

N° d'ordre : 761

50376  
1988  
39

50376  
1988  
39

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Florence DELPLACE - DELHAYE



## **CIBLAGE CELLULAIRE DE MEDICAMENTS ANTITUMORAUX PAR GLYCOSYLATION. APPLICATION DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER A L'ETUDE DE LEUR INTERACTION AVEC LES CELLULES.**

Présentée le 11 Mars 1988 devant la Commission d'Examen

Président et Rapporteur :

Rapporteurs :

Examineurs :

J. MONTREUIL  
M. MONSIGNY  
J.C. MERLIN  
G. SPIK  
F. LAVELLE  
G. STRECKER



\*0300139441\*

UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE  
FLANDRES ARTOIS

---

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,  
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,  
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,  
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Économiques
M. GRIMBLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEBVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. MESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur J. MONTREUIL, dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille - Flandres Artois (Unité Associée au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure - fonction des constituants membranaires), dans le cadre d'un contrat de recherche avec la Société RHONE - POULENC, puis avec les Laboratoires CASSENNE.

Nous adressons à ces Sociétés nos plus vifs remerciements pour l'aide précieuse qu'elles nous ont accordée.

Le travail a été réalisé sous la direction de Monsieur  
M. MONTAUDO, dans le laboratoire de chimie organique  
de l'Université de Grenoble et financé par le Centre National  
de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.) N° 017 - 1. L'auteur  
tient à remercier Monsieur M. MONTAUDO pour son accueil et  
pour la confiance qu'il lui a témoignée. Il adresse ses  
vives remerciements à Monsieur M. MONTAUDO pour son accueil  
et pour la confiance qu'il lui a témoignée.

*A mes parents,*

*A Patrick et à Céline,*

*A toute ma famille,*

*en témoignage de mon affection*

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Vous avez bien voulu m'accueillir dans votre équipe, au sein du Laboratoire de Chimie Biologique et, après m'avoir confié ce sujet de recherche, vous m'avez permis de le développer en bénéficiant de vos conseils et de votre soutien.

Je vous remercie de votre confiance et vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. MONSIGNY

Votre présence dans ce jury témoigne de l'intérêt que vous avez bien voulu accorder à nos recherches. Je vous en suis reconnaissante et tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur J.C. MERLIN

Après m'avoir souvent fait bénéficier de votre expérience dans le domaine de la fluorescence, vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Je vous en remercie très sincèrement.

A Madame le Professeur G. SPIK

Vous m'avez accueillie quelques années au "103" et vous me faites maintenant l'honneur de juger ce travail. Permettez-moi de vous témoigner ma sincère gratitude.

A Monsieur F. LAVELLE, de la Société RHONE-POULENC

Je suis très honorée de votre présence dans ce jury et vous prie d'accepter mes plus vifs remerciements pour l'intérêt que vous voulez bien porter à ce travail.

A Monsieur G. STRECKER, Directeur de Recherches au C.N.R.S.

J'ai souvent apprécié votre grande compétence scientifique. Je suis heureuse de vous compter parmi les membres de ce jury et je vous en remercie vivement.

Mes remerciements s'adressent également

à Monsieur le Professeur M. DELHAYE pour l'expérience et les nombreux conseils dont il m'a fait bénéficier

à Monsieur E. DA SILVA, PDG de la Société DILOR, et à son équipe, pour leur accueil et leur compétence

aux membres du Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman de l'USTLFA, et en particulier à Messieurs J. BARBILLAT et B. LENAIN dont la collaboration et les conseils me furent précieux.

à l'ensemble du personnel du C9 et à tous ceux qui, de près ou de loin, par leur compétence, leur aide et leur amitié ont contribué à la réalisation de ce travail et à la présentation du mémoire.

## ABREVIATIONS

Ala : Alanine

Arg : Arginine

Asn : Asparagine

ASOR : Asialoorosomucoïde

BSA : Sérumalbumine bovine

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DMF : Diméthylformamide

DNR : Daunorubicine

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

Fuc : L-Fucose

Gal : D-Galactose

GalNAc : N-acétylgalactosamine

Glc : D-Glucose

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GpASOR : Glycopeptides de l'asialoorosomucoïde

HEPES : Acide N-2- hydroxyéthylpipérazine- N'-2- éthane sulfonique

Leu : Leucine

Lys : Lysine

Man : D-Mannose

NeuAc : Acide N-acétylneuraminique

SDS : Dodécylsulfate de sodium

Ser : Sérine

TLC : Chromatographie sur couche mince

Tampon DME : Tampon de pH 7,35, de composition ionique identique à celle du milieu DME (Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium, Gibco) additionné de 4,5 g/l de glucose et 10 mM HEPES

TRIS : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

WGA : Agglutinine de germe de blé

## TABLE DES MATIERES

	pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	
<u>TRANSPORT ET CIBLAGE DES MEDICAMENTS</u>	
INTRODUCTION	4
<u>CHAPITRE I : LES DIFFERENTS MODES DE CIBLAGE DES MEDICAMENTS</u>	8
I - LE CIBLAGE PAR ANTICORPS	8
A - <u>Les "immunodrogues"</u>	8
1 - Définition et intérêt du ciblage par anticorps	8
2 - Problèmes liés à la préparation et à l'emploi des immunodrogues	9
3 - Applications des immunodrogues	10
4 - Ciblage par anticorps d'agents antitumoraux	10
a - Couplage de la daunorubicine à des anticorps normaux ou antitumoraux	10
b - Apport des anticorps monoclonaux pour le ciblage de la daunorubicine	11
c - Ciblage d'autres agents antitumoraux	12
B - <u>Les immunotoxines</u>	12
1 - Définition et structure	12
2 - Préparation des immunotoxines	13
3 - Applications et intérêt des immunotoxines	13
a - Immunotoxines à anticorps spécifiques polyclonaux	15
b - Immunotoxines préparées à l'aide d'anticorps monoclonaux	15
c - Intérêt thérapeutique des immunotoxines	16
II - LES LIPOSOMES	16
A - <u>Structure et propriétés</u>	16
1 - Structure	16

	pages
2 - Propriétés	18
B - <u>Interaction des liposomes avec les cellules</u>	19
1 - L'endocytose	19
2 - La fusion	20
3 - L'adsorption	20
C - <u>Devenir in vivo des liposomes et des substances encapsulées</u>	20
liposomes	
1 - Facteurs intervenant dans la destinée des	20
2 - Libération des composés encapsulés	21
D - <u>Utilisation des liposomes pour le transport de principes actifs</u>	22
1 - Agents thérapeutiques divers	22
2 - Thérapeutiques antitumorale et antivirale	23
E - <u>Ciblage des liposomes</u>	27
III - AUTRES TRANSPORTEURS	28
A - <u>Macromolécules</u>	28
1 - Protéines et peptides	28
a - Transport sélectif par	28
conjugaison à l'albumine	
b - Ciblage par l'intermédiaire de	29
récepteurs spécifiques de protéines ou de peptides	
c - Transport par des petits	31
peptides; notion de prodrogues	
2 - Lectines	32
a - Propriétés et intérêt pour le	32
ciblage	
b - Exemples de ciblage par des	33
lectines	
3 - Acide désoxyribonucléique	33
4 - Dextrans	34
B - <u>Transporteurs cellulaires</u>	35
1 - Les érythrocytes	35
2 - Autres cellules	36

	pages
C - <u>Transporteurs synthétiques (ou artificiels)</u>	36
1 - Cellules artificielles	36
2 - Polymères	36
3 - Microsphères	37
CHAPITRE II : <u>LE CIBLAGE PAR GLYCOSYLATION</u>	38
I - LES LECTINES MEMBRANAIRES	38
A - <u>Les récepteurs des hépatocytes</u>	40
1 - Récepteurs des asialoglycoprotéines: introduction	40
2 - Mise en évidence du récepteur des asialoglycoprotéines	42
a - Capture et catabolisme de l'asialocéruléoplasmine	42
b - Généralisation du catabolisme hépatique des asialoglycoprotéines	43
3 - Isolement, caractérisation et structure des récepteurs hépatocytaires spécifiques des asialoglycoprotéines	46
a - Isolement et étude du récepteur hépatique de Lapin	46
b - Etude du récepteur hépatique de Rat	47
c - Autres récepteurs hépatiques des Mammifères	50
d - Distribution subcellulaire de la lectine hépatique	51
4 - Récepteur d'ASHWELL: étude de la liaison	51
a - Spécificité	51
b - Paramètres de la liaison (lectine de Lapin)	52
c - Quantification des récepteurs	54
d - Variations pathologiques du nombre de récepteurs	56
5 - Interaction asialotransferrine - récepteur d'ASHWELL	57
6 - Endocytose des asialoglycoprotéines	58
a - Recyclage du récepteur	58
b - Dissociation intracellulaire du complexe récepteur - ligand	59
c - Facteurs pouvant intervenir dans l'endocytose des asialoglycoprotéines	59

	pages
intracellulaires	
d - Rôle des récepteurs	59
asialoglycoprotéines et de leurs récepteurs	
e - Devenir intracellulaire des	60
7 - Récepteur des cellules Hep G2	62
8 - La lectine hépatique des Oiseaux	65
a - Mise en évidence et isolement	65
b - Propriétés	65
<b>B - <u>Autres lectines membranaires des Eucaryotes</u></b>	<b>66</b>
1 - Récepteurs spécifiques du Man-6-P	67
a - Mise en évidence	67
b - Isolement et propriétés du	
récepteur du Man-6-P de 215000 Da	69
c - Existence d'un second récepteur	
(cation-dépendant) spécifique du Man-6-P	69
2 - Récepteurs spécifiques des résidus de	
mannose et/ou de N-acétylglucosamine	70
a - Mise en évidence et spécificité	70
b - Liaison et internalisation des	
glycoconjugués	71
c - Caractérisation du récepteur	
spécifique du mannose et de la N-acétylglucosamine	71
3 - Récepteurs du fucose	73
<b>II - LES TRANSPORTEURS GLYCOSYLES</b>	<b>74</b>
A - <u>Asialoglycoprotéines</u>	74
1 - Ciblage d'enzymes et de protéines	74
2 - Ciblage de toxines	76
3 - Ciblage d'agents antiviraux	76
4 - Ciblage de composés antipaludiques	77
B - <u>Néoglycoconjugués</u>	77
1 - Ciblage hépatique d'agents antiviraux	77
2 - Ciblage d'immunostimulants	78
3 - Ciblage par des néoglycopeptides	78
<b>CONCLUSION</b>	<b>82</b>

## TRAVAUX PERSONNELS

pages

INTRODUCTION	83
<u>La daunorubicine:</u>	
1 - Mode d'action	83
2 - Limites du traitement par la daunorubicine	85
3 - Ciblage de la DNR par glycosylation	86
<u>CHAPITRE I : LES PRODUITS DE COUPLAGE "GLYCOCONJUGUES - DAUNORUBICINE".</u>	
INTRODUCTION	88
I - GLYCOCONJUGUES VECTEURS	89
A - <u>Orosomucoïde désialylé</u>	89
désialylation	
1 - Préparation de l'orosomucoïde et	89
2 - Analyse et structure	89
B - <u>Glycopeptides de l'asialoorosomucoïde</u>	92
1 - Préparation	92
2 - Analyse	92
II - COUPLAGES A LA DAUNORUBICINE	94
<u>A - Rappels du procédé d'obtention du composé "bras-DNR"</u>	94
B - <u>Couplages à l'ASOR et à ses glycopeptides</u>	99
1 - Couplage à l'asialoorosomucoïde	99
2 - Couplage aux glycopeptides de l'ASOR	100
C - <u>Résultats et analyse des produits de couplage</u>	103
couplage	
1 - Rendement de préparation des produits de	103
2 - Analyse par chromatographie en phase	103
3 - Analyse par chromatographie sur couche	105
4 - Dosage de la DNR des produits de couplage	105
5 - Spectres de fluorescence de la DNR et de	109
ses dérivés	
6 - Possibilités d'hydrolyse enzymatique	112
CONCLUSION	115

CHAPITRE II : MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER. APPLICATION  
A L'ETUDE DE LA DAUNORUBICINE ET DE SES DERIVES.

INTRODUCTION	116
I - MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER: PRINCIPE ET APPAREILLAGE	118
A - <u>Principe de la microspectrofluorimétrie LASER</u>	118
1 - Rappels théoriques	118
2 - Intérêt des sources LASER pour l'étude de la fluorescence	120
B - <u>Microsonde moléculaire "MOLE"</u>	121
1 - Principe et application à la fluorescence	121
2 - Description et fonctionnement de la microsonde MOLE	121
C - <u>Microspectrofluorimètre à détection multicanale</u>	125
1 - Intérêt du microfluorimètre à détection multicanale	125
2 - Description de l'appareil	126
II - APPLICATION DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER A L'ETUDE DE LA DAUNORUBICINE (ET DE SES DERIVES)	128
A - <u>Analyse et contrôle des composés fluorescents</u>	130
1 - Produits en solution	130
2 - Contrôle des produits par chromatographie en couche mince	132
3 - Rendement quantique de la DNR. Evolution de la fluorescence de la DNR en fonction du pH	135
B - <u>Etudes sur les cellules</u>	140
1 - Matériel cellulaire	140
a - Hépatocytes de Rat	140
b - Cellules Hep G2	141
2 - Mise en évidence de la fluorescence cellulaire	143
3 - Enregistrement de spectres de fluorescence intracellulaire	145
4 - Cinétique d'internalisation de la DNR par les cellules Hep G2	147
a - Protocole expérimental	147
b - Résultats	151
C - <u>Etude de l'interaction de la DNR avec l'ADN par polarisation de fluorescence</u>	153
1 - La polarisation de fluorescence	153
2 - Application à la daunorubicine	154
CONCLUSION	160

CHAPITRE III : RESULTATS DES ETUDES DE CIBLAGE PAR  
GLYCOSYLATION: EXPERIMENTATION IN VITRO

INTRODUCTION	161
I - ETUDE DE L'INTERNALISATION PAR LES CELLULES HEP G2 DE LA DAUNORUBICINE GLYCOSYLEE	162
A - <u>Conditions expérimentales</u>	162
B - <u>Mise en évidence de la fluorescence cellulaire des produits de couplage de la DNR aux glycoconjugués</u>	162
1 - Enregistrement de spectres de fluorescence intracellulaire	162
2 - Analyse de la fluorescence cellulaire totale	163
C - <u>Etude de l'incorporation par les cellules Hep G2 de la DNR libre ou couplée aux glycopeptides d'ASOR</u>	169
1 - Protocole expérimental	170
2 - Résultats	170
D - <u>Inhibition de l'incorporation cellulaire d'<sup>125</sup>I - asialoorosomucoïde par les glycopeptides d'ASOR et les conjugués Glycopeptides d'ASOR - bras - DNR</u>	177
II - ETUDE DE L'ACTION DES ENZYMES LYSOSOMIQUES SUR LE PRODUIT DE COUPLAGE DE LA DAUNORUBICINE AUX GLYCOPEPTIDES D'ASIALOOROSOMUCOIDE	179
A - <u>Protocole expérimental</u>	179
B - <u>Résultats et discussion</u>	180
III - UTILISATION DE GLYCOCONJUGUES MARQUES A LA FLUORESCÉINE	182
A - <u>Marquage des glycoconjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine</u>	183
B - <u>Etudes sur les cellules Hep G2</u>	183
1 - Protocole expérimental	184
2 - Résultats	184
CONCLUSION	187

CHAPITRE IV : EXPERIMENTATION ANIMALE

INTRODUCTION	189
--------------	-----

	pages
I - EXPERIENCES REALISEES AVEC LA DAUNORUBICINE LIBRE	190
A - <u>Protocole expérimental</u>	190
B - <u>Résultats et discussion</u>	190
II - EXPERIENCES REALISEES AVEC LA FLUORESCEINE LIBRE OU FIXEE AUX GLYCOPEPTIDES D'ASIALOOROSOMUCOIDE	193
A - <u>Protocole expérimental</u>	195
B - <u>Résultats et discussion</u>	195
CONCLUSION	200
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	201
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

## INTRODUCTION

La chimiothérapie constitue une approche essentielle dans le traitement des cancers. Son principal inconvénient provient du fait que les médicaments anticancéreux, en détruisant les cellules tumorales, sont également toxiques pour les cellules normales. En effet, les agents antitumoraux n'agissent pas seulement sur la division des cellules cancéreuses; ils provoquent très souvent des lésions irréparables sur certaines lignées de cellules normales (moëlle osseuse, muqueuses).

Certains antimétabolites présentent, en outre, une toxicité secondaire vis - à - vis d'un organe particulier (cardiotoxicité de la daunorubicine et de ses dérivés, par exemple). Ces toxicités particulières, associées aux phénomènes de résistance, constituent les limitations majeures de l'usage thérapeutique des anticancéreux.

Les nombreuses recherches engagées actuellement dans le domaine du ciblage des médicaments apparaissent donc justifiées et prennent un intérêt particulier dans le cas des composés antitumoraux pour lesquels il serait souhaitable d'obtenir une action sélective sur les cellules malignes, en épargnant les cellules normales.

Le but du ciblage des médicaments est d'obtenir la réponse pharmacologique ou biologique désirée, en un site choisi, sans interaction indésirable du médicament avec les autres sites (GARDNER (1985)).

Dans cette optique, deux approches peuvent être envisagées: ou le médicament est envoyé dans tout l'organisme mais n'est actif (ou activé) qu'au site choisi, ou bien il est sélectivement (ou mieux, spécifiquement) dirigé vers le site d'action désiré. Différents "transporteurs" de médicaments, capables de véhiculer un principe actif jusqu'à un site donné et de le libérer à ce niveau pour permettre son action, ont ainsi trouvé des applications importantes en chimiothérapie du cancer.

Dans la première partie de ce mémoire, nous présentons les différents modes de ciblage de médicaments actuellement à l'étude et, en particulier, quelques transporteurs de médicaments dont l'intérêt thérapeutique est incontestable. Nous décrivons plus particulièrement le "ciblage par glycosylation" qui consiste à greffer sur des médicaments des structures glucidiques susceptibles d'être spécifiquement reconnues par les récepteurs membranaires des cellules - cibles, et de servir de transporteurs pour les drogues considérées.

Dans la seconde partie du mémoire, nous présentons les résultats obtenus au cours de nos travaux sur le ciblage de drogues antitumorales (fluorescentes) par glycosylation et, en particulier, les études par microspectrofluorimétrie LASER de différents conjugués médicament - transporteur synthétisés et de leur interaction avec les cellules.

Une partie de ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes, en collaboration avec le Laboratoire de Spectrochimie Infra-Rouge et Raman de l'Université des Sciences et Techniques de Lille - Flandres Artois (LP 2631-2641 CNRS, Professeur M.Delhay):

- Possibilités et limites de la microspectrofluorimétrie LASER.

Delhay, M., Dhamelin court, P., Merlin, J.C., Lenain, B., Boussekey, L., Delplace - Delhay, F., Montreuil, J.

in "Spectroscopy of Biological Molecules" édité par A.J.P. Alix, L. Bernard, M. Manfait, Proceedings of the First European conference on the Spectroscopy of biological molecules, Reims, France, 1985. John Wiley & Sons Ltd (1985) p.51 à 53.

- Communications par affiches:

1- First European conference on Spectroscopy of Biological Molecules, Reims, France, 1-5 septembre 1985.

Possibilités et limites de la microspectrofluorimétrie LASER.

Delhay, M., Dhamelin court, P., Merlin, J.C., Lenain, B., Boussekey, L., Delplace - Delhay, F., Montreuil, J.

2- Second International Symposium on drug analysis (organisé par la

Société Belge des Sciences Pharmaceutiques), Bruxelles, Belgique, 27-30 mai 1986.

Microfluorimeter using LASER sources with a multichannel detector and its applications for biological studies.

Delhaye, M., Dhamelin court, P., Merlin, J.C., Lenain, B., Delplace - Delhaye, F., Flan, B., Montreuil, J.

3- Laser scattering spectroscopy of biological objects, Prague, Tchécoslovaquie, 6-10 juillet 1986.

Some applications of LASER excited microspectrofluorimetry for intracellular and microspatial biological studies.

Delplace - Delhaye, F., Flan, B., Montreuil, J., Lenain, B., Merlin, J.C.



## GENERALITES

## TRANSPORT ET CIBLAGE DES MEDICAMENTS

### INTRODUCTION

Les limitations imposées aux applications thérapeutiques des médicaments proviennent en particulier de la faible sélectivité de ceux-ci pour leurs tissus-cibles ou de leur difficulté à atteindre ces cibles sans être inactivés par des processus de modification ou de dégradation des molécules.

Les travaux cités dans les deux premiers chapitres consacrés au ciblage des médicaments ont pour but de montrer comment les transporteurs de médicaments peuvent contribuer à résoudre les problèmes résultant de ces limitations et à optimiser l'action pharmacologique des médicaments.

Certains vecteurs de drogues sont encore au stade expérimental. Cependant, les recherches dans le domaine du ciblage sont très intenses et les applications de plus en plus nombreuses et fructueuses.

La classification des transporteurs de médicaments, proposée par GREGORIADIS (1977), retenait trois groupes principaux:

- les transporteurs macromoléculaires, comprenant en particulier les anticorps, les glycoprotéines et les lectines
- les transporteurs cellulaires
- les transporteurs synthétiques, ou artificiels, biodégradables ou non biodégradables, principalement représentés par les liposomes.

GREGORIADIS (1977) définissait en outre un certain nombre de critères du "transporteur idéal": il doit être non toxique, biodégradable et de forme et de taille adaptées au transport de substances variées; il doit posséder une affinité particulière pour le site d'action de la molécule transportée et l'atteindre facilement in vivo sans destruction ni inactivation durant le trajet. Après libération de la molécule active à son site-cible, il doit être éliminé.

Parmi les transporteurs évoqués par GREGORIADIS et présentés dans le tableau I (p. 6), certains ont connu un développement considérable et sont actuellement les plus largement étudiés. Ce sont les anticorps, les liposomes et les transporteurs protéiques ou glycosylés qui concernent le ciblage par l'intermédiaire de récepteurs (voir le principe de ce mode de ciblage illustré à la figure 1; p.7).

Avant de décrire le ciblage par glycosylation qui constitue le mode de ciblage choisi pour nos travaux, nous citerons les différents transporteurs actuellement étudiés en détaillant essentiellement les anticorps et les liposomes.

TABLEAU I

UTILISATION DE TRANSPORTEURS DE MEDICAMENTS EN BIOLOGIE  
ET EN MEDECINE ( GREGORIADIS (1977) ).

Drug carriers in biology and medicine	
<u>Carrier</u>	<u>Associated drugs</u>
<b>Macromolecules</b>	
Immunoglobulins <sup>2</sup>	Methotrexate <sup>3</sup> , daunomycin <sup>4</sup> , adriamycin <sup>4</sup> , chlorambucil <sup>5,6</sup> , radioactive iodine <sup>7</sup> , diphtheria toxin <sup>8</sup> , glucose oxidase <sup>9</sup>
Desialylated glycoproteins	Lysozyme <sup>10</sup> , albumin <sup>10</sup>
Albumin	Amanitin <sup>11</sup> , phalloidin <sup>12</sup> , deoxycholic acid <sup>13</sup>
Fibrinogen	Dichloroethylphosphoramidate <sup>14</sup>
Deoxyribonucleic acid	Daunomycin <sup>15,16</sup> , adriamycin <sup>17</sup>
Dextran	Insulin <sup>18</sup> , noradrenaline <sup>18</sup> , amphetamine <sup>18</sup> , novocaine <sup>18</sup> , coenzyme B <sub>12</sub> <sup>18</sup>
<b>Cells</b>	
Erythrocytes	β-glucosidase <sup>19</sup> , β-galactosidase <sup>19</sup> , glucuronidase <sup>20</sup> , asparaginase <sup>21</sup> , glucose oxidase <sup>22</sup> , methotrexate <sup>23</sup> , adriamycin <sup>23</sup>
Leucocytes	'Corrective' enzyme <sup>24</sup>
Hepatocytes	Uridine diphosphate glucuronyltransferase <sup>25</sup>
<b>Synthetic systems—non-biodegradable<sup>26</sup></b>	
Nylon semi-permeable microcapsules	Carbonic anhydrase <sup>26</sup> , uricase <sup>26</sup> , asparaginase <sup>26</sup> , urease <sup>26</sup> , catalase <sup>26</sup>
Polyacrylamide gel	Asparaginase <sup>27</sup>
Liquid surfactant membranes	Urease <sup>28</sup>
Glass beads	Uricase <sup>29</sup>
<b>Synthetic systems—biodegradable</b>	
Albumin microspheres	6-mercaptopurine <sup>30</sup> , actinomycin D <sup>31</sup>
Multiple oil emulsions	Naltrexone <sup>32</sup>
Lactic acid polymers <sup>33</sup>	Cyclazocine <sup>33</sup>
Ufasomes (unsaturated fatty acid spheres) <sup>34</sup>	
Liposomes <sup>35</sup>	Lysozyme <sup>36</sup> , amyloglucosidase <sup>37,38</sup> , neuraminidase <sup>39,40</sup> , α-mannosidase <sup>41</sup> , glucocerebrosidase:β-glucosidase <sup>42</sup> , hexosaminidase A <sup>43</sup> , asparaginase <sup>44</sup> , peroxidase <sup>45-47</sup> , glucose oxidase <sup>48</sup> , lectins <sup>49</sup> , immunoglobulins <sup>46,50-52</sup> , insulin <sup>54,55</sup> , diphtheria toxoid <sup>56</sup> , Poly(I):Poly(C) <sup>57</sup> , actinomycin D <sup>58-61</sup> , 5-fluorouracil <sup>62</sup> , methotrexate <sup>63,64</sup> , bleomycin <sup>65,50,65</sup> , cytosine arabinoside <sup>66</sup> , 8-azaguanine <sup>67</sup> , mechlorethamine <sup>68</sup> , bichloroethyl nitrosourea <sup>69</sup> , colchicine <sup>69</sup> , penicillin G <sup>70</sup> , steroids <sup>71,72</sup> , cyclic AMP <sup>73</sup> , pepstatin <sup>74</sup> , glutamate <sup>75</sup> , nitroblue tetrazolium <sup>76</sup> , EDTA <sup>77</sup> , DTPA <sup>77</sup> , TcO <sub>4</sub> <sup>78,79</sup>



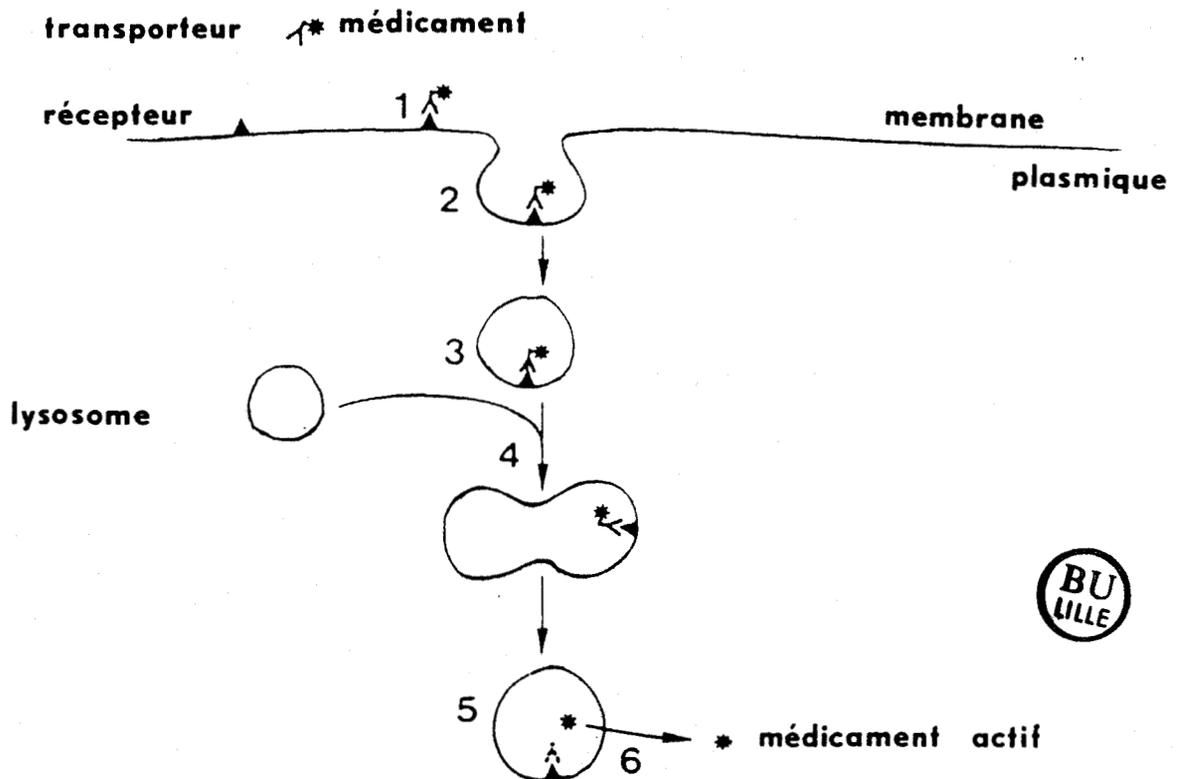


Figure 1

Principe du ciblage d'un médicament par l'intermédiaire d'un récepteur.

- 1- Liaison du conjugué médicament-transporteur au récepteur.
- 2,3- Endocytose du conjugué lié au récepteur.
- 4- Fusion de la vacuole d'endocytose avec un lysosome.
- 5- Coupure de la liaison entre le médicament et son transporteur, sous l'action du pH acide ou des hydrolases lysosomiques.
- 6- Libération du médicament actif dans le milieu intracellulaire.

## CHAPITRE I

### LES DIFFERENTS MODES DE CIBLAGE DES MEDICAMENTS

#### I - LE CIBLAGE PAR ANTICORPS.

##### A - Les "immunodrogues".

##### 1 - Définition et intérêt du ciblage par anticorps.

Dans le cadre du ciblage des médicaments, les anticorps sont des transporteurs macromoléculaires particulièrement intéressants en raison de leur spécificité et de leur haute affinité pour l'antigène. Des immunoglobulines dirigées contre des tumeurs ont ainsi été utilisées pour le transport d'agents cytotoxiques avec conservation de l'activité de l'agent et de l'anticorps, constituant des conjugués médicament-anticorps, encore appelés immunodrogues (BALDWIN et BYERS (1986)).

Des médicaments antitumoraux complexés à des anticorps se sont montrés particulièrement cytotoxiques vis-à-vis des cellules malignes contre lesquelles les anticorps transporteurs avaient été dirigés.

L'utilisation d'anticorps comme transporteurs de médicaments s'accompagne de nombreuses difficultés, en particulier lors de la production et de la purification des anticorps. Cependant, la production des anticorps monoclonaux a donné un élan considérable à cette voie de recherche. L'utilisation in vivo d'anticorps monoclonaux réagissant avec les cellules cancéreuses offre de nouvelles approches pour le ciblage des médicaments cytotoxiques. Il devient possible d'améliorer l'efficacité thérapeutique des médicaments antitumoraux en les conjuguant à des anticorps monoclonaux qui vont les véhiculer jusqu'aux tumeurs et

jusqu'aux métastases. L'élaboration des conjugués médicament-anticorps monoclonal en est encore au stade du développement. Cependant, différents essais réalisés in vitro et in vivo indiquent que ces conjugués possèdent un potentiel thérapeutique incontestable.

## 2 - Problèmes liés à la préparation et à l'emploi des immunodrogues.

Les médicaments cytotoxiques "conduits" par les anticorps vers les cellules-cibles peuvent agir de différentes façons qui conditionnent la conception des conjugués (BALDWIN et BYERS (1986)).

La conjugaison des médicaments aux anticorps a pour but de lier le maximum de molécules, dans des conditions telles que les réactivités du médicament et de l'anticorps soient conservées. Différents modes de liaison entre les agents cytotoxiques et les immunoglobulines antitumorales ont été essayés: liaisons non covalentes (en particulier avec le chlorambucil), liaisons covalentes (par exemple, à l'aide de carbodiimides ou de réactifs bifonctionnels comme les dialdéhydes) et liaisons par l'intermédiaire de "bras". En effet, pour augmenter le taux de combinaison médicament-anticorps, des systèmes "porteurs" du médicament ont été développés (acide polyglutamique, dextrans, sérumalbumine).

Les différents problèmes posés par l'emploi de conjugués anticorps-médicaments dans le traitement du cancer ont été abordés par GHOSE et BLAIR (1978), en particulier celui de l'inhibition de l'interaction anticorps - antigène "cible" par les anticorps circulants, ainsi que la possibilité de réactions allergiques au transporteur lui-même. Ces réactions pourraient néanmoins être diminuées par l'utilisation du dimère Fab comme transporteur, à la place de la molécule d'immunoglobuline elle-même.

En outre, les drogues attachées aux immunoglobulines peuvent masquer le site de reconnaissance antigénique de la protéine, ou altérer sa structure tertiaire, facilitant ainsi son élimination rapide par le système réticulo-endothélial. Ces auteurs mentionnent également la possibilité d'apparition de populations de cellules tumorales résistantes, après traitement par des immunodrogues.

### 3 - Applications des immunodrogues.

Des médicaments et des agents toxiques variés, couplés de différentes façons à des immunoglobulines, ont été étudiés dans des modèles in vitro et in vivo divers (voir les revues générales de GHOSE et BLAIR (1978) et de O'NEILL (1979)). Parmi ces agents cytotoxiques, nous pouvons retenir: les antimétabolites (méthotrexate), les agents alkylants (trénimon, chlorambucil, melphalan), les antibiotiques (daunorubicine, adriamycine), les toxines (toxine diphtérique et ricine) et les enzymes (glucose oxydase, phospholipase). Les travaux réalisés par HURWITZ et ses collaborateurs pour le ciblage de substances antitumorales par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux sont à cet égard particulièrement importants (ARNON et HURWITZ (1985)).

Ces différentes études ont permis de démontrer que des effets sélectifs cytotoxiques ou cytostatiques peuvent résulter de l'exposition de cellules à des anticorps conjugués à des médicaments, des toxines ou des enzymes, sur la base de la spécificité immunologique.

#### 4 - Ciblage par anticorps d'agents antitumoraux.

##### a - Couplage de la daunorubicine à des anticorps

Parmi les différentes études concernant le ciblage de médicaments par des anticorps, des travaux très importants ont été réalisés par HURWITZ et ses collaborateurs (HURWITZ et coll. (1975,1978); LEVY et coll. (1975); TSUKADA et coll. (1982a,1982b); ARNON et HURWITZ (1985)).

Ces auteurs ont étudié l'activité in vitro et in vivo, sur des cellules tumorales, de différents conjugués résultant du couplage, par liaison directe ou par l'intermédiaire de bras de couplage, d'agents antitumoraux (la daunorubicine ou l'adriamycine) avec des anticorps non spécifiques ou spécifiques de tumeurs.

Les premiers essais de complexation de la daunorubicine et de l'adriamycine à des immunoglobulines indiquent que ces composés peuvent être liés covalentiellement à des anticorps en conservant à la fois

leurs effets toxiques sur les cellules et l'activité de l'anticorps (HURWITZ et coll. (1975)).

De plus, par conjugaison à des anticorps spécifiques de tumeurs, la daunorubicine affecte préférentiellement les cellules-cibles pouvant être reconnues par ces anticorps (LEVY et coll. (1978)). Les effets toxiques exercés sur les cellules tumorales par les conjugués sont étudiés en mesurant l'inhibition de la synthèse des acides ribonucléiques ou la réduction de la croissance des cellules tumorales après transplantation.

La liaison de la daunorubicine à des immunoglobulines spécifiques de tumeurs, par liaison directe ou par un pont de dextran, facilite son entrée dans la cellule maligne, probablement par endocytose, aucune différence de pénétration dans les cellules normales n'étant observée entre les complexes daunorubicine - immunoglobulines non spécifiques et daunorubicine - anticorps spécifiques de tumeurs (HURWITZ et coll. (1978)).

Reprenant l'ensemble des travaux réalisés antérieurement par HURWITZ et ses collaborateurs concernant la liaison de la daunorubicine à des anticorps normaux ou antitumoraux, WILCHEK (1979) mentionne également d'autres méthodes de liaison, utilisant les dérivés succinyl, maléyl et citraconyl - daunorubicine couplés sur les anticorps par l'intermédiaire de leurs esters d'hydroxysuccinimide. L'efficacité des conjugués est reliée à la facilité de libération du dérivé initial à partir du complexe, le conjugué citraconyl - daunorubicine étant le plus actif.

b - Apport des anticorps monoclonaux pour le ciblage de la daunorubicine.

TSUKADA et coll. (1982a, 1982b) ont adopté la méthode de couplage par un pont de dextran pour préparer des conjugués de la daunorubicine à des anticorps anti- $\alpha$ -foetoprotéine de Rat (anti-AFP), conventionnels ou monoclonaux. Les conjugués spécifiques daunorubicine - anticorps de Cheval anti-AFP et daunorubicine - anticorps monoclonaux anti-AFP sont plus efficaces, au point de vue cytotoxicité et retard du développement tumoral, que la daunorubicine ou les anticorps anti-AFP seuls, ou qu'un mélange de daunorubicine et d'anticorps anti-AFP, ou encore qu'un conjugué de daunorubicine avec des immunoglobulines normales de Cheval.

Le pouvoir antitumoral est recherché in vitro sur des cellules d'hépatome, et in vivo sur des rats inoculés avec des cellules d'hépatome.

### c - Ciblage d'autres agents antitumoraux.

D'autres composés antitumoraux: cytosine arabinoside, 5-fluorouridine, méthotrexate (décrits par ARNON et HURWITZ (1985)), vindésine (BALDWIN et coll. (1983)) ont été dirigés vers différentes cellules tumorales (hépatome, carcinomes, ostéosarcome,...) par conjugaison à des anticorps spécifiques polyclonaux ou monoclonaux, confirmant ainsi le potentiel des "immunodrogues" dans le traitement des tumeurs et de leurs métastases.

## B - Les immunotoxines.

### 1 - Définition et structure.

Des agents cytotoxiques spécifiques ont été synthétisés par liaison covalente de molécules d'anticorps à des toxines végétales ou bactériennes pour former les immunotoxines.

Les toxines (par exemple, la ricine ou l'abrine) sont constituées de deux chaînes polypeptidiques A et B d'environ 30 Kda, reliées par un pont disulfure. La chaîne B est une lectine spécifique du galactose, responsable de la liaison de la toxine aux cellules eucaryotes. La chaîne A est un enzyme qui se fixe sur le site de liaison du facteur d'élongation EF-2 de la sous-unité ribosomale 60s, et provoque l'inhibition de la synthèse protéique et éventuellement la mort de la cellule.

La pénétration d'une seule chaîne A de la ricine dans le cytosol suffit pour tuer une cellule. L'activité biologique de la chaîne A dépendrait de la coupure du pont disulfure qui la relie à la chaîne B. La liaison de la chaîne B aux glycoprotéines contenant du galactose ou aux glycolipides de la surface cellulaire permet à la chaîne A de traverser la membrane plasmique ou la membrane d'une vésicule d'endocytose et d'exercer son action intracellulaire.

Les immunotoxines sont des molécules hybrides construites artificiellement dans lesquelles des anticorps ou des fragments d'anticorps sont couplés à des toxines ou à leurs sous-unités (VITETTA et UHR (1985)). L'intérêt récent accordé aux immunotoxines est fondé en particulier sur leur développement possible comme agents thérapeutiques pouvant détruire sélectivement des cellules cancéreuses.

## 2 - Préparation des immunotoxines.

Deux stratégies ont été adoptées pour conférer une sélectivité de liaison aux toxines (Fig.2; p14). D'une part, la liaison à des anticorps de la toxine intacte fournit des composés cytotoxiques vis-à-vis des cellules portant les antigènes appropriés, mais dont l'utilisation nécessite la présence de concentrations élevées en galactose ou en lactose, in vitro, pour diminuer leur liaison non spécifique aux résidus de galactose des cellules non-cibles. D'autre part, de nombreuses immunotoxines ont été construites avec la chaîne A des toxines. Les conjugués anticorps - chaîne A sont plus spécifiques mais présentent une cytotoxicité variable, la nature du pont entre l'anticorps et la chaîne A intervenant en particulier dans leur toxicité.

La méthode de préparation d'immunotoxines proposée par THORPE et coll. (1984) permet d'obtenir des conjugués de ricine présentant le double avantage d'un pouvoir cytotoxique élevé et d'une haute spécificité. Cette méthode unit les anticorps à la ricine en bloquant les sites de liaison du galactose de la chaîne B, et diminue ainsi la capacité de liaison non spécifique du conjugué aux cellules ne portant pas les antigènes appropriés.

L'addition de chaînes B ou d'immunotoxines à chaîne B à des cellules traitées par des immunotoxines à chaîne A peut augmenter le potentiel de ces conjugués (VITETTA et UHR (1985)).

## 3 - Applications et intérêt des immunotoxines.

Les immunotoxines ont fait l'objet de nombreux essais in vitro et d'expérimentations in vivo.

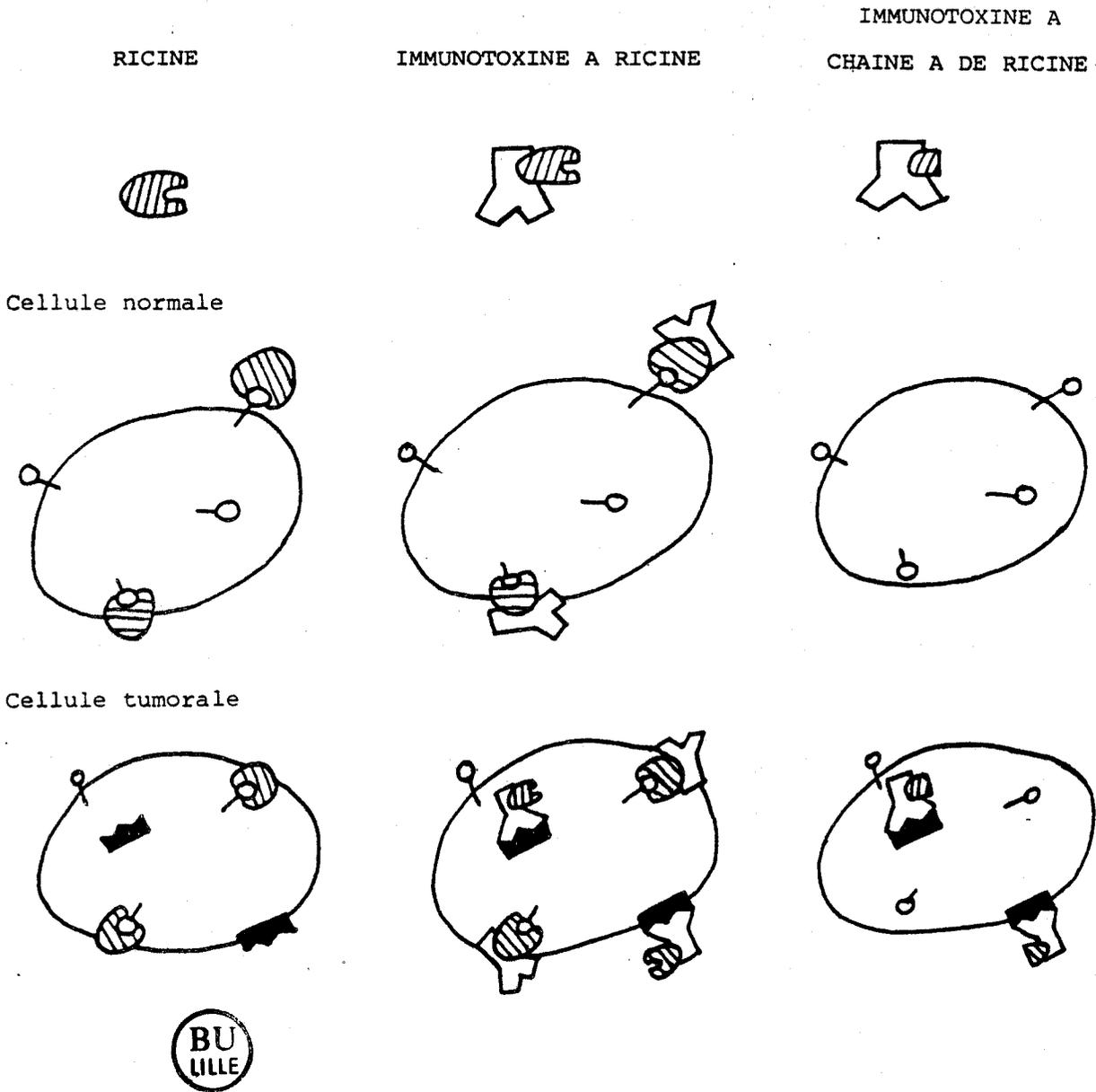


Figure 2

Le concept d'immunotoxine, d'après GROS et coll. (1986).

Les immunotoxines à ricine entière peuvent tuer les cellules exprimant soit l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps, soit un motif galactosidique. Par contre, les immunotoxines à chaîne A de ricine ne reconnaîtront et ne détruiront que les cellules ciblées par l'anticorps.

a - Immunotoxines à anticorps spécifiques polyclonaux.

En 1979, MASUHO et coll. ont montré que le fragment Fab' d'un anticorps de Lapin dirigé contre la leucémie murine L1210 était cytotoxique in vitro sur les cellules tumorales lorsqu'il était associé de façon covalente au fragment A de la toxine diphtérique, la toxine elle-même intacte n'étant pas cytotoxique pour ces cellules.

Un effet antitumoral analogue fut observé in vitro sur des lymphocytes de Souris, à l'aide d'immunotoxines contenant la chaîne A de la ricine (KROLICK et coll. (1980)).

b - Immunotoxines préparées à l'aide d'anticorps monoclonaux.

L'emploi des anticorps monoclonaux a largement contribué au développement des immunotoxines comme agents cytotoxiques spécifiques de tumeurs.

GILLILAND et coll. (1980) ont employé un anticorps monoclonal pour diriger l'action de la chaîne A de la toxine diphtérique et de la ricine vers les cellules d'un carcinome colorectal. Les composés anticorps monoclonal - chaîne A obtenus conservent la spécificité de liaison de la partie anticorps et ont une activité cytotoxique pour les cellules du carcinome en culture, à des concentrations n'affectant pas les lignées cellulaires dépourvues de l'antigène de la tumeur.

De même, BLYTHMAN et coll. (1981) ont étudié l'activité in vitro et in vivo sur des cellules leucémiques de Souris d'une immunotoxine obtenue par couplage de la chaîne A de la ricine avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène de ces cellules. Les expériences réalisées par BUMOL et coll. (1983) montrent de la même manière qu'un anticorps monoclonal dirigé contre un protéoglycane de surface cellulaire de cellules de mélanome humain, conjugué à la chaîne A de la toxine diphtérique, peut inhiber la synthèse protéique in vitro et provoquer une suppression significative de la croissance tumorale des cellules de mélanome in vivo.

c - Intérêt thérapeutique des immunotoxines.

L'ensemble des études précliniques réalisées par différentes équipes ont montré les limites des immunotoxines dans leurs applications thérapeutiques. Cependant, malgré les nombreux obstacles restant à franchir, les immunotoxines devraient à l'avenir former une nouvelle classe d'agents antitumoraux destinés à des traitements variés (par exemple traitement in vitro des greffes de moelle osseuse, ou traitement in vivo des tumeurs solides) (GROS et coll. (1986)).

II - LES LIPOSOMES.

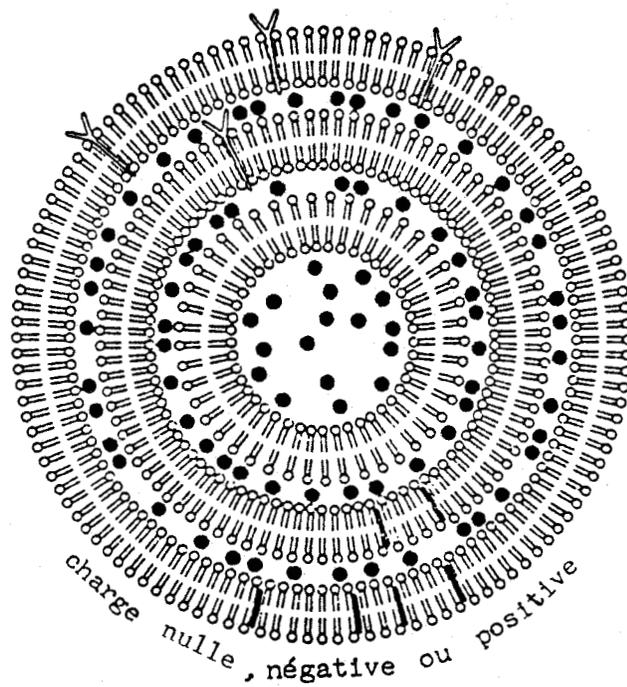
A - Structure et propriétés.

Un grand nombre de systèmes permettant une libération contrôlée de médicaments ont été développés pour obtenir un ciblage cellulaire spécifique. Parmi ces systèmes, les liposomes se sont montrés d'un intérêt considérable comme transporteurs de molécules variées telles que des agents antitumoraux, des antibiotiques, des hormones, des protéines et des acides nucléiques (pour des revues générales, voir TYRELL et coll. (1976), GREGORIADIS (1979), PAPAHAJIOPOULOS (1979)).

1 - Structure.

Les liposomes sont des vésicules lipidiques microscopiques formées spontanément quand des phospholipides sont mis en suspension dans une solution aqueuse. Les vésicules consistent en une ou plusieurs doubles couches concentriques de lipides, entourant un nombre égal de compartiments aqueux. Il est possible d'encapsuler des composés hydrosolubles dans la phase aqueuse des liposomes, ou des composés liposolubles dans la phase lipidique. Des macromolécules comportant une région hydrophobe et une région hydrophile peuvent être incorporées dans les liposomes en occupant à la fois la phase lipidique et la phase aqueuse (GREGORIADIS (1979), voir Fig. 3; p. 17).

Les liposomes peuvent être formés de nombreux phospholipides



- molécules hydrosolubles
- ↓ molécules liposolubles
- Y molécules hydrosolubles avec partie hydrophobe pénétrant dans la phase lipidique

Figure 3

Schéma d'un liposome présentant trois doubles couches de phospholipides polaires en alternance avec des compartiments aqueux (d'après GREGORIADIS (1979)).

différents (phosphatidylcholine, par exemple) auxquels on peut ajouter du cholestérol, des lipides anioniques (acide phosphatidique) ou cationiques (stéarylamine). Ils peuvent aussi être formés à partir d'extraits intacts de lipides de membrane cellulaire ("enveloppes" d'érythrocytes) (TYRELL et coll. (1976)).

La séparation entre les doubles couches de phospholipides, et, en conséquence, le volume de la phase aqueuse du liposome, peuvent être augmentés par l'addition de lipides chargés. L'incorporation d'amphiphiles chargés permet l'obtention d'une charge de surface positive ou négative. Le contrôle de la perméabilité aux substances piégées et de la stabilité des liposomes est réalisable par addition d'un stérol ou d'autres lipides dans la structure du liposome. En outre, en faisant varier les caractéristiques de surface des liposomes, on peut les rendre capables de reconnaître spécifiquement certaines cellules (incorporation d'anticorps spécifiques ou de glycoprotéines, par exemple).



## 2 - Propriétés.

De nombreuses techniques ont été développées pour préparer des liposomes de taille variable (25 nm pour les liposomes unilamellaires à 5 µm pour les liposomes multilamellaires). Ils ont été administrés in vivo par des voies variées: voie orale, voie parentérale, application locale, inhalation, agissant ainsi comme des systèmes synthétiques à libération médicamenteuse contrôlée (PATEL (1985)).

Les liposomes présentent l'avantage sur les autres transporteurs d'être biodégradables car formés de molécules naturelles pouvant être facilement métabolisées dans l'organisme, et peu toxiques.

La taille des liposomes, leur charge de surface et leur composition lipidique interviennent sur leur destinée et sur celle des molécules encapsulées. Ainsi, dans le cas de petites molécules, le taux de diffusion de ces composés à travers les couches lipidiques du liposome peut être diminué par sélection d'une composition lipidique liposomale appropriée.

Leur structure multilamellaire et leurs propriétés (taille, charge, fluidité, perméabilité, sensibilité au pH et à la température,

biodégradabilité, capacité d'incorporation de substances) les rendent particulièrement maniables pour le transport d'agents actifs.

## B - Interaction des liposomes avec les cellules.

Les mécanismes de capture des vésicules lipidiques par les cellules en culture peuvent inclure: la fusion, l'endocytose (ces deux mécanismes d'association entre la cellule et le liposome étant les plus couramment reconnus), mais aussi l'adsorption sur la surface cellulaire ou l'échange moléculaire (PAPAHADJOPOULOS (1979)). La prédominance de l'un de ces mécanismes est contrôlée par les propriétés chimiques et physiques des liposomes et, peut-être, par le type et l'état de la cellule.

L'association sélective des liposomes avec les cellules permet d'introduire des agents actifs sur des cibles moléculaires intracellulaires. Ainsi, l'actinomycine D ou la daunorubicine provenant des lysosomes par endocytose ou du cytoplasme par fusion, pourraient entrer dans le noyau et y exercer leur action sur l'ADN (BLACK et GREGORIADIS (1974)).

### 1 - L'endocytose.

Par le processus d'endocytose, les composés piégés dans les liposomes aboutissent dans les lysosomes, après fusion entre la vacuole d'endocytose contenant le liposome et le lysosome. Ils sont alors libérés de leur transporteur et peuvent agir dans le lysosome ou, après diffusion, dans les autres compartiments cellulaires (BLACK et GREGORIADIS (1974)).

L'endocytose semble être l'interaction la plus fréquente entre les liposomes et les cellules. Cependant, cette voie de pénétration n'est pas toujours accompagnée d'un transfert suffisant des substances dans le cytoplasme. TRUDEL et GICQUAUD (1985) ont montré que ce transfert pouvait être augmenté par incorporation d'acide oléique dans la membrane des liposomes.

La taille des liposomes influence également le transfert du contenu liposomal dans la cellule. Les études réalisées par MACHY et LESERMANN

(1983) avec des liposomes de taille variable contenant du méthotrexate indiquent que l'endocytose par les cellules-cibles des petits liposomes (80 nm) semble plus efficace que celle des gros liposomes.

## 2 - La fusion.

Dans certaines conditions, in vitro, les liposomes peuvent fusionner avec la membrane cellulaire. Des études laissent entendre que la fusion est un phénomène rare qui ne peut se produire spontanément sans perturbation importante de la membrane.

Dans le cas d'un liposome unilamellaire, cette fusion permet d'une part, l'incorporation des substances liposolubles transportées par la double couche lipidique du liposome dans la membrane cellulaire et leur internalisation par endocytose et, d'autre part, l'introduction dans le cytoplasme des substances hydrosolubles qui deviennent alors disponibles pour le reste de la cellule.

La fusion d'un liposome multilamellaire avec la membrane cellulaire est suivie de l'introduction dans le cytoplasme des agents présents dans le compartiment aqueux le plus externe et de l'ensemble des autres compartiments, puis de leur interaction avec les organites intracellulaires (GREGORIADIS (1979)).

## 3 - L'adsorption.

L'adsorption d'un liposome sur la membrane cellulaire peut induire des changements dans la perméabilité des membranes liposomale et cellulaire. Après diffusion à partir du liposome, les composés encapsulés peuvent alors pénétrer dans la cellule.

## C - Devenir in vivo des liposomes et des substances encapsulées.

### 1 - Facteurs intervenant dans la destinée des liposomes.

Dès 1976, TYRELL et coll. signalaient l'existence de deux facteurs essentiels impliqués dans la destinée in vivo des liposomes et de leur

contenu, et pouvant limiter leurs applications thérapeutiques. Ces facteurs sont: la capture rapide des liposomes de la circulation par le foie et la rate, et l'interaction des liposomes avec les composants sériques. Cette interaction, accompagnée de la possibilité de transfert du matériel lipidique entre les liposomes et les lipoprotéines, est responsable de la destruction des liposomes dans la circulation.

Ce phénomène peut être contrôlé et la stabilité des liposomes dans la circulation augmentée par des modifications structurales du contenu phospholipidique des liposomes (BALI et coll. (1983)). De même, la capture des liposomes par les cellules réticulo - endothéliales du foie et de la rate peut être diminuée en augmentant le contenu en cholestérol des vésicules, avec, comme conséquence, une augmentation de leur stabilité et de leur demi-vie dans la circulation (PATEL et coll. (1983)).

Cependant, le ciblage naturel des liposomes vers les cellules du système réticulo - endothélial peut être utilisé pour diriger sélectivement vers les macrophages des immunomodulateurs, pour rendre les macrophages cytolytiques vis-à-vis de cellules infectées par des virus, et des agents antiviraux, afin de supprimer la répllication virale dans ces cellules (KOFF et FIDLER (1985)).

## 2 - Libération des composés encapsulés.

Les propriétés physicochimiques des liposomes et les voies d'administration interviennent, en outre, dans leur distribution in vivo et dans la libération des composés encapsulés.

La libération contrôlée des médicaments à partir des liposomes peut survenir de différentes manières (PATEL (1985)):

- au site d'injection ou d'application (par dégradation progressive du liposome)
- dans les canaux lymphatiques (dans le cas des petits liposomes captés par la lymphe après injection)
- sous forme d'un dépôt extracellulaire de médicament (après adhésion du liposome sur la surface cellulaire)
- dans la circulation (dépôt intravasculaire de drogue)
- dans les cellules (libération intracellulaire par dégradation)

du liposome).

Ainsi la connaissance et le contrôle de la localisation tissulaire et de la capture cellulaire des vésicules liposomales sont indispensables pour leur emploi dans le transport de médicaments, et l'action pharmacologique de la substance encapsulée constitue le test ultime de biodisponibilité.

#### D - Utilisation des liposomes pour le transport de principes actifs.

Différentes substances telles que des protéines, des enzymes, des hormones, des acides nucléiques, des vitamines et de nombreux médicaments (antibiotiques, antitumoraux), ainsi que des virus, ont été incorporés dans des liposomes de compositions variées (voir la revue générale de GREGORIADIS (1979)).

Ces associations substances actives - liposomes ont eu des applications diverses en Biologie et en Médecine, en particulier dans le traitement de certaines déficiences enzymatiques, dans le transport d'agents antimicrobiens (pénicilline) ou de composés immunomodulateurs (muramyl-dipeptide, lymphokines) et en chimiothérapie anticancéreuse (actinomycine D, daunorubicine, bléomycine, 5-fluorouracil, méthotrexate, asparaginase...).

Nous avons retenu quelques exemples illustrant les nombreuses possibilités d'emploi des vecteurs liposomaux dans un but thérapeutique.

##### 1 - Agents thérapeutiques divers.

En 1976, COLLEY et RYMAN utilisèrent des enzymes piégés dans des liposomes pour étudier in vivo la possibilité d'un traitement des maladies lysosomiques. Dans le même but, WEISSMANN et coll. (1975) introduisaient des enzymes dans les lysosomes de cellules déficientes en hydrolases lysosomiques en les piégeant dans des liposomes recouverts d'immunoglobulines.

Des résultats particulièrement intéressants ont été obtenus avec de

l'insuline encapsulée dans des liposomes. L'insuline ainsi piégée et administrée par voie orale peut être captée du tractus gastro-intestinal et provoquer une diminution du taux sanguin de glucose chez des rats diabétiques (PATEL et RYMAN (1976)). Ce résultat permet d'envisager l'utilisation des liposomes pour l'administration orale de composés normalement non administrables par cette voie.

Cependant, la voie parentérale peut également être employée pour administrer l'insuline encapsulée dans des liposomes et permet d'obtenir, chez des chiens diabétiques, un taux plasmatique d'insuline inférieur à celui obtenu avec de l'insuline libre mais maintenu pendant plus de 8 heures après l'injection (voir Fig. 4; p. 24). En outre, après injection d'insuline intraliposomale, la concentration en glucose plasmatique atteint la même valeur que dans le cas d'une injection d'insuline libre et s'y maintient pendant au moins 9 heures après l'injection (PATEL (1985)).

Un exemple de réduction de la toxicité d'un médicament par incorporation dans un liposome a été apporté par MEHTA et coll. (1984) à propos de l'action antifongique de l'amphotéricine B. Leurs résultats suggèrent cependant que l'augmentation de l'efficacité thérapeutique de l'amphotéricine B liposomale n'est pas due à une modification de la pharmacocinétique ou de la distribution de la drogue, mais davantage à une diminution de son interaction avec les cellules animales par rapport aux cellules fongiques.

## 2 - Thérapeutiques antitumorale et antivirale.

L'usage des liposomes comme vecteurs de substances antitumorales a permis une nouvelle approche de la chimiothérapie du cancer. WILSON et MARSHALL (1982) ont ainsi observé l'action de l'asparaginase libre et piégée dans des liposomes sur la croissance d'un lymphosarcome de Souris. De même, JANSONS et PANZER (1983) ont décrit l'effet sur une lignée de cellules lymphoblastiques humaines du fragment A de la toxine diphtérique encapsulé dans un liposome.

L'étude menée par KOTSIFAKI et coll. (1985) sur la capture cellulaire de liposomes contenant du méthotrexate a permis d'aborder les problèmes de l'interaction liposome-cellule et du mode de pénétration

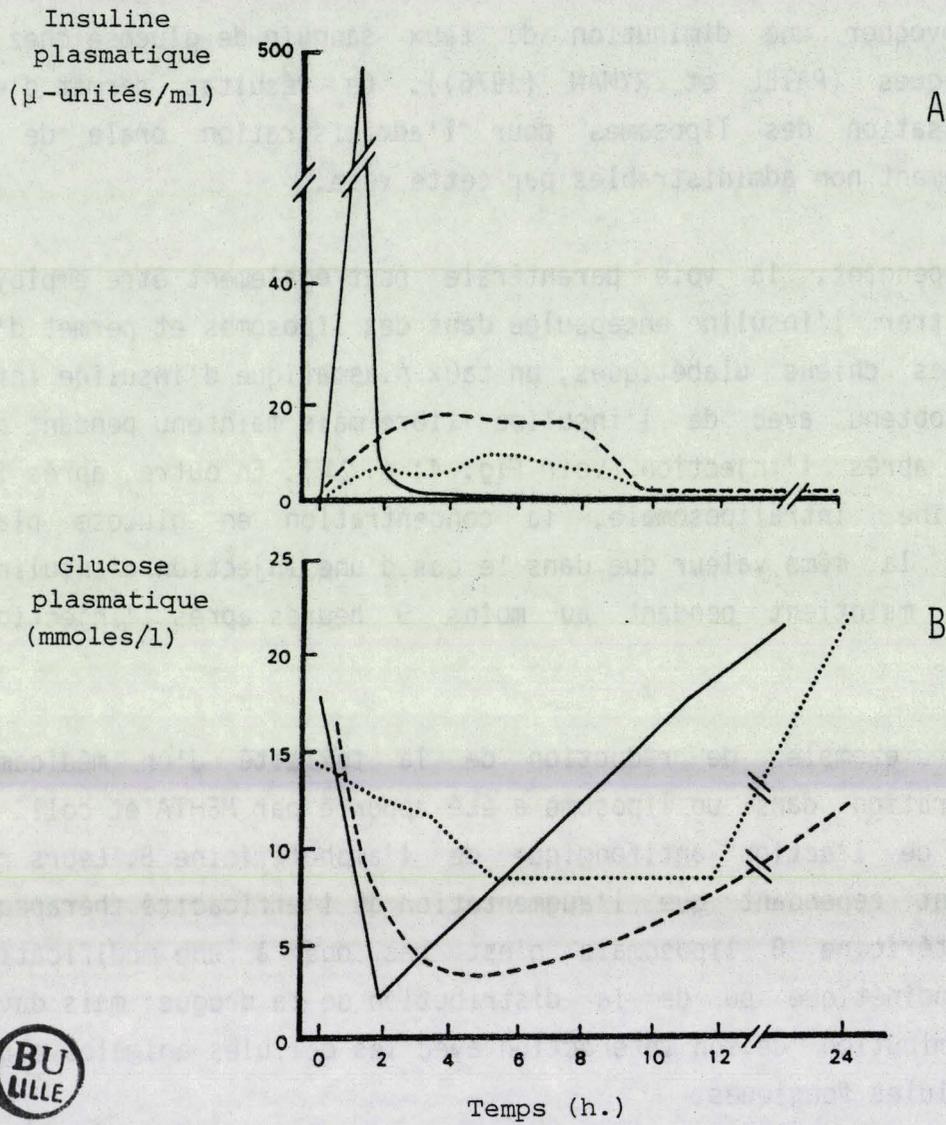


Figure 4

Concentrations plasmatiques d'insuline (A) et de glucose (B) après injection, chez des chiens diabétiques, d'insuline libre (—) ou encapsulée dans des liposomes (---).

Les courbes (...) correspondent aux résultats obtenus avec les préparations d'insuline intraliposomale traitées par la trypsine pour éliminer l'insuline associée à la surface liposomale.

D'après PATEL (1985)

intracellulaire du matériel encapsulé.

Ayant montré la possibilité d'introduction intracellulaire d'un dérivé du 5-fluorouracil: le 5-fluoroorotate par encapsulation dans un liposome, HEATH et coll. (1985) ont, en outre, obtenu une augmentation sensible de l'action de cet agent cytotoxique par utilisation de liposomes unilamellaires chargés négativement.

