA C.,
Collagenase activity in the granulocytes of patients with various liver diseases.
Clinica Chimica Acta, 1983, 135, 135-142.
42. INABA M., JOHNSON R.K.,
Uptake and retention of adriamycine and daunorubicin by sensitive and anthracycline resistant sublines of P 388 leukemia
Biochem. Pharmacol., 1978, 27, 2123-2130.
43. JEANNESSON P., GINOT L., MANFAIT M., JARDILLIER J.C.,
Induction of hemoglobin synthesis in human leukemic K562 cells by adriamycine.
Anticancer Res., 1984, 4, 47-52
44. JEANNESSON P., GINOT L., MANFAIT M., JARDILLIER J.C., TOKES Z.A.,
Cell surface-mediated differentiation in human K562 cells with polymer-bound adriamycin.
Anticancer Res., 1985, 5, 625-626.
45. KAO R.T., STERN R.,
Collagenases in human breast carcinoma cell lines.
Cancer Res., 1986, 46, 1349-1354.
46. KEIL B., GILLES A.M., LECROISEY A., HURINS N., TONY N.T.,
Specificity of collagenase from achromobacter iophagus.
FEBS Lett., 1975, 56, 292-296.

47. KESSEL D.,
Enhanced glycosylation induced by adriamycine.
Mol. Pharmacol., 1979, 16, 306-312.
48. KESSEL D.,
Interactions among membrane transport systems: anthracyclines, calcium antagonists and anti-estrogens.
Biochem. Pharmacol., 1986, 35, 2825-2826.
49. KITAMURA K., ITTO A., MORI Y.,
The existing forms of collagenase in the human uterine cervix.
J. Biochem., 1980, 87, 753-760.
50. KLEIN E., BEN BASSAT H., NEUMANN H., RALPH P., ZEUTHEN J.,
POLLIACK A., VANKY F.,
Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia.
Int. J. Cancer, 1976, 18, 421-431.
51. KNABBE C., LIPPMAN M.E., WAKEFIELD L.M., FLANDERS K.C., KASID A.,
DERYNCK R., DICKSON R.B.,
Evidence that transforming growth factor is a hormonally negative growth factor in human breast cancer cells.
Cell, 1987, 48, 417-428.
52. LAEMMLI U.K.,
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 1970, 227, 680-685.
53. LASKEY R.A., MILLS A.D.,
Quantitative film detections of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gel by fluorography.
Eur. J. Biochem., 1975, 100, 541-550.
54. LAZARUS G.S., BROWN R.S., DANIELDS J.R., FULLMER H.M.,
Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system.
J. Clin. Invest., 1968, 47, 2622-2629.
55. LAZARUS G.S., BROWN R.S., DANIELS J.R., FULLMER H.M.,
Human granulocyte collagenase.
Science, 1968, 159, 1483-1484.
56. LECROISEY A., KEIL B.,
Structural study on the active site of the collagenase from hypodermia lineatum.
Biochim. Biophys. Res. Commun., 1983, 112, 907-910.

57. LIOTTA L.A., TRYGGVASON K., GARBISA S., HART I., FOLTZ C.M., SHAFIA S.,
Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.
Nature, 1980, 284, 67-68.
58. LIOTTA L.A., ABE S., ROBEY P.C., MARTIN G.R.,
Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1979, 76, 2268-2272.
59. LIOTTA L.A., THORGLINSSON U.P., GARBISSA S.,
Role of collagenases in tumor cell invasion.
Cancer Metastasis Rev., 1982, 1, 277-288.
60. LIOTTA L.A., RAO C.N.,
Role of the extracellular matrix in cancer.
Ann. Ny. Acad. Sci., 1985, 460, 333-344.
61. LOYAU G., PUJOL J.P.,
Collagénases en rhumatologie.
Ann ; Biol. Clin., 1986, 44, 275-280.
62. LOWN J.W., SIM S.K., MAJUMDAR K.C., CHANG R.Y.,
Strand scission of DNA by bound adriamycine and daunorubicin in the presence of reducing agents.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 76, 705-710.
63. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FAAR A. L., RANDALL R. J.,
Protein measurement with the Folin phenol reagent:
J. Biol. Chem. 1993, 193, 265-275.
64. LOZZION B.B, MACHADO E.A, LOZZIO C.B.; ITCHELL J., WRUST C.J.,
Immunothérapie of metastases of human neoplastic cells grown in immunodeficient mice.
Cancer Immunol, Immunother, 1982, 12, 135-140.
65. LOZZIO B.B.; LOZZIO C.B.,
Properties and usefulness of the original k 562 human myelogenous leukemia cell line.
Leukemia Research, 1979, 3, 363-370.

