

50376
1990
75

71349

50376
1990
75

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

spécialité : BIOCHIMIE

par **BENOIT FLAN**



LA GLYCOSYL - DAUNORUBICINE UN MODELE D'ETUDE POUR LE CIBLAGE CELLULAIRE DE MEDICAMENTS

soutenue le 11 avril 1990 devant la commission d'examen

Président : Pr. J. MONTREUIL
Rapporteurs : Pr. M. MONSIGNY
Pr. G. SPIK
Examineur : Dr. J.J. HUART

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 mixte de Recherche du CNRS n° 111 : 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.

A mes parents

A Valérie

A ma famille

en témoignage de mon affection

A Monsieur Le Professeur J. MONTREUIL

Vous avez bien voulu m'accueillir au sein de votre équipe et me confier un sujet de recherche qui m'a permis de me familiariser avec de nombreux aspects de la Biochimie. Pendant les cinq années que j'ai passées au laboratoire de Chimie Biologique, puis pendant la rédaction de ce mémoire, vous m'avez fait bénéficier de vos conseils et de votre soutien. Je vous remercie pour la confiance dont vous m'avez honoré et vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur Le Professeur M. MONSIGNY

Vous avez accepté de critiquer ce travail, montrant tout l'intérêt que vous avez toujours porté à nos recherches. Qu'il me soit permis ici de vous exprimer mes plus sincères remerciements.

A Madame Le Professeur G. SPIK

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail.
permettez-moi de vous témoigner mes plus vifs remerciements.

A Monsieur Le Dr. J.J. HUART

Je suis très honoré de votre présence dans ce jury
et vous prie d'accepter mes plus sincères remerciements pour
l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail.

Mes remerciements s'adressent également

à Madame le Dr. M. COLLYN pour l'expérience et les nombreux conseils dont elle m'a fait bénéficier,

à l'ensemble du personnel du C9 qui de près ou de loin, par leur compétence, leur aide et leur amitié ont contribué à la réalisation de ce travail. Je remercie tout particulièrement Mme DELPLACE pour les manipulations effectuées à la microsonde MOLE et au microfluorimètre LASER, Mme CONIEZ pour la culture des cellules et pour sa précieuse collaboration lors des expériences sur les cellules, ainsi que Mrs DELANNOY, DEBEIRE et PLANCKE,

à Mmes SELOSSE et BARTHELEMY et à tous ceux qui ont contribué à la présentation du mémoire.

	Pages
INTRODUCTION	
GENERALITES	
1 - LA DAUNORUBICINE ET LES ANTHRACYCLINES	4
1.1 - Mode d'action des anthracyclines	6
1.1.1 - Interaction des anthracyclines avec l'ADN	6
1.1.2 - Action des anthracyclines sur la membrane cellulaire	9
1.1.3 - Génération de radicaux libres	11
1.2 - Toxicité des anthracyclines	13
2 - LE CIBLAGE DES DROGUES	17
2.1 - Principes généraux du ciblage des drogues	17
2.1.1 - Les transporteurs macromoléculaires.	17
2.1.1.1 - Utilisation de l'albumine comme transporteur	19
2.1.1.2 - Utilisation des anticorps comme transporteurs	20
2.1.1.3 - Utilisation de l'ADN comme transporteur	23
2.1.2 - Les transporteurs cellulaires	24
2.1.3 - Les transporteurs synthétiques	25
2.2 - Applications du ciblage des drogues utilisant les propriétés de reconnaissance des sucres	31
2.2.1 - Les dextrans	32

	Pages
2.2.2 - Les lectines	34
2.2.2.1 - Conjugués lectine-enzyme	37
2.2.2.2 - Conjugués lectine-agent thérapeutique	38
2.2.2.3 - Conjugués lectine-toxine	39
2.2.3 - Les anticorps anti-oligosaccharides	40
2.2.4 - Les glycoconjugués	43
3 - LES LECTINES DE MEMBRANE	57
LE MODELE DU RECEPTEUR DES ASIALO-GLYCOPROTEINES DES HEPATOCYTES DE MAMMIFERE	
3.1 - Isolement et propriétés physicochimiques du récepteur	62
3.2 - Site de liaison des asialoglycoprotéines	66
3.3 - Endocytose et devenir des asialoglycoprotéines endocytées	70
3.3.1 - Fixation du ligand	70
3.3.2 - Internalisation du ligand	72
3.3.3 - Dissociation du complexe récepteur-ligand	78
3.3.4 - Localisation cellulaire et recyclage du récepteur	80
3.3.5 - Endocytose et besoins en énergie	81
3.3.6 - Dégradation du ligand	82
3.4 - Biosynthèse du récepteur	84
TRAVAUX PERSONNELS	90
MATERIEL ET METHODES	92

	Pages
1 - ETUDE DE LA FIXATION ET DE L'ENDOCYTOSE DES GLYCANNES DESIALYLES DE L'OROSOMUCOÏDE PAR LES HEPATOCYTES DE RAT	92
1.1 - Préparation des substrats	92
1.1.1 - Préparation de l'orosomucoïde	92
1.1.1.1 - Méthode par précipitation au sulfate d'ammonium	92
1.1.1.2 - Méthode par chromatographie d'échange d'ions	96
1.1.2 - Préparation de l'asialo-orosomucoïde	96
1.1.3 - Préparation des asialo-glycopeptides de l'orosomucoïde	97
1.1.4 - Préparation des asialo-glycannes de l'orosomucoïde	98
1.1.5 - Marquage radioactif des glycopeptides et des glycannes	99
1.1.5.1 - Marquage radioactif des substrats par le tritium (méthode à la galactose oxydase)	99
1.1.5.2 - Purification des substrats marqués	100
1.2 - Isolement des hépatocytes de Rat	101
1.2.1 - Isolement des cellules du foie de Rat	101
1.2.2 - Enrichissement de la préparation en hépatocytes	102
1.2.3 - Numération et viabilité	102
1.3 - Etude de l'interaction des glycopeptides et des glycannes désialylés et marqués avec les hépatocytes de Rat	103
1.3.1 - Etude cinétique de l'interaction ligand-hépatocyte	103
1.3.1.1 - Conditions d'incubation	103

	Pages
1.3.1.2 - Mesure de la radioactivité associée aux cellules	104
1.3.1.3 - Etude de la spécificité de l'interaction ligand récepteur	104
1.3.1.4 - Etude de l'endocytose du ligand	104
1.3.2 - Etude des constantes de l'interaction récepteur- ligand	105
2 - PREPARATION DE CONJUGUES DAUNORUBICINE-OLIGOSACCHARIDE	105
2.1 - Préparation d'un conjugué de la daunorubicine et du lactose	106
2.1.1 - Méthode de couplage	106
2.1.2 - Purification du conjugué	108
2.2 - Préparation du conjugué DNR-asialoglycannes de l'orosomucoïde	108
2.2.1 - Oxydation periodique des glycannes	108
2.2.2 - Couplage des glycannes oxydés à la daunorubicine	109
2.2.3 - Purification du conjugué	109
2.2.4 - Autres conjugués synthétisés	110
2.3 - Analyse des conjugués DNR-oligosaccharide	111
2.3.1 - Analyse en chromatographie sur couche mince	111
2.3.2 - Enregistrement des spectres d'absorption et d'émission (fluorescence) des conjugués	111
2.3.2.1 - Enregistrement des spectres d'absorption UV- visible des conjugués	111
2.3.2.2 - Enregistrement des spectres de fluorescence des conjugués	112

	Pages
2.3.3 - Analyse de la composition des conjugués	112
2.3.3.1 - Libération de l'aglycone par hydrolyse	112
2.3.3.2 - Identification du galactose dans les conjugués du lactose à la DNR	112
2.3.3.2.1 - Hydrolyse du conjugué	112
2.3.3.2.2 - Analyse en chromatographie en phase gazeuse	113
2.3.4 - Analyse de la pureté des conjugués	113
2.3.5 - Etude de l'hydrolyse enzymatique du conjugué de la DNR au lactose	113
3 - ETUDE DE L'ACTIVITE DU CONJUGUE DE LA DNR AU LACTOSE SUR LES CELLULES HEP G ₂	114
3.1 - Conditions de mise en culture des cellules Hep G ₂ et vérification de l'intégrité du récepteur des ASGP	116
3.1.1 - Conditions de mise en culture des cellules Hep G ₂	116
3.1.2 - Marquage de l'orosomucoïde et de l'asialo- orosomucoïde à l'iode ⁻¹²⁵	116
3.1.3 - Conditions d'incubation des cellules Hep G ₂ avec les substrats	118
3.2 - Etude de l'incorporation du conjugué de la DNR au lactose par les cellules Hep G ₂	119
3.3 - Etude de l'action cytotoxique sur les cellules Hep G ₂ des conjugués DNR-oligosaccharides (technique au ⁵¹ Cr)	121
3.3.1 - Marquage des cellules au ⁵¹ Cr	122
3.3.2 - Incubation avec les conjugués et mesure du relargage du ⁵¹ Cr	122

	Pages
3.4 - Etude de l'action de la DNR et de son conjugué au lactose sur la survie (plating efficiency) des cellules Hep G ₂	123
3.4.1 - Détermination du pourcentage de survie (plating efficiency) des cellules Hep G ₂	124
3.4.2 - Détermination des courbes de survie des cellules Hep G ₂ en présence de DNR et de son conjugué au lactose	125
3.5 - Etude de l'effet cytostatique du conjugué de la DNR au lactose sur les cellules Hep G ₂	126
3.5.1 - Etude de la cinétique de l'incorporation de méthyle-3H thymidine en présence de DNR et de son conjugué au lactose	126
3.5.2 - Etude en cytofluorométrie de flux de l'effet de la DNR et de son conjugué au lactose sur les cellules Hep G ₂	127
3.5.2.1 - Incubation avec les substances	128
3.5.2.2 - Préparation des échantillons pour l'analyse en cytofluorométrie de flux	128
RESULTATS ET DISCUSSION	130
1 - ETUDE DE LA FIXATION ET DE L'ENDOCYTOSE DES GLYCANNES DESIALYLES DE L'OROSOMUCOIDE PAR LES HEPATOCYTES DE RAT	130
1.1 - Etude des cinétiques des interactions récepteur - ligand	132
1.1.1 - Etude de la fixation des substrats aux hépatocytes	132
1.1.1.1 - Etude de la fixation à 4°C	132

1.1.1.2 - Etude de la spécificité de l'interaction récepteur - ligand	135
1.1.1.3 - Etude du déplacement du ligand fixé aux hépatocytes par l'EGTA	136
1.1.2 - Etude de la capture et de l'endocytose des substrats par les hépatocytes	139
1.1.2.1 - Etude de la capture à 37°C	142
1.1.2.2 - Etude du déplacement du ligand associé aux cellules par l'EGTA	142
1.2 - Etude des paramètres de l'association glycanne-récepteur et glycopeptide-récepteur	143
2 - PREPARATION DE CONJUGUES DE LA DAUNORUBICINE A DES OLIGOSACCHARIDES	151
2.1 - Préparation du conjugué de la DNR au lactose (lactityl-daunorubicine)	153
2.1.1 - Déroulement de la réaction de condensation	153
2.1.2 - Analyse du conjugué synthétisé	157
2.1.2.1 - Spectroscopie UV - visible	157
2.1.2.2 - Spectroscopie d'émission (fluorescence)	160
2.1.2.3 - Identification du galactose dans le produit de condensation de la DNR au lactose	160
2.1.2.3.1 - Hydrolyse acide	160
2.1.2.3.2 - Hydrolyse enzymatique	162
2.2 - Préparation de conjugués de la DNR à des glycanes de l'orosomucoïde désialylé	164
2.3 - Autres conjugués synthétisés	167

	Pages
3 - ETUDE DE L'ACTIVITE DU CONJUGUE DE LA DNR AU LACTOSE SUR LES CELLULES HepG ₂ : PENETRATION ET EFFETS CYTO- TOXIQUES	178
3.1 - Vérification de l'intégrité du récepteur des ASGP des cellules HepG ₂	178
3.2 - Etude de l'incorporation du conjugué DNR-lactose par les cellules Hep G ₂	180
3.2.1 - Visualisation et mise en évidence du conjugué lactityl-DNR dans le cytoplasme des cellules Hep G ₂	182
3.2.2 - Visualisation du conjugué lactityl-DNR après lyse cellulaire	182
3.3 - Etude de l'action cytotoxique des conjugués de la DNR aux oligosaccharides sur les cellules Hep G ₂ par marquage cellulaire au ⁵¹ Cr	190
3.3.1 - Effets de la daunorubicine	191
3.3.2 - Effets du lactityl-DNR	191
3.3.3 - Effets de la leucyl-DNR et des glycanes conjugués à la DNR	195
3.4 - Etude de l'action de la DNR et de son conjugué au lactitol sur la survie des cellules Hep G ₂ Technique des courbes de survie ("plating efficiency")	196
3.5 - Etude de l'effet cytostatique du conjugué de la DNR au lactose sur les cellules Hep G ₂	207
3.5.1 - Etude de l'incorporation de méthyle-H ³ thymidine	208
3.5.2 - Etude en cytofluorométrie de flux	210
CONCLUSION	217

INTRODUCTION

L'obstacle majeur à l'établissement d'une thérapie vient des effets secondaires. Si les drogues agissaient uniquement sur leur cible cellulaire ou moléculaire pour produire l'effet désiré, sans entraîner dans le même temps des effets indésirables sur d'autres systèmes, leur efficacité serait considérablement augmentée pour des doses absorbées beaucoup plus faibles.

En théorie, la spécificité pour une cible peut être obtenue sur la base d'une différence soit de sensibilité, soit d'accessibilité. On peut utiliser une drogue qui va partout mais qui n'agit que sur sa cible ou une drogue susceptible d'agir sur de nombreux systèmes mais qui ne va que sur sa cible.

Les agents antibactériens sont un bon exemple de sensibilité différentielle. La plupart d'entre eux doivent leur sélectivité à leur capacité d'interférer avec un métabolisme spécifique à leur bactérie-cible qui n'est pas partagé par l'hôte humain. La cellule cancéreuse, en revanche, qu'il est pratiquement impossible de distinguer de son hôte d'un point de vue génétique, constitue un défi à l'établissement d'une chimiothérapie sélective. Une approche de spécificité a néanmoins été obtenue en tirant parti de la principale propriété des cellules cancéreuses, à savoir leur capacité à se diviser. De cette manière, les cellules ne se divisant pas ou peu peuvent être épargnées, au moins en théorie. Dans la pratique, les agents antimitotiques font souvent plus que bloquer simplement la division cellulaire et la plupart présentent des effets secondaires néfastes comme la cardiotoxicité des anthracyclines (cf. § 1.2), ou la neurotoxicité de la vincristine. De toutes façons, ces drogues n'ont pas la possibilité de distinguer entre des cellules normales qui se divisent et des cellules cancéreuses, rendant impossible l'éradication complète des cellules néoplasiques sans entraîner des dommages parfois irréparables à certaines lignées cellulaires normales de la moelle osseuse, de la peau, des muqueuses ou des organes génitaux.

La thérapeutique serait considérablement améliorée si les drogues pouvaient être équipées de dispositifs spécifiques de la cible à atteindre, véritables têtes chercheuses dirigeant le médicament dans l'organisme. L'idée d'utiliser un transporteur pour guider les drogues vers leur cible n'est pas nouvelle [EHRlich (93)] , cependant elle ne s'est matérialisée que vers 1958 quand MATHE et coll. (185), ont préparé le premier conjugué par couplage chimique du méthotrexate à des anticorps spécifiques dirigés contre la leucémie L - 1210 de la Souris.

L'individualité des cellules repose principalement sur la présence à leur surface de marqueurs discriminants. Le ciblage des drogues, par le biais de transporteurs appropriés met à profit ces marqueurs afin d'obtenir une concentration sélective des drogues sur une cellule choisie.

Les drogues ciblées doivent être conçues sur la base d'informations précises qui souvent font encore défaut, concernant la connaissance approfondie de la surface des cellules aussi bien humaines que de nos agresseurs. La nature utilise de nombreux transporteurs destinés à apporter diverses molécules à telle ou telle cellule : les hormones, les anticorps opsonisants, les virus, les toxines bactériennes et un grand nombre de protéines plasmatiques en sont des exemples. C'est en tirant parti de ces transporteurs naturels que le ciblage des drogues a pris un essor considérable et fait maintenant l'objet d'une littérature abondante.

Les travaux qui ont été réalisés au laboratoire concernent le ciblage de la daunorubicine par conjugaison à des glycoconjugués dans le but de diriger spécifiquement cette drogue vers des récepteurs membranaires et de la détourner du muscle cardiaque où elle exerce une toxicité souvent dramatique.

Après avoir démontré que les glycannes sont endocytés par les hépatocytes de Rat par le biais de leur récepteur du

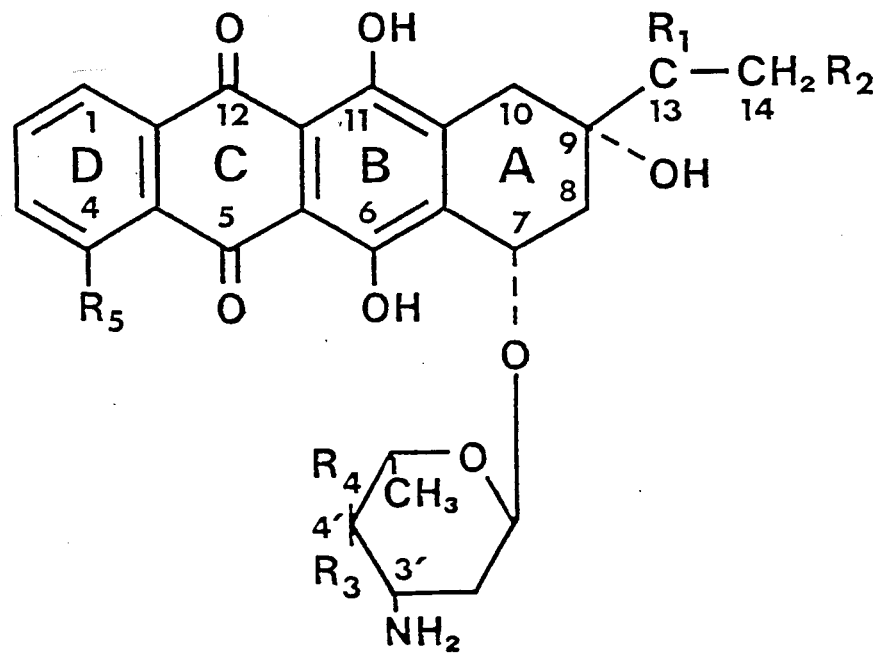
galactose et sont donc de bons candidats comme vecteurs de drogues, nos travaux personnels ont abouti à la synthèse d'un dérivé oligosaccharide-daunorubicine ayant conservé les propriétés cytotoxiques de la daunorubicine et ont permis la mise au point, au laboratoire, des techniques d'étude de la cytotoxicité in vitro. Avant de passer en revue ces travaux, les principales propriétés des anthracyclines seront dans un premier temps résumées. Nous nous attarderons ensuite sur les travaux qui ont été effectués dans l'optique du ciblage des drogues, en insistant sur le ciblage faisant appel aux propriétés de reconnaissance des sucres. Les lectines membranaires feront également l'objet d'un chapitre, la connaissance de celles-ci étant nécessaire dans l'optique que nous nous sommes fixée au laboratoire.

GENERALITES

1 - LA DAUNORUBICINE ET LES ANTHRACYCLINES

La daunorubicine (DNR), encore appelée daunomycine (DNM) ou ribidomycine ou rubomycine, appartient à la famille des anthracyclines. Les anthracyclines représentent une famille d'antibiotiques dont les principaux représentants sont, outre la DNR, la doxorubicine (DXR) ou adriamycine (ADR), (Fig. 1), ces deux dérivés ne différant l'un de l'autre que par la présence d'une fonction alcool en C₁₄ sur l'ADR. Ces dérivés présentent, en plus de propriétés d'indicateurs colorés (anthocyanines), des propriétés très intéressantes dans le traitement des tumeurs animales et humaines, ce qui explique l'intérêt constant qui leur est porté depuis leur découverte (plus de 2000 articles publiés depuis 1970) [ARCAMONE (6), CROOKE (64), DU VERNAY (91), AUBEL-SADRON et CONDOS-GAGLIARDI (19), BOUMA et coll. (42)]. La DNR a été isolée de Streptomyces peucetius [DI MARCO et coll. (83)] et, outre son activité antibactérienne, il a été montré qu'elle entraîne une inhibition remarquable de la tumeur d'ascite d'Ehrlich chez la Souris, augmentant la survie des animaux traités et qu'elle présente une activité antitumorale supérieure à celle des antibiotiques antitumoraux connus, la mitomycine C et l'actinomycine C, en particulier. A la suite de ces observations, de nombreux travaux ont été effectués visant 1) à établir l'efficacité clinique de la DNR dans le traitement de la leucémie aigüe, 2) à l'isolement et à la détermination de la structure chimique de la DXR qui présente un index thérapeutique plus puissant que la DNR, 3) à élargir le spectre d'utilisation de la DXR dans les tumeurs humaines par le biais d'études cliniques.

L'ADR et la DNR sont parmi les drogues anticancéreuses les plus utilisées et sont incluses dans la plupart des protocoles thérapeutiques employés dans des maladies telles que le cancer du sein, le cancer de l'ovaire et les lymphomes. Leur importance est particulièrement nette dans le traitement des leucémies aigües, l'apparition de cette famille de dérivés ayant révolutionné le traitement de la leucémie aigüe myéloblastique.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Doxorubicin	=O	OH	OH	H	OCH ₃
4'-Deoxydoxorubicin	=O	OH	H	H	OCH ₃
4'-Epidoxorubicin	=O	OH	H	OH	OCH ₃
Daunorubicin	=O	H	OH	H	OCH ₃
4-Demethoxydaunorubicin	=O	H	OH	H	H
Doxorubicinol	-OH	OH	OH	H	OCH ₃
Carminomycin	=O	H	OH	H	OH

Figure 1 Formules de la daunorubicine, de l'adriamycine (doxorubicine) et des principales anthracyclines.

Dans ce contexte, il est surprenant de constater qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'accord, ni sur le mécanisme par lequel ces drogues tuent les cellules cancéreuses, ni sur la façon dont elles exercent leur toxicité sur les tissus normaux. En effet, l'emploi des anthracyclines dans la chimiothérapie des cancers est limité par une toxicité (cardiotoxicité) importante qui leur confère un mauvais index thérapeutique et explique l'intérêt considérable qui est porté à la recherche d'analogues de ces molécules présentant une activité au moins identique, mais surtout une toxicité moindre.

1.1 - Mode d'action des anthracyclines

Trois hypothèses ont été avancées concernant le mode d'action des anthracyclines vis-à-vis des cellules tumorales [MYERS et coll. (203)]

1.1.1 - Interaction des anthracyclines avec l'ADN

Les anthracyclines sont susceptibles de s'intercaler dans la molécule d'ADN et d'entraîner la fragmentation de ce dernier. Dès 1965, WARD et coll. (323) ont proposé que la DNR agissait en inhibant à la fois la replication de l'ADN et la transcription de l'ARN par interaction directe avec l'ADN. La DNR et la DXR inhibent la croissance in vitro de nombreuses lignées cellulaires normales et néoplasiques. Cette inhibition est caractérisée par des lésions cellulaires, principalement dans le noyau. Des études effectuées en microscopie électronique et en microscopie à contraste de phase, ainsi qu'en autoradiographie, ont montré que les anthracyclines se lient aux chromosomes, ce qui a pour effet d'en altérer la physiologie. La capture cellulaire de ces composés entraîne une inhibition de la synthèse de l'ARN et de l'ADN dans les cellules en culture et chez l'animal aussi bien que dans des systèmes acellulaires. Les anthracyclines ont également un effet inhibiteur de diverses DNA polymérases [NEIDLE (205)].

La formation de complexes entre les anthracyclines antitumorales et l'ADN a fait l'objet de nombreuses études, cette macromolécule est en effet couramment considérée comme le récepteur principal de l'antibiotique au niveau cellulaire [DI MARCO et coll. (82)].

En 1972, ZUNINO et coll. (354), par des méthodes spectrophotométriques, de dialyse à l'équilibre, de viscosimétrie et de dénaturation thermique du complexe ont déterminé les constantes d'association de la DNR et de ses dérivés à l'ADN de thymus de veau ($K=3,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Les auteurs ont également démontré l'importance de la structure et de la stéréochimie de l'amino-sucres (la daunosamine) de la molécule (Cf Fig. 1) dans la liaison à l'ADN.

De même, GABBAY et coll. (116) ont confirmé que la force de la liaison des complexes ADN-anthracyclines et le degré d'inhibition de la RNA polymérase-DNA dépendante sont étroitement liés à la présence et à l'intégrité de l'amino-sucres. En effet, la substitution de la fonction amine de la daunosamine par des dérivés peptidiques diminue l'affinité de la drogue pour l'ADN et empêche vraisemblablement l'insertion complète de la molécule d'anthracycline entre les paires de bases de l'ADN. L'interaction stéréospécifique du résidu amino-sucres avec l'hélice d'ADN pourrait diriger l'orientation du chromophore tétracyclique de la molécule à l'intérieur du site d'intercalation, la chaîne latérale en C9 déterminant la force et la spécificité de l'interaction anthracycline-ADN [ZUNINO et coll. (353)].

Des études effectuées en RMN concernant l'interaction de la DNR avec des dinucléotides ont établi que la DNR formait des complexes stoechiométriques 1:1 avec les dinucléotides et que l'intensité de la liaison drogue-nucléotide dépendait de la composition en bases du dinucléotide [NUSS et coll. (211)]. QUIGLEY et coll. (233) ont établi la structure moléculaire d'un complexe ADN-DNR par diffraction des rayons X (Fig.2) et ont

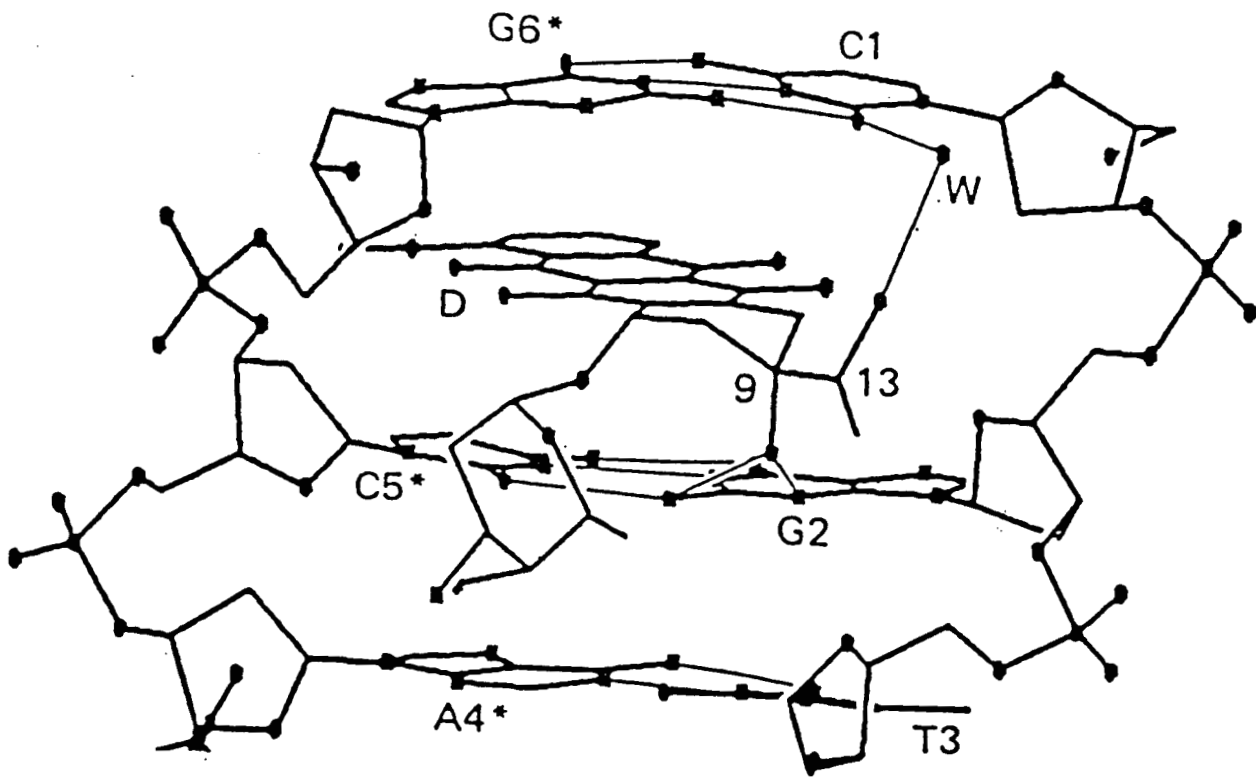


Figure 2 Représentation schématique de la daunorubicine (D) intercalée dans le fragment d'ADN d(CpGpTpApCpG) montrant les interactions intermoléculaires (●, atomes d'oxygène ; ■, atomes d'azote).
[d'après QUIGLEY et coll. (233)].

montré que la DNR s'intercalait entre deux paires de bases, la copule glucidique bloquant partiellement une troisième paire de bases, entraînant une distortion dans la double hélice de l'ADN. D'autre part, CHAIRES et coll. (52), ont démontré que la DNR se liait de préférence aux paires de bases guanine-cytosine et que cette liaison était exothermique. L'étude de la cinétique de l'interaction ADN-DNR [CHAIRES et coll. (53)], montre que celle-ci se décompose en trois étapes pour lesquelles le mécanisme suivant est proposé : liaison externe et rapide de la DNR à l'ADN, suivie soit d'un ajustement de conformation de la drogue ou du site de liaison à l'ADN ou d'une redistribution de la drogue liée vers des sites préférentiels.