L'emploi des liposomes comme transporteurs des anthracyclines antitumorales (doxorubicine (ou adriamycine) et daunorubicine) présente un intérêt considérable sur le plan de la diminution de la cardiotoxicité dose-dépendante de ces dérivés, par modification de leur pharmacocinétique. Cet effet, observé par différents auteurs, est en partie attribuable à la diminution de la capture de l'anthracycline par le tissu cardiaque lors d'une administration sous forme intraliposomale.

Récemment, RAHMAN et coll. (1986), à la suite d'essais fructueux de protection contre la cardiotoxicité par administration de doxorubicine enfermée dans des liposomes constitués de cardiolipine, ont comparé l'efficacité thérapeutique vis-à-vis de différents modèles de tumeurs (voir l'exemple présenté à la figure 5; p.26) et étudié la toxicité chez la Souris de la doxorubicine libre ou encapsulée dans les liposomes de cardiolipine. Dans chaque type de tumeur étudié, la toxicité de la doxorubicine est réduite par encapsulation avec une augmentation significative de l'indice thérapeutique du médicament, confirmant l'intérêt clinique du système liposome-anthracycline.

Les liposomes ont également permis d'aborder le traitement des métastases de tumeurs. En 1980, FIDLER propose le traitement des métastases pulmonaires provenant d'un mélanome sous-cutané, par injection intraveineuse de liposomes multilamellaires contenant des lymphokines capables d'activer les macrophages alvéolaires pour les rendre tumoricides. De même, l'injection de muramyldipeptide (composé synthétique ayant les mêmes propriétés immunostimulantes) encapsulé dans des liposomes, provoque l'activation des macrophages alvéolaires et l'éradication des métastases cancéreuses (FIDLER et coll. (1981)).

Ces mêmes immunomodulateurs (lymphokines et muramyldipeptide) sous forme intraliposomale ont été utilisés pour activer des monocytes

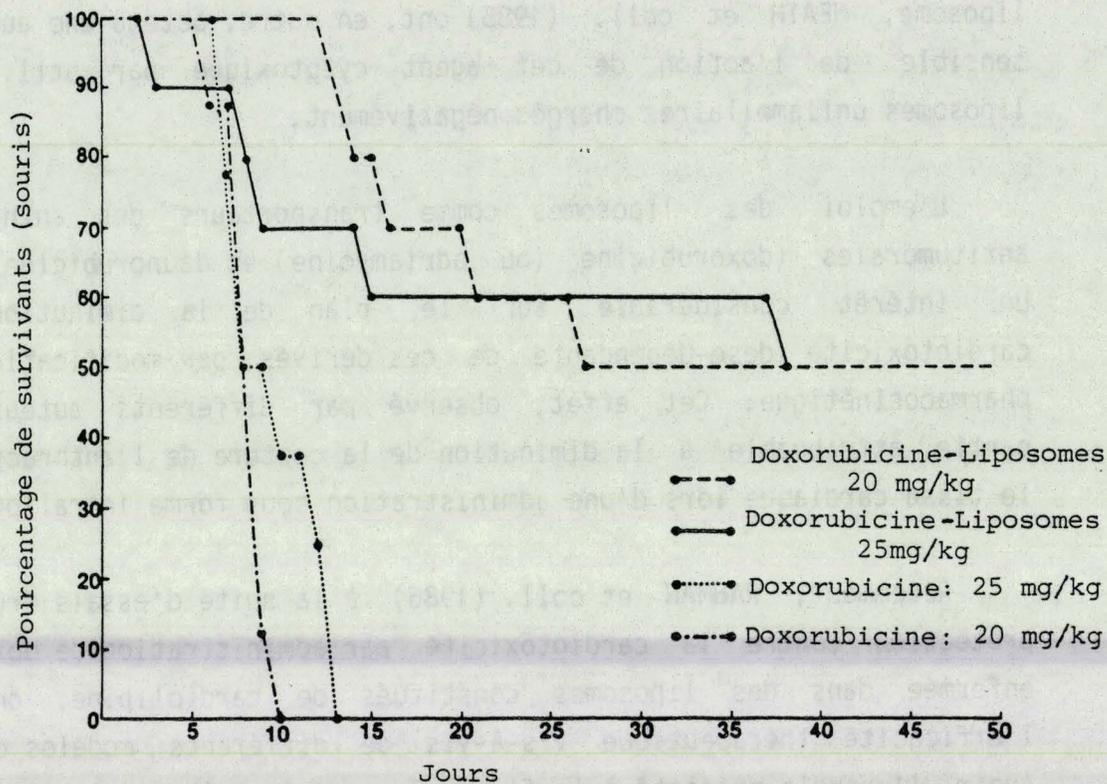


Figure 5

Comparaison de l'action de la doxorubicine libre ou encapsulée dans des liposomes de cardiolipine dans le traitement de la leucémie P388 (d'après RAHMAN et coll. (1986)).

humains. Ces monocytes activés, cytotoxiques, sont alors capables de détruire des cellules infectées par un virus sans toucher aux cellules non infectées (KOFF et coll. (1984)).

#### E - Ciblage des liposomes.

Le succès des applications thérapeutiques des systèmes liposomes - principes actifs dépend de la spécificité des liposomes pour la cible. Cette spécificité peut être atteinte en créant des liposomes ayant une affinité supérieure pour les tissus cibles. La distribution in vivo des liposomes peut être modulée en modifiant la taille, la charge et la composition des liposomes. Ils peuvent aussi être "dirigés" par attachement d'anticorps spécifiques ou incorporation de dérivés glycosylés.

Dès 1975, GREGORIADIS et NEERUNJUN ont montré que l'incorporation d'immunoglobulines spécifiques de cellules normales ou cancéreuses, ou de fétuine désialylée (présentant une affinité pour les hépatocytes) dans des liposomes contenant une substance antitumorale (la bléomycine) induisait la capture cellulaire sélective des complexes liposomes - drogue incorporée - sondes.

L'emploi d'anticorps spécifiques, et en particulier d'anticorps monoclonaux (HARSCH et coll. (1981)), pour cibler des liposomes s'est ensuite largement répandu. De plus, différentes méthodes d'attachement d'immunoglobulines aux liposomes ont été décrites (MARTIN et PAPAHADJOPOULOS (1982)). Les liposomes ciblés par anticorps ont permis, par exemple, d'augmenter l'efficacité d'agents cytotoxiques (HEATH et coll. (1983)).

Récemment, KLIBANOV et coll. (1985) ont proposé un modèle permettant d'évaluer l'interaction entre les liposomes portant des anticorps et les antigènes cibles, afin de contrôler l'efficacité du ciblage.

Différents essais de ciblage de liposomes par l'intermédiaire de dérivés glycosylés ont été réalisés: ciblage par l'asialoglycophorine (HILDENBRANDT et ARONSON (1980)), capture hépatique sélective de liposomes par incorporation de glycosides (GHOSH et coll. (1982)) ou de

lactosylcéramide (SPANJER et coll. (1984)).

Ces études confirment les possibilités de ciblage sélectif des liposomes vers des cellules ou des tissus, et justifient l'intérêt actuellement porté aux liposomes en tant que vecteurs de médicaments.

### III - AUTRES TRANSPORTEURS.

#### A - Macromolécules.

##### 1 - Protéines et peptides.

Différents auteurs ont utilisé des protéines pour introduire sélectivement une drogue dans les cellules où son action pharmacologique était requise. Les conjugués médicament - vecteur protéique sont efficaces si la liaison entre le médicament et la macromolécule est coupée dans les lysosomes avec libération de la drogue active dans la cellule.

##### a - Transport sélectif par conjugaison à l'albumine.

BARBANTI-BRODANO et coll. (1974) ont ainsi envisagé le traitement des proliférations pathologiques des macrophages par conjugaison à l'albumine de toxines fongiques (amanitine et phalloïdine). En effet, la conjugaison de ces toxines à l'albumine leur confère une toxicité sélective pour les cellules ayant une capacité de capture de protéines élevée (cellules sinusoïdales du foie, macrophages). Les lésions ultrastructurales produites dans ces cellules par les conjugués amanitine-albumine et phalloïdine-albumine sont identiques à celles causées dans les hépatocytes (leur cible d'origine) par les mêmes toxines libres. Les conjugués exercent probablement leur action toxique dans les cellules après digestion du transporteur protéique dans les lysosomes et libération des toxines libres.

La seconde application de l'albumine comme vecteur de médicament

concerne la possibilité d'un traitement des infections causées par des virus à ADN croissant dans les macrophages. FIUME et coll. (1983) ont ainsi conjugué deux inhibiteurs de la synthèse d'ADN: la 5-fluoro-désoxyuridine et le cytosine arabinoside, à la sérumalbumine pour obtenir une libération sélective de ces agents antiviraux dans les macrophages infectés.

L'étude menée par TROUET et coll. (1982) concerne des dérivés obtenus par liaison covalente de la daunorubicine à des protéines. L'agent antitumoral est conjugué à la sérumalbumine succinylée par une liaison amide, soit directement, soit en intercalant un bras peptidique variant de un à quatre acides aminés. Les acides aminés utilisés pour constituer ces bras sont l'alanine et la leucine (Fig. 6;p. 30).

In vitro , l'action des hydrolases lysosomiques libère de la daunorubicine intacte, uniquement à partir des conjugués préparés avec un bras tri- ou térapeptidique, conjugués par ailleurs stables en présence de sérum. De même, les meilleurs résultats thérapeutiques contre la leucémie L1210 sont obtenus avec les conjugués formés avec des bras tri- ou térapeptidiques, qui sont plus actifs que la daunorubicine et induisent un haut pourcentage de survivants à long terme. Leurs résultats suggèrent en outre l'endocytose des conjugués par les cellules L1210 et la libération de la daunorubicine après action des enzymes lysosomiques.

De manière analogue, des conjugués d'activité variable ont été obtenus en conjuguant la daunorubicine et le méthotrexate avec de la polylysine, par différents bras de couplage dérivant de diacides comme l'acide succinique (ARNOLD (1985)).

b - Ciblage par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de protéines ou de peptides.

Une autre approche du ciblage par des transporteurs de nature protéique consiste à utiliser la capacité de certaines membranes cellulaires à reconnaître spécifiquement des motifs peptidiques. Ce mode de ciblage par l'intermédiaire de récepteurs est à rapprocher du ciblage par glycosylation où les motifs reconnus sont de nature glycanique.

Deux voies essentielles de recherche ont été développées. La

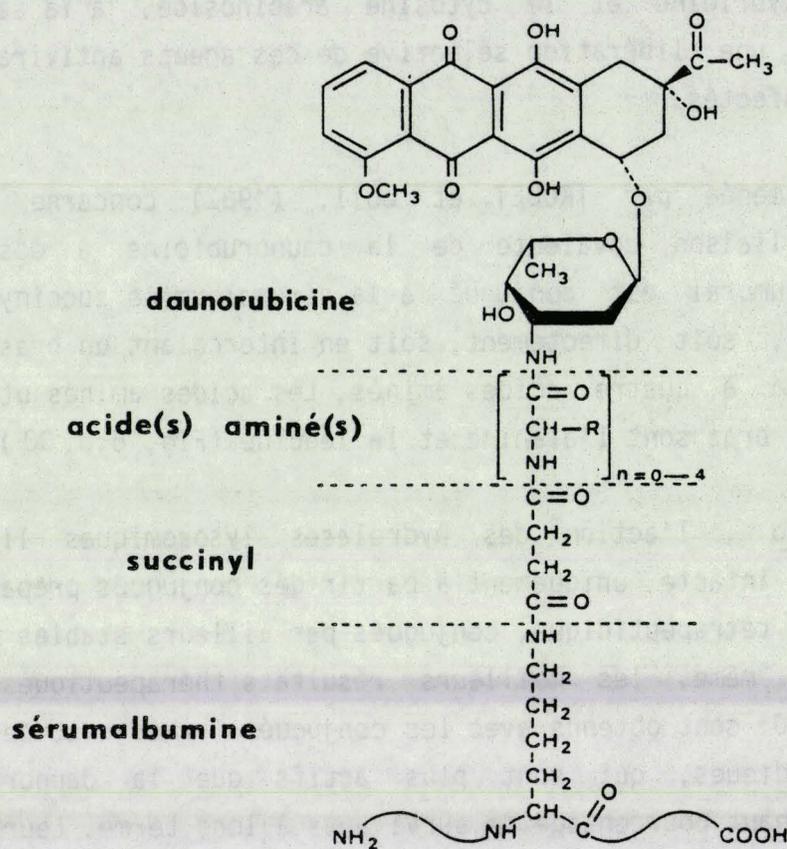


Figure 6

Structure des composés daunorubicine (DNR) - albumine  
d'après TROUET et coll. (1982).

Conjugués obtenus:

- Albumine - DNR
- Albumine - Leu - DNR
- Albumine - Ala - Leu - DNR
- Albumine - Leu - Ala - Leu - DNR
- Albumine - Ala - Leu - Ala - Leu - DNR

première concerne le ciblage par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques de la transferrine qui a ainsi servi de vecteur pour des toxines ou leurs sous-unités (chaîne A de la ricine, RASO et BASALA (1984); toxine diphtérique, O'KEEFE et DRAPER (1985)).

L'autre voie utilise les récepteurs spécifiques d'hormones peptidiques. L'insuline a ainsi permis le transport d'un enzyme vers des tissus ou des cellules riches en récepteurs à insuline, en particulier les cellules musculaires (POZNANSKY et coll. (1984)).

La mélanotropine (MSH), autre hormone peptidique, se lie à des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules d'un mélanome de Souris. Des conjugués de la mélanotropine avec la fluorescéine, puis avec des toxines, ayant été spécifiquement reconnus et internalisés par ces cellules de mélanome, VARGA et ses collaborateurs (VARGA et coll. (1977); VARGA (1985)) ont envisagé et démontré la possibilité d'une chimiothérapie spécifique des mélanomes par un conjugué mélanotropine - daunorubicine. Le complexe MSH-DNR internalisé par les cellules du mélanome s'avère plus toxique sur ces cellules que la daunorubicine libre, mais non toxique sur des cellules dépourvues du récepteur à la mélanotropine (fibroblastes 3T3).

c - Transport par des petits peptides; notion de prodrogues.

Les prodrogues résultent de la liaison temporaire d'une molécule active à un transporteur non toxique, dont la molécule est séparée au moment voulu et au site approprié par un processus chimique ou enzymatique. Lorsque la liaison au transporteur augmente la sélectivité du médicament, c'est-à-dire lorsque le site de transformation de la prodrogue en principe actif peut être localisé au site d'action du principe actif par l'intervention d'un processus enzymatique spécifique, le concept de prodrogue rejoint celui du ciblage de médicaments.

Les cellules tumorales produisent de nombreuses hydrolases dont certaines sont en partie spécifiques de ces tumeurs. Une molécule transportée par un petit peptide non toxique (le conjugué molécule-peptide constituant une prodrogue) peut rester sans action jusqu'à son arrivée au voisinage de la tumeur ou dans la cellule

tumorale, où elle est alors libérée et son action cytotoxique révélée. Selon RINGROSE (1983), un tel ciblage par des peptides présenterait un intérêt certain, davantage en exploitant les différences de spécificité des peptidases selon leur localisation, qu'en utilisant un système de transport sélectif ou l'intervention de récepteurs de surface.

## 2 - Les lectines.

### a - Propriétés et intérêt pour le ciblage.

Les propriétés des lectines ainsi que leurs possibilités d'emploi comme transporteurs de diverses molécules ont été décrites par SHIER (1979, 1985).

Les lectines, telles que l'agglutinine de germe de blé (WGA) et la concanavaline A (Con A), sont des protéines capables d'agglutiner les cellules par liaison à des oligosaccharides spécifiques présents sur la surface cellulaire. L'interaction des lectines avec les cellules s'effectue par liaison à la surface cellulaire, effet mitogène ou cytotoxique, ou endocytose. Les lectines interagissent également avec les tissus: rétention prolongée des lectines dans les tissus près du site d'injection, effets sur le système immunitaire, induction d'une réponse inflammatoire et possibilité d'une nécrose tissulaire.

Les lectines ont été utilisées en particulier comme marqueurs dans les études biologiques (marqueurs fluorescents ou radioactifs) et comme transporteurs d'enzymes (par exemple: Con A liée à la dextranase, à la L-asparaginase ou à la trypsine).

L'intérêt des lectines pour le transport d'agents cytotoxiques réside dans leurs différentes propriétés qui constituent des avantages par rapport aux anticorps monoclonaux, dont les applications récentes dans le ciblage sont beaucoup plus nombreuses. Ces propriétés sont la rétention prolongée des lectines au site d'injection dans les tissus, permettant la libération contrôlée d'agents pharmacologiques, et l'internalisation permettant leur transport à l'intérieur de la cellule. De plus, certaines lectines sont disponibles en grandes quantités et la purification des lectines ou de leurs conjugués est relativement aisée.

Cependant, les lectines ont quelques inconvénients qui limitent leurs applications: spécificité faible comparée à celle des anticorps monoclonaux et haute toxicité.

#### b - Exemples de ciblage par des lectines.

Deux exemples de ciblage par des lectines d'un agent antitumoral (la daunorubicine) sont particulièrement intéressants. Certaines lectines comme la WGA ou la Con A agglutinent et tuent spécifiquement les cellules tumorales sans affecter les cellules normales, dans des conditions expérimentales définies. Cette forte sélectivité de la Con A fut utilisée pour cibler la daunorubicine (KITAO et HATTORI (1977)). Le conjugué Con A - DNR augmente fortement la survie de souris inoculées avec des cellules tumorales (dont les cellules L1210). Cette sensibilité au conjugué in vivo est reliée à sa faculté d'agglutiner ces cellules in vitro .

La WGA a également été couplée à la daunorubicine en intercalant un bras de couplage (MONSIGNY et coll. (1980)). Le composé DNR-bras-WGA et son dérivé succinyl-WGA agglutinent les globules rouges humains et les cellules L1210. De plus, le dérivé DNR-bras-succinyl-WGA présente une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules L1210.

#### 3 - Acide désoxyribonucléique.

L'utilisation de l'ADN comme transporteur de médicaments est fondée sur la capacité de certains types cellulaires à internaliser des macromolécules.

TROUET et coll. (1979) ont ainsi analysé et comparé les propriétés pharmacologiques, toxicologiques et chimiothérapeutiques de la daunorubicine, de l'adriamycine et de leurs complexes avec l'ADN. Ces auteurs ont, en particulier, noté une diminution de la capture des anthracyclines dans le coeur lorsqu'elles sont liées à l'ADN, ainsi qu'une augmentation du taux de survie après traitement par les drogues complexées à l'ADN, chez des souris ayant reçu des cellules leucémiques.

Cependant, de nombreuses questions restent posées concernant la stabilité des complexes de l'ADN dans le flux sanguin (le "vecteur" ADN étant vulnérable aux nucléases sanguines), le mécanisme de l'activation

de la drogue complexée in vivo, le comportement des cellules normales et tumorales au point de vue endocytose de l'ADN et la distribution de l'ADN aux différents tissus et organes.

#### 4 - Les dextrans.

Les dextrans sont des polymères synthétiques d' $\alpha$ -D-glucose. Ils sont retenus dans la circulation sanguine en fonction de leur poids moléculaire et sont également retenus dans le système réticulo - endothélial (MOLTENI (1979)). Leurs propriétés de clearance variable en fonction du poids moléculaire et de réaction avec de nombreux composés grâce à leurs groupements OH ont permis d'envisager leur emploi comme transporteurs d'agents actifs.

Ils ont ainsi été couplés avec des anticorps, des hormones (insuline), des antibiotiques (ampicilline, tétracycline), des vitamines, des protéines, des peptides et des enzymes (trypsine).

Le couplage d'un médicament à de tels polymères lui confère une action prolongée et une meilleure stabilité biologique et chimique. Les complexes entre les substances pharmacologiques et les dextrans sont obtenus par des réactions chimiques relativement simples et, d'un point de vue pharmacocinétique, ces macrodérivés ont une demi-vie plus longue que celle des drogues de départ. Dans les complexes drogues-dextrans, le polysaccharide protège la partie active de la drogue contre la dégradation chimique ou biologique, et transporte le médicament non endommagé jusqu'aux organes sans diminuer, et même le plus souvent en augmentant, sa biodisponibilité.

Ces polymères peuvent aussi servir de transporteurs d'agents antitumoraux même s'ils n'ont pas d'affinité spécifique pour les cellules tumorales, les tissus cancéreux pouvant être plus perméables aux macromolécules.

Le mécanisme d'action d'un conjugué médicament - dextran peut inclure une libération lente du médicament actif à partir du complexe, expliquant son efficacité et sa toxicité moindre.

La daunorubicine couplée à des dextrans présente ainsi une efficacité antitumorale supérieure à celle de la drogue libre (BERNSTEIN et coll. (1978)), ainsi qu'une diminution de la toxicité et des atteintes histopathologiques des organes (LEVI-SCHAFFER et coll. (1982)).

## B - Transporteurs cellulaires.

Différents auteurs ont envisagé l'emploi des cellules elles-mêmes comme transporteurs biodégradables d'agents thérapeutiques.

### 1 - Les érythrocytes.

Les érythrocytes, utilisés comme transporteurs, protègent les enzymes et les médicaments piégés contre une dégradation prématurée ou une inactivation, ainsi que l'hôte contre des effets pharmacologiques ou immunologiques indésirables (IHLER (1979)).

Les érythrocytes modifiés par piégeage d'agents thérapeutiques peuvent circuler aussi longtemps que les érythrocytes normaux, ce qui permet les réactions enzymatiques et la libération contrôlée des substances piégées dans la circulation sanguine. Cependant, une lyse intravasculaire de l'érythrocyte peut se produire, ainsi que sa capture et sa destruction rapide par les cellules du système réticulo-endothélial (foie et rate). Cette capture, permettant l'apport à ces cellules des substances emprisonnées pourrait être mise à profit dans le traitement des atteintes malignes du foie et de la rate.

La structure chimique des composés encapsulés peut être modifiée (par liaison à des macromolécules ou à des anticorps) afin de réguler leur taux de diffusion à travers la membrane érythrocytaire. La modification des propriétés de surface de l'érythrocyte, par exemple à l'aide d'anticorps, permet d'augmenter la spécificité de capture par les cellules tumorales par rapport aux cellules normales.

Des enzymes variés ont été piégés dans des érythrocytes pour agir sur un substrat-cible présent dans le sang ou dans les tissus, ou pour traiter les désordres métaboliques des érythrocytes eux-mêmes (IHLER

(1979)).

Le principal avantage du "vecteur érythrocyte", outre sa biodégradabilité, réside dans l'effet de protection du matériel encapsulé.

## 2 - Autres cellules.

Différentes autres cellules comme les leucocytes, les lymphocytes ou les fibroblastes ont aussi été étudiées en tant que vecteurs possibles d'agents thérapeutiques. Les fibroblastes, par exemple, en tant que source d'enzymes lysosomiques, sont intéressants pour corriger des déficiences enzymatiques (DEAN et MUIR (1979)).

## C - Transporteurs synthétiques (ou artificiels)

Outre les liposomes précédemment décrits, de nombreux systèmes synthétiques de transport et de ciblage de médicaments ont été développés. Nous en présentons quelques exemples.

### 1 - Cellules artificielles.

Les cellules artificielles sont constituées par une membrane sphérique ultrafine, de dimensions cellulaires, enveloppant un matériel biologiquement actif. Elles ont été utilisées en Biologie et en Médecine pour le transport de divers composés tels que des enzymes, des hormones et différents agents pharmacologiques (CHANG (1985)).

### 2 - Polymères.

Le but de l'utilisation des polymères dans le ciblage de médicaments est d'obtenir une libération contrôlée du médicament pendant une période prolongée. Ces systèmes, réservés à l'origine aux molécules de petit poids moléculaire, permettent actuellement, grâce à l'emploi de certains polymères, le transport de macromolécules (insuline, interféron, polypeptides, facteurs de croissance) (LANGER et coll. (1985)).

La libération lente des macromolécules à partir des polymères

s'effectue par diffusion à travers des canaux de la matrice du polymère. Il existe des systèmes polymériques magnétiques, dont le mécanisme d'action, encore mal connu, pourrait faire intervenir une variation des pores de la matrice sous l'action de billes magnétiques.

Des polymères biodégradables d'acides lactique et glycolique ont également été utilisés pour transporter divers composés (par exemple, un médicament antipaludique, WISE et coll. (1979)). D'autres polymères biodégradables comme des polyanhydrides sont actuellement étudiés et permettraient la libération des drogues davantage par érosion que par diffusion (LEONG et coll. (1985)).

### 3 - Microsphères.

Les microsphères utilisées comme transporteurs sont des particules sphériques micrométriques contenant un médicament encapsulé, et préparées le plus souvent à partir d'albumine. La libération du matériel encapsulé peut être contrôlée par stabilisation de la matrice protéique. Par administration intraveineuse, les microsphères d'albumine sont naturellement ciblées, en fonction de leur taille, vers les poumons ou le foie.

Des microsphères magnétiques d'albumine ont servi de vecteurs d'agents antitumoraux tels que la doxorubicine (WIDDER et coll. (1981)) et sont intéressantes pour le traitement de maladies localisées.

Le ciblage de microsphères chargées en médicament est également possible en les recouvrant d'anticorps monoclonaux pour constituer des "immunosphères" (ILLUM et JONES (1985)).

Des microsphères de constitution différente ont été préparées et utilisées: microcapsules de nylon, microsphères acryliques, et microsphères de polyglutaraldéhyde (par exemple pour le transport de l'adriamycine, TOKES et coll. (1982)).

## CHAPITRE II

### LE CIBLAGE PAR GLYCOSYLATION

Le ciblage des médicaments par glycosylation concerne l'utilisation de glycoconjugués naturels ou de synthèse (néoglycoconjugués) comme transporteurs de principes actifs.

Avant d'aborder les différents essais de ciblage réalisés par l'intermédiaire de composés glycosylés, il convient de définir la notion de récepteurs membranaires, intervenant en particulier dans la reconnaissance par les cellules de structures glucidiques. Un certain nombre de travaux ont, en effet, suggéré l'existence de signaux de reconnaissance présents au niveau de la membrane cellulaire et susceptibles de reconnaître et de se lier à certains sucres spécifiques. Ces signaux sont les lectines membranaires.

#### I - LES LECTINES MEMBRANAIRES.

De nombreuses lectines membranaires ont été trouvées dans des microorganismes (bactéries, virus, parasites, amibes) et chez les Eucaryotes, où elles interviennent dans des processus variés de reconnaissance et d'adhésion cellulaire (voir Tableau II; p. 39; d'après MONSIGNY et coll. (1979)).

Chez les Mammifères, des lectines membranaires ont été mises en évidence et caractérisées dans différentes cellules telles que les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules du système réticulo - endothélial ou les lymphocytes (OLDEN et coll. (1982), MONSIGNY et coll. (1983)).

TABLEAU II : LECTINES MEMBRANAIRES ( d'après MONSIGNY et coll.(1979)).

	Origiu	Sugar specificity	References
Virus	Myxovirus	NeuNAc-glycophorin	Bachi <i>et al.</i> , 1977 Paulson <i>et al.</i> , 1979
Bacteria	<i>Escherichia coli</i> (Pili)	D-mannose ( $\alpha$ -methyl-D-mannoside)	Olek <i>et al.</i> , 1977, 1978 Salit and Gotschlich, 1977
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D-galactose D-mannose	Gilboa-Garber, 1972 Gilboa-Garber <i>et al.</i> , 1977
Amoeba	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	D-mannose	Brown <i>et al.</i> , 1975
Slime moulds	<i>Dictyostelium discoideum</i>	D-galactose, and related sugars	Frazier <i>et al.</i> , 1975
	<i>Polyspondylium pallidum</i>	D-galactose, lactose	Simpson <i>et al.</i> , 1975
Yeasts	<i>Hansenula wingeei</i>	D-mannose	Burke and Ballou, 1978
Marine sponge	<i>Axinella polyplodes</i>	D-galactose	Baldo <i>et al.</i> , 1977
	<i>Aaptos papillata</i>	N-acetyl-D-glucosamine and $\beta$ -1-4-oligomers	Bretting <i>et al.</i> , 1976
	<i>Geodia cydonium</i>		Vaith <i>et al.</i> , 1979
Plants	<i>Ricinus communis</i> (inner mitochondrial membrane)	D-galactose, lactose	Bowles <i>et al.</i> , 1976
	<i>Phaseolus aureus</i>	D-galactose, D-xylose	Bowles and Kauss, 1976
	Protoplasts	$\beta$ -D-glucose	Larkin, 1977, 1978
Sea urchin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine	Asao and Oppenheimer, 1979
Fish	<i>Electrophorus electricus</i>	D-galactose	Teichberg <i>et al.</i> , 1975
Muscle	Rat Myoblasts L 6	D-galactose Thiodigalactoside	Gartner and Podleski, 1976
	Embryonic chick muscle	D-galactose Glycosaminoglycans	Den and Malinzak, 1977 Kobiler and Barondes, 1979
	Embryonic chick pectoral muscle	D-galactose N-acetyl-D-galactosamine	Nowak <i>et al.</i> , 1977 Mir-Lechaire and Barondes, 1978
Retina	Chick embryo-retina and spinal cord	D-galactose, lactose	Eisenbarth <i>et al.</i> , 1978 Kobiler and Barondes, 1977
Brain	Chick optic tectum	D-galactose, lactose	Gremo <i>et al.</i> , 1978
	Rat	D-galactose and other sugars	Simpson <i>et al.</i> , 1977
Heart	Chick	D-galactose, lactose	Kobiler and Barondes, 1977
	Bovine	$\beta$ -D-galactoside	De Waard <i>et al.</i> , 1976
Lung	Chick	D-galactose	Kobiler and Barondes, 1977
		$\beta$ -D-galactoside	De Waard <i>et al.</i> , 1976
Cartilage	Mouse costal cartilage	D-glucosamine 2-deoxy-D-glucose	Chany-Fournier <i>et al.</i> , 1978
Liver	Rat	D-galactose	Morell <i>et al.</i> , 1971 Weigel <i>et al.</i> , 1978 Tanabe <i>et al.</i> , 1979
	Rat	N-acetyl-D-glucosamine	Stockert <i>et al.</i> , 1976
	Rat (hepatocytes and Kupffer cells)	N-acetyl-D-glucosamine	Steer <i>et al.</i> , 1978 Morell <i>et al.</i> , 1968
	Rabbit	D-galactose	Hudgin <i>et al.</i> , 1974
	Rabbit	D-mannose and/or N-acetyl-D-glucosamine	Kawasaki <i>et al.</i> , 1978
	Chicken	N-acetyl-D-glucosamine	Kawasaki and Ashwell, 1977
	Mouse (hepatocytes)	L-fucosyl- $\alpha$ -3-N-acetyl-D-glucosamine	Schnaar <i>et al.</i> , 1978 Prieels <i>et al.</i> , 1978
	Bovine	N-acetyl-D-glucosamine and $\beta$ -4-oligomers	Bowles and Kauss, 1976
Spleen	Rat (red pulp)		Achord <i>et al.</i> , 1977
	Mouse	D-galactose, D-mannose N-acetyl-D-glucosamine N-acetyl-D-galactosamine	Kiëda <i>et al.</i> , 1978, 1979
Thymus	Mouse	D-galactose, D-mannose N-acetyl-D-glucosamine N-acetyl-D-galactosamine	Kiëda <i>et al.</i> , 1978, 1979
Stem cells	Teratocarcinoma	Mannose	Grabel <i>et al.</i> , 1979
Fibroblasts	Human	Mannose-6-phosphate	Kaplan <i>et al.</i> , 1977
		D-fucose, N-acetyl-D-galactosamine	Dyart and Edwards, 1977
Macrophages	Rat alveolar	Mannose and/or N-acetyl-D-glucosamine	Stahl <i>et al.</i> , 1975
	Rat liver	Mannose or N-acetyl-D-glucosamine	Achord <i>et al.</i> , 1978
	Rat Kupffer cells	D-galactose	Kolb and Kolb-Bachofen, 1978
	Rat Kupffer cells	N-acetyl-D-glucosamine	Steer <i>et al.</i> , 1978
Platelets	Human	Hexosamine, basic amino acids, galactose	Gartner <i>et al.</i> , 1978
Erythrocytes	Human glycophorin	N-acetyl-D-galactosamine	Bowles and Hanke, 1977
Serum	Fibronectin	GT <sub>1</sub> , GD <sub>1a</sub> gangliosides	Kleinman <i>et al.</i> , 1979



Des lectines membranaires spécifiques de sucres sont également présentes sur différentes lignées de cellules tumorales (mélanomes, hépatomes...) (voir Tableau III; p.41 ; d'après MONSIGNY et coll. (1983)).

Dans cet exposé, nous nous sommes limitée aux études concernant certaines lectines membranaires des Eucaryotes reconnaissant des sucres (galactose, mannose...) pouvant se trouver en position terminale dans les chaînes glycaniques des glycoprotéines et enzymes, et dont la spécificité, les propriétés, le rôle et le mécanisme d'action sont assez bien connus.

Ces études montrent, en outre, que les glycoprotéines interviennent à la fois comme ligands spécifiques et comme récepteurs (lectines) dans de nombreux systèmes de reconnaissance.

#### A - Les récepteurs des hépatocytes.

L'étude des lectines membranaires s'est considérablement développée grâce aux travaux des chercheurs de l'équipe d'ASHWELL. Leurs résultats indiquent la présence de sites récepteurs sur les hépatocytes des Mammifères et des Oiseaux et permettent d'expliquer le rôle des sucres et des chaînes glucidiques dans la reconnaissance hépatique et le transport des glycoprotéines circulantes.

Par la suite, une lignée cellulaire (cellules d'hépatome Hep G2) renfermant un récepteur des asialoglycoprotéines fut décrite et caractérisée (SCHWARTZ et coll. (1981a)).

Ces lectines hépatiques responsables de l'endocytose par récepteur de glycoprotéines partiellement déglycosylées sont parmi les récepteurs connus les mieux caractérisés.

##### 1 - Récepteurs des asialoglycoprotéines: introduction.

Ces récepteurs ont été décrits dans différentes revues générales: ASHWELL et MORELL (1974), ASHWELL et HARFORD (1982), HARFORD et ASHWELL

TABLEAU III

LECTINES MEMBRANAIRES DE CELLULES TUMORALES

( d'après MONSIGNY et coll.(1983)).

<i>D-Gal, Gal-β-Glc or Gal-β-3-GalNAc</i>		
<i>Murine</i>		
Fibrosarcoma	Raz and Lotan	1981
Hybridomas (SP <sub>2</sub> ×B cells)	Kieda	1980
Melanoma B 16	Raz and Lotan	1981
Neuroblastoma	Teichberg <i>et al.</i>	1975
<i>Human</i>		
Adenocarcinoma Hela	Bussian and Wriston	1977
	Huang	1978
	Raz and Lotan	1981
Hepatoma	Schwartz <i>et al.</i>	1981
Melanoma	Raz and Lotan	1981
<i>α-D-Man</i>		
<i>Murine</i>		
Teratocarcinoma	Grabel <i>et al.</i>	1979
Myeloma SP2	Kieda	1980
<i>α-D-Glc</i>		
<i>Murine</i>		
Carcinoma LLC	Roche <i>et al.</i>	1982
<i>Human</i>		
Melanoma C 32	unpublished	
<i>6-P-Man</i>		
<i>Human</i>		
Chronic myelogenous leukemia K562	Forbes <i>et al.</i>	1981
<i>α-L-Fuc</i>		
<i>Murine</i>		
Teratocarcinoma	Grabel <i>et al.</i>	1981



(1982).

La mise en évidence du récepteur hépatocytaire des asialoglycoprotéines chez les Mammifères trouve son origine dans la démonstration par ASHWELL et ses collaborateurs (ASHWELL et MORELL (1971, 1974)) du rôle spécifique de l'acide sialique dans la régulation du temps de survie dans la circulation des glycoprotéines sériques.

Lorsque les résidus de galactose en position subterminale dans la chaîne glycanique des glycoprotéines sont exposés par l'enlèvement enzymatique des résidus d'acide sialique, ils constituent une configuration structurale reconnaissable par le foie et capable d'induire la capture rapide et le catabolisme de l'asialoglycoprotéine injectée. Le galactose apparaît ainsi comme un déterminant spécifique pour la reconnaissance hépatique des glycoprotéines désialylées, chez les Mammifères. De plus, la capacité de liaison du récepteur hépatique responsable de la capture (lui-même glycoprotéine sialylée) est dépendante de l'intégrité de ses résidus d'acide sialique.

Les recherches consécutives à la démonstration de ce phénomène de reconnaissance des asialoglycoprotéines concernent, d'une part, la détermination de la nature du récepteur et de son interaction avec les ligands et, d'autre part, l'étude des relations entre le récepteur et la cellule où il est présent (distribution subcellulaire du récepteur, devenir du ligand endocyté, réutilisation du récepteur).

## 2 - Mise en évidence du récepteur des asialoglycoprotéines.

### a - Capture et catabolisme de l'asialocéruléoplasmine.

Lors de l'étude du rôle de la céruléoplasmine dans le métabolisme du cuivre, MORELL et coll. (1968) ont remarqué que l'asialocéruléoplasmine radioactive injectée chez le Lapin disparaissait très rapidement de la circulation alors que la céruléoplasmine native a un temps de demi-vie élevé. Ces auteurs ont étudié ce phénomène de capture et, en particulier, les différences dans la disparition du sérum de la céruléoplasmine de Lapin, native, marquée au  $^{64}\text{Cu}$ , ou modifiée. La

spécificité du galactose semble prouvée par l'augmentation du temps de survie quand le galactose est modifié ou enlevé (Fig. 7; p.44 ).

Les études de localisation de la capture et du catabolisme de la céruléoplasmine désialylée ont été menées par GREGORIADIS et coll. (1970). La disparition rapide de l'asialocéruléoplasmine du sérum est accompagnée d'une accumulation de la radioactivité dans le foie (80% après 25 minutes) avec une localisation dans les cellules du parenchyme hépatique (hépatocytes). Les expériences de distribution intracellulaire de l'asialocéruléoplasmine, réalisées chez le Rat, ont situé le catabolisme au niveau du lysosome.

En utilisant une céruléoplasmine dont l'acide sialique terminal était marqué au  $^{14}\text{C}$  (céruléoplasmine préparée par transfert enzymatique des acides sialiques sous l'action d'une sialyl-transférase), HICKMAN et coll. (1970) ont montré qu'un petit nombre de résidus de galactose exposés suffisent pour permettre le passage de la glycoprotéine de la circulation dans le foie. Les résultats de l'étude statistique de VAN DEN HAMER et coll. (1970) indiquent que deux résidus de galactose exposés suffisent pour la capture.

b - Généralisation du catabolisme hépatique des asialoglycoprotéines.

Les études suivantes de MORELL et coll. (1971) montrent le rôle général des résidus d'acide sialique terminaux des glycoprotéines circulantes dans la détermination de leur survie dans la circulation. Après injection chez le Rat, toutes les glycoprotéines désialylées, à l'exception de l'asialotransferrine, sont rapidement captées du sang et sont retrouvées dans le foie. C'est le cas en particulier, après désialylation, de l'orosomucoïde, de la fêtuine, de la céruléoplasmine et de deux hormones gonadotropes: la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) et l'hormone folliculostimulante (FSH) dont la désialylation correspond à l'inactivation (Fig. 8; p.45 ). De plus, ces glycoprotéines désialylées et leurs glycopeptides (désialylés) peuvent exercer une inhibition compétitive sur la capture de l'asialocéruléoplasmine.

Par la suite, différents auteurs ont signalé la liaison ou la capture par le foie de glycoprotéines désialylées diverses: asialo-TBG

Pourcentage de radioactivité dans le sérum

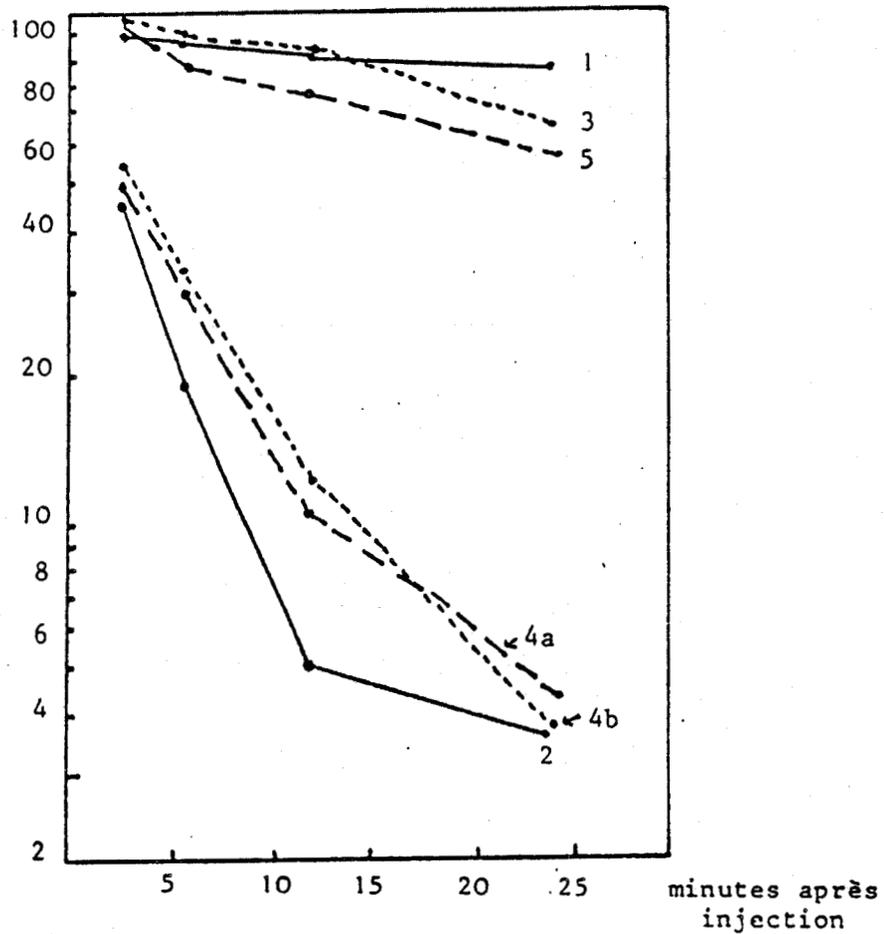


Figure 7

Disparition du sérum de la céruloplasmine de Lapin (native marquée au  $^{64}\text{Cu}$  et modifiée); d'après MORELL et coll. (1968).

- Courbes 1 : Céruloplasmine  
2 : Asialocéruloplasmine  
3 : Céruloplasmine oxydée  
4a et 4b : Asialocéruloplasmine doublement marquée (4a: T; 4b:  $^{64}\text{Cu}$ )  
5 : Asialoagalactocéruloplasmine

Pourcentage  
de produit  
marqué  
injecté par  
ml de plasma

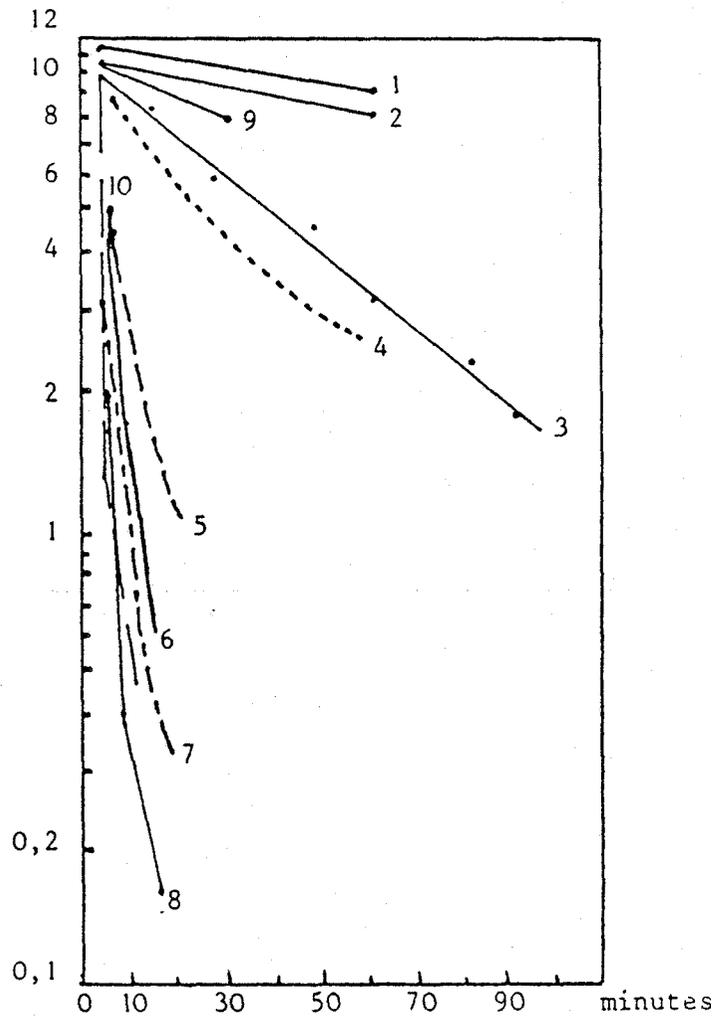


Figure 8

Temps de survie dans le plasma, chez le Rat, de glycoprotéines désialylées et tritiées; d'après MORELL et coll. (1971).

1 : Asialotransferrine ; 2 : Céruléoplasmine ; 3 : Asialothyroglobuline ; 4 : Asialo  $\alpha_2$ -macroglobuline ; 5 : Asialohaptoglobuline ; 6 : Asialocéruléoplasminé ; 7 : Asialofétuine ; 8 : Asialoorosomucoïde ; 9 : Gonadotrophine chorionique humaine ( $^{125}\text{I}$ -HCG) ; 10 : Asialo - HCG.

(thyroxin binding globulin), ZINN et coll. (1978); antigène carcinoembryonnaire désialylé, THOMAS et JONES (1978); asialoglycophorine, HILDENBRANDT et ARONSON (1979).

Des expériences réalisées in vitro sur homogénat de foie de Rat (PRICER et ASHWELL (1971)) ont montré la localisation du site de liaison des glycoprotéines désialylées au niveau de la fraction des membranes plasmiques et indiqué, d'une part, un parallélisme entre les systèmes in vivo et in vitro (spécificité, inhibition compétitive, effet du calcium, pH optimal) et, d'autre part, la nécessité, pour la liaison, de la présence de résidus d'acide sialique sur les membranes de l'hépatocyte.

### 3 - Isolement, caractérisation et structure des récepteurs hépatocytaires spécifiques des asialoglycoprotéines.

Le récepteur des asialoglycoprotéines (HBP = Hepatic binding protein) de différentes espèces de Mammifères a été étudié dans le foie entier in vivo, dans le foie perfusé in situ, et dans des hépatocytes isolés.

La protéine de liaison hépatique des Mammifères est une lectine. En effet, elle est capable d'agglutiner les érythrocytes (STOCKERT et coll. (1974)) et d'induire la mitose des lymphocytes (NOVOGRODSKY et ASHWELL (1977)). La liaison de cette lectine aux asialoglycoprotéines nécessite la présence absolue d'ions  $Ca^{2+}$ .

Les travaux de PAULSON et coll. (1977) ont confirmé l'interprétation proposée par STOCKERT et coll. (1977) de l'inactivation apparente de cette lectine par désialylation. La perte de sa capacité de liaison serait le résultat de la compétition pour les sites de liaison des résidus de galactose du récepteur, exposés par la désialylation.

#### a - Isolement et étude du récepteur hépatique de Lapin.

Ayant retrouvé les propriétés de liaison des récepteurs hépatiques à partir d'une fraction d'homogénat de foie de Lapin, MORELL et SCHEINBERG (1972) ont solubilisé le complexe récepteur -  $^{125}I$  asialoorosomucoïde par traitement de la fraction par le Triton X100. Ils ont également

obtenu la solubilisation par le Triton X100 des récepteurs non chargés et réalisé la formation du complexe récepteur - asialoorosomucoïde en solution.

La protéine de liaison du foie de Lapin a été purifiée par chromatographie d'affinité sur asialoorosomucoïde - Sepharose 4B (HUDGIN et coll. (1974)). Le matériel isolé, hydrosoluble et exempt de lipides, a été identifié comme étant une glycoprotéine contenant 10% de sucres. Cette protéine est présente dans un état d'aggrégation important qui semble résulter des propriétés d'auto-association d'un oligomère.

L'auto-association est complètement et rapidement détruite par addition de Triton X100 avec apparition d'un seul composant. Le traitement de celui-ci par le dodécylsulfate de sodium a permis d'identifier et d'isoler deux sous-unités de poids moléculaires 48000 et 40000 (KAWASAKI et ASHWELL (1976a)).

Deux glycopeptides ont été isolés à partir de la protéine intacte, par hydrolyse pronasique. Une structure glucidique et une possibilité de distribution de ces glycopeptides dans les deux sous-unités ont été proposées (KAWASAKI et ASHWELL (1976b)). Par la suite, LOWE et NILSSON (1983) ré-examinèrent la structure glucidique de la protéine de liaison de Lapin. La structure qu'ils ont proposée pour l'oligosaccharide de type N-acétyllactosaminique est présentée dans la figure 9 (p. 48).

#### b - Etude du récepteur hépatique de Rat.

Le récepteur du foie de Rat a également été isolé et caractérisé. Les propriétés physicochimiques du récepteur hépatique du Rat diffèrent selon les auteurs en ce qui concerne le nombre et la taille des sous-unités (voir Tableau récapitulatif IV; p. 49).

TANABE et coll. (1979) indiquent la présence d'une sous-unité majeure de 47000 Da et de deux sous-unités mineures de poids moléculaires supérieurs. SCHWARTZ et coll. (1981b) ont obtenu une préparation du récepteur de foie de Rat contenant quatre polypeptides différents dont la masse moléculaire varie de 40000 à 120000. Par une approche différente de l'identification du récepteur, indépendante de la liaison (utilisation d'un anticorps monoclonal), ces auteurs ont montré que les espèces

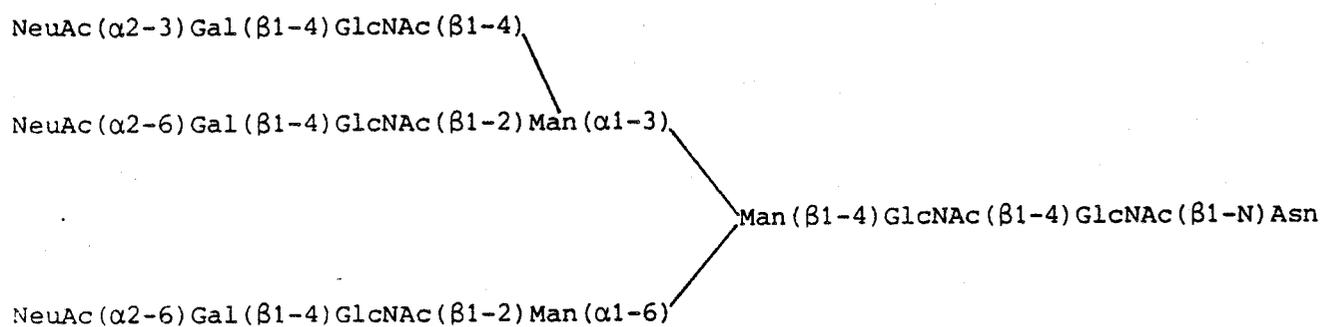


Figure 9

*Structure de l'oligosaccharide de type N-acétyllactosaminique de la lectine hépatique de Lapin, proposée par LOWE et NILSSON (1983).*

TABLEAU IV : PROPRIETES DES LECTINES HEPATIQUES DE DIFFERENTES ESPECES.

ESPECE	SPECIFICITE	SOUS-UNITES		SEQUENCE D'ACIDES AMINES	AUTRES CARACTERISTIQUES
		nombre	masse moléculaire		
Rat	Gal/GalNac (Glc)	1 à 4	47000 (+ 2 mineures) Tanabe et coll. (1979)  40000, 55000, 65000 et 120000 Schwartz et coll. (1981b)	déterminée Drickamer et coll. (1984)  - protéine majeure (RHL <sub>1</sub> ) de 283 AA - fragment commun aux deux protéines mineures (RHL <sub>2/3</sub> ) de 101 AA	nécessité d'ions Ca <sup>2+</sup>
Lapin	Gal/GalNac (Glc)	2	48000 et 40000 Kawasaki et Ashwell (1976a)	non déterminée	nécessité d'ions Ca <sup>2+</sup>
Homme	Gal/GalNac	1	41000 Baenziger et Maynard (1980)  46000 Schwartz et Rup (1983)	déterminée (291 AA) Spiess et coll. (1985)	nécessité d'ions Ca <sup>2+</sup>
Souris	Gal/GalNac	2	43000 (majeure) et 28000 (mineure) Rosenfeld et coll. (1986)	non déterminée	nécessité d'ions Ca <sup>2+</sup>
Poulet	GlcNac	1	26000 Kawasaki et Ashwell (1977)	déterminée (207 AA) Drickamer (1981)	nécessité d'ions Ca <sup>2+</sup>



majeures trouvées sur les hépatocytes intacts sont de 55000 et 65000 Da. Par une technique d'inactivation par radiation, STEER et coll. (1981) ont estimé à 105000 le poids moléculaire minimal du récepteur intact des glycoprotéines désialylées ("unité fonctionnelle"), mesuré d'une manière directe dans les membranes plasmiques de foie de Rat. Les deux polypeptides prédominants sur la surface cellulaire (54000 et 64000) sont phosphorylés (TAKAHASHI et coll. (1985)).

La disposition transmembranaire du récepteur hépatique de Rat, proposée par HARFORD et ASHWELL (1981) fut confirmée par CHIACCHIA et DRICKAMER (1984). La lectine hépatique de Rat est une protéine membranaire insérée par une séquence-signal interne, et comprenant un domaine COOH terminal extracellulaire et un NH<sub>2</sub> cytoplasmique.

DRICKAMER et coll. (1984) ont déterminé la séquence complète (283 résidus) du polypeptide majeur (RHL1) du récepteur des asialoglycoprotéines du foie de Rat, ainsi que la séquence du fragment commun (101 résidus) aux sous-unités mineures (RHL2/3).

#### c - Autres récepteurs hépatiques des Mammifères.

La lectine hépatique humaine est composée d'une seule sous-unité de 41000 Da (BAENZIGER et MAYNARD (1980)), ou 46000 Da (SCHWARTZ et RUP (1983)). Sa composition en acides aminés et en sucres est comparable à celle des sous-unités de la lectine de Rat ou de Lapin.

Par utilisation d'anticorps spécifiques, un clone de cDNA contenant la séquence entière codant pour le récepteur humain des asialoglycoprotéines a été isolé et séquencé. La séquence d'acides aminés (291 résidus) du récepteur humain est très voisine de la séquence de la protéine majeure du récepteur du Rat (RHL1) (SPIESS et coll. (1985)).

Un récepteur des asialoglycoprotéines a également été isolé et purifié à partir du foie de Souris (ROSENFELD et coll. (1986)). Ses caractéristiques (poids moléculaire, spécificité) sont présentées dans le tableau IV (p.49).

d - Distribution subcellulaire de la lectine hépatique.

L'examen de la distribution subcellulaire de la protéine de liaison du foie de Rat a permis à PRICER et ASHWELL (1976) de proposer un schéma de biosynthèse de cette protéine. La protéine a été isolée et purifiée par chromatographie d'affinité à partir des membranes du Golgi, des lysosomes et des microsomes lisses de foie de Rat. Au niveau de l'appareil de Golgi et des microsomes lisses, le récepteur est essentiellement localisé sur la surface interne de leur membrane (TANABE et coll. (1979)). Cette localisation est en accord avec leur rôle présumé dans la biosynthèse du récepteur. Cependant, la protéine de liaison aurait été identifiée sur la surface externe (cytosolique) des membranes lysosomiques donc à l'abri de la dégradation par les enzymes lysosomiques.

4 - Récepteur d'ASHWELL: Etude de la liaison.

a - Spécificité.

Par des essais d'inhibition compétitive de la liaison, différents auteurs ont examiné les affinités relatives de la lectine hépatique pour divers sucres et glycoprotéines. STOCKERT et coll. (1977) ont ainsi observé le pouvoir inhibiteur élevé de la N-acétylgalactosamine et d'une glycoprotéine portant des résidus terminaux de N-acétylgalactosamine.

Utilisant comme inhibiteurs des substances de groupe sanguin, des mono- ou polysaccharides et des glycosides, SARKAR et coll. (1979) confirment la reconnaissance préférentielle par la lectine de Lapin des résidus terminaux de N-acétylgalactosamine des glycoprotéines par rapport au galactose, et indiquent en outre un pouvoir inhibiteur plus important des N-acétylgalactosaminides par rapport aux galactosides.

De même, les actions inhibitrices exercées sur la liaison à la lectine humaine par des glycoprotéines et glycopeptides de structure bien établie ont été déterminées et comparées (BAENZIGER et MAYNARD (1980)). Ainsi, des glycopeptides portant des oligosaccharides de type N-acétyllactosaminique à un ou plusieurs résidus de galactose terminaux ont une constante d'inhibition ( $K_i$ ) similaire à celle de glycopeptides portant une ou plusieurs unités Gal( $\beta$ 1-3)GalNac liées O-glycosidiquement. Cependant, l'exposition des résidus de N-acétylgalactosamine de ces

derniers, par enlèvement des résidus de galactose, diminue fortement les valeurs de  $K_i$ , confirmant la spécificité supérieure pour la N-acétylgalactosamine par rapport au galactose.

Etudiant le comportement de néoglycoprotéines (glycoprotéines de synthèse) vis-à-vis des membranes de foie de Lapin, KRANTZ et coll. (1976), puis STOWELL et LEE (1978) ont observé que des néoglycoprotéines D-glucosylées se liaient au récepteur des asialoglycoprotéines, élargissant ainsi la spécificité de la protéine de liaison hépatique.

#### b - Paramètres de la liaison (lectine de Lapin).

LEE Y.C. et coll. (1983) ont étudié l'inhibition de la liaison de ligands à la lectine des hépatocytes de Lapin par des oligosaccharides synthétiques ressemblant aux glycannes naturels de type N-acétyllactosaminique après désialylation (voir des exemples de structures de glycannes de type N-acétyllactosaminique à la figure 10;p.53).

Le pouvoir d'inhibition décroît fortement des oligosaccharides tétraantennés aux triantennés, puis aux biantennés et monoantennés. Le nombre de résidus de galactose par assemblage et le mode de branchement (et en conséquence la distance entre les galactoses) sont des déterminants majeurs de l'affinité de liaison du ligand à la lectine de surface des hépatocytes. Leurs résultats sont en faveur d'une distance Gal-Gal optimale pour la liaison de 15 Å.

D'autres études avec des ligands synthétiques ont confirmé l'importance des distances inter-Gal et de la flexibilité du bras portant les galactoses dans la force de liaison à la lectine solubilisée ou présente sur la surface des hépatocytes (LEE R.T. et coll. (1984)).

Plus récemment, HARDY et coll. (1985) ont proposé l'existence de paramètres physiques de liaison différents selon les ligands considérés. Ils ont étudié la liaison à la lectine d'hépatocytes de Lapin de trois ligands différents: l'asialoorosomucoïde, un glycopeptide triantenné désialylé (purifié de l'inhibiteur de l' $\alpha$ 1-protéase) et un ligand synthétique portant 6 galactoses.

Chacun des ligands fait intervenir deux classes de sites de liaison. Cependant, le glycopeptide triantenné et le ligand synthétique ont

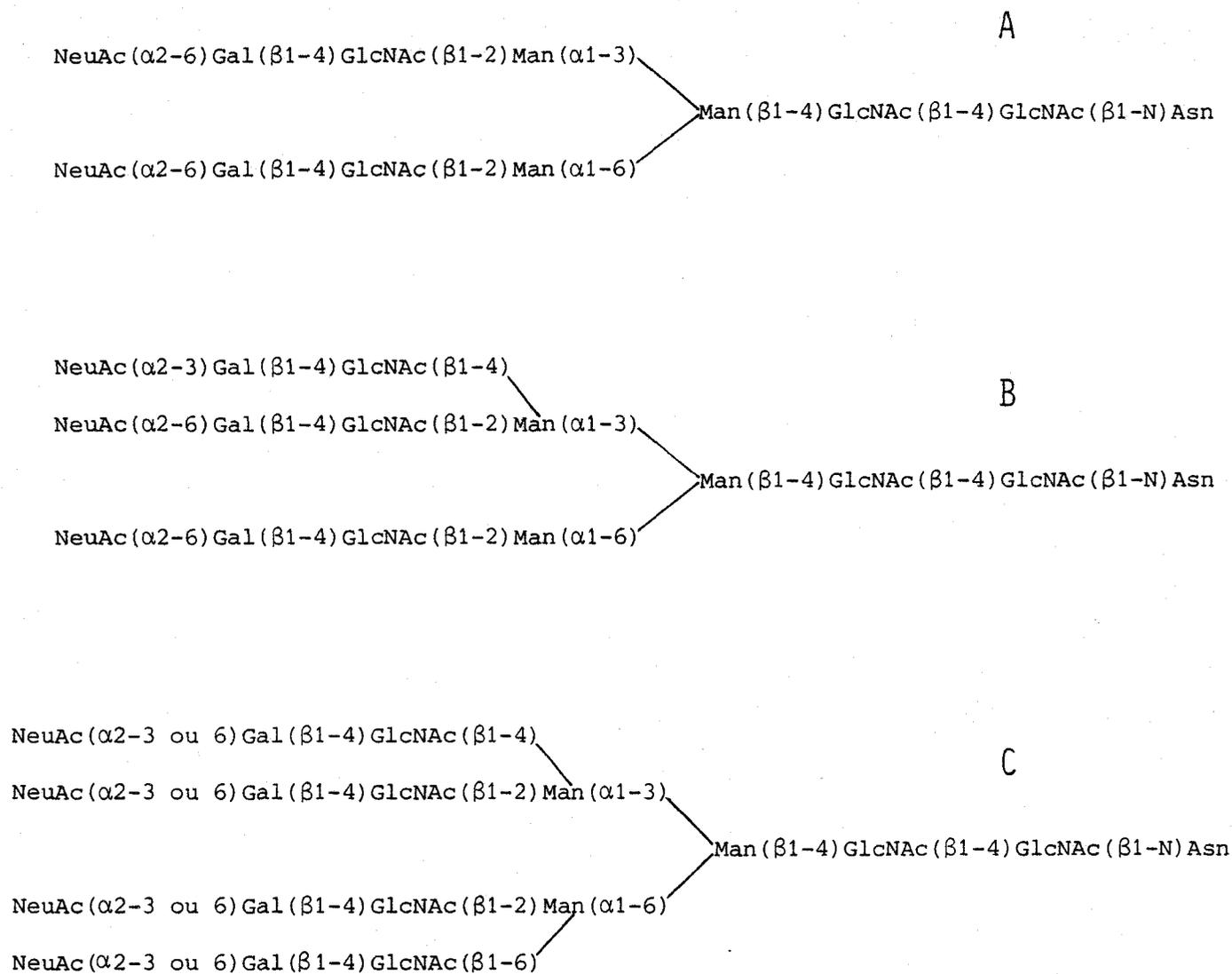


Figure 10

Exemples de structures de glycannes de type N-acétyllactosaminique

(d'après la revue générale de MONTREUIL (1984)).

A - Structure du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine.

B - Structure d'un des glycannes triantennés de la sérotransferrine humaine.

C - Structure du glycanne tétraantenné de l' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide humaine.

beaucoup plus de sites de liaison que l'asialoorosomucoïde bien que les constantes de dissociation soient similaires pour les trois ligands. Les différentes observations recueillies au cours de cette étude leur ont permis de conclure que le nombre apparent et l'affinité des sites de liaison sont fonctions du ligand utilisé. Les auteurs proposent un modèle de liaison des trois ligands à la surface des hépatocytes de Lapin, respectant l'unité de liaison de haute affinité dont les distances inter-Gal ont été calculées. Cette unité contient trois galactoses formant un triangle dont les côtés font 15, 22 et 25 Å (voir Fig. 11; p.55).

A l'aide de glycopeptides triantennés et désialylés préparés à partir de la fêtuine, ces mêmes auteurs (TOWNSEND et coll. (1986)) ont récemment montré que les glycopeptides triantennés possédant trois branches de structure Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc présentent une affinité de liaison pour la lectine hépatique de Lapin supérieure à celle des glycopeptides triantennés portant deux branches de structure Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc et une branche de structure Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc.

#### c - Quantification des récepteurs.

Dès 1972, VAN LENTEN et ASHWELL ont cherché à déterminer la capacité de liaison de la protéine des membranes plasmiques de foie de Rat pour différentes asialoglycoprotéines et ont montré qu'il existait une saturation des sites récepteurs de la membrane. Cependant, de nombreuses difficultés se posent quant à la quantification des récepteurs des asialoglycoprotéines in vivo ou sur hépatocytes isolés.

En 1980, SCHWARTZ et coll. montraient l'influence de la méthode d'isolement des hépatocytes de Rat et des conditions d'étude de la liaison (présence ou non de sérum ou d'albumine dans le milieu d'incubation) sur le nombre apparent de récepteurs. Le nombre absolu de récepteurs à la surface des hépatocytes de Rat fut estimé à environ 500000 par cellule avec une constante de dissociation du complexe asialoorosomucoïde - récepteur de 7 nM.