66. LOZZIO. C.B; LOZZIO B.B.,
Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome.
Blood, 1975, 45, 321-33
67. MACARTNEY H.W., TSCHESCHE H.,
Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes and activations to collagegenase by removal of an inhibitor.
FEBS Lett., 1980, 119, 327-332.
68. MACARTNEY H.W., TSCHESCHE H.,
The metal ion requirement for activation of latent collagenase from human plymorphonuclear leucocytes.
Hope-Seyler's z. Physiol. Chem., 1981, 362, 1523-1531.
69. MARTIN P.M.,
Méthodes de détection et de quantification des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein.
Pathol. Biol., 1983, 31, 723-740.
70. MC CROSKEY P.A ; RICHARDS J.F., HARRIS E.D.,
Purifications and characterizations of a collagenase extrated from rabbit tumors.
Biochem, J., 1975, 152, 131-142.
71. MADOULET C., TRENTESAUX C., BENOIST H., REBEL G, DREYFUS H., JARDILLIER J.C.,
Evidence for sialidase activity, in K562 cells: inhibition by adriamycin treatment.
Cancer Biochem., Biophys., 1986, 9, 15-23.
72. MITSUHIRO YAMACIMURO, KOHJI HARE, HIROYOSHI NOHARA,
Collagenase activities in healthy and inflamed gingiva of dogs.
J. Periodont. Res., 1983, 18, 1-10.
73. MIZUMO N.S., ZAKIS B., DECKER R.W.,
Binding of dauorubicin to DNA and the inhibition of RNA and DNA synthesis.
Cancer Res., 1975, 35, 1542-1546.
74. MURGIKAR A., CHITNIS M., GOTHOSKAR B.,
Mixed function oxidase enzymes in Adriamycin-sensitive and resistant sublines of p 388 leukemia.
Chem. Biol. Interact., 1981, 35, 119-124.

75. MURPHREE S., TRITTON T.R., SMITH P.L., SARTORELLI A.C.,
Adriamycin-induced changes in the surface membrane of sarcoma 180 ascites cells.
Biochem. Biophys. Acta, 1981, 649, 317-324.
76. MURPHY G., REYNOLDS J.J., BRETZ U., BAGGIOLINI M.,
Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes.
Biochem. J., 1977, 162, 195-197.
- 76 bis. MURPHY G., Mc. ALPINE C.G., POLL C.T. and REYNOLDS J.J.
Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and
type IV and V collagene.
Biochim. Biophys. Acta. 1985, 831, 49-58.
77. NOËL G., PETERSON C., TROUET A., TULKENS P.,
Uptake and subcellular localization of daunorubicin and adriamycin in cultured
fibroblasts.
Eur. J. Cancer, 1978, 14, 363-368.
78. O'BRIAN C.A., LISKAMP R.M., SOLOMON D.H., WEINSTEIN B.,
Inhibition of protein kinase c by tamoxifen.
Cancer Res., 1985, 45, 2462-2465.
79. OHLSSON K., OLSSON I.,
The neutral proteases of human granulocytes.
Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenase.
Eur. J. Biochem., 1973, 36, 473-481.
80. OHLSSON K.,
Polymorphonuclear leucocyte collagenase.
In: collagenase in normal and pathological connective tissues.
Ed. By D.E. WOOLEY and J.M. EVANSON.
New York: J. Wiley, 1980. pp 209-221.
81. PUJOL J.P., BOCQUET J. BONAVENTURE J., HERON J.F., LOYAU G.,
Collagenase et enzymes liposomiales du liquide synovial au cours de la polyarthrite
rhumatoïde.
Rhumatologie (Paris), 1982, 12, 241-246.
82. RAMU A., FUKS Z., GATT S., GLAUBIGER D.,
Reversal of acquired resistance to doxorubicin in P388 murine leukemia cells by
perhexilline maleate.
Cancer Res., 1984, 44, 144-148.