Les anthracyclines sont également connues comme agents mutagènes et carcinogènes, cette dernière propriété n'ayant été démontrée que chez l'animal.

Bien que de nombreux travaux soient en faveur de l'interaction ADN-anthracycline, deux observations récentes suggèrent fortement que l'intercalation au niveau de l'ADN n'est pas le mécanisme d'action principal au niveau des cellules tumorales. En effet, on connaît maintenant des analogues d'anthracyclines dénués de propriétés intercalantes, mais qui sont des dérivés anticancéreux tout à fait actifs. De plus, le degré de fragmentation de l'ADN par l'ADR n'est pas corrélé avec la mort des cellules tumorales.

1.1.2 - Action des anthracyclines sur la membrane cellulaire

La deuxième hypothèse avancée concernant le mode d'action des anthracyclines est que ces composés exercent une action sur la membrane cellulaire. Il est clairement établi que l'ADR se lie à certains composants de la membrane cellulaire avec

une affinité identique ou supérieure à celle avec laquelle elle se lie à l'ADN. Cette fixation entraîne des perturbations des fonctions membranaires et de sa fluidité.

TRITTON et YEE (296) ont démontré que l'ADR peut exercer son action cytotoxique uniquement en interagissant avec la surface cellulaire. En effet, les auteurs ont couplé l'ADR à un support insoluble d'agarose de taille supérieure à celle des cellules étudiées et ont montré que ce conjugué présentait une réelle toxicité vis-à-vis de cellules L 1210 en culture. De même, l'absence de corrélation entre la cytotoxicité et la quantité de drogue liée à l'intérieur de la cellule [BATES et coll. (31)], suggère que l'ADR liée au noyau n'est pas fondamentalement impliquée dans la mort cellulaire et confirme les résultats de SIEGFRIED et coll. (267) montrant l'absence de corrélation entre l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques et la cytotoxicité de l'ADR sur les cellules de sarcome 180.

A la suite de ces observations, la surface cellulaire pourrait être considérée comme une cible potentielle pour une nouvelle génération d'agents anticancéreux. Ces résultats apparaissent également intéressants dans l'optique du ciblage des drogues : il ne serait peut-être pas indispensable qu'une anthracycline conjuguée à un vecteur spécifique de la cellule cible pénètre dans cette cellule pour exercer son action cytotoxique.

Cependant, la faiblesse de cette hypothèse repose sur le fait qu'elle ne propose pas de mécanisme précis par lequel les altérations membranaires observées pourraient entraîner la mort cellulaire, CHAHWALA et HICKMAN (51) ayant démontré à ce propos que des modifications de flux ioniques régulés par l'ATPase Na-K dépendante ou des perturbations de potentiel de membrane ne sont pas impliquées dans ce mode d'action.

1.1.3 - Génération de radicaux libres

La troisième hypothèse attribue la cytotoxicité des anthracyclines à la génération de radicaux libres, la cytotoxicité résulterait alors de la faculté de ces radicaux à détruire les membranes cellulaires ou l'ADN. Dans des systèmes acellulaires, il a été démontré que le radical semiquinonique de l'ADR peut réduire l'oxygène en superoxyde, peroxyde d'hydrogène et en hydroxyle, ce dernier étant l'un des oxydants les plus puissants, capable de détruire les membranes cellulaires et l'ADN [MYERS et coll. (203)]. Certaines lignées cellulaires sensibles à l'ADR réduisent l'ADR en radical semiquinonique, conduisant à la production de superoxyde, (Fig.3). GIANNI et coll. (119) ont montré que la formation d'ion Fe^{2+} est indispensable à la réduction de l'oxygène : l'ADR se lie au fer, permettant ainsi la réduction de l'oxygène moléculaire et la production de peroxyde d'hydrogène. La génération de radicaux libres par les anthracyclines a également été évoquée dans la cardiotoxicité de ces dérivés.

Les anthracyclines sont susceptibles d'interagir avec de nombreuses macromolécules biologiques [ARCAMONE (6)] : liaison avec des protéines nucléaires non-histones de foie de Rat, interaction avec la tubuline de cerveau de veau, avec les globules rouges humains par liaison à la spectrine, interaction avec des phospholipides et des mucopolysaccharides. Une augmentation de la cytotoxicité à médiation cellulaire, corrélée à une augmentation de l'interleukine - 2 a également été rapportée chez la Souris lors de l'administration d'ADR [EHRKE et coll. (92)]. La complexité de ces interactions des anthracyclines avec de nombreuses molécules explique la diversité de leurs effets biologiques. Ces composés sont capables, entre autres, de se lier à des récepteurs membranaires, d'entraîner la scission de brins d'ADN et la peroxydation des lipides, d'inhiber le transport du calcium et ils présentent une cardiotoxicité très importante [NEIDLE (205)].

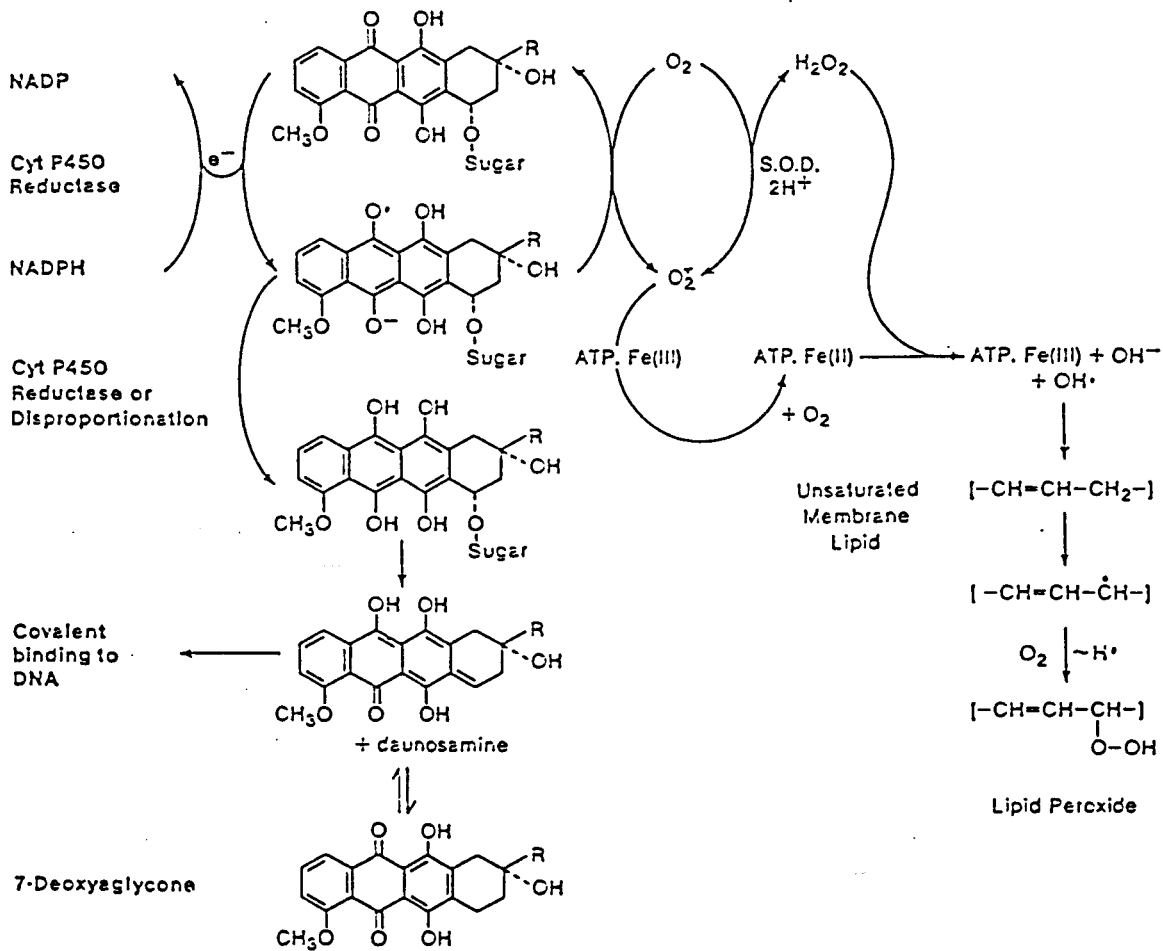


Figure 3

Réduction par le cytochrome P 450 du chromophore des anthracyclines entraînant la déglycosylation et la formation du dérivé 7-désoxyaglycone et interaction avec l'oxygène moléculaire provoquant la peroxydation des lipides [d'après LOWN et coll. (179)].

1.2 - Toxicité des anthracyclines

La cardiotoxicité des anthracyclines ne permet pas la pleine exploitation de leur activité antitumorale. VON HOFF et coll. (318) ont montré une augmentation importante du risque de toxicité cardiaque avec les composés les plus utilisés de cette famille (DNR et DXR) à forte dose et ceci de façon cumulative. Les auteurs ont établi une dose maximale cumulée de 600 mg/m² chez l'homme pour la DNR et de 550 mg/m² pour la DXR.

L'administration de DXR induit une cardiomyopathie congestive chronique et peut également entraîner des lésions cardiaques aiguës. En quelques minutes, l'administration d'une dose massive de DXR chez l'animal provoque dans les cellules cardiaques une fragmentation des nucléoles, suivie d'une agglutination de la chromatine des noyaux. En quelques heures, le réticulum sarcoplasmique, les tubules transverses et les mitochondries augmentent de volume, quelques mitochondries dégènèrent et les structures tubulaires deviennent coalescentes pour former de grandes vacuoles (Fig.4) [UNVERFERTH et coll. (306)]. Des altérations de l'électrocardiogramme après administration de DXR chez le Rat ont été reliées à des perturbations du potentiel transmembranaire cellulaire et à des modifications ultrastructurales mises en évidence dans des préparations isolées de coeurs de Rats traités [JENSEN et coll. (158)]. D'autres études histopathologiques et électrophysiologiques ont révélé la présence d'oedème interstitiel avec une augmentation du calcium et du sodium intracellulaires.

Des altérations aiguës des noyaux, des mitochondries et des tubules des cellules cardiaques ont également été rapportées chez l'Homme : dégénérescence des nucléoles, agglutination de la chromatine, gonflement des tubules et des mitochondries.

L'étiologie précise et la pathogénèse de ces perturbations ne sont pas connues avec certitude. Cependant, la



Figure 4 Modifications ultrastructurales du cœur de Rat induites par la doxorubicine (1 mg/kg x 20 traitements). Tissu isolé 14 semaines après la fin du traitement. Deux cellules adjacentes (A et B) sont présentées. La première montre un éclaircissement des mitochondries avec séparation des cristae ; la seconde est plus gravement atteinte, montrant un gonflement des mitochondries, un oedème cellulaire, une vacuolisation (flèches) et des ruptures des myofibrilles (*) (x 11700) [d'après JENSEN et coll. (158)].

formation de radicaux libres a été impliquée [DODD et MUKHERJEE (85)]. La génération de ces radicaux se fait par l'intermédiaire d'une réaction faisant intervenir une cytochrome P450 réductase et la formation de radicaux semiquinoniques, (Fig.3)[CHINAMI et coll. (56)]. Les radicaux libres entraîneraient la peroxydation des lipides membranaires provoquant des désordres importants au niveau des membranes mitochondriales et du réticulum endoplasmique ; FOLKERS et coll. (110) ont également suggéré que les analogies structurales entre le noyau anthraquinonique du chromophore des anthracyclines et les groupements quinoniques de divers coenzymes comme le CoE Q 10 entraîneraient l'inhibition, par la drogue, des enzymes mitochondriales, ce qui expliquerait sa toxicité.

DAVIES et DOROSHOW (67) ont démontré que la DNR et la DXR inhibaient la réduction du NAD⁺ en NADH. Les interactions des anthracyclines dans les systèmes rédox cellulaires via la NADH déhydrogénase mitochondriale génèrent des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et des ions hydroxyles qui pourraient être à l'origine de la cardiotoxicité de ces dérivés, les lésions observées au niveau des mitochondries du muscle cardiaque pouvant être dues à la formation d'ions hydroxyles [DOROSHOW et DAVIES (86)].

D'autre part, ZORZATO et coll. (352) ont montré que la DXR augmentait également la libération des ions Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique et provoquait une fuite du Ca²⁺ des citernes terminales. La DXR pourrait interagir avec les ponts à Ca²⁺ intervenant dans la libération physiologique du Ca²⁺. La cardiotoxicité dose - dépendante de la DXR pourrait ainsi être corrélée à une altération de l'homéostasie du calcium à l'intérieur de la cellule.

L'ADR est susceptible d'entraîner de nombreux autres effets secondaires tels que : nausées, vomissements, alopecie, anorexie, mucosite, myélosuppression et nécroses tissulaires

locales lorsque la substance se trouve extra-vasée [OKANO et coll. (214)].

Les anthracyclines constituent donc une famille d'agents anti-tumoraux extrêmement actifs mais dotés d'une toxicité telle qu'elle entraîne souvent l'arrêt de leur utilisation chez des patients chez qui ces médicaments constituent le traitement de choix. Ceci s'applique particulièrement dans le cancer du sein où la décision d'utiliser l'agent le plus actif dans la thérapie adjuvante doit être confrontée au risque de cardiotoxicité chez des sujets par ailleurs en bonne santé [GREEN et coll. (126)].

L'utilisation des anthracyclines se heurte également à l'apparition de cellules tumorales résistantes à ces dérivés [KAYE et MERRY (162)]. MARSH et CENTER (183), ont démontré à cet égard l'apparition de nombreuses modifications des protéines de membrane et de leur phosphorylation dans une lignée de cellules de poumon de Hamster résistante à l'ADR.

Dans le but de pallier la cardiotoxicité des anthracyclines ou l'apparition de résistances à ces drogues, de nombreuses recherches ont été effectuées visant, soit à mettre au point des analogues structuraux [ARCAMONE (7)], soit à modifier les protocoles thérapeutiques utilisant ces substances, soit à découvrir des agents cardioprotecteurs, soit enfin à détourner la drogue du coeur où elle exerce son action toxique, par le biais du ciblage de drogues. Ceci explique pourquoi les anthracyclines ont souvent servi de modèles dans la mise au point des systèmes de ciblage, que ce soit par des liposomes [VAN HOESEL et coll. (314)], par des anticorps [TSUKADA et coll. (303)], ou par des glycoconjugués, ce qui constitue le but de notre travail.

2 - LE CIBLAGE DES DROGUES

Le ciblage d'une drogue consiste à en modifier la pharmacocinétique en l'associant à un transporteur qui sera plus ou moins spécifique de la cible à atteindre. Le transporteur qui est destiné à véhiculer une drogue dans l'organisme doit répondre à un certain nombre de critères qui ont été définis par GREGORIADIS (128) et qui sont résumés dans le Tableau I.

Compte tenu du nombre de travaux existant à l'heure actuelle ayant trait au ciblage des drogues (des ouvrages entiers lui sont consacrés [GREGORIADIS, ed., (129)], il n'est pas possible, ici, de passer en revue tous les procédés actuellement à l'étude et les résultats obtenus. Aussi, nous contenterons-nous de ne citer que le principe des différentes voies de recherche explorées, en ne détaillant que les applications du ciblage faisant appel aux propriétés de reconnaissance qui ont été attribuées aux sucres depuis maintenant deux décennies.

2.1. - Principes généraux du ciblage des drogues

Les transporteurs, selon GREGORIADIS (129), peuvent être classés en trois catégories : on distingue les transporteurs macromoléculaires, cellulaires et artificiels. C'est cette classification que nous utiliserons dans ce paragraphe.

2.1.1. - Les transporteurs macromoléculaires.

La conjugaison d'une drogue avec une macromolécule susceptible d'être captée par les cellules cibles et d'y être digérée par les enzymes lysosomiques est une des voies d'approche du ciblage des drogues. Si la liaison entre la drogue et la macromolécule est clivée dans les lysosomes, la drogue peut être concentrée sous une forme active dans la cellule où elle est véhiculée par le transporteur [TROUET et coll. (299)]. Parmi les macromolécules actuellement à l'étude, citons l'albumine, les anticorps, l'ADN, les lectines, les glycoprotéines et les

TABLEAU I : Propriétés du transporteur idéal
[d'après GREGORIADIS (128)].

- 1- non toxique
- 2- biodégradable
- 3- forme et taille adaptées au transfert de substances variées
- 4- affinité particulière pour le site d'action de la molécule transportée
- 5- accessibilité aisée in vivo au site d'action de la molécule transportée
- 6- stabilité in vivo durant le trajet vers la cible à atteindre
- 7- élimination après libération de la molécule active à son site cible

dextrans. Dans ce paragraphe, nous étudierons rapidement les buts poursuivis dans l'utilisation de l'albumine, des anticorps et de l'ADN ainsi que les principaux résultats obtenus et les obstacles rencontrés. Les lectines, les glycoprotéines et les dextrans seront étudiés plus en détail ultérieurement.

2.1.1.1. - Utilisation de l'albumine comme transporteur

L'utilisation de l'albumine comme transporteur de drogues a pour objet de concentrer la drogue dans les macrophages. FIUME et ses collaborateurs ont ainsi conjugué l'amanitine à l'albumine. Alors que l'amanitine non conjuguée, injectée chez la Souris entraîne une nécrose du foie et des reins, avec une atteinte sélective des hépatocytes, le conjugué amanitine-albumine est hautement hépatotoxique, produisant des lésions nucléaires caractéristiques de l'amanitine au niveau des cellules sinusoidales. Des expériences in vitro ont montré que les cellules présentant un taux de capture élevé, comme les macrophages péritonéaux de Souris, sont beaucoup plus sensibles au conjugué amanitine-albumine que d'autres cellules présentant un taux de phagocytose plus faible [BARBANTI-BRODANO et FIUME (26)].

Des conjugués à l'albumine ont donc été synthétisés dans le but de traiter les proliférations néoplasiques des macrophages, ainsi que les infections causées par des virus à ADN se développant dans les macrophages. C'est ainsi que BALBONI et coll. (24), ont préparé des conjugués de l'albumine avec des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN : la 5-fluorodésoxyuridine et le cytosine arabinoside. Les auteurs ont montré que ces conjugués étaient capables d'inhiber, in vitro, la replication des virus Electromelia et Vaccinia et que leur action, in vivo, était limitée à la phase de l'infection virale qui a lieu dans les macrophages du foie.

TROUET et coll. (301) ont mis au point un bras de couplage, stable dans le sérum, permettant la liaison covalente

de la DNR à des protéines. Les auteurs ont démontré qu'un minimum de trois acides aminés était nécessaire pour obtenir une coupure du bras par les enzymes lysosomiques, avec libération de la DNR libre. Les auteurs ont montré que la DNR, ainsi conjuguée à la sérum-albumine succinylée était beaucoup plus active que la DNR libre sur des cellules de leucémie L 1210, injectées en IP chez la Souris.

2.1.1.2. - Utilisation des anticorps comme transporteurs

L'existence de déterminants associés aux cellules tumorales capables d'entraîner la production d'anticorps spécifiques est clairement établie pour les tumeurs animales et humaines. Il peut s'agir de véritables néo-antigènes spécifiques de la tumeur ou d'antigènes onco-foetaux comme l'antigène carcino-embryonnaire ou l' α -foeto-protéine ou encore de la sécrétion d'une hormone par une cellule tumorale, HCG par exemple. Le nombre de sites antigéniques par cellule est un facteur important à considérer dans l'optique du ciblage de drogues par conjugaison à des anticorps : il apparaît que certaines spécificités sont présentes à la surface cellulaire à un taux qui ne permet pas la délivrance d'une quantité suffisante de drogue, ceci étant dû à un nombre insuffisant de molécules d'anticorps capables de se lier à la surface cellulaire.

A la suite des travaux de KOHLER et MILSTEIN (168), qui ont mis au point la technique des hybridomes permettant la production des anticorps monoclonaux, les recherches visant l'utilisation des anticorps dans la thérapie des cancers ont connu un essor considérable, l'anticorps apparaissant comme l'arme absolue pour la reconnaissance de cellules cibles.

Les anticorps monoclonaux s'avèrent très utiles en médecine anticancéreuse [BRON et coll. (45)]. Outre leur utilisation dans le diagnostic des tumeurs par détection des antigènes qui leur sont associés [BOROWITZ et STEIN (41), DAVIS

et RAO (68)], dans la localisation des tumeurs par l'emploi d'anticorps marqués [LARSON (171)], dans la détection de micrométastases de cellules tumorales [BRON et coll. (45)], dans la détection et le suivi des hormones et d'autres antigènes dans le sérum et dans l'immunothérapie passive, leur utilisation dans le ciblage d'agents thérapeutiques par le biais de leur conjugaison à des drogues fait l'objet d'une abondante littérature [EMBLETON et GARNETT (94), ARNON et HURWITZ (10), BALDWIN (25), EMBLETON et coll. (95), ARNON et coll. (11)], (Fig.5). Les agents thérapeutiques qui ont ainsi été conjugués sont soit des substances anticancéreuses comme l'ADR ou la DNR [O'NEILL (219)], soit des toxines d'origine bactérienne ou végétale [BLYTHMAN et coll. (38), VITETTA et UHR (317)], soit des liposomes [TOONEN et CROMMELIN (295), SULLIVAN et coll. (283)], soit des enzymes ou des radio-isotopes. L'utilisation des anticorps dans le ciblage des drogues sera développée ultérieurement (§ 2.2.3) dans le cas particulier des anticorps reconnaissant spécifiquement des motifs oligosaccharidiques.

L'emploi des anticorps monoclonaux en thérapeutique ou pour le ciblage des drogues présente des limites. En effet, chez certains patients des antigènes tumoraux circulants se lient avec l'anticorps dans le sang, inactivant ainsi celui-ci. De même, la liaison de certains anticorps aux cellules peut entraîner la disparition de l'antigène cible de la surface cellulaire par modulation antigénique. De plus, toutes les tumeurs d'un même type ne sont pas identiques d'un point de vue antigénique et il existe une hétérogénéité des cellules et de leurs antigènes de surface dans une même tumeur [MARX (184)]. En outre, WEINSTEIN et coll. (336) ont montré que la liaison d'immunoliposomes à leur cellule cible, dans ce cas le lymphocyte n'entraînait pas ou peu de libération du contenu des liposomes au niveau des lymphocytes.

L'emploi des anticorps monoclonaux monovalents devrait permettre d'augmenter leur potentiel thérapeutique, ceux-ci n'entraînant pas de modulation antigénique et possédant un

AFFINITY THERAPY

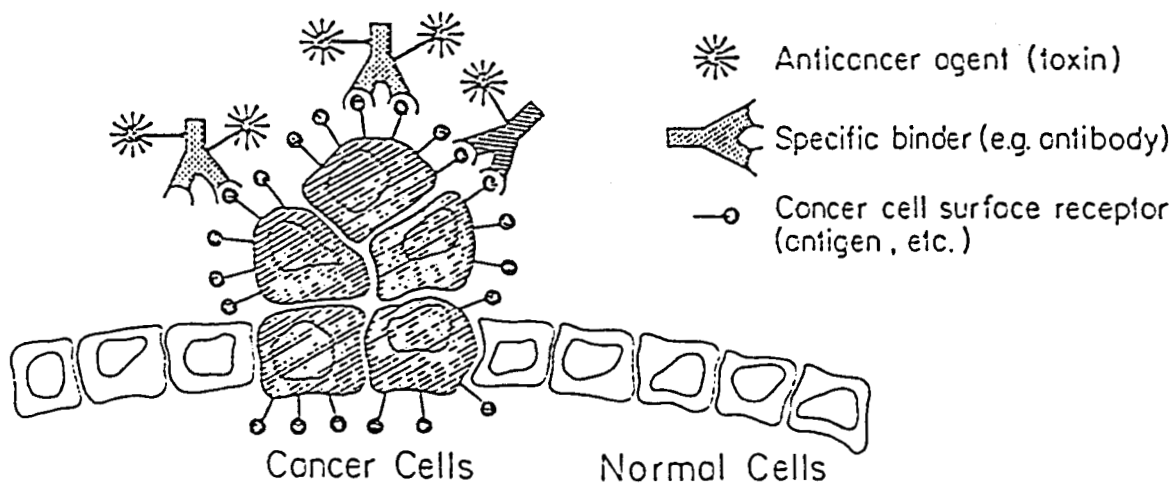


Figure 5

Schéma du principe de l'application de l'affinité en thérapeutique.

[d'après WILCHEK et HURWITZ (341)].

pouvoir de lyse accru en présence de complément humain [COBBOLD et WALDMAN (58)]. De plus, la production d'anticorps monoclonaux humains présente l'avantage qu'ils peuvent être injectés sans risque et de façon répétée chez l'homme. Ces anticorps trouveront rapidement leur application dans le diagnostic et le traitement des cancers. Le fait que chaque anticorps monoclonal porte un idiotype unique soulève le problème de la production d'anticorps anti-idiotype chez le receveur. La production d'anticorps multiples dirigés contre le même antigène ou contre différents déterminants antigéniques permettrait de pallier ce problème. De même, il serait préférable d'utiliser des anticorps dirigés contre des antigènes qui ne sont pas retrouvés dans la circulation sanguine, dans le but de minimiser le risque d'apparition de complexes immuns et de la toxicité qui s'y rattache [BRON et coll. (45)].

Une autre approche de l'utilisation des anticorps pour le ciblage des drogues consiste à atteindre spécifiquement des cellules possédant un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines par l'utilisation de complexes drogue - anticorps opsonisant [SHEN et RYSER (261)]. Des anticorps recombinants, spécifiques d'un haptène, dans lesquels le fragment Fc a été remplacé par un enzyme actif ont également été préparés [NEUBERGER et coll. (206)]. La production de telles chimères protéiques présentant un domaine apportant la spécificité et un domaine cytotoxique (toxine) serait un moyen d'obtenir des molécules biologiquement actives présentant des propriétés de reconnaissance.