Selon d'autres auteurs (STEER et ASHWELL (1980); WEIGEL (1980)), le nombre de récepteurs sur les hépatocytes de Rat isolés peut varier de 50000 à 500000 par cellule, avec une constante de dissociation de l'ordre

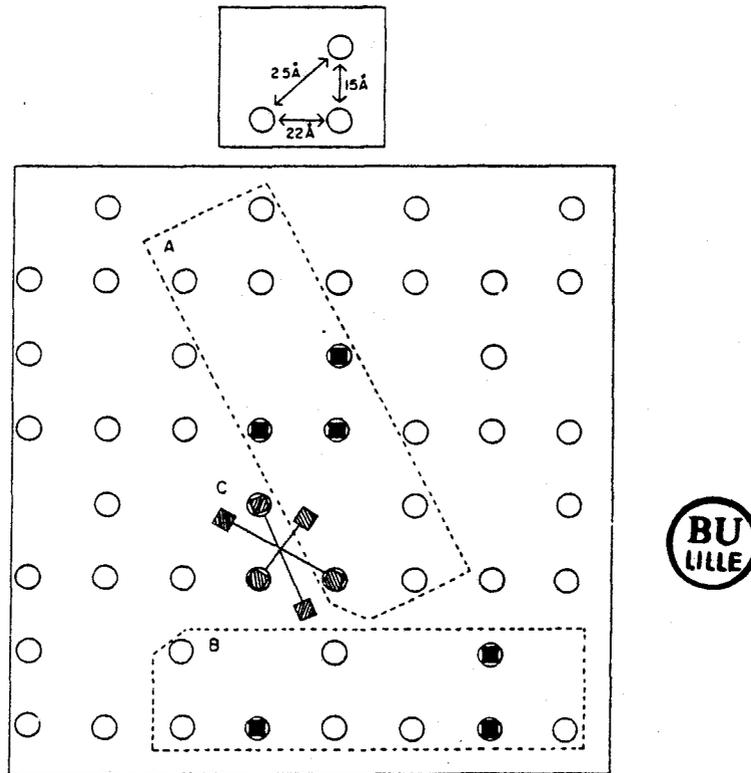


Figure 11

Unité de liaison de haute affinité et modèle de liaison de différents ligands à la surface des hépatocytes de Lapin; d'après HARDY et coll. (1985).

L'unité de liaison (trois sites de liaison au galactose) correspond au site de liaison du glycopeptide triantenné désialylé de l'inhibiteur de l' $\alpha_1$ -protéase.

Les aires A et B correspondent aux sites de liaison de l'asialo-orosomucoïde. C représente la liaison du ligand synthétique à six galactoses.

de la nanomole pour l'asialoorosomucoïde.

PARTRIDGE et coll. (1983) se sont intéressés à la quantification in vivo de la capture des asialoglycoprotéines par le récepteur du foie de Rat et ont démontré que la clearance hépatique de l'asialoorosomucoïde est saturable et suggéré que la majorité des récepteurs sont localisés sur la surface externe des cellules du foie.

L'effet de la température sur le nombre de récepteurs de surface des hépatocytes de Rat isolés a été examiné (WEIGEL et OKA (1983a)). Les changements de température semblent moduler de façon réversible le nombre des récepteurs de surface. De plus, ces auteurs concluent en faveur d'une possibilité de recyclage ou d'internalisation réversible des récepteurs de surface, en absence de ligand. Ces résultats permettraient d'expliquer les variations trouvées par les différents laboratoires dans le nombre de récepteurs par cellule.

Selon ces mêmes auteurs (WEIGEL et OKA (1983b)), la distribution du récepteur sur la surface cellulaire ou dans la cellule change au cours de l'endocytose. A 37°C, le nombre total de récepteurs serait de 450000 par cellule avec une valeur de constante de dissociation comparable à celles mentionnées par d'autres équipes (5 nM), pour les deux classes de récepteurs (internes ou de surface). Après 1 à 2h en présence d'asialoorosomucoïde à 37°C, un état d'équilibre serait atteint avec 70% des récepteurs intracellulaires occupés. Leurs conclusions suggèrent en particulier la participation de tous les récepteurs internes ou de surface à l'endocytose des asialoglycoprotéines.

#### d - Variations pathologiques du nombre de récepteurs.

Des variations pathologiques du nombre de récepteurs ont été signalées. Ainsi, on observe une perte importante du récepteur chez des rats ayant subi différents traitements: anastomose jejuno-iléale (pour reproduire les signes de la cirrhose humaine, SERBOURCE-GOGUEL et coll. (1985)), hépatectomie partielle (HOWARD et coll. (1982)), traitement par un dérivé carcinogène (SCHWARZE et coll. (1985)). Ces données expérimentales sont à rapprocher de la perte en récepteurs observée dans le cas de cancer hépatique (STOCKERT et BECKER (1980)) ou de cirrhose (MARSHALL et WILLIAMS (1978)), qui s'accompagne d'une quantité

anormalement élevée en asialoglycoprotéines dans le sérum de ces patients.

#### 5 - Interaction asialotransferrine - récepteur d'ASHWELL.

La désialylation entraîne généralement une élimination rapide des glycoprotéines sériques. Cependant, le catabolisme de chaque glycoprotéine varie en fonction de son affinité pour le récepteur hépatique (MORELL et coll. (1971)). Ceci est particulièrement net pour l'asialotransferrine qui était supposée échapper à ce catabolisme (Fig. 8;p. 45 ). En fait, REGOECZI et coll. (1974) ont démontré que, sur une période d'observation de 12h, l'asialotransferrine était captée de la circulation plus rapidement que la protéine intacte et que la rapidité de disparition de l'asialotransferrine humaine chez le Rat dépendait de la dose injectée.

De plus, selon ces auteurs (REGOECZI et coll. (1978)), la liaison de l'asialotransferrine à la lectine et son endocytose sont deux phénomènes distincts. Par la suite, l'existence de différents variants de la transferrine fut mise en évidence (par chromatographie d'affinité sur ConA - Sépharose; WONG et coll. (1978); SPIK (1982)) confirmant l'hypothèse de l'hétérogénéité des glycanes de la transferrine proposée par MONTREUIL et SPIK (1975). Puis REGOECZI et coll. (1979) ont caractérisé trois types d'asialotransferrine humaine ayant des affinités différentes pour la lectine hépatique de Rat. Seul le variant de type 3 de l'asialotransferrine humaine (HAsTf3) qui contient un glycanne biantenné et un glycanne triantenné est reconnu par la lectine hépatique.

Il existe deux voies essentielles pour le devenir de l'HAsTf3 après son internalisation dans les hépatocytes. Elle est soit catabolisée dans les lysosomes selon le processus classique des autres asialoglycoprotéines, soit diacytosée (TOLLESHAUG et coll. (1981)) et recyclée dans la circulation sanguine avec resialylation partielle (REGOECZI et coll. (1982)).

La diacytose décrite par TOLLESHAUG et coll. (1981) fait intervenir un mécanisme d'endocytose - exocytose sans dégradation. L'asialotransferrine humaine de type 3 est la seule asialoglycoprotéine connue pour avoir ces deux routes subcellulaires possibles.

DEBANNE et coll. (1984) ont, par ailleurs, proposé l'existence de deux populations de structures prélysosomiques de rôle différent: une structure serait impliquée dans le transport de ligands destinés à l'exocytose (comme l'HAsTf3) ou à la dégradation (comme l'asialoorosomucoïde), la deuxième structure servant de liaison entre la première et le lysosome pour la dégradation de l'asialoglycoprotéine.

L'asialotransferrine constitue ainsi un cas particulier parmi les asialoglycoprotéines en ce qui concerne l'interaction avec le récepteur d'ASHWELL. Il semble, en outre, qu'il soit nécessaire de tenir compte de variations pouvant exister dans la structure glycanique des transferrines de différentes espèces, lors d'études d'interaction des asialotransferrines avec le récepteur d'ASHWELL réalisées en systèmes hétérologues.

#### 6 - Endocytose des asialoglycoprotéines.

Le processus de transport des asialoglycoprotéines endocytées a été étudié par des techniques variées, en particulier par la microscopie électronique et par le fractionnement cellulaire.

##### a - Recyclage du récepteur.

Dès 1979, l'hypothèse d'un mécanisme de recyclage du récepteur des asialoglycoprotéines fut proposée par TANABE et coll.. Le récepteur échappant ainsi à la dégradation lysosomique serait réinséré dans la membrane plasmique de l'hépatocyte. Différentes études (STEER et ASHWELL (1980); STOCKERT et coll. (1980a)) confirment l'hypothèse de la non-dégradation du récepteur hépatique lors du catabolisme lysosomique des glycoprotéines désialylées. TOLLESHAUG (1981) propose en outre un schéma d'endocytose comprenant les étapes suivantes: liaison du ligand au récepteur, internalisation puis dissociation du complexe récepteur-ligand, dégradation lysosomique du ligand et recyclage du récepteur.

Dans les hépatocytes de Rat en culture, une molécule de récepteur a une demi-vie de 20h et peut fournir environ 1000 molécules de ligand au lysosome (WARREN et DOYLE (1981)).

b - Dissociation intracellulaire du complexe récepteur - ligand.

BRIDGES et coll. (1982) apportent la première donnée en faveur de l'existence d'un compartiment de dissociation du complexe récepteur-ligand. La dissociation intracellulaire du complexe est réalisée par intervention du pH dans une vésicule prélysosomique (HARFORD et coll. (1983)). Il existe des complexes se dissociant rapidement, mais 25 à 50% des complexes se dissocient lentement, avec dans ce cas une possibilité de réapparition du complexe à la surface cellulaire avant la dissociation (WEIGEL et OKA (1984)). La vitesse de dissociation du complexe est fonction du ligand et intervient dans le phénomène d'exocytose existant parallèlement au catabolisme des asialoglycoprotéines (TOWNSEND et coll. (1984)). La dissociation du complexe récepteur-ligand dans un endosome acide est suivie de la ségrégation entre le récepteur et le ligand, précédant d'une part le recyclage du récepteur et d'autre part la dégradation du ligand (WOLKOFF et coll. (1984)).

c - Facteurs pouvant intervenir dans l'endocytose des asialoglycoprotéines.

De nombreux facteurs peuvent influencer les différentes phases de l'endocytose. L'activité de liaison du récepteur peut être modulée par des dérivés ionophores tels que la monensine et la nigéricine (FIETE et coll. (1983)). La dégradation lysosomique peut être inhibée in vivo par diminution de la température (DUNN et coll. (1980)) ou par action de la leupeptine (DENNIS et ARONSON (1984)), et in vitro par action de la swainsonine (WINKLER et SEGAL (1984)). Le taux d'ATP cellulaire intervient fortement à toutes les étapes de l'endocytose (TOLLESHAUG et coll. (1985)).

d - Rôle des récepteurs intracellulaires.

Deux hypothèses existent concernant la possibilité de participation des récepteurs intracellulaires au processus d'endocytose. Le contenu intracellulaire en récepteurs des asialoglycoprotéines représente 80 à 90% du pool total de récepteurs (PRICER et ASHWELL (1976)). Cependant,

selon STOCKERT et coll. (1980b), ces récepteurs internes ne participent pas à l'endocytose. La liaison et l'endocytose des asialoglycoprotéines sont maintenues par une réutilisation continue des récepteurs des membranes plasmiques et non par leur remplacement à partir du pool intracellulaire. Les expériences de DOYLE et coll. (1979) sont en faveur de cette hypothèse. Elles indiquent que des vésicules de membranes dérivant de foie de Rat confèrent à des fibroblastes de Souris les propriétés du récepteur des asialoglycoprotéines, par fusion avec ces cellules et insertion du récepteur dans leur membrane.

WEIGEL (1981), puis BRIDGES et coll. (1982) suggèrent au contraire l'intervention des récepteurs internes. La variation de répartition des récepteurs entre la surface et l'intérieur de la cellule au cours de l'endocytose, mise en évidence par WEIGEL et OKA (1983b), leur a permis de conclure que tous les récepteurs internes des asialoglycoprotéines sont fonctionnels et qu'ils participent à l'endocytose. Ces récepteurs intracellulaires peuvent être fonctionnellement équivalents à ceux de la surface ou servir de réserve ou lors du trajet intracellulaire du ligand internalisé.

e - Devenir intracellulaire des asialoglycoprotéines et de leurs récepteurs.

Le schéma proposé par DAUTRY-VARSAT et LODISH (1984) et présenté dans la figure 12 (p. 61) résume les connaissances actuelles concernant le trajet intracellulaire des récepteurs des asialoglycoprotéines et de leurs ligands.

Les molécules de ligand se fixent sur les récepteurs présents sur la membrane plasmique de l'hépatocyte, puis les complexes récepteur-ligand s'accumulent dans des sites particuliers appelés "puits recouverts" (coated pits). La couche qui recouvre la face interne de la membrane plasmique sous chaque puits est constituée d'une protéine fibreuse: la clathrine. Les puits recouverts s'invaginent et prennent la forme de "vésicules recouvertes" (coated vesicles) pour pénétrer dans la cellule. En s'enfonçant dans le cytoplasme, les vésicules recouvertes perdent leur revêtement de clathrine et fusionnent entre elles ou avec d'autres types de vésicules pour former les endosomes, puis les compartiments de dissociation des récepteurs et des ligands. Dans ces compartiments

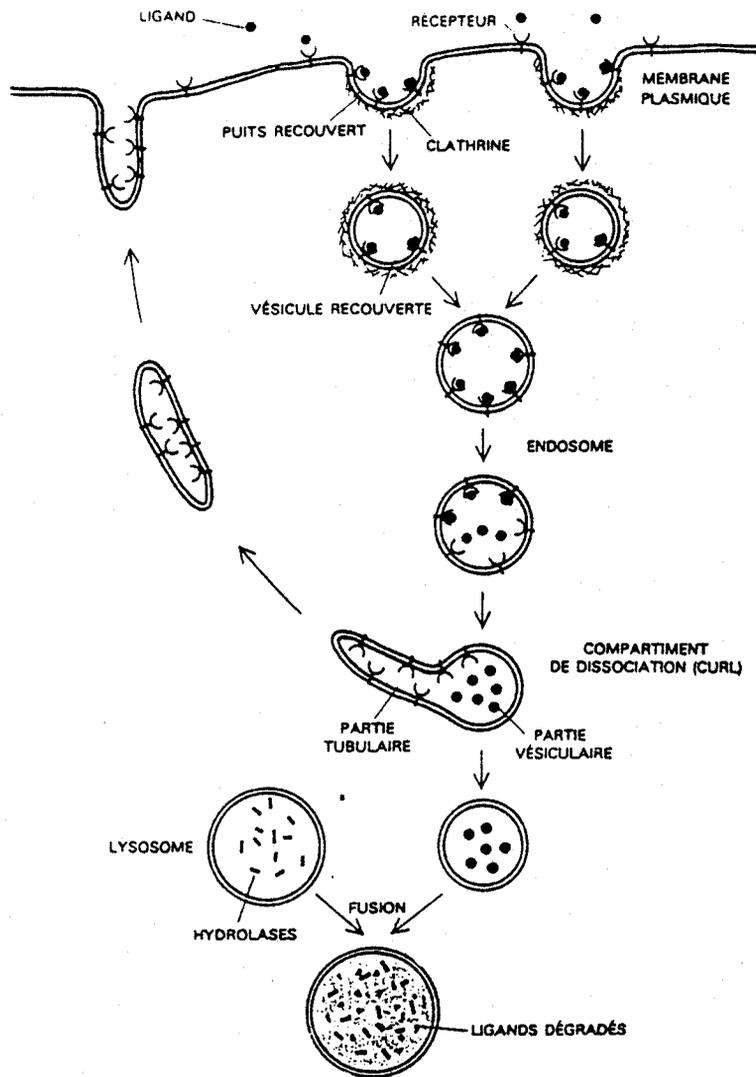


Figure 12

Trajet intracellulaire du récepteur des asialoglycoprotéines et de son ligand ; d'après DAUTRY-VARSAT et LODISH (1984).

acides, les ligands se dissocient des récepteurs et s'accumulent dans la partie vésiculaire du compartiment. Les récepteurs se concentrent quant à eux dans les tubules membranaires du compartiment. Cette structure tubulaire, séparée du reste de la vésicule, permettra le recyclage des récepteurs vers la membrane plasmique. La partie vésiculaire fusionne avec un lysosome et lui livre le ligand pour qu'il soit dégradé.

### 7 - Récepteurs des cellules Hep G2.

Le récepteur des asialoglycoprotéines a été identifié et caractérisé sur une lignée continue d'hépatome humain établie par ADEN et coll. (1979): les cellules Hep G2 dont les caractéristiques morphologiques sont proches de celles des hépatocytes. Le récepteur des cellules Hep G2 est très voisin de celui des hépatocytes de Rat ou de Lapin. Il est spécifique des asialoglycoprotéines et nécessite la présence de  $Ca^{2+}$  pour la liaison aux ligands (SCHWARTZ et coll. (1981a)). Les expériences réalisées par ces auteurs concernant la liaison et la capture d'asialoorosomucoïde par les cellules Hep G2 sont présentées dans la figure 13 (p.63).

Les récepteurs représentent une population homogène de sites de liaison de haute affinité ( $K_d=7nM$ ) avec environ 150000 sites par cellule. Le taux d'endocytose d'asialoorosomucoïde à  $37^\circ C$  est de  $0,02$  pmole/min/ $10^6$  cellules et représente 30% de la valeur trouvée dans des hépatocytes isolés.

Les paramètres cinétiques définissant les différentes étapes de l'endocytose par les cellules d'hépatome Hep G2 ont été déterminés (SCHWARTZ et coll. (1982); voir Tableau V; p. 64). Ces cellules renferment 225000 récepteurs fonctionnels des asialoglycoprotéines, dont la distribution dans les cellules en croissance et au cours de l'internalisation d'asialoorosomucoïde a été étudiée. Le cycle d'un récepteur de surface dure approximativement 15 minutes.

La lignée cellulaire Hep G2 a servi de modèle pour étudier l'aspect morphologique de l'endocytose par récepteur des asialoglycoprotéines et le trajet intracellulaire du ligand, à l'aide d'un ligand marqué avec des particules d'or colloïdal (GEUZE et coll. (1983)).

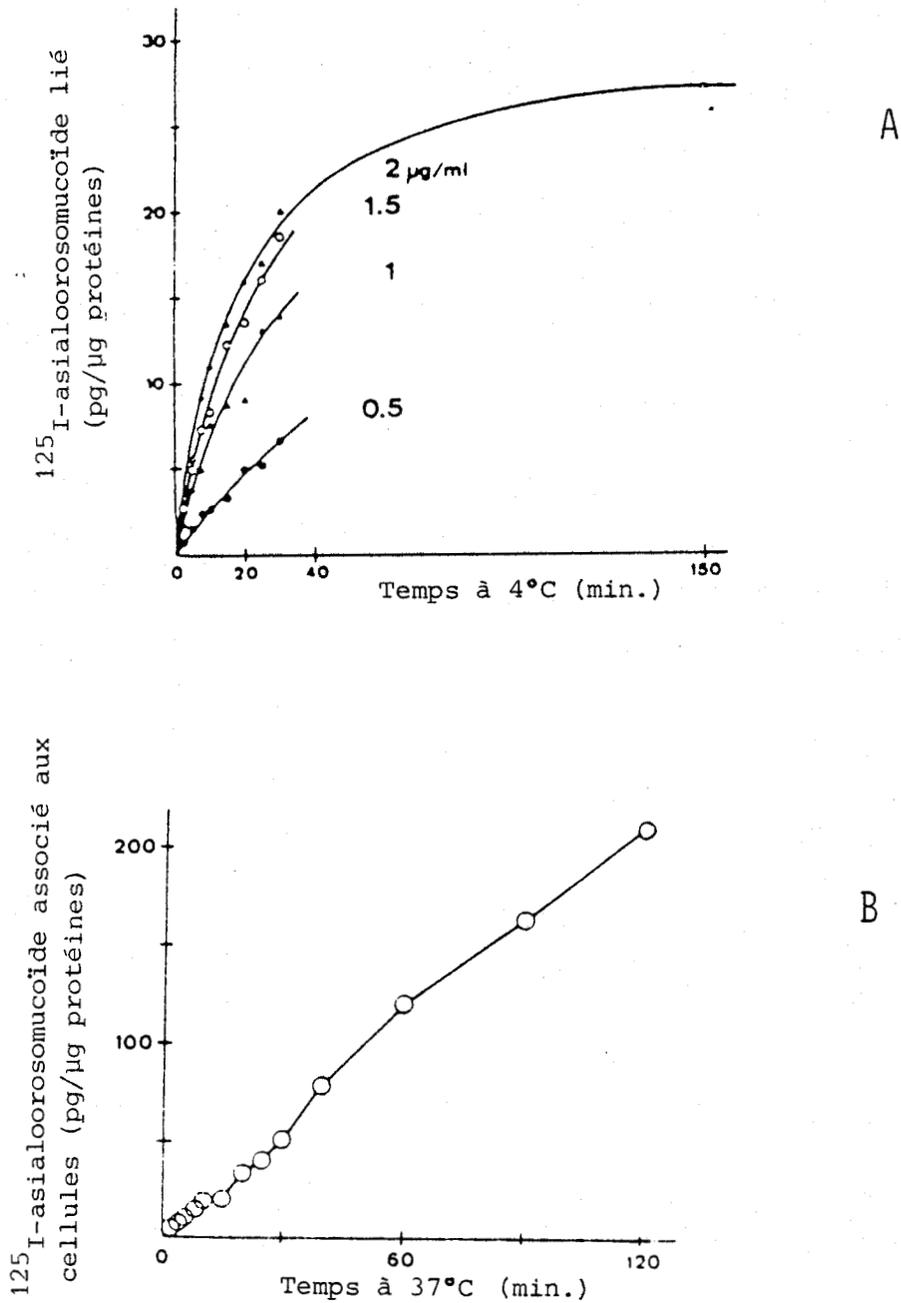


Figure 13

- A - Liaison d' $^{125}\text{I}$ -asialoorosomucoïde aux cellules Hep G2 (concentration d' $^{125}\text{I}$ -asialoorosomucoïde dans le milieu d'incubation : 0,5 à 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- B - Capture d' $^{125}\text{I}$ -asialoorosomucoïde par les cellules Hep G2 (concentration d' $^{125}\text{I}$ -asialoorosomucoïde dans le milieu d'incubation : 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

D'après SCHWARTZ et coll. (1981a).

TABLEAU V

PARAMETRES DE L'ENDOCYTOSE DES ASIALOGLYCOPROTEINES PAR  
LES CELLULES D'HEPATOME HEP G2 (d'après SCHWARTZ et coll.(1982)).

<u>Paramètre</u>	<u>Temps</u>
Liaison du ligand au récepteur de surface	$\geq$ 1,2 min. dépend de la concentration en ligand
Internalisation du complexe récepteur - ligand	2,2 min.
Retour du récepteur à la surface cellulaire	4,2 min.
Durée du cycle d'un récepteur	7,6 à 15 min.

L'utilisation d'anticorps anti-récepteur spécifiques a permis de caractériser la biosynthèse et le renouvellement du récepteur humain des asialoglycoprotéines dans les cellules Hep G2. Le récepteur de 46000 Da est synthétisé à partir d'un précurseur de 40000 Da. Il a une durée de vie de 30h et peut transporter plus de 250 molécules de ligand (SCHWARTZ et RUP (1983)).

Cette même lignée Hep G2 a été employée lors de la détermination de la séquence du récepteur humain (SPIESS et coll. (1985)).

## 8 - La lectine hépatique des Oiseaux.

### a - Mise en évidence et isolement.

Le récepteur hépatocytaire spécifique du galactose permettant la reconnaissance et le catabolisme des asialoglycoprotéines, chez les Mammifères, est absent chez les Oiseaux et les Reptiles. Cette absence s'accompagne de la présence d'une quantité élevée d'asialoglycoprotéines dans le sérum de ces espèces.

Différentes observations de LUNNEY et ASHWELL (1976) ont permis d'établir l'existence d'un récepteur hépatique, chez les Oiseaux, de spécificité différente. Ces observations ont été confirmées par KAWASAKI et ASHWELL (1977) qui ont isolé et caractérisé une protéine de liaison du foie des Oiseaux, spécifique des glycoprotéines ayant des résidus de N-acétylglucosamine terminaux. Ce récepteur a été purifié à partir du foie de Poulet. Il s'agit d'une glycoprotéine hydrosoluble contenant 8% de sucres. La liaison au récepteur est un processus saturable faisant intervenir un seul site de liaison de haute affinité. Une seule sous-unité de 26000 Da a été identifiée.

### b - Propriétés.

Quelques propriétés caractéristiques de la lectine hépatique de Poulet sont présentées dans le tableau IV (p.49). Certaines propriétés sont communes aux glycoprotéines de liaison des Oiseaux et des Mammifères: site de liaison hépatique, nécessité d'ions  $Ca^{2+}$  pour la liaison, état d'aggrégation en solution aqueuse, liaison abolie par action de glycosidases spécifiques.

La séquence complète du récepteur hépatique de Poulet a été établie (DRICKAMER (1981)) puis comparée à celles des sous-unités du récepteur de Rat (DRICKAMER et coll. (1984)). La lectine de Poulet est phosphorylée et sialylée, avec une forme disialylée prédominante (DRICKAMER et MAMON (1982)). Les sites de phosphorylation (Ser7) et de glycosylation (acide aminé 67) ont été identifiés. De plus, la lectine possède une suite d'acides aminés non chargés (résidus 25 à 48) qui pourrait correspondre à une zone d'interaction avec la membrane. L'ensemble des données recueillies par ces auteurs suggère que la lectine de Poulet spécifique de la N-acétylglucosamine est probablement une protéine transmembranaire orientée avec le COOH externe à la cellule et le NH<sub>2</sub> cytoplasmique.

#### B - Autres lectines membranaires des Eucaryotes.

A côté des récepteurs à galactose présents sur les hépatocytes des Mammifères, ou à N-acétylglucosamine présents sur les hépatocytes des Oiseaux, il existe d'autres systèmes d'endocytose de glycoprotéines faisant intervenir un récepteur. Chaque système dépend de la reconnaissance d'un sucre se trouvant en position terminale sur la partie glycanique de la glycoprotéine et est spécifique de certaines cellules.

Ainsi, un système de reconnaissance spécifique du galactose existe également dans les leucocytes qui pourrait compléter celui précédemment identifié sur les hépatocytes (BEZOUSKA et coll. (1985)).

De même, une lectine reconnaissant spécifiquement le D-Gal a été mise en évidence à la surface des cellules de Kupffer. Cette lectine serait responsable de la capture de particules, la lectine à galactose hépatocytaire servant pour l'endocytose de molécules et de petites particules inférieures à 10 nm (ROOS et coll. (1983); KOLB-BACHHOFEN et coll. (1983)). Le récepteur des cellules de Kupffer serait impliqué dans la reconnaissance des érythrocytes âgés et des cellules tumorales.

Les trois groupes de récepteurs que nous décrivons plus particulièrement (récepteurs spécifiques du Man-6-P, récepteurs à Man/GlcNAc et récepteurs spécifiques du fucose) sont actuellement bien étudiés. On sait, en outre, qu'ils interviennent dans la reconnaissance

des glycoprotéines et de certains enzymes lysosomiques. Quelques-unes de leurs caractéristiques ont été regroupées et présentées dans le tableau VI (p. 68).

### 1 - Récepteurs spécifiques du Man-6-P.

#### a - Mise en évidence.

L'existence d'un mécanisme de reconnaissance permettant la capture des enzymes lysosomiques par les fibroblastes, et la possibilité de l'intervention d'une structure glucidique, présumée absente ou cachée dans les maladies lysosomiques, comme marqueur de reconnaissance furent d'abord envisagées par HICKMAN et coll. (1974).

La confirmation de cette hypothèse fut apportée par KAPLAN et coll. (1977) qui conclurent à la participation du Man-6-P comme déterminant de reconnaissance dans la capture de la  $\beta$ -glucuronidase par les fibroblastes.

La reconnaissance par l'intermédiaire du Man-6-P fut ensuite démontrée pour différents enzymes lysosomiques:  $\beta$ -hexosaminidase, cathepsine D,  $\alpha$ -glucosidase (HASILIK et NEUFELD (1980)),  $\alpha$ -L-iduronidase (ROME et coll. (1979)).

Initialement découvert dans les membranes de surface cellulaire des fibroblastes (KAPLAN et coll. (1977)), le récepteur spécifique du marqueur de reconnaissance phosphomannosylé des enzymes lysosomiques fut mis en évidence dans différentes cellules de Mammifères, comprenant en particulier les hépatocytes de Rat, les cellules ovariennes de Hamster Chinois (SAHAGIAN et coll. (1981)), les cellules de chondrosarcome de Rat et les fibroblastes humains (STEINER et ROME (1982)).

Le récepteur du Man-6-P est également présent dans les membranes intracellulaires des fibroblastes (FISCHER et coll. (1980a)). Dans ces fibroblastes, les récepteurs intracellulaires représentent 80% des récepteurs totaux. De même, 90% des récepteurs du foie de Rat sont intracellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes) (FISCHER et coll. (1980b)).



TABLEAU VI: PROPRIETES DE QUELQUES LECTINES MEMBRANAIRES.

Spécificité	Localisation	Masse moléculaire	Propriétés particulières
Man-6-P/Man-6-P-OCH <sub>3</sub>	Fibroblastes, hépatocytes, macrophages alvéolaires Cellules ovariennes de Hamster Chinois Cellules de chondrosarcome de Rat Autres tissus de Rat	215000 Da	liaison indépendante des cations divalents
Man-6-P	Macrophages de Souris P <sub>388D<sub>1</sub></sub> Foie de Boeuf	46000 Da	cations divalents nécessaires pour la liaison
Man/GlcNAc/Fuc (Glc)	Cellules non parenchymateuses du foie, macrophages, cellules réticulo-endothéliales	180000 Da	ions Ca <sup>2+</sup> nécessaires
Man/GlcNAc	Hépatocytes, sérum	32000 Da	ions Ca <sup>2+</sup> nécessaires
Fuc (Gal)	Cellules de Kupffer	deux sous-unités de 88000 et 77000 Da	ions Ca <sup>2+</sup> nécessaires

b - Isolement et propriétés du récepteur du Man-6-P de 215000 Da.

Le récepteur fut isolé sous la forme d'une protéine de 215000 Da, à partir des membranes de foie de Boeuf (SAHAGIAN et coll. (1981)), puis des cellules de chondrosarcome de Rat et des fibroblastes humains (STEINER et ROME (1982)). D'autres organes tels que la rate, les poumons et le cerveau de Rat contiennent également des récepteurs du Man-6-P (FISCHER et coll. (1980b)). Dans le cas du récepteur de 215000 Da, la liaison de l'enzyme est saturable et ne nécessite pas la présence de cations divalents.

Plus récemment, des récepteurs spécifiques du Man-6-P ont été mis en évidence sur des monocytes humains fraîchement isolés (ROCHE et coll. (1985)) et sur des macrophages alvéolaires de Lapin (SHEPHERD et coll. (1984)). Le récepteur des macrophages alvéolaires présente les mêmes caractéristiques que celui des fibroblastes: spécificité pour les résidus Man-6-P et Man-6-P-OCH<sub>3</sub>, liaison saturable et indépendante des cations divalents, taux de récepteurs intracellulaires de 80%.

Ainsi, le Man-6-P est un marqueur de reconnaissance essentiel impliqué dans le transport des enzymes lysosomiques nouvellement synthétisés du réticulum endoplasmique à travers le Golgi jusqu'aux lysosomes (SLY et FISCHER (1982)). De plus, ce processus de reconnaissance est un mécanisme général de ciblage des enzymes lysosomiques vers les lysosomes, avec recyclage du récepteur.

Le récepteur des fibroblastes et des cellules Hep G2, de masse moléculaire 215000 (180000 dans des conditions non réductrices, SAHAGIAN et NEUFELD (1983)) est une protéine transmembranaire avec une fraction C-terminale cytosolique et un site de liaison exposé du côté externe de la membrane plasmique et du côté luminal des membranes intracellulaires (VON FIGURA et coll. (1985)).

c - Existence d'un second récepteur (cation-dépendant) spécifique du Man-6-P.

GABEL et coll. (1983) ont identifié des lignées de cellules de Souris déficientes en récepteur de 215000 Da. La présence de taux élevés d'enzymes lysosomiques dans ces cellules leur a fait postuler l'existence

d'un second mécanisme impliqué dans le transport de ces enzymes jusqu'aux granules denses des lysosomes. HOFLACK et KORNFELD (1985a) démontrèrent par la suite l'existence d'un second récepteur spécifique du Man-6-P impliqué dans le ciblage des hydrolases acides nouvellement synthétisées vers les lysosomes des macrophages murins P388 D1 déficients en récepteur de 215000 Da. Ce nouveau récepteur spécifique des résidus de Man-6-P non méthylés et nécessitant la présence de cations divalents pour la liaison, a été purifié à partir des macrophages P388 D1 et du foie de Boeuf (HOFLACK et KORNFELD (1985b)). Ce récepteur cation-dépendant possède une masse moléculaire de 46000.

## 2 - Récepteurs spécifiques des résidus de mannose et/ou de N-acétylglucosamine.

Au système de reconnaissance spécifique du galactose présent sur les hépatocytes des Mammifères s'ajoute un second système d'endocytose localisé au niveau des cellules non parenchymateuses du foie et concernant les glycoprotéines ayant des résidus terminaux de mannose ou de N-acétylglucosamine (SCHLESINGER et coll. (1978)).

### a - Mise en évidence et spécificité.

Initialement découvert dans le foie, ce système de reconnaissance des résidus Man/GlcNAc fut par la suite mis en évidence dans d'autres cellules et tissus dont les macrophages alvéolaires (STAHL et coll. (1978)) et péritonéaux (KUSIAK et coll. (1980)), les monocytes après maturation (ROCHE et coll. (1985); KATAOKA et TAVASSOLI (1985)), les macrophages dérivant de la moëlle osseuse (LANG et DE CHASTELLIER (1985)), la rate, les os et les éléments du système réticulo-endothélial (SCHLESINGER et coll. (1980)).

La détermination de la spécificité du récepteur est fondée sur des études réalisées avec des glycoprotéines ou des néoglycoprotéines. Le récepteur lie des (néo)glycoprotéines portant du mannose, de la N-acétylglucosamine ou encore du L-fucose (SHEPHERD et coll. (1981)), et éventuellement du glucose (SCHLESINGER et coll. (1980)). L'unité structurale oligosaccharidique commune aux glycopeptides et glycoprotéines reconnus par le récepteur spécifique du mannose et/ou de la N-acétylglucosamine des cellules réticulo-endothéliales de foie de

Rat, proposée par MAYNARD et BAENZIGER (1981), est présentée dans la figure 14 (p. 72).

b - Liaison et internalisation des glycoconjugués.

La liaison (Ca-dépendante) et l'internalisation des glycoprotéines par l'intermédiaire des récepteurs à Man/GlcNAc des macrophages ont été particulièrement étudiées par STAHL et ses collaborateurs (STAHL et SCHLESINGER (1980); STAHL et coll. (1980); STAHL et coll. (1984)) qui proposent un mécanisme d'endocytose voisin de celui des hépatocytes avec dégradation du ligand dans les lysosomes et recyclage du récepteur. Le nombre de sites de liaison présents à la surface des macrophages alvéolaires est de 90000. La durée moyenne du cycle d'un récepteur est de 11 minutes.

L'intervention d'une pompe à protons pour l'acidification du compartiment de dissociation du complexe récepteur-ligand suggérée par STAHL et coll. (1984) est également proposée par WILEMAN et coll. (1985).

Les paramètres cinétiques de liaison et d'internalisation de glycoconjugués par les macrophages ont été définis par HOPPE et LEE (1983) à l'aide de néoglycoprotéines portant un nombre variable de mannoses. De même, LARGENT et coll. (1984) ont déterminé l'affinité des macrophages alvéolaires pour différents sucres, par étude de l'adhésion de ces cellules à des surfaces portant des glycosides.

c - Caractérisation du récepteur spécifique du mannose et de la N-acétylglucosamine.

Une première protéine de liaison du mannose, de masse moléculaire environ 30000 supposée être le récepteur à Man/GlcNAc fut isolée à partir de foies par KAWASAKI et coll. (1978), TOWNSEND et STAHL (1981) et MIZUNO et coll. (1981). MAYNARD et BAENZIGER (1982) ont montré qu'elle est en fait d'origine hépatocytaire et qu'elle diffère du récepteur des cellules réticulo - endothéliales. Cette même protéine est présente dans le sérum (KOZUTSUMI et coll. (1980)).

A partir des macrophages alvéolaires de Rat, HALTIWANGER et HILL

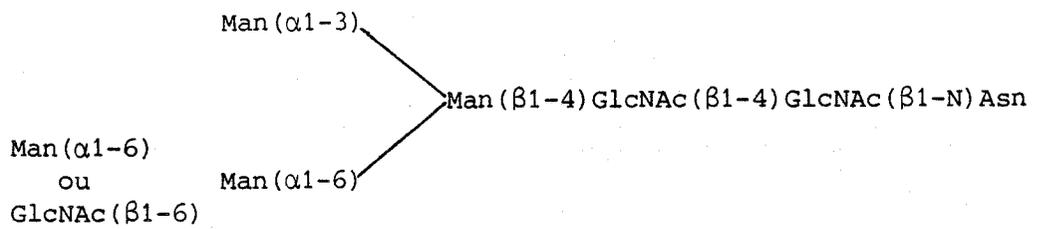


Figure 14

*Structure minimale nécessaire pour la reconnaissance et l'endocytose des glycoconjugués par les cellules réticulo-endothéliales de Rat (MAYNARD et BAENZIGER (1981)).*

(1986) ont isolé et caractérisé une lectine de 180000 Da spécifique de la N-acétylglucosamine et du fucose, et dont la liaison dépend du calcium. Cette lectine serait également présente dans les cellules non parenchymateuses du foie et pourrait correspondre au récepteur des macrophages spécifique des résidus Man/GlcNAc (Fuc). Ces auteurs confirment d'autre part l'existence de la lectine intracellulaire de 32000 Da des hépatocytes.

### 3 - Récepteurs du Fucose.

Dès 1978, les travaux de PRIELLS et coll. ont suggéré la présence sur les hépatocytes de Souris d'un récepteur présumé spécifique des glycoprotéines présentant un résidu de fucose terminal lié en  $\alpha$ -1,3 à une N-acétylglucosamine, et intervenant en particulier dans la clearance de la lactotransferrine humaine après injection chez la souris.

Les expériences menées ensuite par HILL et ses collaborateurs ont permis de réexaminer cette hypothèse. LEHRMAN et coll. (1986a) ont ainsi démontré qu'il existait dans le foie de Rat et de Souris un récepteur spécifique du fucose et différent des récepteurs à Gal ou à Man/GlcNAc. Ce récepteur interviendrait en complément des deux autres systèmes de capture des glycoprotéines du foie, dans le cas des glycoprotéines à résidus de fucose terminaux.

Après isolement à partir du foie de Rat, LEHRMAN et HILL (1986) ont purifié par chromatographie d'affinité sur Fuc-BSA-agarose une lectine possédant une forte affinité pour les ligands fucosylés. Cette lectine contient deux sous-unités polypeptidiques de poids moléculaires 88000 et 77000. Ils en ont étudié la spécificité et ont montré, en particulier, que des galactosides et des fucosides pouvaient inhiber la liaison à cette lectine d'une néoglycoprotéine Fuc-BSA (LEHRMAN et coll. (1986b)). La liaison est dépendante du  $Ca^{2+}$  et son pH optimal se situe entre 7,6 et 8,6. Cette lectine n'est présente chez le Rat que dans les cellules de Kupffer (HALTIWANGER et coll. (1986)).

## II - LES TRANSPORTEURS GLYCOSYLES.

Les lectines membranaires présentes dans les cellules normales et tumorales ont été caractérisées à l'aide de glycoconjugués naturels ou de composés glycosylés (néoglycoconjugués). Différents travaux fondés sur les propriétés de reconnaissance des lectines membranaires ont été réalisés. Ils concernent l'utilisation de (néo)glycoconjugués possédant une structure glucidique déterminée pour diriger spécifiquement des médicaments, des enzymes ou des liposomes vers des cellules contenant des lectines membranaires.

Le cas des liposomes ayant été précédemment décrit (Chapitre I, IIE), nous avons retenu quelques essais de ciblage par des glycoconjugués qui sont résumés dans le tableau VII (p. 75).

### A - Asialoglycoconjugués.

Les glycoprotéines désialylées, dont la capture par les hépatocytes est bien connue, constituent un premier groupe de transporteurs glycosylés.

#### 1 - Ciblage d'enzymes et de protéines.

Dès 1971, ROGERS et KORNFELD ont tiré parti de la possibilité de capture hépatique des glycoprotéines désialylées, également valable pour leurs glycopeptides, pour l'introduction d'un enzyme dans les cellules du parenchyme hépatique. Ces auteurs ont conjugué les glycopeptides de la fétuine au lysozyme et à la sérualbumine. Après désialylation par la neuraminidase et injection chez le Rat, les complexes sont rapidement et sélectivement captés de la circulation par les hépatocytes, alors que les complexes formés avec la protéine native ne sont pas captés. ROGERS et KORNFELD proposaient ainsi une technique permettant d'induire de façon spécifique la capture hépatique de protéines variées et éventuellement d'autres substances telles que des médicaments.

SCHMER et coll. (1978) ont couplé l'orosomucoïde désialylé à une glutaminase et ont réalisé des expériences similaires in vivo, montrant une interaction rapide et spécifique du complexe glutaminase -

TABLEAU VII : UTILISATION DES GLYCOCONJUGUES COMME TRANSPORTEURS

TRANSPORTEUR	MOLECULE TRANSPORTEE	CELLULES "CIBLEES"	REFERENCES
Asialofétuine (ou ses glycopeptides)	Lysozyme , Albumine	Hépatocytes de Rat	Rogers et Kornfeld (1971)
	Toxines : ricine toxine diphtérique (DTA)	Hépatocytes en culture " " "	Skiletter et coll. (1982) Cawley et coll. (1981)
	Trifluorothymidine, Ara-A et ara-AMP	Hépatocytes de Souris (hépatite à virus)	Fiume et coll. (1979,1980)
	Primaquine (+ bras tétra- -peptidique)	Hépatocytes de Souris (malaria)	Trouet et coll. (1984)
Asialoorosomucoïde	Glutaminase	Hépatocytes ( <u>in vivo</u> )	Schmer et coll. (1978)
Lactose - Sérumalbumine	Ara-A , ara-AMP	Hépatocytes de Souris (hépatite à virus)	Fiume et coll. (1981,1982,1986)
Man <sub>3</sub> Lys <sub>2</sub>	β-Glucocérébrosidase	Macrophages alvéolaires de Rat, cellules réticulo- endothéliales de Rat	Doebber et coll. (1982)
P - Man <sub>5</sub>	LDL Ricine	Fibroblastes "	Murray et Neville (1980) Youle et coll. (1979)
Man - BSA	Muramyl-dipeptide	Macrophages alvéolaires de Rat et de Souris	Monsigny et coll. (1984)



asialoorosomucoïde avec le récepteur du galactose des hépatocytes.

## 2 - Ciblage de toxines.

L'asialofétuine a également servi de vecteur pour des toxines. CAWLEY et coll. (1981) ont lié par un pont disulfure l'asialofétuine au fragment A de la toxine diphtérique. Le conjugué obtenu inhibe la synthèse protéique dans des hépatocytes de Rat en culture primaire lorsqu'il est employé à une concentration de 10pM. Il s'est montré 600 et 800 fois plus toxique sur les hépatocytes que la toxine diphtérique et son fragment A respectivement. Son action est bloquée par l'asialofétuine et l'asialoorosomucoïde, confirmant le passage par le récepteur du galactose.

De même, SKILETTER et coll. (1982) ont étudié l'accumulation et l'effet sur la synthèse protéique d'un conjugué de la ricine à l'asialofétuine, dans des cultures de cellules parenchymateuses du foie et de cellules de Kupffer. Leurs observations indiquent que la liaison de cette toxine à l'asialofétuine la dirige plus spécifiquement vers les hépatocytes que vers les cellules de Kupffer, avec rétention de son pouvoir inhibiteur sur la synthèse des protéines. L'emploi de tels agents rendus spécifiques des cellules parenchymateuses du foie pourrait être intéressant dans le traitement d'hépatocarcinomes.

## 3 - Ciblage d'agents antiviraux.

Des travaux très importants ont été réalisés par FIUME et ses collaborateurs concernant le ciblage vers les hépatocytes par les récepteurs du galactose d'agents antiviraux inhibiteurs de la synthèse d'ADN.

Envisageant le traitement des hépatites causées par les virus à ADN, FIUME et coll. (1979,1980) ont couplé la trifluorothymidine, l'adénine-9- $\beta$ -D-arabinofuranoside (ara-A) et son monophosphate (ara-AMP) à l'asialofétuine, afin de concentrer ces drogues dans les hépatocytes. La conjugaison avec ces composés n'empêche pas l'interaction de l'asialofétuine avec les récepteurs spécifiques hépatocytaires. De plus, une augmentation de l'inhibition de la synthèse de l'ADN viral dans les hépatocytes de souris infectées par le virus Ectromelia et traitées par

les complexes a été observée.

#### 4 - Ciblage de composés antipaludiques.

Une autre approche du traitement d'infections intracellulaires a été entreprise par TROUET et coll. (1984). Elle concerne le traitement chez la Souris du stade exoérythrocytaire (hépatocytaire) de la malaria à l'aide d'un médicament antipaludique (la primaquine) conjugué à l'asialofétuine par l'intermédiaire d'un bras tétrapeptidique.

#### B - Néoglycoconjugués.

##### 1 - Ciblage hépatique d'agents antiviraux.

FIUME et coll. (1981) ont également couplé l'ara-AMP à de la sérumalbumine substituée par des résidus de lactose (L-SA) car ce transporteur hépatotrope a l'avantage sur l'asialofétuine d'être facilement préparé en quantités requises pour un traitement clinique et, lorsqu'on utilise une sérumalbumine homologue, de réduire le risque d'une réponse immunitaire contre le conjugué. Le même effet inhibiteur de la synthèse d'ADN viral a été obtenu avec le complexe L-SA-ara-AMP, sans inhibition de la synthèse de l'ADN cellulaire dans l'intestin et la moëlle osseuse.

Le taux maximal de capture chez la Souris de deux préparations de sérumalbumine humaine portant 22 et 40 résidus de lactose (L22-HSA et L40-HSA) a été déterminé, ainsi que les doses d'ara-A libre ou conjugué inhibant de manière comparable la synthèse d'ADN viral dans le foie de souris infectées par le virus Ectromelia (FIUME et coll. (1982)).

Plus récemment, par modification du procédé de couplage de l'ara-AMP à l'albumine lactosaminée, FIUME et coll. (1986) ont préparé un composé L-SA-ara-AMP plus stable chimiquement. L'étude chez la Souris montre que ce composé est stable dans la circulation, qu'il s'accumule dans le foie et qu'il inhibe la synthèse d'ADN viral dans le foie de souris porteuses d'hépatite, sans affecter la synthèse de l'ADN cellulaire dans l'intestin et la moëlle osseuse. Ce conjugué est, en outre, non toxique aux doses pharmacologiques et non immunogène quand il est préparé avec une albumine

homologue.

## 2 - Ciblage d'immunostimulants.

MONSIGNY et coll. (1984) ont obtenu une action immunostimulante particulièrement intéressante en couplant le muramyldipeptide (MDP) à une protéine mannosylée (Man-BSA) susceptible d'être endocytée activement par les macrophages.

Les macrophages alvéolaires de Rat et de Souris n'ont pas d'activité tumoricide spontanée et sont activés par le MDP. Cependant, celui-ci n'est pas efficace in vivo. Lorsque le MDP est lié à la néoglycoprotéine mannose - sérumalbumine, l'activation des macrophages alvéolaires de Rat et de Souris est très élevée même à des concentrations très faibles du conjugué Man-BSA-MDP. En outre, le conjugué injecté en intraveineuse ou en intrapéritonéale est capable d'activer les macrophages alvéolaires dont l'activité est maximale après 48h chez la Souris et 72h chez le Rat (Fig. 15; p. 79).

## 3 - Ciblage par des néoglycopeptides.

L'utilisation de glycopeptides synthétiques comme transporteurs de molécules diverses s'est également développée.

Ainsi, ROBBINS et coll. (1981) ont synthétisé des substrats glycopeptidiques destinés à l'endocytose par les macrophages. Ces auteurs ont lié de manière covalente des résidus de mannose à la lysine, la dilysine et la trilycine, et ont étudié le pouvoir inhibiteur des composés obtenus sur la capture par les macrophages alvéolaires de Rat de la néoglycoprotéine mannose - sérumalbumine bovine. Certains de ces composés sont aussi des substrats pour la capture spécifique par les macrophages (Man<sub>3</sub>Lys<sub>2</sub>). De tels substrats synthétiques peuvent être utilisés pour "cibler" des agents pharmacologiques vers les macrophages et des composés analogues pourraient diriger des agents thérapeutiques vers d'autres types de cellules.

Grâce à ces résultats, DOEBBER et coll. (1982) ont obtenu une augmentation de la capture par les macrophages alvéolaires de Rat in vitro de la  $\beta$ -glucocérébrosidase du placenta humain en la couplant au

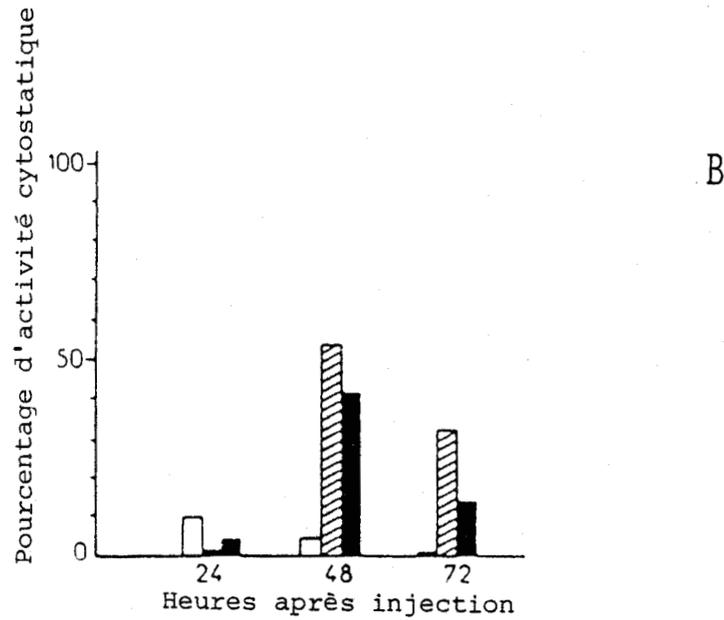
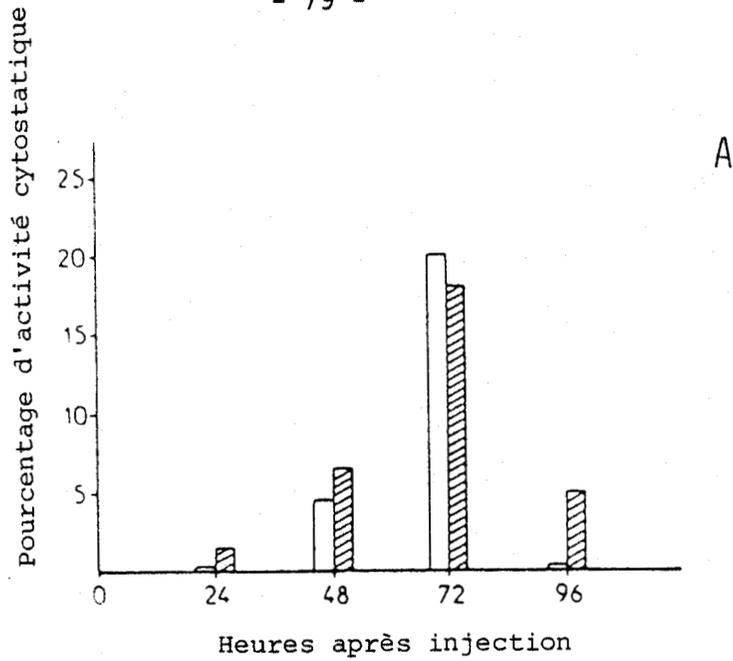


Figure 15

Activation in vivo des macrophages alvéolaires de Rat (A) et de Souris (B) après injection de muramyl-dipeptide (MDP) couplé à l'albumine mannosylée (Man-BSA)

- A - □ injection intraveineuse de 100 µg de MDP couplé
- ▨ injection intrapéritonéale de 100 µg de MDP couplé
- B - □ injection intraveineuse de 1,1 µg de MDP couplé
- ▨ injection intraveineuse de 11 µg de MDP couplé
- injection intraveineuse de 30 µg de MDP couplé

D'après MONSIGNY et coll. (1984).

glycopeptide synthétique  $\text{Man}_3\text{Lys}_2$  (Fig.16; p.81).

In vivo une injection simultanée de mannane (bloquant le système de capture) augmente fortement le temps de demi-vie plasmatique de l'enzyme couplé. Ces études montrant le ciblage de l'enzyme vers un ou des composants du système réticulo - endothélial permettent d'envisager une thérapeutique de remplacement enzymatique dans la maladie de Gaucher (déficience en  $\beta$ -glucocérébrosidase).

L'utilisation du système de reconnaissance à Man-6-P des fibroblastes a aussi été proposée pour la capture sélective de certains composés (MURRAY et NEVILLE (1980), YOULE et coll. (1979)).

Ainsi, de nombreux résultats encourageants ont été obtenus par différents auteurs qui montrent l'intérêt des glycoconjugués en tant que transporteurs de médicaments.

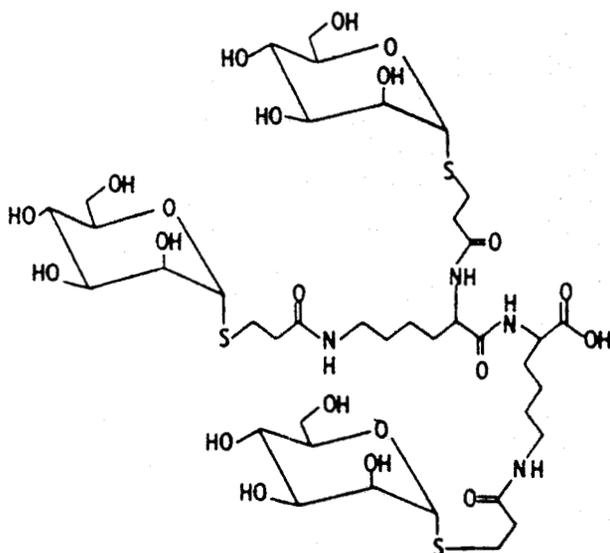


Figure 16A

Structure du glycopeptide synthétique  $Man_3Lys_2$ .

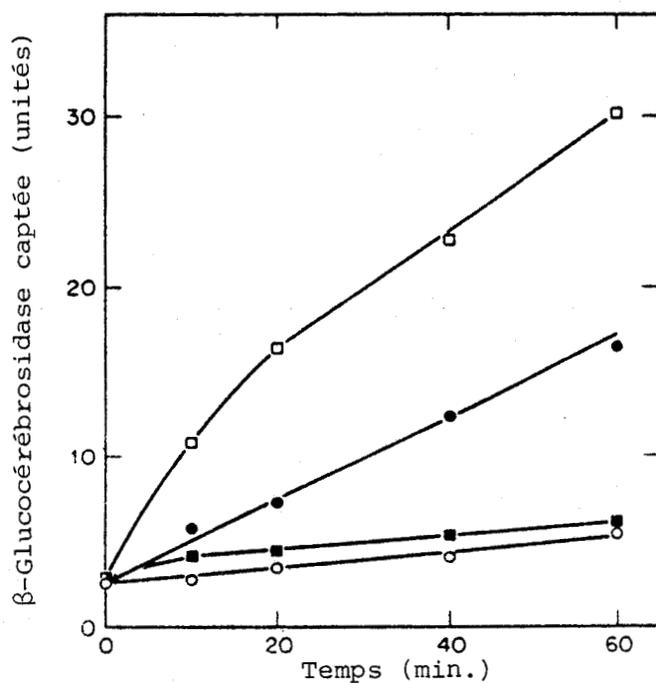


Figure 16B

Capture par les macrophages alvéolaires de Rat de la  $\beta$ -Glucocerebrosidase native ou couplée au glycopeptide  $Man_3Lys_2$  (d'après DOEBBER et coll. (1982))

- $\beta$ -Glucocerebrosidase native
- $Man_3Lys_2$  -  $\beta$ -Glucocerebrosidase
- $\beta$ -Glucocerebrosidase, en présence de mannanes
- $Man_3Lys_2$  -  $\beta$ -Glucocerebrosidase, en présence de mannanes

## CONCLUSION

De nombreuses équipes de recherche accordent un intérêt croissant aux "transporteurs de médicaments". Malgré les différents problèmes liés à leur emploi thérapeutique, certains d'entre eux ont fait l'objet d'applications intéressantes et fructueuses, et leurs avantages justifient incontestablement leur développement.

Le ciblage par glycosylation, que nous avons appliqué au laboratoire au ciblage d'agents antitumoraux, occupe une place de choix parmi les différents modes de ciblage. En effet, l'intervention de récepteurs cellulaires pour la reconnaissance de la structure glycanique du transporteur lui confère une spécificité élevée.

De nombreuses tentatives de ciblage d'agents pharmacologiques divers par des glycoconjugués ont été réalisées. Les résultats obtenus permettent d'envisager de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses, antivirales, antiparasitaires ou immunostimulantes.

## TRAVAUX PERSONNELS

## INTRODUCTION

### LA DAUNORUBICINE

La daunorubicine (DNR) est un antibiotique du groupe des anthracyclines isolé, en 1962, par un groupe de chercheurs de la Société RHONE-POULENC, de cultures de Streptomyces ceruleorubidus. Cet antibiotique, doué d'une activité antitumorale, s'est révélé particulièrement efficace dans le traitement des leucémies aiguës.

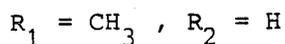
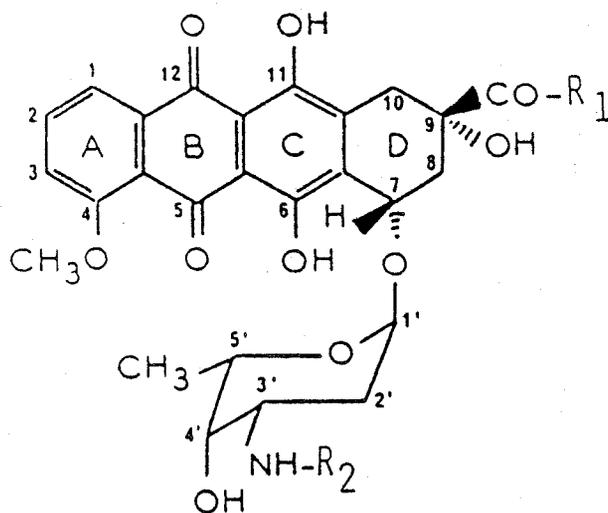
La daunorubicine est un hétéroside formé d'un aglycone: la daunomycinone (à noyau dihydroxyanthraquinone), lié glycosidiquement à un sucre aminé: la daunosamine. La structure de la daunorubicine et de certains de ses dérivés (N-leucyldaunorubicine, adriamycine ou doxorubicine) est présentée dans la figure 17 (p.84 ).

La daunorubicine possède des propriétés antibiotiques et antitumorales mais présente, malheureusement, une certaine cardiotoxicité et exerce, en outre, une action immunodépressive.

#### 1 - Mode d'action.

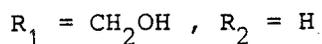
La corrélation entre l'affinité des anthracyclines pour l'ADN et leur activité antitumorale n'a pas été établie. Cependant, différentes études montrent l'influence de la structure des anthracyclines sur leur liaison avec l'ADN et leur activité cytotoxique (voir la revue générale de AUBEL-SADRON et LONDOS-GAGLIARDI (1984)). L'interaction de la daunorubicine avec l'ADN inclut la formation d'un complexe d'intercalation et l'intervention d'interactions électrostatiques. La liaison intercalante des anthracyclines à l'ADN est à l'origine de l'inhibition de la synthèse de l'ARN et de l'ADN.

Les propriétés spectrales de la daunorubicine, en particulier les propriétés de fluorescence apportées par son chromophore (aglycone), ont permis l'étude de son interaction avec les acides nucléiques. Cette

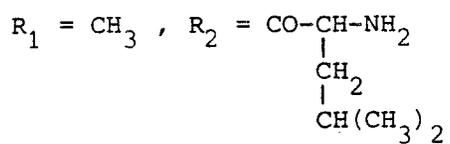


Daunorubicine (DNR)

$(MM_{\text{DNR,HCl}} = 563,99)$



Adriamycine ou doxorubicine



N-leucyl daunorubicine

$(MM_{\text{LD,HCl}} = 677,15)$

Figure 17

Structure de la daunorubicine, de l'adriamycine (ou doxorubicine)  
et de la N-leucyl daunorubicine.

liaison met en jeu le groupement hydroxyle du chromophore (OH porté par le C9) et le groupement aminé de la daunosamine.

Les études cinétiques récentes de CHAIRES et coll. (1985) ont abouti à l'hypothèse d'un mécanisme de liaison de la DNR à l'ADN en trois étapes, faisant intervenir une première étape de liaison rapide ionique, suivie de l'intercalation de la drogue, puis d'un réarrangement conformationnel des sites de liaison. Ces études confirment en outre le rôle essentiel du groupement aminé ionisable de la daunosamine dans la liaison de la DNR à l'ADN.

Les anthracyclines portent également atteinte à l'intégrité de l'ADN. Cette action serait expliquée par la conversion de la quinone en semi-quinone exerçant son effet par liaison aux acides nucléiques ou par production de radicaux libres (superoxyde) (BACHUR et coll. (1978)).

Des études plus récentes indiquent, par ailleurs, que les anthracyclines peuvent agir par interaction avec la membrane cellulaire.

Ces trois modes d'action proposés (intercalation dans l'ADN, effet direct sur la membrane cellulaire et formation de radicaux libres) seraient impliqués dans le mécanisme d'activité cytotoxique et antitumorale de la daunorubicine.

## 2 - Limites du traitement par la daunorubicine.

Les deux limitations essentielles de l'efficacité thérapeutique des anthracyclines sont leur cardiotoxicité et l'acquisition d'une résistance des cellules cancéreuses à ces agents antitumoraux.

La daunorubicine induit des déficiences cardiaques réversibles ou léthales, chez des patients ayant reçu des doses cumulatives supérieures à 650 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle. Cet effet se traduit, d'un point de vue histopathologique, par une nécrose des tissus cardiaques.

Le mécanisme de la cardiotoxicité des anthracyclines n'est pas totalement élucidé. Cependant, des études suggèrent une relation entre la cardiotoxicité et la formation de radicaux libres (SATO et coll. (1977)) et/ou l'association de l'anthracycline avec la cardiolipine (GOORMAGHTIGH

et coll. (1984)).

Les anthracyclines agiraient au niveau des chaînes respiratoires intégrées dans la membrane mitochondriale, par réduction de l'anthracycline en semi-quinone, déclenchant une cascade de radicaux libres, et interaction avec un phospholipide membranaire (la cardiolipine) entraînant des perturbations au niveau de la membrane mitochondriale. La toxicité cardiaque des anthracyclines est également associée à la peroxydation des lipides cardiaques.

Différents facteurs, tels que les taux de capture, de rétention et d'élimination de la daunorubicine, interviennent dans le mécanisme de résistance des cellules cancéreuses à l'action des anthracyclines. De plus, l'apparition de la résistance est liée à un certain nombre d'altérations de la membrane.

### 3 - Ciblage de la daunorubicine par glycosylation.

De nombreuses études sont effectuées dans le but d'obtenir des dérivés de la daunorubicine aussi cytotoxiques, mais moins cardiotoxiques. Des modifications de la structure chimique des anthracyclines ont abouti à des dérivés de synthèse cytotoxiques dont le mode d'action et le métabolisme sont différents.

D'autre part, pour augmenter la spécificité de la daunorubicine pour les cellules tumorales, différents essais de couplage de ce médicament à des anticorps, des protéines ou des lectines ont été réalisés, ainsi que des recherches de ciblage par encapsulation dans des liposomes.

L'orientation que nous avons choisie au laboratoire est le ciblage par glycosylation qui met à profit les propriétés de reconnaissance spécifique, grâce aux récepteurs lectiniques membranaires, de motifs glycaniques par les cellules, pour faire reconnaître et endocyter des médicaments par certaines cellules en les couplant à des glycoconjugués.

Ces travaux ont fait l'objet d'un contrat de recherche avec la Société RHONE-POULENC, puis avec les Laboratoires CASSENNE. Ils portent sur la daunorubicine et sur la N-leucyldaunorubicine.

Nous avons initialement envisagé de greffer la daunorubicine sur des oligosaccharides ou des glycopeptides, rejetant les glycoprotéines susceptibles de provoquer des réactions antigéniques donc inutilisables en thérapeutique. Néanmoins, nous appuyant sur les études menées avec succès par différents auteurs, nous avons également retenu les glycoprotéines comme modèles, pour les coupler à la daunorubicine car leur endocytose par différents types de cellules était bien connue.