83. RAMU A., GLAUBIGER D., FUKS Z.,
Reversal of acquired resistance to doxorubicin in P388 murine leukemia cells by tamoxifen and other triparanol analogues.
Cancer Res., 1984, 44, 4392-4395.
84. RECKLIES A.O., TILTMAN K.J., STOKER A.M., POOLE A.R.,
Secretion of proteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue.
Cancer Res., 1980, 40, 550-556.
85. RIORDON Jr, DEUCHARS K., KARTNER N., ALON N., TRENT J., LING V.,
Amplifications of P glycoprotein in multidrug mammalian resistant cell lines.
Nature, 1985, 316, 817-819.
86. ROBERT L., ROBERT J.L.,
Les macromolécules de la matrice extracellulaire.
Ann. Biol. Clin., 1986, 44, 145-151.
87. ROBERTS D.R., EVANSON J.M.,
Small molecular weight B1 serum protein which specifically inhibits human collagenases.
Nature, 1976, 261, 325-327.
88. RUTHERFORD T.R., CLEGG J.B., WEATHERALL D.J.,
K 562 human leukaemic cells synthesis embryonic haemoglobin in response to haemin.
Nature, 1979, 280, 164-165.
89. SAEZ S., CHOUVET C.,
Evidence for high affinity 3H-Tamoxifen cytosol binding protein (s) in a human cancer cell line MDA.MB 231 devoid of estrogen receptor.
Cancer Res., 1983, 24, 180-181.
90. SEIFTER S., GALLOP M.M., KLEIN L., MEHMAN E.,
Properties of purified collagenase and its inhibitors.
J. Biol. Chem., 1959, 234, 285-293.
91. STEVEN F.S., ITZHAKI S.,
Evidence for a latent form of collagenase extracted from rabbit tumour cells.
Biochim. Biophys. Acts, 1977, 496, 241-246.

92. SUTHERLAND R.L., MURPHY L.C., FOO M.S., GREEN M.D., WHYBOURNE A.M.,
High affinity antiestrogen binding site distinct from the estrogen receptor.
Nature, 1980, 288, 273-275.
93. SUTHERLAND J.A., TURNER R.A., MANNONI P., Mc GANN L.E., TURC J.M.,
Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage and megakaryocyte lineages.
J. Biol. Response Mod., 1986, 5, 250-262.
94. TAPIERO H., FOURCADE A., VAIGOT P., FARHI J.J.,
Comparative uptake of adriamycin and daunorubicin in sensitive and resistant friend leukemia cells measured by flow cytometry.
Cytometry, 1982, 2, 298-302.
95. TOKES Z.A., ROGERS K.E., REMBAUM A.,
Synthesis of adriamycin-coupled polyglutaraldehyde microspheres and evaluation of their cytostatic activity;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1982, 79, 2026-2630.
96. TRENTÉSEAUX C., LAPLACE B., MADOULET C., REBEL G., JARDILLIER J. C.,
Enhanced sialylation of the K562 cell surface membrane glycoconjugates induced by adriamycin.
Anticancer Res., 1987, 7, 187-192.
97. TSURUO T.,
Enhancement of vincristine and adriamycin induced cytotoxicity by verapamil in P388 leukemia and its sublines resistant to vincristine and adriamycin;
Biochem. Pharmacol., 1982, 31, 3138-3140.
98. VERELLE P.,
Biologie des métastases.
Bull. Cancer., 1986, 73, 349-352.
99. WAKELING A.E., SLATER S.R.,
Biochemical and biological aspects of anti-oestrogen action.
In Lewis G.P., *Mechanisms of hormones action*
New York: Mac-Millan Press, 1981, pp 159-171.
100. WERB Z., BURLEIGH M.C.,
A specific collagenase from rabbit fibroblasts in monolayer culture.
Biochem. J., 1974, 137, 373-385.