2.1.1.3. - Utilisation de l'ADN comme transporteur

Dans le but de préparer des drogues présentant un tropisme pour le lysosome, TROUET et ses collaborateurs ont complexé l'ADR et la DNR avec l'ADN [TROUET et coll. (299), TROUET et coll. (297), TROUET et JOLLES (300)]. L'action de drogues libres et conjuguées a été étudiée sur des cellules de leucémie murine L 1210 en culture. Les auteurs ont montré que les

complexes de la DNR et de l'ADR à l'ADN se comportaient in vitro, comme des drogues lysosomotropes, pénétrant dans les cellules par endocytose, et que ces conjugués sont 1,5 à 2 fois moins toxiques que les drogues libres quand ils sont administrés par voie intrapéritonéale. De plus, l'utilisation de ces conjugués diminue l'exposition du coeur aux drogues. La concentration plasmatique des drogues et leur demi-vie sont augmentées, ce qui peut expliquer l'augmentation de leur activité thérapeutique.

L'ADN peut être utilisé comme transporteur de toutes les drogues qui présentent une affinité spontanée pour cette macromolécule et qui sont susceptibles d'être libérées sous une forme active, soit par un simple processus de déplacement d'équilibre, soit par digestion de l'ADN par des enzymes extra- ou intra-cellulaires. Des complexes de la DNR et de l'ADR à l'ADN ont été utilisés chez l'Homme en chimiothérapie anticancéreuse. Ces conjugués se sont montrés aussi actifs que leurs analogues libres mais avec l'avantage qu'aucune cardiotoxicité n'a pu être décelée durant les traitements, même quand la dose cumulative critique était dépassée.

2.1.2. - Les transporteurs cellulaires

Les transporteurs cellulaires présentent une membrane qui délimite un espace susceptible de renfermer l'agent à transporter et qui restreint le mouvement des molécules et des ions à l'intérieur de ses limites. Les transporteurs cellulaires actuellement à l'étude sont les érythrocytes [OFFORD et coll. (212), DELOACH et coll. (74)], les polynucléaires neutrophiles, les cellules lymphoïdes, les hépatocytes, les îlots pancréatiques et les fibroblastes. L'intérêt de ce type de transporteur réside dans le besoin, soit de protéger des enzymes ou des drogues d'une inactivation ou d'une dégradation trop rapide, soit de protéger l'hôte d'effets immunologiques ou pharmacologiques indésirables. Ces transporteurs permettent également de véhiculer l'enzyme ou la drogue plus spécifiquement vers sa cible.

Les érythrocytes sont dotés de nombreuses propriétés du transporteur idéal (Tableau I). En effet, puisque les érythrocytes du patient peuvent être employés, les effets secondaires dus à l'utilisation de substances étrangères ne sont pas à craindre. De plus, l'érythrocyte est biodégradable et sa dégradation s'effectue par les mêmes cellules et de la même manière que pour les érythrocytes normaux. La durée de vie élevée des érythrocytes dans la circulation pourrait permettre le développement de réactions enzymatiques dans le sang ainsi que la libération retardée de drogues ou de substances transportées sur un intervalle de temps élevé. A l'inverse, certaines modifications de l'érythrocyte permettraient leur destruction rapide dans le système réticulo-endothélial conduisant à la délivrance des substances véhiculées au niveau des lysosomes des cellules phagocytaires.

Les polynucléaires neutrophiles ont la capacité de s'accumuler rapidement et en grand nombre dans les zones pathologiques. Leurs propriétés de transporteurs naturels dans l'organisme en font un très bon modèle pour le transport de drogues.

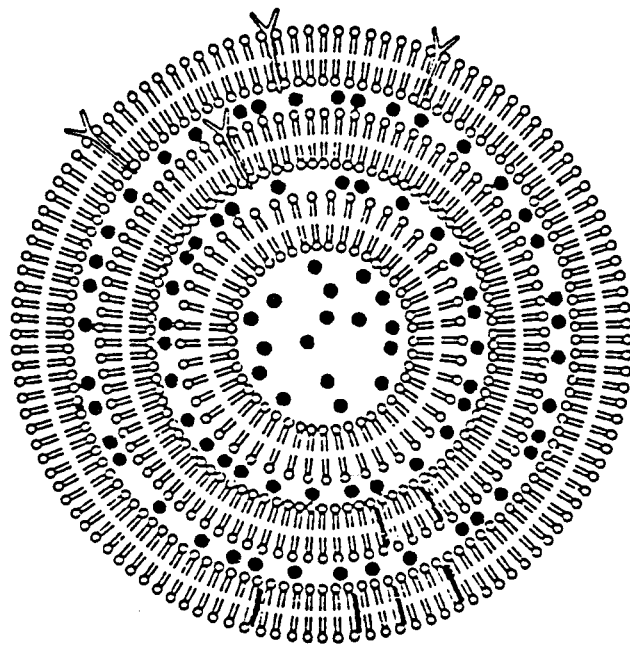
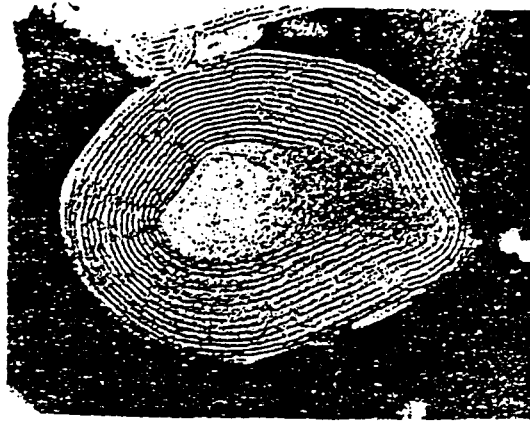
2.1.3 - Les transporteurs synthétiques

La complexité des transporteurs naturels a stimulé la recherche de matériaux synthétiques susceptibles d'être utilisés comme transporteurs. Le but est de mettre au point des substances de composition relativement simple, dont la préparation soit aisée et reproductible et possédant les propriétés indispensables aux transporteurs de drogues. Parmi ces transporteurs synthétiques, citons les polymères d'acide glycollique et d'acide lactique obtenus par polymérisation soit directe, soit par l'intermédiaire de monomères cycliques, les cellules artificielles et les liposomes. Nous nous attarderons plus spécialement sur ces derniers qui font déjà l'objet de multiples applications.

Les liposomes sont des structures microscopiques constituées d'un ou de plusieurs doubles feuillets lipidiques concentriques délimitant un espace aqueux (Fig.6). Ils sont obtenus en mettant en présence des lipides polaires (phospholipides par exemple) et un excès d'eau, ce qui entraîne la formation d'assemblages hautement organisés dans un système de membranes closes et concentriques. Les propriétés des liposomes peuvent être modifiées par l'incorporation dans leur structure de divers composés liposolubles. Leur stabilité (rigidité et perméabilité), leur charge, le volume de leur compartiment aqueux peuvent ainsi être modulés [GREGORIADIS (130-131)].

La préparation, la capacité de stockage, la taille, la stabilité et la destinée des liposomes in vivo font l'objet de nombreux travaux [GREGORIADIS (130), GREGORIADIS et ALLISON(132), GREGORIADIS et coll. (135), RYMAN et TYRREL (243), POSTE et coll. (228)]. Les liposomes peuvent être utilisés dans plusieurs buts [WEINSTEIN et LESERMAN (337)] :

- (1) prolonger l'effet d'une drogue par une augmentation de son temps de présence dans la circulation,
- (2) utiliser l'aptitude de certaines cibles (tumeurs par exemple) à séquestrer les liposomes en tant que particules,
- (3) réduire la toxicité d'une drogue au niveau des tissus qui ne captent pas les liposomes,
- (4) empêcher le métabolisme d'une drogue ou sa destruction par le système immunitaire avant qu'elle n'atteigne sa cible,
- (5) confiner une drogue dans un compartiment anatomique choisi,
- (6) diriger les liposomes vers des cellules choisies par conjugaison avec des anticorps ou d'autres ligands,
- (7) diriger une drogue vers les cellules phagocytaires, cible naturelle des liposomes in vivo (dans le cas des leishmanioses par exemple [ALVING (4)]),
- (8) amplifier l'effet thérapeutique d'une drogue par incorporation de nombreuses molécules de substance active dans chaque particule spécifiquement dirigée,



Surface neutre ou chargée

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

Figure 6

Schéma d'un liposome présentant trois doubles couches de phospholipides polaires en alternance avec des compartiments aqueux.

[d'après GREGORIADIS (130)].

- (9) libérer localement et sélectivement une substance contenue dans les liposomes par action sur des facteurs physiques comme la température [WEINSTEIN et coll. (338)] ou le pH,
- (10) contourner les obstacles à la perméabilité cellulaire par endocytose ou fusion des liposomes au niveau des cellules,
- (11) administrer des drogues destinées à n'être actives qu'après un processus d'endocytose.

Les liposomes peuvent interagir avec les cellules de différentes façons (Fig.7). Les phénomènes impliqués sont : l'endocytose, l'adsorption, le transfert de lipides et, à un degré moindre, la fusion. L'adsorption peut être soit non-spécifique, soit spécifique par l'intermédiaire de ligands comme les anticorps, les hormones ou les lectines. L'adsorption peut, ou non, conduire dans un deuxième temps à l'endocytose des liposomes et de leur contenu. Le transfert de lipides est un processus selon lequel des molécules lipidiques sont échangées entre la membrane cellulaire et le feuillet le plus externe du liposome sans qu'il n'y ait association du liposome avec la cellule. L'endocytose constitue le phénomène le plus important : les cellules phagocytaires captent les liposomes avec avidité, bien que les récepteurs ou les signaux responsables de cette endocytose ne soient pas encore clairement définis. Les cellules non-phagocytaires sont également susceptibles d'endocyter les liposomes [WEINSTEIN (335)].

De nombreux types de ligands ont été attachés aux liposomes dans le but de les diriger vers les cellules tumorales essentiellement. Citons les sucres, les lectines, les anticorps, les glycoconjugués (cf. § 2.2), les hormones peptidiques, des haptènes et diverses protéines [WEINSTEIN et LESERMAN (337)]. D'une manière générale, il a été relativement aisé d'obtenir une liaison sélective des liposomes avec leurs cellules cibles in vitro et in vivo quand les liposomes sont injectés dans le compartiment anatomique renfermant les cellules cibles. Cependant, il est rapidement apparu à l'évidence que la liaison des liposomes à la surface cellulaire n'entraînait pas

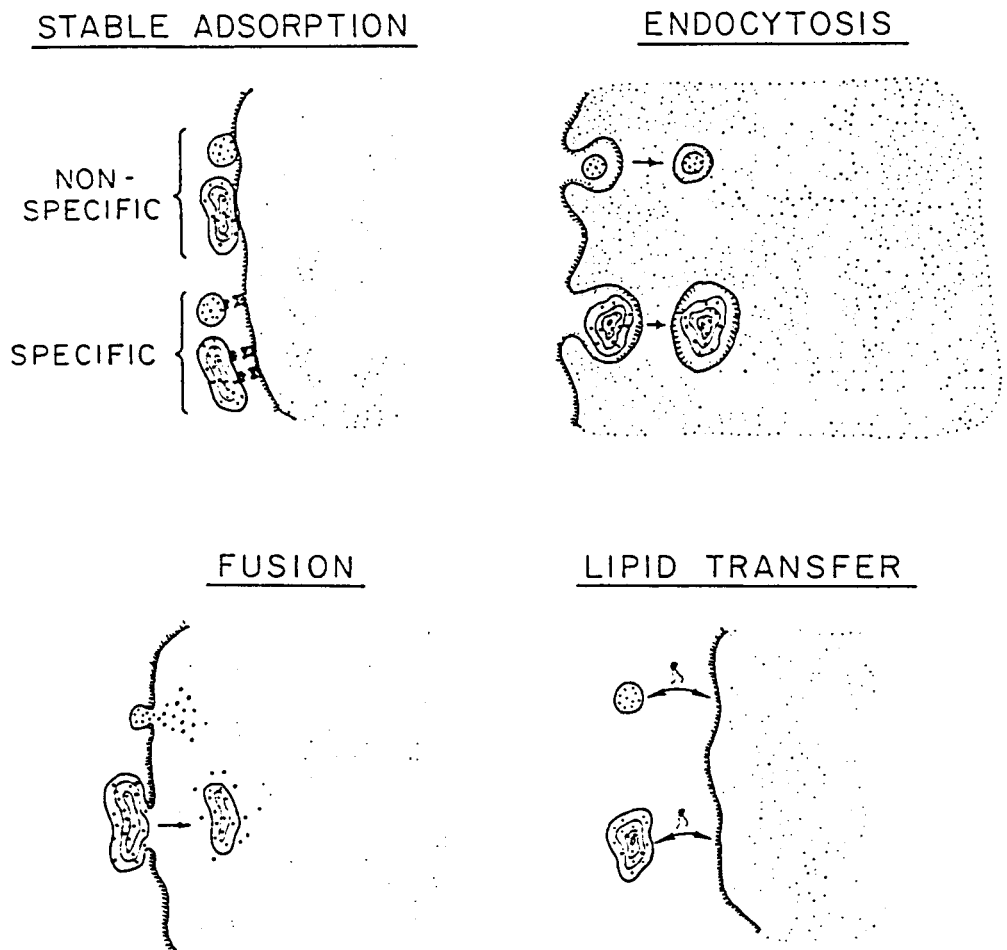


Figure 7 Mécanismes d'interaction entre liposomes (multilamellaires ou unilamellaires) et cellules. [d'après WEINSTEIN et LESERMAN (337)].

obligatoirement la pénétration de leur contenu dans la cellule [WEINSTEIN et coll. (336)]. Cette pénétration est liée au phénomène d'endocytose et non à la fusion avec la membrane plasmique. La quantité de matériel endocyté dépend de la liaison du déterminant de la membrane cellulaire au liposome, de la manière dont il est lié et du type cellulaire.

L'utilisation des liposomes comme transporteurs présente certaines limites [WEINSTEIN (335)] :

1- Capture par le foie et la rate : l'administration intraveineuse de liposomes entraîne leur accumulation dans les cellules réticulo-endothéliales du foie (cellules de Küpffer) ou de la rate. La capture hépatique des liposomes constitue donc un obstacle à l'encapsulation de drogues fortement hépatotoxiques. Des essais ont été effectués dans le but d'utiliser cette capture préférentielle au niveau du foie pour diriger des drogues vers des tumeurs hépatiques mais l'incorporation des liposomes dans le foie n'entraîne pas forcément une accumulation dans la tumeur elle-même.

2- Franchissement de la barrière endothéliale : l'endothélium des tissus agit comme une barrière empêchant le passage des liposomes, ce qui rend difficile leur sortie du courant sanguin. L'accès direct des liposomes aux tumeurs n'est possible que dans le cas des tumeurs du foie ou de la moelle osseuse. Cependant il est possible que les tumeurs elles-mêmes, en particulier lorsqu'elles sont nécrotiques, présentent des endothéliums plus lâches, permettant ainsi l'accès à certaines tumeurs solides [MAYHEW (186)].

3- Destruction dans les milieux physiologiques : les lipoprotéines et d'autres composants sériques, non encore identifiés, sont susceptibles de détruire les liposomes.

4- Antigénicité et Immunogénicité : il a été constaté lors de l'injection de liposomes, l'apparition d'anticorps dirigés contre

les liposomes et leurs lipides, principalement lorsqu'ils présentent des protéines ou des polysaccharides à leur surface (vecteurs de vaccins).

5- Toxicité : les liposomes ne sont pas dénués de toxicité : certains lipides chargés et la sphingomyéline qui entrent dans leur composition sont capables d'entraîner des perturbations hématologiques ainsi qu'une activation de la voie alterne du complément.

6- Réduction du potentiel phagocytaire naturel du système réticulo-endothélial par compétition avec les liposomes.

7- Instabilité : la relative instabilité des liposomes est également un obstacle, à l'heure actuelle, à leur utilisation.

Après avoir passé rapidement en revue les différents types de transporteurs actuellement à l'étude, il apparaît que tous présentent des propriétés intéressantes dans l'optique du ciblage des drogues mais que de nombreux travaux sont encore nécessaires afin de parvenir au transporteur idéal défini par GREGORIADIS (128) (Tableau I) et afin que cette approche de la pharmacothérapie ait l'impact que les scientifiques attendent d'elle.

2.2 - Applications du ciblage des drogues utilisant les propriétés de reconnaissance des sucres

Au cours des deux dernières décennies, il est apparu que de nombreuses interactions spécifiques in vivo faisaient intervenir les glycoconjugués. Entre autres, ceux-ci participent à la reconnaissance et à l'adhésion cellulaires, ils sont également des récepteurs pour des virus, des protéines, ou des hormones et, en tant que constituants de la membrane cellulaire, ils représentent des antigènes dont la structure et la fonction peuvent être altérées lors de la transformation maligne

[MONTREUIL (195)]. L'exploitation de ces propriétés dans le ciblage des drogues est actuellement à l'étude, la cible principale étant la cellule cancéreuse. Les transporteurs ainsi étudiés sont les dextrans, les lectines et les glycoconjugués. Des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement des motifs oligosaccharidiques ont été obtenus et conjugués à des drogues dans le but de les diriger vers les cellules porteuses des spécificités antigéniques correspondantes.

2.2.1 - Les dextrans

Les dextrans sont des polymères d' α -D-Glucose : 95 % des chaînes sont constituées d'unités linéaires de glucose lié en α -1,6, les chaînes latérales étant constituées par des unités de glucose liées en α -1,3. Des fractions de dextrans présentant une échelle de poids moléculaire étroite peuvent être obtenues par hydrolyse des mélanges bruts synthétisés par les microorganismes (Leuconostoc mesenteroides) ou par les systèmes acellulaires et fractionnements répétés des hydrolysats.

Les dextrans sont des substances colloïdales, hydrophiles et solubles dans l'eau, inertes à l'égard des systèmes biologiques et n'affectant pas la viabilité cellulaire. Les dextrans sont utilisés depuis longtemps comme succédanés du plasma pour maintenir la volémie, leur vitesse d'élimination de la circulation sanguine variant en fonction de leur poids moléculaire. Les dextrans sont captés par les tissus du système réticulo-endothélial et ils sont métabolisés en sucres simples diffusibles par les dextranases présentes dans les systèmes biologiques.

La réactivité chimique des groupements hydroxyyles de la molécule à l'égard de nombreux composés, s'ajoutant à leurs propriétés in vivo, ont permis leur utilisation comme transporteurs de drogues dans le but de conférer une plus grande stabilité chimique et biologique aux molécules qui leur sont

associées. Ceci permet de transformer des drogues biologiquement instables et de faible demi-vie plasmatique, en drogues à action prolongée et retardée.

Les groupements hydroxyles présents sur la molécule de dextran forment des complexes stables et solubles avec les métaux lourds par chélation. Ils peuvent également réagir directement avec les acides organiques pour former des esters. De plus, les dextrans peuvent être activés par un certain nombre de méthodes [MOLTENI (190)] et ainsi se combiner avec de nombreuses substances. L'utilisation des dextrans comme transporteurs de drogues est cependant limitée par la réactivité des radicaux présents dans les molécules à conjuguer et par les rendements des réactions de couplage qui restreignent l'éventail des drogues à conjuguer à celles présentant une forte activité pharmacologique.

Parmi les applications des dextrans comme transporteurs de drogues, citons les complexes dextran-antimoine [MIKHAIL et coll. (189)], dont les propriétés ont été étudiées dans la prophylaxie et le traitement des infections à Leishmania donovani chez le Hamster. La conjugaison des dérivés pentavalents de l'antimoine aux dextrans augmente considérablement leur temps de présence dans la circulation ainsi qu'au niveau du foie et de la rate, ce qui se traduit par un meilleur index thérapeutique pour ces substances. Citons également les complexes dextran-insuline qui présentent une activité hormonale à dose beaucoup plus faible que l'insuline native et dont la durée de vie plasmatique est augmentée [ARMSTRONG et coll. (9)].

Les dextrans ont également été conjugués à des antibiotiques (ampicilline, kanamycine, tétracycline), à des vitamines, à des enzymes, à des peptides et à des protéines, dans le but de modifier leur pharmacocinétique et d'augmenter leur temps de présence dans l'organisme afin d'obtenir une plus grande efficacité thérapeutique.

Dans ce type de conjugués, le polysaccharide agit, d'une part, comme protecteur de la molécule active vis-à-vis des dégradations chimiques et biologiques et, d'autre part, comme transporteur, transférant la drogue aux organes visés sans réduire sa biodisponibilité.

2.2.2 - Les lectines

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine non-immune, qui sont capables de reconnaître et de se lier spécifiquement à des déterminants oligosaccharidiques [GOLDSTEIN et coll. (123)], provoquant ainsi l'agglutination des cellules. Ces propriétés des lectines expliquent leur utilisation dans différents domaines de la biologie cellulaire, en particulier dans l'étude de la membrane cellulaire [SHARON et LIS (260), LIS et SHARON (177), MONTREUIL et coll. (196)]. Le concept de lectine membranaire sera développé au § 3.

Sans insister sur les nombreuses propriétés et applications des lectines, notons que les cellules transformées présentent une agglutinabilité augmentée sous l'action de la concanavalline A (Con A) ou de l'agglutinine de germe de Blé (WGA). De nombreuses lectines sont également capables de stimuler la mitogenèse des lymphocytes (B,T,B+T) et sont susceptibles d'être endocytées par les cellules. Les macrophages péritonéaux murins en culture lient la ConA et d'autres lectines [GOLDMAN (122)], puis internalisent la lectine dans de petites vésicules de pinocytose qui fusionnent progressivement pour former des vacuoles. Ces vacuoles semblent ne pas fusionner avec les lysosomes. La stimulation de l'endocytose, conduisant à la formation de vacuoles qui résistent à la fusion avec les lysosomes serait une propriété générale des lectines, vérifiée dans de nombreux types cellulaires.

De nombreuses lectines présentent également des effets cytotoxiques. En effet, OLSNES et PIHL (218), ont montré que l'agglutinine de ricin (Ricinus communis) RCA II inhibait la synthèse protéique par action directe sur les ribosomes. Le mode

d'action de cette lectine fait intervenir un processus en deux étapes : liaison à la cellule puis transport à l'intérieur de celle-ci et action sur la synthèse protéique. La cytotoxicité des lectines nécessite donc leur liaison à la surface des cellules et peut être inhibée par addition du sucre inhibiteur dans le milieu ou par sélection de lignées cellulaires ne présentant pas les récepteurs de surface concernés ou résistant à la toxicité de la lectine par un autre mécanisme.

Les lectines sont également susceptibles d'interagir avec les tissus intacts : elles présentent un temps de rétention augmenté à proximité du point d'injection par rapport à d'autres protéines [SHIER et coll. (263)]. Ceci est la conséquence de trois propriétés qui ont été démontrées sur les cellules en culture :

(1) spécificité relativement large qui entraîne leur liaison à de nombreux types cellulaires, (2) internalisation en quantité relativement importante par les cellules, (3) dégradation lente des lectines à la suite de leur internalisation. Les lectines entraînent également lors de l'injection chez l'animal une immunosuppression, une inflammation au point d'injection et, à dose plus forte, des nécroses tissulaires.

SHOHAM et coll. (265) ont démontré que l'injection de 10-20 mg de ConA directement dans les nodules tumoraux inhibait le développement de polyomes chez le Hamster, alors qu'une injection effectuée à 2 cm de la tumeur n'avait pas d'effet. WALKER et coll. (319) ont rapporté l'effet antitumoral de l'abrine et de la ricine utilisées soit seules, soit en association avec le cis-platine. Les auteurs ont montré une augmentation de la survie de Souris porteuses de cellules de leucémie L-1210 par administration de ces lectines, ainsi qu'une synergie d'action avec le cis-platine.

Les propriétés des lectines ont conduit à envisager leur utilisation comme transporteurs de drogues par conjugaison à des enzymes ou à des agents cytotoxiques (Tableau II). Les lectines, à cause de leur capacité à se localiser et à se

TABLEAU II : Lectines et substances assimilées utilisées comme transporteurs de toxines ou de drogues [d'après MONSIGNY et coll. (192)].

Sugar binding protein	Drug	Cell	References
Concanavalin A	Daunorubicin	L1210	Hirao and Hattori, 1977
Concanavalin A	DTA	HeLa, CHO, SV3T3	Gilliland <i>et al.</i> , 1978
Concanavalin A	Ricin A	3T3	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1979
Suc. Wheat germ lectin	Daunorubicin	L1210	Monsigny <i>et al.</i> , 1980
Wheat germ lectin	DTA	3T3	Gilliland <i>et al.</i> , 1981
<i>Ricinus communis</i> lectin	DTA (variant)	L	Uchida <i>et al.</i> , 1978
<i>Wisteria floribunda</i> lectin	DTA		Uchida <i>et al.</i> , 1978
<i>Wisteria floribunda</i> lectin	Ricin A		Uchida <i>et al.</i> , 1978
<i>Chalera B</i> chain	DTA	3T3	Uchida <i>et al.</i> , 1980
Ricin B chain	DTA*	3T3	Gilliland <i>et al.</i> , 1981
DTB chain	Ricin. A	Vero, HeLa	Gilliland <i>et al.</i> , 1981
Ricin	DTA	HeLa	Sundan <i>et al.</i> , 1982
			Youle and Neville, 1979

DTA: *Diphtheria* toxin A chain; DTB: *Diphtheria* toxin B chain.
*The DTA-Ricin B chain hybrid was found to be non cytotoxic.

concentrer sur les structures saccharidiques insolubles, ont été couplées par des liaisons covalentes à des enzymes dans le but d'éviter les effets secondaires indésirables que l'on observe lors de leur administration. Les conjugués macromoléculaires obtenus conservent la plupart des propriétés des deux précurseurs.

Les lectines présentent les groupements fonctionnels qui permettent la conjugaison à d'autres protéines. Les groupements amino des résidus de lysine, les groupements phénols des résidus de tyrosine, les groupements thiols libres des résidus de cystéine et les groupements carboxyles libres des résidus d'aspartate et de glutamate ont ainsi pu être utilisés [SHIER (262)].

2.2.2.1 - Conjugués lectine-enzyme

BARKER et coll. (27) ont synthétisé un conjugué ConA-dextranase destiné à maintenir l'enzyme au niveau des dents afin de permettre l'hydrolyse des polysaccharides responsables de la formation de la plaque dentaire. Cependant la spécificité de la dextranase était altérée et l'hydrolyse ne conduisait qu'à des di-et trisaccharides et non à des monosaccharides.

La L-asparaginase est une enzyme capable d'entraîner la régression de certains lymphomes et leucémies en privant les cellules tumorales de L-asparagine. Son utilisation est cependant limitée par l'apparition rapide de résistances et de réactions immunologiques dirigées contre l'enzyme. SHIER et coll. (264) ont préparé un conjugué ConA-L-asparaginase dans le but de maintenir l'enzyme intacte à proximité du point d'injection et d'éviter son élimination par le système immunitaire. Le conjugué s'est montré totalement inactif dans le traitement des lymphosarcomes sensibles à la L-asparaginase, l'activité de l'enzyme étant retenue à l'intérieur des vacuoles d'endocytose et ne pouvant ainsi s'exercer.

D'autres enzymes ont été couplées à la ConA comme la trypsine, la streptokinase, l'urokinase.