Nous avons retenu comme modèles d'études des cellules possédant les récepteurs des asialoglycoprotéines, les hépatocytes de Rat et les cellules d'hépatome humain Hep G2.

L'orosomucoïde désialylé et ses dérivés ont été choisis comme transporteurs en raison de leur structure glycanique (voir cette structure à la figure 18; p.91). En effet, la nature du monosaccharide se trouvant en position terminale non réductrice dans les chaînes glycaniques du glycoconjugué à greffer (dans notre cas, le galactose) est déterminante dans l'endocytose.

Lors de nos précédents travaux (DELPLACE-DELHAYE (1982)), nous avons mis au point un procédé d'obtention d'un bras de couplage permettant la préparation de conjugués DNR - glycoprotéines, et abordé l'étude du comportement de la daunorubicine et de ses dérivés sur les cellules en tirant parti des propriétés de fluorescence de la drogue.

Nous présentons maintenant les résultats obtenus lors de la poursuite de ces travaux, en particulier sur le plan de la préparation et de l'analyse des produits de couplage de la DNR aux glycoconjugués, de la mise au point de l'étude de la DNR et de ses dérivés par microspectrofluorimétrie LASER, et des études de ciblage elles - mêmes.

En parallèle à nos travaux, différents résultats ont été obtenus, au Laboratoire, par B.FLAN, concernant l'endocytose des glycoconjugués choisis comme vecteurs (glycopeptides et glycannes de l'asialoorosomucoïde), la synthèse de produits de couplage de la DNR aux oligosaccharides (lactose et glycannes) et l'étude de la cytotoxicité de la daunorubicine libre ou glycosylée.

## CHAPITRE I

# LES PRODUITS DE COUPLAGE "GLYCOCONJUGUES - DAUNORUBICINE"

### INTRODUCTION

Les récepteurs des asialoglycoprotéines ayant été choisis comme modèle d'étude, nous avons retenu comme glycoconjugués portant des galactoses en position terminale, l'orosomucoïde (ou  $\alpha$ 1-glycoprotéine acide) désialylé qui a fréquemment été utilisé par différents auteurs lors d'études de liaison et d'endocytose par les hépatocytes et les cellules d'hépatome Hep G2 (HARDY et coll. (1985), WEIGEL et OKA (1983b), SCHWARTZ et coll. (1981a)), et ses glycopeptides.

Ces vecteurs ont été greffés à la daunorubicine grâce au procédé de couplage mis au point lors de nos précédents travaux (DELPLACE-DELHAYE (1982)). Ce procédé fournit des composés "daunorubicine - bras - glycoconjugué" formés à l'aide du bras de couplage Glc-S-Et-Arg-Leu. Les conjugués obtenus ont été analysés et leur sensibilité à l'hydrolyse enzymatique a été étudiée.

## I - GLYCOCONJUGUES "VECTEURS".

### A - Orosomucoïde désialylé

#### 1 - Préparation de l'orosomucoïde et désialylation.

L'orosomucoïde natif est préparé au laboratoire par fractionnement du sérum par le sulfate d'ammonium selon une méthode voisine de celle de WEIMER et coll. (1950), puis purification, après dialyse contre de l'eau, sur résine échangeuse d'ions (type XE 64, Amberlite IRC 50) selon le procédé de SCHMID et coll. (1958), dans un tampon citrate trisodique 0,05M, pH 5,2.

Nous remercions le groupe du Professeur FOURNET, ainsi que B.FLAN et D.DAMART pour la préparation de l'orosomucoïde.

L'orosomucoïde ainsi préparé est contrôlé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol.

L'orosomucoïde natif est désialylé par action de la neuraminidase insolubilisée sur agarose (neuraminidase de Clostridium Perfringens, type IX-A, Sigma) en tampon citrate 0,1M de pH 5,1. 2,5 ml de gel, soit 1,2 unités d'enzyme, sont nécessaires pour hydrolyser 50 mg d'orosomucoïde. L'hydrolyse enzymatique est effectuée à 37°C pendant 48h, en circuit fermé. Les glycoprotéines recueillies après hydrolyse sont dialysées contre de l'eau distillée et lyophilisées.

#### 2 - Analyse et structure.

Les compositions centésimale et molaire en monosaccharides de l'orosomucoïde natif et désialylé, déterminées par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation selon la technique de ZANETTA et coll. (1972) sont présentées dans le tableau VIII (p. 90).

La structure des glycannes de l'orosomucoïde désialylé, déterminée par FOURNET et coll. (1978) est rappelée dans la figure 18 (p. 91).

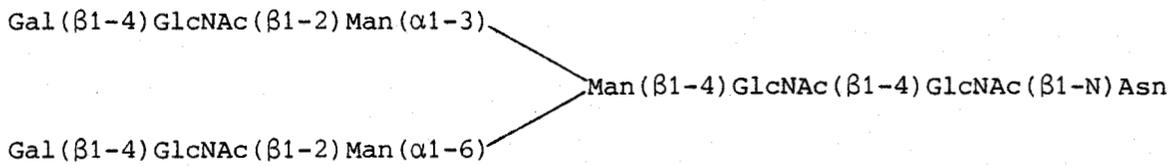
TABLEAU VIII

Compositions centésimale et molaire en monosaccharides de l'orosomucoïde natif et désialylé, et de ses glycopeptides.

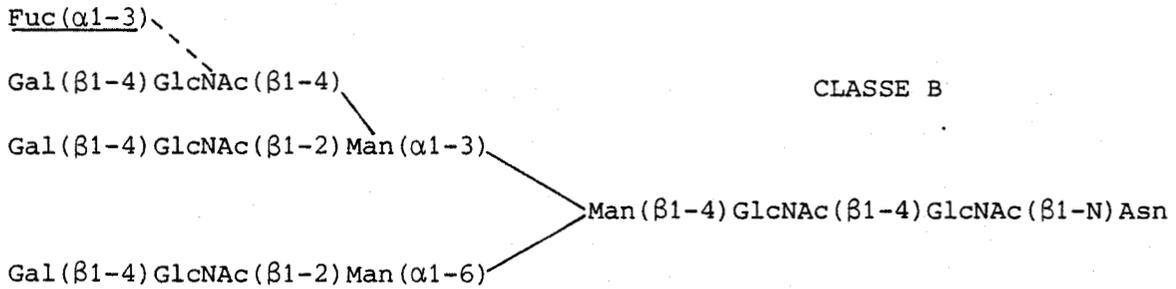
	Orosomucoïde natif	Orosomucoïde désialylé	Glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé
<u>Composition centésimale</u>			
Oses neutres	14%	14%	27%
Osamines	11%	10,8%	20%
Acides sialiques	12%	—	—
<u>Composition molaire</u> (calculée pour 3 Man)			
Fuc	0,78	0,57	0,4
Gal	3,25	3,27	3,6
Man	3	3	3
GlcNAc	4,5	4,3	4,3
NeuAc	3,3	—	—



CLASSE A



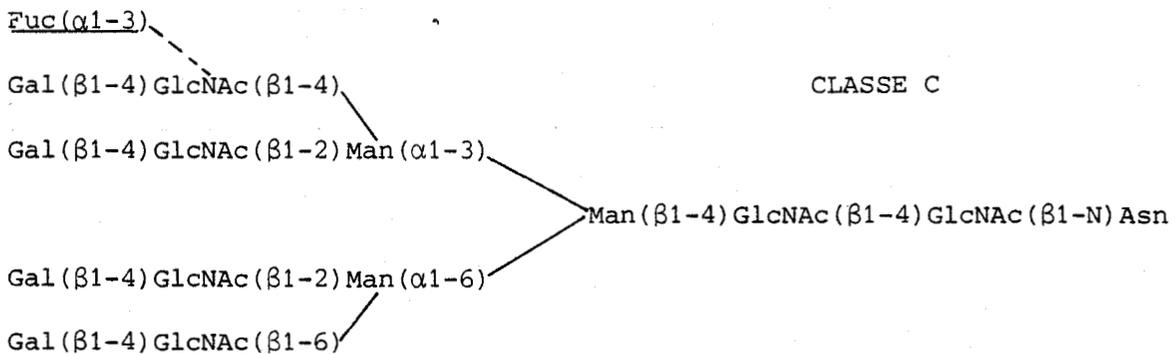
CLASSE BF



CLASSE B



CLASSE CF



CLASSE C

Figure 18

Structure des cinq classes de glycanes de l'orosomucoïde désialylé (FOURNET et coll. (1978)).

Les glycanes des classes BF et CF correspondent respectivement aux glycanes des classes B et C, fucosylés.

## B - Glycopeptides de l'asialoorosomucoïde

### 1 - Préparation

Les glycopeptides de l'asialoorosomucoïde sont obtenus par hydrolyse pronasique (YAMASHINA et coll. (1962)) de l'orosomucoïde désialylé, suivie d'une purification sur colonne de Bio-Gel P6 (BIO-RAD) dans l'eau distillée. On effectue un seul cycle d'hydrolyse, à pH 7,8, pendant 48 heures, à 37°C, en présence d'une quantité de pronase correspondant au 1/50 du poids d'asialoorosomucoïde (Pronase E, Merck).

Cette hydrolyse ménagée a pour but de conserver, parmi les acides aminés des glycopeptides obtenus, des résidus de lysine dont la présence s'est avérée indispensable pour un bon rendement de couplage à la daunorubicine. L'importance des résidus de lysine est encore renforcée si l'on tient compte de la présence de tels résidus à proximité des sites de glycosylation II et III de l'orosomucoïde (voir la séquence de l'orosomucoïde et l'emplacement des cinq sites de glycosylation à la figure 19; p. 93).

### 2 - Analyse

L'analyse qualitative des acides aminés des glycopeptides de l'asialoorosomucoïde, en particulier la vérification de la présence de résidus de lysine, est réalisée par hydrolyse chlorhydrique des glycopeptides (HCl 5,6N, 18h à 105°C) et contrôle de l'hydrolysat en chromatographie sur couche mince (silicagel Merck) dans le système - solvant: n-butanol/ éthanol/ eau/ acide acétique/ pyridine (10: 100: 30: 3: 10; v:v) en présence de témoins d'acides aminés (révélation à la ninhydrine).

Les compositions centésimale et molaire en monosaccharides des glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé, déterminées par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation selon le procédé de ZANETTA et coll. (1972) sont présentées dans le tableau VIII (p. 90).



## II - COUPLAGES A LA DAUNORUBICINE.

### A - Rappels du procédé d'obtention du composé "bras - daunorubicine" (Glc - S - Et - Arg - Leu - DNR).

A la suite des travaux de MONSIGNY et coll. (1980) concernant l'utilisation d'un "bras" de synthèse pour le couplage de la daunorubicine à des lectines comme la WGA, nous avons envisagé l'utilisation de ce "bras" pour le couplage de la daunorubicine aux glycoprotéines ou aux glycopeptides.

Nous avons donc, en accord avec le Professeur MONSIGNY, repris son schéma général de préparation des conjugués "drogue - bras - lectines" en y apportant des modifications afin de pouvoir, en particulier, utiliser la N-leucyldaunorubicine dont nous disposions.

Nous remercions très vivement la Société RHONE - POULENC pour les échantillons de daunorubicine (chlorhydrate), N-leucyldaunorubicine (chlorhydrate) et aglycone qui nous ont été généreusement fournis.

Le procédé de synthèse du couple "N-leucyldaunorubicine - bras de couplage à des glycoprotides" (Glc - S - Et - Arg - Leu - DNR) que nous avons mis au point est présenté dans les figures 20 à 23 (p. 95 à 98).

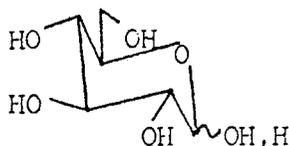
Ce procédé comprend trois étapes principales:

- la préparation du composé I:  $\text{Glc-S-CH}_2\text{-COOH}$  à partir du D-glucose selon le protocole illustré dans les figures 20 et 21.
- le couplage de la L-arginine au composé I (figure 22) permettant d'obtenir le composé II:  $\text{Glc-S-Et-Arg, HCl}$ .
- la condensation du composé II avec le chlorhydrate de N-leucyldaunorubicine, fournissant le composé III: "bras-droque" (figure 23).

Les composés obtenus au cours des différentes étapes de la synthèse ont été contrôlés par différentes techniques (RMN du  $^{13}\text{C}$ ; chromatographie sur couche mince, parfois associée à la spectroscopie de

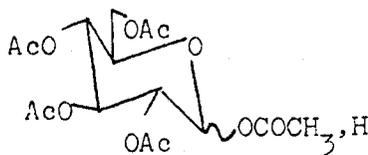
D - Glucose

MM = 180

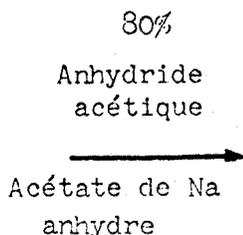


Penta-O-acétyl-D-glucopyranose

MM = 390



(Ac = COCH<sub>3</sub>)



HBr (solution à 40% dans l'acide acétique)

65 à 70%



Bromure de 2,3,4,6 tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl isothiuronium

MM = 487

Acétobromoglucose

MM = 411

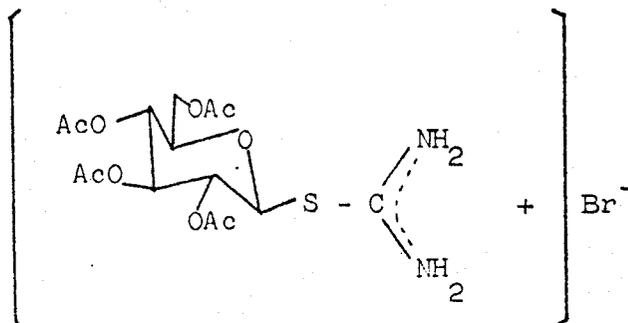
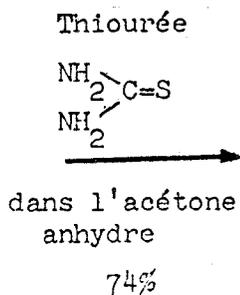
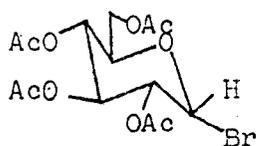


Figure 20

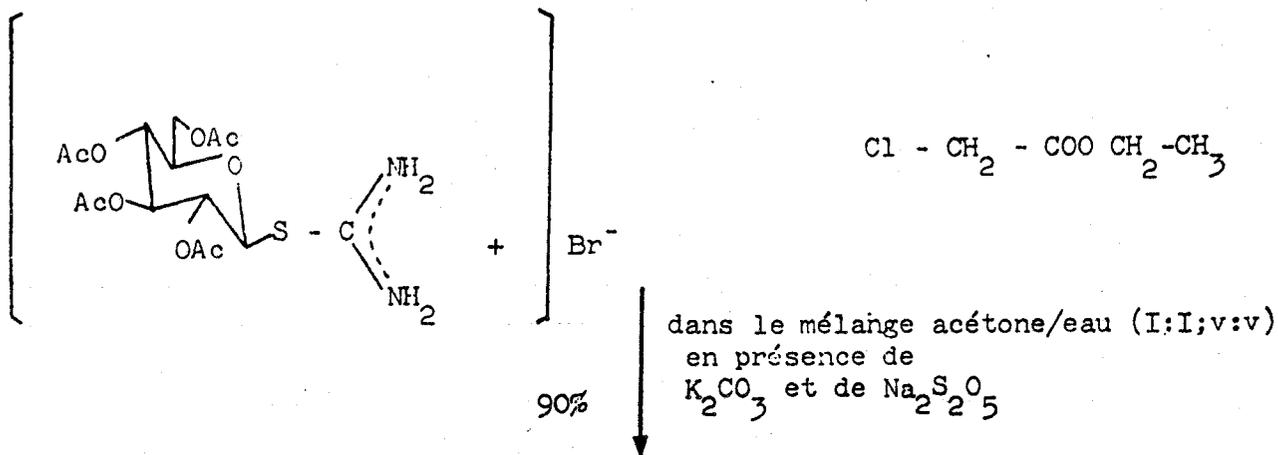
Préparation du bromure de 2,3,4,6 tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl isothiuronium.

Bromure de 2,3,4,6 tétra-O-acétyl-  
β-D-glucopyranosyl isothiouronium

MM = 487

Chloracétate d'éthyle

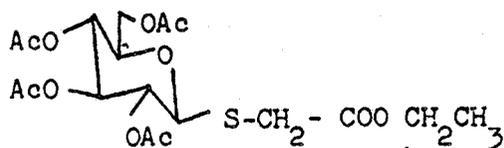
+



Ester éthylique de l'acide 2-S-(2,3,4,6 tétra-O-acétyl-

β-D-glucopyranosyl)-2-thioacétique

MM = 450



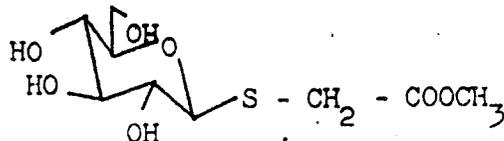
83%

$CH_3ONa$

dans le méthanol anhydre

Ester méthylique du composé I

MM = 268



89%

Saponification ( $NaOH$  2N) puis passage  
sur résine Dowex 50 x 8 (forme  $H^+$ ).

Composé I

MM = 254

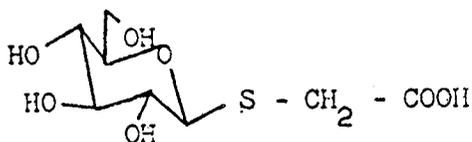
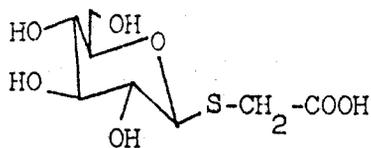


Figure 21

Préparation du composé I

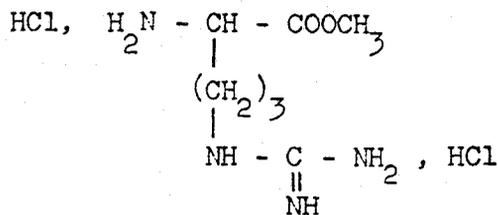
Composé I

MM = 254

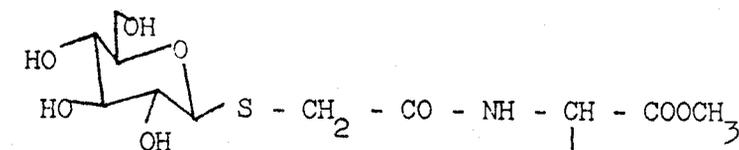


Dichlorhydrate de l'ester méthylique de la L-arginine

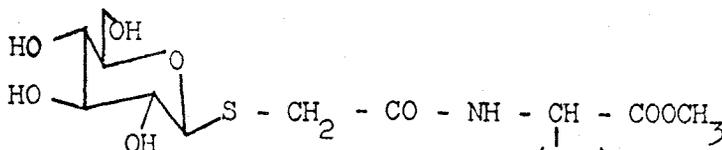
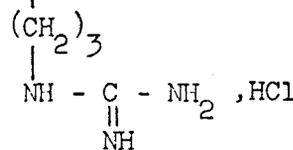
MM = 261



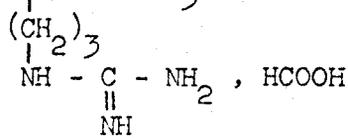
Couplage dans le mélange eau/pyridine (I:4;v:v) en présence de dicyclohexylcarbodiimide et de triéthylamine.



Purification sur résine Dowex Ix2 (forme HCOO<sup>-</sup>)



Saponification (NaOH IN) puis traitement par HCl IN



Composé II

MM = 446,5

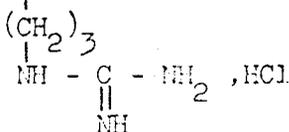
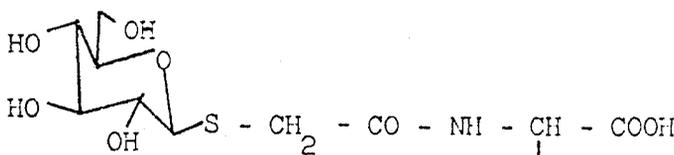
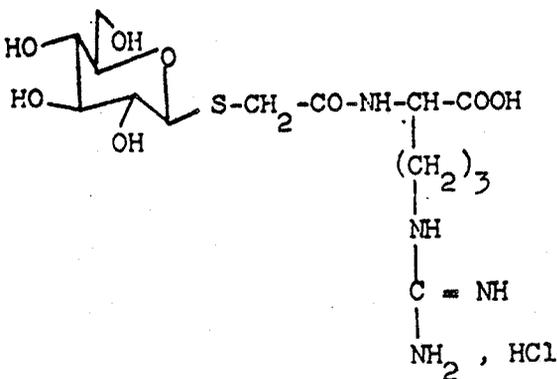


Figure 22

Préparation du composé II

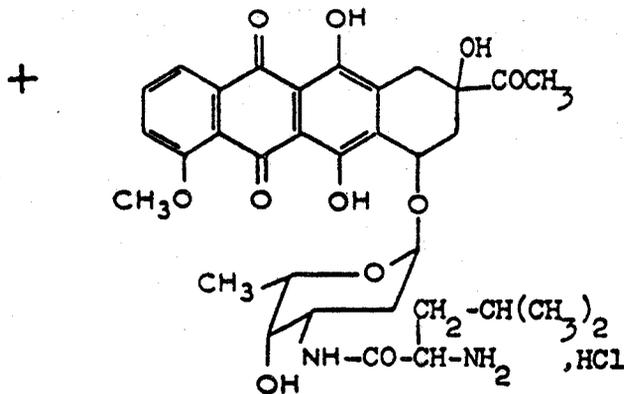
Composé II

(MM = 446,5)



Chlorhydrate de la N-leucyldaunorubicine

(MM = 677,15)



Couplage dans la DMF anhydre, en présence de DCC, d'hydroxybenzotriazole et de N-méthylmorpholine. Purification et passage à la forme acétate.

Composé III (MM = 1092,65)

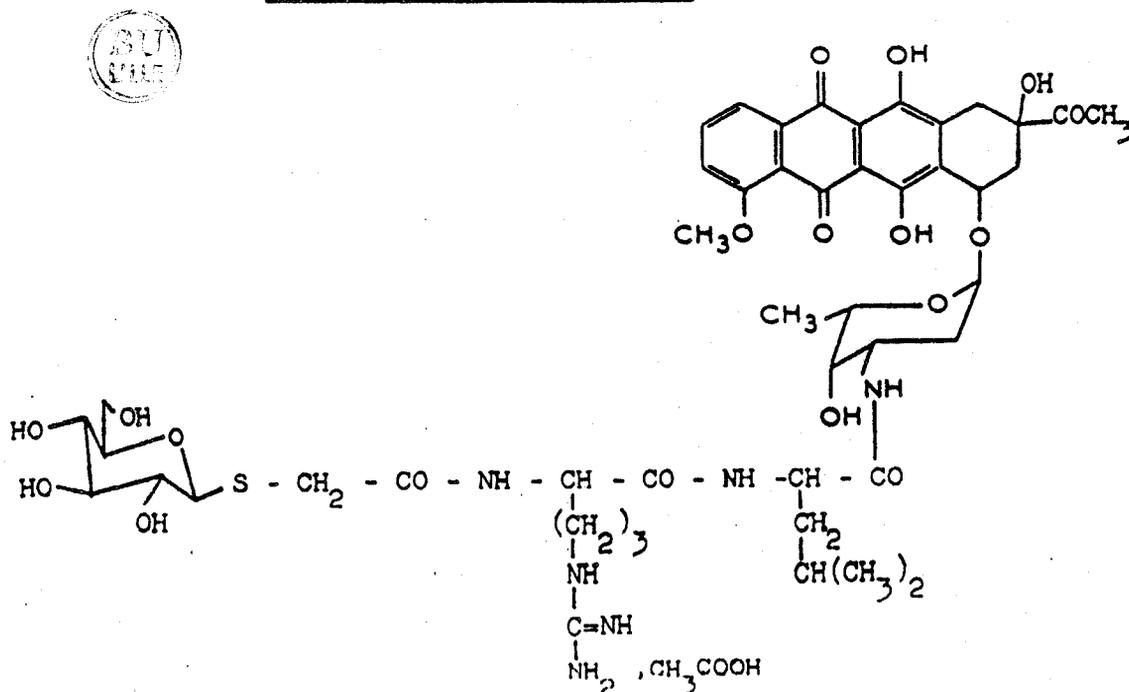


Figure 23

Condensation du composé II avec le chlorhydrate de N-leucyl-daunorubicine; formation du composé III: "bras-drogue".



fluorescence) décrites précédemment (DELPLACE-DELHAYE (1982)).

Par la suite, le composé "bras-DNR" a été synthétisé en plus grande quantité par les laboratoires de la Société RHONE - POULENC. 3g de composé "bras-DNR" nous ont été fournis par Monsieur COMMERCON de la société RHONE - POULENC (Centre Nicolas Grillet) que nous remercions vivement.

Le composé fourni est sous forme chlorhydrate (et non acétate), son poids moléculaire est alors de 1069,57 au lieu de 1092,65. Sa dénomination chimique est: chlorhydrate de N-(( $\beta$ -D-glucoopyranosyl-2) thioacétyl - arginyl - leucyl) daunorubicine.

Nous avons remarqué une légère dégradation au cours du temps du composé "bras-DNR", responsable de l'apparition de produits secondaires lors des couplages. Cependant ces contaminants, détectés par l'analyse en chromatographie sur couche mince, sont extractibles par le chloroforme.

Les couplages aux glycoconjugués ont été réalisés indifféremment avec l'un ou l'autre des composés "bras-DNR" synthétisés.

#### B - Couplages à l'asialoorosomucoïde et à ses glycopeptides.

Le composé "Glc-S-Et-Arg-Leu-DNR" peut être couplé à une glycoprotéine selon une méthode voisine de celle décrite par MONSIGNY et coll. (1980) pour le couplage à la WGA. Nous avons ainsi préparé un conjugué "daunorubicine - bras - asialoorosomucoïde". Nous avons également adapté la technique de couplage aux glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé. Les protocoles expérimentaux de couplage et de purification des conjugués sont les suivants.

##### 1 - Couplage à l'asialoorosomucoïde.

###### Protocole expérimental:

Pour coupler à 1  $\mu$ mole de glycoprotéine (asialoorosomucoïde, MM moyenne de 39000), on utilise au départ entre 20 et 35  $\mu$ moles de composé III (MM = 1092,65 ou 1069,57 selon le sel utilisé: acétate ou chlorhydrate).

La prise d'essai de composé III est dissoute dans du tampon acétate de sodium 0,2M de pH 5 (3 ml de tampon sont employés pour dissoudre 35  $\mu$ moles de composé III). A cette solution, on ajoute le métapériodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ , PROLABO, MM = 214; 117  $\mu$ moles pour 35  $\mu$ moles de composé III). Le mélange est mis sous agitation 6h dans la glace, à l'obscurité. Après 6h, on ajoute du chlorure de potassium (MM = 74,56; 111  $\mu$ moles pour 117  $\mu$ moles de  $\text{NaIO}_4$ ). On agite puis on laisse précipiter. Le précipité de périodate de K est ensuite éliminé par centrifugation.

Le surnageant est ajouté à la solution d'asialoorosomucoïde dans du carbonate de sodium saturé, amené à pH 9,5 par addition de bicarbonate de sodium saturé (4 ml de solution contenant environ 1  $\mu$ mole d'asialoorosomucoïde sont utilisés pour un volume initial de 3 ml de tampon acétate de Na 0,2M pH 5). Le mélange est alors laissé à température ambiante, à l'obscurité, pendant une nuit. Après une nuit, le borohydrure de sodium est ajouté ( $\text{NaBH}_4$ , Fluka, MM = 37,83; 70  $\mu$ moles pour 35  $\mu$ moles de composé III). Le mélange est de nouveau laissé à température ambiante pendant environ 1h. Puis le pH de la solution est amené à 4,5 par addition d'acide acétique concentré. La solution est ensuite évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif.

Le résidu est repris par de l'acide acétique 0,05M et chromatographié sur une colonne de Bio-Gel P10 (BIO-RAD) équilibrée dans l'acide acétique 0,05M (dimensions: 65 cm x 1,5 cm, pour 1  $\mu$ mole d'asialoorosomucoïde et 35  $\mu$ moles de composé III). L'élution est effectuée par l'acide acétique 0,05M. Le produit de couplage sort à un volume d'élution légèrement supérieur au volume d'exclusion. Les fractions contenant le produit de couplage sont réunies, neutralisées par de l'ammoniaque, concentrées et lyophilisées. On obtient 20 à 30 mg de produit final pour 39 mg d'asialoorosomucoïde au départ.

## 2 - Couplage aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde.

Lorsque nous avons appliqué le protocole de couplage employé pour l'orosomucoïde désialylé, à ses glycopeptides, nous avons rencontré quelques difficultés pour la préparation et la purification des conjugués.

A la suite d'essais de couplage infructueux réalisés sur des glycopeptides obtenus à partir d'asialoorosomucoïde après trois cycles d'hydrolyse pronasique et dont l'analyse d'acides aminés indiquait la présence de peu de résidus d'acides aminés et l'absence de résidus de lysine, nous avons préféré utiliser des glycopeptides plus riches en acides aminés (et en particulier en lysine), obtenus après un seul cycle d'hydrolyse pronasique, afin d'augmenter les probabilités de couplage à la daunorubicine (voir l'analyse par chromatographie sur couche mince des acides aminés des glycopeptides de l'asialoorosomucoïde à la figure 24, p.102 ).

Nous nous sommes également attachés à améliorer les conditions de purification des conjugués afin d'éviter la dégradation des produits de couplage et leur adsorption sur le support de chromatographie.

Le protocole expérimental que nous avons finalement retenu est le suivant.

A 55 micromoles de composé "bras-DNR" dans 5 ml d'acétate de sodium 0,2M pH 5 sont ajoutées 185 micromoles de métapériodate de sodium. Le mélange est agité pendant 6 heures dans la glace à l'obscurité. Après l'oxydation périodique, 175  $\mu$ moles de KCl sont ajoutées et le précipité est éliminé par centrifugation.

Le surnageant est alors ajouté à une prise d'essai de 20 mg de glycopeptides d'asialoorosomucoïde dissoute dans 7 ml de mélange carbonate de sodium saturé/ bicarbonate de sodium saturé, pH 9,5. Après 18 heures à température ambiante, à l'obscurité, 108  $\mu$ moles de borohydrure de sodium sont ajoutées et le mélange réactionnel est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 1h30. Le pH est alors amené à 5,5 avec de l'acétate de pyridinium 2M. Après centrifugation 15 minutes à 2000g, le surnageant est lyophilisé. Le résidu, repris par l'acétate de pyridinium 2M est chromatographié sur colonne de Bio-Gel P6 (BIO-RAD) équilibrée dans le même tampon (dimensions: 140 cm x 2,8 cm; élution en acétate de pyridinium 2M: 5 ml/ fraction/ 20 minutes).

Les fractions contenant le conjugué "DNR - bras - glycopeptides", repérées par dépôt sur support de chromatographie en couche mince et révélation à l'orcinol sulfurique, sont recueillies et lyophilisées.

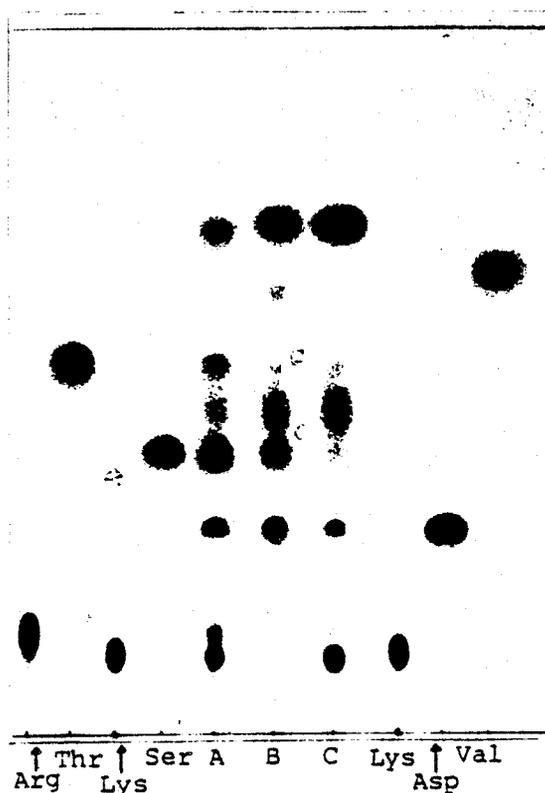


Figure 24

Analyse par chromatographie sur couche mince des acides aminés présents dans les glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé (solvant: n-butanol/éthanol/eau/acide acétique/pyridine; 10:100:30:3:10; v:v)

- A et C : glycopeptides obtenus après un seul cycle d'hydrolyse pronasique de l'asialoorosomucoïde
- B : glycopeptides obtenus après trois cycles d'hydrolyse pronasique de l'asialoorosomucoïde



On obtient 12 mg de conjugué pour une quantité initiale de 20 mg de glycopeptides d'asialoorosomucoïde. Ce procédé de dessalage en acétate de pyridinium permet une meilleure séparation des produits de réaction et évite l'adsorption des composés sur le gel probablement par effet d'empilement des structures aromatiques de la pyridine et de la daunorubicine.

### C - Résultats et analyse des produits de couplage.

#### 1 - Rendement de préparation des produits de couplage.

Le couplage du composé III (bras-DNR) à l'asialoorosomucoïde (ASOR) permet d'obtenir environ 25 mg de produit ASOR - bras - DNR pour une prise d'essai initiale de 39 mg d'asialoorosomucoïde.

Le couplage du composé III aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde (Gp ASOR) fournit 12 mg de produit Gp ASOR - bras - DNR à partir de 20 mg de glycopeptides d'asialoorosomucoïde.

Le rendement de préparation des produits de couplage est dans les deux cas voisin de 60%.

#### 2 - Analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats de l'analyse des monosaccharides des produits de couplage par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation selon le procédé de ZANETTA et coll. (1972) sont présentés dans le tableau IX (p.104) et montrent que les glycanes de l'asialoorosomucoïde et de ses glycopeptides ne sont pas altérés lors du couplage des glycoconjugués à la daunorubicine.

La composition centésimale en monosaccharides des glycopeptides d'asialoorosomucoïde après couplage à la daunorubicine est de 22,5% d'oses neutres et 18% d'osamines.

TABLEAU IX

Composition molaire en monosaccharides des produits de couplage de la daunorubicine à l'asialoorosomucoïde et à ses glycopeptides (calculée pour trois résidus de mannose).

	Asialoorosomucoïde - bras - daunorubicine	Glycopeptides d'ASOR - bras - daunorubicine
Fuc	0,44	0,49
Gal	3,3	3,67
Man	3	3
GlcNAc	4,8	4,65



### 3 - Analyse par chromatographie en couche mince.

Les produits de couplage de la daunorubicine à l'asialoorosomucoïde et aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde ont été analysés par chromatographie en couche mince dans différents systèmes - solvants. Dans le système - solvant: chloroforme/ méthanol/ eau (80:30:3; v:v:v), la daunorubicine couplée aux glycoconjugués (asialoorosomucoïde ou ses glycopeptides) ne migre pas.

Malgré l'obtention d'une tache très étalée pour le produit de couplage de la DNR aux glycopeptides d'ASOR, le système - solvant: n-butanol/ éthanol/ eau/ acide acétique (5:2:2:1; v:v) s'est avéré intéressant car il permet la migration de tous les dérivés de la daunorubicine à l'exception du produit de couplage à l'asialoorosomucoïde (voir figure 25; p. 106). La séparation de la daunorubicine et du composé III (bras-DNR) qui présentent des Rf voisins après une migration dans ce système - solvant, peut être améliorée par une deuxième migration dans les mêmes conditions. L'aglycone (A), qui n'est pas présentée sur la figure, migre au delà de la N-leucyldaunorubicine:  $R_f(A) = 0,73$ ;  $R_f(\text{LeuD}) = 0,62$ ;  $R_f(\text{DNR}) = 0,5$ .

Les produits ainsi séparés en chromatographie sur couche mince peuvent être analysés en microscopie et en spectroscopie de fluorescence qui permet d'obtenir le spectre de fluorescence de chaque dérivé et de détecter les éventuels contaminants des préparations.

Les produits de couplage que nous avons obtenus sont exempts de daunorubicine, N-leucyldaunorubicine ou bras-DNR libres. Quelques impuretés ont été détectées par l'étude en microfluorimétrie LASER mais peuvent être éliminées par extraction par le chloroforme.

### 4 - Dosage de la daunorubicine des produits de couplage.

La daunorubicine des produits de couplage peut être dosée après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,5N, 30 minutes à 97°C, extraction chloroformique de l'aglycone libéré et lecture au spectrophotomètre contre une gamme témoin d'aglycone en solution chloroformique à 475 ou 490 nm.

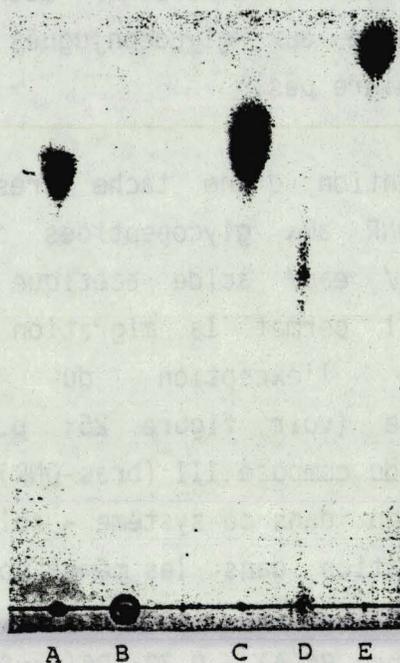


Figure 25

Analyse par chromatographie en couche mince de la daunorubicine et de ses dérivés (gel de silice, solvant: n-butanol/éthanol/eau/acide acétique; 5:2:2:1, v:v)

- A : Composé "bras-daunorubicine"
- B : Produit de couplage de la daunorubicine à l'asialoorosomucoïde
- C : Daunorubicine
- D : Produit de couplage de la daunorubicine aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde
- E : N-leucyl-daunorubicine

Les produits sont visibles directement par leur couleur (rouge - orange).

Par cette méthode, le taux de daunorubicine trouvé dans le produit de couplage ASOR - bras - DNR est de 0,3% (en poids), ce qui correspond à 0,2 mole de DNR fixée par mole d'ASOR. Cependant, l'extraction quantitative de l'aglycone à partir de l'hydrolysat est difficile à obtenir, probablement par hydrolyse incomplète de la DNR couplée à l'asialoorosomucoïde, dans les conditions habituelles de dosage, ou par la présence de la glycoprotéine gênant pour l'extraction chloroformique. Le pourcentage de daunorubicine mesuré par la méthode classique de dosage apparaît donc déterminé par défaut.

C'est pourquoi nous avons par la suite dosé la daunorubicine couplée aux glycoconjugués par mesure de son absorption, en solution aqueuse, à 500 nm, par rapport à une gamme de concentrations connues en DNR libre (en solution aqueuse). Les spectres d'absorption de la daunorubicine libre ou couplée (concentration voisine de  $2 \times 10^{-5}M$ , Fig. 26; p.108) présentent une valeur maximale de densité optique commune vers 500 nm, ce qui permet d'estimer le taux de DNR par comparaison des absorbances à 500 nm.

Le taux maximal de DNR mesuré ainsi dans le produit de couplage à l'asialoorosomucoïde est de 2% et correspond à 1,5 mole de DNR fixée par mole d'ASOR, en considérant que le poids moléculaire du produit final est voisin de 40000.

Dans le cas des produits de couplage de la daunorubicine aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde, la méthode classique de dosage par hydrolyse en aglycone et l'estimation par mesure de l'absorption de la daunorubicine couplée à 500 nm donnent des valeurs voisines de pourcentage de daunorubicine.

Les produits de couplage Gp ASOR - bras - DNR renferment en moyenne 3,8% en poids de DNR, le taux maximal trouvé étant de 12%. La quantité moyenne de DNR fixée est de 0,3 mole par mole de glycopeptides d'asialoorosomucoïde (en considérant que le poids moléculaire du produit de couplage est voisin de 4000) et la quantité maximale d'environ 1 mole de DNR fixée par mole de glycopeptides.

Nous avons également recherché les possibilités de dosage de la

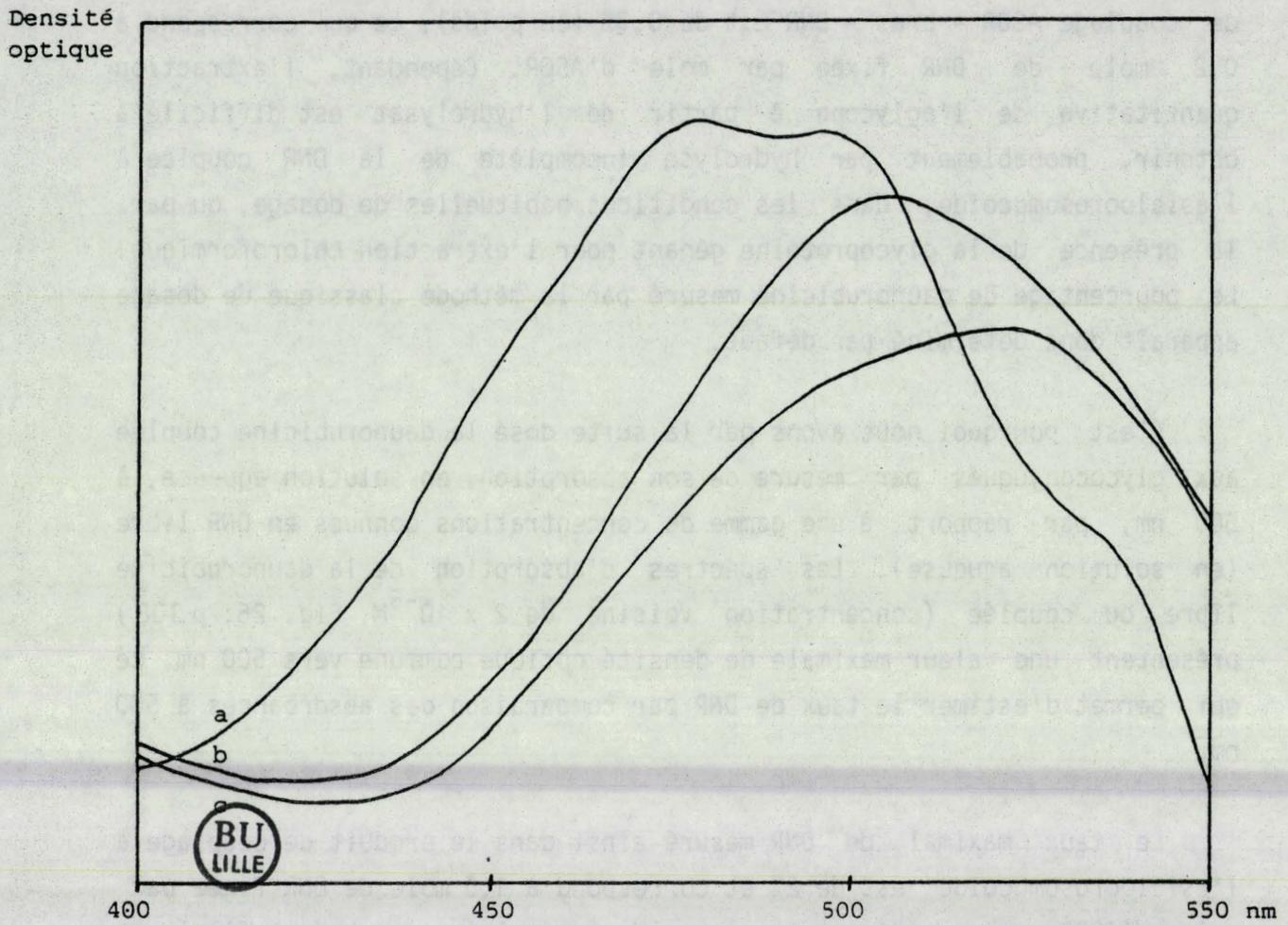


Figure 26

Comparaison des spectres d'absorption de la daunorubicine libre et couplée en solution aqueuse (spectrophotomètre Varian Cary 219)

- a - daunorubicine libre
- b - daunorubicine couplée aux glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé
- c - daunorubicine couplée à l'asialoorosomucoïde

daunorubicine par fluorescence. Cependant, dans le cas de la daunorubicine couplée aux glycoconjugués, la diminution de l'intensité de fluorescence n'est pas négligeable, comme le montre la figure 27 (p.110) qui présente les variations de l'intensité de fluorescence de la daunorubicine libre ou couplée, en solution aqueuse, en fonction de sa concentration. Ces résultats ont été obtenus au microfluorimètre à excitation LASER à partir de solutions aqueuses de daunorubicine libre ou couplée observées en capillaires (conditions détaillées dans le chapitre II).

De plus, pour la daunorubicine libre, il existe une zone de concentrations où l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la concentration. Au delà de cette zone, la proportionnalité n'est plus observée (à partir de 50 µg/ml). En effet, pour des concentrations élevées, la fluorescence de la DNR en solution est altérée par une baisse d'intensité parfois accompagnée d'un déplacement des bandes spectrales (déformation du spectre de fluorescence).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces altérations, en particulier une absorption de la lumière émise (autoabsorption) ou de la lumière excitatrice, et un "quenching" dû à la modification des interactions moléculaires.

##### 5 - Spectres de fluorescence de la daunorubicine et de ses dérivés.

Les spectres de fluorescence des solutions aqueuses de DNR, N-leucyldaunorubicine, composé III (bras-DNR), Gp ASOR - bras - DNR et ASOR - bras - DNR ont été enregistrés. Les spectres de fluorescence des produits N-leucyldaunorubicine et bras-DNR sont semblables à celui de la daunorubicine libre.

La comparaison des profils des spectres de fluorescence de la DNR libre ou couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde est illustrée dans la figure 28 (p.111). On remarque que l'on retrouve la variation d'intensité précédemment citée.

Le profil du spectre de fluorescence du composé ASOR - bras - DNR

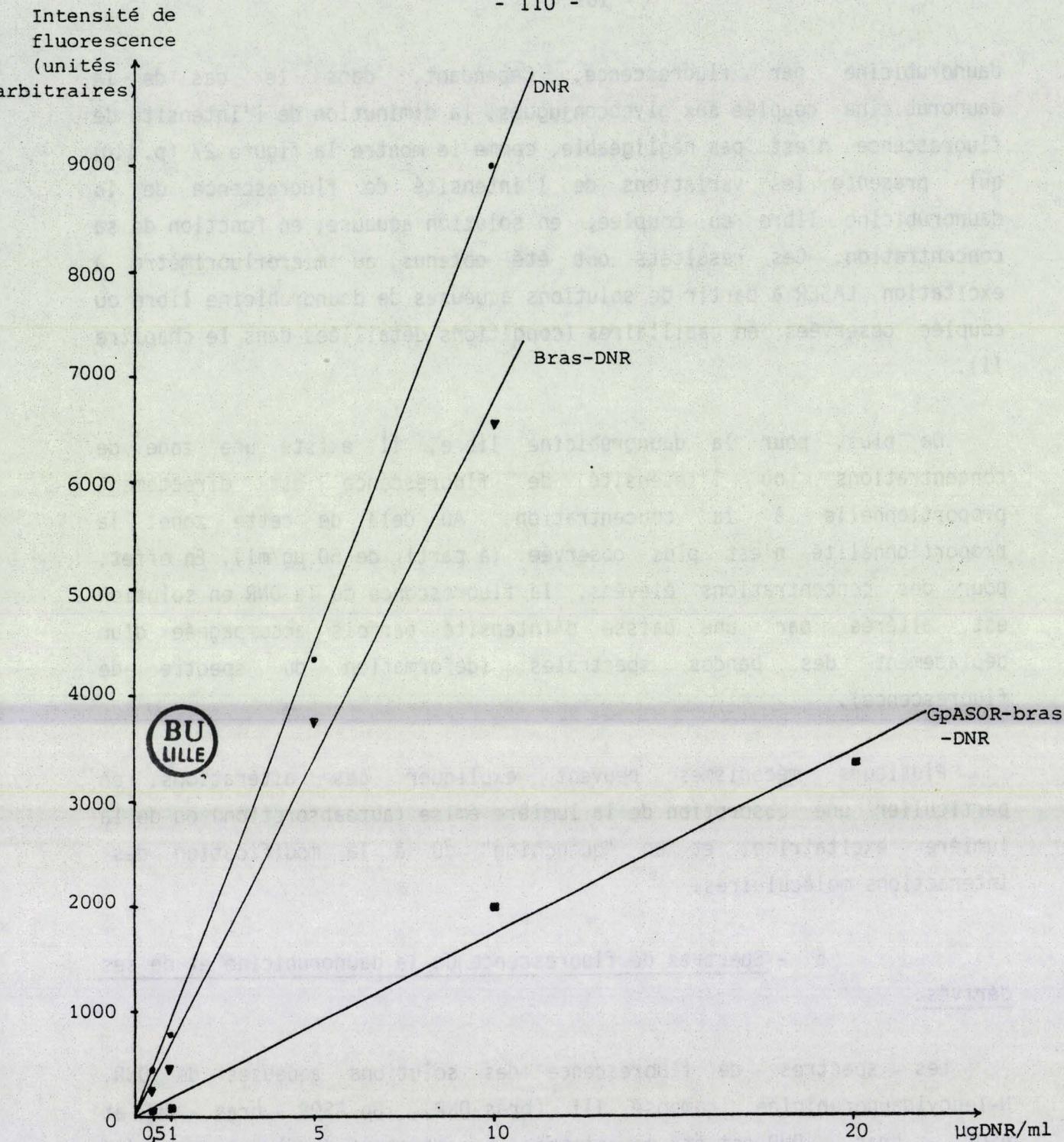


Figure 27

Variation de l'intensité de fluorescence de la daunorubicine

- libre, ▾ portant le bras de couplage aux glycoconjugués,
- couplée aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde.

L'intensité de fluorescence des solutions aqueuses observées en capillaires est mesurée au microfluorimètre LASER

( $\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$ , objectif x 50, puissance LASER = 30  $\mu\text{W}$ ).

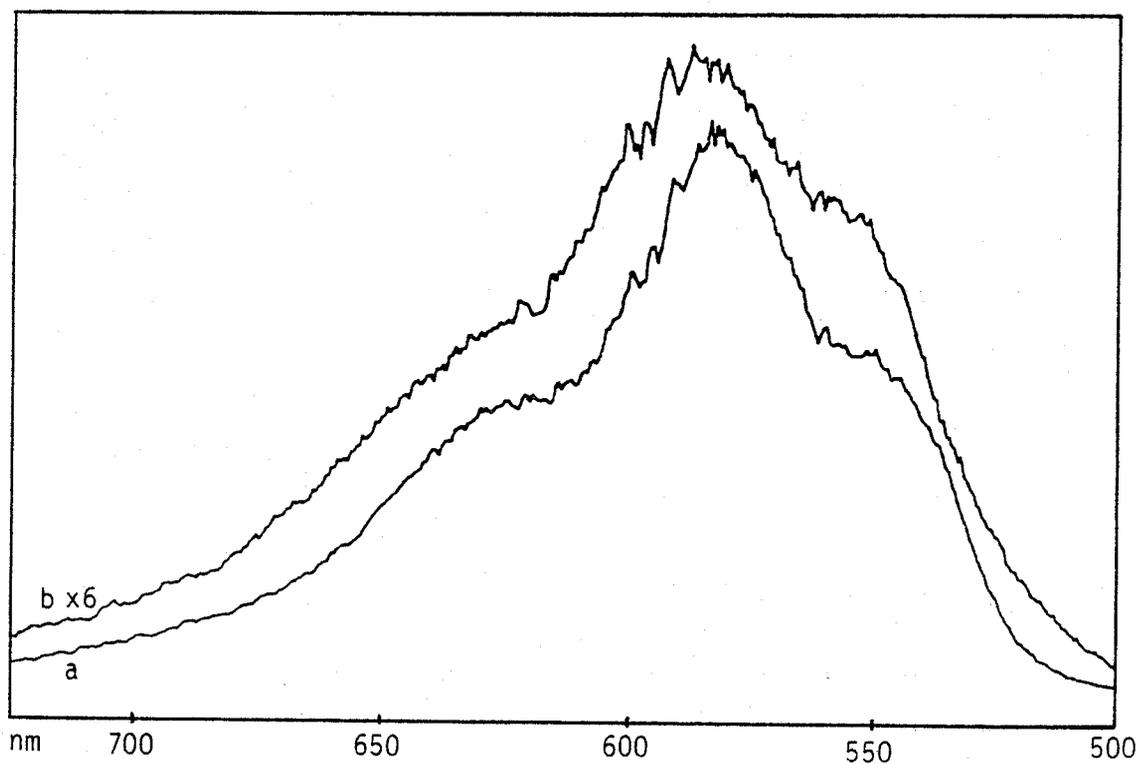


Figure 28

Spectres de fluorescence de la daunorubicine libre (a) ou couplée aux glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé (b), (solutions aqueuses observées en capillaire, concentration en DNR égale ou équivalente à 10  $\mu\text{g/ml}$ ; détection multicanale, microfluorimètre LASER,  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$ , puissance = 50  $\mu\text{W}$ ).

est voisin de celui du produit de couplage Gp ASOR - bras - DNR, avec cependant des maxima de fluorescence moins marqués, les deux pics externes apparaissant comme des épaulements du pic central.

Lorsque les produits sont analysés après chromatographie sur couche mince, donc à l'état solide, en focalisant le faisceau LASER sur les taches obtenues après migration, les spectres de la daunorubicine, de la N-leucyldaunorubicine et du composé bras-DNR sont similaires. Le spectre de l'aglycone est légèrement différent et on remarque également la différence de profil du spectre de la DNR couplée aux glycoconjugués par rapport à la DNR libre.

#### 6 - Possibilités d'hydrolyse enzymatique.

L'action de la trypsine sur le composé bras-DNR et sur son produit de couplage aux glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé a été étudiée.

L'hydrolyse trypsique (trypsine, Miles) est réalisée en tampon TRIS/HCl 0,1M, acétate de calcium 0,025M, pH 7,8, à 37°C pendant 16 à 48 heures. L'addition d'ions  $Ca^{2+}$  retarde l'autolyse de la trypsine. Des quantités de trypsine correspondant au 1/50 du poids du substrat sont ajoutées au départ et après 16h et 24h d'hydrolyse. Les hydrolysats sont analysés en chromatographie sur couche mince dans le système - solvant: butanol/ acide acétique/ eau (2:1:1; v:v:v).

Le composé bras-DNR libère de la N-leucyldaunorubicine. Le composé Gp ASOR - bras - DNR libère quant à lui très peu de N-leucyldaunorubicine. Son hydrolyse trypsique fournit deux composés majeurs non identifiés qui pourraient résulter de la coupure entre des acides aminés portés par la partie peptidique résiduelle des glycopeptides d'asialoorosomucoïde, et non de la coupure entre les résidus Arg et Leu de la partie bras-DNR qui fournirait directement la N-leucyldaunorubicine. Ces dérivés, de taille intermédiaire entre le composé bras-DNR et le produit de couplage initial Gp ASOR - bras - DNR, ne donneraient la N-leucyldaunorubicine elle-même qu'après une hydrolyse très poussée.

Le profil de migration en chromatographie sur couche mince du composé Gp ASOR - bras - DNR avant hydrolyse trypsique et des dérivés

obtenus par hydrolyse trypsique est présenté dans la figure 29 (p.114 ). Ces profils ont été obtenus par analyse du chromatogramme en fluorescence, à la microsonde MOLE (longueurs d'onde d'excitation: 488 nm et d'émission: 590 nm), selon la technique illustrée dans la figure 32 (p.124).

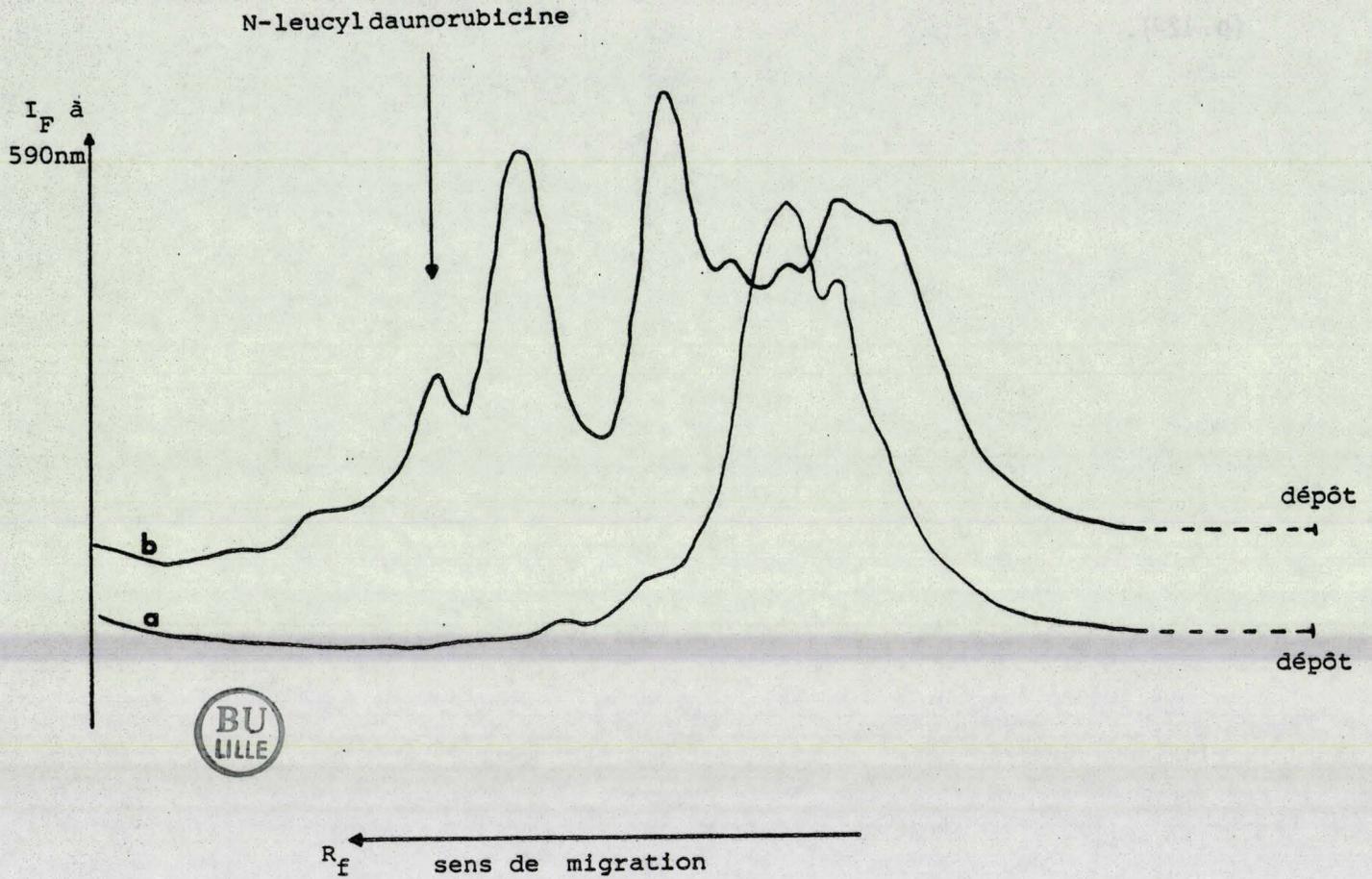


Figure 29

Migration en chromatographie sur couche mince du produit de couplage Glycopeptides d'ASOR-bras-DNR (a) et de ses produits d'hydrolyse trypsique (b- 48h d'hydrolyse).

Observation en fluorescence à la microsonde MOLE avec platine à déplacement micrométrique; excitation à 488nm; émission à 590nm. Migration dans le solvant: n-butanol/acide acétique/eau (2:1:1;v:v).

## CONCLUSION

Le procédé de couplage de la daunorubicine à l'asialoorosomucoïde et à ses glycopeptides que nous avons mis au point permet d'obtenir, avec un rendement de préparation de 60% et sans altérer la partie glycanique du glycoconjugué vecteur, des composés dépourvus de contaminants fluorescents comme la daunorubicine, la N-leucyldaunorubicine ou le composé bras-DNR dont la présence pourrait fausser l'interprétation des résultats biologiques.

Malgré les nombreux emplacements possibles de fixation du composé bras-DNR sur les glycoconjugués, le taux de DNR trouvé dans les produits de couplage est assez faible (2 à 4%) et correspond approximativement à une mole de daunorubicine fixée par mole de glycoconjugué. Cependant, ce taux est voisin de ceux que nous avons précédemment obtenus par différentes méthodes de couplage (DELPLACE-DELHAYE (1982)) et de ceux décrits dans la littérature. Il est, en outre, suffisant pour la détection et le suivi des composés par fluorescence.

Ce premier chapitre consacré à la synthèse et à l'analyse des conjugués médicament - transporteur laisse entrevoir l'application des techniques de fluorescence à l'étude de la DNR et de ses dérivés, techniques qui sont décrites plus longuement dans les chapitres suivants.

Les résultats obtenus lors de l'hydrolyse trypsique ne permettent pas de conclure de manière précise sur les possibilités d'hydrolyse enzymatique des produits de couplage. Cependant, cette hydrolyse ne correspond pas aux conditions réelles d'une hydrolyse intracellulaire. Les expériences d'hydrolyse par des enzymes lysosomiques, que nous présentons dans le chapitre III (consacré aux expérimentations in vitro du ciblage par glycosylation) sont à cet égard plus significatives.

### Remarque:

Quelques expériences d'internalisation par les cellules Hep G2 (voir chapitre III) ont été réalisées avec un conjugué daunorubicine - lactose préparé par B.FLAN. Le couplage est réalisé par réduction à l'aide d'un cyanoborohydrure de l'imine formée entre le groupement réducteur du glucide et la fonction amine de la daunorubicine.

## CHAPITRE II

### MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER.

#### APPLICATION A L'ETUDE DE LA DAUNORUBICINE ET DE SES DERIVES

##### INTRODUCTION

Ayant mis au point la préparation des produits de couplage de la daunorubicine à l'asialoorosomucoïde ou à ses glycopeptides, glycoconjugués portant des résidus terminaux de galactose susceptibles de répondre aux conditions requises pour l'endocytose par les hépatocytes ou les cellules d'hépatome Hep G2, nous avons abordé l'étude du comportement de la daunorubicine libre ou couplée vis - à - vis de ces cellules, en particulier du point de vue de l'internalisation du médicament et de son devenir intracellulaire.

Deux problèmes majeurs se sont alors posés:

- le contrôle de la pureté des produits de couplage préparés qui doivent, pour l'interprétation des résultats biologiques, être totalement dépourvus de daunorubicine, N-leucyl daunorubicine ou de composé bras - daunorubicine libres,

- la détection, l'identification, et parfois la quantification de la daunorubicine ou de ses dérivés dans des microéchantillons tels que des solutions, des cellules, des extraits de cellules ou de tissus, afin d'apporter la preuve de l'internalisation de la drogue couplée et de déterminer sa localisation intracellulaire.

Pour tenter de résoudre ces problèmes, nous avons mis à profit les propriétés de fluorescence de la daunorubicine et de ses dérivés. Nos expériences ont été réalisées à l'aide de la microsonde "MOLE"

(laboratoire de Spectrochimie Infra-Rouge et Raman de l'Université des Sciences et Techniques de Lille - Flandres Artois, Professeur M.Delhayé) et du microspectrofluorimètre LASER (réalisé par la Société DILOR dans le cadre du G.I.P. Instrumentation et Spectrométrie) dont nous décrivons brièvement le principe et les possibilités d'utilisation dans notre domaine d'étude, en montrant quelques résultats obtenus avec la daunorubicine.

## I - MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER: PRINCIPE ET APPAREILLAGE.

### A - Principe de la microspectrofluorimétrie LASER.

#### 1 - Rappels théoriques.

Les spectres électroniques caractérisent les transitions entre l'état fondamental et les états électroniques excités d'une molécule. L'absorption UV ou visible correspondra ainsi au passage de la molécule de l'état fondamental à un état électronique excité par absorption d'un photon dont l'énergie  $hc\bar{\nu}$  est égale à la différence d'énergie  $\Delta E$  entre les deux niveaux.

L'énergie du photon est égale à  $hc\bar{\nu}$  avec  $h$ : constante de Planck,  $c$ : vitesse de la lumière et  $\bar{\nu}$ : nombre d'ondes. Le nombre d'ondes  $\bar{\nu}$  peut être défini comme l'inverse de la longueur d'onde  $\lambda$ :  $\bar{\nu} = 1/\lambda$ , ou comme le rapport de la fréquence  $\nu$  sur la vitesse de la lumière:  $\bar{\nu} = \nu/c$ .

La désactivation d'une molécule préalablement excitée par une absorption d'énergie peut produire une émission de lumière appelée luminescence. La molécule à l'état excité va retrouver son état fondamental selon plusieurs processus de désactivation de durée très variable, parmi lesquels se situe le phénomène de fluorescence (Fig. 30; p. 119).