101. WILHEM S.M., JAVED T., MILLER R.C.,
Demonstration and initial characterization of a latent collagenase secreted by human gingival fibroblast.
J; Periodont. Res., 1983, 18, 11-22.
102. WILLINGHAM M.C., CORNWELL M.M., CARDARELLI C.O., GOTTESMAN M.M., PASTAN I.,
Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs.
Cancer Res., 1986, 46, 5941-5946;
103. WOOLLEY D.E.,
Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion.
Cancer Metastasis Rev., 1984, 3, 361-372.
104. WOOLLEY D.E., TETLOW L.C., MOONEY C.J., EVANSON J.M.,
Human collagenase and its extracellular inhibitors in relation to tumor invasiveness.
In: Proteinases and tumor invasion, Ed. By STRAULI P. et al., New York: Raven Press, 1980. pp 97-113.
105. WOOLLEY D.E., GRAFTON C.A.,
Collagenase immunolocalization studies of cutaneous secondary melanomas.
Br. J; cancer, 1980, 42, 260-265.
106. ZAGURY D., MORGAN D., LENVI G., FOUCARD M., FELDMAN F.,
Human normal C.T.L. clones: generations and properties.
Int. J. Cancer, 1983, 31, 427-430.
107. ZBARSKY I.B., PEREVOSHCIKOVA K.A., DELEKTORSKAYA L.N.,
DELEKTORSKY V. V.,
Tumor cell collagenase and its inhibition by a cartilage derived protease inhibitor.
Science, 1977, 196, 653-654.
108. ZUNINO F., GAMBETTA R., DI MARCO A.,
The inhibition in vitro of DNA polymerase and RNA polymerase by daunomycin and adriamycin.
Biochem. Pharmacol., 1975, 24, 309-311.

AKELI (Marie-Geneviève), épouse OKIEMY. Nouvelles propriétés de la lignée érythroleucémique humaine K562 : Activité collagénolytique et réversion de la résistance à l'adriamycine par le tamoxifène.

Marie-Geneviève AKELI, épouse OKIEMY. (1987)

Th : Pharm. : Univ. : REIMS : 1987, n°202

Résumé

Le traitement du cancer se heurte à 2 problèmes majeurs:

- 1) La dissémination tumorale
- 2) L'acquisition d'une résistance aux médicaments anticancéreux.

Il a été écrit par plusieurs auteurs que l'activité collagénolytique est impliquée dans le processus d'invasion tumorale. Dans cette optique, l'érythroleucémie humaine K562 est intéressante pour plusieurs raisons.

- Elle est multipotente, c'est-à-dire qu'elle possède des caractères à la fois érythroïde, mégacaryocytaire et granulocytaire. Elle est également capable de se différencier sous l'effet de certains inducteurs vers ces différentes voies.
- Elle induit des métastases chez la souris athymique.
- En présence continue d'adriamycine, elle développe des phénomènes de résistance.

Nos travaux ont montré que cette lignée possède une activité collagénolytique qui diminue en fonction de la différenciation érythroïde.

Cette activité est inhibée par le tamoxifène et ses métabolites. En outre, l'utilisation du tamoxifène à des doses non cytotoxiques, nous a permis de lever la résistance induite par l'adriamycine.

RUBRIQUE : BIOCHIMIE

Mots-clés :

- Collagénase
- Erythroleucémie humaine K562
- Différenciation érythroïde
- Tamoxifène
- Adriamycine, résistance

JURY

Président : Monsieyr J.C. JARDILLIER

Assesseurs : Monsieur C. BOHUON

 Monsieur J.P. BOREL

 Monsieur J. DUFER

 Monsieur P. SIRET

Adresse de l'auteur : Madame Marie-Geneviève OKIEMY
15, groupe Eisenhower 51 100 - REIMS