2.2.2.2 - Conjugués lectine-agent thérapeutique

KITAO et HATTORI (164) ont préparé un conjugué de la ConA avec la DNR et ont montré que le conjugué augmentait de façon significative la survie des Souris porteuses de cellules leucémiques L 1210 et de Souris porteuses de cellules d'ascite de carcinome d'Ehrlich, par rapport aux témoins recevant les mêmes quantités de ConA et de DNR non couplées. De même, MONSIGNY et coll. (193) ont mis au point un bras de couplage permettant la liaison covalente de la DNR sur un accepteur protéique, dans ce cas la WGA succinylée, et ont étudié l'action de ce conjugué sur les cellules de leucémie L 1210. Les auteurs ont montré que le conjugué ainsi préparé se liait promptement aux récepteurs de la lectine de la surface cellulaire à 4 °C et à 37°C et que cette liaison pouvait être inhibée par l'addition de di-N-acétyl chitobiose. La cytotoxicité de ce conjugué est supérieure à celle de la DNR libre : le transporteur augmente la capture de la drogue en induisant un processus d'endocytose et après son internalisation, est rapidement hydrolysé, libérant la DNR et des dérivés de faible poids moléculaire.

L'utilisation de ces conjugués drogue-lectine est limitée par la faiblesse des rendements obtenus lors des couplages. En effet, dans le cas de la ConA, les quantités de drogue conjuguée sont si faibles que la lectine est plus cytotoxique que la drogue qu'elle transporte. Des drogues qui ne sont pas utilisables en clinique à cause de leur toxicité ne présenteraient peut-être pas cet inconvénient.

2.2.2.3 - Conjugués lectine-toxine

Les lectines ont également été conjuguées à des toxines bactériennes. Les toxines bactériennes, cholérique et diphtérique, sont constituées de deux fragments, le fragment A exerçant une action cytotoxique et le fragment B non toxique, mais permettant le transport transmembranaire du fragment A [VAN HEYNINGEN (312)].

GILLILAND et coll. (120) ont conjugué le fragment A de la toxine diphtérique, non toxique quand séparé du fragment B, avec la ConA et ont montré que le produit de couplage était toxique, in vitro, vis-à-vis de différents types cellulaires et, in vivo après injection intra-dermique chez le Lapin ou intra-veineuse chez la Souris. L'activité du conjugué sur les cellules en culture est inhibée par l'addition de ConA libre ou d' α - méthyl-mannoside.

De même, UCHIDA et coll. (305) ont conjugué ce même fragment A de la toxine diphtérique avec une sous-unité de la lectine de Wistaria floribunda et ont démontré que le conjugué partiellement purifié était toxique pour les cellules leucémiques. Cette toxicité est inhibée par l'addition, soit de N-acétyl-D-galactosamine qui se lie à la lectine, soit par un anticorps anti-fragment A.

La gélonine agit dans les systèmes acellulaires comme les chaînes A de l'abrine, de la ricine ou de la modeccine, mais n'a pas la possibilité de se lier à la surface cellulaire et de pénétrer dans les cellules intactes. Quand ce composé est couplé à la ConA, il devient capable de se lier aux cellules et d'exercer son action cytotoxique en inhibant la synthèse protéique [STIRPE et coll. (276)].

D'autres conjugués ont été préparés, associant les propriétés cytotoxiques des chaînes A des toxines et les propriétés de reconnaissance des lectines : citons un hybride de

la chaîne A de la modeccine et de la chaîne B de la ricine [SUNDAN et coll. (284)], ou encore un conjugué du peptide A₁ de la toxine cholérique et de la lectine de Wistaria floribunda [VAN HEYNINGEN (313)] qui active l'adénylate cyclase de cellules intactes.

VITETTA et coll. (316) ont mis en évidence une synergie entre des immuno-toxines préparées, d'une part, avec le fragment A et, d'autre part, avec le fragment B de la ricine. La délivrance de chaînes A et de chaînes B de la ricine, de façon séparée, permet de tuer des cellules qui ne sont pas sensibles aux immuno-toxines ne renfermant que la chaîne A. Dans ce cas, le ciblage est obtenu par la présence, à la fois de l'anticorps et de la chaîne B, spécifique de motifs oligosaccharidiques et permettant le passage diamembranaire du fragment A.

L'utilisation des lectines dans le futur tirera vraisemblablement parti de leurs propriétés cytotoxiques ou de rétention au point d'injection ou de leur capacité à amener des agents thérapeutiques à l'intérieur des cellules. Cette dernière propriété pouvant être exploitée dans le traitement des parasites intracellulaires par conjugaison à des drogues incapables de traverser la membrane cellulaire. Leur emploi peut également être envisagé dans les cas où la spécificité désirée concerne la partie oligosaccharidique d'une glycoprotéine, l'obtention d'anticorps contre ce type de structure présentant certaines difficultés [KIEDA et coll. (163)].

2.2.3 - Les anticorps anti-oligosaccharides

La transformation maligne d'une cellule s'accompagne de nombreuses perturbations des métabolismes cellulaires. L'une de ces perturbations atteint la composition, le métabolisme et l'organisation des glycosphingolipides de la membrane cellulaire [HAKOMORI (138)]. Grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux dans l'analyse de l'antigénicité des cellules tumorales, la présence dans les membranes des cellules transformées de

nouvelles structures oligosaccharidiques, absentes ou présentes en très faibles quantités dans les tissus normaux a été clairement démontrée [HAKOMORI (138), FEIZI (98)]. Deux types de perturbations des glycolipides ont ainsi été observées [HAKOMORI et YOUNG (141)] :

(i) synthèse de nouveaux déterminants glycolipidiques, résultant de l'activation de glycosyl-transférases non exprimées à l'état normal, comme l'antigène Forssman dans les tumeurs humaines et l'antigène A-like chez les sujets de groupe sanguins B ou O [HAKOMORI et coll. (140)],

(ii) synthèse incomplète de glycolipides complexes conduisant fréquemment à l'accumulation de précurseurs glycolipidiques [ROSENFELDER et coll. (242)].

ROSENFELDER et coll. (242) ont ainsi démontré la présence d'un marqueur spécifique de cellules tumorales dans des cellules 3T3 transformées par le virus de Kirsten, représenté par la ganglio-N-triosylcéramide : GalNAc (β 1-4) Gal (β 1-4) Glc (β -1,1) Cer. Ce glycolipide est également présent dans les cellules de lymphome L 5178 c 127.

URDAL et HAKOMORI (307) ont démontré que ce glycolipide pouvait servir de cible pour le pharmacoguidage d'une drogue par conjugaison avec un anticorps spécifique. A cause de l'inactivation de l'anticorps par conjugaison à la drogue, les auteurs ont développé différents systèmes de ciblage, dans lesquels l'administration d'un conjugué anticorps anti-glycolipide-biotine est suivie de l'administration a) soit d'avidine et d'une drogue couplée à la biotine, b) soit d'avidine et de liposomes conjugués à la biotine et renfermant de l'actinomycine D, c) soit de liposomes conjugués à l'avidine et renfermant une drogue. Les auteurs ont montré que le système a) permettait de tuer spécifiquement les cellules présentant la ganglio-N-triosylcéramide. Les systèmes b) et c) permettent également le ciblage de liposomes, mais n'entraînent pas la mort des cellules.

Un anticorps monoclonal dirigé contre ce glycolipide a également été administré à des Souris porteuses de lymphomes [YOUNG et HAKOMORI (348)]. La croissance du lymphome L 5178 de Souris qui renferme de grandes quantités de ganglio-N-triosylcéramide est inhibée par immunisation passive des Souris par l'anticorps correspondant. Les auteurs ont montré que l'apparition d'une tumeur chez un animal traité était liée à la sélection d'un variant présentant un taux de ganglio-N-triosylcéramide abaissé par rapport aux cellules inoculées.

NUDELMAN et coll. (210) ont décrit l'accumulation d'un glycolipide dont la structure est Gal (α 1-4) Gal (β 1-4) Glc (β 1-1) Cer dans les lymphomes de Burkitt. Ce glycolipide est un déterminant antigénique spécifiquement reconnu par un anticorps monoclonal. Des immunotoxines préparées par conjugaison de cet anticorps à la chaîne A de la ricine ou à la gélonine se sont avérées respectivement 6000 fois et 3000 fois plus toxiques à l'égard de leurs cellules cibles que les chaînes A de la ricine et que la gélonine non couplées [WIELS et coll.(340)].

A la suite de ces travaux, HAKOMORI et ses collaborateurs ont décrit l'accumulation de nouveaux fucolipides dans des cas d'adénocarcinome humain [HAKOMORI et coll. (139)], ainsi que les anticorps monoclonaux correspondants [FUKUSHI et coll. (114), FUKUSHI et coll (115), NUDELMAN et coll. (209)]. Ces nouvelles structures constituent vraisemblablement de nouvelles cibles intéressantes pour le ciblage de drogues.

D'autres structures oligosaccharidiques complexes sont susceptibles d'être reconnues par des anticorps spécifiques. BUMOL et coll. (46) ont rapporté l'inhibition de la croissance in vivo de cellules de mélanome humain par un conjugué entre un anticorps monoclonal dirigé contre un protéoglycane (chondroïtine sulfate) de la surface cellulaire et la chaîne A de la toxine diphtérique. De même, SEON et coll. (258) ont préparé un anticorps monoclonal reconnaissant une glycoprotéine de la surface cellulaire associée aux cellules T leucémiques humaines.

Un conjugué préparé à partir de cet anticorps et de la chaîne A de la ricine se montre hautement cytotoxique vis-à-vis des cellules T de leucémie aiguë lymphoblastique [SEON (257)].

De nombreuses perturbations des sucres associées au cancer et révélées par des anticorps monoclonaux sont maintenant connues [MAGNANI et GINSBURG (181), MONSIGNY et coll. (192), FEIZI (97)]. C'est ainsi qu'une O-glycosylation aberrante a été décrite dans des cellules de mélanome humain [CHERESH et coll. (54)] et que la présence d'acide N-acétyl neuraminique lié en C6 sur la N-acétylgalactosamine du squelette ganglio-tétraosyl a été décrite pour la première fois chez les Mammifères dans des cellules d'ascite hépatomateuse de Rat [TAKI et coll. (287)].

La connaissance approfondie des perturbations des motifs oligosaccharidiques des glycoconjugués de la membrane cellulaire au cours de la transformation maligne, actuellement à l'étude dans notre laboratoire en ce qui concerne les glycoprotéines [DEBRAY et coll. (70), PLANCKE et MONTREUIL (226)], permettra peut-être de déceler de nouveaux marqueurs et de fabriquer les anticorps monoclonaux correspondants, susceptibles d'être utilisés dans le ciblage des drogues.

2.2.4 - Les glycoconjugués

Les glycoprotéines peuvent être utilisées pour diriger des drogues vers des cibles spécifiques par l'intermédiaire du large éventail de leurs récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique qui caractérisent certains types cellulaires (Tableau III) [BODMER et DEAN (39)]. En règle générale, ces récepteurs permettent l'entrée dans les cellules par endocytose et sont donc intéressants dans le ciblage de molécules vers les endosomes, les lysosomes ou vers d'autres structures avec lesquelles ces vésicules sont capables de fusionner. De plus, de

TABLEAU III : Quelques récepteurs cellulaires spécifiques de glycoprotéines [d'après BODMER et DEAN (39)].

Receptor	Representative location
Serum glycoproteins recognized primarily by carbohydrate termini	
Galactose-terminated glycoproteins	Hepatocytes
Other serum glycoproteins	
Transferrin	Reticulocytes
α_2 -Macroglobulin	Macrophages; fibroblasts
Lysosomal enzymes	
Mannose-terminated enzymes	Macrophages
Mannose 6-phosphate terminated enzymes	Fibroblasts
Hormones and growth factors	
TSH	Thyroid
Gonadotropins	Gonadal cells
Cellular growth factors, such as epidermal growth factor	Fibroblasts
Opsonins	
Complement components	Leukocytes
Antibodies	Leukocytes

petites molécules diffusibles peuvent, par ce biais, pénétrer à l'intérieur de cellules données puis, après hydrolyse de leur transporteur, être amenées à diffuser dans la cellule, atteignant ainsi non-spécifiquement le cytosol ou d'autres localisations intracellulaires.

Les glycoprotéines peuvent également être utilisées pour diriger des liposomes, des fantômes d'érythrocytes ou des enveloppes virales vers des cibles cellulaires données avec les surfaces desquelles ils fusionnent, déposant ainsi leur contenu à l'intérieur de la cellule. Si les molécules ainsi libérées ne sont pas diffusibles, leurs effets peuvent ainsi être restreints à l'espace cytosolique de la cellule cible.

Les lectines endogènes des tissus normaux jouent un rôle dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. Ces fonctions présentent un intérêt particulier dans le cadre du développement des tumeurs et de l'apparition des métastases. Les premiers travaux concernant les lectines endogènes de différentes tumeurs ont conduit à l'hypothèse que le profil des lectines endogènes différait qualitativement et quantitativement d'un type de tumeur à l'autre, et d'un tissu tumoral à un tissu homologue normal (Tableau IV). Les lectines endogènes pourraient ainsi permettre une nouvelle approche diagnostique et thérapeutique des cancers par l'utilisation de leurs propriétés de reconnaissance des glycoconjugués [GABIUS et coll. (117), MONSIGNY et coll. (194a)].

Dès 1971, ROGERS et KORNFELD (240) ont conjugué l'albumine et le lysozyme avec des glycopeptides de la fétuine. La désialylation de ces conjugués entraîne, chez le Rat, leur disparition rapide de la circulation et leur capture par les hépatocytes. Alors que la cible naturelle de l'albumine est représentée par le macrophage (cellules de Küpffer), sa conjugaison à des glycopeptides présentant des résidus de galactose terminaux la détourne de cette cible et la dirige vers l'hépatocyte.

TABLEAU IV : Protéines reconnaissant et liant les sucres (lectines) présentes sur les cellules tumorales [d'après MONSIGNY et coll. (192)].

<i>D-Gal, Gal-β-Glc or Gal-β-3-GalNAc</i>		
<i>Murine</i>		
Fibrosarcoma	Raz and Lotan	1981
Hybridomas (SP ₂ ×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

La conjugaison de drogues antivirales à des transporteurs protéiques glycosylés a permis de réduire leurs effets secondaires en les dirigeant spécifiquement vers les cellules infectées [FIUME et coll. (106)]. Les travaux menés par FIUME et ses collaborateurs ont pour but d'augmenter l'index thérapeutique de l'adénine-arabinoside (ara-A) dans le traitement de l'hépatite B chronique par sa conjugaison à des glycoprotéines à galactose terminal. Les auteurs ont tout d'abord utilisé la trifluorothymidine (F3T), un inhibiteur de la synthèse de l'ADN, actif chez la Souris à des doses très faibles et qui peut être facilement conjugué à des protéines. Lors de l'injection chez des Souris infectées par le virus Ectromelia de conjugués F3T-asialofétuine (ASF), le F3T est concentré sous une forme pharmacologiquement active dans le foie [FIUME et coll. (108)]. L'inhibition de la synthèse de l'ADN au niveau de la moelle osseuse que l'on observe chez les Souris traitées par ce conjugué est due au F3T libre qui s'échappe des hépatocytes dans la circulation sanguine après sa libération de l'ASF.

Le F3T est un composé très toxique qui n'est pas utilisé chez l'Homme. Aussi, les auteurs ont-ils, par la suite, conjugué l'adénine-9- β -D-arabinofuranoside moins toxique à l'ASF [FIUME et coll. (109)]. L'inhibition majeure de la synthèse de l'ADN est observée au niveau du foie, avec une inhibition très faible au niveau de l'intestin (0-19 % d'inhibition), cible majeure de l'ara-A injecté seul (60-89 % d'inhibition).

L'immunogénicité des conjugués de l'ara-A à l'ASF est un obstacle à leur utilisation clinique. Ces conjugués induisent, en effet, la production d'anticorps qui peuvent conduire soit à l'inactivation du conjugué, soit à des lésions d'origine allergique. L'utilisation de conjugués de N-acétyllactosamine et d'albumine homologue (L-SA) comme transporteurs hépatotropes de l'ara-A permet d'éviter cette production d'anticorps. En effet, WILSON (344) a démontré que des protéines galactosylées comme la sérum albumine couplée à la lactosamine, pénétraient spécifiquement à l'intérieur des hépatocytes après liaison au récepteur des glycoprotéines à galactose terminal.

L'ara-A et l'ara-AMP ont donc été conjugués à la L-SA et les expériences décrites ci-dessus ont été renouvelées dans le but de vérifier que la L-SA pouvait remplacer l'ASF dans l'élaboration de conjugués à visée hépatocytaire [FIUME et coll. (104, 105, 107)]. Comme dans le cas où elle est conjuguée à l'ASF, l'ara-A conjuguée à la L-SA, injectée chez la Souris se trouve concentrée sous forme active dans les hépatocytes. Il en est de même pour l'ara-AMP [FIUME et coll. (104)].

Les conjugués de l'ara-A préparés avec de la sérum albumine homologue sont dépourvus de toute immunogénicité humorale ou cellulaire chez la Souris. Si cette tolérance immunitaire se vérifie chez l'Homme, l'albumine humaine conjuguée à la lactosamine semble être le transporteur de choix pour le ciblage hépatique de l'ara-A dans le traitement de l'hépatite B chronique. Des études toxicologiques effectuées chez la Souris n'ont pu mettre en évidence aucun signe de toxicité aiguë pour ces conjugués. L'index thérapeutique de l'ara-A pourrait donc être augmenté par conjugaison à la sérum albumine humaine couplée à la lactosamine.

L'asialofétuine a également été conjuguée à la primaquine dans le but de diriger spécifiquement cette drogue vers les hépatocytes et d'obtenir ainsi un composé actif dans la phase hépatocytaire du paludisme [TROUET et coll. (298)]. Alors que la primaquine ne s'avère efficace que dans 50 % des cas de primo-infections par le Plasmodium, la primaquine conjuguée à l'ASF est efficace à 100 %. La conjugaison de la primaquine à l'ASF succinylée supprime son action dans le traitement des primo-infections.

SCHWARTZ et coll. (249) ont montré que les cellules Hep G2, une lignée d'hépatome humain, fixaient et internalisaient sélectivement l'asialo-orosomucoïde. Après avoir démontré que les propriétés d'endocytose spécifique de cette lignée s'appliquaient également à la sérum albumine galactosylée (gal-SA), ROLIN-VAN SWIETEN et coll. (241), ont conjugué la DNR à la gal-SA par

l'intermédiaire d'un bras peptidique (décrit dans [TROUET et coll. (301)]) et ont montré que ce conjugué était capté spécifiquement par les hépatocytes de Rat en culture et les cellules d'hépatome Hep G₂. Les auteurs ont également mis au point des méthodes permettant de détecter la présence du récepteur des asialo-glycoprotéines sur des coupes obtenues à partir de biopsies d'hépatomes humains et ont rapporté que sur 9 biopsies analysées, 6 révélaient la présence de ce récepteur. Compte tenu de ces résultats, les auteurs proposent l'utilisation des glycoprotéines à galactose terminal pour le traitement des hépatomes humains.

Des travaux similaires sont actuellement en cours dans notre Laboratoire. DELPLACE-DELHAYE (76) a synthétisé des conjugués de la DNR à des glycoprotéines ou des glycopeptides par l'intermédiaire d'un bras de couplage : β -glucosyl-thioacétyl-arginyl-leucine décrit par MONSIGNY et coll.(193)(fig.8) et mis au point des méthodes d'analyse en fluorescence permettant de détecter, d'identifier et de quantifier la DNR et ses dérivés en solution ou sur plaques de couche mince ou dans les cellules [DELPLACE-DELHAYE et coll.(78), DELHAYE et coll. (72, 73), DELPLACE et coll. (75)]. Les substrats choisis présentent le galactose en position terminale (asialo-orosomucoïde et ses glycopeptides) et les modèles cellulaires sont l'hépatocyte de Rat et les cellules d'hépatome Hep G₂. 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 également été effectuées pour mettre au point la méthodologie d'étude de la destinée in vivo de la DNR libre couplée et pour étudier certains mécanismes liés à l'activité ou à la toxicité de l'anthracycline (interaction avec l'ADN, interactions avec certains organes) [DELPLACE-DELHAYE (77)]

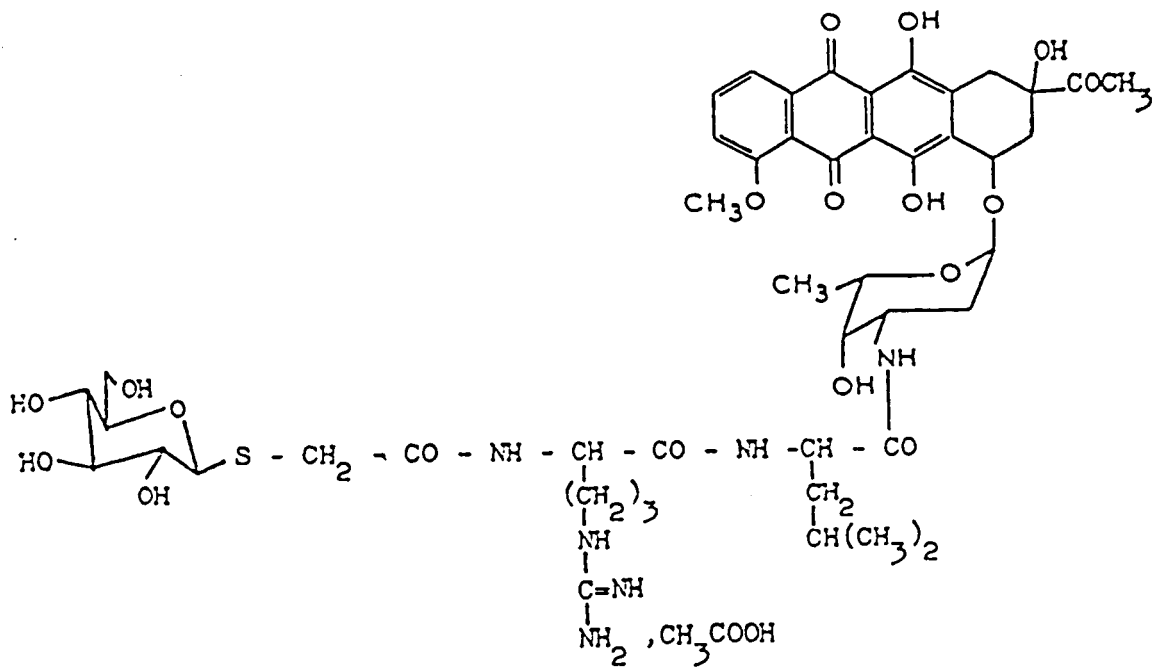


Figure 8 Formule du bras de couplage utilisé pour la condensation de la leucyl-DNR à des glycoprotéines ou glycopeptides. [d'après MONSIGNY et coll. (193)].

Le macrophage qui possède des récepteurs membranaires reconnaissant le D-mannose constitue également une cible intéressante, par exemple, dans la thérapeutique anti-inflammatoire. Dans ce but, ROBBINS et coll. (237) ont synthétisé des mannosyl-peptides en attachant des résidus de D-mannose à des squelettes de lysine, dilysine et d'oligolysine, par l'intermédiaire de bras espaceurs. Les auteurs ont montré que le ligand trimannosyl-dilysine et ses analogues présentaient un intérêt certain dans la délivrance sélective d'agents thérapeutiques aux macrophages. Les auteurs ont choisi comme modèle la dexaméthasone, dans le but de conférer aux corticoïdes une affinité élevée pour le point d'inflammation, réduisant ainsi les doses nécessaires et les effets secondaires de ces composés [PONPIPOM et coll. (227)].

MONSIGNY et coll. (194) ont obtenu une activation de l'activité tumoricide de macrophages alvéolaires de Rat ou de Souris par conjugaison du muramyl-dipeptide (MDP) avec de la sérum albumine mannosylée, activation observée même à de très faibles concentrations de MDP conjugué. L'utilisation de tels dérivés du MDP conjugué à des néoglycoprotéines a permis l'éradication de métastases de carcinome de Lewis chez la Souris [ROCHE et coll. (238)]. Ces conjugués présentent donc un réel intérêt comme immunostimulants en thérapeutique anticancéreuse ou antiparasitaire.

Les sucres et les glycoconjugués ont également été utilisés pour le ciblage de toxines d'origine végétale ou bactérienne. YOULE et coll. (347) ont lié des résidus de monophosphopentamannose à la ricine et ont montré que ce conjugué se liait aux récepteurs des hydrolases lysosomales des fibroblastes, obtenant ainsi une toxine spécifique d'un type cellulaire. De même, un conjugué entre le fragment A de la toxine diphtérique et l'asialo-fétuine s'est montré toxique vis-à-vis d'hépatocytes de Rat en culture par liaison au récepteur des asialo-glycoprotéines [CAWLEY et coll. (50)].

ROCHE et coll. (239), après avoir démontré la présence d'un récepteur spécifique de l' α -D-glucose sur les cellules du carcinome du poumon de Lewis (LLC), ont étudié l'action d'un conjugué gélonine-néoglycoprotéine renfermant des résidus d' α -D-glucose, sur ces cellules. Les auteurs ont démontré que cette toxine ainsi ciblée se liait et pénétrait à l'intérieur des cellules LLC et que ce conjugué était 100 fois plus toxique à l'égard de ces cellules que la gélonine libre.

La transferrine a également été conjuguée à des toxines dans le but de tirer parti de la multiplication par 100 du nombre de récepteurs de la STF dans les cellules cancéreuses. C'est ainsi qu'un conjugué transferrine-chaîne A de la ricine a été préparé et s'est avéré hautement cytotoxique vis-à-vis de cellules possédant un récepteur de la transferrine (cellules leucémiques humaines CEM) [RASO et BASALA (234)]. Ce conjugué a permis de sélectionner des variants dépourvus de récepteurs, utiles pour l'étude des mécanismes de la délivrance transmembranaire soit du fer, soit de la chaîne A de la ricine. De même, un conjugué de la transferrine à la toxine diphtérique exerce une action cytotoxique vis-à-vis de cellules de Souris LMTK-, la partie enzymatique de la toxine diphtérique pénétrant dans le cytoplasme, bloquant ainsi la synthèse protéique [O'KEEFE et DRAPER (215)].

Les liposomes sont eux aussi susceptibles d'être dirigés spécifiquement vers une cible donnée en introduisant dans leur structure des glycoconjugués. GREGORIADIS (127) a étudié la capacité de l'asialofétuine conjuguée à des liposomes renfermant de l'albumine à interagir, in vivo, avec le foie (hépatocytes). L'accumulation spécifique du conjugué dans le foie a pu être démontrée. A la suite d'expériences in vitro et in vivo, GREGORIADIS et NEERUNJUN (134) ont montré que l'asialofétuine était capable d'entraîner la capture cellulaire sélective de liposomes qui lui sont associés et de la drogue transportée. La conjugaison de liposomes à l'asialofétuine augmente la capture et l'internalisation cellulaires à la fois des liposomes et de leur

contenu. Des liposomes conjugués à l'asialoglycophorine et leur contenu (^{125}I -sérum albumine bovine) sont aussi captés par le foie de Rat en perfusion [HILDENBRANDT et ARONSON (150)], capture conduisant à la digestion du contenu protéique.

Des glycolipides ont également été conjugués aux liposomes et il a été démontré que les sucres liés à la membrane du liposome conservaient leurs propriétés d'interagir avec des lectines [SUROLIA et coll. (285), BOLDT et coll. (40)]. De nombreux conjugués ont ainsi été préparés dans le but de conférer aux liposomes les propriétés de reconnaissance des sucres (Tableau V) et de modifier leur répartition tissulaire in vivo [WEINSTEIN et LESERMAN (337)]. SORIANO et coll. (271) ont inclus dans le double feuillet lipidique de liposomes, un glycolipide, le lactosylcéramide et ont étudié le transfert d'un plasmide renfermant le gène de la préproinsuline I au niveau des cellules de foie de Rat. Les auteurs ont montré que le ciblage des liposomes par cette méthode les détournait de leur cible naturelle (cellules de Küpffer) vers les hépatocytes et principalement vers les cellules endothéliales. L'inclusion d'un glycolipide spécifique dans la structure de liposomes pourrait permettre dans le futur l'expression du gène de l'insuline au niveau du foie sous la forme physiologiquement active de l'hormone.