Dans le cas d'un composé fluorescent, un photon d'énergie  $hc\bar{\nu}_0$  absorbé porte la molécule à un état électronique excité. Après une cascade de transitions non radiatives sur les niveaux vibrationnels de cet état électronique excité, un photon peut être émis avec retard ramenant la molécule au niveau fondamental. Cette transition correspond à une énergie  $hc\bar{\nu}_F$  plus faible que celle du photon exciteur.

Ce phénomène qui suit la loi de Stokes constitue l'émission de fluorescence. Le spectre de fluorescence sera donc observé à des longueurs d'onde supérieures à celles du spectre d'excitation.

Dans certains cas, il existe un état intermédiaire qui est un état "Triplet" à durée de vie longue car la transition Triplet - Singulet est "interdite". On observe alors le phénomène de phosphorescence.

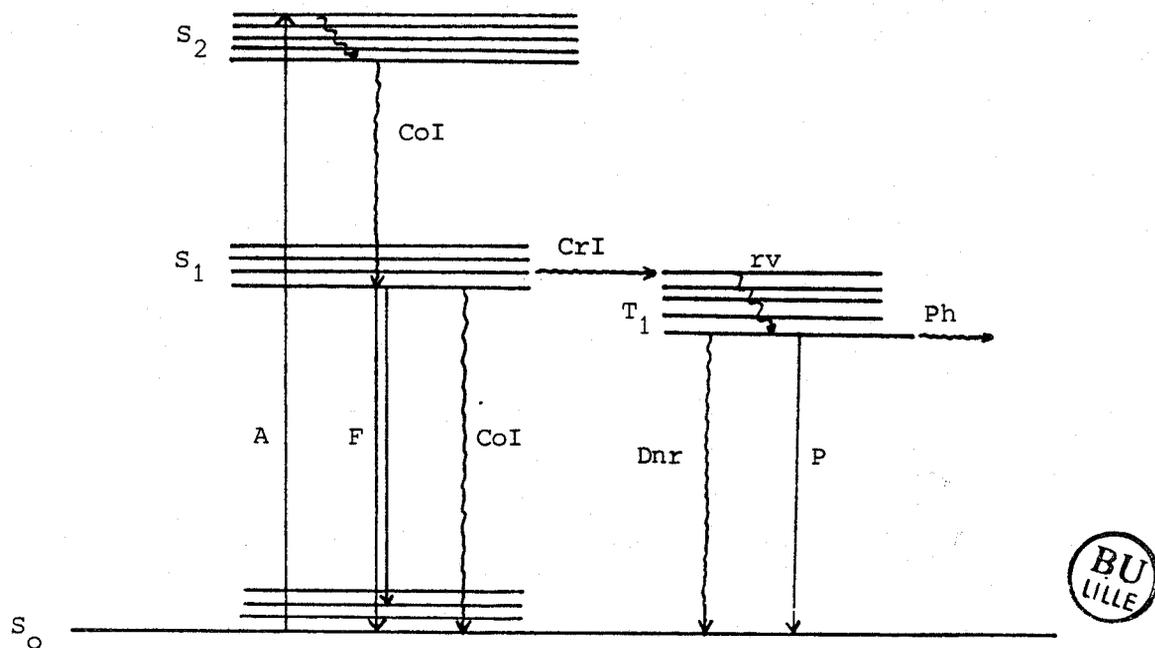


Figure 30

Transitions entre les états énergétiques d'une molécule

$S_0, S_1, S_2$	états singlets
$T_1$	état triplet
A	absorption ( $10^{-15} s$ )
F	fluorescence ( $10^{-7}$ à $10^{-9} s$ )
CoI	conversion interne
CrI	croisement intersystème
P	phosphorescence ( $10^{-5}$ à $10 s$ )
Dnr	désactivation non radiative
Ph	réaction photochimique
rv	relaxation vibrationnelle

## 2 - Intérêt des sources LASER pour l'étude de la fluorescence.

Les méthodologies basées sur le phénomène de fluorescence sont actuellement très largement exploitées. Leur application à l'analyse à l'échelle microscopique d'échantillons biologiques se révèle particulièrement utile à l'étude de mécanismes cellulaires.

L'application du microspectrofluorimètre (excitation par une lampe au xénon) réalisé par SALMON (1980) à l'étude de la pénétration et de la métabolisation de composés fluorescents dans des cellules est à cet égard un exemple significatif.

En combinant les techniques de micromanipulation des cellules et de spectroscopie de fluorescence avec détection de faibles intensités lumineuses, divers marqueurs fluorescents (en particulier des molécules biologiquement actives rendues fluorescentes) peuvent être utilisés comme sondes pour étudier la structure et les fonctions des cellules vivantes (TAYLOR et WANG (1980)).

Récemment, des microfluorimètres à excitation LASER ont été développés dont l'intérêt par rapport aux spectrofluorimètres conventionnels est considérable pour l'étude de microéchantillons fluorescents. En effet, l'emploi de sources LASER qui permettent de concentrer l'énergie d'un faisceau lumineux sur une très petite surface est particulièrement avantageux sur le plan de la sensibilité et de la résolution spatiale.

Les deux instruments que nous avons utilisés pour nos études sont la microsonde moléculaire "MOLE" utilisée en microfluorimètre à détection monocanale, et le microspectrofluorimètre LASER à détection multicanale. Pour ces deux appareils, l'excitation de la fluorescence est obtenue à l'aide de raies émises par un LASER à argon ionisé.

## B - Microsonde moléculaire "MOLE".

### 1 - Principe et application à la fluorescence.

Le principe de la microsonde moléculaire est fondé sur l'analyse non destructive d'un échantillon par observation de l'effet Raman excité grâce à un faisceau LASER. Les constituants d'un échantillon peuvent ainsi être identifiés et localisés au moyen de leur spectre Raman qui les caractérise par leurs fréquences de vibration.

Deux générations successives d'instruments ont été développées à Lille (laboratoire de Spectrochimie Infra-Rouge et Raman de l'Université de Lille I) pour réaliser sur ce principe l'analyse locale par effet Raman d'échantillons de très petites dimensions. La première (DELHAYE et coll. (1976)) a été appelée "MOLE" (par abréviation de microsonde moléculaire). La seconde, développée dans les années 80, a pris le nom de "MICRODIL".

Bien que ces instruments aient été conçus et optimisés pour l'étude de spectres Raman, d'intensité très faible, il nous a paru intéressant de profiter de leur sensibilité élevée et de leur excellente résolution spatiale pour étudier les spectres de fluorescence d'échantillons microscopiques.

En effet, l'excitation par un faisceau LASER permet également, selon la valeur de la fréquence  $\nu_0$  excitatrice, d'observer le phénomène de fluorescence. Les microsondes moléculaires deviennent alors des microfluorimètres extrêmement sensibles capables de détecter des quantités très faibles de composés fluorescents dans un microéchantillon tel qu'une cellule.

### 2 - Description et fonctionnement de la microsonde MOLE.

La microsonde moléculaire MOLE, que nous avons utilisée lors de nos études, est constituée par l'association d'un microscope optique, d'un monochromateur à réseaux holographiques (filtre optique) et de systèmes de détection photoélectriques (DELHAYE et DHAMELINCOURT (1975); DHAMELINCOURT (1979); DELHAYE (1981)).

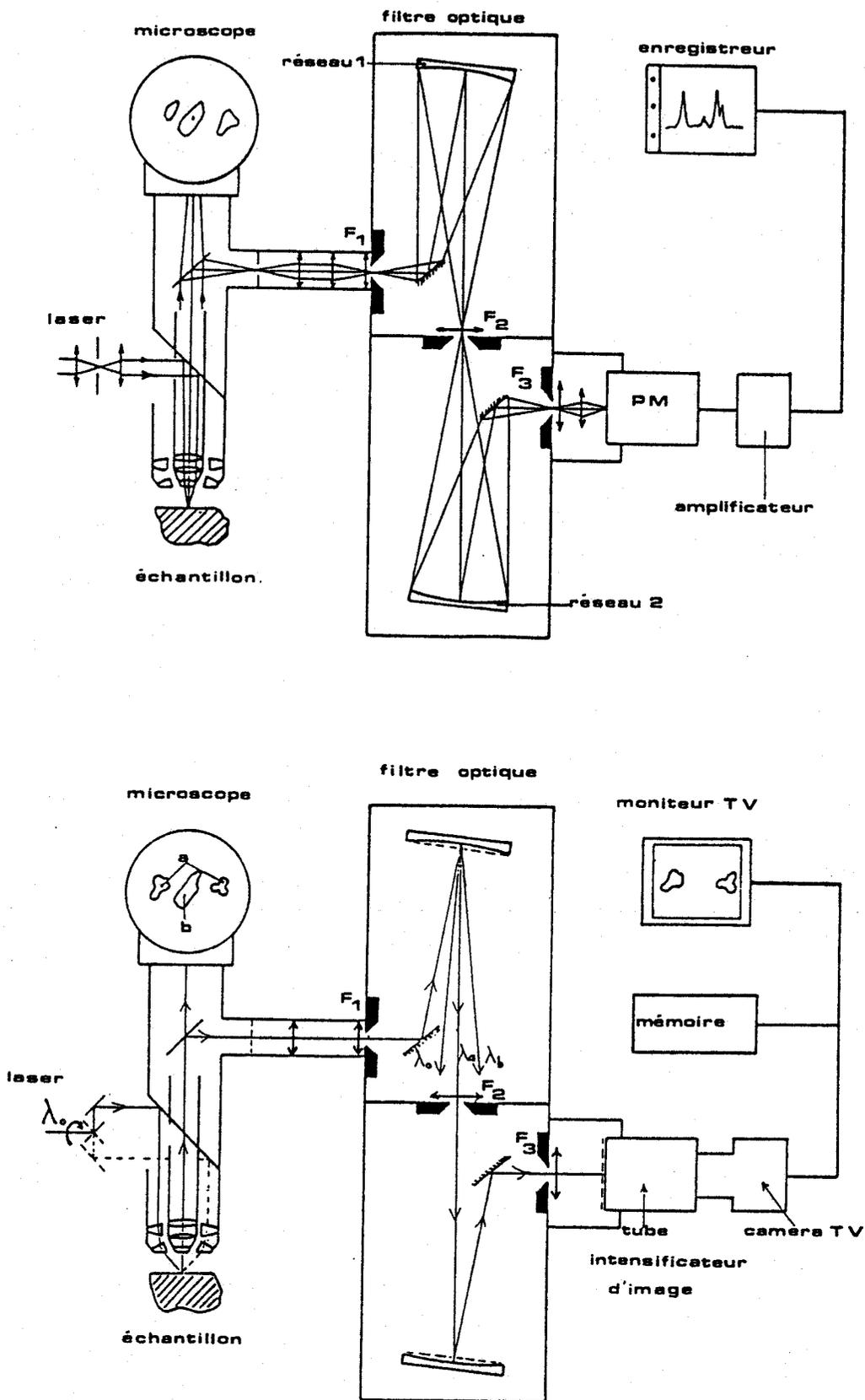
Cet instrument, dont le schéma optique est donné dans la figure 31 (p.123) remplit trois fonctions complémentaires:

- observation de l'échantillon grâce à un microscope optique offrant diverses possibilités d'éclairage soit en lumière blanche, soit en lumière monochromatique (source LASER à argon).

- enregistrement de spectres moléculaires (Raman, fluorescence) correspondant à un très petit volume choisi dans l'échantillon (quelques  $\mu\text{m}^3$ ) par utilisation du mode d'éclairage ponctuel (mode spectre; voir figure 31A) et focalisation du faisceau LASER dans le champ du microscope en une tache dont les dimensions sont proches du micromètre.

- observation d'images micrographiques, obtenues en isolant dans le spectre Raman ou de fluorescence une bande caractéristique d'une substance contenue dans l'échantillon, et donnant directement la distribution de cette substance dans le champ du microscope avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre. Ce mode d'éclairage global (mode image; voir figure 31B) permet d'éclairer une zone de la préparation de 150 à 300  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'image obtenue est visualisée et enregistrée grâce à un système de détection constitué par un intensificateur photoélectrique d'images couplé à une caméra de télévision S.E.C..

Pour certaines expériences, une platine à déplacement micrométrique motorisée a été adaptée à la microsonde MOLE. Il est alors possible, en se plaçant à longueur d'onde d'émission fixe, choisie en fonction du spectre de fluorescence des composés étudiés, d'obtenir des profils d'intensité de fluorescence le long d'une zone rectiligne choisie dans un échantillon. Cette technique permet de détecter la présence de composés fluorescents après migration sur un support constitué par un gel de silice, dans le cas d'une chromatographie sur couche mince, ou par un gel de polyacrylamide dans le cas d'une électrophorèse (voir figure 32; p.124).



A

B



Figure 31

Schéma optique de la microsonde moléculaire "MOLE"

A : mode spectre

B : mode image

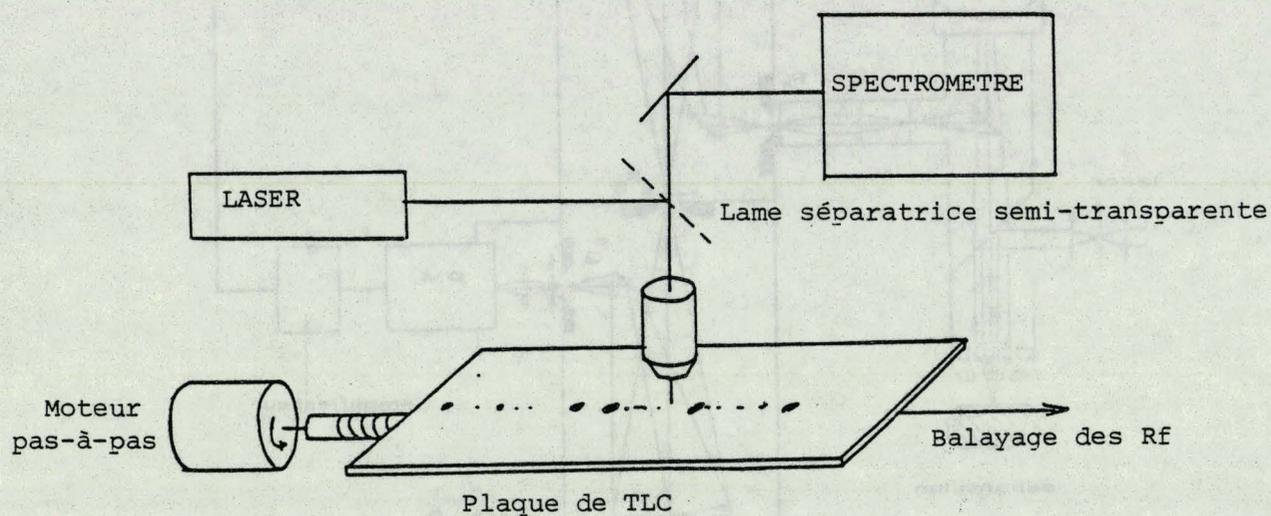


Figure 32



Analyse par microspectrofluorimétrie LASER de chromatographies sur couche mince: - spectres de fluorescence de taches isolées ( $10^{-12}$ g)  
- profils d'intensité de fluorescence à longueur d'onde d'émission fixe

C - Microspectrofluorimètre à détection multicanale.

1 - Intérêt du microfluorimètre à détection multicanale.

Les sources LASER sont particulièrement bien adaptées à l'étude des mécanismes cellulaires en raison de leur efficacité d'excitation et de leur résolution spatiale. Cependant, ces sources intenses doivent être utilisées avec précaution lors d'analyses d'échantillons biologiques car l'irradiation peut rapidement modifier ou altérer le matériel observé (phénomène de "photobleaching" réversible et décomposition photochimique irréversible). Pour éviter ces altérations, un temps d'enregistrement court et une faible puissance LASER au niveau de l'échantillon sont nécessaires.

Le microfluorimètre développé à Lille (G.I.P. Instrumentation et Spectrométrie), équipé d'un détecteur multicanal, beaucoup plus performant que la microsonde MOLE sur le plan de la sensibilité et de la vitesse d'enregistrement des spectres (BARBILLAT (1983)), permet de s'affranchir de ces limitations liées à la microanalyse d'échantillons biologiques (BARBILLAT et coll. (1985)).

Il nous a, en outre, permis d'aborder l'aspect quantitatif de la détermination en solution de quantités très faibles de daunorubicine et de ses dérivés.

La décroissance rapide de la fluorescence sous irradiation LASER (particulièrement nette dans le cas de cellules) observée à la microsonde MOLE au cours du balayage du spectre gêne l'enregistrement correct du spectre de fluorescence. Ce problème a été résolu grâce au microfluorimètre à détection multicanale qui permet l'enregistrement de tous les éléments spectraux simultanément (et non pas séquentiellement comme dans le cas des spectrofluorimètres classiques) même si le phénomène évolue rapidement au cours du temps.

Le temps d'acquisition du spectre de fluorescence est alors déterminé par la nécessité d'obtenir un rapport signal/ bruit aussi élevé que possible avec un temps d'exposition à la radiation excitatrice suffisamment court pour éviter la détérioration du matériel biologique et la photodégradation du composé fluorescent.

Le microfluorimètre LASER fournit ainsi, de manière non destructive

et rapide (0,1 seconde à quelques minutes), d'une part, le spectre de fluorescence complet de l'échantillon placé sur la platine du microscope, avec une résolution spatiale égale au micromètre, et d'autre part, la distribution spatiale, à des longueurs d'onde déterminées, des composés fluorescents présents dans un échantillon hétérogène.

Il permet également de suivre l'évolution temporelle des phénomènes de fluorescence observés.

## 2 - Description de l'appareil.

Le microfluorimètre, dont le schéma optique est présenté dans la figure 33 (p.127), comprend:

- une source LASER à argon ionisé (longueurs d'onde d'excitation: 458, 488 et 514,5 nm)
- un microscope optique dont l'objectif est utilisé pour focaliser le faisceau LASER sur l'échantillon et pour collecter l'émission de fluorescence
- un dispositif optique de balayage de l'échantillon
- des filtres d'arrêt dont les longueurs d'onde de coupure sont adaptées aux longueurs d'onde d'émission du LASER
- un spectrographe à réseaux holographiques plans (Le réseau à 300 traits/ mm a été employé lors de nos études). Le positionnement en longueur d'onde et la calibration du spectrographe sont entièrement informatisés.
- un détecteur multicanal (barrette de 512 ou 1024 photodiodes couplée à un intensificateur à microcanaux et refroidie par effet Peltier) dont la sensibilité élevée permet d'utiliser un faisceau LASER d'excitation de très faible puissance (quelques  $\mu\text{W}$ ).

Le système entier est relié à un ordinateur pour l'acquisition des données, la mise en mémoire, le traitement et la présentation des spectres.

Outre les enregistrements de spectres de fluorescence et les mesures d'intensité de fluorescence, le microfluorimètre permet des mesures en polarisation de fluorescence. La dernière version du microfluorimètre multicanal (BARBILLAT et coll. (1987)) permet en outre l'étude en fluorescence d'échantillons biologiques sous excitation UV (LASER He-Cd).

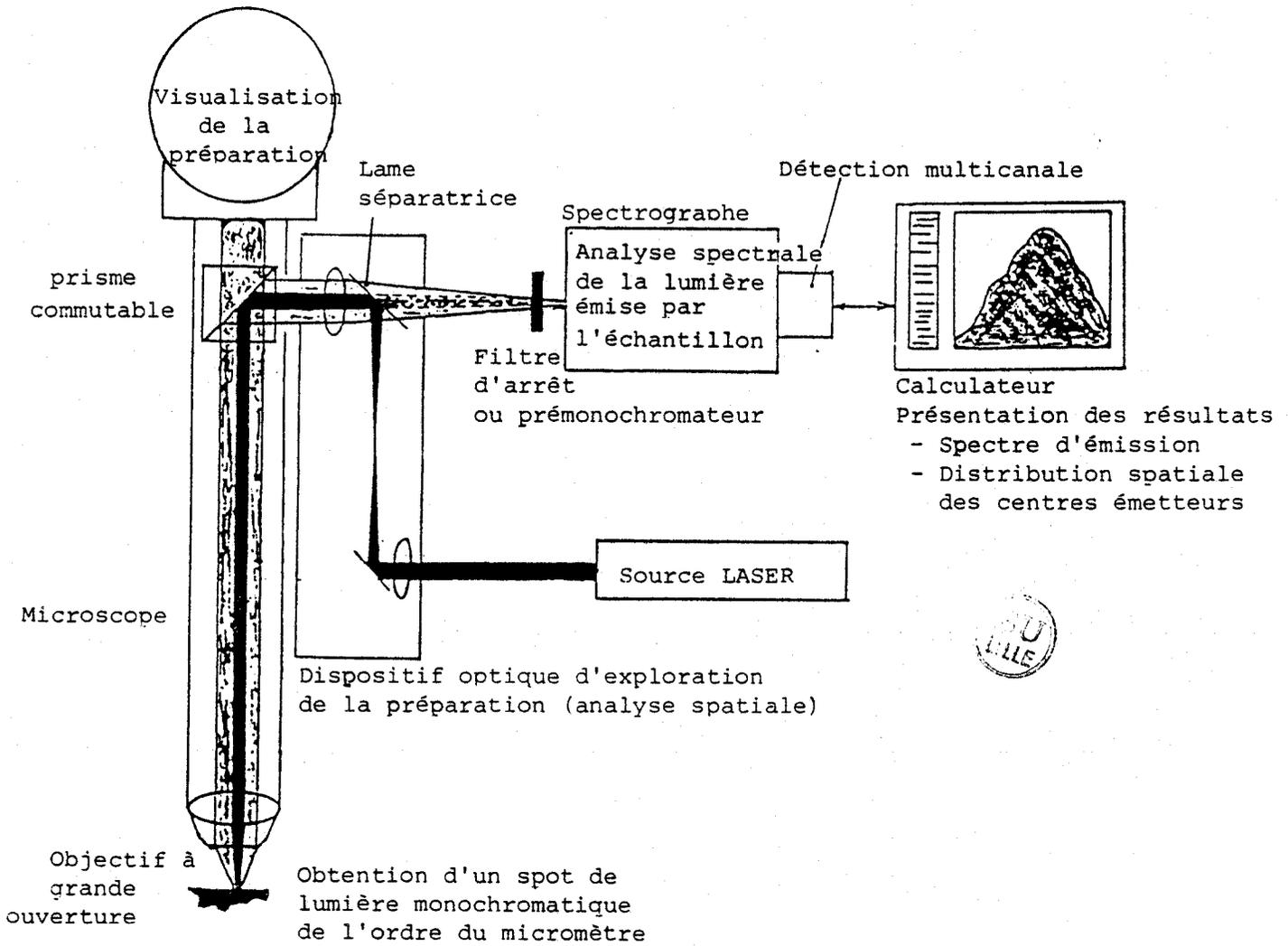


Figure 33

Schéma optique du microfluorimètre LASER.

## II - APPLICATION DE LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE LASER A L'ETUDE DE LA DAUNORUBICINE (ET DE SES DERIVES).

L'étude d'un composé par spectroscopie de fluorescence permet d'obtenir un certain nombre de renseignements. Cette étude comporte différents aspects: étude du spectre d'excitation de fluorescence, étude du spectre d'émission de fluorescence, analyse par polarisation de fluorescence, détermination de la durée de vie du phénomène de fluorescence.

Différentes données fournies par l'analyse de l'émission de fluorescence peuvent ainsi être exploitées. A côté des mesures classiques d'intensité de fluorescence, l'enregistrement du spectre d'émission de fluorescence permet la détermination de différentes données: profil du spectre, longueurs d'onde des maxima des composantes du spectre, intensités relatives de ces maxima, largeurs des bandes, intensité intégrée (calcul de l'aire comprise entre la courbe et la ligne de base entre deux limites de longueurs d'onde), et la mise en évidence des variations de ces différentes données en relation avec les interactions moléculaires.

La daunorubicine ayant la particularité d'être fluorescente, nous avons choisi de tirer profit de cette propriété et d'employer les techniques de microspectrofluorimétrie LASER pour "suivre" la molécule, que ce soit pour le contrôle des produits de couplage médicament - transporteur synthétisés, ou pour l'étude des interactions entre le médicament libre ou couplé et les cellules.

La daunorubicine dont les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont présentés dans la figure 34 (p.129) peut être excitée au voisinage de son maximum d'absorption par la raie bleue ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) d'un LASER à argon ionisé. Ces conditions d'excitation ont été conservées pour toutes nos expériences, aussi bien pour la daunorubicine que pour ses dérivés.

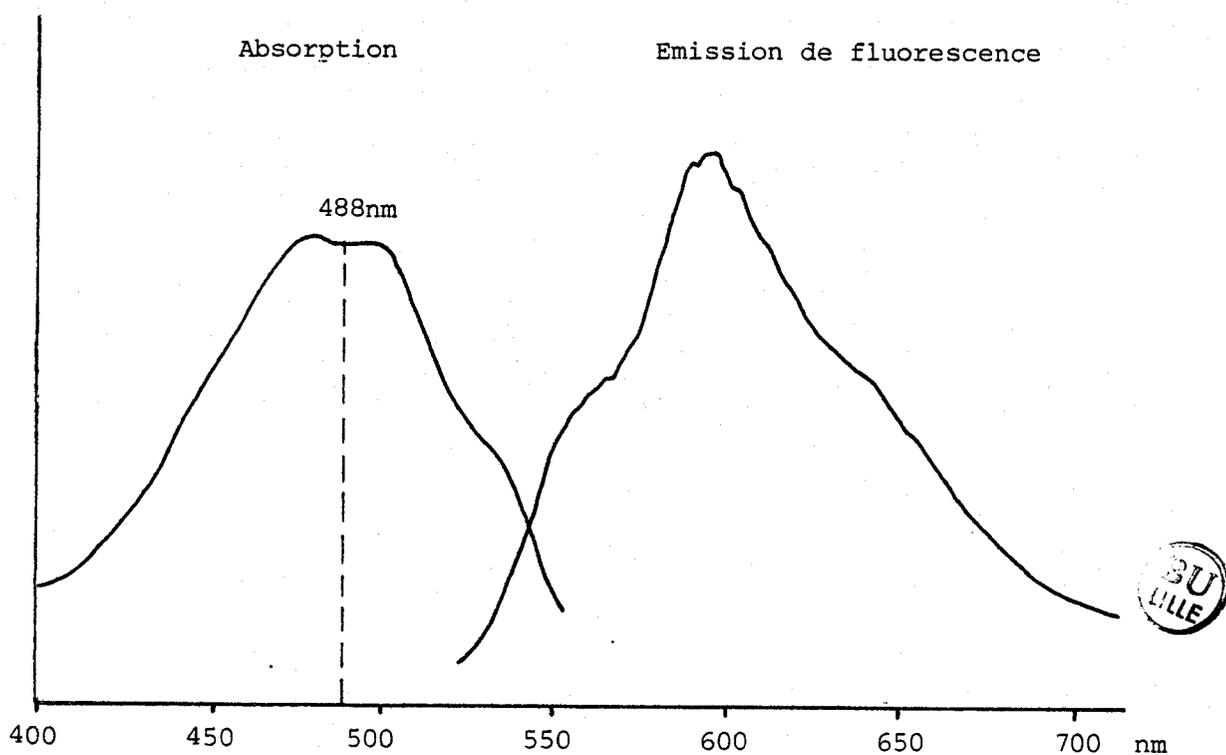


Figure 34

Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence  
de la daunorubicine (pH=4).

A - Analyse et contrôle des composés fluorescents.

1 - Produits en solution.

La microsonde MOLE et le microfluorimètre LASER permettent l'analyse en fluorescence de produits en solution aqueuse soit par observation (sous lamelle ou sans lamelle) d'une goutte de solution déposée sur une lame de verre, soit par observation à travers un capillaire de verre contenant la solution. Les dimensions du tube capillaire (Pyrex; diamètre intérieur = 0,3 mm; diamètre extérieur = 0,55 mm) permettent l'analyse d'un volume de solution inférieur au microlitre, le volume effectivement observé étant de l'ordre de  $10^{-12}$  litres (soit 1 nanogramme de solution).

Dans le cas de solutions de concentration très faible en composé fluorescent, les limitations de cette technique proviennent du spectre de fluorescence du support utilisé (capillaire en verre) et du spectre Raman de l'eau (voir figure 35; p.131).

Les spectres de fluorescence en solution aqueuse de la daunorubicine et de quelques-uns de ses dérivés (N-leucyldaunorubicine, composé bras-DNR, produits de couplage de la DNR à l'asialoorosomucoïde et à ses glycopeptides, composé lactose-DNR) ont été enregistrés, en utilisant des capillaires ouverts, à la microsonde MOLE ou au microfluorimètre.

Seul le spectre de fluorescence de l'aglycone en solution n'a pas été enregistré, car ce composé est peu soluble dans l'eau et l'obtention du spectre de fluorescence de sa solution chloroformique ne serait possible qu'en employant un capillaire scellé. En effet, l'échauffement de la préparation dû à l'éclairage LASER produit une évaporation rapide dans le cas de solvants très volatils.

La figure 35 (p. 131) présente le spectre de fluorescence de la daunorubicine en solution aqueuse, pour différentes concentrations en daunorubicine, et indique la concentration minimale nécessaire pour détecter la présence de DNR dans la solution ( $2 \times 10^{-6}$  M). Pour cette concentration, le spectre de fluorescence enregistré en quelques secondes correspond à une masse détectée de daunorubicine de l'ordre de  $10^{-15}$  g, en considérant que la mesure a été effectuée sur un volume de  $10^{-12}$  l.

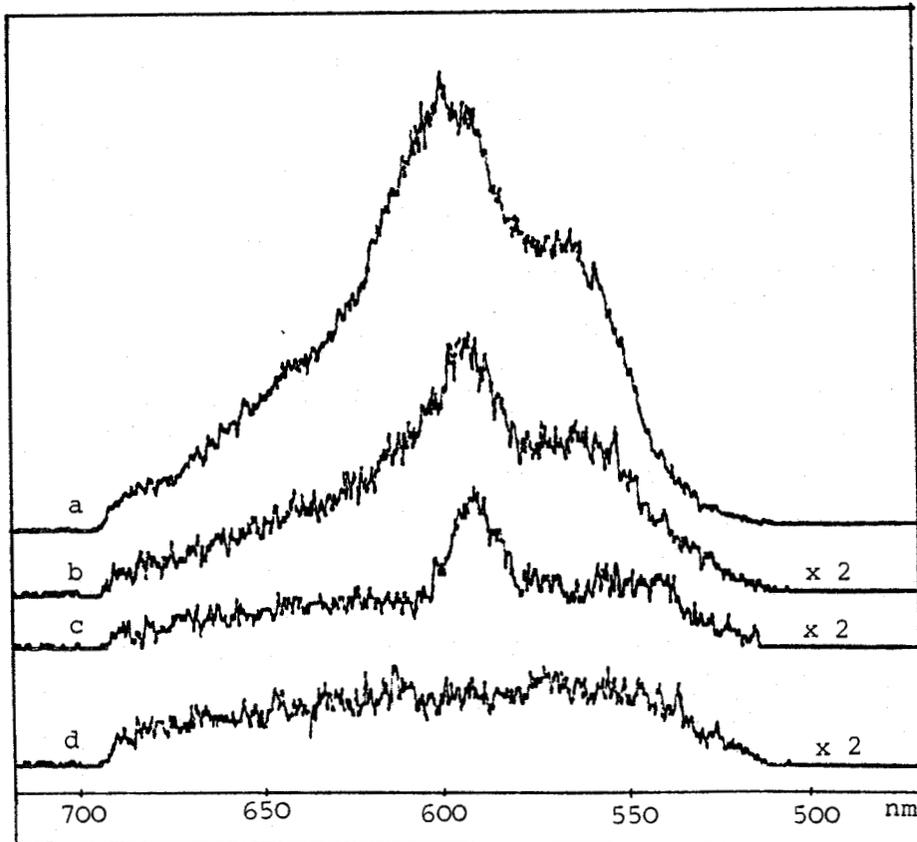


Figure 35

Test de détection de la daunorubicine en solution aqueuse  
(capillaire en verre; diamètre intérieur: 0,3 mm; diamètre  
extérieur: 0,55 mm)

- a - daunorubicine ( $10^{-5}M$ )
- b - daunorubicine ( $2 \times 10^{-6}M$ )
- c - eau
- d - capillaire seul

Microfluorimètre:  $\lambda_{exc} = 488nm$ ; puissance LASER = 420  $\mu W$ ;  
détection multicanale, 1024 diodes, temps d'intégration: 0,3 sec.,  
10 accumulations; temps d'acquisition d'un spectre: 6 secondes.

La courbe de l'évolution de l'intensité maximale de fluorescence en fonction de la concentration en DNR, présentée dans la figure 36 (p.133) montre que le seuil de détection peut être diminué ( $7 \times 10^{-8}$  M) quand la DNR est en solution dans un mélange HCl 0,3N / éthanol 50%.

Il en est de même quand la daunorubicine est en solution dans un tampon contenant un détergent tel que le SDS (dodécylsulfate de sodium) avec une légère modification du spectre de fluorescence dont les bandes sont plus marquées (voir figure 37; p.134) et une forte augmentation de l'intensité de fluorescence, à concentration égale en DNR.

En tenant compte de ces facteurs, nous avons effectué des mesures quantitatives de DNR ou de ses dérivés en solution en comparant l'intensité maximale de fluorescence obtenue à celles d'une gamme témoin du composé fluorescent dans le même solvant et dans les mêmes conditions de mesure (puissance LASER, objectif, temps d'intégration, nombre d'accumulations de spectres).

Nous avons, d'autre part, réalisé des études de variation du spectre de fluorescence de la DNR en fonction du pH (voir paragraphe A - 3) ou d'interactions avec d'autres composés tels que l'ADN (voir partie C).

## 2 - Contrôle des produits par chromatographie en couche mince.

Nous avons associé la chromatographie sur couche mince à la microspectrofluorimétrie LASER afin de contrôler la pureté des composés que nous avons préparés par couplage de la DNR aux glycoconjugués.

Cette technique est particulièrement avantageuse car elle nécessite très peu de produit. En effet, après dépôt d'une microgoutte (de volume voisin du microlitre) de produit en solution sur le support de chromatographie en couche mince (gel de silice) et migration dans un système - solvant approprié, il est possible d'enregistrer le spectre de fluorescence d'une tache d'une surface de quelques  $\mu\text{m}^2$  et de détecter ainsi les éventuels contaminants des préparations (sensibilité : 1 picogramme).

De plus, grâce à la platine à déplacement micrométrique, nous avons

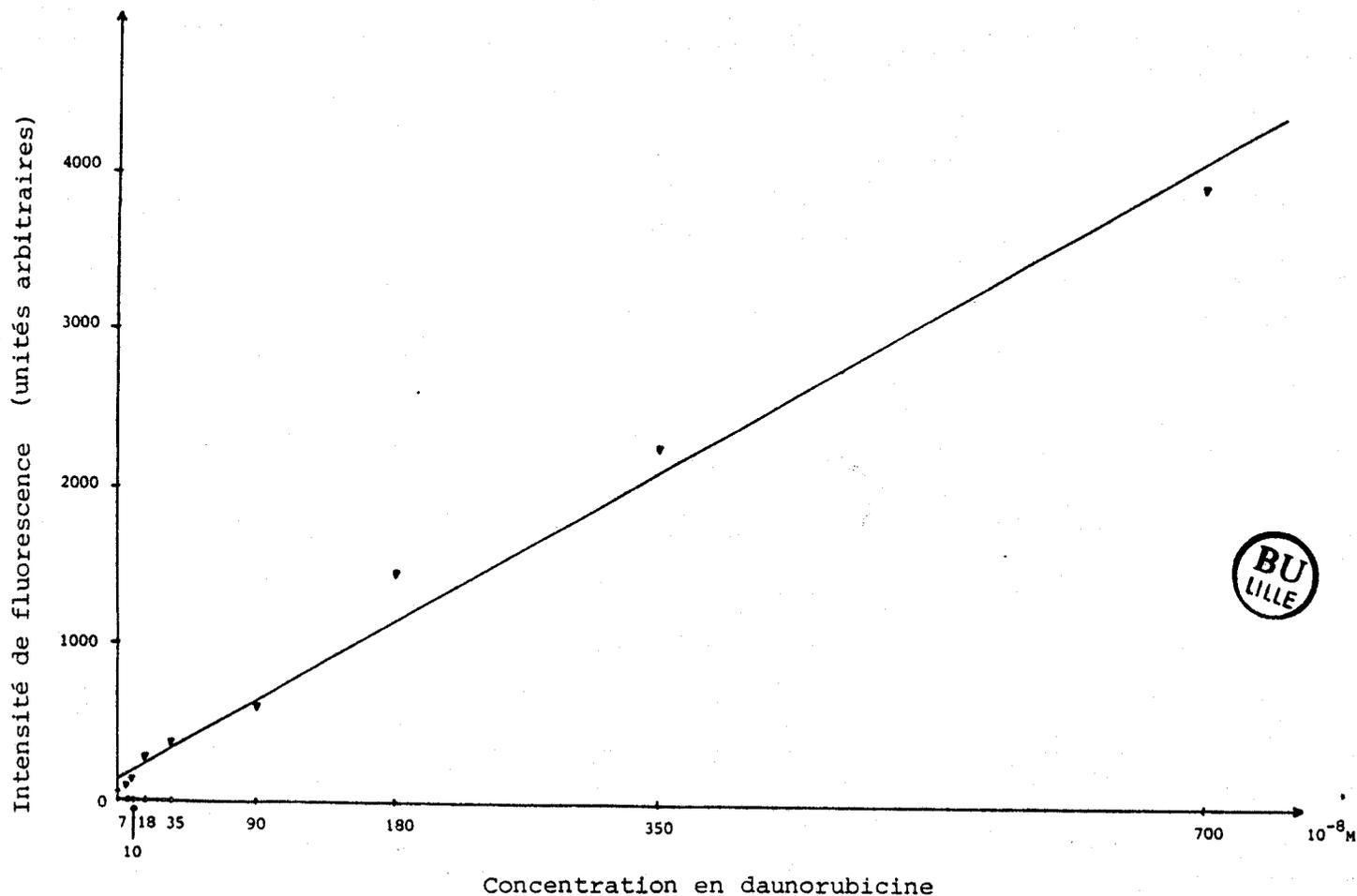


Figure 36

Variation de l'intensité maximale de fluorescence ( $\lambda_F = 590 \text{ nm}$ ) de la daunorubicine en solution dans HCl 0,3N/ éthanol à 50% en fonction de sa concentration (7 à 700  $\times 10^{-8} M$ ).

Microfluorimètre à détection multicanale; solutions en capillaire; objectif x 32; excitation à 488 nm; puissance LASER = 300  $\mu W$ .

La droite de régression est  $Y = 5,628 X + 148,39$  (coefficient de corrélation = 0,994).

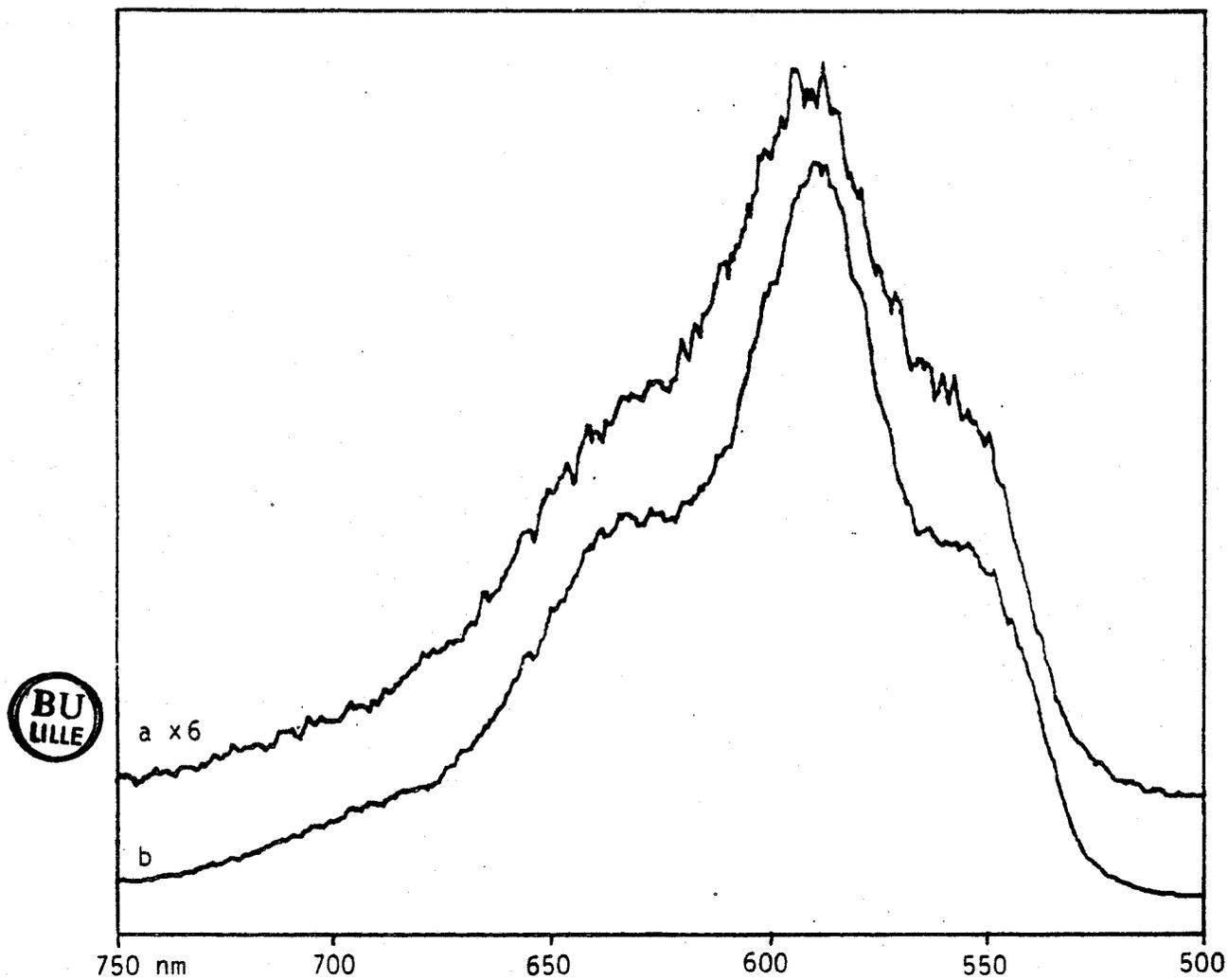


Figure 37

Spectre de fluorescence de la DNR en solution dans l'eau (a) ou dans un tampon TRIS 0,125M/ HCl pH 6,8, 4,6% SDS (b).

Solutions observées en capillaire, concentration en DNR = 10  $\mu\text{g/ml}$ ; microfluorimètre à détection multicanale,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 488 nm, puissance LASER = 30  $\mu\text{W}$ , obj. x50, temps d'acquisition des spectres : 5 secondes.

enregistré des profils de migration sur support de chromatographie en couche mince pour détecter les produits d'hydrolyse enzymatique de nos composés et en identifier certains (hydrolyse trypsique et hydrolyse par les enzymes lysosomiques).

Tous les dérivés de la daunorubicine (y compris l'aglycone) sont analysables par cette technique qui nécessite des quantités très faibles de produit. En effet, si la quantité de produit déposé est trop importante, le spectre obtenu après irradiation LASER peut être déformé par un phénomène de réabsorption de la lumière émise comme dans le cas de solutions de très forte concentration.

### 3 - Rendement quantique de la DNR. Evolution de la fluorescence de la DNR en fonction du pH.

Nous avons déterminé le rendement quantique de fluorescence de la DNR en solution et recherché les modifications des spectres d'absorption et de fluorescence de la DNR avec le pH de la solution.

L'intensité de fluorescence  $I_F$  d'une solution peut être calculée à partir de l'expression:

$$I_F = I_0 (1 - 10^{-\epsilon c l}) Q_F$$

où  $I_F$  = intensité de fluorescence

$I_0$  = intensité de la radiation excitatrice

$Q_F$  = rendement quantique de fluorescence

Pour des solutions de concentrations faibles, l'équation se simplifie et l'intensité du signal de fluorescence  $I_F$  est directement proportionnelle à la concentration et au rendement quantique de fluorescence  $Q_F$  du chromophore (RABEK (1982)):

$$I_F = I_0 (2,3 \epsilon c l) Q_F$$

Le rendement quantique de fluorescence d'un composé peut être déterminé par comparaison avec un composé standard fluorescent de rendement quantique  $Q_{FS}$  connu selon l'équation:

$$Q_F = \frac{I_F \epsilon_S c_S}{I_{FS} \epsilon c} Q_{FS}$$

Le rendement quantique de fluorescence de la DNR a été déterminé avec une solution de DNR  $2 \times 10^{-5}$  M à pH 6, par rapport à une solution de fluorescéine ayant la même densité optique à 488 nm (la fluorescéine dont le maximum d'absorption se situe vers 488 nm peut être excitée dans les mêmes conditions que la DNR) et de rendement quantique connu (0,65). Le rendement quantique à pH 6 de la daunorubicine trouvé est de 0,02.

Les spectres d'absorption de la DNR à différents pH ont été obtenus au spectrophotomètre Cary à partir de solutions  $2 \times 10^{-5}$  M de DNR dans divers tampons (pH 3 à 10). Le spectre d'absorption est constant pour un pH inférieur ou égal à 8 (Fig. 38; p.137). En milieu basique (pH 9 et pH 10), on observe une diminution de l'absorption (effet hypochrome) accompagnée d'une modification du spectre d'absorption et de son déplacement vers les valeurs élevées de longueur d'onde (effet bathochrome). Des modifications analogues du spectre d'absorption sous l'effet du pH ont d'ailleurs été décrites pour l'adriamycine, composé voisin de la daunorubicine (MANFAIT et coll. (1981)). Les effets bathochrome et hypochrome observés sur le spectre d'absorption des anthracyclines auraient pour cause la déprotonation, à pH alcalin, des groupements phénoliques du chromophore.

Les mêmes solutions ont été analysées, en capillaires, en microspectrofluorimétrie multicanale avec excitation à 488 nm. Le profil du spectre de fluorescence n'est pas modifié quand le pH de la solution varie (Fig. 39; p.138). Cependant l'intensité de fluorescence décroît fortement des pH acides aux pH basiques, avec une zone d'intensité de fluorescence pratiquement constante (pH 4 à 7). Le même mécanisme de déprotonation en milieu alcalin serait à l'origine de la décroissance de l'intensité de fluorescence observée.

Dans la gamme où la densité optique (A) à 488 nm est à peu près constante (pH 3 à 8), il est possible connaissant le rendement quantique à pH 6 de l'obtenir pour les autres pH d'après la relation:

$$Q_{(pHx)} = \frac{I_{(pHx)} Q_{(pH6)} A_{(pH6)}}{I_{(pH6)} A_{(pHx)}}$$

Comme le montre le tableau X (p.139), le rendement quantique de

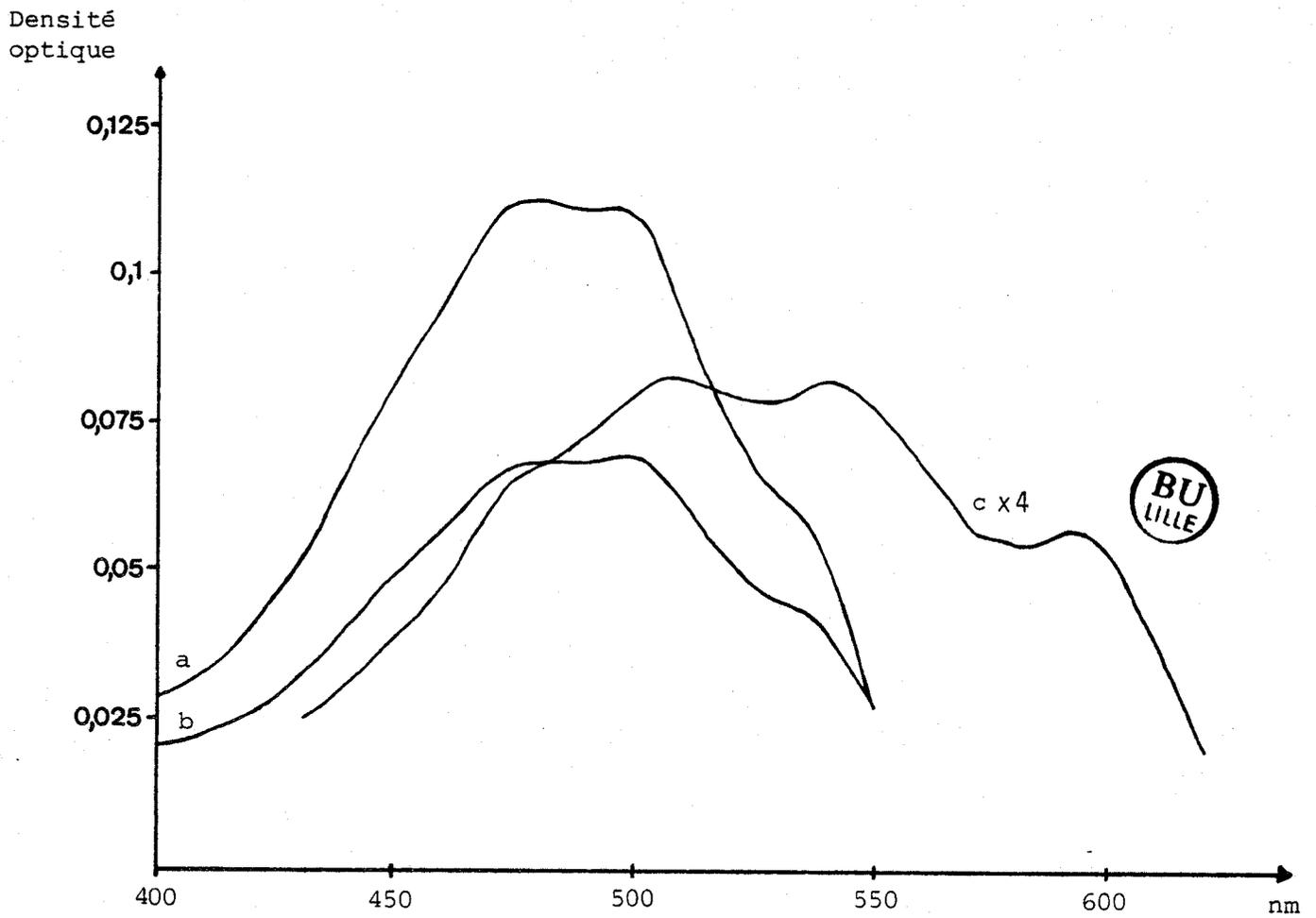


Figure 38

Absorption de la daunorubicine libre en solution aqueuse en fonction du pH (solution  $2 \times 10^{-5}M$ ; spectrophotomètre Varian Cary 219)

a - pH 3 à 8

b - pH 9

c - pH 10

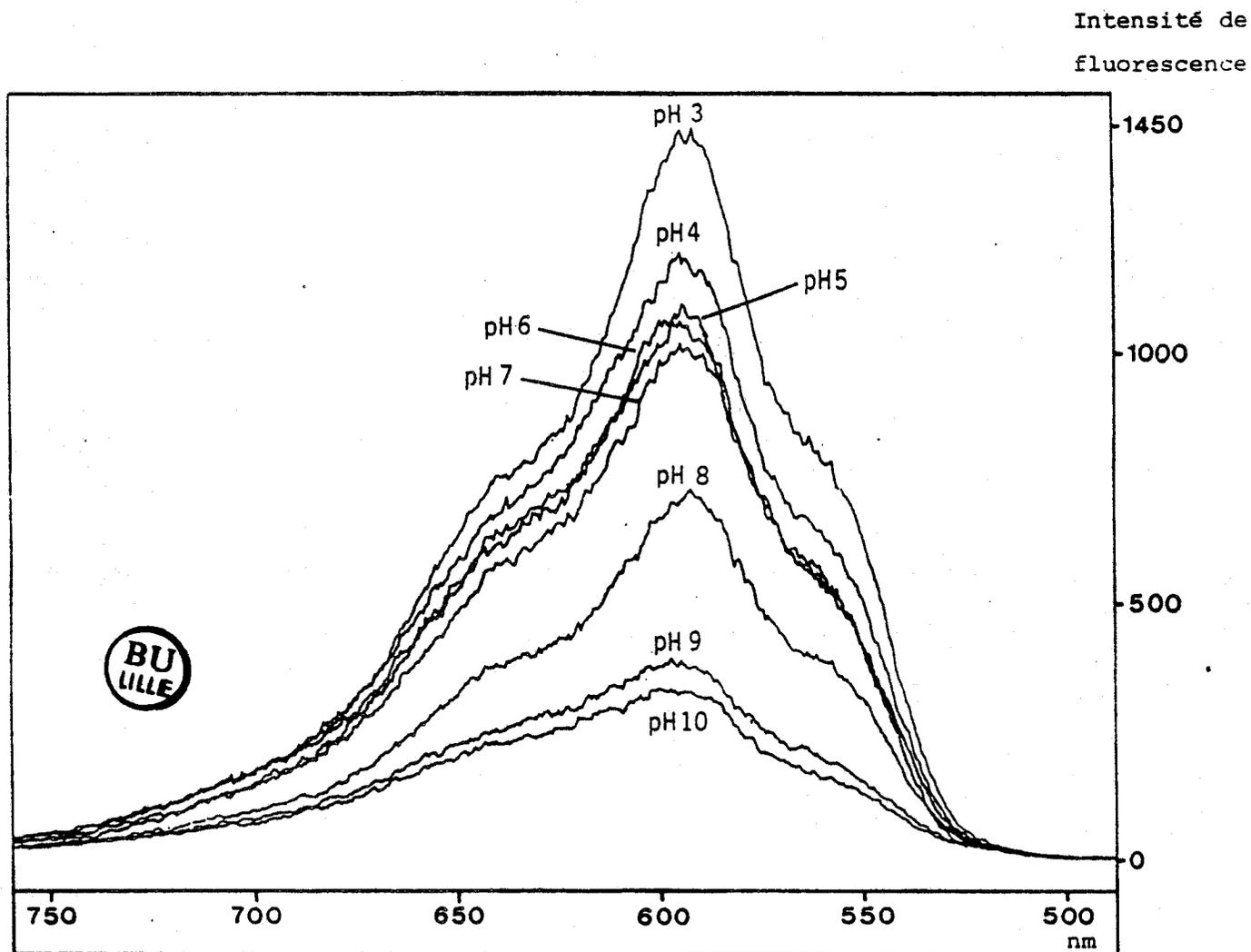


Figure 39

Spectres de fluorescence de la daunorubicine en solution aqueuse ( $2 \times 10^{-5} M$ ) à différents pH, et variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH.

Excitation à 488 nm; puissance LASER = 50  $\mu W$ ; détection multicanale (microfluorimètre); solutions en capillaires; objectif x 50.

TABLEAU X

Variation du rendement quantique de fluorescence de la daunorubicine  
en fonction du pH (solution aqueuse  $2 \times 10^{-5}$  M; absorption mesurée à  
488 nm; fluorescence mesurée à 590 nm après excitation à 488 nm).

	pH							
	3	4	5	6	7	8	9	10
$I_F$ (intensité maximale de fluorescence)	1450	1200	1120	1080	1060	743	400	344
A (densité optique à 488 nm)	0,108	0,111	0,115	0,111	0,111	0,105	0,066	0,021
$Q_F$ (rendement quantique de fluorescence)	0,032	0,025	0,023	0,023	0,022	0,017	—	—



fluorescence de la DNR est quasiment constant dans une large gamme de pH (4 à 7).

Cette étude de l'évolution de la fluorescence de la DNR en fonction du pH est particulièrement importante puisqu'elle montre qu'il est nécessaire de travailler à pH constant ou dans une zone de pH à rendement quantique constant lorsque l'on veut doser la DNR ou ses dérivés en solution. Elle confirme, en outre, la stabilité de la DNR en milieu acide ou neutre, propriété intéressante dans l'étude du comportement intracellulaire de la drogue.

Ces résultats permettent également d'expliquer les difficultés rencontrées lors des étapes de préparation des produits de couplage réalisées à pH basique et pouvant être responsables de l'instabilité des produits obtenus.

## B - Etudes sur les cellules.

Nous avons réalisé différentes expériences, avec la daunorubicine ou la N-leucyldaunorubicine, sur des hépatocytes de Rat isolés (en suspension ou adhérents sur film de collagène) et sur des cellules d'hépatome humain Hep G2, afin de développer la méthodologie de l'étude par microspectrofluorimétrie LASER du mode d'action sur les cellules des produits de couplage DNR - glycoconjugués.

### 1 - Matériel cellulaire.

#### a - Hépatocytes de Rat.

Les hépatocytes isolés de foie de Rat sont obtenus selon une technique voisine de celle de SEGLEN (1976), par perfusion du foie de Rat à la collagénase (Clostridium histolyticum, Sigma). Ces hépatocytes ainsi isolés peuvent être employés en suspension, mais uniquement pendant quelques heures après l'isolement. Aussi, pour augmenter les temps d'incubation et d'observation, nous avons réalisé une "culture primaire" de ces hépatocytes en les faisant adhérer sur un film de collagène. Les hépatocytes ainsi adhérents conservent, en effet, leur capacité d'endocyter les asialoglycoprotéines. Nous remercions B.FLAN

pour la préparation des hépatocytes de Rat et du collagène.

Protocole expérimental:

Le collagène est préparé selon la méthode de REID et coll. (1979), à partir de tendon de queue de Rat, et dialysé contre un tampon neutre. Il est réparti en film soit sur le fond des boîtes de Pétri, soit sur des lamelles déposées au fond des boîtes de Pétri, puis séché et "équilibré" à 37°C avec du milieu MEM (MEM Earle's salts, Gibco) additionné de 10% de sérum de veau nouveau-né (SVNN) et d'antibiotiques.

Les cellules, récupérées après isolement et centrifugation, sont comptées et leur viabilité est estimée par la technique d'exclusion au bleu Trypan. Elles sont ensuite réparties dans les boîtes de Pétri et incubées à 37°C pendant environ 1 h dans du milieu MEM + 10% de SVNN + antibiotiques. Elles sont ensuite lavées et mises à l'étuve à 37°C pour la nuit dans du milieu neuf.

Les incubations sont réalisées, après lavage des cellules, à 37°C, pendant des temps variables, dans du milieu HANK'S, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% de séralbumine bovine, pH = 7,45, avec la daunorubicine ou ses dérivés (concentration exprimée en chlorhydrate de DNR variant de 0,1 à 3 µg/ml). Après incubation, les cellules sont lavées et observées soit immédiatement sans autre traitement, soit après fixation au formol (5 minutes, formol à 3,7% dans le milieu HANK'S, 2 mM CaCl<sub>2</sub>).

b - Cellules Hep G2.

Les cellules Hep G2, lignée cellulaire établie par ADEN et coll. (1979) à partir d'une biopsie de tumeur de foie humain, ont des caractéristiques morphologiques proches de celles des hépatocytes et possèdent un récepteur des asialoglycoprotéines dont les caractéristiques ont été décrites par SCHWARTZ et coll. (1981a, 1982).

Cette lignée cellulaire Hep G2 a été introduite au laboratoire d'une part pour étudier la cytotoxicité de la DNR et de ses conjugués (cette étude a été menée en parallèle à nos travaux par B.FLAN) et d'autre part, parce qu'en raison de leur aptitude à se multiplier ces cellules constituent un excellent modèle pour l'étude de l'internalisation des

conjugués par l'intermédiaire du récepteur spécifique du galactose.

Les repiquages, l'entretien et la préparation de ces cellules pour nos expériences ont été effectués par M.CONIEZ et O.LABIAU que nous remercions vivement. Les conditions d'utilisation et de culture sont très proches de celles décrites par SCHWARTZ et coll. (1981a).

#### Protocole expérimental:

Deux jours après le repiquage en boîtes Falcon, les cellules Hep G2 sont décollées (Trypsine/EDTA) et réparties en boîtes de Pétri à raison de 0,5 à  $1 \times 10^6$  cellules par boîte, dans 1 ml de milieu de culture DME (Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium, Gibco) additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF), 25 mM HEPES et d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine), et supplémenté en acides aminés.

Après 2 à 4 jours de culture à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu est remplacé par 1 ml de milieu neuf sans antibiotiques. Les incubations avec la daunorubicine ou ses dérivés sont ensuite effectuées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans un tampon de pH 7,35 dont la composition ionique est identique à celle du milieu de culture mais qui ne contient ni antibiotiques, ni SVF, ni rouge de phénol (pour ne pas perturber l'observation en fluorescence). Ce tampon est additionné de 4,5 g/l de glucose et 10 mM HEPES et renferme 2 g/l de bicarbonate de sodium et 1,8 mmol/l d'ions Ca<sup>2+</sup>. Il est également employé pour les lavages des cellules avant et après incubation.

Après incubation, les cellules peuvent être observées sans autre traitement en fluorescence si l'on veut détecter et localiser les produits ou en enregistrer le spectre intracellulaire. Il est également possible de traiter les cellules par un mélange HCl 0,3N / éthanol 50% ou par un tampon contenant du SDS si l'on veut enregistrer le spectre de fluorescence à partir d'une quantité plus élevée de cellules afin d'augmenter les possibilités de détection, ou réaliser des cinétiques d'internalisation de la DNR et des conjugués dans les cellules Hep G2 par mesure de la fluorescence cellulaire.

Dans le cas du traitement des cellules par HCl/ éthanol, nous avons utilisé parfois des cellules mises en culture dans des plaques Microtest

à raison de 100000 cellules / puits / 0,2 ml de milieu.

## 2 - Mise en évidence de la fluorescence cellulaire.

La fluorescence émise par la daunorubicine ou ses dérivés dans les hépatocytes de Rat ou les cellules Hep G2 peut être détectée et localisée par microspectrofluorimétrie LASER de différentes manières.

Deux difficultés majeures ont été rencontrées lors des études en fluorescence des cellules:

- d'une part, la détection de concentrations très faibles de composé fluorescent dans une cellule possédant une fluorescence intrinsèque,
- d'autre part, les contraintes imposées par l'étude d'un matériel vivant qui ne doit subir aucune détérioration (séchage, photoblanchiment\* local).

Les préparations peuvent être observées en éclairage ponctuel (longueur d'onde d'excitation: 488 nm) à l'objectif x 32 LF (longue frontale) entre lame et lamelle, par exemple, ou à l'objectif x 100 à immersion à eau plongeant directement dans le tampon recouvrant les cellules dans la boîte de Pétri.

Cette dernière technique permet de collecter plus de lumière et de préserver les cellules de la dégradation sous irradiation LASER en limitant l'échauffement de la préparation et l'évaporation du tampon.

En associant à cet éclairage ponctuel le mode d'utilisation "image" de la microsonde MOLE, le monochromateur à réseaux étant calé sur la longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence du produit étudié, le détecteur d'image (intensificateur photoélectrique d'images couplé à une caméra de télévision S.E.C.) fournit la répartition du composé fluorescent dans le champ du microscope. La comparaison de l'image de fluorescence du champ observé avec l'image de référence obtenue par éclairage en lumière blanche par transmission donne la localisation du composé fluorescent dans les cellules observées (Planche I;p.144).

Pour cette technique d'imagerie de fluorescence, le pouvoir séparateur du microscope n'est pas modifié (1 micromètre) et la

\*: Traduction du terme anglais: Photobleaching.



A



B

PLANCHE I

Observation à la microsonde MOLE (objectif x 160, à sec) de cellules incubées avec un dérivé de daunorubicine

A - Image de référence obtenue par éclairage en lumière blanche par transmission

B - Image de fluorescence du même champ d'observation

Eclairage LASER à Argon de puissance quelques mW;  $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ ; monochromateur à réseaux calé sur  $\lambda_F = 595,5 \text{ nm}$ .

profondeur de champ est de 1 à 10 micromètres.

Remarque:

L'observation directe au microscope (comparable à l'observation au microscope à fluorescence classique, mais bénéficiant de l'irradiation LASER) est possible à la microsonde MOLE en utilisant par exemple l'objectif x 100 à immersion à eau (Planche IIA;p.146) ou l'objectif x 32 à éclairage annulaire (LASER à faisceau tournant dont la puissance est de quelques centaines de mW; Planche IIB;p.146).

Dans les hépatocytes de Rat (isolés ou sur collagène) et les cellules d'hépatome Hep G2, la daunorubicine et la N-leucyldaunorubicine semblent s'accumuler rapidement dans le noyau. La fluorescence nucléaire observée est intense (pour des concentrations initiales de DNR égales ou équivalentes à quelques µg/ml de milieu d'incubation) comparée à celle du cytoplasme qui s'atténue très rapidement sous l'effet de l'irradiation. La fluorescence du noyau semble plus "résistante" au photoblanchiment que celle du cytoplasme. De même, la fluorescence des cellules fixées est moins sensible au photoblanchiment que celle des cellules vivantes. Il est d'ailleurs possible d'enregistrer des courbes de décroissance de l'intensité de fluorescence en fonction du temps.

3 - Enregistrement de spectres de fluorescence intracellulaire.

La décroissance rapide de la fluorescence cellulaire sous irradiation LASER observée à la microsonde MOLE (mode spectre, éclairage ponctuel) au cours du balayage du spectre et gênante pour un enregistrement correct peut être limitée en utilisant un faisceau LASER focalisé mais fortement atténué (puissance = 0,1 mW) permettant l'obtention de spectres reproductibles.

D'autre part, l'emploi de l'objectif x 100 à immersion à eau améliore les conditions d'observation des cellules (effet de protection du tampon) et augmente la précision de la mesure par focalisation du faisceau LASER en un point précis d'un compartiment cellulaire (noyau, cytoplasme).



PLANCHE IIA

Observation directe au microscope de la fluorescence des cellules Hep G2 incubées pendant 1h avec la daunorubicine.  
(Excitation LASER : 488nm, objectif x 100 à immersion; détection: filtre MTO,  $\lambda_{\text{coupure}} = 520\text{nm}$ , film photographique Kodachrome 64 Asa).

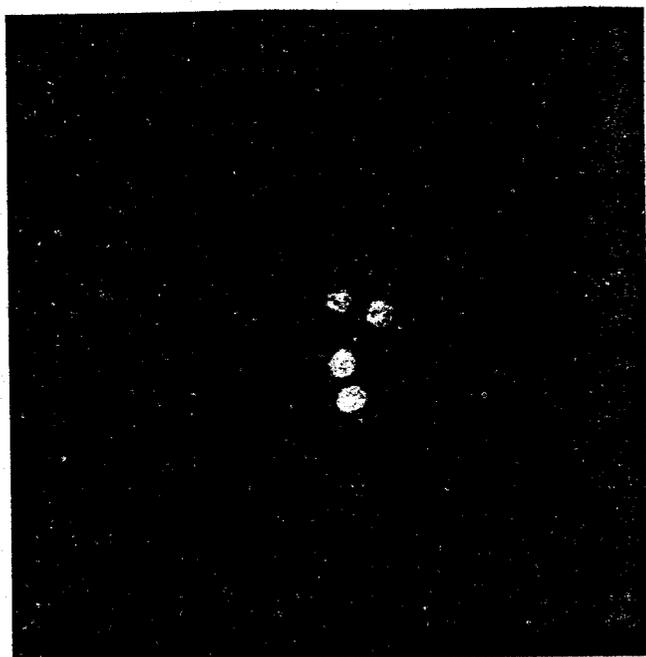


PLANCHE IIB

Observation de la fluorescence obtenue dans les hépatocytes de Rat isolés incubés pendant 3h (en suspension) avec la N-leucyldaunorubicine.  
Excitation LASER à faisceau tournant,  $\lambda_{\text{exc}} = 488\text{nm}$ , objectif x 32 à éclairage annulaire; détection: filtre MTO,  $\lambda_{\text{coupure}} = 520\text{nm}$ , film photographique Agfachrome professional 50L.

Grâce à ces améliorations, nous avons obtenu quelques résultats intéressants à la microsonde MOLE lors de l'étude de cellules traitées avec des concentrations faibles en DNR ou N-leucyldaunorubicine (concentrations de 0,5 à 3 µg DNR /ml) en particulier des spectres de DNR ou de N-leucyldaunorubicine dans le noyau ou dans le cytoplasme d'hépatocytes de Rat (Fig. 40; p.148) et de cellules d'hépatome Hep G2 (Fig. 41; p.149).

Pour des concentrations inférieures à 0,5 µg/ml, il est nécessaire d'augmenter la puissance du LASER. Dans ce cas, l'observation est gênée par un photoblanchiment important et par la présence d'un fond de fluorescence provenant de la cellule elle-même.

Aussi, afin de diminuer les concentrations en composés utilisées pour les incubations sans perdre en détection, nous avons préféré employer par la suite le microfluorimètre LASER beaucoup plus performant que la microsonde MOLE sur le plan de la sensibilité et de la vitesse d'enregistrement des spectres.

L'exemple de spectre de fluorescence enregistré à partir d'une cellule Hep G2, présenté dans la figure 42 (p.150) montre en effet un gain en sensibilité important (concentration initiale en DNR de  $4 \times 10^{-7}$  M = 0,2 µg/ml) avec un temps d'acquisition du spectre très court (12 secondes).

#### 4 - Cinétiques d'internalisation de la daunorubicine par les cellules Hep G2.

Nous avons étudié l'incorporation de la daunorubicine par les cellules d'hépatome Hep G2 par mesure de la fluorescence cellulaire après incubation des cellules avec différentes concentrations en DNR.

##### a - Protocole expérimental.

Les cellules Hep G2 sont incubées dans des boîtes de Pétri (500000 cellules pour 1 ml milieu) à 37°C dans le tampon de pH 7,35 (conditions définies en 1) en présence de concentrations initiales en DNR de 0,5 µg/ml ( $10^{-6}$  M), 1 µg/ml, 2 µg/ml et 4 µg/ml ( $8 \times 10^{-6}$  M).

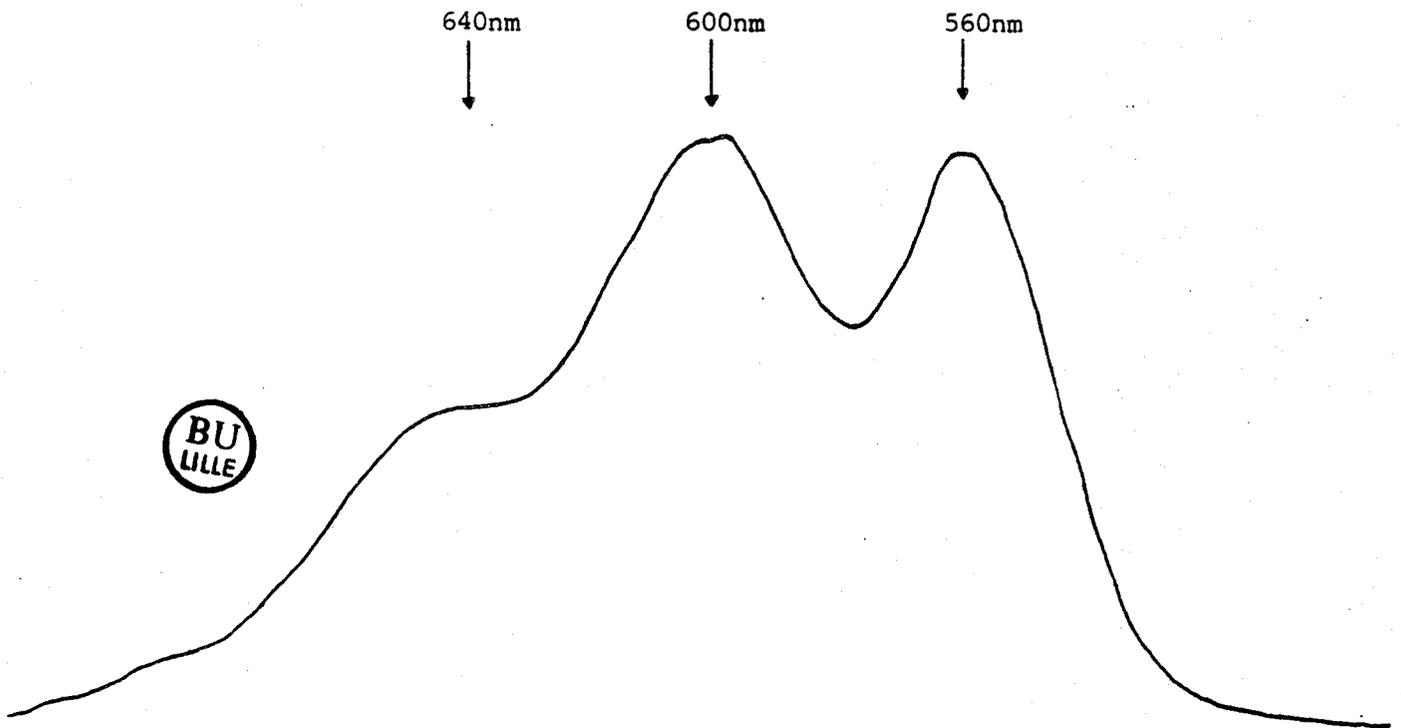


Figure 40

Spectre de fluorescence enregistré au niveau du noyau d'un hépatocyte de Rat incubé pendant 2 h 30 avec de la daunorubicine (concentration:  $5 \times 10^{-6}$  M). Microsonde MOLE,  $\lambda_{exc.} = 488$  nm, puissance LASER: quelques mW, objectif x 100 à immersion, temps d'enregistrement : 2 minutes.

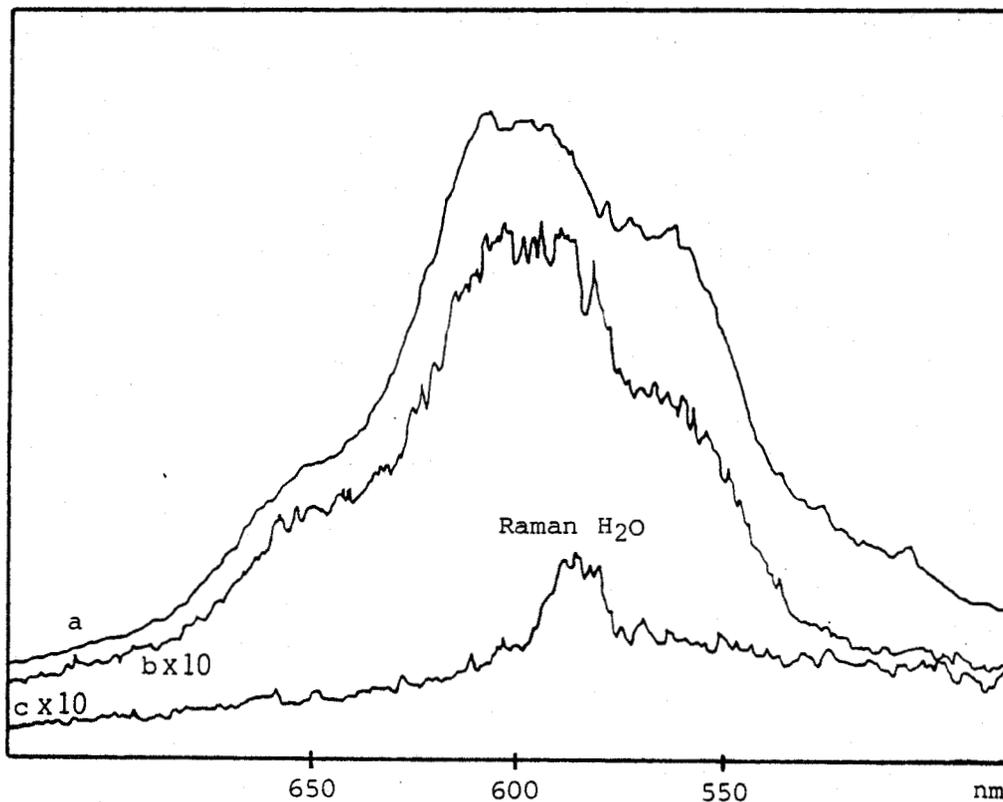


Figure 41

- a - Spectre de fluorescence du noyau d'une cellule HepG2 incubée pendant 2h à 37°C avec la DNR (concentration dans le milieu d'incubation:  $10^{-6}$ M)
- b - Spectre de fluorescence du cytoplasme de la même cellule
- c - Spectre de fluorescence du cytoplasme ou du noyau d'une cellule Hep G2 témoin non traitée.

Détection monocanale (microsonde MOLE), excitation à 488nm, puissance LASER: 1mW, objectif x100 à immersion, temps d'enregistrement des spectres: 2 min..

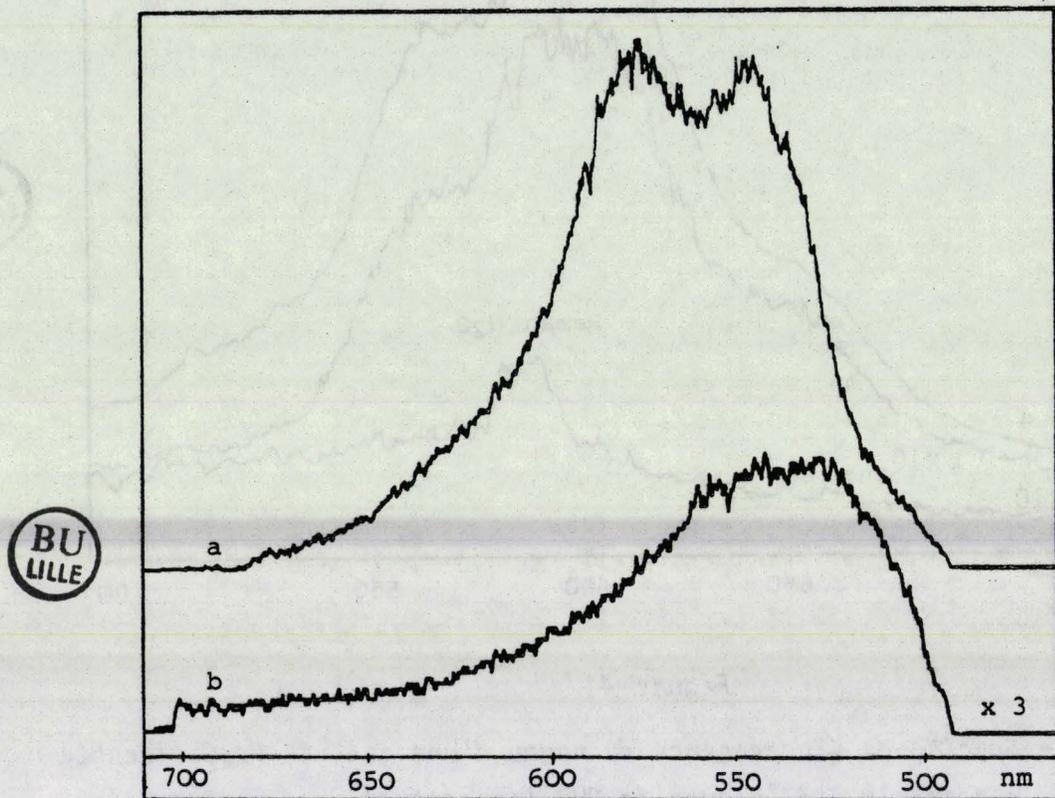


Figure 42

Spectres de fluorescence enregistrés au niveau du noyau de cellules vivantes d'hépatome (cellules Hep G2)

a - cellule incubée pendant 1h30 avec la daunorubicine  
(concentration:  $4 \times 10^{-7}$  M dans le milieu d'incubation)

b - cellule témoin non traitée

Excitation à 488 nm; puissance LASER = 160  $\mu$ W; détection multicanale: 1024 diodes; temps d'intégration: 0,3 sec.; nombre d'accumulations = 20 (a), 50 (b); temps d'acquisition des spectres = 12 sec.(a), 30 sec.(b); obj.x100 à immersion, temps d'illumination des cellules = 6 sec.(a), 15 sec.(b).

Après des temps d'incubation variables (5 min à 1 h), les cellules sont lavées et récupérées par grattage des boîtes dans le tampon de pH 7,35. Après centrifugation (10 min à 1500 rpm), les surnageants sont écartés et les culots cellulaires repris par 10  $\mu$ l d'eau distillée et soumis à 5 cycles de congélation/ décongélation. Ils sont ensuite repris par 20  $\mu$ l de tampon TRIS 0,125M/ HCl pH 6,8, additionné de 4,6% de SDS, et portés à 37°C pendant 3h puis conservés à température ambiante jusqu'à la mesure en fluorescence (microfluorimètre LASER).

Les spectres de fluorescence sont enregistrés à partir des "lysats" observés en capillaire et les intensités de fluorescence au maximum d'émission (590 nm) sont notées. Le volume total des culots traités est mesuré puis les protéines cellulaires sont dosées, après précipitation à partir des culots par l'acide trichloracétique, par une technique dérivée de la méthode de LOWRY (1951). On détermine alors l'intensité maximale de fluorescence ( $I_F$ ) par mg de protéines. Par comparaison avec les  $I_F$  obtenues à partir d'une gamme témoin de DNR dans le mélange TRIS/HCl, SDS, on détermine la quantité de DNR retrouvée par mg de protéines cellulaires, puis le nombre de nanomoles de DNR incorporées par mg de protéines cellulaires.

#### b - Résultats.

Les droites représentées sur la figure 43 (p. 152), montrant l'incorporation de DNR en fonction du temps et de la concentration initiale, ont été déterminées et tracées à partir des moyennes des valeurs expérimentales obtenues lors de quatre expériences différentes.

La quantité maximale de daunorubicine incorporée en 1 heure à 37°C par les cellules Hep G2 est de 5 nanomoles par mg de protéines cellulaires, pour une concentration initiale de DNR dans le milieu d'incubation de  $8 \times 10^{-6}$  M (4  $\mu$ g/ml). Dans la gamme de concentrations initiales utilisées (0,5 à 4  $\mu$ g/ml), la capture de la DNR par les cellules Hep G2 est directement liée à sa concentration dans le milieu d'incubation. La pénétration de la DNR semble donc s'effectuer selon un processus passif similaire à la diffusion simple. Le modèle de la diffusion passive a par ailleurs été suggéré par différents auteurs pour la capture cellulaire des anthracyclines (SIEGFRIED et coll. (1985), BATES et coll. (1985)).

nanomoles DNR/  
mg protéines

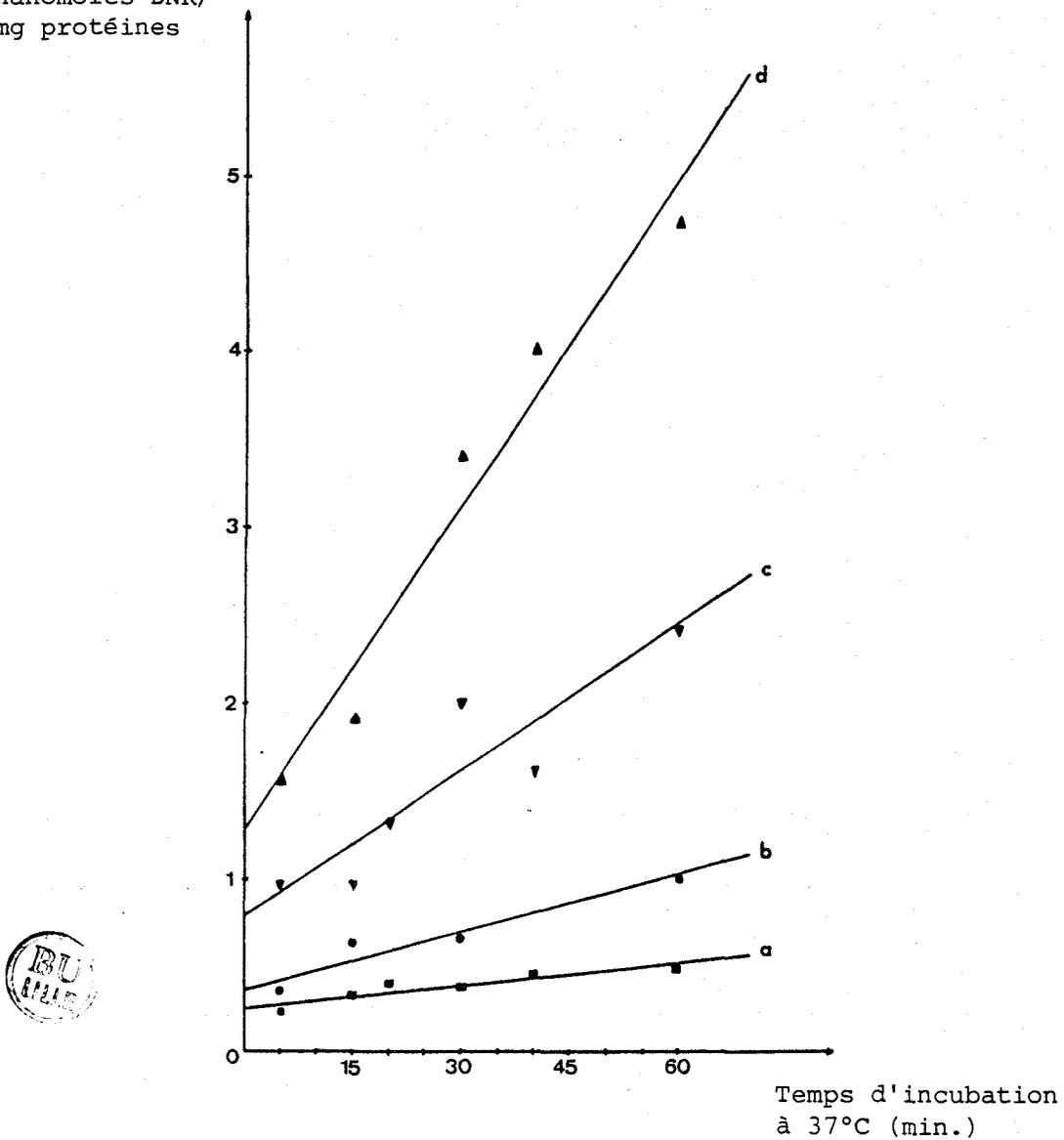


Figure 43

Incorporation de la DNR par les cellules Hep G2 à 37°C en fonction du temps et de la concentration initiale en DNR (mesure au microfluorimètre LASER après traitement des cellules par TRIS/SDS)

a -  $c_i = 0,5 \mu\text{g/ml}$  ( $10^{-6}\text{M}$ ); droite de régression  $y = 0,004x + 0,247$   
(coefficient de corrélation  $r = 0,927$ )

b -  $c_i = 1 \mu\text{g/ml}$  ( $2 \times 10^{-6}\text{M}$ );  $y = 0,01x + 0,353$  ( $r = 0,963$ )

c -  $c_i = 2 \mu\text{g/ml}$  ( $4 \times 10^{-6}\text{M}$ );  $y = 0,026x + 0,783$  ( $r = 0,909$ )

d -  $c_i = 4 \mu\text{g/ml}$  ( $8 \times 10^{-6}\text{M}$ );  $y = 0,061x + 1,275$  ( $r = 0,979$ )

C - Etude de l'interaction de la daunorubicine avec l'ADN par polarisation de fluorescence.

1 - La polarisation de fluorescence.

En solution aqueuse, seules les substances faiblement fluorescentes présentent une forte polarisation. Cependant, si l'on travaille dans des conditions de viscosité plus élevée, il est possible pour des substances fortement fluorescentes d'observer une polarisation importante.

En effet, dans une solution fluide, les molécules excitées ont le temps, pendant leur durée de vie après excitation, de se réorienter dans une position quelconque. Ainsi, si l'on excite une solution diluée d'un produit fluorescent à l'aide d'une lumière polarisée, on observera dans les conditions précédentes une émission de fluorescence non polarisée. Par contre, si la viscosité de la solution est élevée, la molécule excitée ne pourra plus se réorienter totalement pendant sa durée de vie et l'on peut alors observer des polarisations assez fortes.

Une formule permet de relier la polarisation de fluorescence d'une solution quelconque à trois constantes caractérisant les propriétés intrinsèques des molécules fluorescentes. Cette formule ("loi de Perrin") peut s'écrire:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left( \frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left( 1 + \frac{RT\tau}{V\eta} \right)$$

avec P: taux de polarisation

$P_0$ : polarisation fondamentale

$\tau$ : durée de vie moyenne de l'état excité

$\eta$ : viscosité

V: volume moléculaire.

Lorsqu'on irradie une substance fluorescente par une lumière polarisée (à l'aide d'un polariseur p), l'émission de fluorescence analysée est captée derrière un second polariseur p'. Si p' est orienté parallèlement à p, on enregistre une intensité de fluorescence I//. Si p'

est orienté perpendiculairement à  $p$ , on enregistre une intensité de fluorescence  $I_{\perp}$ . On définit alors le taux de polarisation de l'émission de fluorescence  $P$  en fonction des intensités d'émission de fluorescence captées:

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}$$

## 2 - Application à la daunorubicine.

Les mesures de polarisation de fluorescence peuvent apporter des informations concernant les interactions moléculaires.

En effet, de même qu'il existe une diminution du mouvement de rotation d'un composé fluorescent comme la daunorubicine en solution visqueuse, on devrait observer lorsque la DNR est liée à l'ADN une modification du taux de polarisation de fluorescence. Le but de nos expériences est donc de rechercher si l'interaction de la DNR avec l'ADN peut modifier son taux de polarisation de fluorescence.

Nous ne présentons ici que quelques expériences préliminaires dont le but est de contribuer à la mise au point des études futures par polarisation de fluorescence des interactions de la DNR libre ou couplée avec l'ADN, d'abord en solution puis dans le noyau des cellules Hep G2 elles - mêmes.

L'enregistrement des spectres de fluorescence et les mesures de polarisation de fluorescence de la DNR en interaction avec l'ADN ont été réalisées au microfluorimètre LASER. Deux expériences ont été faites: l'une avec une concentration en DNR constante, dans des conditions voisines de celles décrites par PLUMBRIDGE et BROWN (1977), l'autre avec une concentration en ADN constante.

De manière générale, les résultats obtenus concordent et sont en faveur de la modification du taux de polarisation de fluorescence de la DNR par interaction avec l'ADN.

Dans la première expérience, les mesures sont faites à partir d'une solution  $2,5 \times 10^{-6}$  M de DNR dans un tampon TRIS 0,008M/ HCl, 0,05M NaCl pH 7 (tampon utilisé par PLUMBRIDGE et BROWN (1977)). Des résultats tout à fait similaires sont obtenus si la DNR est en solution dans  $\text{NaClO}_4$   $10^{-2}$  M selon les conditions employées par MANFAIT (1981).

Des quantités variables d'ADN (ADN de thymus de veau, Koch-Light laboratories) sont ajoutées de manière à faire varier le rapport du nombre de nucléotides sur le nombre de moles de DNR ( $r$ ) de 100 à 10000. La concentration en ADN dans les solutions analysées varie ainsi de 0,07 à 7 mg/ml.

Les spectres de fluorescence de la DNR libre et en présence d'ADN ont été enregistrés (microfluorimètre, excitation à 488 nm, puissance LASER = 50  $\mu$ W, objectif x 50, solutions en capillaire). On note une diminution de l'intensité de l'émission de fluorescence quand la DNR interagit avec l'ADN, lorsque  $r$  est inférieur à 1000.

En ce qui concerne les mesures de polarisation, le tableau XI (p.156) réunit les valeurs d'intensité maximale de fluorescence  $I_{//}$  et  $I_{\perp}$  mesurées et le taux de polarisation  $P$  calculé à partir de ces valeurs. Pour la DNR seule (solution  $2,5 \times 10^{-6}$  M soit 1,4  $\mu$ g/ml) le taux de polarisation est inférieur à 0,1 et on note une augmentation du taux de polarisation  $P$  quand  $r$  augmente.

Un problème se pose cependant quant à l'allure des spectres de fluorescence avec  $r$  élevé car une forte composante due à l'ADN, dont la concentration devient très élevée (7 mg/ml pour le rapport 10000), apparaît alors et modifie le spectre. C'est pourquoi, nous avons repris cette expérience en conservant cette fois une concentration en ADN constante (1 mg/ml, dans le tampon TRIS 0,008M/ HCl, 0,05M NaCl, pH 7) et en faisant varier la concentration en DNR.

Le rapport  $r$  (nombre de nucléotides/ nombre de moles de DNR) varie de 25 à 2500 et la concentration en DNR de 0,76  $\mu$ g/ml (pour le rapport  $r = 2500$ ) à 76  $\mu$ g/ml (pour  $r = 25$ ).

Nous avons suivi l'évolution du spectre de fluorescence de la DNR et de son intensité en fonction de l'interaction avec l'ADN. Nous avons

TABLEAU XI

Variation du taux de polarisation de fluorescence de la daunorubicine par interaction avec l'ADN.

Concentration en daunorubicine constante ( $2,5 \times 10^{-6}$  M soit 1,4  $\mu$ g/ml)

			(r)				DNR seule ( $2,5 \times 10^{-6}$ M)
	100	500	2500	5000	10000		
I//	156	198	323	334	486		1295
I $\perp$	107	124	203	206	289		1067
P = $\frac{I// - I\perp}{I// + I\perp}$	0,186	0,229	0,228	0,237	0,254		0,096



Concentration en ADN constante (1 mg/ml)

			(r)				DNR equiv. r=25 76 $\mu$ g/ml	DNR equiv. r=250 7,6 $\mu$ g/ml
	25	50	100	250	1000	2500		
I//	2112	1300	745	261	62	20	5992	1844
I $\perp$	1536	916	523	182	40	13	5228	1614
P	0,157	0,173	0,175	0,178	0,216	0,224	0,068	0,066

(r) = nombre de nucléotides/nombre de moles de DNR; microfluorimètre LASER, excitation à 488 nm, puissance LASER = 50  $\mu$ W, objectif x 50, solutions en capillaires.

observé, comme dans l'expérience précédente, une forte diminution de l'intensité de fluorescence quand la DNR interagit avec l'ADN pour les valeurs de  $r$  faibles (25 à 500). Pour les valeurs de  $r$  plus élevées (1000 à 2500), l'intensité maximale de fluorescence de la DNR libre ou liée à l'ADN a le même ordre de grandeur. Ce résultat, également obtenu dans les conditions expérimentales précédentes (concentration en DNR constante et concentration en ADN variable) pourrait traduire une interaction différente de la DNR avec l'ADN selon la valeur de  $r$ .

Il n'y a pas de variation significative de l'allure générale du spectre de fluorescence de la DNR libre ou en interaction avec l'ADN. Cependant, on note un déplacement vers les longueurs d'onde plus élevées (effet bathochrome) lors de l'interaction DNR/ADN (Fig. 44; p.158). Un déplacement analogue vers les hautes longueurs d'onde, accompagné d'une baisse d'intensité de fluorescence, a été observé pour une autre anthracycline: l'adriamycine, lorsqu'elle interagit avec l'ADN (GINOT (1985); MANFAIT (1981)).

En polarisation de fluorescence, on ne note aucune variation de l'allure du spectre et des intensités relatives des trois bandes selon l'une ou l'autre des orientations du polariseur (parallèle ou perpendiculaire), pour la DNR seule ou liée à l'ADN. En revanche, on remarque le même déplacement du spectre vers les valeurs élevées de longueur d'onde pour la DNR liée à l'ADN par rapport à la DNR seule.

On observe en outre une variation des intensités de l'émission de fluorescence selon la direction du polariseur ( $I//$  ou  $I\perp$ ) quand la DNR interagit avec l'ADN, qui se traduit par une augmentation du taux de polarisation (voir figure 45; p.159 et tableau XI; p.156).

L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'une modification de la polarisation de fluorescence de la DNR par interaction avec l'ADN et nous permettent d'espérer, en améliorant les conditions d'études (en particulier en ce qui concerne le problème des concentrations en ADN et DNR à employer), tirer parti de cette modification pour étudier les possibilités d'interaction avec l'ADN de la DNR couplée (au lactose ou aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde) dans un premier temps en solution, puis dans la cellule.

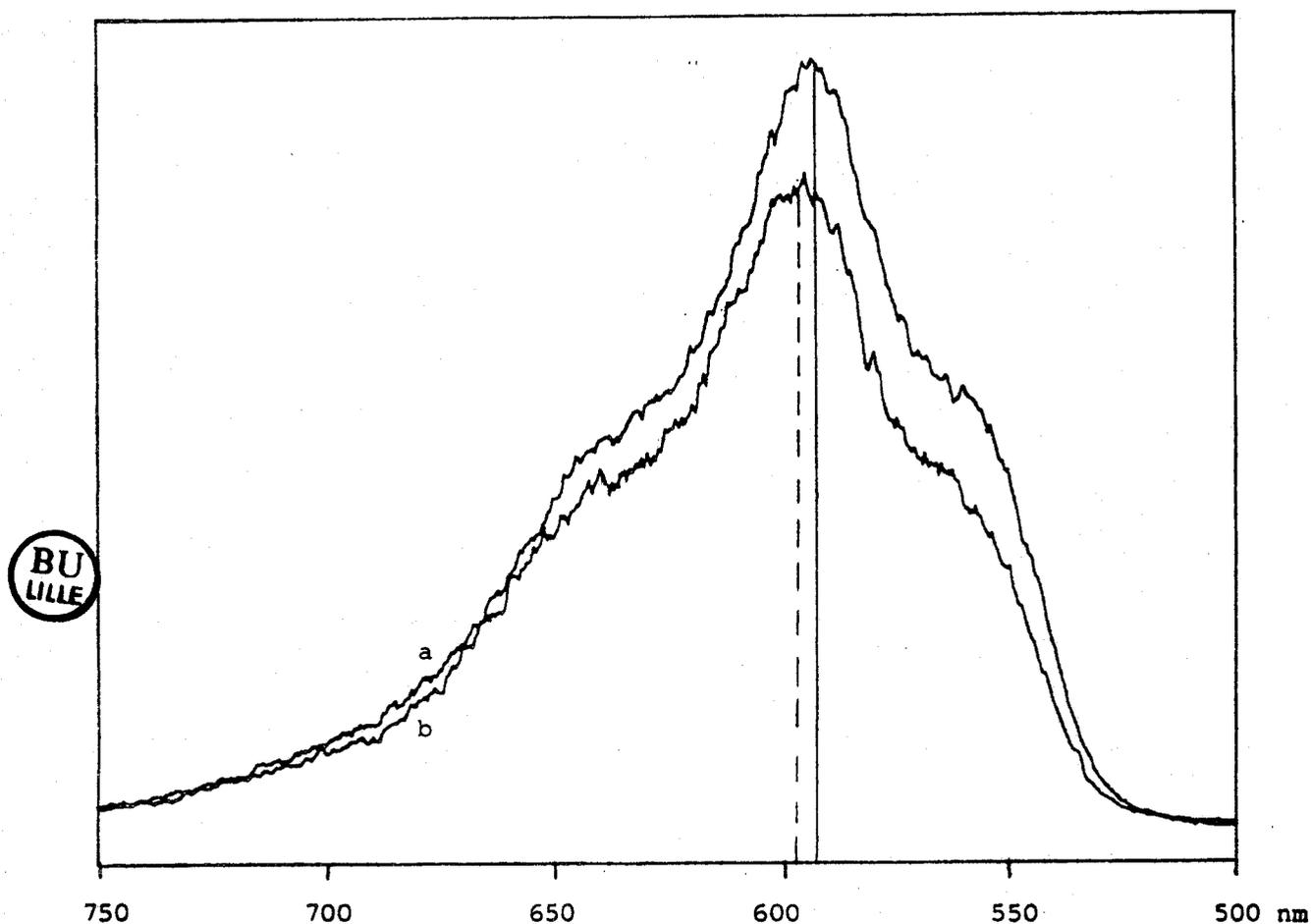


Figure 44

Spectres de fluorescence de la daunorubicine libre (a) ou en interaction avec l'ADN (b) en solution.

Microfluorimètre LASER de puissance 50  $\mu$ W,  $\lambda_{exc.} = 488$  nm; solutions observées en capillaire, objectif x 50;  $n = 50$ ; concentration en ADN = 1mg/ml dans le tampon TRIS 0,008M/ HCl, 0,05M NaCl pH 7; concentration en DNR = 38  $\mu$ g/ml.

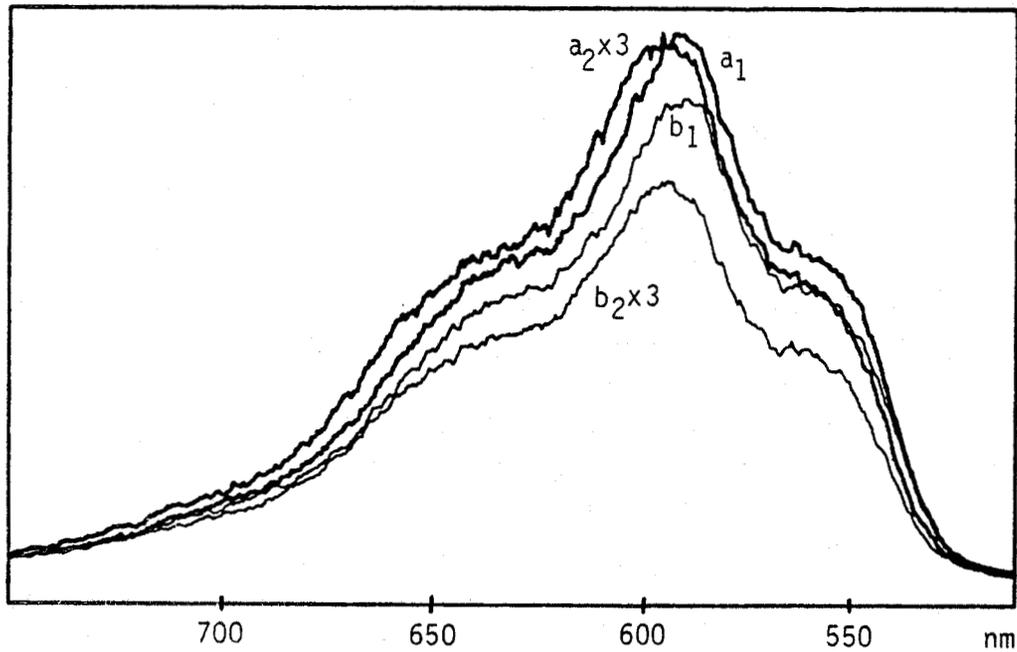


Figure 45

Spectres d'émission de fluorescence de la DNR libre ( $a_1, b_1$ ) ou en interaction avec l'ADN ( $a_2, b_2$ ), en polarisation de fluorescence

$a_1$  et  $a_2$ - orientation parallèle du polariseur ( $I //$ )

$b_1$  et  $b_2$ - orientation perpendiculaire du polariseur ( $I \perp$ )

Microfluorimètre:  $\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$ , puissance LASER =  $50 \mu\text{W}$ , solutions observées en capillaire, objectif x50;  $r=25$ , concentration en ADN =  $1 \text{ mg/ml}$ . concentration en DNR =  $76 \mu\text{g/ml}$ .

## CONCLUSION

Ayant choisi de tirer parti des propriétés de fluorescence de la DNR pour analyser ses produits de couplage aux glycoconjugués et étudier son interaction avec les hépatocytes de Rat et les cellules d'hépatome Hep G2, nous avons mis au point une méthode rapide, sensible et non destructive fondée sur l'application de la microspectrofluorimétrie LASER à l'analyse d'échantillons microscopiques.

Nous avons eu recours à deux instruments conçus à Lille (laboratoire de Spectrochimie Infra-Rouge et Raman de l'Université de Lille I, Société DILOR, G.I.P. Instrumentation et Spectrométrie): la microsonde MOLE et le microfluorimètre LASER à détection multicanale, capables de détecter et d'analyser une quantité très faible de composé fluorescent dans un microéchantillon (microvolume de solution ou compartiment cellulaire, par exemple).

Un certain nombre de problèmes liés à l'analyse d'échantillons biologiques fragiles ont été résolus et différentes études sur des cellules ont été abordées, sans détérioration du matériel vivant observé et en utilisant des doses de drogue faibles afin de se rapprocher de celles utilisées en thérapeutique.

Les travaux présentés dans ce chapitre portent sur la daunorubicine, elle - même. Nous nous sommes intéressée à son comportement fluorescent en solution dans différentes conditions. Les résultats obtenus concernent la détermination du rendement quantique de fluorescence de la DNR, l'évolution de sa fluorescence en fonction du pH ou de l'interaction avec l'ADN, la mise en évidence d'une modification de la polarisation de fluorescence de la DNR par interaction avec l'ADN. Nous avons également étudié son internalisation dans les hépatocytes de Rat et les cellules d'hépatome Hep G2. Dans ces cellules, la DNR s'accumule rapidement dans le noyau. Son incorporation par les cellules Hep G2 semble s'effectuer selon un processus passif dépendant de sa concentration initiale dans le milieu d'incubation.

L'ensemble de ces mises au point techniques et de ces résultats ont été déterminants lors des études ultérieures menées avec les produits de couplage daunorubicine - vecteurs eux - mêmes.

### CHAPITRE III

## RESULTATS DES ETUDES DE CIBLAGE PAR GLYCOSYLATION

### EXPERIMENTATION IN VITRO

#### INTRODUCTION

A l'aide des techniques de microfluorimétrie LASER précédemment mises au point avec la daunorubicine elle-même, nous avons abordé l'étude de l'internalisation par les cellules Hep G2 des produits de couplage de la daunorubicine aux glycoconjugués, afin de tenter de mettre en évidence une différence de mode de pénétration dans les cellules Hep G2 de la daunorubicine glycosylée par rapport à la daunorubicine libre, favorable à l'hypothèse de l'endocytose de la daunorubicine glycosylée par l'intermédiaire du récepteur spécifique du galactose, et d'une modulation de l'internalisation de la DNR.

Nous avons d'autre part recherché in vitro la sensibilité à l'action des enzymes lysosomiques du produit de couplage de la daunorubicine aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde afin d'apporter quelques éléments de réponse au problème de la libération intracellulaire de la drogue ciblée.

En raison des problèmes de détection en fluorescence rencontrés avec les produits de couplage de la daunorubicine à l'asialoorosomucoïde et à ses glycopeptides, nous nous sommes également intéressée à ces glycoconjugués, non couplés à la daunorubicine et marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, dans le but de compléter les expériences réalisées avec le modèle cellulaire.

I - ETUDE DE L'INTERNALISATION PAR LES CELLULES HEP G2 DE LA DAUNORUBICINE GLYCOSYLEE.

A - Conditions expérimentales.

Les expériences de mise en évidence par microfluorimétrie LASER de l'internalisation par les cellules d'hépatome Hep G2 de la daunorubicine couplée aux glycoconjugués (asialoorosomucoïde, glycopeptides de l'asialoorosomucoïde, lactose) ont été réalisées dans les conditions précédemment définies pour la daunorubicine seule (voir Chapitre II, IIB1b).

Après incubation à 37°C en boîtes de Pétri ( $0,5$  à  $1 \times 10^6$  cellules/boîte/ 1 ml de tampon DME), les cellules sont observées directement, sans fixation, en fluorescence pour détecter les produits et en enregistrer le spectre intracellulaire, ou lysées par un mélange HCl 0,3N/ éthanol 50% ou par un tampon TRIS/ HCl contenant du SDS, afin d'enregistrer le spectre de fluorescence d'une quantité plus importante de cellules ou de réaliser des études cinétiques d'incorporation par les cellules Hep G2 de la daunorubicine libre ou couplée, par mesure quantitative de la fluorescence cellulaire.

B - Mise en évidence de la fluorescence cellulaire des produits de couplage de la daunorubicine aux glycoconjugués.

1 - Enregistrement de spectres de fluorescence intracellulaire.

En utilisant l'objectif x 100 à immersion à eau plongeant directement dans le tampon recouvrant les cellules dans la boîte de Pétri, nous avons tenté d'enregistrer le spectre de fluorescence de la daunorubicine et de ses produits de couplage au lactose, aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde, à l'asialoorosomucoïde, dans le noyau ou le cytoplasme des cellules Hep G2 traitées par ces composés.

Les résultats les plus intéressants obtenus par cette technique d'enregistrement direct sur cellule unique concernent les cellules traitées par le composé lactose - DNR.

Après incubation avec les composés lactose - DNR et glycopeptides d'ASOR - bras - DNR (concentration initiale dans le milieu d'incubation équivalente à quelques  $\mu\text{g}$  DNR/ml; temps d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  variant de 1h30 à 6h), les cellules Hep G2 vivantes, non fixées, sont observées en fluorescence à la microsonde MOLE ou au microfluorimètre à détection multicanale.

La figure 46 (p.164) montre le spectre de fluorescence enregistré au niveau du cytoplasme d'une cellule Hep G2 incubée pendant 3h avec le produit de couplage GpASOR - bras - DNR, comparé au cytoplasme d'une cellule témoin. La différence de profil des deux spectres (différence existant aussi pour le noyau mais nettement moins marquée que pour le cytoplasme) indique une pénétration du composé au moins dans le cytoplasme.

Le composé lactose - DNR donne quant à lui une fluorescence cytoplasmique très intense (Fig.47; p.165) mettant en évidence la pénétration intracellulaire du composé. Cependant, cette fluorescence décroît très rapidement. C'est pourquoi ce spectre ne peut être obtenu qu'en employant le microfluorimètre à détection multicanale qui enregistre le spectre en "instantané" (0,5 seconde). La même cellule irradiée pendant 25 secondes (50 accumulations de 0,5 sec.) donne un spectre identique mais dont l'intensité est diminuée d'un facteur 4.

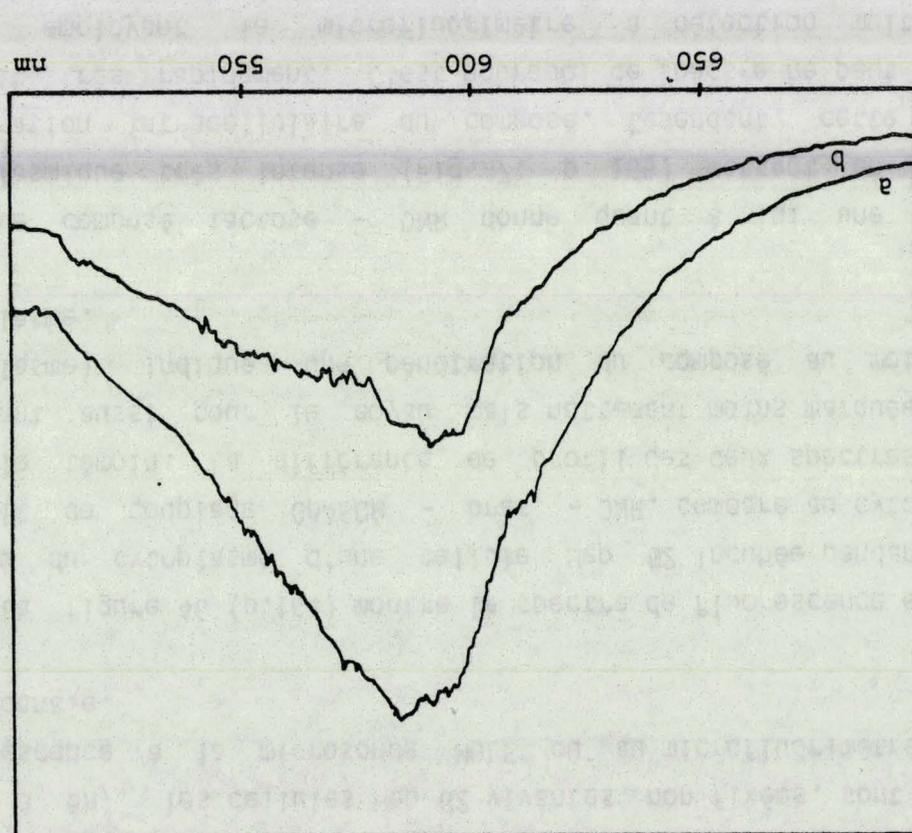
## 2 - Analyse de la fluorescence cellulaire totale.

L'enregistrement direct (sur cellule unique) de spectres de fluorescence intracellulaire s'étant avéré très délicat et difficilement interprétable dans le cas des produits de couplage ASOR - bras - DNR et GpASOR - bras - DNR, nous avons essayé d'augmenter les chances de détection de la fluorescence en réalisant des mesures sur des lysats provenant d'un grand nombre de cellules ( $10^6$ ). Dans ce cas, la fluorescence analysée correspond à la fluorescence cellulaire totale sans distinction entre les différents compartiments.

La première technique que nous avons employée pour lyser les cellules est une méthode de lyse par un mélange HCl 0,3N/ éthanol 50%, qui s'est avérée satisfaisante pour la daunorubicine (quand sa

Spectres de fluorescence enregistrés au niveau du cytoplasme de  
 cellules Hep G2  
 a - cellule incubée pendant 3h à 37°C avec le produit de  
 couplage GpASOR-bras-DNR  
 b - cellule témoin non traitée  
 Observation des cellules à la microsonde MOLE (détection monocale);  
 $\lambda_{exc.} = 488\text{nm}$  à l'objectif x100 à immersion.

Figure 46



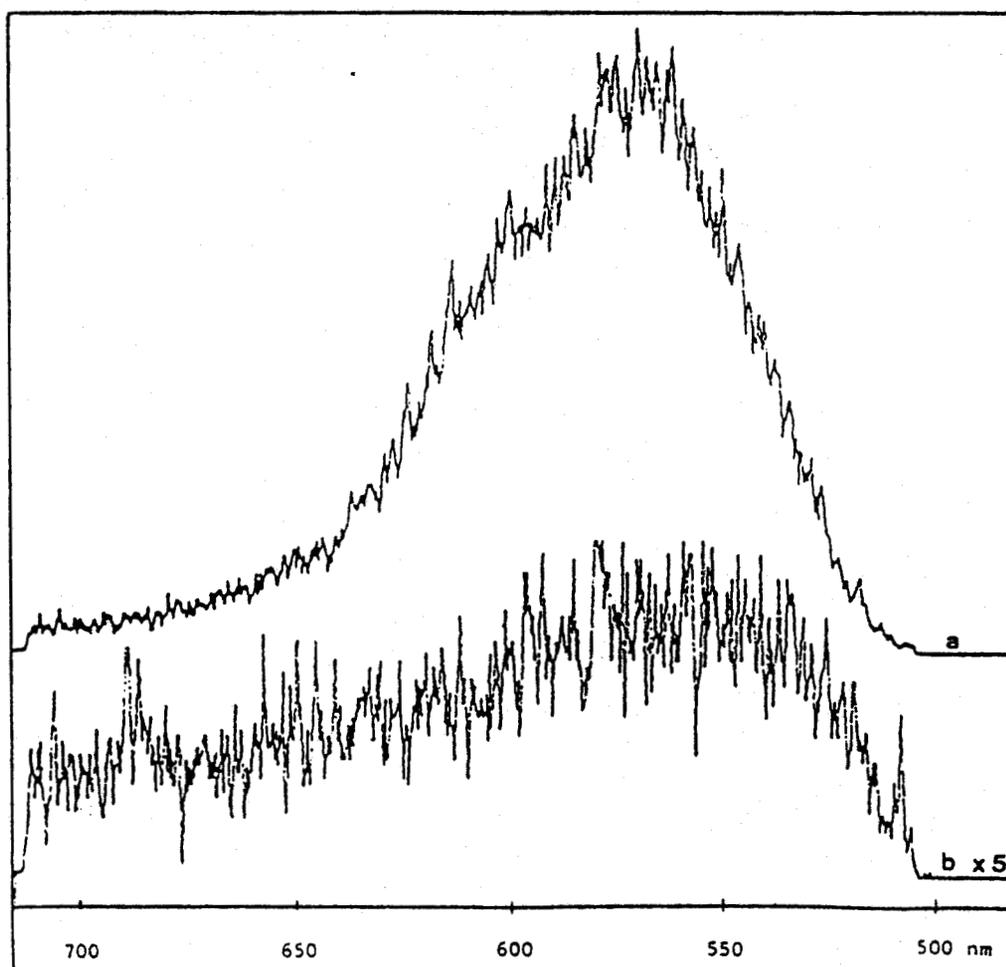


Figure 47

Spectres de fluorescence enregistrés au niveau du cytoplasme de cellules d'hépatome Hep G2

a - cellule incubée pendant 2h à 37°C avec le composé Lactose - DNR

b - cellule témoin non traitée

Microfluorimètre à détection multicanale, Laser de puissance 135  $\mu$ W,  $\lambda_{exc.} = 488$  nm, temps d'acquisition des spectres: 1sec., objectif x 100 à immersion.

concentration initiale dans le milieu d'incubation est faible), la N-leucyl-dànorubicine, le composé bras - DNR et le composé lactose - DNR. Cette technique classique d'extraction des anthracyclines à partir des cellules par un mélange HCl 0,3N/ éthanol 50% a par ailleurs été récemment employée pour l'étude de la capture de l'adriamycine et de morpholinyl- anthracyclines par des cellules tumorales (STREETER et coll. (1986)).

Après incubation à 37°C dans le tampon DME contenant la DNR ou ses dérivés (concentration égale ou équivalente à quelques µg de DNR par ml de milieu d'incubation), les cellules Hep G2 adhérant au fond des boîtes de Pétri sont lavées par le tampon DME, puis recouvertes par 0,25 ml de mélange HCl 0,3N/ éthanol 50% et laissées quelques heures à 4°C. Les surnageants et les culots (dépôts présents au fond des boîtes) sont alors récupérés et analysés en microfluorimétrie LASER, en capillaire pour les surnageants, et déposés sur lame pour les culots.

Dans le cas du composé lactose - DNR, le culot n'est pratiquement pas fluorescent quel que soit le temps d'incubation des cellules avec le composé. Le spectre de fluorescence du surnageant de lyse (Fig. 48A; p.167) est par contre intense et très différent de celui du témoin (cellules non traitées par un composé et lysées par HCl/ éthanol). Ce spectre pourrait correspondre au produit lactose - DNR lui-même. Il est en outre voisin de celui retrouvé avec les lysats de cellules incubées avec la DNR (Fig. 48B; p.167).

Dans le cas des cellules traitées par la DNR couplée à l'ASOR ou à ses glycopeptides, les résultats sont moins satisfaisants car on observe une fluorescence à la fois dans le surnageant et dans le culot de lyse des cellules.

En effet, le surnageant de lyse des cellules incubées à 37°C pendant 3 à 6h avec le composé GpASOR - bras - DNR présente une fluorescence relativement intense dont le spectre diffère de celui des cellules témoins. Sur la figure 49A (p.168), le spectre en pointillés résulte de la soustraction au spectre Aa du spectre témoin Ab. La soustraction permet d'éliminer la bande correspondant au spectre Raman de l'eau. Le spectre obtenu correspond au spectre réel du produit de couplage GpASOR - bras - DNR dans le surnageant de lyse des cellules.

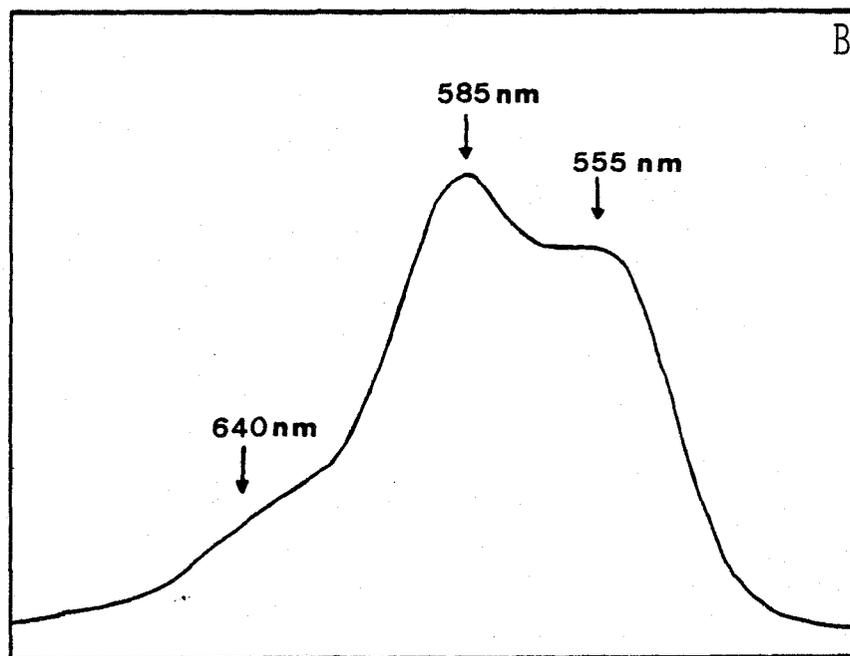
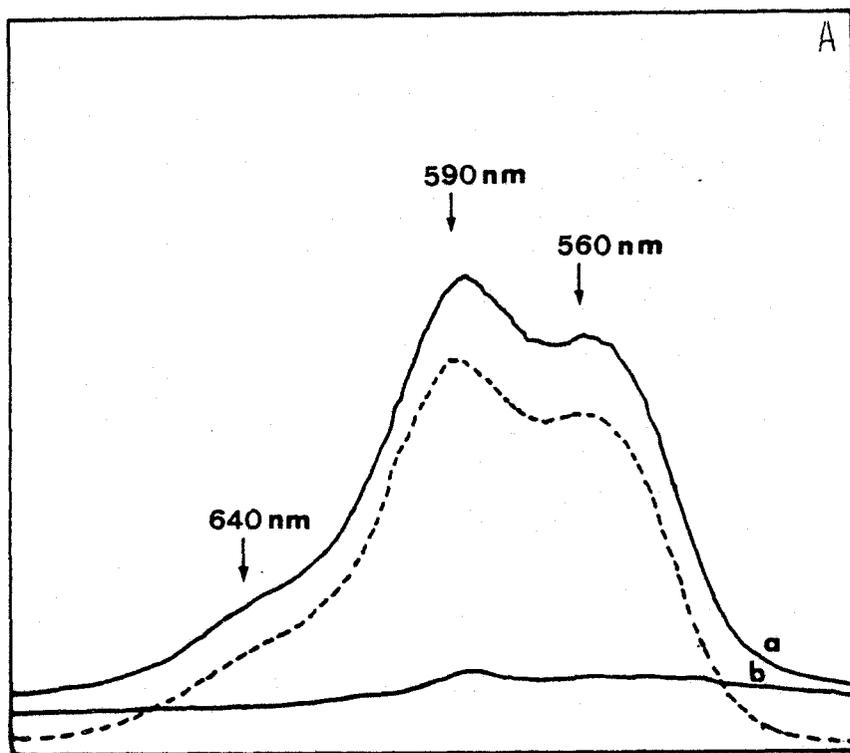


Figure 48

Spectres de fluorescence des surnageants de lyse (HCl/éthanol) des cellules Hep G2

A-a- cellules incubées pendant 3h à 37°C avec le composé Lactose-DNR (concentration équivalente à 2 µgDNR/ml)

b- cellules témoins non traitées

Le spectre en pointillés correspond au spectre réel du composé Lactose-DNR (a-b)

B- cellules incubées pendant 3h à 37°C avec la DNR (1 µg/ml)

Microsonde MOLE (488nm; temps d'acquisition des spectres: 1min.30).

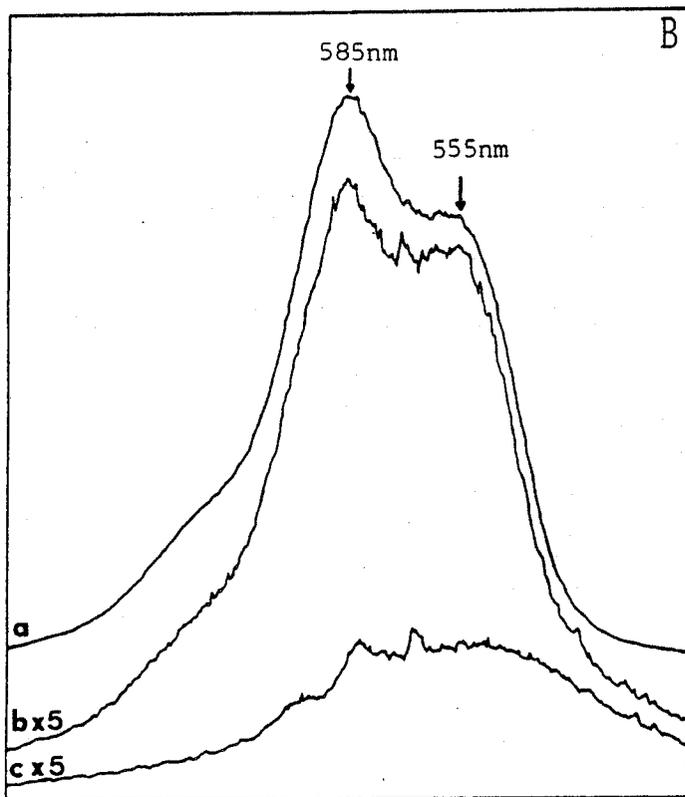
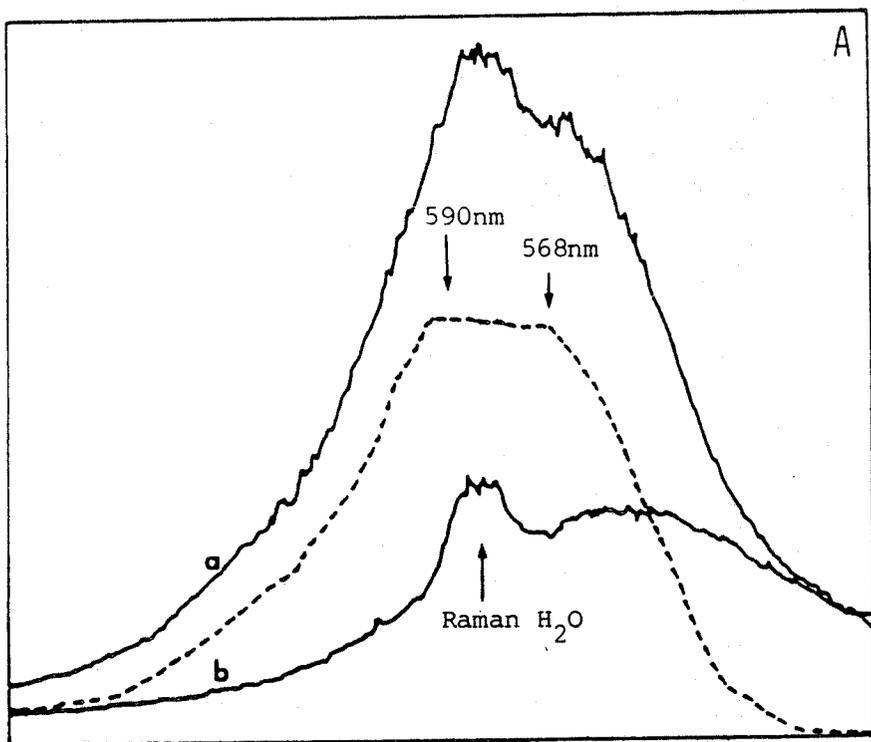


Figure 49

Spectres de fluorescence des surnageants de lyse (HCl/éthanol) des cellules Hep G2

A-a- cellules incubées pendant 6h à 37°C avec le conjugué GpASOR-bras-DNR (concentration équivalente à 2 µgDNR/ml)

b- cellules témoins non traitées

B-a- cellules incubées 2h à 37°C avec la N-leucyl-daunorubicine (concentration équivalente à 0,5 µgDNR/ml)

b- cellules incubées 4h à 37°C avec le composé Bras-DNR (conc. équiv. 2 µgDNR/ml)

c- cellules témoins non traitées

Mêmes conditions d'enregistrement que pour la figure 48.

Cependant, dans les culots de lyse des cellules traitées avec la DNR couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde (GpASOR - bras - DNR), on remarque également une fluorescence intense indiquant une perte par précipitation du produit de couplage avec les débris cellulaires.

Ce phénomène est encore accentué dans le cas des culots de lyse des cellules Hep G2 incubées en présence du composé ASOR - bras - DNR, et suggère une précipitation du produit de couplage lors de la lyse ou son adsorption (ou sa liaison) sur les débris cellulaires empêchant son extraction.

Quant au composé "bras - DNR" dont la masse moléculaire est double de celle de la daunorubicine (environ 1000) et qui comporte à une extrémité un sucre différent du galactose, l'intensité de fluorescence retrouvée dans les surnageants de lyse par HCl/ éthanol des cellules Hep G2 est très inférieure à celle des cellules traitées par la DNR, le composé lactose - DNR ou la N-leucyldaunorubicine (Fig. 49B; p.168). Ceci semble indiquer une pénétration beaucoup moins importante de ce dérivé, soit en raison de sa taille (limite pour une pénétration selon un processus passif), soit en raison de la présence d'un sucre terminal particulier non conforme aux exigences de l'endocytose par l'intermédiaire du récepteur à galactose.

Malgré les difficultés expérimentales rencontrées lors des observations directes sur cellules vivantes et des essais de lyse des cellules Hep G2 par HCl/ éthanol, nos résultats sont en faveur de l'internalisation de la DNR couplée au lactose, à l'asialoorosomucoïde ou à ses glycopeptides. Cependant, afin d'étudier la liaison aux cellules Hep G2 de ces produits de couplage et les paramètres de leur internalisation, des expériences complémentaires à 4°C et des essais d'inhibition (par de l'asialoorosomucoïde) de l'internalisation à 37°C sont indispensables.

C - Etude de l'incorporation par les cellules Hep G2 de la DNR libre ou couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde.

Si la méthode de lyse des cellules Hep G2 par HCl/ éthanol était

intéressante dans le cas du composé lactose - DNR, le choix d'une meilleure technique de lyse s'imposait dans le cas des cellules traitées par la daunorubicine couplée à l'asialoorosomucoïde ou à ses glycopeptides. En effet, lors de la lyse par HCl/ éthanol, la fluorescence se répartit entre le surnageant et le culot ce qui rend impossible toute mesure quantitative. Ce problème est également rencontré lorsque l'on emploie des concentrations élevées en DNR seule dans le milieu d'incubation (concentrations supérieures à 1 µg DNR/ ml).

Ces difficultés nous ont incitée à rechercher une méthode différente pour lyser les cellules et analyser directement l'ensemble de la fluorescence cellulaire.

### 1 - Protocole expérimental.

La méthode que nous avons mise au point consiste à récupérer les cellules, après incubation dans le tampon DME, par grattage dans 0,5 ml de tampon DME (pour  $0,5 \times 10^6$  cellules/ boîte de Pétri). Après centrifugation 10 min à 1500 rpm, les surnageants sont éliminés et les culots cellulaires repris par 10 µl d'eau et soumis à 5 cycles de congélation/ décongélation. Les culots sont ensuite repris par 20 µl de tampon TRIS 0,125M/ HCl pH 6,8, additionné de 4,6% de SDS, portés à 37°C pendant quelques heures et conservés à température ambiante jusqu'à la mesure en capillaire au microfluorimètre LASER.