L'exploitation des systèmes de reconnaissance lectine membranaire-sucre a d'autre part été envisagée pour réduire le taux des LDL circulantes, facteur de risque d'athérosclérose. En effet, le foie est le seul organe où le cholestérol peut être éliminé de façon irréversible de la circulation. VAN BERKEL et coll. (309) ont démontré que l'interaction des LDL avec les récepteurs hépatiques pouvait être augmentée de manière significative en mélangeant les LDL avec un dérivé cholestérol-galactose triantenné (Tris-Gal-Chol), postulant que les résidus de galactose interagiraient avec le récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes. Cependant, les auteurs ont démontré que l'incorporation du Tris-Gal-Chol dans les LDL

TABLEAU V : Ciblage de liposomes par conjugaison à des glycoprotéines ou à des glycolipides [d'après WEINSTEIN et LESERMAN (337)].

Glycoprotein or Glycolipid in Liposomes	Mediation: Direct or Lectin-Mediated	Target Cell	Activity of Complex Evaluated By	Reference
Human erythrocyte sialoglycoprotein	Lectins: WGA, PHA	Human erythrocytes	Cell-associated [³ H]phosphatidylcholine	Juliano and Stamp, 1976
Glucosyl, galactosyl or lactosyl-dihydrosphingosine	Direct	HeLa	[¹⁴ C]cholesterol and [³ H]DPPC uptake	Bussian and Wristin, 1977
Numerous substituted ceramides	Direct	HeLa cells and other tissue culture lines	Cell-associated fluorescence: DPH in liposomes	Huang, 1978
Sugar and aminosugar cholesterol derivatives in DSPC-cholesterol liposomes	Direct	<i>In vivo</i>	Increase in half-life of intact liposomes Changes in tissue localization	Mauk <i>et al.</i> , 1980a,b
Sugar and aminosugar cholesterol derivatives in DSPC-cholesterol liposomes	Direct	Murine peritoneal macrophages	Cell-association of ¹⁴ C labeled cholesterol, electron microscopy	Wu <i>et al.</i> , 1981
Lactosylceramide and tetradecyl or hexadecyl maltobionamide in LUV of various compositions	Lectins: Ricinus communis, agglutinin I, Concanavalin A, fusogen = PEG	Tissue culture lines: BG9-human NIL-8M2 hamster L-929 mouse	Transfer of fluorescent lipid to target cell in presence of lectin and fusogen	Szoka <i>et al.</i> , 1981
Beef brain ceramide; galactosyl, glycosyl and lactosyl ceramide in DMPC, chol, DCP liposomes	Direct	<i>In vivo</i>	—	Alving <i>et al.</i> , 1979

entraînait leur reconnaissance par les récepteurs du galactose présents sur les cellules non parenchymateuses et que 80 à 90 % de la capture hépatique induite par le Tris-Gal-Chol s'exerçait au niveau de ces cellules. A l'inverse, l'incorporation de Tris-Gal-Chol dans les HDL entraîne leur capture spécifique par les cellules parenchymateuses du foie (98 %), via le récepteur des asialo-glycoprotéines [VAN BERKEL et coll. (308)]. Il est vraisemblable que le ciblage cellulaire hautement spécifique des LDL et des HDL par le Tris-Gal-Chol est la conséquence de la différence de taille entre ces lipoprotéines. Les auteurs concluent que l'incorporation du Tris-Gal-Chol dans les LDL et les HDL (lors de l'addition de ce composé au plasma humain, celui-ci se retrouve rapidement associé à ces lipoprotéines) conduit à un catabolisme accru des LDL par les cellules de Küpffer et des HDL par les cellules parenchymateuses. Ce composé pourrait donc être utilisé pour abaisser le taux de cholestérol circulant ou pour le ciblage de drogues vers les cellules de Küpffer ou vers les cellules parenchymateuses du foie.

Les glycoprotéines et les glycoconjugués constituent donc une voie d'avenir intéressante pour le ciblage de drogues : inclus dans des systèmes à double membrane, ils permettront peut-être d'atteindre des organelles particuliers à l'intérieur de la cellule par interaction avec des récepteurs participant aux systèmes de reconnaissance membrane-membrane intracellulaires.

Le ciblage des drogues constitue donc un axe de recherche parallèle à la découverte de nouveaux dérivés utiles en thérapeutique. Tous les systèmes actuellement à l'étude n'ont pas pu être cités dans ce chapitre malgré l'intérêt qu'ils présentent. Ajoutons cependant le ciblage obtenu par l'utilisation de peptidyl-prodrogues activables par des protéases associées aux tumeurs [CARL et coll. (49)], ou encore une application élégante des immunotoxines permettant d'obtenir une immunosuppression spécifique par le biais de la conjugaison de la DNR à un haptène, ce conjugué permettant de supprimer la compétence immunitaire de lymphocytes B de Souris vis-à-vis de

l'haptène couplé [DIENER et coll. (81)]. Signalons encore l'utilisation d'immunotoxines ex vivo afin d'éliminer les lymphocytes T de la moelle osseuse dans la prévention de la réaction greffon contre hôte [FILIPOVICH et coll. (101)] ou leur utilisation pour éliminer les cellules tumorales de leucémie humaine dans les autogreffes de moelle [MYERS (202)].

Malgré les nombreux efforts qui ont été déployés dans la recherche de moyens de ciblage des drogues afin que celles-ci n'agissent que là où leur action est utile, les auteurs s'accordent pour signaler qu'un long chemin reste à parcourir avant que les concepts actuellement à l'étude trouvent les applications cliniques qui permettront d'apporter la preuve de la justesse des hypothèses avancées [TROUET et SCHNEIDER (302)]. De même, si le potentiel du ciblage des drogues est vaste et que de nombreux secteurs de la thérapeutique peuvent en bénéficier, il est bon d'en connaître les limites [GARDNER (118)]. Le ciblage des drogues permettra peut-être l'emploi en thérapeutique de composés jusqu'alors considérés comme toxiques et donc non utilisés (toxines). Il est clair qu'il n'y a pas une approche générale du ciblage des drogues et que chaque problème doit être traité individuellement. Ainsi, connaissant les avantages et les inconvénients des différentes stratégies et ayant des espoirs réalistes en ce qui peut être atteint, le chercheur pourra résoudre le problème posé.

La stratégie poursuivie au laboratoire dans le domaine du ciblage des drogues consiste en l'utilisation de conjugués drogue-glycoconjugué afin de diriger la drogue vers des récepteurs lectiniques membranaires. La lectine qui a été choisie comme modèle est le récepteur hépatique des asialo-glycoprotéines de Mammifère qui est la lectine membranaire la mieux connue à l'heure actuelle.

3 - LES LECTINES DE MEMBRANE

LE MODELE DU RECEPTEUR DES ASIALO-GLYCOPROTEINES DES HEPATOCYTES DE MAMMIFERE

Les lectines, primitivement mises en évidence dans le règne végétal (cf § 2.2.2) ont été, au cours des deux dernières décennies, découvertes dans le règne animal [cf. LIENER et coll., ed. (176)]. En effet, en 1968, ASHWELL et ses collaborateurs ont mis en évidence le premier récepteur spécifique de sucres chez les Mammifères [MORELL et coll. (200)]. Ce récepteur fut, par la suite, assimilé à une lectine [STOCKERT et coll. (280)], constituant la première lectine de Mammifère connue [ASHWELL et MORELL (16)]. Cette lectine qui reconnaît les résidus de galactose situés en position terminale non réductrice des glycoprotéines (asialo-glycoprotéines, abrev. : ASGP) est insérée dans la membrane des hépatocytes des Mammifères, d'où le terme de lectine membranaire. A la suite de ces travaux, de nombreuses interactions lectine membranaire - sucre ont été mises en évidence aussi bien chez les microorganismes (virus, bactéries, amibes) que chez les Oiseaux et les Reptiles, ainsi que chez les Mammifères, dans de nombreux organes (foie, coeur, poumon, cerveau...). La liste des lectines de membrane connues à l'heure actuelle ne cesse de s'accroître par leur découverte tant dans les cellules normales que dans les cellules transformées, (cf. Tableaux IV et VI). Plus récemment, la présence chez les Mammifères, de lectines solubles impliquées dans l'organisation moléculaire de l'environnement extracellulaire a également été démontrée [BARONDES (29)].

En dehors des lectines dont l'existence dans un tissu est démontrée par l'agglutination par des extraits d'organes de globules rouges porteurs de certaines spécificités, certains systèmes lectiniques sont mieux connus, ainsi que leur rôle in vivo. Citons, par exemple, le récepteur du mannose-6-phosphate impliqué dans le trafic des enzymes lysosomiques [NEUFELD et ASHWELL (207)], ou le récepteur des asialoglycoprotéines des

TABLEAU VI

Principales lectines de membranes isolées
[d'après MONSIGNY et coll. (192)]

	Origin	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 (α -methyl-D-mannoside)	Ofek <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 molds	<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 wingeii</i>	D-mannose	Burke and Ballou, 1978
Marine sponge	<i>Axinella polyplodes</i>	D-galactose	Baldo <i>et al.</i> , 1977
	<i>Acipos papillata</i>	N-acetyl-D-glucosamine and β -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> Protoplasts	D-galactose, D-xylose β -D-glucose	Bowles and Kauss, 1976 Larkin, 1977, 1978
	Sea urchin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine
Fish	<i>Electrophorus electricus</i>	D-galactose	Teichberg <i>et al.</i> , 1975
Muscle	Rat Myoblasts L 6	D-galactose Thiodigalactoside	Garner 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	β -D-galactoside	De Waele <i>et al.</i> , 1976
Lung	Chick	D-galactose β -D-galactoside	Kobiler and Barondes, 1977 De Waele <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	Mereil <i>et al.</i> , 1971 Weigel <i>et al.</i> , 1978 Tanabe <i>et al.</i> , 1979
	Rat	N-acetyl-D-glucosamine	Stockart <i>et al.</i> , 1976
	Rat (hepatocytes and Kupffer cells)	N-acetyl-D-glucosamine	Steer <i>et al.</i> , 1978 Mereil <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 Schnaar <i>et al.</i> , 1978
	Mouse (hepatocytes)	L-fucosyl- β -N-acetyl-D-glucosamine	Prieels <i>et al.</i> , 1978
	Bovine	N-acetyl-D-glucosamine and β -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	Kieða <i>et al.</i> , 1978, 1979
Thymus	Mouse	D-galactose, D-mannose N-acetyl-D-glucosamine N-acetyl-D-galactosamine	Kieða <i>et al.</i> , 1978, 1979
Stem cells	Teratocarcinoma	Mannose	Grabel <i>et al.</i> , 1979
Fibroblasts	Human	Mannose-6-phosphate D-fucose, N-acetyl-D-galactosamine	Kaplan <i>et al.</i> , 1977 Dyball and Edwards, 1977
Macrophages	Rat alveolar	Mannose and/or N-acetyl-D-glucosamine	Stahl <i>et al.</i> , 1978
	Rat liver	Mannose or N-acetyl-D-glucosamine	Achord <i>et al.</i> , 1978
	Rat Kupffer cells	D-galactose	Kelb and Kolb-Bachofen, 1978
	Rat Kupffer cells	N-acetyl-D-glucosamine	Steer <i>et al.</i> , 1978
Platelets	Human	Hexosamine, basic amino acids, galactose	Garner <i>et al.</i> , 1978
Erythrocytes	Human glycophorin	N-acetyl-D-galactosamine	Bowles and Hanke, 1977
Serum	Fibronectin	GT ₁ , CD ₁₁ gangliosides	Kleinman <i>et al.</i> , 1979

hépatocytes de Mammifères dont le rôle dans le catabolisme des glycoprotéines sériques est clairement établi [ASHWELL et HARFORD (13)]. Il serait fastidieux de passer en revue le grand nombre de lectines membranaires connues à ce jour [voir les revues de SIMPSON et coll. (268), MONSIGNY et coll. (191), SHARON (259), BARONDES (28), ASHWELL et HARFORD (13), BARONDES (30)]. Aussi étudierons-nous en détail le récepteur des ASGP des hépatocytes de Mammifères qui est lui-même à l'origine de nombreux travaux et qui constitue le modèle qui a été choisi au laboratoire pour les travaux concernant le ciblage des drogues.

Les glycoprotéines sériques désialylées ont une durée de vie dans la circulation considérablement réduite par rapport à leur forme native. Un récepteur spécifique du galactose présent dans les membranes des hépatocytes régule leur "clearance" par le biais de la reconnaissance des résidus de galactose démasqués par la désialylation. Ce phénomène a été démontré, à l'origine, avec la céruléoplasmine désialylée [MORELL et coll. (200)]. Les résidus de galactose exposés ont été identifiés comme les déterminants reconnus par la démonstration que le traitement de l'asialocéruléoplasmine avec une galactose oxydase ou une β -galactosidase [MORELL et coll. (200)], (Fig. 9) ou la resialylation enzymatique de l'ASGP [HICKMAN et coll. (149)], prolonge sa durée de vie dans la circulation. Ce phénomène a pu être étendu aux autres glycoprotéines plasmatiques [MORELL et coll. (199)] et nombreuses sont les glycoprotéines susceptibles de voir leur épuration sanguine accélérée par désialylation (Tableau VII).

Depuis la découverte de ce récepteur, de nombreux travaux ont permis d'explorer la nature de la molécule et ses interactions avec les ligands, ainsi que les relations entre cette molécule et la cellule dans laquelle elle se trouve. C'est ainsi que l'on connaît de mieux en mieux ses propriétés physicochimiques, sa spécificité, sa physiologie au sein de la cellule et dans l'organisme ainsi que sa biosynthèse [voir les revues de ASHWELL et MORELL (15), ASHWELL et KAWASAKI (14)],

Pourcentage de radioactivité dans le sérum

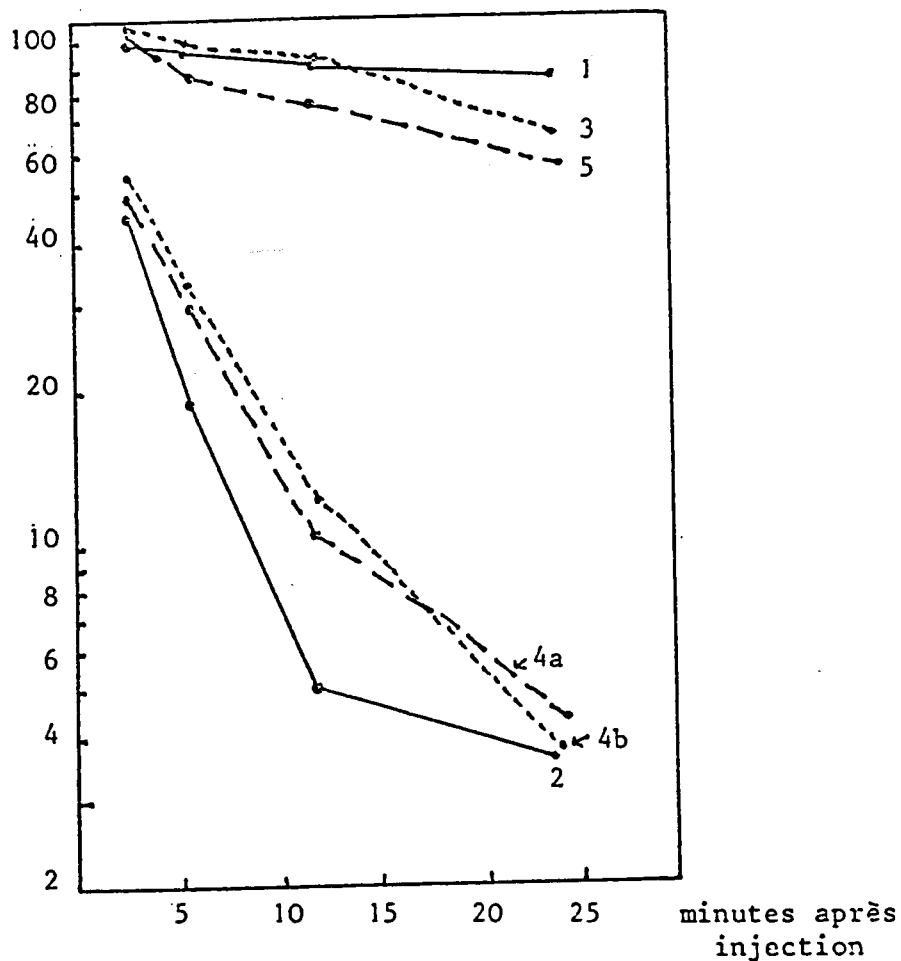


Figure 9 Disparition du sérum de la céruléoplasmine de Lapin native et modifiée, marquée au ^{64}Cu [d'après MORELL et coll. (200)] :

- courbe 1 : céruléoplasmine
- courbe 2 : asialocéruléoplasmine
- courbe 3 : céruléoplasmine oxydée
- courbe 4 : asialocéruléoplasmine doublement marquée : 4a tritium, 4b ^{64}Cu
- courbe 5 : asialo-agalactocéruléoplasmine

TABLEAU VII

Protéines susceptibles d'être éliminées par l'intermédiaire du récepteur des asialoglycoprotéines. [d'après ASHWELL et HARFORD (13)].

<u>Modulators of cellular responses</u>	<u>Protein complexers</u>
Erythropoietin	α_1 -Antitrypsin
Follicle stimulating hormone	Haptoglobin
Human chorionic gonadotropin	α_2 -Macroglobulin
Interferon	Molecules of immunological importance
<u>Carrier proteins for smaller molecules</u>	<u>Immunoglobulin G</u>
Ceruloplasmin	IgG-antigen complex
Hemopexin	<u>Other</u>
Thyroglobulin	Carcino-embryonic antigen
Thyroxin-binding globulin	Fetuin
Transcobalamine	Glycophorin
Transcortin	Orosomuroid
Transferrin	Prothrombin

ASHWELL et STEER (17), ASHWELL et HARFORD (13), HARFORD et ASHWELL (144-145), STOCKERT (277). Nous passerons rapidement en revue les premiers travaux qui ont permis l'isolement et l'étude de la localisation et des propriétés physicochimiques du récepteur et nous insisterons plus particulièrement sur des travaux plus récents concernant la spécificité du récepteur, sa physiologie et sa biosynthèse.

3.1 - Isolement et propriétés physicochimiques du récepteur

L'activité de liaison des ASGP est associée aux fractions membranaires du foie [PRICER et ASHWELL (229)]. Le récepteur a été solubilisé par traitement d'homogénats de foie de Lapin par le Triton X 100 [MORELL et SCHEINBERG (201)]. HUDGIN et coll. (155) ont purifié par chromatographie d'affinité, une fraction hydrosoluble présentant l'activité de liaison des ASGP. Les paramètres de spécificité pour le ligand, de pH optimum et l'absolue nécessité du calcium pour la liaison de cette préparation sont identiques à ceux qui ont été observés dans les études de "clearance" [MORELL et coll. (199)], et pour la liaison aux membranes plasmiques [PRICER et ASHWELL (229)].

Le récepteur purifié par affinité est composé de 10 % de sucres et la présence à la fois de glycanes de type N-acétyl lactosaminique et de type oligomannosidique a pu être établie par l'analyse de glycopeptides préparés à partir de récepteur isolé de foie de Lapin [KAWASAKI et ASHWELL (161)]. LOWE et NILSSON (178) ont établi la structure primaire du glycanne de type N-acétyl lactosaminique de ce récepteur (Fig. 10) : il s'agit d'un glycanne triantenné sialylé, non fucosylé. L'intégrité des motifs oligosaccharidiques du récepteur est essentielle pour son activité fonctionnelle puisque le traitement des membranes plasmiques [PRICER et ASHWELL (229)], ou du récepteur purifié [HUDGIN et coll. (155)], par une neuraminidase entraîne la disparition de son activité par "autosaturation" de son site lectinique. En effet, l'activité du récepteur inactivé

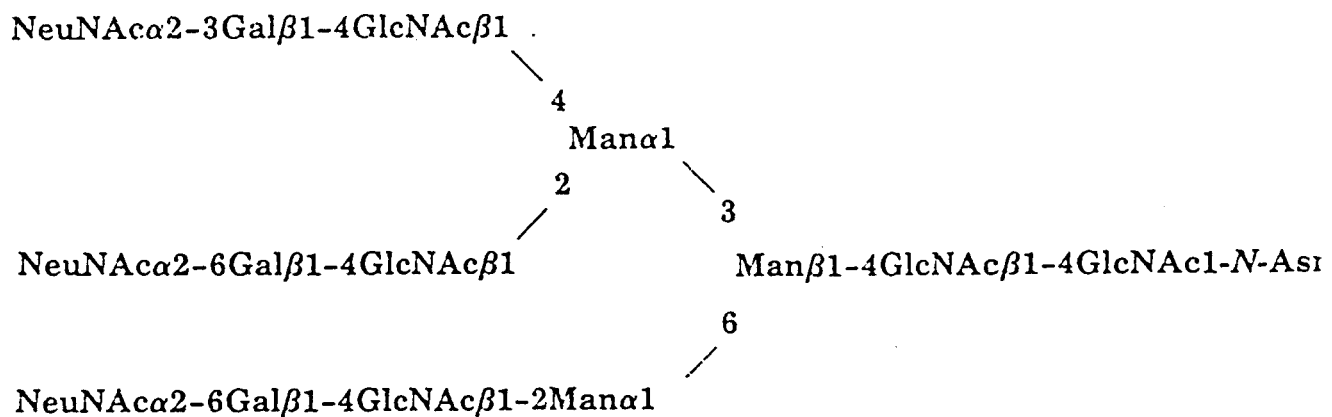


Figure 10 Structure du glycanne du récepteur hépatique des asialoglycoprotéines de Lapin.
 [d'après LOWE et NILSSON (178)].

par la neuraminidase peut être restaurée par traitement par une galactose oxydase ou une β -galactosidase ou par resialylation enzymatique [PAULSON et coll. (223)], (Fig. 11). Ceci a conduit à l'interprétation que la perte d'activité est une conséquence de la liaison par le récepteur de ses propres résidus de galactose exposés par la désialylation.

Les études physiques effectuées sur la protéine isolée du foie de Lapin montrent que celle-ci présente un fort degré d'aggrégation. L'addition de Triton X 100 entraîne la formation d'unités de 260 000 Da à partir desquelles se forment les agrégats [KAWASAKI et ASHWELL (160)]. L'analyse en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS permet de distinguer 2 polypeptides de masses moléculaires apparentes 48 000 et 40 000 Da. L'étude de la dénaturation thermique du récepteur isolé du foie de Lapin montre que la fixation du calcium stabilise le récepteur vis-à-vis de cette dénaturation. La fixation de ligands spécifiques ajoute un nouveau degré de stabilisation à la protéine. L'étude de la liaison du calcium au récepteur isolé du foie de Rat montre que la liaison du calcium à cette protéine entraîne son aggrégation. De même, BLOMHOFF et coll. (36) ont démontré que le récepteur isolé fixait 4 ions calcium uniquement en présence d'ASGP. La fixation montre une coopérativité positive et la constante d'association à demi-saturation des sites de liaison est de l'ordre de 10^{-5}M^{-1} . Le récepteur isolé est saturé à une concentration de 0,1mM en ions calcium.

Le récepteur de Rat a été isolé par chromatographie d'affinité [TANABE et coll. (288)] et l'analyse en SDS-PAGE montre qu'il est constitué d'une sous-unité majeure de 47 000 Da et de 2 sous-unités mineures. STEER et coll. (275) ont montré que la masse moléculaire du récepteur in situ était de 105 000 Da. Le récepteur des ASGP de foie humain isolé et caractérisé par BAENZIGER et MAYNARD (23) est composé d'une seule sous-unité de 41 000 Da. Les compositions en acides aminés et en sucres du récepteur du foie de Rat et du foie humain sont très voisines de

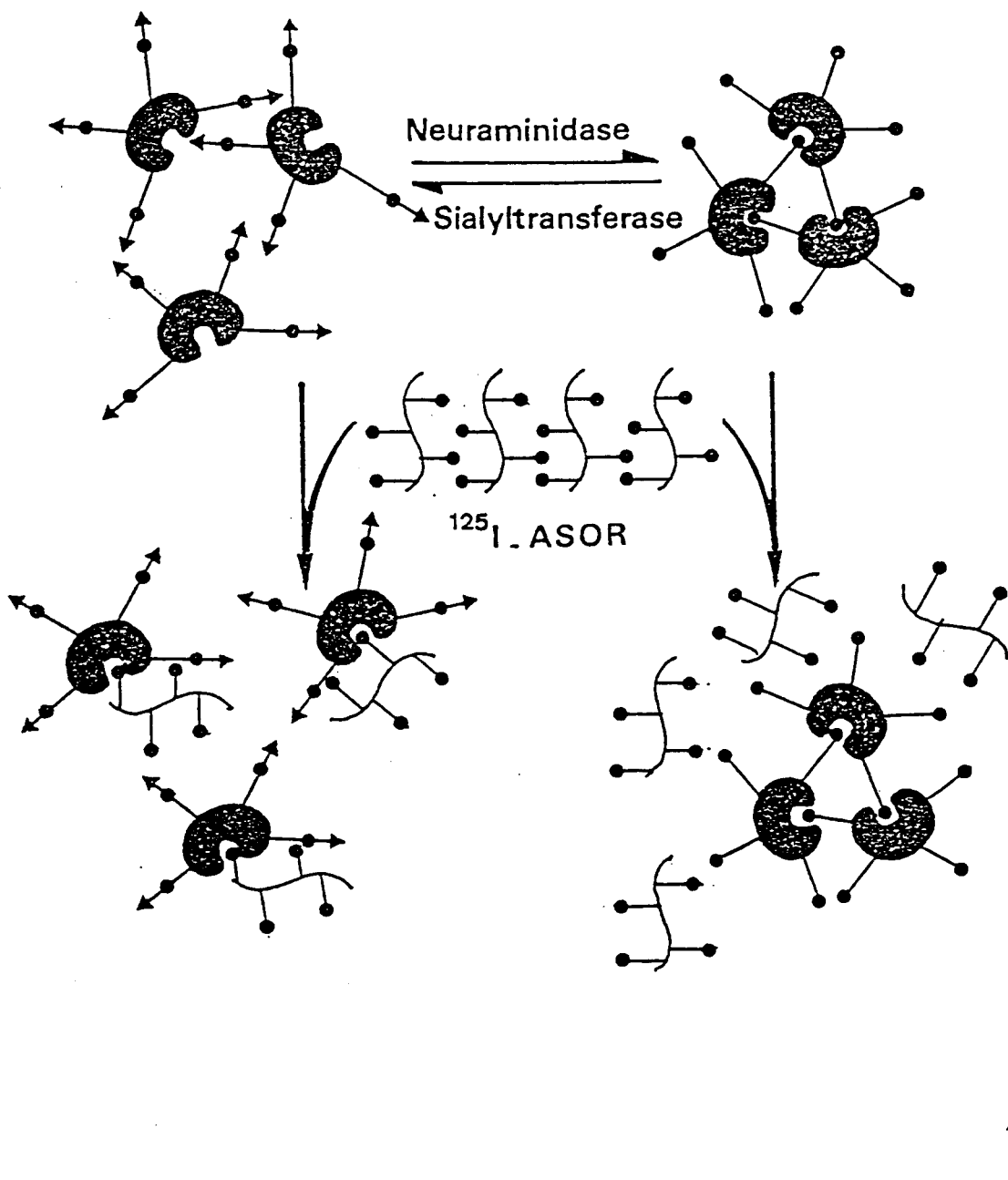


Figure 11 Mécanisme de l'inhibition de la lectine hépatique par la neuraminidase et de restauration de l'activité de liaison par resialylation. [d'après PAULSON et coll. (223)].

celles des préparations obtenues à partir de foie de Lapin. L'unité fonctionnelle du récepteur humain des ASGP est un multimère d'un polypeptide non glycosylé de 34 000 Da [SCHWARTZ et RUP (252)], conduisant à un récepteur de 70 000 Da dans les membranes des hépatocytes et de 140 000 Da dans les cellules de la lignée d'hépatome humain Hep G2 [SCHWARTZ et coll. (254)].

3.2 - Site de liaison des asialoglycoprotéines

Le site de liaison du récepteur de Lapin étudié après immobilisation de la protéine sur Sépharose [SARKAR et coll. (246)], s'est révélé être de taille réduite puisque seul le sucre non réducteur et une portion de l'avant dernier résidu de sucre influencent la capacité de saccharides à inhiber la fixation d'¹²⁵I-asialoorosomucoïde (ASOR). Le classement des sucres en fonction de leur pouvoir inhibiteur s'établit comme suit : méthyl N-acétyl- α -D-galactosamine >> méthyl N-acétyl- β -D-galactosamine > méthyl β -D-galactose > méthyl α -D-galactose. Les monosaccharides GalNAc, Gal, D-Fuc et le lactose possèdent la même affinité. Le motif D-Gal (β 1-3) D-Glc NAc se révèle présenter une meilleure affinité que l'analogue lié en 4 et la substitution de l'osamine réductrice par la N-acétyl galactosamine entraîne une diminution de l'affinité. Le récepteur isolé de foie humain présente également une affinité supérieure pour la N-acétyl galactosamine que pour le galactose [BAENZIGER et MAYNARD (23)].

STOWELL et LEE (281) ont démontré par l'utilisation de néoglycoprotéines, que le récepteur ne pouvait distinguer la configuration D-galacto et D-gluco et ont pu isoler le récepteur de Lapin par chromatographie d'affinité sur glucosyl-BSA (sérum albumine bovine). L'hypothèse de la présence d'un groupement anionique à proximité du site de liaison a été avancée, s'appuyant sur la constatation que, à la différence des galacto-néoglycoprotéines, les glucosyl-néoglycoprotéines ne se lient au récepteur que lorsque le glucose est lié à l'albumine via un groupement amidine. BAENZIGER et FIETE (21) ont démontré que les

asialo-glycopeptides triantennés sont endocytés avec la même cinétique que l'ASOR alors que les glycopeptides biantennés et les oligosaccharides avec un ou deux résidus de galactose terminal ne le sont pas et ont proposé que seuls les glycopeptides présentant des résidus de galactose ou de N-acétyl galactosamine terminaux disposés dans une configuration spatiale stricte peuvent induire une modification de conformation du récepteur préalable à l'endocytose.

De même, MORELL et coll. (199) avaient montré que l'asialotransferrine n'est pas reconnue par le récepteur hépatique. Cependant, REGOECZI et coll. (235) ont démontré en prolongeant le temps d'observation que la durée de vie de l'asialotransferrine dans le sérum était réduite par rapport à la forme native sialylée. L'analyse des sucres montre que la transferrine présente essentiellement deux chaînes glycaniques de type biantenné [JAMIESON et coll. (157), SPIK et coll. (273a)], à la différence de l'orosomucoïde qui présente 5 chaînes glycaniques en majorité tri- et tétraantennées [FOURNET et coll. (112)]. La fixation et l'endocytose de l'asialotransferrine (ASTF) humaine par l'hépatocyte de Rat sont deux phénomènes distincts : les molécules d'ASTF isolées, bien que se fixant au récepteur hépatique ne présentent pas la quantité ou la densité de résidus de galactose terminal nécessaire pour déclencher l'endocytose. Celle-ci est induite par l'action combinée de plusieurs molécules agissant en synergie [REGOECZI et coll. (236)].

En 1982, CONNOLLY et coll. (60) ont étudié la fixation et l'endocytose de groupements de résidus de galactose et ont montré que les groupements de 3 ou 4 résidus de galactose présentaient un pouvoir inhibiteur sur la fixation d'asialo-glycopeptides triantennés supérieur aux groupements de 2 résidus. Les auteurs ont montré également que, dans certaines conditions, des ligands de faible masse moléculaire pouvaient être internalisés et par la suite ramenés à la surface de la cellule.

LEE (172) a démontré que la lectine hépatique possédait au moins un groupement chargé négativement au niveau du site de liaison et a proposé que la présence de ce groupement soit directement responsable de l'incapacité des glycoprotéines natives sialylées à s'y fixer. Poursuivant l'étude du site de liaison du récepteur hépatique, LEE et coll. (173), ont exploré la capacité d'oligosaccharides synthétiques copiant les glycannes de type N-acétyllactosaminique à inhiber la fixation de ligand marqué. Les auteurs ont démontré une hiérarchie dans le pouvoir inhibiteur : tétraantenné > triantenné >> biantenné >> monoantenné, un ligand tétraantenné se montrant 1×10^6 fois plus inhibiteur qu'un ligand monoantenné. De même, l'oligosaccharide triantenné présentant le groupement N-acétyllactosaminique lié en 1,4 sur le mannose s'avère plus inhibiteur que le même oligosaccharide lié en 1,6. Il apparaît que dans la conformation la plus favorable, les résidus de galactose sont séparés dans l'espace par une distance d'environ 15 Å alors que dans la conformation la moins favorable, cette distance est voisine de 25 Å.

En 1985, HARDY et coll (142) ont démontré que sur les hépatocytes de Lapin, il existait 3 ou 4 fois plus de sites de liaison pour un asialoglycopeptide triantenné ou pour un ligand synthétique di-tris-lac présentant six résidus de galactose non réducteur que pour l'asialoorosomucoïde et que l'ASOR ne peut ni saturer tous les sites de liaison du galactose présents à la surface des hépatocytes, ni empêcher la liaison à haute affinité du ligand de faible masse moléculaire di-tris-lac. S'appuyant sur ces observations, les auteurs ont proposé un modèle pour la liaison des différents ligands à la surface des hépatocytes de Lapin dans lequel un site de liaison de l'ASOR représente 2 ou 3 sites pour des ligands de petite taille (Fig. 12). Les sites occupés par l'ASOR seraient inaccessibles à de nouvelles molécules d'ASOR ou de glycopeptide triantenné mais pourraient être accessibles au ligand di-tris-lac grâce à la flexibilité de sa conformation ou à la présence de 3 résidus de galactose supplémentaires.

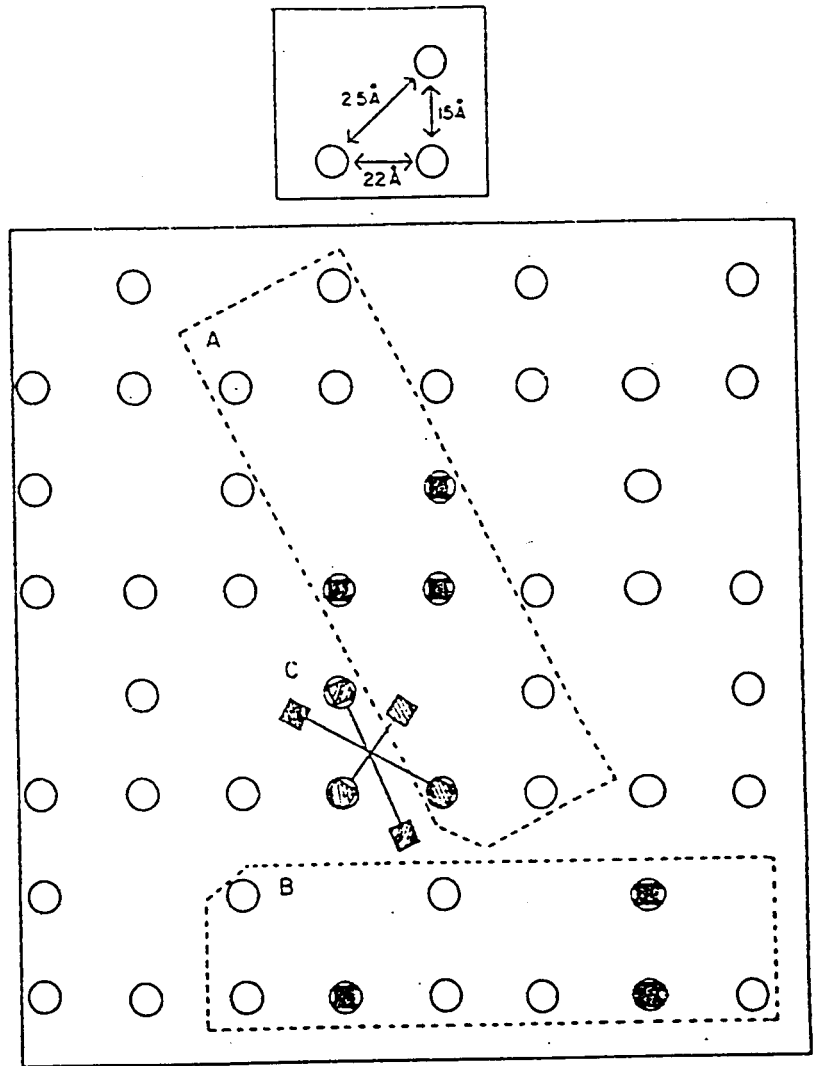


Figure 12 Modèle de liaison de différents ligands à la surface des hépatocytes de Lapin.
 L'unité de liaison (trois sites de liaison au galactose) correspond au site de liaison du glycopeptide triantenné désialylé de l'inhibiteur de l'alpha 1 - protéase.
 Les aires A et B correspondent aux sites de liaison de l'asialo-orosomucoïde. C représente la liaison du ligand synthétique à six galactoses.
 [d'après HARDY et coll. (142)].

3.3. - Endocytose et devenir des asialoglycoprotéines endocytées

3.3.1. - Fixation du ligand

La première interaction du ligand avec son récepteur au cours de l'endocytose a lieu au niveau de la membrane plasmique de l'hépatocyte. Les caractéristiques de la liaison étudiées sur les membranes plasmiques [PRICER et ASHWELL (229)] et sur les hépatocytes isolés par perfusion à la collagénase [STEER et ASHWELL (274), TOLLESHAUG et coll. (291), WEIGEL (325), BAENZIGER et FIETE (21)], sont identiques à celles décrites ci-dessus pour le récepteur solubilisé. Les paramètres de liaison et de dissociation des ligands ont été déterminés à basse température dans le but d'inhiber l'internalisation [WEIGEL (325), TOLLESHAUG (289)]. La vitesse de dissociation est extrêmement lente, ce qui peut contribuer à la diversité des résultats trouvés par les différents auteurs qui ont mesuré les constantes de liaison de l'ASOR aux hépatocytes isolés par la technique de SCATCHARD [STEER et ASHWELL (274), WEIGEL (325), BAENZIGER et FIETE (21), TOLLESHAUG et BERG (290), SCHWARTZ et coll. (253)]. La nécessité d'atteindre l'équilibre au cours des expériences conduisant à ce calcul ainsi que d'autres difficultés expérimentales expliquent les variations observées (200 fois). SCHWARTZ et coll. (253) ont à ce propos décrit l'influence de certains inhibiteurs présents dans le sérum ou dans les préparations d'albumine couramment employés au cours de ces expériences.

L'interaction des ligands avec le récepteur des ASGP a lieu au moins en partie au niveau de "coated pits" [WALL et coll. (322)]. Ces régions particulières de la membrane plasmique ont été ainsi appelées à cause du "manteau diffus" (fuzzy coat) qui recouvre la surface cytoplasmique. En 1981, KOLB-BACHOFEN (169) a suggéré que l'association de particules d'or colloïdal recouvertes de ligand avec les "coated pits" sur les hépatocytes

isolés est précédée par la liaison au niveau de sites diffus sur la surface sinusoïdale et par la microaggrégation locale de complexes récepteur-ligand. Les résultats indiquent que cette microaggrégation et la migration présumée pour former les "coated pits" pourraient avoir lieu à 4°C. La mobilité latérale du récepteur des ASGP est également suggérée par la démonstration que l'adhésion des hépatocytes à un substrat porteur d'un ligand entraîne le rassemblement ("patching") des récepteurs [WEIGEL (326)].

La portion du récepteur responsable de l'interaction avec d'autres molécules conduisant à l'endocytose semble être localisée sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. En effet, HARFORD et ASHWELL (143) ont montré, par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le récepteur solubilisé, la présence de déterminants antigéniques différents de part et d'autre de la membrane, démontrant ainsi la disposition transmembranaire du récepteur. Cette orientation du récepteur est confirmée par les travaux de NAKADA et coll. (204) qui ont montré que le récepteur était synthétisé au niveau des ribosomes associés aux membranes et traverse la membrane microsomale. Par des techniques de radioiodination des protéines de la surface externe des cellules et analyse des résidus de tyrosine marqués, CHIACCHIA et DRICKAMER (55) ont démontré en 1984 que le récepteur était une glycoprotéine transmembranaire présentant sa partie N-terminale du côté cytoplasmique de la membrane et sa partie C-terminale portant les motifs oligosaccharidiques à la face externe de la membrane (cf § 3.4). Le fragment exposé à la face cytoplasmique de la membrane est vraisemblablement responsable de l'interaction du récepteur avec les "coated pits", la clathrine, protéine majeure des "coated pits" étant elle-même à la face interne de la membrane plasmique. BLUMENTHAL et coll. (37) ont démontré une modification de la conformation spatiale du récepteur lors de la fixation du ligand avec translocation du récepteur d'un côté du double feuillet lipidique à l'autre qui pourrait servir de signal conduisant à l'endocytose [KLAUSNER et coll. (165)]

3.3.2 - Internalisation du ligand

L'internalisation du ligand lié au récepteur est rapide : la vitesse calculée pour une cinétique d'ordre 1 à 37°C est de $3,7 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, [TOLLESHAUG (289)], ce qui correspond à une demi-vie pour le récepteur occupé à la surface cellulaire de 3 minutes. STEER et ASHWELL (274), d'après le nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire et la quantité d'ASOR internalisée et dégradée pendant un intervalle de temps donné avaient également estimé ce temps de présence des récepteurs à la surface cellulaire à 3 minutes. Mettant à profit la vitesse d'internalisation, des sections de foie fixées 30 secondes après l'injection d'ASGP couplées à la peroxydase ont permis de visualiser le produit de la réaction enzymatique dans des petites vésicules (<1000 Å) et dans des structures plus grandes et irrégulières localisées à la périphérie du cytoplasme, à proximité des sinusoides [WALL et coll. (322)]. Un certain pourcentage (45 %) de ces structures d'apparence vésiculaire sont ouvertes vers l'extérieur de la cellule. STOCKERT et coll. (278) ont décrit la présence de canaux de pinocytose et de structures tubulaires renfermant le ligand. Il a également été suggéré [WILLINGHAM et PASTAN (342)] que des structures apparaissant comme des vésicules "coated" sont en fait des coupes de "coated pits" et que contrairement à ce qui avait été observé, les vésicules "coated" ne sont pas un intermédiaire dans le processus d'internalisation.

Il est clairement établi que des vésicules plus grandes non "coated" sont impliquées dans la translocation du ligand. Le terme de réceptosome a été proposé [WILLINGHAM et PASTAN (342)] pour évoquer le rôle de ces vésicules dans l'endocytose via un récepteur. D'autres auteurs ont appelé cette structure vacuole d'endocytose ou endosome [HELENIUS et coll. (148)]. Le mécanisme de formation des réceptosomes met en jeu le pincement de "coated pits" pour former des vésicules "coated". Les vésicules "coated" perdraient ensuite leur revêtement de clathrine qui retournerait

à la surface cellulaire pour former de nouveaux "coated pits". PASTAN et WILLINGHAM (221) ont suggéré en 1983 que les "coated pits" étaient des structures stables toujours associées avec la surface cellulaire et que les réceptosomes se formaient directement à partir de ceux-ci comme le montre la Fig. 13. Les réceptosomes migrent ensuite dans le cytoplasme et s'accumulent petit à petit dans la région de la cellule proche de l'appareil de Golgi. Les réceptosomes atteignent vraisemblablement le Golgi en suivant les microtubules. La présence de "coated pits" dans le Golgi est vraisemblablement associée, comme dans le cas des "coated pits" de la surface cellulaire, à un phénomène de concentration du ligand avant son transfert au compartiment suivant, ici le lysosome (Fig. 14) (Pour revue concernant l'endocytose cf. [PASTAN et WILLINGHAM (222)]).

En 1985, WILLINGHAM et PASTAN (343) ont proposé que les termes réceptosome, endosome, CURL (compartment of uncoupling of receptor and ligand) identifiés par différents auteurs désignent en fait le même organelle. DESCHUYTENEER et coll. (80) ont rapporté l'accumulation des ligands à galactose terminal dans des corps multivésiculaires avant leur délivrance aux lysosomes, cette accumulation supportant l'hypothèse de l'existence d'un compartiment intermédiaire entre l'endroit de la cellule où s'effectue la séparation du ligand de son récepteur et le lysosome. Par des techniques de centrifugation différentielle, DEBANNE et coll. (69) ont montré l'existence de deux populations de structures pré-lysosomiques, l'une, non sédimentable impliquée dans le transport des molécules de ligand destinées soit à l'exocytose, soit à la dégradation dans le lysosome, l'autre, sédimentable, représentant un lien entre la précédente et le lysosome. Le compartiment endosomal mis en jeu dans l'endocytose a pu être caractérisé [WALL et HUBBARD (320)].

La découverte d'inhibiteurs spécifiques de chaque étape du parcours intracellulaire des ASGP a permis une approche biochimique de l'endocytose des ASGP, parallèle aux études

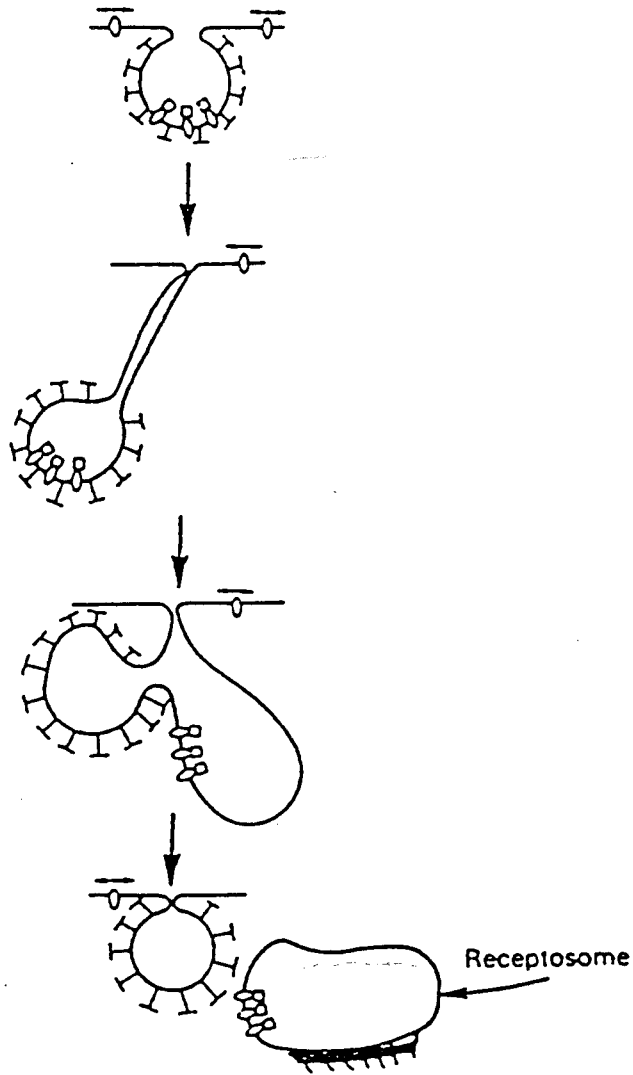


Figure 13 Mécanisme proposé pour la formation de réceptosomes à partir des "coated pits" de la membrane plasmique. [d'après PASTAN et WILLINGHAM (221)].

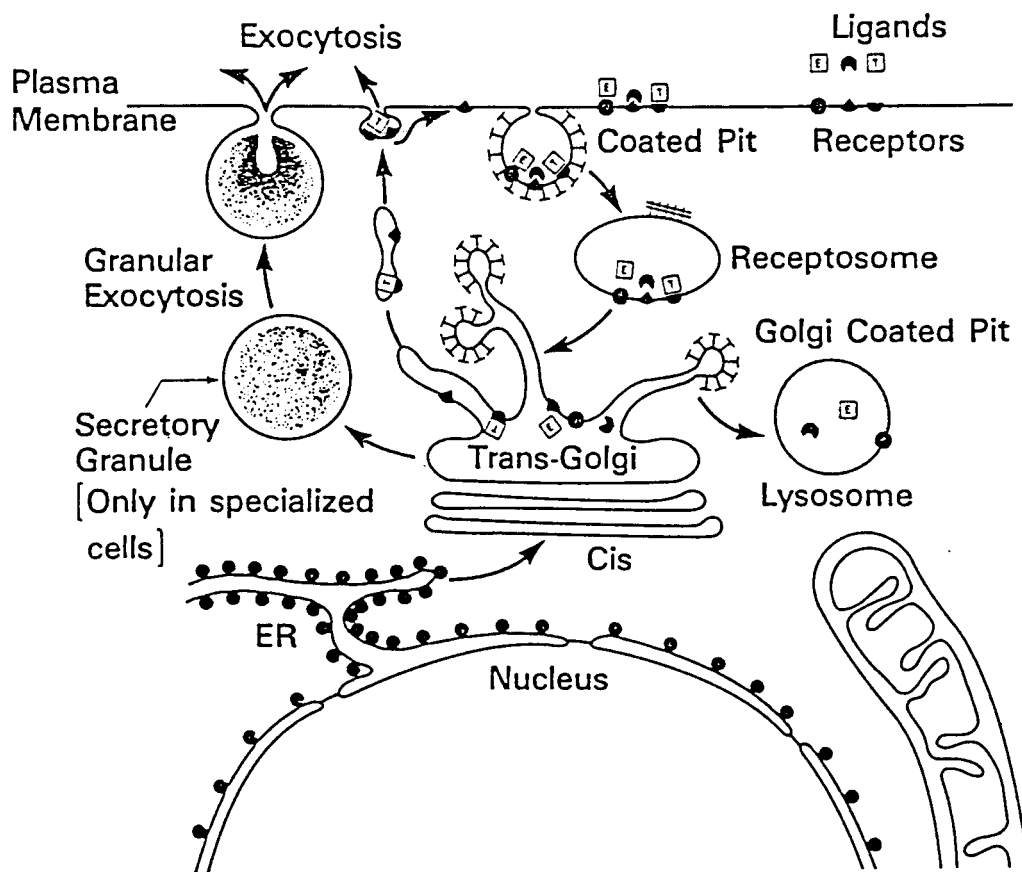


Figure 14 Représentation schématique des différentes voies de l'endocytose et de l'exocytose dans les cellules en culture. Les éléments cellulaires sont représentés schématiquement mais ne sont pas dessinés à l'échelle.

1. ligand = EGF (E), récepteur de l'EGF (●) : le ligand et le récepteur sont délivrés aux lysosomes ;
2. ligand = transferrine (T), récepteur de la transferrine (◡) : le ligand et le récepteur sont recyclés à la surface de la cellule ;
3. ligand = alpha 2 - macroglobuline (▲), récepteur de l'alpha 2 - macroglobuline (▲) : le ligand est délivré aux lysosomes mais le récepteur est recyclé efficacement à la surface de la cellule.

Dans certains systèmes, le récepteur peut également être concentré dans les "coated pits" en l'absence de ligand et effectuer un cycle intra et extra cellulaire d'une manière indépendante du ligand.

[d'après PASTAN et WILLINGHAM (222)].

ultrastructurales, (Fig. 15). C'est ainsi que [HARFORD et coll. (147)] :

1 - La fixation du ligand aux récepteurs de la surface cellulaire est mesurée à 4°C. Cette fixation est inhibée par un excès de ligand non marqué ou par l'emploi d'anticorps anti-récepteur. la dissociation est obtenue par l'utilisation de chélateurs du calcium, de N-acétylgalactosamine ou par abaissement du pH.

2 - L'internalisation des complexes récepteur-ligand entraîne leur résistance au déplacement par la N-acétylgalactosamine et est empêchée à 4°C.

3 - La dissociation intracellulaire du ligand est étudiée par des techniques de solubilisation, précipitation, elle est inhibée à une température < à 18°C et par l'emploi d'amines ou de monensine.

4 - La ségrégation des récepteurs et des ligands est mesurée par l'étude de leur réassociation en présence de monensine et est inhibée par l'utilisation de colchicine ou de cytochalasine B.

5 - La délivrance du ligand aux lysosomes est étudiée en gradient de densité de Percoll et est empêchée par la privation en Na+.

6 - La protéolyse intralysosomale est étudiée par l'apparition de produits de dégradation acido-solubles et est empêchée par la leupeptine.