Après mesure des intensités de fluorescence au maximum d'émission (590 nm) des spectres des lysats, mesure des volumes des lysats et dosage des protéines cellulaires, on détermine l'intensité maximale de fluorescence par mg de protéines cellulaires.

Par comparaison avec les intensités de fluorescence obtenues à partir de gammes témoins de DNR libre et de DNR couplée aux glycopeptides d'ASOR (dont la fluorescence à concentration équivalente est inférieure à celle de la DNR libre) dans le mélange TRIS/ HCl/ SDS, on détermine la quantité de DNR retrouvée (en nanomoles par mg de protéines cellulaires).

### 2 - Résultats.

Les spectres présentés dans la figure 50A (p.171) montrent que, par

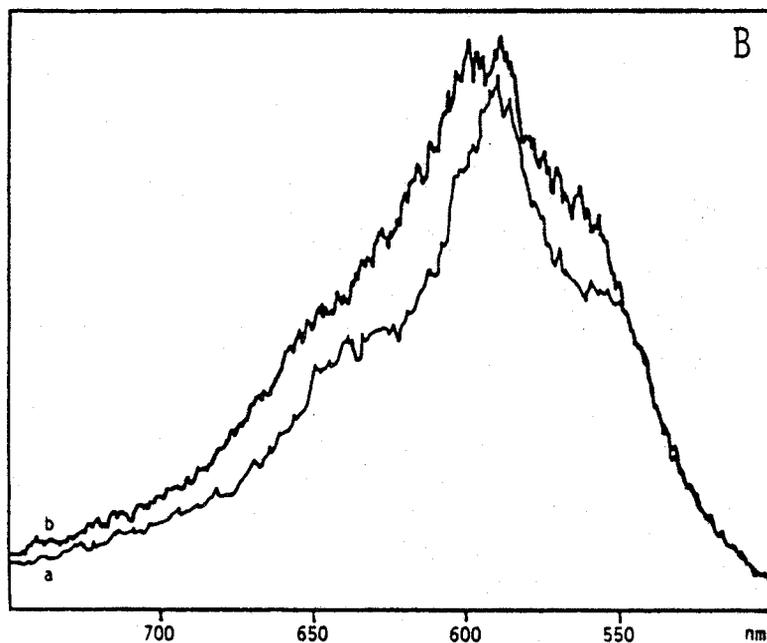
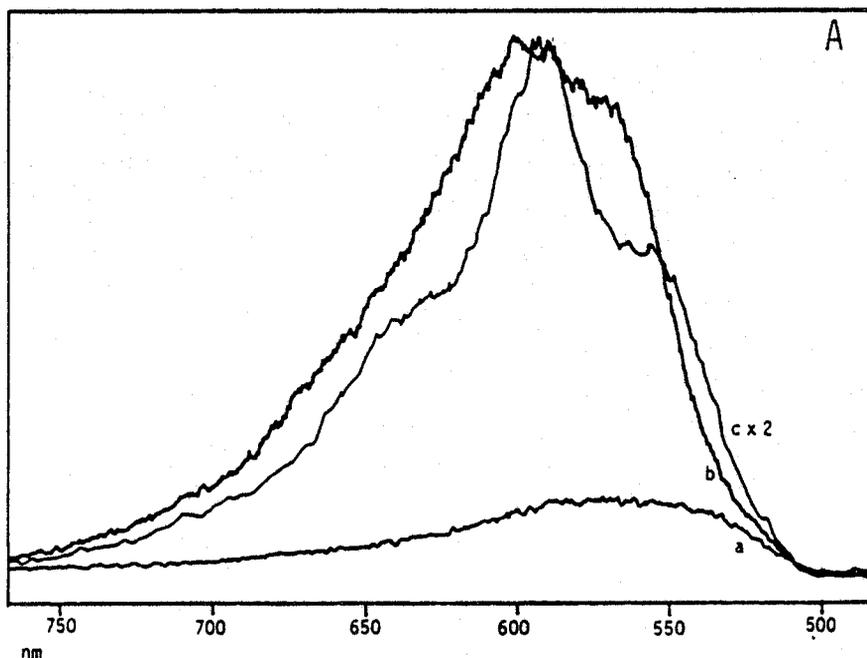


Figure 50

Spectres de fluorescence de lysats de cellules Hep G2 (lyse par un tampon TRIS/HCl contenant 4,6% SDS) observés en capillaires au microfluorimètre.

A - a - lysat de cellules témoins non traitées

b - cellules incubées pendant 1h à 37°C avec le conjugué GpASOR-bras-DNR (concentration équivalente à 2µg DNR/ml)

c - cellules incubées pendant 1h à 37°C avec la DNR (concentration de 0,1µg/ml)

B - a - lysat de cellules témoins additionné de DNR (concentration égale à 0,5µg DNR/ml de lysat)

b - lysat de cellules témoins additionné de conjugué GpASOR-bras-DNR (concentration équivalente à 0,5µg DNR/ml de lysat)

Microfluorimètre LASER, excitation à 488 nm; puissance LASER= 30µW; objectif x 50; temps d'acquisition des spectres: 20sec. (A), 10sec. (B).

cette méthode, la fluorescence retrouvée dans les lysats de cellules traitées par la DNR ou le composé GpASOR - bras - DNR est intense et très différente de la fluorescence du lysat de cellules témoins, ce qui permet les mesures quantitatives d'intensité de fluorescence.

De plus, les spectres retrouvés dans les lysats des cellules traitées sont très voisins de ceux de lysats de cellules témoins additionnés de quantités connues de DNR ou de GpASOR - bras - DNR (Fig. 50B) ou de ceux des produits eux-mêmes en solution dans le tampon TRIS/HCl contenant du SDS.

L'importance du SDS réside, d'une part, dans l'intérêt qu'il présente pour la lyse des cellules, et, d'autre part, dans le gain en sensibilité qu'il apporte à la méthode par augmentation de l'intensité des spectres de fluorescence de la DNR et de ses dérivés.

La figure 51 (p.173) présente les droites déterminées à partir des valeurs d'intensité de fluorescence/ mg de protéines obtenues dans les lysats cellulaires après incubation des cellules Hep G2, à 37°C, pendant des temps variables, en présence de DNR libre à 3 concentrations (0,1 µg/ml; 0,5 et 1 µg/ml) ou conjuguée aux glycopeptides d'ASOR (concentrations initiales dans le milieu d'incubation équivalentes à 2 et 4 µg DNR/ ml).

Ces résultats mettent en évidence une différence d'internalisation de la DNR dans les cellules Hep G2 selon sa forme: libre ou liée aux glycopeptides. Lorsque la DNR est libre, sa pénétration s'effectuerait selon un processus passif dépendant de la concentration initiale de drogue dans le milieu d'incubation. Quand la DNR est liée aux glycopeptides, l'intensité maximale de fluorescence cellulaire suit la même évolution en fonction du temps d'incubation, pour les 2 concentrations de produit de couplage employées. Ce résultat témoigne d'une incorporation de la DNR couplée selon un processus saturable analogue à celui rencontré lors de l'endocytose par l'intermédiaire d'un récepteur.

L'histogramme présenté dans la figure 52 (p.175) montre que, si l'on exprime les résultats en nanomoles de DNR incorporée par mg de protéines cellulaires, expression qui permet de tenir compte de l'influence du

Intensité de fluorescence/mg protéines

(unités arbitraires)

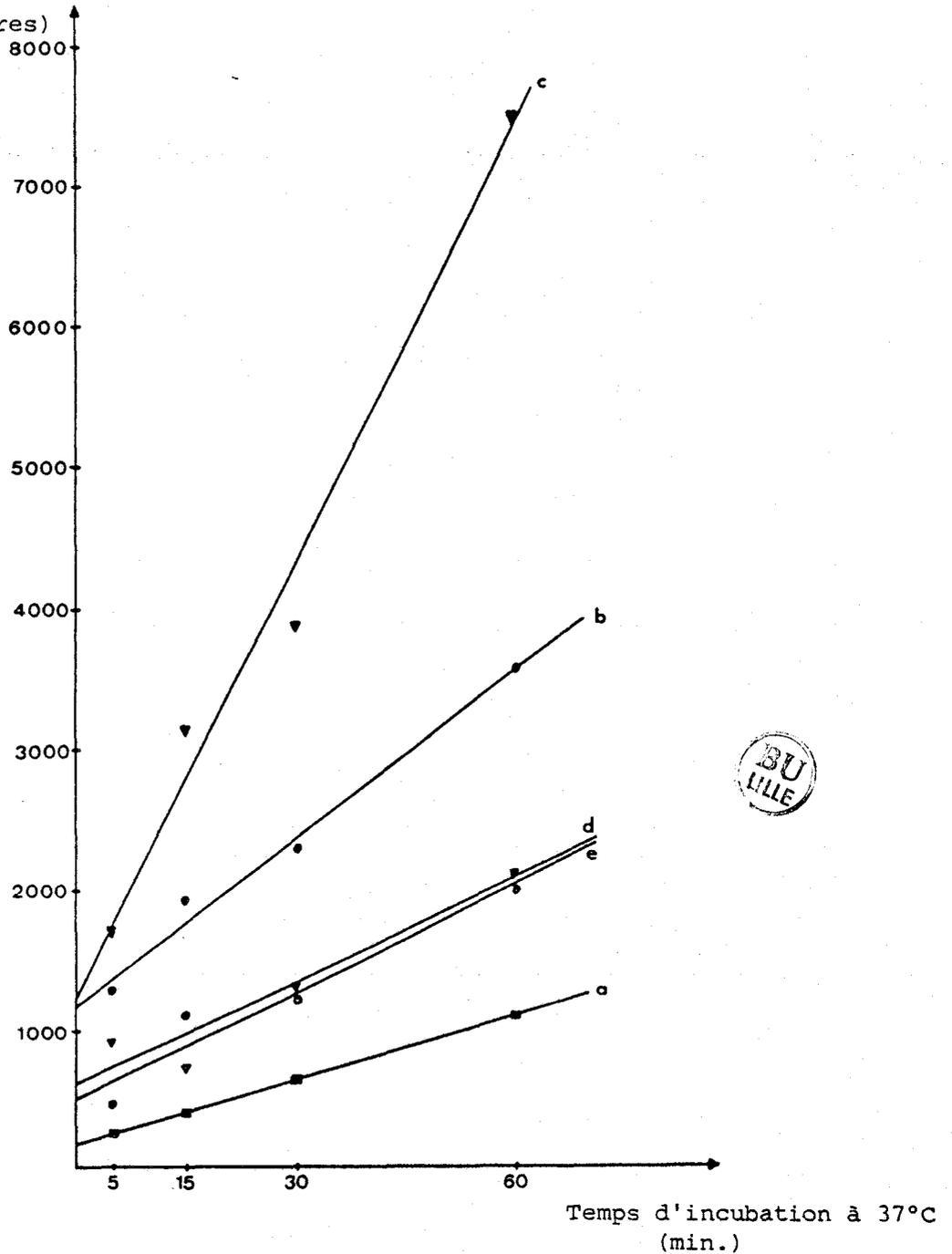


Figure 51

Intensité de fluorescence par mg de protéines cellulaires retrouvée après incubation des cellules HepG2 avec la DNR libre ou couplée aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde.

- a - DNR; concentration initiale dans le milieu d'incubation  $c_i = 0,1 \mu\text{g/ml}$  ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ); droite de régression  $y = 15,8x + 165,84$  (coefficient de corrélation  $r = 0,999$ )
- b - DNR;  $c_i = 0,5 \mu\text{g/ml}$  ( $10^{-6} \text{M}$ ); droite de régression  $y = 39,488x + 1177,32$  ( $r = 0,992$ )
- c - DNR;  $c_i = 1 \mu\text{g/ml}$  ( $2 \times 10^{-6} \text{M}$ ); droite de régression  $y = 101,54x + 1253,67$  ( $r = 0,9908$ )
- d - GpASOR-bras-DNR;  $c_i$  équivalente à  $2 \mu\text{g DNR/ml}$  ( $4 \times 10^{-6} \text{M}$ ); droite de régression  $y = 44,43x + 601,12$  ( $r = 0,947$ )
- e - GpASOR-bras-DNR;  $c_i$  équivalente à  $4 \mu\text{g DNR/ml}$  ( $8 \times 10^{-6} \text{M}$ ); droite de régression  $y = 25,55x + 502,64$  ( $r = 0,9609$ ).

couplage de la DNR aux glycopeptides sur sa fluorescence, la quantité de DNR retrouvée dans les cellules est relativement importante, que la DNR soit ajoutée au milieu d'incubation sous forme libre ou glycosylée.

La quantité maximale de DNR retrouvée dans les cellules incubées en présence de GpASOR - bras - DNR est d'environ 1,2 nanomoles, quand la concentration initiale dans le milieu d'incubation est équivalente à 2 ou 4  $\mu\text{g}$  DNR/ ml (4 ou 8  $\times 10^{-6}$  M).

L'histogramme présenté dans la figure 53 (p. 176) indique les quantités de DNR retrouvée par mg de protéines quand les cellules sont incubées avec la drogue libre. Il a été tracé d'après les valeurs moyennes reportées sur la figure 43 (p. 152) du chapitre précédent (moyennes des valeurs expérimentales de 4 expériences).

En comparant ces deux histogrammes, on remarque que, pour une concentration initiale de DNR égale ou équivalente à 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de milieu d'incubation, la quantité de DNR retrouvée dans les cellules Hep G2 après incubation pendant 1h avec la DNR couplée aux glycopeptides d'ASOR correspond à la moitié de la valeur obtenue quand les cellules sont incubées avec la DNR libre (environ 2,4 nanomoles). Lorsque la concentration initiale en DNR est égale ou équivalente à 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de milieu d'incubation, la quantité de DNR incorporée par les cellules Hep G2 est diminuée d'un facteur 4 quand la DNR est glycosylée.

Ces résultats sont particulièrement importants puisqu'ils mettent en évidence:

- d'une part, une modification du mode de pénétration dans les cellules Hep G2 de la DNR par couplage aux GpASOR, suggérant le passage d'un processus passif d'internalisation (dans le cas de la DNR libre) à un processus actif saturable (dans le cas de la drogue glycosylée)

et - d'autre part, une diminution de l'incorporation de la DNR par les cellules Hep G2 par conjugaison aux GpASOR, favorable à l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme spécifique de pénétration de la drogue glycosylée, mécanisme dont l'intérêt pour le contrôle de la pénétration intracellulaire de la DNR est à souligner.

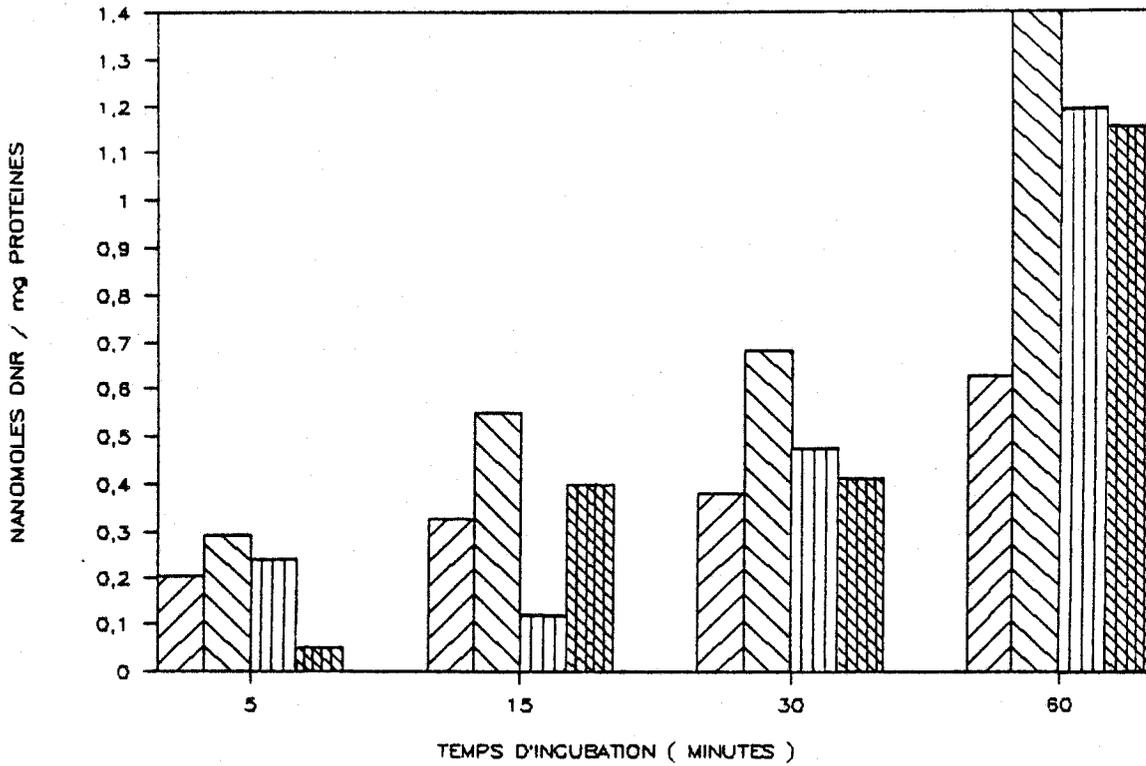


Figure 52

Quantité de DNR retrouvée par mg de protéines cellulaires après incubation à 37°C des cellules Hep G2 avec la DNR libre ou couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde.

-  DNR;  $c_i = 0,5 \mu\text{g/ml}$  ( $10^{-6}\text{M}$ )
-  DNR;  $c_i = 1 \mu\text{g/ml}$  ( $2 \times 10^{-6}\text{M}$ )
-  GpASOR-bras-DNR;  $c_i$  équivalente à  $2 \mu\text{g DNR/ml}$  ( $4 \times 10^{-6}\text{M}$ )
-  GpASOR-bras-DNR;  $c_i$  équivalente à  $4 \mu\text{g DNR/ml}$  ( $8 \times 10^{-6}\text{M}$ )

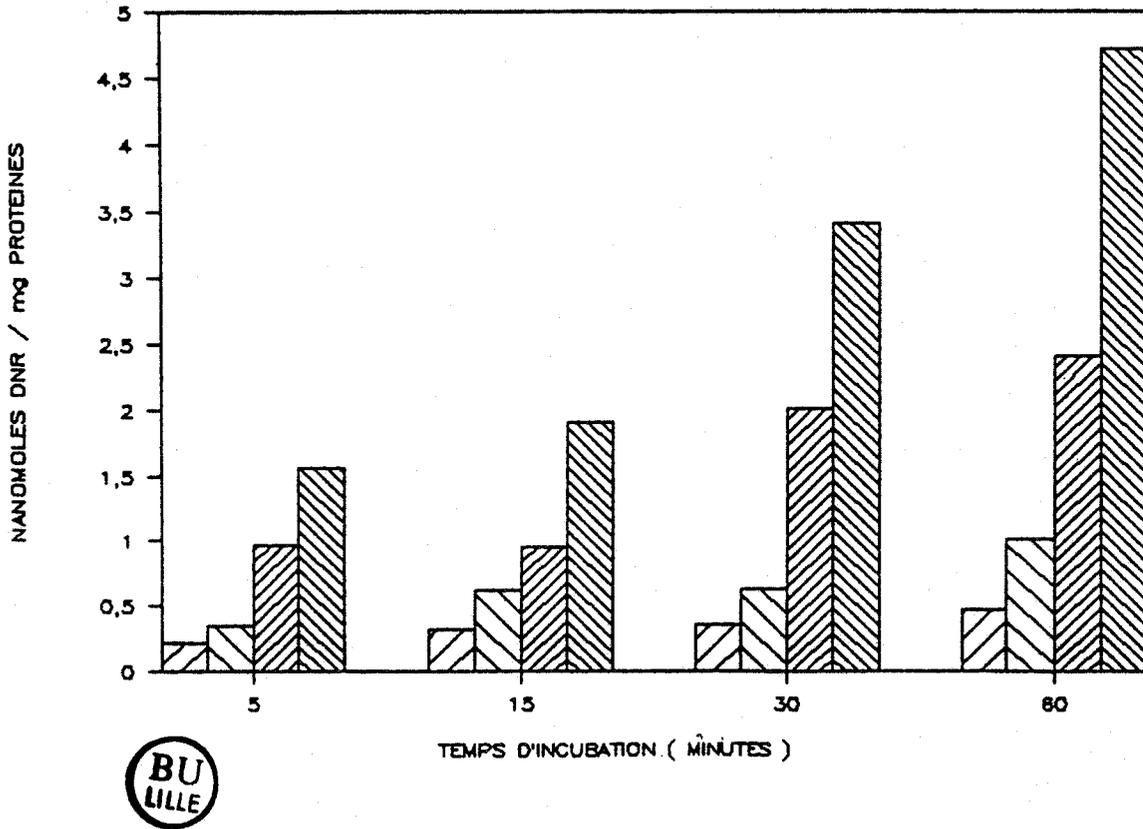


Figure 53

Quantité de DNR retrouvée par mg de protéines cellulaires après incubation des cellules Hep G2 à 37°C avec la DNR libre.

-   $c_i = 0,5 \mu\text{g/ml}$  ( $10^{-6}\text{M}$ )
-   $c_i = 1 \mu\text{g/ml}$  ( $2 \times 10^{-6}\text{M}$ )
-   $c_i = 2 \mu\text{g/ml}$  ( $4 \times 10^{-6}\text{M}$ )
-   $c_i = 4 \mu\text{g/ml}$  ( $8 \times 10^{-6}\text{M}$ )

D - Inhibition de l'incorporation cellulaire d'<sup>125</sup>I - asialoorosomucoïde par les glycopeptides d'ASOR et les conjugués GpASOR - bras - DNR.

Nous avons recherché si les glycopeptides d'ASOR libres ou conjugués à la DNR pouvaient inhiber l'incorporation de l'asialoorosomucoïde par les cellules Hep G2. Cette expérience complémentaire a été réalisée, en collaboration avec D.DAMART, dans le but de confirmer la participation du récepteur spécifique du galactose des cellules Hep G2 à l'internalisation de la DNR couplée aux glycopeptides d'ASOR.

Les cellules Hep G2 sont réparties en boîtes de Pétri ( $0,5 \times 10^6$  cellules/ 1 ml de milieu) et incubées à 37°C en présence d'asialoorosomucoïde marqué à l'<sup>125</sup>I (méthode de marquage à l'iodogen; radioactivité spécifique voisine de 700000 cpm/ $\mu$ g) à la concentration de 2  $\mu$ g d'ASOR/ ml ( $5 \times 10^{-8}$  M). Après incubation et lavage, les cellules sont lysées par 1 ml de NaOH 1N. Les lysats sont transférés dans des tubes en plastique, la radioactivité est comptée et les protéines cellulaires sont dosées par une méthode dérivée de celle de LOWRY (1951).

Des incubations sont également réalisées avec de l'<sup>125</sup>I - ASOR (2  $\mu$ g/ml) en présence de concentrations variables en glycopeptides d'asialoorosomucoïde (GpASOR) ou en conjugués GpASOR - bras - DNR ( $5 \times 10^{-6}$  M;  $2,5 \times 10^{-6}$  M;  $1,25 \times 10^{-6}$  M).

La figure 54 (p.178) présente l'incorporation de l'<sup>125</sup>I - ASOR par les cellules Hep G2 à 37°C et sa variation en présence des glycopeptides d'ASOR libres ou couplés à la DNR. On observe que les glycopeptides d'ASOR et les conjugués GpASOR - bras - DNR sont capables d'inhiber l'incorporation par les cellules Hep G2 de l'ASOR marqué. Cette incorporation est ainsi diminuée de moitié quand les glycopeptides d'ASOR libres ou couplés sont ajoutés au milieu d'incubation à raison de 100 moles pour 1 mole d'ASOR marqué. Cependant, l'inhibition observée n'est pas totale ce qui indiquerait une affinité moindre du récepteur pour les glycopeptides par rapport à l'asialoorosomucoïde.

Les inhibitions provoquées par les glycopeptides d'ASOR et les conjugués GpASOR - bras - DNR sont identiques quand ceux-ci sont employés aux mêmes concentrations. La conjugaison de la daunorubicine aux

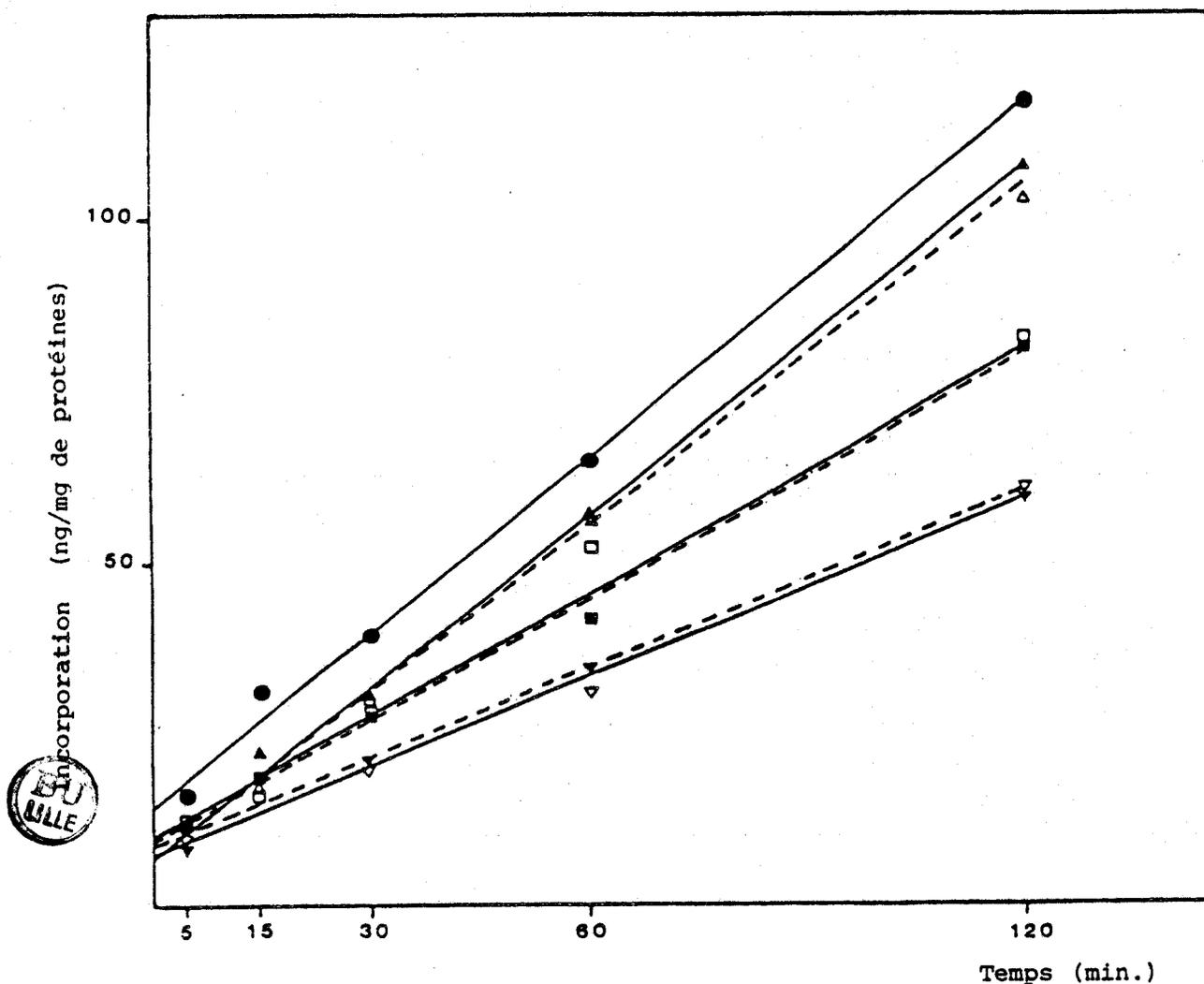


Figure 54

Incorporation d' $^{125}\text{I-ASOR}$  par les cellules Hep G2 à  $37^\circ\text{C}$

- $^{125}\text{I-ASOR}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )
- ▲ glycopeptides d'ASOR ( $1,25 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) +  $^{125}\text{I-ASOR}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )
- △ GpASOR-bras-DNR ( $1,25 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) +  $^{125}\text{I-ASOR}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )
- GpASOR ( $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) +  $^{125}\text{I-ASOR}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )
- GpASOR-bras-DNR ( $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) +  $^{125}\text{I-ASOR}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )
- ▼ GpASOR ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) +  $^{125}\text{I-ASOR}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )
- ▽ GpASOR-bras-DNR ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) +  $^{125}\text{I-ASOR}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ )

glycopeptides ne modifie donc pas leur affinité pour le récepteur à galactose des cellules Hep G2.

Ces résultats sont favorables à l'hypothèse de l'incorporation de la DNR couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde par les cellules Hep G2 selon un processus d'endocytose par l'intermédiaire du récepteur à galactose, mais doivent être complétés par une expérimentation à 4°C permettant de conclure en ce qui concerne la fixation des composés aux cellules Hep G2.

## II - ETUDE DE L'ACTION DES ENZYMES LYSOSOMIQUES SUR LE PRODUIT DE COUPLAGE DE LA DAUNORUBICINE AUX GLYCOPEPTIDES DE L'ASIALOOROSOMUCOÏDE.

Un des problèmes majeurs posés par le ciblage de médicaments par conjugaison à un transporteur est la libération du médicament dans la cellule par action des enzymes intracellulaires. Dans le cas d'un conjugué pénétrant par endocytose, la libération de la drogue ferait intervenir l'action des enzymes lysosomiques. C'est pourquoi nous avons étudié la sensibilité des dérivés de la daunorubicine à l'hydrolyse par les enzymes lysosomiques. Cette étude a été réalisée in vitro dans des conditions voisines de celles décrites par TROUET et coll. (1982).

### A - Protocole expérimental.

Les lysosomes sont isolés à partir de foie de Rat selon une technique voisine de celle décrite par DE DUVE (1955). Nous remercions D. BRASSART pour la préparation des lysosomes ainsi que pour ses conseils quant à leur utilisation.

Après isolement, le culot lysosomal provenant de 5g de foie est lavé 2 fois par NaCl 9% avec centrifugation 15 min à 10000 trs/min, puis repris par 3 ml de tampon citrate 0,001M pH 5,5 contenant 1% de Triton X100 et 5 mM de 2 mercapto - éthanol (choc hypotonique). Il est ensuite homogénéisé à l'aide d'un appareil de Dounce et maintenu 2h à 4°C avant les incubations.

Les dérivés de la daunorubicine (DNR, N-leucyl daunorubicine, composé "bras - DNR" et produit de couplage GpASOR - bras - DNR) sont dissous dans un tampon citrate 0,1M de pH 5,5 contenant 5 mM de 2 mercapto-éthanol (concentration égale ou équivalente à 0,1 mg de DNR/ml) et incubés à 37°C en présence d'enzymes lysosomiques (0,1 ml de substrat dans le tampon 0,1M pour 0,1 ml de fraction lysosomique dans le tampon 0,001M).

Après 2h et 4h d'incubation, des aliquots sont prélevés et congelés. De nouvelles quantités (0,1 ml) d'enzymes lysosomiques sont alors ajoutées pour une durée totale d'incubation de 24h.

Les échantillons sont ensuite déposés sur support de chromatographie en couche mince (plaque de verre recouverte de gel de silice, Merck) et soumis à une migration dans le système - solvant: n-butanol/ acide acétique/ eau (2:1:1; v:v), puis analysés en fluorescence à la microsonde MOLE équipée de la platine à déplacement micrométrique (excitation à 488 nm; émission à 590 nm).

## B - Résultats et discussion.

Les profils de migration en chromatographie sur couche mince du produit de couplage de la DNR aux glycopeptides de l'asialoorosomucoïde et des dérivés obtenus après action des enzymes lysosomiques sur ce composé sont présentés dans la figure 55 (p.181). Ces profils ont été obtenus par analyse du chromatogramme en fluorescence, à la microsonde MOLE (excitation à 488 nm, émission à 590 nm) selon la technique précédemment citée (Fig.32; p.124).

La DNR et le composé bras - DNR restent intacts pendant toute la durée de l'action des enzymes lysosomiques. La N-leucyl daunorubicine libère de la DNR dès 2h d'incubation et son hydrolyse en DNR est quasiment totale en 20h.

Le produit de couplage GpASOR - bras - DNR donne, après 4h d'incubation avec les enzymes lysosomiques, une quantité importante d'un dérivé intermédiaire non identifié. Après 24h d'action enzymatique, ce dérivé est encore présent mais on note une libération de faibles

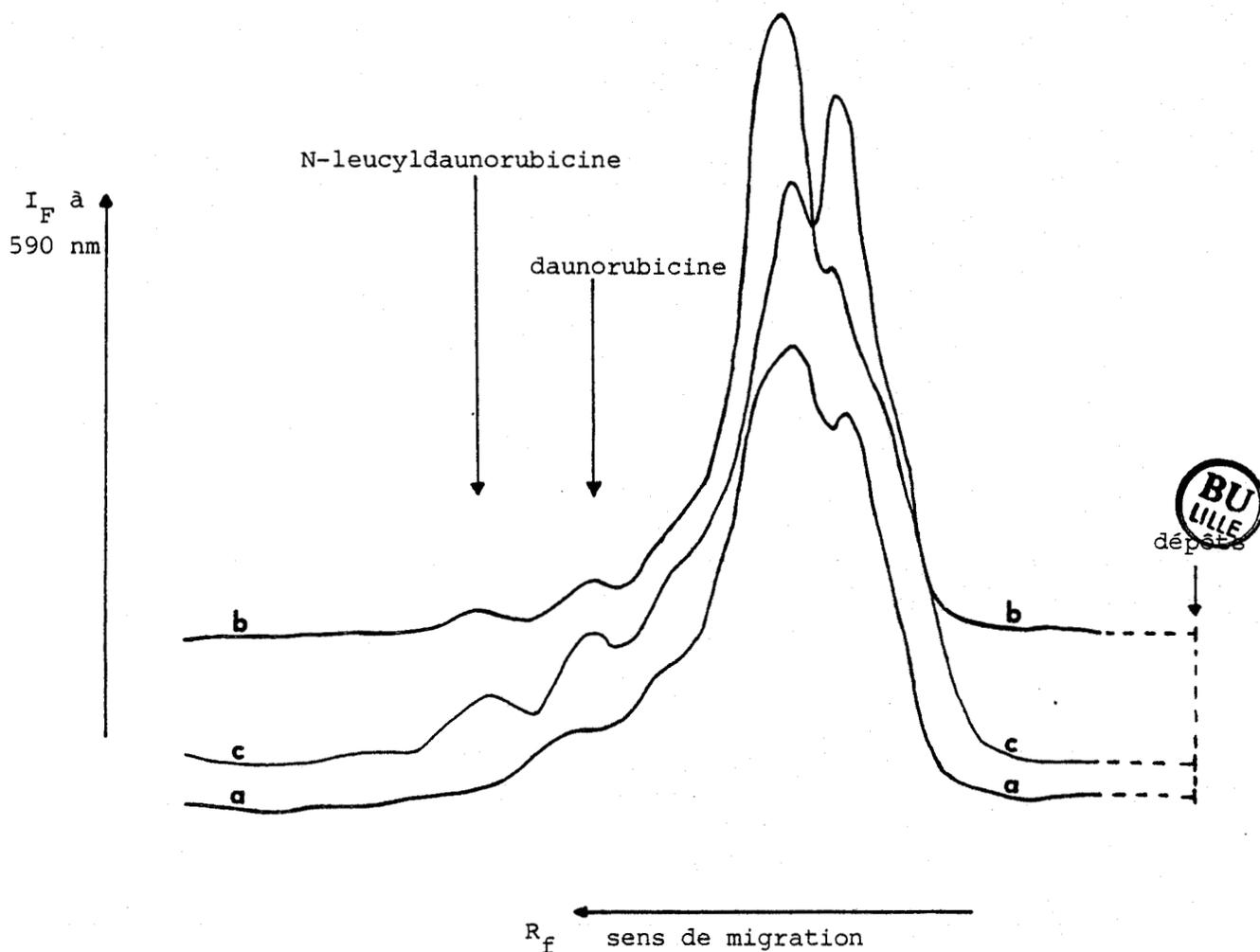


Figure 55

Migration en chromatographie sur couche mince du produit de couplage Glycopeptides d'ASOR - bras - DNR (a) et de ses dérivés obtenus par action des enzymes lysosomiques (b: 4h d'hydrolyse enzymatique; c: 24h). Observation des TLC en fluorescence à la microsonde MOLE avec platine à déplacement micrométrique; excitation à 488nm; émission à 590 nm. Migration dans le solvant: n-butanol/acide acétique/eau (2:1:1;v:v).

quantités de DNR et de N-leucyl-daunorubicine. Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il montre la possibilité de libération de la DNR ou de son dérivé (leucyl-daunorubicine) à partir du produit de couplage GpASOR - bras - DNR, sous l'action des enzymes lysosomiques.

L'hydrolyse rapide de la N-leucyl-daunorubicine en DNR, en accord avec les résultats de MASQUELIER et coll. (1980), suggère que les conditions expérimentales sont bonnes. Il serait néanmoins intéressant de les améliorer afin de rechercher une éventuelle augmentation de l'hydrolyse du conjugué.

Les résultats obtenus par TROUET et coll. (1982) avec des conjugués DNR - albumine semblent bien meilleurs puisque ces conjugués libèrent 60 à 75% de DNR après 10h d'incubation avec les enzymes lysosomiques lorsqu'ils sont préparés à l'aide d'un bras peptidique à 3 ou 4 acides aminés.

Cependant, dans le cas de conjugués comportant un bras à 1 ou 2 acides aminés, la libération de DNR est lente et comparable à celle que nous avons obtenue. De plus, le conjugué GpASOR - bras - DNR pourrait présenter un avantage sur le plan thérapeutique en tant que système à libération lente de médicament.

### III - UTILISATION DE GLYCOCONJUGUES MARQUES A LA FLUORESCÉINE.

Les nombreuses difficultés rencontrées lors des essais d'enregistrement direct de spectres de fluorescence intracellulaire de la DNR couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde ou à l'asialoorosomucoïde, et lors des essais de lyse des cellules Hep G2 incubées avec ces conjugués nous ont incitée à utiliser les mêmes glycoconjugués (ASOR et ses glycopeptides) non fixés à la DNR et marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, afin de bénéficier du rendement quantique de fluorescence élevé de la fluorescéine par rapport à celui de la DNR.

Ces glycoconjugués marqués à la fluorescéine nous ont permis

d'aborder l'étude du devenir intracellulaire des glycoconjugués endocytés.

A - Marquage des glycoconjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine.

6 mg d'asialoorosomucoïde ou de glycopeptides dissous dans 5 ml de pyridine à 50% sont additionnés d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sur Célite (FITC Isomer I on Celite, Sigma, contenant environ 10% de FITC) à raison de 10 moles de FITC pour 1 mole de glycoconjugué. Le marquage est réalisé à 37°C pendant 1h sous agitation. Après centrifugation 10 min à 2000 trs/min, le surnageant contenant le glycoconjugué marqué est déposé sur une colonne d'ACA 202 (IBF) équilibrée dans la pyridine à 10% (dimensions: 130 cm x 2,8 cm; élution par la pyridine à 10%: 8 ml/ h/ fraction). Les glycoconjugués marqués à la fluorescéine recueillis sont ensuite purifiés sur colonne de Bio-Gel P2 (BIO-RAD) équilibrée dans l'eau distillée (dimensions: 1,2 cm x 80 cm; élution par l'eau: 2 ml/ fraction/ 20 min.), puis lyophilisés.

B - Etudes sur les cellules Hep G2.

Pour pallier les difficultés rencontrées lors de l'étude du comportement vis - à - vis des cellules Hep G2 de la DNR couplée à l'ASOR, nous nous sommes intéressée essentiellement, dans le cas du modèle cellulaire, à l'ASOR marqué à la fluorescéine.

Nous avons commencé l'étude des glycoconjugués marqués à la fluorescéine par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et analyse en fluorescence. Cette technique, très sensible sur le plan de la détection quantitative, permet de distinguer les glycoconjugués en fonction de leur taille (glycoprotéine ou glycopeptide) et pourrait s'avérer intéressante pour l'étude du devenir intracellulaire des glycoconjugués endocytés.

Une technique analogue a par ailleurs été développée par PORETZ et PIECZENIK (1981) et proposée pour l'étude des glycopeptides et de leurs produits de dégradation enzymatique.

## 1 - Protocole expérimental.

Les cellules Hep G2 sont incubées pendant 2h à 37°C avec l'asialoorosomucoïde marqué à la fluorescéine (ASOR - FITC) à la concentration de 2 µg/ml dans un tampon DME de pH 7,35. Après incubation et lavages, les cellules sont récupérées par grattage dans le même tampon et centrifugées 10 min à 1500 trs/min.. Le culot cellulaire (provenant de  $4 \times 10^6$  cellules) est repris par 20 µl d'eau et soumis à 5 cycles de congélation/ décongélation. Puis il est repris par 40 µl de tampon de dépôt et porté à 37°C pendant 2h avant d'être soumis à une électrophorèse.

Différents témoins en solution (protéines témoins de masse moléculaire déterminée, ASOR - FITC, glycopeptides d'ASOR et glycopeptides bi- et triantennés désialylés marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine) sont également soumis à l'électrophorèse après avoir été dilués au demi dans le tampon de dépôt et portés 2h à 37°C.

L'électrophorèse en acrylamide à 20% est réalisée selon la technique de LAEMMLI (1970) en présence de 0,1% de SDS. Après migration, l'électrophorèse est analysée en fluorescence à la microsonde MOLE équipée de la platine à déplacement micrométrique (excitation à 488 nm). En se plaçant à la longueur d'onde d'émission de la fluorescéine et de ses dérivés (525 nm), on détecte la présence de composés fluorescents sur le gel et on enregistre le profil d'intensité de fluorescence (donc de migration) pour chaque couloir correspondant à un dépôt (puissance du LASER voisine de 0,5 mW, objectif x 32 longue frontale).

Après l'analyse en fluorescence, le gel est coloré au bleu de Coomassie pour préciser la position des protéines témoins de masse moléculaire. La fluorescéine libre migre avec le bleu de bromophénol et indique le front de migration.

## 2 - Résultats.

Cette technique très sensible permet de détecter une quantité déposée de 20 ng d'ASOR - FITC (sensibilité 100 fois supérieure à celle de la coloration au bleu de Coomassie).

Le profil de migration en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS de l'ASOR - FITC et du lysat cellulaire après incubation pendant 2h à 37°C avec l'ASOR - FITC est présenté dans la figure 56A. La figure 56B présente la comparaison de la migration de l'ASOR - FITC et de ses glycopeptides marqués à la fluorescéine (Fig.56;p.186).

L'ASOR - FITC internalisé en 2h par les cellules Hep G2 et retrouvé dans le lysat cellulaire peut donc être mis en évidence par cette technique. D'après ces expériences préliminaires, il apparait possible, par analyse en électrophorèse des lysats cellulaires après incubation pendant des temps variables avec l'ASOR - FITC, d'obtenir des informations sur la dégradation intracellulaire de l'ASOR, en suivant la disparition de la glycoprotéine et l'apparition de composés fluorescents de plus petite taille sous l'action des enzymes intracellulaires.

Nous avons aussi observé que la migration du produit de couplage ASOR - bras - DNR, dans les mêmes conditions d'électrophorèse, était semblable à celle de l'ASOR marqué à la fluorescéine. L'extension de cette technique au produit de couplage ASOR - bras - DNR est donc envisageable, en fixant la longueur d'onde d'émission pour l'analyse en fluorescence au maximum d'émission de la DNR (590 nm).

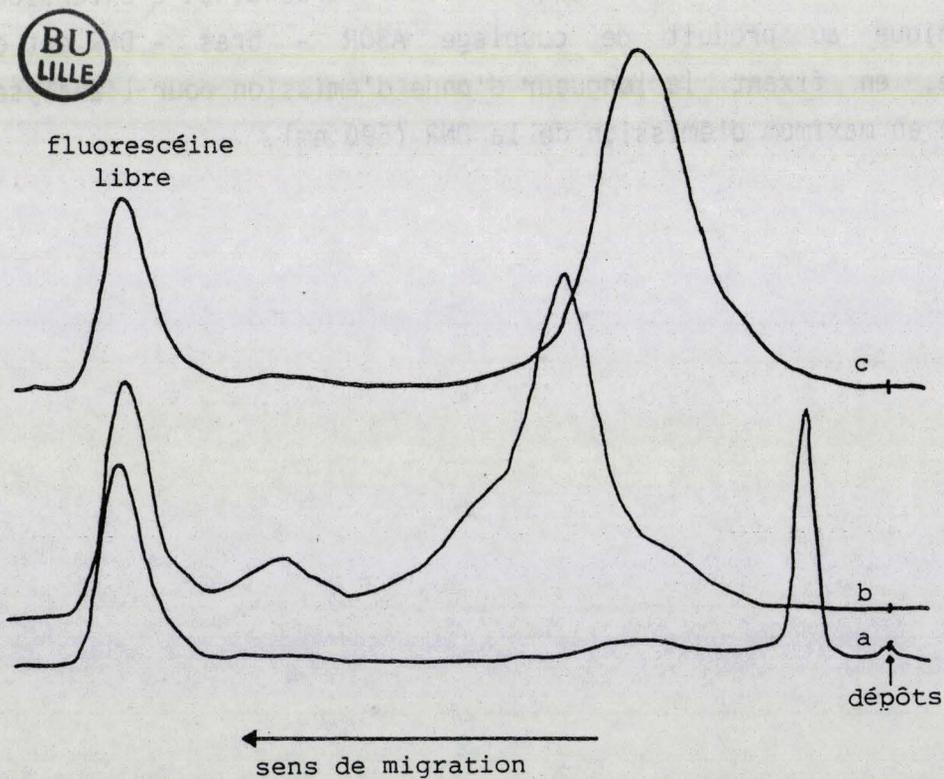
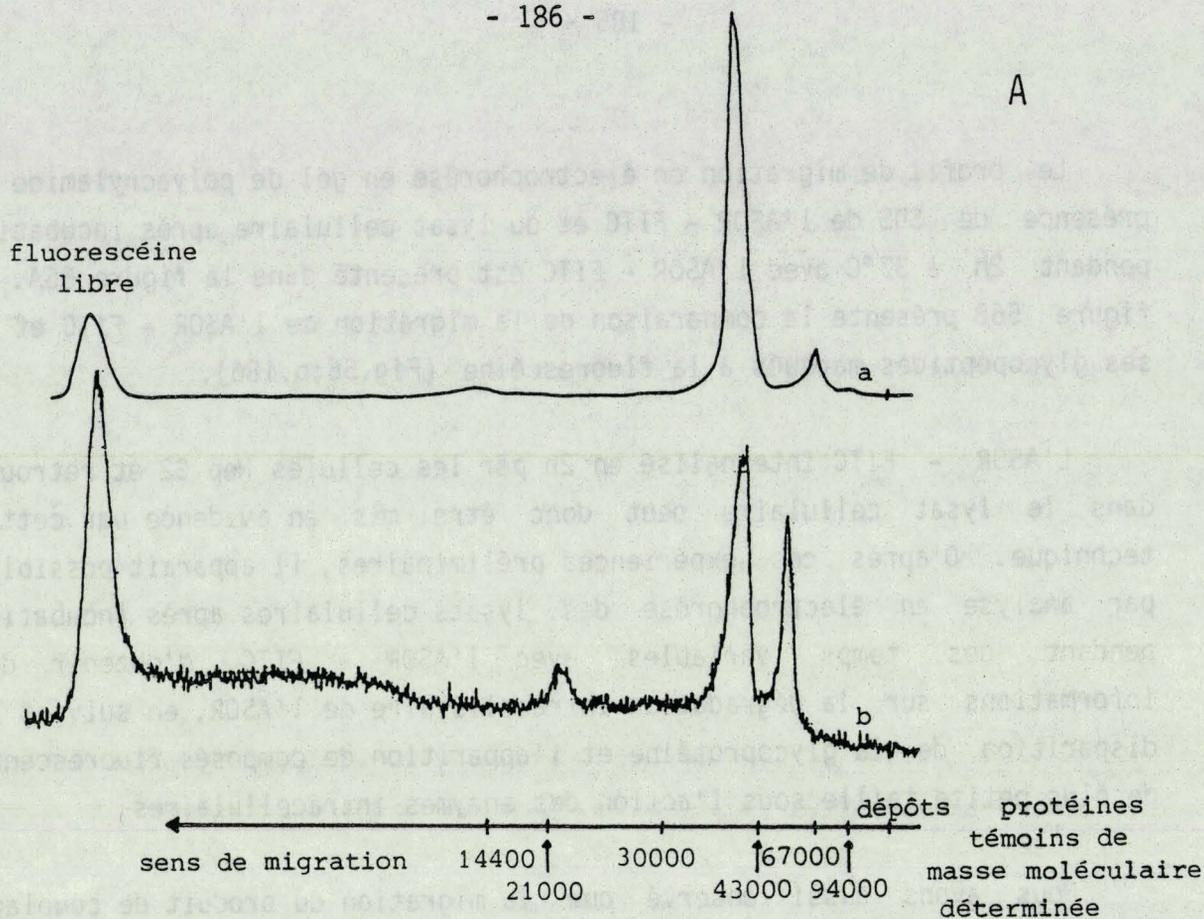


Figure 56

Analyse en fluorescence de la migration en électrophorèse en gel d'acrylamide à 20% en présence de SDS de l'ASOR-FITC (A-a, B-a), du lysat de cellules Hep G2 incubées 2h à 37°C avec l'ASOR-FITC (A-b), d'un mélange de glycopeptides désialylés bi- et triantennés (B-b) et des glycopeptides d'ASOR (B-c); microsonde MOLE;  $\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{émission} = 525 \text{ nm}$ .

## CONCLUSION

L'utilisation des techniques de microfluorimétrie LASER, précédemment mises au point avec la daunorubicine seule, a permis la mise en évidence de l'internalisation par les cellules d'hépatome humain Hep G2 de la DNR couplée aux glycoconjugués (asialoorosomucoïde, glycopeptides d'asialoorosomucoïde, lactose).

L'enregistrement direct des spectres de fluorescence intracellulaire sur cellule unique vivante et les mesures de fluorescence des lysats cellulaires, obtenus par action du mélange HCl/ éthanol sur les cellules Hep G2 après incubation avec les produits de couplage, n'ont donné de résultats satisfaisants que dans le cas du composé lactose - DNR.

C'est pourquoi nous avons développé une méthode d'analyse de la fluorescence cellulaire après lyse des cellules Hep G2 par un tampon contenant du SDS qui nous a permis de montrer la différence d'incorporation de la DNR couplée aux glycopeptides d'ASOR par rapport à la DNR libre.

Lorsque la DNR est ajoutée au milieu d'incubation sous forme libre, sa pénétration semble s'effectuer selon un processus passif dépendant de sa concentration initiale. Quand la DNR est ajoutée au milieu d'incubation sous forme couplée aux glycopeptides, son incorporation se ferait selon un processus saturable, avec une quantité maximale de DNR retrouvée dans les cellules (après 1h d'incubation) égale à 1,2 nanomoles soit la moitié de la valeur obtenue après incubation avec la drogue libre à même concentration (2 µg/ml).

Une expérience complémentaire a montré que la conjugaison de la DNR aux glycopeptides d'ASOR ne modifiait pas leur affinité pour le récepteur à galactose des cellules Hep G2 puisque les glycopeptides d'ASOR libres ou conjugués à la DNR inhibent de la même manière l'incorporation d'<sup>125</sup>I - ASOR par les cellules Hep G2.

L'ensemble de ces expériences est en faveur de l'hypothèse de l'endocytose de la DNR couplée aux glycopeptides d'ASOR par l'intermédiaire du récepteur à galactose des cellules Hep G2. La

diminution d'incorporation intracellulaire de la DNR par glycosylation est compensée par l'intervention d'un processus actif spécifique contrôlant la pénétration intracellulaire de la drogue.

En ce qui concerne le problème de la libération intracellulaire de la DNR après ciblage par glycosylation, nos expériences réalisées in vitro montrent une possibilité de libération de DNR et de N-leucyl-daunorubicine à partir du produit de couplage aux glycopeptides d'ASOR sous l'action des enzymes lysosomiques. Bien que les quantités libérées soient faibles, un tel système à libération lente de médicament pourrait s'avérer intéressant sur le plan thérapeutique.

Afin de bénéficier du rendement quantique de fluorescence élevé de la fluorescéine par rapport à la DNR, nous nous sommes également intéressée aux glycoconjugués précédemment employés pour les couplages à la DNR (ASOR et ses glycopeptides) marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine.

L'application de l'association des techniques de fluorescence et d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS à l'étude de l'interaction de l'asialoorosomucoïde marqué à la fluorescéine avec les cellules Hep G2 souligne l'intérêt que cette méthodologie peut apporter à l'analyse des glycoconjugués et à l'étude de leur devenir intracellulaire.

## CHAPITRE IV

### EXPERIMENTATION ANIMALE

#### INTRODUCTION

En parallèle aux expériences réalisées avec le modèle cellulaire (cellules Hep G2), nous nous sommes intéressée au devenir de la daunorubicine libre ou couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde, chez la Souris, dans le but de mettre en évidence une modification de la répartition dans l'organisme de la DNR par couplage aux glycopeptides et de vérifier in vivo l'efficacité du ciblage par glycosylation.

Nous avons ainsi recherché les possibilités d'étude par fluorescence de la pharmacocinétique chez la souris de la daunorubicine libre ou glycosylée. Cependant, en raison des nombreuses difficultés rencontrées lors de cette étude, en particulier sur le plan de la détection de la fluorescence, nous avons entrepris quelques expériences préliminaires avec la fluorescéine libre ou fixée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde.

## I - EXPERIENCES REALISEES AVEC LA DAUNORUBICINE LIBRE.

Nous ne présentons que l'aspect qualitatif de l'analyse par fluorescence de la répartition de la daunorubicine libre chez la souris, car les meilleures conditions d'extraction de la DNR à partir des organes ne sont pas encore totalement définies. Nous nous sommes intéressée aux différences de profil du spectre de fluorescence de la DNR selon les organes dont elle est extraite et avons cherché à les relier aux possibilités d'interactions de la drogue avec certains organes. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec D.DAMART.

### A - Protocole expérimental.

Une dose de daunorubicine correspondant à 2,5 mg/kg de poids corporel est injectée par voie intraveineuse dans la queue d'une souris adulte. Après 2 heures, l'animal est sacrifié par décapitation. Son sang est recueilli sur héparine et certains de ses organes (cœur, foie, poumons, reins, rate) sont récupérés et pesés. Les organes ou parties d'organes sont dilacérés et homogénéisés à l'appareil de Potter en présence d'une solution HCl 0,3N/ éthanol à 50% (10 ml/g d'organe). En effet, les anthracyclines ont la propriété d'être solubles dans cette solution qui fait précipiter la majeure partie des structures cellulaires. L'homogénat est alors centrifugé 30 min à 2000 tours/min. et le surnageant est récupéré pour être analysé au microfluorimètre LASER.

### B - Résultats et discussion.

L'analyse en fluorescence des surnageants récupérés lors de l'extraction de la DNR des différents organes indique la présence d'une quantité élevée de DNR au niveau des reins, la quantité de DNR retrouvée dans le sang étant à l'inverse très faible. La figure 57 (p.191) présente la comparaison des profils des spectres de fluorescence obtenus lors de cette analyse.

Les spectres de fluorescence de la DNR dans les différents organes présentent les trois bandes caractéristiques de la DNR sans déplacement sensible des longueurs d'onde des maxima. Cependant, les profils

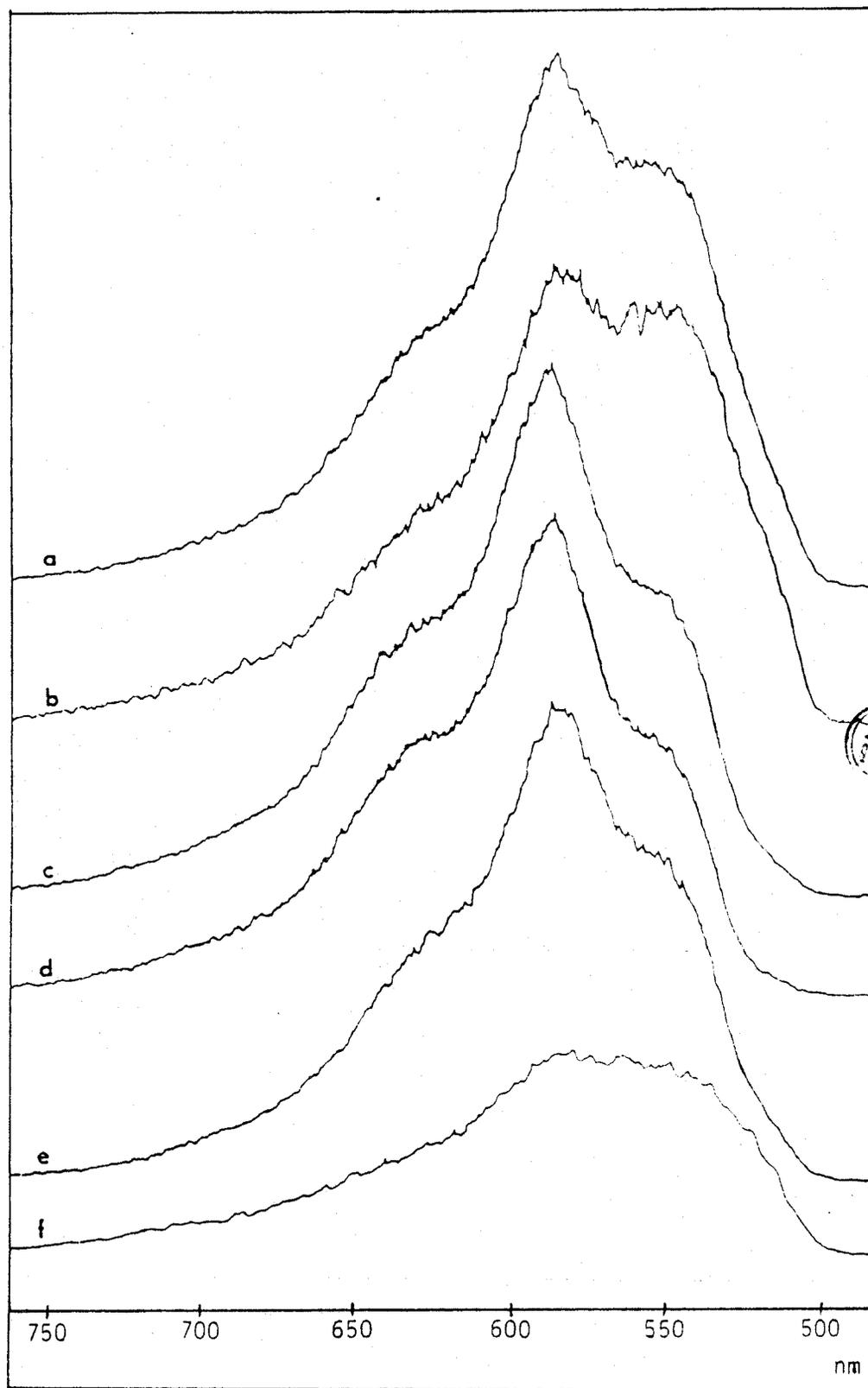


Figure 57

Spectres de fluorescence d'extraits d'organes de Souris après injection de daunorubicine (IV, 2,5mg/kg)

(a) foie, (b) coeur, (c) poumon, (d) rate, (e) rein, (f) sang

Microfluorimètre LASER: 30  $\mu$ W,  $\lambda_{exc.} = 488$  nm.

Les intensités relatives ne sont pas respectées.

différent par l'intensité relative des trois pics ce qui laisserait supposer l'existence d'interactions différentes de la DNR selon les organes. Si les profils observés pour les poumons et la rate sont très voisins de celui de la drogue libre, le profil du spectre de fluorescence de la DNR au niveau du coeur est au contraire très particulier, avec les bandes vers 560 et 590 nm d'intensités voisines. Cette observation est importante si l'on se réfère à l'affinité particulière de la DNR pour certaines structures cardiaques en relation avec sa cardiotoxicité.

Bien que le mécanisme de la toxicité cardiaque des anthracyclines soit encore mal connu, des études récentes suggèrent une relation entre la cardiotoxicité et la formation de radicaux libres et/ou l'association de l'anthracycline avec un phospholipide membranaire: la cardiolipine, entraînant des perturbations au niveau de la membrane mitochondriale. La connaissance de la structure moléculaire du complexe anthracycline - cardiolipine s'avère donc essentielle pour la compréhension des effets de la drogue sur la membrane mitochondriale.

Les interactions des anthracyclines (et en particulier de l'adriamycine) avec différents systèmes contenant de la cardiolipine (vésicules unilamellaires, HENRY et coll. (1985), LORENZINA - FIALLO et GARNIER - SUILLEROT (1986); liposomes multilamellaires: GOORMAGHTIGH et coll. (1986)) ont ainsi été largement étudiées.

Ces études suggèrent l'existence de deux types de liaison entre l'adriamycine et la cardiolipine.

Le premier type de liaison (I) correspond à la formation d'un complexe incluant 2 moles d'adriamycine pour une mole de cardiolipine par interaction électrostatique entre les groupements aminés chargés positivement des résidus de daunosamine de l'anthracycline et les résidus phosphates chargés négativement du phospholipide, sans pénétration de la partie dihydroxyanthraquinone à l'intérieur de la phase lipidique (GOORMAGHTIGH et coll. (1980)).

Selon LORENZINA-FIALLO et GARNIER-SUILLEROT (1986), un second type de liaison (II) pourrait exister correspondant à la fixation de l'adriamycine à la cardiolipine par interaction électrostatique mais avec inclusion de la partie dihydroxyanthraquinone dans la couche lipidique.

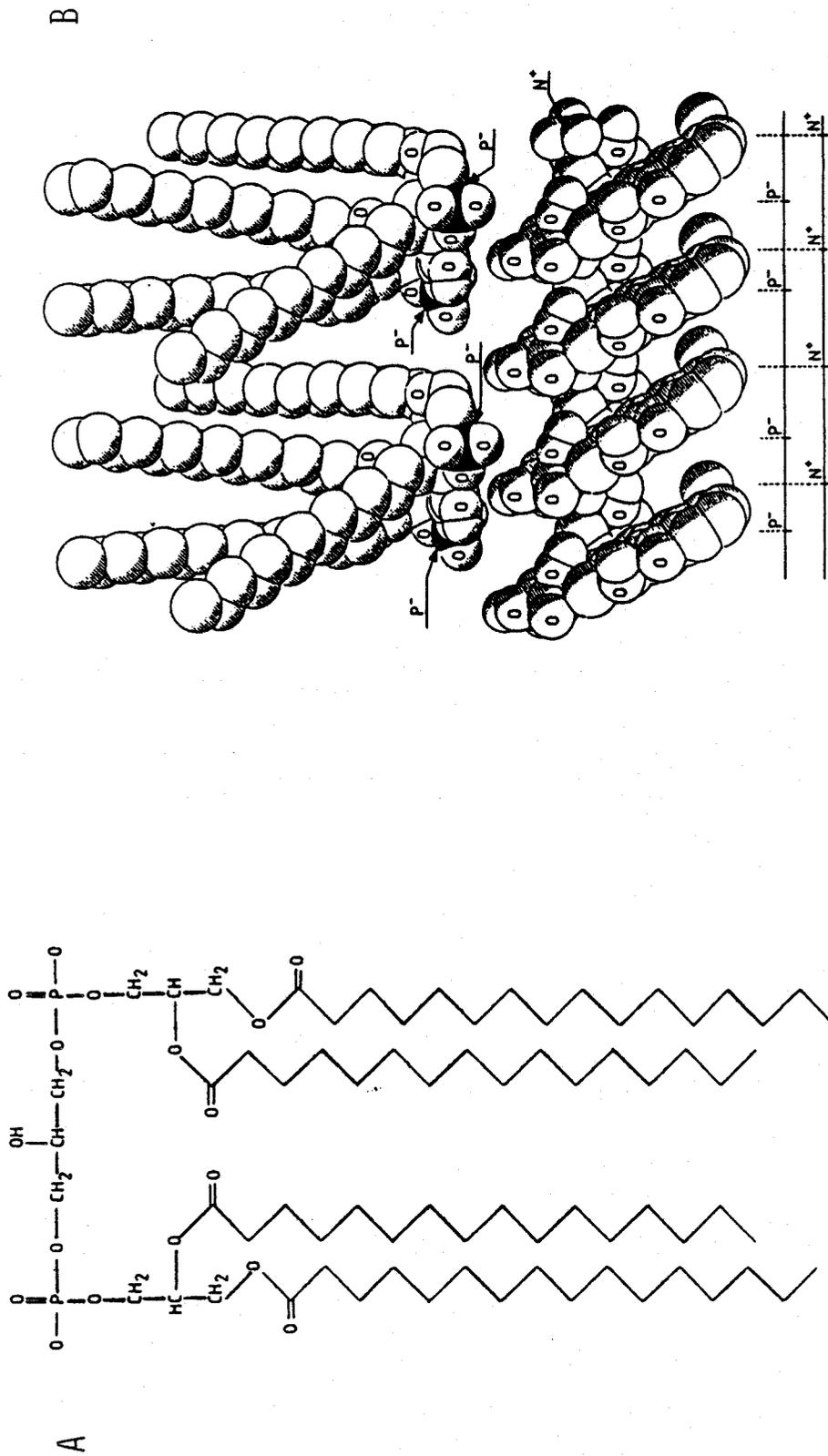


Figure 58



Structure de la cardiolipine (A) et représentation de l'arrangement de deux molécules de cardiolipine avec quatre molécules d'adriamycine (B). Les flèches indiquent la position des groupements phosphates du lipide (P<sup>-</sup>) et des groupements amines de l'adriamycine (N<sup>+</sup>); d'après GOORMAGHTIGH et coll. (1986).