DUNN et coll. (89) ont démontré que la dégradation de l'¹²⁵I-asialofétuine par le foie perfusé était inhibée à 20°C. Bien que l'endocytose de l'ASF et le mouvement des vésicules de pinocytose vers la région du golgi et des lysosomes soient conservés à 20°C, la fusion entre les vésicules de pinocytose et les lysosomes est inhibée à cette température. L'étude de l'influence de la température sur l'endocytose a montré l'existence de deux processus différents qui semblent réguler l'internalisation à 20°C et 37°C [WEIGEL et OKA (329)]. A l'équilibre, la vitesse de fixation de l'ASOR aux récepteurs de la surface cellulaire est plus grande que la vitesse

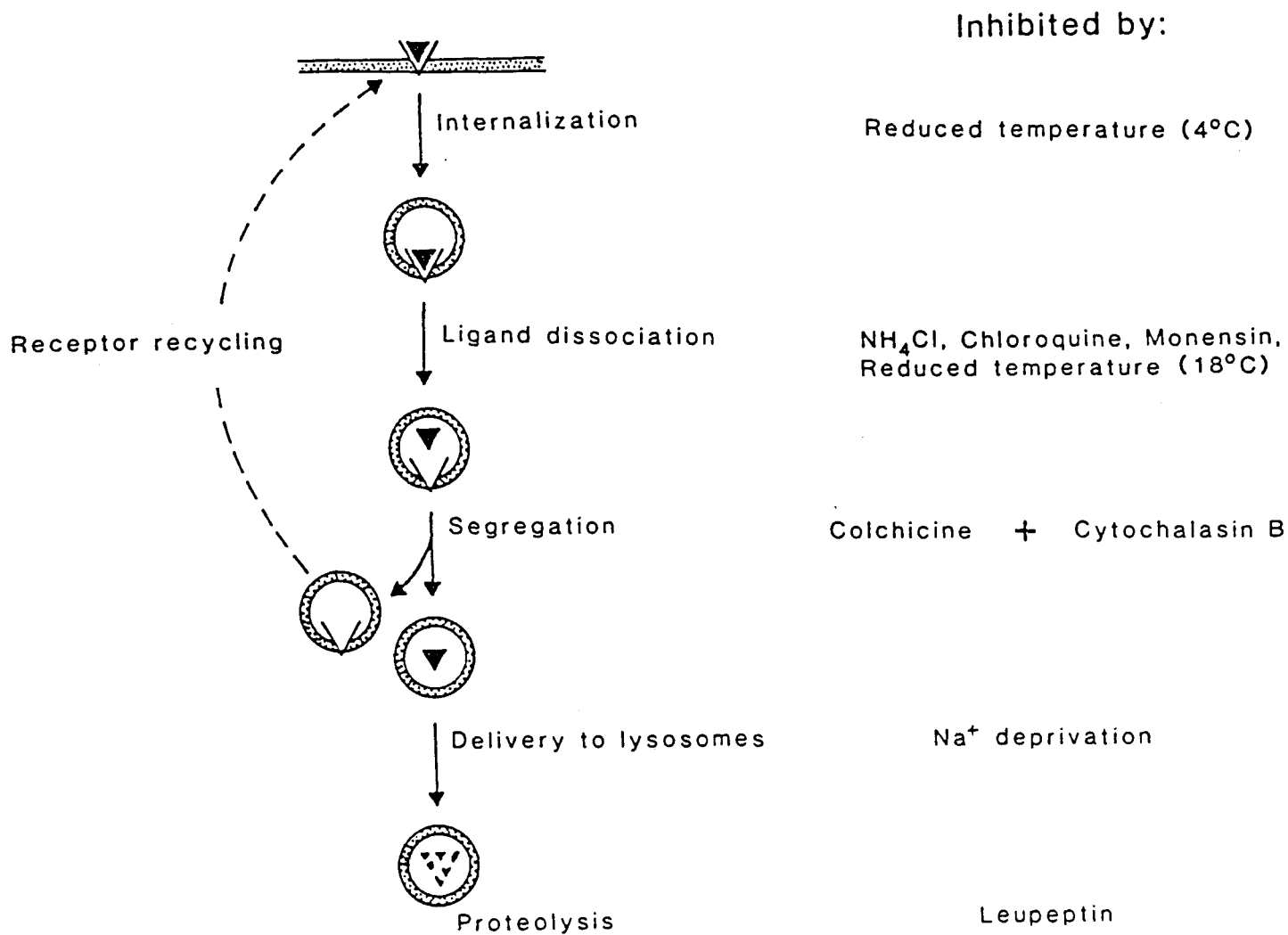


Figure 15 Représentation schématique de l'endocytose des asialo-glycoprotéines via leur récepteur et des inhibiteurs de cette endocytose permettant d'individualiser 5 étapes dans le processus complet d'endocytose. [d'après WOLKOFF et coll. (345)].

d'internalisation qui est elle-même supérieure à la vitesse de dégradation, [WEIGEL et OKA (330)]. WEIGEL et OKA (331), en 1983, ont montré que le nombre de récepteurs par cellule est multiplié par un facteur 2 ou 3 en 30 à 60 minutes quand les hépatocytes fraîchement isolés passent de 0 à 37°C et que cette augmentation est également observée sur des cellules qui ont été traitées par l'EDTA dans le but d'exposer les récepteurs cryptiques de la surface cellulaire [WEIGEL (325)]. Les auteurs concluent que, en l'absence de ligand, les récepteurs de surface peuvent soit être recyclés, soit internalisés de façon réversible, soit séquestrés afin d'empêcher l'accès du ligand. WEIGEL et OKA (332) ont également démontré que tous les récepteurs intracellulaires étaient fonctionnels et impliqués dans l'endocytose. Les récepteurs intracellulaires seraient donc équivalents aux récepteurs de la surface cellulaire ou constitueraient un réservoir ou encore pourraient jouer un rôle dans le cheminement du ligand internalisé.

Les propriétés de liaison des récepteurs de la surface cellulaire peuvent être modulées par des interactions transmembranaires [FIETE et coll. (100)]. Cette modulation de la fixation représenterait un mécanisme rapide permettant la libération du ligand et le retour immédiat du récepteur à la surface cellulaire.

3.3.3 - Dissociation du complexe récepteur-ligand

L'étude du devenir du récepteur et du ligand pendant l'endocytose montre que le ligand demeure associé au récepteur après internalisation et que le complexe est dissocié avant la dégradation [BRIDGES et coll. (44)]. Les récepteurs, une fois dissociés, sont rapidement ramenés à la surface cellulaire à partir d'un pool intracellulaire. La dissociation du ligand internalisé s'effectue selon un mode biphasique. La moitié des complexes qui pénètrent dans la cellule se dissocient rapidement, l'autre moitié très lentement [WEIGEL (328)]. HARFORD et coll.

(146) ont montré que la dissociation des complexes récepteur-ligand a lieu dans une vésicule d'endocytose différente du lysosome et est provoquée par un abaissement du pH. Outre l'acidification, les auteurs ont proposé différents mécanismes permettant d'expliquer cette dissociation, comme l'absence de calcium, la modification chimique du ligand telle que l'enlèvement ou l'altération des résidus de galactose terminal, le déplacement par compétition ou la modulation du site de liaison du récepteur.

GUEUZE et coll. (136) ont montré l'existence de vésicules renfermant le ligand et dont les membranes présentent peu de récepteurs (CURL : compartment of uncoupling of receptor and ligand). Ces vésicules CURL semblent se transformer en lysosomes secondaires, le récepteur, quant à lui, se trouvant concentré dans des extensions tubulaires intermédiaires dans son recyclage vers la surface cellulaire. L'acidification rapide des vésicules d'endocytose renfermant des ASGP dans des cellules d'hépatome humain a été démontrée [TYCKO et coll. (304)], ainsi que des modifications de conformation des récepteurs des ASGP induites par le pH légèrement acide trouvé dans ces vésicules [DIPAOLA et MAXFIELD (84)]. Cette modification de conformation pourrait expliquer la dépendance vis-à-vis des conditions de pH de la liaison du ligand et pourrait également permettre la protection des récepteurs de la dégradation enzymatique dans les compartiments d'endocytose ou les lysosomes. OKA et WEIGEL (213) ont mis en évidence l'existence de deux compartiments de dissociation des complexes récepteur ligand que l'on peut distinguer par leurs cinétiques et leur sensibilité à la température. Le retour d'une partie du ligand endocyté à la surface cellulaire et la diacytose suggèrent qu'une partie des complexes récepteur-ligand intracellulaires est en équilibre avec les complexes de la surface cellulaire ou qu'ils échappent aux étapes ultérieures qui conduisent à la dissociation et subissent un mécanisme de recyclage vers la surface cellulaire.

WOLKOFF et coll. (345), en 1984, ont montré que la ségrégation entre récepteur et ligand, consécutive à la dissociation des complexes, se produit comme la dissociation dans un compartiment d'endocytose situé en amont du lysosome (Fig. 15). L'étude du devenir des complexes récepteur-ligand montre que suite à leur dissociation, les récepteurs sont recyclés à la surface de la cellule.

3.3.4 - Localisation cellulaire et recyclage du récepteur

Le récepteur des ASGP qui avait été mis en évidence au niveau des membranes plasmiques [PRICER et ASHWELL (229)], a également été identifié dans de nombreuses fractions intracellulaires comme l'appareil de Golgi et les lysosomes [PRICER et ASHWELL (230)] et au niveau de la membrane nucléaire [SCHULTE et MONSIGNY (248)]. La présence de molécules de récepteur au niveau du golgi avait été, à l'origine, reliée à sa biosynthèse. Cependant, VAN DEN BOSCH et coll. (310), en 1986, ont démontré sa présence dans le golgi en dehors de toute néosynthèse, impliquant le golgi dans le processus d'endocytose et de recyclage. Le récepteur des ASGP est en majeure partie localisé à l'intérieur de la cellule.

STOCKERT et coll. (279) ont montré que la fixation et l'endocytose des ASGP passait par une réutilisation constante des récepteurs de la membrane plasmique plutôt que par leur remplacement à partir d'un pool intracellulaire. La réutilisation des récepteurs qui succède à la pénétration dans la cellule des complexes récepteur-ligand, est inhibée à basse température [WEIGEL (327)] et ne nécessite pas la délivrance du ligand aux lysosomes [BAENZIGER et FIETE (22)].

WEIGEL et OKA (333) ont montré que les complexes récepteur-ligand participant au pool des complexes se dissociant lentement retournaient à la surface cellulaire avant la dissociation. Ce phénomène reflète soit une étape obligatoire,

soit une étape réversible se produisant au hasard dans le processus d'endocytose-recyclage. Des études in vitro et in vivo montrent que les hépatocytes exposés à différents ligands à galactose terminal peuvent internaliser un nombre de molécules de ligand nettement supérieur au nombre de récepteurs des ASGP de la surface cellulaire [STEER et ASHWELL (274)]. Les récepteurs associés à la membrane sont réutilisés de manière cyclique ne nécessitant pas de synthèse protéique. Une molécule de récepteur permet la capture et la dégradation de nombreuses molécules d'ASGP sans être dégradée. WARREN et DOYLE (324), par comparaison de la demi-vie du récepteur et de la vitesse de métabolisme des ASGP, ont estimé que chaque molécule de récepteur pouvait délivrer environ 1000 molécules de ligand aux lysosomes.

3.3.5 - Endocytose et besoins en énergie

En 1985, CLARKE et WEIGEL (57) ont montré que la phase d'internalisation ne nécessitait pas d'apport d'énergie par l'ATP mais que la phase de "processing" et/ou d'externalisation dans le cycle du récepteur dépendaient de l'ATP et étaient très sensibles aux modifications du contenu intracellulaire en ATP. Ce besoin en ATP permettrait la régulation du phénomène d'endocytose, celle-ci étant inhibée dans les situations de déplétion en énergie, permettant à la cellule de survivre à une courte période de privation d'énergie. Des petites modifications du contenu cellulaire en ATP (20-25 %) seraient sans effet sur l'endocytose, mais des déplétions en ATP pouvant menacer la survie de la cellule (>50%) empêcheraient l'endocytose. La compartimentation intracellulaire des réserves en ATP est encore mal connue. Il est possible que le processus de recyclage des récepteurs fasse appel à certains pools d'ATP qui sont plus sensibles à la déplétion par les poisons métaboliques que d'autres réserves d'ATP intracellulaires.

Les différentes étapes de l'endocytose et de la dégradation des ASGP qui semblent nécessiter l'apport d'ATP

sont : le transport des molécules internalisées, le transport des vésicules qui nécessite la coopération entre protéines contractiles et cytosquelette, le "processing" des vésicules d'endocytose qui nécessite des gradients ioniques et de pH pour la dissociation, le recyclage des récepteurs qui requiert également des gradients ioniques et la dégradation intralysosomique du ligand pour le maintien du faible pH dans le lysosome. TOLLESHAUG et coll. (292) ont ainsi mis en évidence, par l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques, une diminution de la vitesse d'internalisation du ligand et du nombre de récepteurs à la surface cellulaire. La diminution de la vitesse d'internalisation pourrait être une conséquence du deuxième phénomène observé, CLARKE et WEIGEL (57) ayant démontré que l'internalisation n'était pas affectée par la déplétion en ATP.

3.3.6 - Dégradation du ligand

Dès 1970, GREGORIADIS et coll. (133) ont démontré l'accumulation de l'asialocéruléoplasmine marquée dans les lysosomes des hépatocytes et ont identifié le lysosome comme le site de catabolisme de cette glycoprotéine. L'étude de la cinétique d'incorporation d'asialofétuine par les hépatocytes montre que, entre 5 et 13 minutes après l'injection chez le Rat, l' ^{125}I - asialofétuine passe d'une migration avec les marqueurs de la membrane plasmique à une comigration avec les lysosomes [LABADIE et coll. (170)]. L'identification du lysosome comme site de catabolisme est supportée par l'inhibition de la dégradation du ligand par la leupeptine [DUNN et coll. (90)] et le NH_4Cl ou la chloroquine [TOLLESHAUG et coll. (291)], agents qui inhibent la protéolyse dans le compartiment lysosomique. Les études morphologiques sont en accord avec ce concept [WALL et coll. (322), HAIMES et coll. (137)]. L'étude de la dégradation de l'asialoorosomucoïde marqué au ^3H ou au ^{14}C sur la glucosamine ou à l' ^{125}I a été étudiée sur le foie de Rat perfusé [ARONSON et DOCHERTY (12), DENNIS et ARONSON (79)], et les auteurs ont démontré que les thiol-protéinases : cathépsine B, H et L

étaient apparemment impliquées dans la phase initiale de la digestion de l'ASOR de Rat dans les lysosomes du foie. VAN DER SLUIJS et coll. (311), en 1985, ont étudié l'excrétion biliaire de métabolites marqués par la fluorescéine après l'injection d'ASOR couplé au FITC et ont proposé l'utilisation de ce modèle pour l'étude in vivo de la vitesse de la dégradation des protéines dans le lysosome.

Cependant, l'endocytose des ASGP via leur récepteur, ne conduit pas obligatoirement à leur dégradation dans les lysosomes. Une petite quantité de certaines protéines qui sont éliminées de la circulation par ce système, échappe à la dégradation et la protéine est, dans ce cas, sécrétée intacte dans la bile [BURGER et coll. (47), WALL et coll. (321)].

Bien que le processus de l'endocytose via le récepteur des ASGP soit continu, CLARKE et WEIGEL (57) décomposent le cycle en 9 étapes : 1) fixation du ligand, 2) internalisation du complexe récepteur-ligand, mettant en jeu un "coated pit", 3) répartition des complexes en un compartiment où la dissociation est rapide et un compartiment où celle-ci est plus lente (le ligand présent dans ce dernier compartiment peut retourner à la surface de la cellule), 4) dissociation des complexes qui libère le ligand du récepteur, 5) ségrégation du ligand libéré et du récepteur dans des compartiments cellulaires différents, 6) translocation du ligand et délivrance aux lysosomes, 7) dégradation du ligand dans les lysosomes, 8) "processing" du récepteur et recyclage à la surface cellulaire, 9) réincorporation du récepteur dans les "coated pits".

3.4 - Biosynthèse du récepteur

Parallèlement aux études de la physiologie du récepteur et du mécanisme de l'endocytose, de nombreux travaux ont permis de connaître la biosynthèse du récepteur des ASGP chez le Rat et chez l'Homme dans les cellules de la lignée Hep G₂. Le récepteur des ASGP chez le Rat existe sous 3 formes présentant des parentés structurales [WARREN et DOYLE (324)] et SCHWARTZ et coll. (251) ont suggéré que certains peptides séparés par électrophorèse dériveraient du peptide de plus haut poids moléculaire par protéolyse. L'étude de la biosynthèse du récepteur dans les cellules Hep G₂ [SCHWARTZ et RUP (252)] montre que le récepteur a une masse moléculaire de 46 000 Da, et est initialement synthétisé sous la forme d'un précurseur de 40000 Da qui, par maturation des N-oligosaccharides conduit à la forme native de 46 000 Da avec une t 1/2 d'environ 45 minutes. L'étude de l'action de l'endo-N-acétyl- β -glucosaminidase montre que le précurseur possède 2 N-glycannes de type oligomannosidique qui sont transformés en glycannes de type N-acétyllactosaminique dans le golgi pour donner la forme mature du récepteur. Les récepteurs nouvellement synthétisés atteignent la surface cellulaire en 45 à 60 minutes. Dans les cellules HepG₂, le récepteur des ASGP a une durée de vie moyenne d'environ 30 heures, qui n'est pas modifiée lors de l'endocytose des ASGP.

L'étude de l'action de la swainsonine sur la biosynthèse du récepteur des ASGP dans les cellules HepG₂ montre que la transformation des N-glycannes du récepteur en structures hybrides n'altère ni sa biosynthèse, ni son ciblage vers la surface cellulaire, ni son turn-over, ni la fixation du ligand [BREITFELD et coll. (43)]. De même, l'action de la tunicamycine qui conduit à une forme non glycosylée de 34 000 Da n'altère pas la biosynthèse, ni la physiologie du récepteur. Les glycannes ne semblent donc pas jouer un rôle majeur dans le fonctionnement du récepteur des ASGP dans les cellules HepG₂.

L'étude de la séquence peptidique du récepteur de foie de Rat [DRICKAMER et coll. (88)], montre l'existence de plusieurs espèces peptidiques dérivant au moins de deux gènes différents.

Le peptide (1) de 41 500 Da, composé de 283 résidus d'acides aminés présente un arrangement voisin du récepteur des asialo-agalactoglycoprotéines du foie de Poulet [DRICKAMER (87)], constitué à la partie N-terminale de résidus d'acides aminés hydrophiles, d'une séquence de 30 résidus non chargés et de 3 sites d'attachement pour des oligosaccharides situés dans la partie C-terminale de la molécule. Les peptides (2) et (3) (respectivement 49 000 Da et 54 000 Da) diffèreraient par des modifications post-traductionnelles. L'étude de 2 cDNA codant pour la forme majeure du récepteur des ASGP de Rat [HOLLAND et coll. (152)], montre l'absence d'une séquence signal N-terminale permettant l'insertion membranaire et que la seule protéolyse intervenant dans la maturation de la lectine 1 de foie de Rat (RHL 1) concerne l'enlèvement d'un résidu de méthionine N-terminal initiateur.

L'insertion membranaire de la RHL 1 semble se produire par la reconnaissance de la région interne transmembranaire comme séquence signal. SPIESS et coll. (273), en 1985, ont isolé et séquencé le cDNA codant le récepteur humain des ASGP et ont montré que la molécule de récepteur, constituée de 291 résidus d'acides aminés, présentait une grande homologie avec la séquence de la protéine majeure du récepteur de Rat (Fig. 16). Les molécules du récepteur humain et de Rat R1 sont constituées de 2 domaines hydrophiles (résidus 1 - 40 et 60 - 291 chez l'homme) séparés par un segment très hydrophobe (résidus 41 - 59) permettant selon toute vraisemblance l'insertion membranaire. La partie N-terminale est située à l'intérieur de la cellule, le C-terminal à l'extérieur et la molécule porte 2 N-oligosaccharides. De plus, le récepteur humain est phosphorylé au niveau d'un résidu de sérine. La phosphorylation du récepteur de Rat a également été démontrée [TAKAHASHI et coll. (286)], celle-ci affecte des résidus de sérine et de thréonine et a lieu à la surface cellulaire.

La séquence d'un second récepteur des ASGP du foie humain, H₂, a été établie par SPIESS et LODISH (272), présentant 58 % d'homologie avec le récepteur H₁ et présentant plus d'homologie avec le récepteur R₂ de Rat qu'avec H₁ (Fig. 17). De



Figure 16

Comparaison des séquences d'acides-amino des récepteurs des ASGP humains et de Rat. La séquence du récepteur humain des ASGP (H) est comparée à la séquence majeure du récepteur de Rat (R - 1) et à la portion C -terminale de deux séquences mineures connues (R - 2/3) du récepteur de Rat déterminées par DRICKAMER et coll. (88). Les sites de N - glycosylation sont indiqués par des astérisques. Les résidus identiques entre la séquence du récepteur humain et une ou les deux séquences du récepteur de Rat sont encadrés. [d'après SPIESS et coll. (273)].

R1	...	Leu	Glu	Asn	Ala	His	Leu	Val	Val	Val	Val	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Asn	Thr	Trp	Ile
H1	...	Leu	Glu	Asp	Ala	His	Leu	Val	Val	Val	Val	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Lys	Phe	Phe	Gly	Pro	Val	Asn	Thr	Trp	Met
H2	...	Leu	Glu	Asn	Ala	His	Leu	Val	Val	Val	Val	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Lys	Phe	Phe	Asn	Pro	Val	Asn	Thr	Trp	Ile
R2	...	Leu	Glu	Asn	Ala	His	Leu	Val	Val	Val	Val	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Lys	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	His	Thr	Trp	Ile
R1	Cly	Leu	Thr	Asp	Gln	Asn	Cly	Pro	Trp	Lys	Lys	Cly	Thr	Val	Val	Val	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Trp	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp
H1	Cly	Leu	His	Asp	Gln	Asn	Cly	Pro	Trp	Lys	Lys	Cly	Thr	Val	Val	Val	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Trp	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp
H2	Cly	Leu	Thr	Asp	Asp	Asn	Cly	Pro	Trp	Lys	Lys	Cly	Thr	Val	Val	Val	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Trp	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp
R2	Cly	Leu	Thr	Asp	Lys	Asp	Cly	Pro	Trp	Lys	Lys	Cly	Thr	Val	Val	Val	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Trp	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp
R1	Asp	Trp	Tyr	Gly	His	Cly	Leu	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Thr	Thr	Thr	Asp	Asp	Val	Cys	Arg	Pro	Pro
H1	Asp	Trp	Tyr	Gly	His	Cly	Leu	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Thr	Thr	Thr	Asp	Asp	Val	Cys	Arg	Pro	Pro
H2	Asn	Trp	His	Cly	His	Cly	Leu	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Thr	Thr	Thr	Asp	Asp	Val	Cys	Arg	Pro	Pro
R2	Asn	Cys	Gln	Cly	His	Cly	Leu	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Cly	Thr	Thr	Thr	Asp	Asp	Val	Cys	Arg	Pro	Pro
R1	Tyr	Arg	Trp	Val	Cys	Glu	Thr	Glu	Leu	Cly	Lys	Ala	Asn	Ala	Asn	Asn	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Cys	Arg	Arg	Pro
H1	Tyr	Arg	Trp	Val	Cys	Glu	Thr	Glu	Leu	Cly	Lys	Ala	Asn	Ala	Asn	Asn	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Cys	Arg	Arg	Pro
H2	Tyr	Arg	Trp	Val	Cys	Glu	Thr	Glu	Leu	Cly	Lys	Ala	Asn	Ala	Asn	Asn	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Cys	Arg	Arg	Pro
R2	Asn	Arg	Trp	Ala	Cys	Cys	Thr	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Lys	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Cys	Arg	Arg	Pro

Figure 17 Comparaison des séquences d'amino-acides des récepteurs des ASGP humains et de Rat à proximité de l'extrémité C - terminale incluant la séquence d'un second récepteur humain H2. [d'après SPIESS et LODISH (272)].

même, H₁ présente plus d'homologie avec R₁ qu'avec H₂. Tous les récepteurs des ASGP dérivent d'un gène ancestral commun, mais l'expression et la conservation de plusieurs récepteurs des ASGP chez l'Homme et chez le Rat soulève le problème de la fonction de ces différents récepteurs. LEUNG et coll. (174) ont démontré que le mRNA qui code pour la synthèse du récepteur de Rat est codé par 9 exons séparés par 8 introns. Le premier exon est limité à l'extrémité 5' non transcrite du mRNA, le deuxième code la majeure partie du segment cytoplasmique N-terminal, le troisième code la portion trans-membranaire hydrophobe, les autres exons codant les portions extracellulaires du récepteur (Fig. 18).

Le récepteur des ASGP de foie de Rat synthétisé in vitro dans des lysats de réticulocytes, est capable de lier des ligands oligosaccharidiques uniquement en présence de microsomes de pancréas de Chien lors de la traduction [HSUEH et coll. (154)]. Ces résultats suggèrent que des facteurs présents dans la lumière des microsomes sont indispensables à l'établissement de la conformation du domaine de liaison de la molécule.

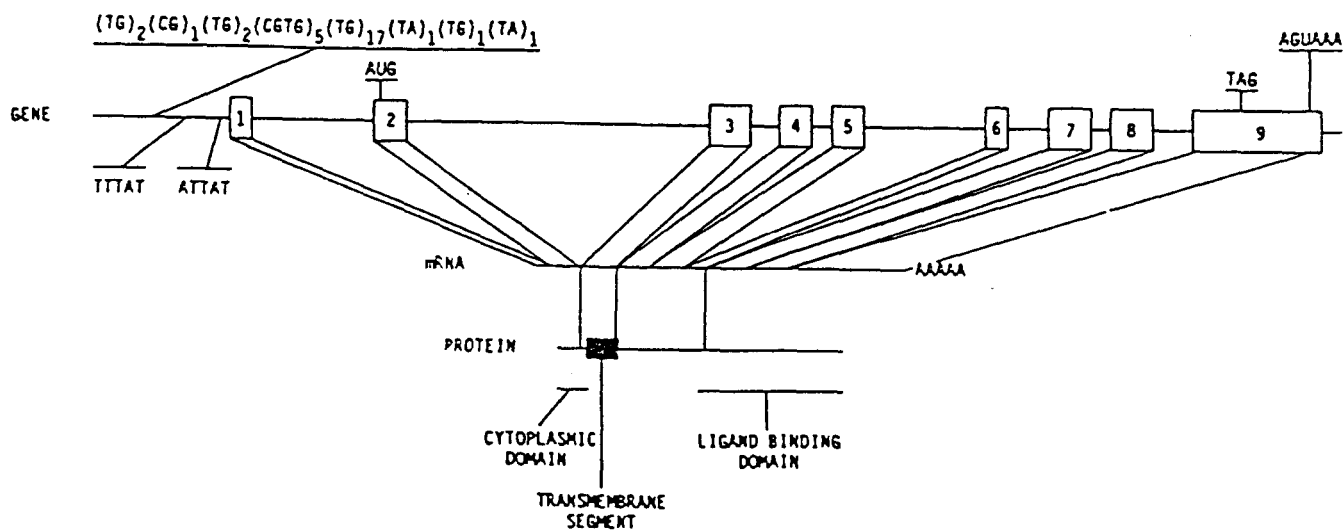


Figure 18 Représentation schématique des régions fonctionnelles du gène, du mRNA et du polypeptide de la lectine hépatique de Rat (RHL - 1).
 [d'après LEUNG et coll. (174)].

TRAVAUX PERSONNELS

Le travail qui a été effectué s'inscrit dans le cadre d'un important effort de recherche qu'avait entrepris le laboratoire en collaboration avec la société RHONE-POULENC dans le but de cibler la daunorubicine vers les cellules cancéreuses et/ou de réduire sa cardiotoxicité. En effet, en 1977, l'idée était née au laboratoire de modifier la pharmacocinétique des médicaments en les conjuguant à des glucides, et, dans le cas particulier de la daunorubicine en posant en hypothèse que cette modification de la répartition tissulaire de la DNR réduirait son action néfaste sur la fibre cardiaque. La connaissance des systèmes lectiniques, alors moins étendue qu'à l'heure actuelle a permis à MONTREUIL de proposer comme axe de recherche, non pas le greffage "au hasard" de sucres simples, mais la conjugaison de la DNR avec des glycoprotéines ou des glycopeptides présentant des structures oligosaccharidiques complexes susceptibles d'être reconnues spécifiquement par un récepteur de type lectinique.

Le médicament choisi a donc été la DNR (choix de la Société RHONE-POULENC) et le modèle cellulaire d'étude retenu comme cible à atteindre fut l'hépatocyte de Mammifère dont le récepteur spécifique des asialo-glycoprotéines était largement décrit dans la littérature. Ce travail a fait l'objet d'un contrat de 3 ans entre le Laboratoire et la Société RHONE-POULENC et a été poursuivi ,pendant un an, grâce au soutien de la société CASSENNE, en conservant la DNR comme modèle médicamenteux, sa détection, tant d'un point de vue analytique que pour l'étude de sa localisation intracellulaire, étant facilitée par ses propriétés de fluorescence mises à profit par le biais de la microsonde MOLE et du microfluorimètre LASER. Nous remercions les sociétés RHONE-POULENC et CASSENNE qui ont permis la réalisation de ce travail. Les travaux concernant le couplage de la DNR à des glycoprotéines et à des glycopeptides, et les résultats concernant l'interaction de ces conjugués avec les cellules sont rassemblés dans la thèse de Doctorat de F. DELPLACE-DELHAYE (77).