Le type I serait prédominant quand le rapport molaire adriamycine/cardiolipine est élevé, le type II correspondant à un rapport molaire inférieur.

L'analyse conformationnelle présentée par GOORMAGHTIGH et coll. (1986, 1987) (voir figure 58, p.193) correspond au premier type de complexe (I). Elle suggère en outre la stabilisation du complexe par interaction entre les noyaux aromatiques des molécules d'adriamycine adjacentes. De telles interactions sont plausibles puisque des mécanismes analogues d'empilement des structures aromatiques seraient à l'origine de phénomènes d'autoassociation des anthracyclines (CHAIRES et coll. (1982)).

Sans nous permettre d'opter pour l'un ou l'autre des mécanismes de liaison proposés, la modification du profil du spectre de fluorescence de la DNR observée au niveau du coeur témoigne de l'existence d'une interaction forte et particulière entre l'anthracycline et des structures membranaires cardiaques. L'incidence de cette interaction sur le spectre de fluorescence est telle qu'elle sous-entend des perturbations dans les interactions moléculaires de la DNR au niveau de son chromophore polyaromatique.

## II - EXPERIENCES REALISEES AVEC LA FLUORESCEINE LIBRE OU FIXEE AUX GLYCOPEPTIDES D'ASIALOOROSOMUCOIDE.

La technique précédemment décrite pour l'analyse par fluorescence de la répartition de la DNR libre chez la souris, fondée sur l'extraction des anthracyclines à partir des organes par un mélange HCl 0,3N/ éthanol 50%, s'est avérée inexploitable dans le cas de la DNR couplée aux glycopeptides d'ASOR, en raison d'une précipitation du produit de couplage avec les structures cellulaires lors de l'extraction.

Après plusieurs tentatives infructueuses d'extraction à partir des organes et de solubilisation de la DNR libre et glycosylée, selon différentes techniques, nous avons opté pour des essais avec des glycopeptides d'ASOR non fixés à la DNR et marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, afin d'augmenter les chances de détection par fluorescence,

le but final étant d'adapter à la DNR glycosylée le protocole mis au point avec la fluorescéine fixée aux glycopeptides.

#### A - Protocole expérimental.

Les glycopeptides d'asialoorosomucoïde ont été marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine selon la technique précédemment décrite (chapitre III, III-A).

Les produits (fluorescéine libre et glycopeptides d'ASOR marqués à la fluorescéine: GpASOR - FITC) sont administrés par voie intraveineuse dans la queue des souris. Après 2h, l'animal est sacrifié par décapitation; son sang est recueilli sur héparine et certains de ses organes (foie, coeur, poumons, rate, reins) sont récupérés et pesés. Ils sont ensuite dilacérés et homogénéisés à l'appareil de Potter en présence d'un tampon TRIS 0,125M/ HCl pH 6,8 additionné de 4,6% SDS. Après congélation et décongélation, les organes sont soumis aux ultrasons (sonde Sonotrode, Branson) 3 fois 2 min avec mise dans la glace entre chaque sonication. Après centrifugation 30 min à 10000g, les surnageants sont analysés en capillaires au microfluorimètre (détection multicanale; excitation à 488 nm; puissance LASER: 4  $\mu$ W).

#### B - Résultats et discussion.

Aucun dérivé de fluorescéine n'est retrouvé dans le sang des souris traitées. La figure 59 (p.196) présente les spectres de fluorescence des lysats de foies de souris traitées avec la fluorescéine libre ou les glycopeptides d'ASOR marqués à la fluorescéine (GpASOR - FITC) et de souris témoin.

Dans le cas de la souris ayant reçu l'injection de GpASOR - FITC, le spectre retrouvé au niveau du foie est très intense, comparé au témoin, et son profil est très voisin de celui des GpASOR - FITC libres en solution dans le tampon TRIS/SDS (Fig. 59A).

Dans le cas de la souris ayant reçu l'injection de fluorescéine,

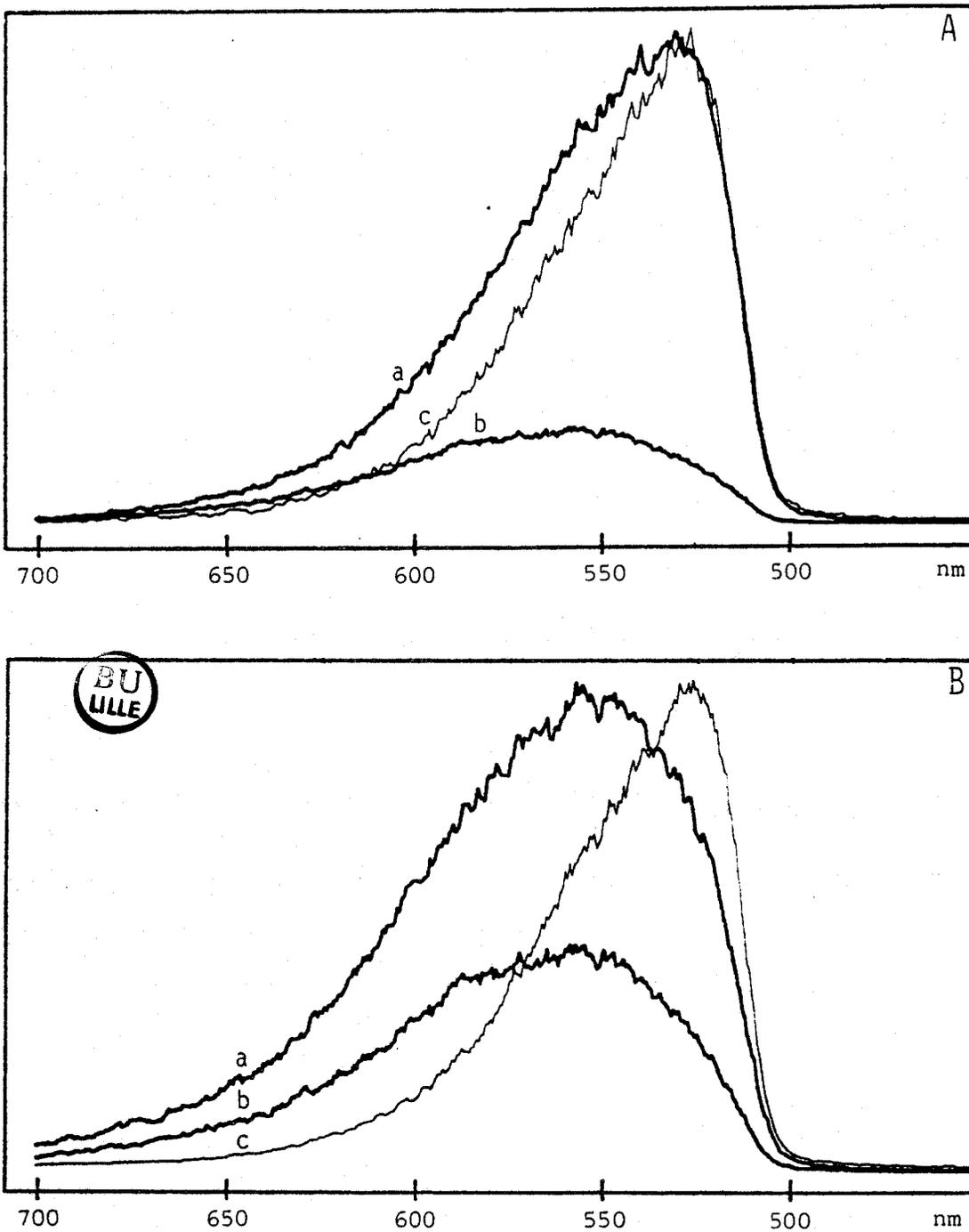


Figure 59

Spectres de fluorescence des lysats de foies de Souris après injection de fluorescéine ou de glycopeptides d'ASOR marqués à la fluorescéine (GpASOR-FITC)

A - a - Souris traitée par GpASOR-FITC

b - Souris témoin

B - a - Souris traitée par la fluorescéine

b - Souris témoin

Les spectres A-c et B-c correspondent respectivement aux GpASOR-FITC et à la fluorescéine en solution. Microfluorimètre LASER (488 nm; 4  $\mu$ W).

le profil du spectre retrouvé au niveau du foie est plus proche de celui du foie de la souris témoin, mais très différent du spectre de la fluorescéine libre (Fig. 59B).

Afin de déterminer la part de GpASOR - FITC incorporée par le foie de manière spécifique, nous avons enregistré les spectres des différents organes prélevés provenant des trois souris (témoin, fluorescéine et GpASOR - FITC).

Les spectres de la rate et du coeur des souris traitées sont très voisins de ceux de la souris témoin et sont donc ininterprétables sur le plan quantitatif car la composante fluorescéine est difficile à déterminer. Pour les autres organes (foie, reins, poumons) par contre, les spectres des souris traitées à la fluorescéine ou aux glycopeptides marqués à la fluorescéine sont différents de ceux de la souris témoin, tant sur le plan des intensités que sur le plan des profils, avec un déplacement des spectres correspondant aux souris traitées vers les basses longueurs d'onde (donc vers la longueur d'onde du maximum d'émission de la fluorescéine: 525 nm) par rapport aux spectres des organes de la souris témoin.

Nous avons pris comme organes témoins de "non ciblage" les reins et les poumons afin d'évaluer l'incorporation hépatique spécifique et d'éliminer les différences spectrales liées aux conditions expérimentales (en particulier la différence de dose exactement injectée pouvant exister dans le cas des souris traitées et la perte en composés fluorescents dans les organes non récupérés).

Pour chaque organe considéré (foie, rein, poumon), nous avons déterminé les rapports des surfaces des spectres de fluorescence enregistrés:  $F$  = surface du spectre souris traitée à la fluorescéine / surface du spectre souris témoin, et  $G$  = surface du spectre souris traitée par GpASOR - FITC / surface du spectre souris témoin.

Le calcul des rapports  $G/F$  pour les trois organes considérés permet d'éliminer la composante due au témoin et rend compte de la différence observée au niveau du foie par rapport aux autres organes. En effet, pour les reins et les poumons, le rapport  $G/F$  est voisin de 1, ce qui est en accord avec le fait qu'il n'y ait pas de ciblage vers ces organes par

fixation de la fluorescéine aux glycopeptides d'ASOR, et signifie qu'il n'y a pas de correction à apporter au résultat obtenu pour le foie.

Le rapport G/F égal à 1,5 pour le foie témoigne donc réellement d'une augmentation de la quantité de fluorescéine retrouvée dans le foie par administration sous forme fixée aux glycopeptides d'ASOR. Cette valeur indique qu'après injection chez la souris, la quantité de fluorescéine retrouvée dans le foie lorsqu'elle est administrée sous forme de GpASOR - FITC est supérieure de 50% à la quantité retrouvée dans le foie quand la fluorescéine est administrée sous forme libre.

Cette expérience ne donne pas d'indications précises sur la différence de répartition de la fluorescéine dans l'organisme selon qu'elle est administrée libre ou fixée aux glycopeptides, mais elle permet d'estimer la part de fluorescéine effectivement "ciblée" vers le foie.

Cette part est faible. Cependant, les conditions expérimentales ne sont pas optimales. En effet, nous avons choisi de sacrifier les souris 2h après l'injection intraveineuse de fluorescéine ou de GpASOR - FITC, par analogie avec l'expérience précédemment réalisée avec la DNR seule dont les conditions étaient voisines de celles employées par BERNARD et coll. (1969) lors de l'étude de la fixation de la DNR dans les cellules hépatiques de Rat. Or, d'après les expériences de GREGORIADIS et coll. (1970), l'incorporation hépatique d'une asialoglycoprotéine (l'asialocéruléoplasmine dans leur cas) est maximale en 20 à 30 minutes. Il serait donc nécessaire de réaliser nos essais in vivo en cinétique en conservant le temps de 2h comme dernière valeur significative.

Il nous semble en outre important de prendre en compte d'autres organes (cerveau, intestin, muscle...), afin de contrôler davantage le devenir des produits injectés, et de mesurer les quantités réelles de fluorescéine libre ou fixée aux glycopeptides retrouvées dans chaque organe (par comparaison des spectres et des intensités de fluorescence des organes des souris traitées avec les spectres de lysats d'organes de souris témoins additionnés de quantités connues de fluorescéine libre ou de GpASOR - FITC, en tenant compte des différences de rendement quantique de fluorescence pouvant exister entre ces composés) pour évaluer la modification de répartition de la fluorescéine dans l'organisme par

fixation sur les glycopeptides d'ASOR.

Remarques:



1- Après injection in vivo, il est probable qu'un chromophore comme la fluorescéine puisse avoir avec les différents organes des interactions diverses non spécifiques (telles que des interactions avec des lipides membranaires). Il est alors possible d'envisager que de telles interactions puissent interférer avec le processus spécifique du ciblage et en réduire l'efficacité.

2- Nous avons noté la présence dans les organes d'une fluorescence intrinsèque intense gênant la détection et la quantification de la fluorescence, et dont le spectre est voisin dans tous les organes analysés. Bien que son origine ne soit pas déterminée, ce fond de fluorescence cellulaire pourrait s'expliquer par l'existence de structures membranaires susceptibles de piéger des chromophores. Cette observation renforce l'hypothèse des interactions non spécifiques précédemment proposée.

En tenant compte des résultats obtenus lors de ces expériences préliminaires et des observations qui en découlent, une étude de la pharmacocinétique de la daunorubicine glycosylée chez la Souris est envisageable, en améliorant la méthodologie mise au point lors de ces essais, en particulier sur le plan de l'extraction quantitative de la daunorubicine libre ou couplée aux glycopeptides d'ASOR à partir des organes.

## CONCLUSION

Notre étude du devenir chez la Souris de la DNR libre ou glycosylée a été entreprise dans le but de rechercher si la conjugaison aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde peut modifier la répartition du médicament dans l'organisme (en particulier le dévier des cellules cardiaques) et provoquer son accumulation hépatique.

Les difficultés d'extraction et de détection en fluorescence rencontrées lors de cette étude nous ont incitée à réaliser quelques expériences préliminaires avec la fluorescéine (libre ou fixée aux glycopeptides d'ASOR) dont le rendement quantique de fluorescence est supérieur à celui de la DNR.

Nous avons ainsi appliqué les techniques de microfluorimétrie LASER précédemment décrites à l'analyse des extraits d'organes de souris traitées avec différents composés fluorescents.

Les expériences réalisées avec la DNR libre ont mis en évidence des différences de profil du spectre de fluorescence de la drogue selon les organes dont elle est extraite. Le profil particulier observé pour le coeur pourrait traduire une modification des interactions moléculaires au niveau des structures aromatiques de l'anthracycline, confirmant l'hypothèse de l'existence d'interactions particulières de la DNR avec certaines structures cardiaques en relation avec sa cardiotoxicité.

L'expérience d'injection à la souris de fluorescéine libre ou fixée aux glycopeptides d'ASOR a mis en évidence une augmentation de la quantité de fluorescéine retrouvée dans le foie après administration des glycopeptides marqués à la fluorescéine. Bien que cet essai préliminaire ne permette pas de conclure à un ciblage hépatique efficace, il nous a permis de connaître les difficultés de l'expérimentation animale et de définir les précautions à prendre lors de son interprétation.

Il nous montre en outre la possibilité d'application des techniques de microfluorimétrie LASER aux études in vivo de drogues (et de leurs métabolites) et nous permet d'envisager, en modifiant certains paramètres, une étude pharmacocinétique plus complète de la DNR libre ou glycosylée.

## **CONCLUSION GENERALE**

La daunorubicine, antibiotique du groupe des anthracyclines, est douée d'une activité antitumorale particulièrement efficace dans le traitement de certaines leucémies. Cependant, elle présente une cardiotoxicité qui en limite l'usage thérapeutique. C'est pourquoi, de nombreuses recherches sont actuellement engagées dans le but d'obtenir des dérivés de la daunorubicine aussi cytotoxiques à l'égard des cellules tumorales, mais moins cardiotoxiques.

L'orientation choisie au laboratoire est le ciblage par glycosylation dont l'objectif est à la fois de diriger la daunorubicine spécifiquement vers les cellules cancéreuses et de la dévier des cellules cardiaques. Il consiste à greffer sur le principe actif des glycoconjugués susceptibles d'être spécifiquement reconnus par les lectines membranaires des cellules - cibles.

Ayant retenu comme modèles d'étude des cellules possédant les récepteurs des asialoglycoprotéines: les hépatocytes de Rat et les cellules d'hépatome humain Hep G2, nous avons choisi comme transporteurs l'orosomucoïde désialylé et ses dérivés, en raison de leur structure glycanique (présence de galactoses en position terminale).

Les principaux résultats que nous avons obtenus et qui sont présentés dans ce mémoire, peuvent être résumés de la manière suivante:

1 - Les glycoconjugués vecteurs (asialoorosomucoïde et ses glycopeptides) ont été greffés sur la daunorubicine grâce au procédé de couplage mis au point lors de nos précédents travaux (DELPLACE-DELHAYE (1982)), utilisant le bras de couplage Glc-S-Et-Arg-Leu précédemment employé par MONSIGNY et coll. (1980) pour le couplage de la DNR à des lectines.

Ce procédé permet d'obtenir, avec un rendement de préparation de 60% et sans altérer la partie glycanique du glycoconjugué vecteur, des composés DNR - glycoprotéines (ou glycopeptides) dépourvus de DNR, N-leucyldaunorubicine et "bras + DNR" libres (dont la présence pourrait fausser l'interprétation des résultats biologiques) et renfermant environ 1 mole de DNR fixée par mole de glycoconjugué.

2 - La daunorubicine ayant la particularité d'être fluorescente, nous avons choisi de tirer parti de cette propriété pour analyser les produits de couplage DNR - transporteurs synthétisés et pour étudier l'interaction entre le médicament libre ou couplé et les cellules.

Nos expériences ont été réalisées à l'aide de la microsonde MOLE (Laboratoire de Spectrochimie Infra-Rouge et Raman de l'Université des Sciences et Techniques de Lille - Flandres Artois, Professeur M.DELHAYE) et du microfluorimètre LASER à détection multicanale (Société DILOR, G.I.P. Instrumentation et Spectrométrie) qui permettent la microanalyse d'échantillons fluorescents.

L'emploi du microfluorimètre équipé d'un détecteur multicanal, plus performant que la microsonde MOLE sur le plan de la sensibilité et de la vitesse d'enregistrement des spectres, a permis de résoudre un certain nombre de problèmes liés à l'analyse d'échantillons biologiques et d'aborder la détection et la quantification de la daunorubicine et de ses dérivés dans des solutions, des cellules, des extraits de cellules ou de tissus.

3 - En ce qui concerne la daunorubicine elle-même, nous avons étudié l'évolution de sa fluorescence (en solution) en fonction du pH ou de l'interaction avec l'ADN, et montré une modification de la polarisation de fluorescence de la drogue par interaction avec l'ADN.

Nous avons, d'autre part, étudié son internalisation dans les hépatocytes de Rat et les cellules d'hépatome Hep G2. Dans les cellules Hep G2, son internalisation s'effectuerait selon un processus passif dépendant de sa concentration initiale dans le milieu d'incubation.

4 - A l'aide de la méthode de microspectrofluorimétrie LASER citée précédemment, nous avons montré l'incorporation dans les cellules Hep G2 des conjugués synthétisés (DNR couplée au lactose, à l'asialoorosomucoïde ou à ses glycopeptides) et la différence de mode de pénétration de la DNR couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde par rapport à la DNR libre, suggérant le remplacement du processus de diffusion simple par un mécanisme actif spécifique. L'ensemble de nos

résultats est favorable à l'hypothèse de l'endocytose de la DNR "glycosylée" par l'intermédiaire du récepteur spécifique du galactose des cellules Hep G2.

5 - Après la démonstration de l'internalisation de la DNR couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde et afin d'apporter quelques éléments de réponse au problème de la libération intracellulaire de la drogue ciblée, nous avons montré in vitro la possibilité de libération de daunorubicine et de N-leucyldaunorubicine à partir du produit de couplage glycopeptides d'ASOR - bras - DNR sous l'action des enzymes lysosomiques.

6 - Nous nous sommes également intéressée au devenir in vivo de la daunorubicine libre ou couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde. L'analyse en fluorescence des extraits d'organes de souris après injection de DNR libre a mis en évidence des différences de profil du spectre de fluorescence de la drogue selon les organes et confirmé l'existence d'interactions moléculaires particulières de la DNR avec certaines structures cardiaques, susceptibles d'intervenir dans sa cardiotoxicité.

En raison des difficultés d'extraction et de détection en fluorescence rencontrées lors des études réalisées avec la DNR couplée aux glycopeptides d'ASOR, nous avons employé les glycoconjugués non couplés à la DNR et marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine. Des expériences préliminaires effectuées chez la Souris ont montré une augmentation de l'incorporation hépatique de la fluorescéine lorsqu'elle est administrée sous forme fixée aux glycopeptides d'ASOR. Bien que nos conditions expérimentales ne correspondent pas aux conditions optimales d'un ciblage hépatique, la méthodologie mise au point lors de ces essais pourra être adaptée au cas de la DNR glycosylée, et permettra son étude pharmacocinétique chez la Souris.

De nombreux éléments de démonstration de l'intérêt et de l'efficacité du ciblage cellulaire de la daunorubicine par glycosylation ont été réunis. Nos travaux ont en outre fourni des informations complémentaires intéressantes pour la compréhension de certains des mécanismes liés à l'activité ou à la toxicité des anthracyclines (mode de

pénétration intracellulaire de la drogue, interaction avec l'ADN, interactions particulières avec certains organes).

Après avoir montré que la DNR pouvait être incorporée spécifiquement dans des cellules tumorales par fixation à un glycoconjugué approprié, un point essentiel reste à étudier: celui de l'activité cytotoxique de la daunorubicine couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde.

Les résultats obtenus, en parallèle à nos travaux, par B.FLAN indiquent que la daunorubicine couplée au lactose conserve ses propriétés cytostatiques. L'application du protocole mis au point lors de ces études de cytotoxicité à nos produits de couplage DNR - glycoconjugués permettrait de conclure sur ce point et de compléter l'étude réalisée avec le modèle cellulaire.

## BIBLIOGRAPHIE

	<i>pages</i>
ADEN, D.P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOW, I. et KNOWLES, B.B. (1979) <i>Nature</i> , <u>282</u> , 615-616.	62, 141
ARNOLD, L.J. (1985) <i>Methods in Enzymology</i> , <u>112</u> , Part A: Drug and Enzyme Targeting, Eds. Widder, K.J., Green, R., Academic Press, 270-285.	29
ARNON, R. et HURWITZ, E. (1985) in <i>Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy</i> , Eds. Baldwin, R.W., Byers, V.S., Academic Press, 365-383.	10, 12
ASHWELL, G. et HARFORD, J. (1982) <i>Ann. Rev. Biochem.</i> , <u>51</u> , 531-554.	40
ASHWELL, G. et MORELL, A.G. (1971) in <i>Glycoproteins of blood cells and plasma</i> , Eds. Jamieson, G.A. et Greenwalt, T.J., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 173-189.	42
ASHWELL, G. et MORELL, A.G. (1974) <i>Adv. Enzymol.</i> , <u>41</u> , 99-128.	40, 42
AUBEL-SADRON, G. et LONDOS-GAGLIARDI, D. (1984) <i>Biochimie</i> , <u>66</u> , 333-352.	83
BACHUR, N.R., GORDON, S.L. et GEE, M.V. (1978) <i>Cancer Res.</i> , <u>38</u> , 1745-1750.	85
BAENZIGER, J.U. et MAYNARD, Y. (1980) <i>J. Biol. Chem.</i> , <u>255</u> , 4607-4613.	49, 50, 51
BALDWIN, R.W. et BYERS, V.S. (1986) <i>Biofutur (mars)</i> , 53-55.	8, 9
BALDWIN, R.W., EMBLETON, M.J., PIMM, M.V. (1983) <i>Bull. Cancer (Paris)</i> , <u>70</u> , 132-136.	12
BALI, A., DHAWAN, S. et GUPTA, C.M. (1983) <i>FEBS Lett.</i> , <u>154</u> , 373-377.	21
BARBANTI-BRODANO, G., DERENZINI, M. et FIUME, L. (1974) <i>Nature</i> , <u>248</u> , 63-65.	28
BARBILLAT, J. (1983) <i>Thèse de Doctorat d'Etat (Sciences physiques)</i> , Lille: Etude d'une seconde génération de microsonde optique à effet Raman mettant à profit les avantages de la détection multicanale.	125
BARBILLAT, J., DHAMELINCOURT, P., DELHAYE, M. et DA SILVA, E. (1985) <i>Microbeam Analysis</i> , 15-18.	125
BARBILLAT, J., DHAMELINCOURT, P., CORNARD, J.P. et LENAIN, B. (1987) <i>Microbeam Analysis</i> , 210.	126
BATES, D.A., FUNG, H. et MACKILLOP, W.J. (1985) <i>Cancer Letters</i> , <u>28</u> , 213-221.	151

	<i>pages</i>
BERNARD, J., PAUL, R., BOIRON, M., JACQUILLAT, C. et MARAL, R. (1969) in <i>Recent Results in Cancer Research</i> , vol. 20: Rubidomycin, Springer-Verlag, 46.	198
BERNSTEIN, A., HURWITZ, E., MARON, R., ARNON, R., SELA, M. et WILCHEK, M. (1978). <i>J. Natl. Cancer Inst.</i> , <u>60</u> , 379-384.	35
BEZOUSKA, K., TABORSKY, O., KUBRYCHT, J., POSPISIL, M. et KOUCUREK, J. (1985) <i>Biochem. J.</i> , <u>227</u> , 345-354.	66
BLACK, C.D.V. et GREGORIADIS, G. (1974) <i>Biochem. Soc. Trans.</i> , <u>2</u> , 869-871.	19
BLYTHMAN, H.E., CASELLAS, P., GROS, O., GROS, P., JANSEN, F.K., PAOLUCCI, F., PAN, B. et VIDAL, H. (1981) <i>Nature</i> , <u>290</u> , 145-146.	15
BRIDGES, K., HARFORD, J., ASHWELL, G. et KLAUSNER, R.D. (1982) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , <u>79</u> , 350-354.	59, 60
BUMOL, T.F., WANG, Q.C., REISFELD, R.A. et KAPLAN, N.O. (1983) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , <u>80</u> , 529-533.	15
CAWLEY, D.B., SIMPSON, D.L. et HERSCHMAN, H.R. (1981) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , <u>78</u> , 3383-3387.	75, 76
CHAIRES, J.B., DATTAGUPTA, N. et CROTHERS, D.M. (1982) <i>Biochemistry</i> , <u>21</u> , 3927-3932.	194
CHAIRES, J.B., DATTAGUPTA, N. et CROTHERS, D.M. (1985) <i>Biochemistry</i> , <u>24</u> , 260-267.	85
CHANG, T.M.S. (1985) <i>Methods in Enzymology</i> , <u>112</u> , Part A: Drug and Enzyme Targeting, Eds. Widder, K.J., Green, R., Academic Press, 195-203.	36
CHIAICCHIA, K.B. et DRICKAMER, K. (1984) <i>J. Biol. Chem.</i> , <u>259</u> , 15440-15446.	50
COLLEY, C.M. et RYMAN, B.E. (1976) <i>Trends Biochem. Sci.</i> , <u>1</u> , 203-205.	22
DAUTRY-VARSAT, A. et LODISH, H. (1984) <i>Pour la Science</i> (juillet), 78-85.	60, 61
DEAN, M.F. et MUIR, H. (1979) in <i>Drug Carriers in Biology and Medicine</i> , Ed. Gregoriadis, G., Academic Press, 211-233.	36
DEBANNE, M.T., BOLYOS, M., GAULDIE, J. et REGOECZI, E. (1984) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , <u>81</u> , 2995-2999.	58
DE DUVE, C. (1955) <i>Biochem. J.</i> , <u>60</u> , 604-617.	179
DELHAYE, M. (1981) <i>Techniques de l'ingénieur (Analyse, Chimie et caractérisation)</i> , <u>7</u> , 2869.	121
DELHAYE, M. et DHAMELINCOURT, P. (1975) <i>J. Raman Spectroscopy</i> , <u>3</u> , 33-43.	121
DELHAYE, M., DHAMELINCOURT, P. et DA SILVA, E. (1976) "Microsonde	121

optique à LASER", brevet A.N.V.A.R. n° 7 621 539.

DELPLACE-DELHAYE, F. (1982) Thèse de Troisième Cycle (Biochimie), Lille I: Ciblage de drogues antitumorales par glycosylation. Mise au point de procédés de couplage à des glycoconjugués. 87, 88, 99, 115, 201

DENNIS, P.A. et ARONSON, N.N. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 798, 14-20. 59

DHAMELINCOURT, P. (1979) Thèse de Doctorat d'Etat (Sciences Physiques), Lille: Etude et réalisation d'une microsonde moléculaire à effet Raman. Quelques domaines d'application. 121

DOEBBER, T.W., WU, M.S., BUGIANESI, R.L., PONPIPOM, M.M., FURBISH, F.S., BARRANGER, J.A., BRADY, R.O. et SHEN, T.Y. (1982) J. Biol. Chem., 257, 2193-2199. 75, 78, 81

DOYLE, D., HOU, E. et WARREN, R. (1979) J. Biol. Chem., 254, 6853-6856. 60

DRICKAMER, K. (1981) J. Biol. Chem., 256, 5827-5839. 49, 66

DRICKAMER, K. et MAMON, J.F. (1982) J. Biol. Chem., 257, 15156-15161. 66

DRICKAMER, K., MAMON, J.F., BINNS, G. et LEUNG, J.O. (1984) J. Biol. Chem., 259, 770-778. 49, 50, 66

DUNN, W.A., HUBBARD, A.L. et ARONSON, N.N. (1980) J. Biol. Chem., 255, 5971-5978. 59

FIDLER, I.J. (1980) Science, 208, 1469-1470. 25

FIDLER, I.J., SONE, S., FOGLER, W.E. et BARNES, Z.L. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1680-1684. 25

FIETE, D., BROWNELL, M.D. et BAENZIGER, J.U. (1983) J. Biol. Chem., 258, 817-823. 59

FISCHER, H.D., GONZALEZ-NORIEGA, A. et SLY, W.S. (1980a) J. Biol. Chem., 255, 5069-5074. 67

FISCHER, H.D., GONZALEZ-NORIEGA, A., SLY, W.S. et MORRE, D.J. (1980b) J. Biol. Chem., 255, 9608-9615. 67, 69

FIUME, L., BASSI, B., BUSI, C., MATTIOLI, A. et SPINOSA, G. (1986) Biochem. Pharmacol., 35, 967-972. 75, 77

FIUME, L., BUSI, C. et MATTIOLI, A. (1982) FEBS Lett., 146, 42-46. 75, 77

FIUME, L., BUSI, C. et MATTIOLI, A. (1983) FEBS Lett., 153, 6-10. 29

FIUME, L., BUSI, C., MATTIOLI, A., BALBONI, P.G. et BARBANTI-BRODANO, G. (1981) FEBS Lett., 129, 261-264. 75, 77

FIUME, L., MATTIOLI, A., BALBONI, P.G., TOGNON, M., BARBANTI-BRODANO, G., DE VRIES, J. et WIELAND, T. (1979) FEBS 75, 76

Lett., <u>103</u> , 47-51.	
FIUME, L., MATTIOLI, A., BUSI, C., BALBONI, P.G., BARBANTI-BRODANO, G., DE VRIES, J., ALTMANN, R. et WIELAND, T. (1980) FEBS Lett., <u>116</u> , 185-188.	75, 76
FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.F.G., BINETTE, J.P. et SCHMID, K. (1978) Biochemistry, <u>17</u> , 5206-5214.	89, 91
GABEL, C.A., GOLDBERG, D.E. et KORNFELD, S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>80</u> , 775-779.	69
GARDNER, C.R. (1985) Biomaterials, <u>6</u> , May, 153-160.	1
GEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.J.A. et SCHWARTZ, A.L. (1983) Eur. J. Cell Biol., <u>32</u> , 38-44.	62
GHOSE, T. et BLAIR, A.H. (1978) J. Natl. Cancer Inst., <u>61</u> , 657-676.	9, 10
GHOSH, P., DAS, P.K. et BACHHAWAT, B.K. (1982) Arch. Biochem. Biophys., <u>213</u> , 266-270.	27
GILLILAND, D.G., STEPLEWSKI, Z., COLLIER, R.J., MITCHELL, K.F., CHANG, T.H. et KOPROWSKI, H. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>77</u> , 4539-4543.	15
GINOT, L. (1985) Thèse de Doctorat de Troisième Cycle (Disciplines Pharmaceutiques) Reims: Etude biochimique de l'interaction Adriamycine - cellules tumorales; Apport de la microspectrofluorimétrie LASER.	157
GOORMAGHTIGH, E., BRASSEUR, R., HUART, P. et RUYSSCHAERT, J.M. (1987) Biochemistry, <u>26</u> , 1789-1794.	194
GOORMAGHTIGH, E., CHATELAIN, P., CASPERS, J. et RUYSSCHAERT, J.M. (1980) Biochim. Biophys. Acta, <u>597</u> , 1-14.	192
GOORMAGHTIGH, E., HUART, P., BRASSEUR, R. et RUYSSCHAERT, J.M. (1986) Biochim. Biophys. Acta, <u>861</u> , 83-94.	192, 193, 194
GOORMAGHTIGH, E. et RUYSSCHAERT, J.M. (1984) Biochim. Biophys. Acta, <u>779</u> , 271-288.	85
GREGORIADIS, G. (1977) Nature, <u>265</u> , 407-411.	4, 5, 6
GREGORIADIS, G. (1979) in Drug Carriers in Biology and Medicine, Ed. Gregoriadis, G., Academic Press, 287-341.	16, 17, 20, 22
GREGORIADIS, G., MORELL, A.G., STERNLIEB, I. et SCHEINBERG, I.H. (1970) J. Biol. Chem., <u>245</u> , 5833-5837.	43, 198
GREGORIADIS, G. et NEERUNJUN, E.D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>65</u> , 537-544.	27
GROS, O., GROS, P., LIANCE, M.C. et JANSEN, F.K. (1986) Biofutur (mars), 50-52.	14, 16

	pages
HALTIWANGER,R.S. et HILL,R.L. (1986) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 7440-7444.	71
HALTIWANGER,R.S., LEHRMAN,M.A., ECKHARDT,A.E. et HILL,R.L. (1986) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 7433-7439.	73
HARDY,M.R., TOWNSEND,R.R., PARKHURST,S.M. et LEE,Y.C. (1985) Biochemistry, <u>24</u> , 22-28.	52,55,88
HARFORD,J. et ASHWELL,G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>78</u> , 1557-1561.	50
HARFORD,J. et ASHWELL,G. (1982) in The Glycoconjugates, Vol.IV, Part B, Ed. Horowitz,M.I., Academic Press, 27-55.	40
HARFORD,J., BRIDGES,K., ASHWELL,G. et KLAUSNER,R.D. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 3191-3197.	59
HARSCH,M., WALTHER,P., WEDER,H.G. et HENGARTNER,H. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>103</u> , 1069-1076.	27
HASILIK,A. et NEUFELD,E.F. (1980) J. Biol. Chem., <u>255</u> , 4946-4950.	67
HEATH,T.D., LOPEZ,N.G., STERN,W.H. et PAPAHAJDOPOULOS,D. (1985) FEBS Lett., <u>187</u> , 73-75.	25
HEATH,T.D., MONTGOMERY,J.A., PIPER,J.R. et PAPAHAJDOPOULOS,D. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>80</u> , 1377-1381.	27
HENRY,N., FANTINE,E.O., BOLARD,J. et GARNIER-SUILLEROT,A. (1985) Biochemistry, <u>24</u> , 7085-7092.	192
HICKMAN,J., ASHWELL,G., MORELL,A.G., VAN DEN HAMER,C.J.A. et SCHEINBERG,I.H. (1970) J. Biol. Chem., <u>245</u> , 759-766.	43
HICKMAN,S., SHAPIRO,L.J. et NEUFELD,E.F. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>57</u> , 55-61.	67
HILDENBRANDT,G.R. et ARONSON,N.N. (1979) Biochim. Biophys. Acta, <u>587</u> , 373-380.	46
HILDENBRANDT,G.R. et ARONSON,N.N. (1980) Biochim. Biophys. Acta, <u>631</u> , 499-502.	27
HOFACK,B. et KORNFELD,S. (1985a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>82</u> , 4428-4432.	70
HOFACK,B. et KORNFELD,S. (1985b) J. Biol. Chem., <u>260</u> , 12008-12014.	70
HOPPE,C.A. et LEE,Y.C. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 14193-14199.	71
HOWARD,D.J., STOCKERT,R.J. et MORELL,A.G. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 2856-2858.	56
HUDGIN,R.L., PRICER,W.E., ASHWELL,G., STOCKERT,R.J. et MORELL,A.G. (1974) J. Biol. Chem., <u>249</u> , 5536-5543.	47

	<i>pages</i>
HURWITZ,E., LEVY,R., MARON,R., WILCHEK,M., ARNON,R. et SELA,M. (1975) <i>Cancer Res.</i> , <u>35</u> , 1175-1181.	10,11
HURWITZ,E., MARON,R., ARNON,R., WILCHEK,M. et SELA,M. (1978) <i>Europ. J. Cancer</i> , <u>11</u> , 1213-1220.	10,11
IHLER,G.M. (1979) in <i>Drug Carriers in Biology and Medicine</i> , Ed. Gregoriadis,G., Academic Press, 129-153.	35
ILLUM,L. et JONES,P.D.E. (1985) <i>Methods in Enzymology</i> , <u>112</u> , Part A: Drug and Enzyme Targeting, Eds. Widder,K.J., Green,R., Academic Press, 67-84.	37
JANSONS,V.K. et PANZNER,E.A. (1983) <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , <u>735</u> , 433-437.	23
KAPLAN,A., ACHORD,D.T. et SLY,W.S. (1977) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , <u>74</u> , 2026-2030.	67
KATAOKA,M. et TAVASSOLI,M. (1985) <i>Exp. Hematol.</i> , <u>13</u> , 44-50.	70
KAWASAKI,T. et ASHWELL,G. (1976a) <i>J. Biol. Chem.</i> , <u>251</u> , 1296-1302.	47,49
KAWASAKI,T. et ASHWELL,G. (1976b) <i>J. Biol. Chem.</i> , <u>251</u> , 5292-5299.	47
KAWASAKI,T. et ASHWELL,G. (1977) <i>J. Biol. Chem.</i> , <u>252</u> , 6536-6543.	49,65
KAWASAKI,T., ETOH,R. et YAMASHINA,I. (1978) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , <u>81</u> , 1018-1024.	71
KITAO,T. et HATTORI,K. (1977) <i>Nature</i> , <u>265</u> , 81-82.	33
KLIBANOV,A.L., MUZYKANTOV,V.R., IVANOV,N.N. et TORCHILIN,V.P. (1985) <i>Anal. Biochem.</i> , <u>150</u> , 251-257.	27
KOFF,W.C. et FIDLER,I.J. (1985) <i>Antiviral Research</i> , <u>5</u> , 179-190.	21
KOFF,W.C., FIDLER,I.J., SHOWALTER,S.D., CHAKRABARTY,M.K., HAMPAR,B., CECCORULLI,L.M. et KLEINERMAN,E.S. (1984) <i>Science</i> , <u>224</u> , 1007-1009.	27
KOLB-BACHOFEN,V., SCHLEPPER-SCHAFFER,J., TERADEIRA,R., VOGT,D. et KOLB,H. (1983) in <i>Structural Carbohydrates in the Liver</i> , Eds. Popper,H., Köttgen,E., Reutter,W., Gudat,F., MTP Press, 277-286.	66
KOTSIFAKI,H., KAPOULAS,V. et DELICONSTANTINOS,G. (1985) <i>Gen. Pharmac.</i> , <u>16</u> , 573-577.	23
KOZUTSUMI,Y., KAWASAKI,T. et YAMASHINA,I. (1980) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , <u>95</u> , 658-664.	71
KRANTZ,M.J., HOLTZMAN,N.A., STOWELL,C.P. et LEE,Y.C. (1976) <i>Biochemistry</i> , <u>15</u> , 3963-3968.	52

	pages
KROSLICK, K.A., VILLEMEZ, C., ISAKSON, P., UHR, J.W. et VITETTA, E.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>77</u> , 5419-5423.	15
KUSIAK, J.W., QUIRK, J.M. et BRADY, R.O. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>94</u> , 199-204.	70
LAEMMLI, U.K. (1970) Nature, <u>227</u> , 680-685.	184
LANG, T. et DE CHASTELLIER, C. (1985) Biol. Cell, <u>53</u> , 149-154.	70
LANGER, R., BROWN, L. et EDELMAN, E. (1985) Methods in Enzymology, <u>112</u> , Part A: Drug and Enzyme Targeting, Eds. Widder, K.J., Green, R., Academic Press, 399-422.	36
LARGENT, B.L., WALTON, K.M., HOPPE, C.A., LEE, Y.C. et SCHNAAR, R.L. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 1764-1769.	71
LEE, R.T., LIN, P. et LEE, Y.C. (1984) Biochemistry, <u>23</u> , 4255-4261.	52
LEE, Y.C., TOWNSEND, R.R., HARDY, M.R., LONNGREN, J., ARNARP, J., HARALDSSON, M. et LONN, H. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 199-202.	52
LEHRMAN, M.A., HALTIWANGER, R.S. et HILL, R.L. (1986b) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 7426-7432.	73
LEHRMAN, M.A. et HILL, R.L. (1986) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 7419-7425.	73
LEHRMAN, M.A., PIZZO, S.V., IMBER, M.J. et HILL, R.L. (1986a) J. Biol. Chem., <u>261</u> , 7412-7418.	73
LEONG, K.W., BROTT, B.C. et LANGER, R. (1985) J. Biomed. Mater. Res., <u>19</u> , 941-955.	37
LEVI-SCHAFFER, F., BERNSTEIN, A., MESHORER, A. et ARNON, R. (1982) Cancer Treat. Rep., <u>66</u> , 107-114.	35
LEVY, R., HURWITZ, E., MARON, R., ARNON, R. et SELA, M. (1975) Cancer Res., <u>35</u> , 1182-1186.	10, 11
LORENZINA-FIALLO, M.M. et GARNIER-SUILLEROT, A. (1986) Biochim. Biophys. Acta, <u>854</u> , 143-146.	192
LOWE, M. et NILSSON, B. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 1885-1887.	47, 48
LOWRY, O.W., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem., <u>193</u> , 265-275.	151, 157
LUNNEY, J. et ASHWELL, G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>73</u> , 341-343.	65
MACHY, P. et LESERMANN, L.D. (1983) Biochim. Biophys. Acta, <u>730</u> , 313-320.	19
MANFAIT, M. (1981) Thèse de Doctorat d'Etat (Sciences Physiques), Reims: Etude par spectroscopie Raman de substances anticancéreuses libres, en interaction avec l'ADN et dans des	155, 157

	<i>pages</i>
cellules tumorales.	
MANFAIT, M., BERNARD, L. et THEOPHANIDES, T. (1981) J. Raman Spectrosc., <u>11</u> , 68-74.	136
MARSHALL, J.S. et WILLIAMS, S. (1978) Biochim. Biophys. Acta, <u>543</u> , 41-52.	56
MARTIN, F.J. et PAPAHA DJOPOULOS, D. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 286-288.	27
MASQUELIER, M., BAURAIN, R. et TROUET, A. (1980) J. Med. Chem., <u>23</u> , 1166-1170.	182
MASUHO, Y., HARA, T. et NOGUCHI, T. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>90</u> , 320-326.	15
MAYNARD, Y. et BAENZIGER, J.U. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 8063-8068.	71, 72
MAYNARD, Y. et BAENZIGER, J.U. (1982) J. Biol. Chem., <u>257</u> , 3788-3794.	71
MEHTA, R., LOPEZ-BERESTEIN, G., HOPFER, R., MILLS, K. et JULIANO, R.L. (1984) Biochim. Biophys. Acta, <u>770</u> , 230-234.	23
MIZUNO, Y., KOZUTSUMI, Y., KAWASAKI, T. et YAMASHINA, I. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 4247-4252.	71
MOLTENI, L. (1979) in Drug Carriers in Biology and Medicine, Ed. Gregoriadis, G., Academic Press, 107-125.	34
MONSIGNY, M., KIEDA, C. et ROCHE, A.C. (1979) in Membrane Glycoconjugates, Eds. Monsigny, M., Schrevel, J., Biol. Cell, <u>36</u> , 289-300.	38, 39
MONSIGNY, M., KIEDA, C. et ROCHE, A.C. (1983) Biol. Cell, <u>47</u> , 95-110.	38, 40, 41
MONSIGNY, M., KIEDA, C., ROCHE, A.C. et DELMOTTE, F. (1980) FEBS Lett., <u>119</u> , 181-186.	33, 94, 99, 201
MONSIGNY, M., ROCHE, A.C. et BAILLY, P. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>121</u> , 579-584.	75, 78, 79
MONTREUIL, J. (1984) Biol. Cell, <u>51</u> , 115-132.	53
MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1975) in Protein of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine, Ed. Crichton, R.R., Amsterdam, North-Holland, 27-38.	57
MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, I.H., HICKMAN, J. et ASHWELL, G. (1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 1461-1467.	43, 45, 57
MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB, I., SCHEINBERG, I.H. et ASHWELL, G. (1968) J. Biol. Chem., <u>243</u> , 155-159.	42, 44
MORELL, A.G. et SCHEINBERG, I.H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>48</u> , 808-815.	46

	<i>pages</i>
MURRAY,G.J. et NEVILLE,D.M. (1980) J. Biol. Chem., <u>255</u> , 11942-11948.	75,80
NOVOGRODSKY,A. et ASHWELL,G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>74</u> , 676-678.	46
OLDEN,K., PARENT,J.B. et WHITE,S.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta, <u>650</u> , 209-232.	38
O'KEEFE,D.O. et DRAPER,R.K. (1985) J. Biol. Chem., <u>260</u> , 932-937.	31
O'NEILL,G.J. (1979) in Drug Carriers in Biology and Medicine, Ed. Gregoriadis,G., Academic Press, 23-41.	10
PAPAHADJOPOULOS,D. (1979) Annual Reports in Medicinal Chemistry, <u>14</u> , 250-260.	16,19
PARTRIDGE,W.M., VAN HERLE,A.J., NARUSE,R.T., FIERER,G. et COSTIN,A. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 990-994.	56
PATEL,H.M. (1985) Biochem. Soc. Trans., <u>13</u> , 513-516.	18,21,23,24
PATEL,H.M. et RYMAN,B.E. (1976) FEBS Lett., <u>62</u> , 60-63.	23
PATEL,H.M., TUZEL,N.S. et RYMAN,B.E. (1983) Biochim. Biophys. Acta, <u>761</u> , 142-151.	21
PAULSON,J.C., HILL,R.L., TANABE,T. et ASHWELL,G. (1977) J. Biol. Chem., <u>252</u> , 8624-8628.	46
PLUMBRIDGE,T.W. et BROWN,J.R. (1977) Biochim. Biophys. Acta, <u>479</u> , 441-449.	154,155
PORETZ,R.D. et PIECZENIK,G. (1981) Anal. Biochem., <u>115</u> , 170-176.	183
POZNANSKY,M.J., SINGH,R., SINGH,B. et FANTUS,G. (1984) Science, <u>223</u> , 1304-1306.	31
PRICER,W.E. et ASHWELL,G. (1971) J. Biol. Chem., <u>246</u> , 4825-4833.	46
PRICER,W.E. et ASHWELL,G. (1976) J. Biol. Chem., <u>251</u> , 7539-7544.	51,59
PRIEELS,J.P., PIZZO,S.V., GLASGOW,L.R., PAULSON,J.C. et HILL,R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>75</u> , 2215-2219.	73
RABEK,J.F. (1982) in Experimental Methods in Photochemistry and photophysics, Part 2, Chap. 21: Emission spectroscopy, John Wiley & Sons, 746-790.	135
RAHMAN,A., FUMAGALLI,A., BARBIERI,B., SCHEIN,P.S. et CASAZZA,A.M. (1986) Cancer Chemother. Pharmacol., <u>16</u> , 22-27.	25,26
RASO,V. et BASALA,M. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 1143-1149.	31

	<i>pages</i>
REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A., DEBANNE, M.T. et CHARLWOOD, P.A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>79</u> , 2226-2230.	57
REGOECZI, E., HATTON, M.W.C. et WONG, K.L. (1974) Can. J. Biochem., <u>52</u> , 155-161.	57
REGOECZI, E., TAYLOR, P., DEBANNE, M.T., MARZ, L. et HATTON, M.W.C. (1979) Biochem. J., <u>184</u> , 399-407.	57
REGOECZI, E., TAYLOR, P., HATTON, M.W.C., WONG, K.L. et KOJ, A. (1978) Biochem. J., <u>174</u> , 171-178.	57
REID, L.M. et ROJKIND, M. (1979) Methods in Enzymology, Eds. Jacoby, W.B. et Pastan, I.H., Academic Press, LVIII, 263-278.	141
RINGROSE, P.S. (1983) Biochem. Soc. Trans., <u>11</u> , 804-808.	32
ROBBINS, J.C., LAM, M.H., TRIPP, C.S., BUGIANESI, R.L., PONPIPOM, M.M. et SHEN, T.Y. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>78</u> , 7294-7298.	78
ROCHE, A.C., MIDOUX, P., BOUCHARD, P. et MONSIGNY, M. (1985) FEBS Lett., <u>193</u> , 63-68.	69, 70
ROGERS, J.C. et KORNFELD, S. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>45</u> , 622-629.	74, 75
ROME, L.H., WEISSMANN, B. et NEUFELD, E.F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>76</u> , 2331-2334.	67
ROOS, P.H., KOLB - BACHOFEN, V., SCHLEPPER - SCHAFFER, J., MONSIGNY, M., STOCKERT, R.J. et KOLB, H. (1983) FEBS Lett., <u>157</u> , 253-256.	66
ROSENFELD, E.L., BELENKY, D.M. et BYSTROVA, N.K. (1986) Biochim. Biophys. Acta, <u>883</u> , 306-312.	49, 50
SAHAGIAN, G.G., DISTLER, J. et JOURDIAN, G.W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>78</u> , 4289-4293.	67, 69
SAHAGIAN, G.G. et NEUFELD, E.F. (1983) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 7121-7128.	69
SALMON, J.M. (1980) Thèse de Doctorat d'Etat (Sciences Physiques) Perpignan: Réalisation d'un microspectrofluorimètre. Application à l'étude de quelques mécanismes cellulaires.	120
SARKAR, M., LIAO, J., KABAT, E.A., TANABE, T. et ASHWELL, G. (1979) J. Biol. Chem., <u>254</u> , 3170-3174.	51
SATO, S., IWAIZUMI, M., HANDA, K. et TAMURA, Y. (1977) Gann, <u>68</u> , 603-608.	85
SCHLESINGER, P.H., DOEBBER, T.W., MANDELL, B.F., WHITE, R., DESCHRYVER, C., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. et STAHL, P.D. (1978) Biochem. J., <u>176</u> , 103-109.	70
SCHLESINGER, P.H., RODMAN, J.S., DOEBBER, T.W., STAHL, P.D.,	70

- LEE, Y.C., STOWELL, C.P. et KUHLENSCHMIDT, T.B. (1980) *Biochem. J.*, 192, 597-606.
- SCHMER, G., HOLCENBERG, J.S. et ROBERTS, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 538, 397-405. 74, 75
- SCHMID, K., KAUFMANN, H., ISEMURA, S., BAUER, F., EMURA, J., MOTOYAMA, T., ISHIGURO, M. et NANNO, S. (1973) *Biochemistry*, 12, 2711-2724. 93
- SCHMID, K., MAC NAIR, M.B. et BURGI, A.F. (1958) *J. Biol. Chem.*, 230, 853-864. 89
- SCHWARTZ, A.L., FRIDOVICH, S.E., KNOWLES, B.B. et LODISH, H.F. (1981a) *J. Biol. Chem.*, 256, 8878-8881. 40, 62, 63  
88, 141, 142
- SCHWARTZ, A.L., FRIDOVICH, S.E. et LODISH, H.F. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 4230-4237. 62, 64, 141
- SCHWARTZ, A.L., MARSHAK-ROTHSTEIN, A., RUP, D. et LODISH, H.F. (1981b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3348-3352. 47, 49
- SCHWARTZ, A.L. et RUP, D. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 11249-11255. 49, 50, 65
- SCHWARTZ, A.L., RUP, D. et LODISH, H.F. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 9033-9036. 54
- SCHWARZE, P.E., TOLLESHAUG, H. et SEGLEN, P.O. (1985) *Carcinogenesis*, 6, 777-782. 56
- SEGLEN, P.O. (1976) *Methods in Cell Biology*, Ed. Prescott, D.M., Academic Press, XIII, 29-83. 140
- SERBOURCE-GOGUEL, N., BOREL, B., DODEUR, M., SCARMATO, P., BOUREL, B., FEGER, J. et DURAND, G. (1985) *Hepatology*, 5, 220-223. 56
- SHEPHERD, V.L., FREEZE, H.H., MILLER, A.L. et STAHL, P.D. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 2257-2261. 69
- SHEPHERD, V.L., LEE, Y.C., SCHLESINGER, P.H. et STAHL, P.D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1019-1022. 70
- SHIER, W.T. (1979) in *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Ed. Gregoriadis, G., Academic Press, 43-70. 32
- SHIER, W.T. (1985) *Methods in Enzymology*, 112, Part A: Drug and Enzyme Targeting, Eds. Widder, K.J., Green, R., Academic Press, 248-258. 32
- SIEGFRIED, J.M., BURKE, T.G. et TRITTON, T.R. (1985) *Biochem. Pharmacol.*, 34, 593-598. 151
- SKILETTER, D.N., PAINE, A.J. et THORPE, P.E. (1982) *Biochem. Soc. Trans.*, 10, 122-123. 75, 76
- SLY, W.S. et FISCHER, H.D. (1982) *J. Cell. Biochem.*, 18, 67-85. 69
- SPANJER, H.H., MORSELT, H. et SCHERPHOF, G.L. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 774, 49-55. 28
- SPIESS, M., SCHWARTZ, A.L. et LODISH, H.F. (1985) *J. Biol. Chem.*, 49, 50, 65

26C, 1979-1982.

- SPIK, G. (1982) in The Biochemistry and Physiology of Iron, Eds Saltman, P. et Hegenauer, J., Elsevier North-Holland, 49-56. 57
- STAHL, P.D., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. et SCHLESINGER, P.H. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1399-1403. 70
- STAHL, P.D. et SCHLESINGER, P.H. (1980) Trends Biochem. Sci., 5, 194-196. 71
- STAHL, P.D., SCHLESINGER, P.H., SIGARDSON, E., RODMAN, J.S. et LEE, Y.C. (1980) Cell, 19, 207-215. 71
- STAHL, P.D., WILEMAN, T.E., DIMENT, S. et SHEPHERD, V.L. (1984) Biol. Cell, 51, 215-218. 71
- STEER, C.J. et ASHWELL, G. (1980) J. Biol. Chem., 255, 3008-3013. 54, 58
- STEER, C.J., KEMPNER, E.S. et ASHWELL, G. (1981) J. Biol. Chem., 256, 5851-5856. 50
- STEINER, A.W. et ROME, L.H. (1982) Arch. Biochem. Biophys., 214, 681-687. 67, 69
- STOCKERT, R.J. et BECKER, F.F. (1980) Cancer Res., 40, 3632-3634. 56
- STOCKERT, R.J., GARTNER, U., MORELL, A.G. et WOLKOFF, A.W. (1980a) J. Biol. Chem., 255, 3830-3831. 58
- STOCKERT, R.J., HOWARD, D.J., MORELL, A.G. et SCHEINBERG, I.H. (1980b) J. Biol. Chem., 255, 9028-9029. 60
- STOCKERT, R.J., MORELL, A.G. et SCHEINBERG, I.H. (1974) Science, 186, 365-366. 46
- STOCKERT, R.J., MORELL, A.G. et SCHEINBERG, I.H. (1977) Science, 197, 667-668. 46, 51
- STOWELL, C.P. et LEE, Y.C. (1978) J. Biol. Chem., 253, 6107-6110. 52
- STREETER, D.G., JOHL, J.S., GORDON, G.R. et PETERS, J.H. (1986) Cancer Chemother. Pharmacol., 16, 245-252. 166
- TAKAHASHI, T., NAKADA, H., OKUMURA, T., SAWAMURA, T. et TASHIRO, Y. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun., 126, 1054-1060. 50
- TANABE, T., PRICER, W.E. et ASHWELL, G. (1979) J. Biol. Chem., 254, 1038-1043. 47, 49, 51, 58
- TAYLOR, D.L. et WANG, Y-L. (1980) Nature, 284, 405-410. 120
- THOMAS, P. et JONES, M. (1978) Biochem. J., 173, 981-983. 46
- THORPE, P.E., ROSS, W.C.J., BROWN, A.N.F., MYERS, C.D., CUMBER, A.J., FOXWELL, B.M.J. et FORRESTER, J.T. (1984) Eur. J. 13

	<i>pages</i>
Biochem., <u>140</u> , 63-71.	
TOKES,Z.A., ROGERS,K.E. et REMBAUM,A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>79</u> , 2026-2030.	37
TOLLESHAUG,H. (1981) Int.J. Biochem., <u>13</u> , 45-51.	58
TOLLESHAUG,H., CHINDEMI,P.A. et REGOECZI,E. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 6526-6528.	57
TOLLESHAUG,H., KOLSET,S.O. et BERG,T. (1985) Biochem. Pharmacol., <u>34</u> , 1639-1645.	59
TOWNSEND,R.R., HARDY,M.R., WONG,T.C. et LEE,Y.C. (1986) Biochemistry, <u>25</u> , 5716-5725.	54
TOWNSEND,R.R. et STAHL,P.D. (1981) Biochem. J., <u>194</u> , 209-214.	71
TOWNSEND,R.R., WALL,D.A., HUBBARD,A.L. et LEE,Y.C. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>81</u> , 466-470.	59
TROUET,A., DEPRez-DE-CAMPENEERE,D., BAURAIN,R., HUYBRECHTS,M. et ZANEBERGH,A. (1979) in Drug Carriers in Biology and Medicine, Ed. Gregoriadis,G., Academic Press, 87-105.	33
TROUET,A., DEPRez-DE-CAMPENEERE,D., BAURAIN,R. et SCHNEIDER,Y.J. (1984) in Drug Design: Fact or Fantasy?, Eds: Jolles,G., WOOLDRIDGE,K.R.H., Academic Press, 3-18.	75,77
TROUET,A., MASQUELIER,M., BAURAIN,R. et DEPRez - DE - CAMPENEERE,D. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>79</u> , 626-629.	29,30,179, 182
TRUDEL,P. et GICQUAUD,C. (1985) Eur. J. Cell Biol., <u>38</u> , 27-33.	19
TSUKADA,Y., BISCHOF,W.K.D., HIBI,N., HIRAI,H., HURWITZ,E. et SELA,M. (1982a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>79</u> , 621-625.	10,11
TSUKADA,Y., HURWITZ,E., KASHI,R., SELA,M., HIBI,N., HARA,A. et HIRAI,H. (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>79</u> , 7896-7899.	10,11
TYRELL,D.A., HEATH,T.D., COLLEY,C.M. et RYMAN,B.E. (1976) Biochim. Biophys. Acta, <u>457</u> , 259-302.	16,18,20
VAN DEN HAMER,C.J.A., MORELL,A.G., SCHEINBERG,I.H. et ASHWELL,G. (1970) J. Biol. Chem., <u>245</u> , 4397-4402.	43
VAN LENTEN,L. et ASHWELL,G. (1972) J. Biol. Chem., <u>247</u> , 4633-4640.	54
VARGA,J.M. (1985) Methods in Enzymology, <u>112</u> , Part A: Drug and Enzyme Targeting, Eds. Widder,K.J., Green,R., Academic Press, 259-269.	31
VARGA,J.M., ASATO,N., LANDE,S. et LERNER,A.B. (1977) Nature, <u>267</u> , 56-58.	31
VITETTA,E.S. et UHR,J.W. (1985) Cell, <u>41</u> , 653-654.	13

VON FIGURA,K., GIESELMANN,V. et HASILIK,A. (1985) Biochem. J., <u>225</u> , 543-547.	69
WARREN,R. et DOYLE,D. (1981) J. Biol. Chem., <u>256</u> , 1346-1355.	58
WEIGEL,P.H. (1980) J. Biol. Chem., <u>255</u> , 6111-6120.	54
WEIGEL,P.H. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>101</u> , 1419-1425.	60
WEIGEL,P.H. et OKA,J.A. (1983a) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 5089-5094.	56
WEIGEL,P.H. et OKA,J.A. (1983b) J. Biol. Chem., <u>258</u> , 5095-5102.	56,60,88
WEIGEL,P.H. et OKA,J.A. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 1150-1154.	59
WEIMER,H.E., MEHL,J.W. et WINZLER,R.J. (1950) J. Biol. Chem., <u>185</u> , 561-568.	89
WEISSMANN,G., BLOOMGARDEN,D., KAPLAN,R., COHEN,C., HOFFSTEIN,S., COLLINS,T., GOTTLIEB,A. et NAGLE,D. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>72</u> , 88-92.	22
WIDDER,K.J., MORRIS,R.M., POORE,G., HOWARD,D.P., SENYEI,A.E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>78</u> , 579-581.	37
WILCHEK,M. (1979) Makromol. Chem. Suppl., <u>2</u> , 207-214.	11
WILEMAN,T., BOSHANS,R. et STAHL,P.D. (1985) J. Biol. Chem., <u>260</u> , 7387-7393.	71
WILSON,R. et MARSHALL,R.D. (1982) Biochem. Soc. Trans., <u>10</u> , 137-138.	23
WINKLER,J.R. et SEGAL,H.L. (1984) J. Biol. Chem., <u>259</u> , 1958-1962.	59
WISE,D.L., FELLMANN,T.D., SANDERSON,J.E. et WENTWORTH,R.L. (1979) in Drug Carriers in Biology and Medicine, Ed. Gregoriadis,G., Academic Press, 237-270.	37
WOLKOFF,A.W., KLAUSNER,R.D., ASHWELL,G. et HARFORD,J. (1984) J. Cell Biol., <u>98</u> , 375-381.	59
WONG,K.L., DEBANNE,M.T., HATTON,M.C.W. et REGOECZI,E. (1978) Int. J. Peptide Protein Res., <u>12</u> , 27-37.	57
YAMASHINA,I. et MAKINO,M. (1962) J. Biochem., <u>51</u> , 359-364.	92
YOULE,R.J., MURRAY,G.J. et NEVILLE,D.M. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>76</u> , 5559-5562.	75,80
ZANETTA,J.P., BRECKENBRIDGE,W.C. et VINCENDON,G. (1972) J. Chromatogr., <u>69</u> , 291-304.	89,92,103
ZINN,A.B., MARSHALL,J.S. et CARLSON,D.M. (1978) J. Biol. Chem., <u>253</u> , 6768-6773.	46

## RESUME

Le ciblage par glycosylation, que nous avons appliqué à un médicament antitumoral: la daunorubicine (DNR) dont la cardiotoxicité limite l'usage thérapeutique, consiste à greffer sur le principe actif des structures glucidiques susceptibles d'être spécifiquement reconnues par les lectines membranaires des cellules-cibles.

Ayant retenu comme modèles d'étude des cellules possédant les recepteurs des asialoglycoprotéines: les hépatocytes de Rat et les cellules d'hépatome humain HepG2, nous avons choisi, comme vecteurs, l'orosomucoïde désialylé et ses glycopeptides. Ces glycoconjugués ont été greffés sur la DNR par l'intermédiaire du bras de couplage Glc-S-Et-Arg-Leu.

Nous avons tiré parti des propriétés de fluorescence de la DNR pour analyser les produits de couplage synthétisés et étudier l'interaction entre le médicament libre ou glycosylé et les cellules. L'utilisation des techniques de microspectrofluorimétrie LASER (Microsonde Moléculaire, microfluorimètre à détection multicanale) a permis de mettre en évidence l'internalisation, par les cellules HepG2, de la DNR couplée aux glycoconjugués ainsi que la modification du mode de pénétration de la DNR couplée aux glycopeptides d'asialoorosomucoïde par rapport à la DNR libre. Ces résultats sont en faveur d'une endocytose de la DNR "glycosylée" par l'intermédiaire du récepteur spécifique du galactose des cellules HepG2.

Des expériences préliminaires ont été effectuées pour mettre au point la méthodologie d'étude de la destinée in vivo de la DNR libre ou couplée et pour étudier certains des mécanismes liés à l'activité ou à la toxicité de l'anthracycline (interaction avec l'ADN, interactions avec certains organes).

Nos résultats démontrent donc que le ciblage cellulaire de substances actives est parfaitement réalisable par une glycosylation spécifique de ces dernières.