Notre travail a permis, dans un premier temps, de démontrer que des glycanes désialylés présentant le galactose en position terminale non réductrice sont endocytés par les hépatocytes de Rat d'une façon comparable aux asialoglycopeptides et à l'asialo-orosomucoïde. Les glycanes sont donc susceptibles d'être utilisés comme vecteurs de drogues dans un système conjugué Drogue-Glycane --> lectine, ce qui permettrait de réduire les risques d'immunisation encourus lors de l'administration de glycoprotéines ou de glycopeptides. D'autre part, la purification de glycanes de structure oligosaccharidique connue est plus aisée que la purification de glycoprotéines ou de glycopeptides, ce qui constitue un atout majeur dans un domaine où la spécificité repose parfois sur de faibles variations structurales. A la suite de cette observation, nos travaux ont eu pour but de préparer un conjugué glycane-DNR utilisant le lactose comme modèle d'oligosaccharide pour les expériences de couplage, sucre dont nous disposons en quantité illimitée pour les essais et qui, de plus, présente le galactose en position terminale non réductrice. L'obtention de ce conjugué de la DNR au lactose nous a ensuite permis d'envisager l'étude de sa toxicité sur les cellules Hep G₂, introduisant ainsi au Laboratoire les techniques d'exploration de la toxicité cellulaire de médicaments anticancéreux, techniques qui permettront l'étude de la toxicité des conjugués de la DNR à des oligosaccharides ou à des glycopeptides présentant les structures glycaniques complexes spécifiques du récepteur à atteindre.

MATERIEL ET METHODES

1. - ETUDE DE LA FIXATION ET DE L'ENDOCYTOSE DES GLYCANNES DESIALYLES DE L'OROSOMUCOÏDE PAR LES HEPATOCYTES DE RAT

L'orosomucoïde (α 1 glycoprotéine acide) est une glycoprotéine circulante de 45 000 Da, qui présente 5 motifs glycaniques essentiellement de nature tri- et tétraantennée [FOURNET et coll. (112)] (Fig. 19). La relative abondance de ce substrat dans le plasma humain (0,8 - 1,4 g/l), ainsi que la structure de ses glycanes en font un matériel de choix pour l'étude du récepteur des asialoglycoprotéines des Mammifères, sa désialylation exposant les résidus de galactose dans les positions les plus favorables pour la capture par ce récepteur. De même, le modèle de l'hépatocyte de Rat a été, dans un premier temps, retenu pour cette étude, la technique d'obtention des hépatocytes par perfusion du foie de Rat par la collagénase étant largement utilisée.

1.1. - Préparation des substrats

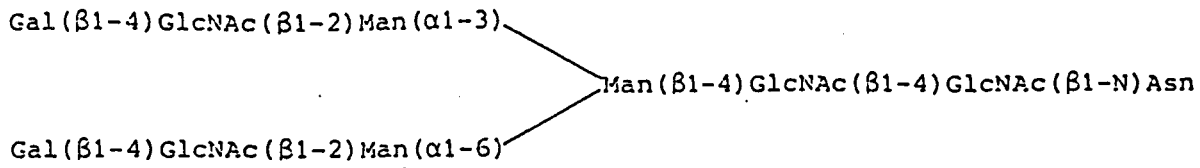
1.1.1. - Préparation de l'orosomucoïde

La nécessité de disposer de quantités importantes d'orosomucoïde pour nos expérimentations nous a amené à préparer ce substrat par une technique classique de fractionnement des protéines plasmatiques par le sulfate d'ammonium et à mettre au point un protocole d'obtention de l'orosomucoïde en deux étapes de chromatographie d'échange d'ions.

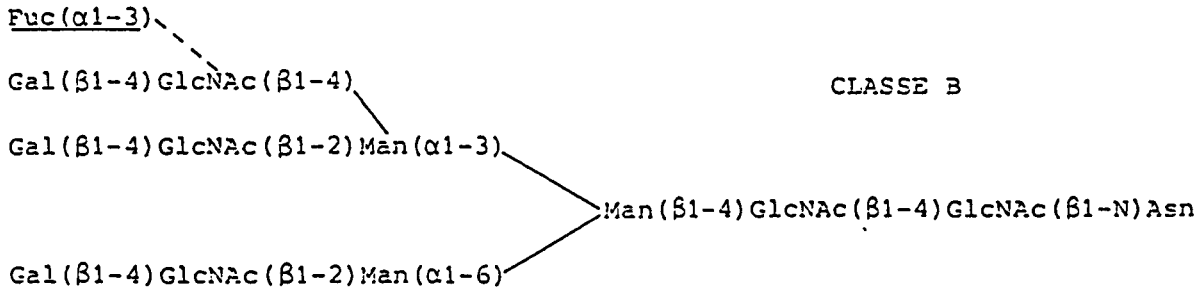
1.1.1.1. - Méthode par précipitation au sulfate d'ammonium

L'orosomucoïde est préparé à partir du plasma humain (don du Centre Régional de Transfusion Sanguine de LILLE) selon la méthode de WEIMER et coll. (334) modifiée par FOURNET (111).

CLASSE A



CLASSE BF



CLASSE CF

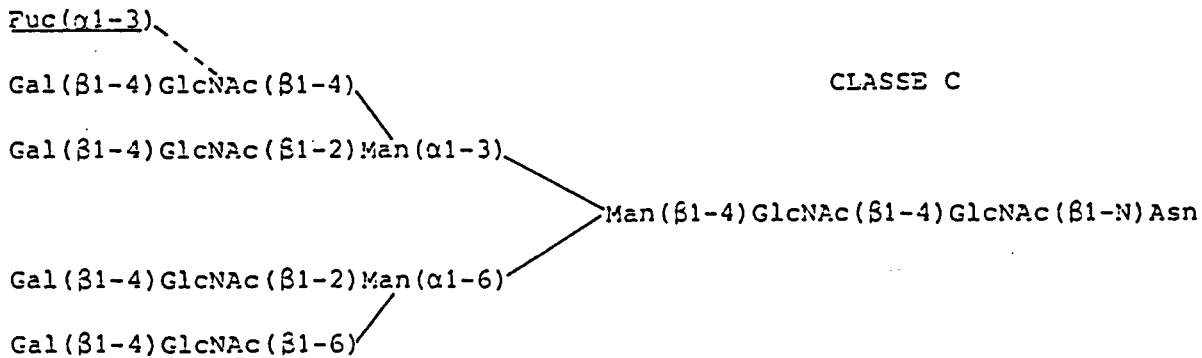


Figure 19 Structure primaire de cinq asialo-glycopeptides isolés à partir de l'orosomucoïde.
 Les glycannes des classes BF et CF correspondent respectivement aux glycannes des classes B et C fucosylés [d'après FOURNET et coll (112)].

Le schéma de fractionnement des protéines plasmatiques qui met à profit les modifications de solubilité des protéines en fonction du pH et de la concentration saline du milieu, est décrit dans la Fig. 20. Après 5 étapes de précipitation, il permet d'obtenir à une concentration saturante en sulfate d'ammonium et à pH 3,7 , une fraction enrichie en orosomucoïde, celui-ci précipitant en dernier dans le fractionnement, compte tenu de son pH_I très acide et de sa grande solubilité que lui confère sa composition en sucres. Le précipité P_5 recueilli par centrifugation (centrifugeuse BECKMAN - J 21, Rotor JA 10, 8 000 rpm, 1 H) est ensuite dialysé et lyophilisé.

Dans le but d'obtenir une préparation pure d'orosomucoïde, afin d'éviter toute interférence dans les expériences de capture par les cellules de substrats marqués, nous avons introduit une étape de chromatographie sur CM-Trisacryl (IBF) en tampon acétate/acide acétique 0.01M, pH 3,7 , la fraction P_5 recueillie par précipitation étant au préalable dialysée contre ce même tampon. Le précipité obtenu lors de la dialyse est éliminé par centrifugation (rotor JA 20, 30 mn, 18 000 rpm). Le fractionnement sur CM-Trisacryl permet de recueillir l'orosomucoïde non retenu sur le gel et d'éliminer des contaminants de la fraction P_5 élués par un tampon phosphate 0.1M, pH 7,4. La fraction non retenue sur la colonne est lyophilisée après dialyse. Le rendement de la préparation est de environ 1g d'orosomucoïde par litre de plasma.

La pureté de la préparation d'orosomucoïde ainsi obtenue est contrôlée par des techniques d'électrophorèse sur acétate de cellulose en tampon véronal pH 8,9 , d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et révélation par le bleu de Coomassie et le réactif de Schiff, d'immunoélectrophorèse (la visualisation des arcs d'orosomucoïde étant relativement malaisée avec un antisérum humain total). L'intégrité de la composition molaire en sucres est vérifiée par GLC après méthanolyse et trifluoroacétylation [ZANETTA et coll. (349)]. La comparaison des résultats obtenus par ces différentes techniques

- V volume de plasma humain + V volume d'une solution de sulfate d'ammonium saturée.

- Amener à PH 3,5.

- Laisser reposer une nuit à 4°C, puis centrifuger.

Solution S1

Précipité P1

- Amener à PH 6,2 puis à 2/3 saturation en sulfate d'ammonium

- Laisser reposer une nuit à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1

Solution S2

Précipité P2

- Amener à PH 4,9

- Laisser reposer une nuit à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1

Solution S3

Précipité P3

- Amener à PH 3,7

- Laisser reposer une nuit à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1

Solution S4

Précipité P4

- Saturer la solution par le sulfate d'ammonium

- Laisser reposer 48 h à 4°C, filtrer sur papier Whatman n° 1

Solution S5

Précipité P5

Éliminée

Fraction enrichie en orosomucoïde

Figure 20 Schéma de fractionnement du plasma humain par précipitation au sulfate d'ammonium, utilisé pour la préparation de l'orosomucoïde (alpha 1 glycoprotéine acide). [d'après WEIMER et coll. (334)].

avec les résultats obtenus avec de l'orosomucoïde utilisé comme témoin montrent que l'orosomucoïde ainsi préparé présente un haut degré de pureté compatible avec les expériences ultérieures.

1.1.1.2. - Méthode par chromatographie d'échange d'ions

Parallèlement à la méthode de préparation de l'orosomucoïde par précipitation qui est relativement lourde et longue, nous avons mis au point un procédé de préparation de l'orosomucoïde par une technique d'échange d'ions s'inspirant de KALOUS (159) qui avait décrit un procédé d'obtention de l'orosomucoïde par adsorption en batch sur gel de DEAE cellulose suivie de la purification de la fraction éluée sur CM-cellulose. Le plasma humain (200 ml) est dialysé contre un tampon acétate/acide acétique 0.01M, pH 3,7 , le précipité obtenu est éliminé par centrifugation et le surnageant est chromatographié sur une colonne de DEAE cellulose (C 53 WHATMAN, 1,7 x 40 cm) équilibrée dans le même tampon. Le profil d'éluion est enregistré par mesure de l'absorbance à 280 nm. Après récupération de la fraction non retenue, l'éluion des fractions retenues est obtenue par un gradient de NaCl 0-1M dans le même tampon. L'analyse d'une fraction éluée à une molarité voisine de 0,15M en NaCl montre que celle-ci se compose essentiellement d'orosomucoïde (analyse en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, dosage en immuno-diffusion radiale). La purification de cette fraction déjà enrichie en orosomucoïde est poursuivie par chromatographie sur CM-Trisacryl comme décrit dans le paragraphe ci-dessus.

1.1.2. - Préparation de l'asialo-orosomucoïde

L'orosomucoïde natif est désialylé par une technique de chromatographie d'affinité sur neuraminidase insolubilisée sur un support d'agarose, en tampon citrate 0.1M, pH 5 (25 mg de protéine pour 1 ml de tampon). La désialylation s'effectue à 37°C

pendant 48 heures, l'orosomucoïde étant recyclé sur la colonne. Après dialyse, la préparation est lyophilisée et l'efficacité de la désialylation est vérifiée en GLC après méthanolyse et trifluoroacétylation. Ce procédé de désialylation affecte moins la structure glycanique que l'hydrolyse acide (fucose). Cette dernière technique a été utilisée pour le traitement de plus grandes quantités de substrat, Cf § 1.1.4.

1.1.3.- Préparation des asialo-glycopeptides de l'orosomucoïde

La préparation des glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé a été effectuée par digestion pronasique selon la méthode décrite par YAMASHINA et MAKINO (346). L'asialoorosomucoïde (100 mg environ) est incubé sous agitation constante pendant 48 heures à 40°C en présence de pronase (5 mg, Pronase E, MERCK) dans une solution d'acétate de calcium 0.01M dont le pH est maintenu à 8 par addition en continu de NaOH 0.1N. L'adjonction de toluène au mélange réactionnel permet de limiter l'évaporation et d'éviter la contamination bactérienne. A l'issue du premier cycle d'hydrolyse, le pH du milieu est abaissé à 4,5 (CH₃COOH glacial), le volume est ramené à 20 ml avant l'addition d'éthanol absolu (10 volumes) afin de précipiter les glycopeptides. Le mélange est maintenu 2 heures à température ambiante et une nuit à +4°C. Le précipité recueilli par centrifugation (centrifugeuse BECKMAN, J 21, Rotor JA 10, 45 mn, 10 000 rpm) est remis en solution par de l'acétate de calcium en vue de subir le deuxième cycle d'hydrolyse dans les mêmes conditions. L'orosomucoïde subit ainsi 3 cycles de digestion pronasique.

Les glycopeptides obtenus sont purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire et lyophilisés. L'intégrité de la copule glycanique des glycopeptides est vérifiée par GLC après méthanolyse et trifluoroacétylation. L'analyse de la composition en acides aminés a également été réalisée par GLC après hydrolyse acide et traitement à l'anhydride heptafluorobutyrique.

1.1.4. - Préparation des asialo-glycannes de l'orosomucoïde

Les glycannes ont été préparés à partir de l'orosomucoïde par la technique d'hydrazinolyse d'après la méthode décrite par BAYARD et MONTREUIL (34). En effet, le traitement des N-glycosyl protéines par l'hydrazine à la température de 105°C conduit à l'hydrolyse des liaisons amide, libérant le glycanne sous forme désacétylée, la copule protéique étant dégradée. L'orosomucoïde (100 mg) est dissous dans l'hydrazine (PIERCE) et le mélange est porté à 105°C pendant 20 heures. Après refroidissement, l'hydrazine est évaporée sous courant d'azote et entraînée par adjonction de toluène. L'hydrazine résiduelle est transformée en sulfate d'hydrazine par incubation une nuit dans un dessiccateur sous H_2SO_4 . Le mélange est ensuite purifié par chromatographie de tamisage moléculaire dans l'acide acétique à 1 %.

La fraction glycanne concentrée sous vide est reprise par une solution saturée de $NaHCO_3$ en vue de la N-réacétylation. Celle-ci s'effectue en milieu de $NaHCO_3$ saturé ($NaHCO_3$ en excès dans le milieu réactionnel) par adjonction séquentielle d'anhydride acétique. Après la réacétylation, le pH du milieu est amené à 12 par addition de soude 1N en vue de la réduction de la glucosamine libérée de l'asparagine par l'hydrazinolyse. La réduction s'effectue par addition de $NaBH_4$ (100 mg) et contact une nuit à température ambiante. La réaction est arrêtée par abaissement du pH à 5 avec CH_3COOH 1 % dans la glace fondante puis addition de résine DOWEX 50 x 8 (BIO-RAD). Le mélange est ensuite chromatographié sur une colonne de résine DOWEX 50 x 8, les borates ainsi formés sont éliminés par entraînement sous vide en présence de méthanol et par chromatographie de tamisage moléculaire. Les glycannes purifiés sont ensuite soumis à une désialylation par hydrolyse acide : les glycannes sont incubés à 80°C pendant 40 mn dans une solution d'acide trifluoroacétique 0,05N. Après hydrolyse, le mélange est

purifié par entraînement de l'ATFA sous vide en présence d'éthanol puis chromatographie de tamisage moléculaire. L'élimination de l'acide sialique est vérifiée par analyse des sucres en GLC après méthanolyse et trifluoroacétylation.



Pour l'étude de l'endocytose des glycanes par les hépatocytes de rat, les glycanes ont été obtenus par hydrazinolyse des asialoglycopeptides utilisés comme témoin d'incorporation, ceci afin d'éliminer toute interférence due à la composition en sucres des substrats testés. L'hydrazinolyse est effectuée dans les mêmes conditions que ci-dessus sur un matériel désialylé (asialoglycopeptides) qui ne subit donc pas la désialylation par hydrolyse acide.

1.1.5. - Marquage radioactif des glycopeptides et des glycanes

L'étude de la fixation et de l'endocytose de ligands radiomarqués nécessite l'utilisation de substrats présentant une forte activité spécifique. Dans le cas de l'asialo-orosomucoïde ou des glycopeptides, ceci est obtenu par marquage à l'iode¹²⁵ soit des résidus de tyrosine de la copule protéique, soit d'un réactif conjugué au groupement NH₂ terminal des glycopeptides. Dans le cas des glycanes, l'iodination étant impossible et le marquage par réacétylation à l'anhydride acétique tritié n'ayant pas permis d'obtenir des substrats présentant une activité spécifique suffisante, nous avons opté pour le marquage par réduction au NaBT₄ après traitement des glycanes par la galactose oxydase.

1.1.5.1. - Marquage radioactif des substrats par le tritium (méthode à la galactose oxydase)

Une prise d'essais correspondant à 200 µg de glycanne ou de glycopeptide (environ 70 µmoles) est incubée 2 heures à

37°C en présence de galactose oxydase (10 UI) en tampon phosphate 0,1 M pH7. Après incubation, le mélange est transvasé dans l'ampoule de KBT₄ (CEA, 5 mCi, 50 Ci/mmole), le réactif ayant été préalablement remis en solution par 100 µl de NaOH 0,05 N. Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante avant l'addition de KBH₄ en excès afin de réduire les résidus de galactose oxydés n'ayant pas réagi avec le réactif marqué. La réduction est poursuivie pendant 2 heures avant arrêt par neutralisation par l'acide acétique 1 % et purification sur DOWEX 50 x 8.

1.1.5.2. - Purification des substrats marqués

Les substrats sont purifiés par chromatographie sur papier (système-solvant : pyridine / acétate d'éthyle / acide acétique / eau : 5 : 5 : 1 : 3) dans le but d'éliminer les contaminants radioactifs libres pouvant interférer dans les expériences de capture par les cellules. Après élution, les substrats subissent une étape de chromatographie de tamisage moléculaire afin d'éliminer toute trace de solvant résiduel.

L'activité spécifique des produits marqués est calculée sur la base des rapports molaires obtenus par GLC, par dosage des oses neutres selon la technique à l'orcinol sulfurique décrite par MONTREUIL et SPIK (197). Les comptages de radioactivité sont effectués dans un compteur à scintillation liquide BECKMAN LS - 1800. L'activité spécifique des substrats est de 1×10^4 dpm/pmole pour les glycopeptides et $1,4 \times 10^4$ dpm/pmole de glycanne. L'efficacité du marquage est vérifiée par identification du galactose marqué après hydrolyse du glycanne par l'acide trifluoroacétique 4N pendant 4 heures à 100°C et séparation des monosaccharides par chromatographie sur papier (système-solvant : pyridine / acétate d'éthyle / acide acétique / eau : 5 : 5 : 1 : 3, en présence des témoins monosaccharidiques correspondants. L'analyse du chromatogramme montre l'intégrité du glycanne marqué (témoin non hydrolysé), l'absence de contaminants

radioactifs libres et montre que la totalité de la radioactivité est associée au galactose. Les glycanes marqués ont également été analysés en chromatographie sur couche mince (système-solvant : éthanol / eau / pyridine / n-butanol / acide acétique : 100 : 30 : 10 : 10 : 3) et révélation par autoradiographie afin de vérifier l'efficacité de l'hydrazinolyse dans la libération du glycanne. Les glycanes marqués correspondent à une population de structures lourdes tri- et tétraantennées (fucosylés et non fucosylés). La contamination par des glycanes biantennés est mineure.

1.2. - Isolement des hépatocytes de Rat

L'isolement des hépatocytes est effectué selon la méthode décrite par SEGLEN (256). Après complexation du calcium par l'EGTA (éthylèneglycol-bis (aminoéthyléther) N, N'-tétraacetic acid), la matrice extracellulaire est digérée par action de la collagénase. Les cellules du foie ainsi libérées sont ensuite soumises à une centrifugation différentielle en vue d'enrichir la préparation en cellules parenchymateuses plus denses que les cellules non parenchymateuses.

1.2.1. - Isolement des cellules du foie de Rat

Solutions utilisées :

- NEMBUTAL à 5 % (ABBOTT)
- Solution A : solution saline de Hank's dépourvue de calcium
- Solution B : solution A + EGTA (SIGMA) 0,5 mM
- Solution C : solution A + CaCl₂ 5 mM + collagénase 0,03 % (p/v) (SIGMA, Clostridium histolyticum, Type IV, suitable for the release of rat parenchymal liver cells) (solution préparée extemporanément).

Les solutions A, B et C sont maintenues à 37°C pendant toute la durée de la perfusion, les solutions perfusées sont en plus soumises à un barbotement de carbogène (95 % O₂, 5 % CO₂).

Méthode : un rat WISTAR femelle est anesthésié par injection intrapéritonéale de NEMBUTAL (0,1 ml de solution à 5 % /100 g de poids). Après ouverture de la cavité abdominale, la veine porte est cathétérisée et quelques ml de solution A sont introduits dans le foie. La veine cave inférieure est alors dégagée par ouverture de la cage thoracique puis cathétérisée. Le foie se trouve ainsi isolé de la circulation, la perfusion se faisant par l'intermédiaire d'une pompe peristaltique. Le foie est ensuite perfusé par :

1 - 50 à 70 ml de solution A dans le but d'éliminer les hématies,

2 - 20 ml de solution B afin de complexer le calcium qui joue un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire,

3 - 20 ml de solution A pour éliminer l'EGTA qui gênerait l'action de la collagénase,

4 - 40 ml de solution C renfermant la collagénase en présence d'ions calcium indispensables à son action.

Le foie est ensuite dégagé de la cavité abdominale et dilacéré dans quelques ml de solution C.

1.2.2. - Enrichissement de la préparation en hépatocytes

La suspension cellulaire préalablement filtrée sur gaze est soumise à trois centrifugations à très basse vitesse (50 g) suivies de resuspension dans la solution A renfermant 1 % (p/v) de sérum albumine bovine (SIGMA, Fraction V, Abrév. : BSA).

1.2.3. - Numération et viabilité

La numération des cellules est effectuée au microscope

microscope optique à l'aide de la cellule de Neubauer. La viabilité est évaluée par le test d'exclusion du bleu Trypan. La dissociation du foie dans ces conditions permet d'obtenir environ 100×10^6 cellules avec une viabilité de 80 - 90 %. La contamination par les cellules non parenchymateuses est très faible. La viabilité des hépatocytes testée après 5 heures à +4°C et 37°C demeure voisine de 75 %.

1.3 - Etude de l'interaction des glycopeptides et des glycanes désialylés et marqués avec les hépatocytes de Rat

Dans le but d'étudier l'interaction des glycanes désialylés et marqués avec les hépatocytes de Rat, nous avons, dans un premier temps, étendu aux asialo-glycopeptides préparés à partir d'orosomucoïde et marqués au tritium sur les résidus de galactose, les résultats de BAENZIGER et FIETE (21) qui ont démontré qu'un asialo-glycopeptide de fêtuine (structure triantennée [BAENZIGER (20)] marqué à l'iode¹²⁵ est endocyté de la même manière que l'asialoorosomucoïde. Nous avons exploré en parallèle, l'interaction avec les hépatocytes des glycanes préparés à partir de ces glycopeptides et marqués de la même façon.

1.3.1 - Etude cinétique de l'interaction ligand-hépatocyte

1.3.1.1 - Conditions d'incubation

Les cellules (4×10^6 cellules par ml) sont incubées à + 4°C ou à 37°C dans le milieu de Hank's supplémenté d'HEPES 20 mM(N-2 hydroxyethyl piperazine-N-2 ethane sulfonic acid, HOPKIN et WILLIAMS) + CaCl_2 2,7 mM + BSA 1%, ajusté à pH 7,5 par NaOH. Les cellules sont maintenues en suspension par agitation douce. Après addition du substrat marqué, des aliquotes de 0,25 ml (1 x

10^6 cellules) sont prélevées à des temps déterminés; le premier prélèvement est effectué dès l'addition du substrat et constitue le point zéro de la cinétique. La réaction est arrêtée par transfert de l'aliquote dans un volume égal de milieu d'incubation maintenu à 0°C.

1.3.1.2 - Mesure de la radioactivité associée aux cellules

Les cellules sont récupérées par filtration sur fibre de verre (WHATMAN, GF 05). Les filtres sont abondamment rinçés par du milieu et la radioactivité est mesurée après séchage des filtres, en scintillation liquide (compteur BECKMAN, gamme de quenching : filtre + chloroforme).

1.3.1.3 - Etude de la spécificité de l'interaction ligand récepteur

L'étude de la spécificité de l'interaction récepteur-ligand a été effectuée par addition dans le milieu d'incubation d'un large excès de ligand non marqué (100 excès molaire) ou d'asialoorosomucoïde froid et mesure de l'incorporation du ligand radioactif. De même, BAENZIGER et FIETE (21), ont proposé que la fixation non spécifique à 4°C peut être mesurée par la quantité de ligand qui reste associée aux cellules après traitement par l'EGTA 5 mM à 4°C, le calcium étant indispensable à la fixation du ligand sur le récepteur. Après avoir vérifié la concordance de cette mesure avec les essais d'inhibition par le substrat froid en excès, nous avons opté pour cette technique dans les expériences ultérieures.

1.3.1.4 - Etude de l'endocytose du ligand

L'incubation à +4°C en présence d'EGTA de cellules ayant été en contact avec les substrats permet de déplacer la fraction de substrat associée aux membranes [WEIGEL et OKA (329)], par opposition à la fraction de substrat internalisée qui résiste au déplacement par l'EGTA. A +4°C, l'internalisation du

ligand est inhibée (Cf généralités § 3), aussi, la fraction qui résiste au déplacement par l'EGTA est elle assimilée à la fixation non spécifique du ligand (Cf § ci-dessus). Celle-ci est déduite de la radioactivité totale mesurée sans traitement par l'EGTA, ce qui permet de connaître la quantité de ligand associée à la membrane (à +4°C = fixation spécifique calcium dépendante). Par contre, à 37°C, le ligand qui est internalisé devient résistant au déplacement par l'EGTA ce qui permet de mesurer la quantité de ligand internalisé (EGTA résistant) et par différence avec la radioactivité totale, de connaître la quantité de ligand associée à la membrane cellulaire (EGTA libéré).

1.3.2 - Etude des constantes de l'interaction récepteur-ligand

L'étude des constantes de l'interaction du ligand avec les hépatocytes est effectuée à +4°C afin d'inhiber l'endocytose. Les hépatocytes (1×10^6 cellules par point) sont incubés 3h en présence d'une gamme de concentration du ligand de 2 nM à 500 nM. Après incubation, la réaction est arrêtée par dilution et filtration comme décrit précédemment, une aliquote subissant un traitement en présence d'EGTA 5 mM avant filtration afin de déterminer la fixation non spécifique qui est déduite de la radioactivité totale.

2 - PREPARATION DE CONJUGUES DAUNORUBICINE-OLIGOSACCHARIDE

Afin d'étudier la possibilité d'utiliser les glycanes désialylés de l'orosomucoïde pour le ciblage de la daunorubicine vers l'hépatocyte de Mammifère, nous avons mis au point une technique de greffage des oligosaccharides sur la daunorubicine, s'inspirant de la méthode de GRAY (125), qui avait décrit le couplage direct du cellobiose sur les résidus NH_2 libres de la serumalbumine bovine par amination réductrice en présence de cyanoborohydrure. En effet, à la différence du borohydrure, le

cyanoborohydrure ne réduit pas les radicaux carbonyles libres des sucres à un pH supérieur à 5 [BORCH et coll. (41a)], mais réduit sélectivement l'imine formée par la condensation d'une amine avec un aldéhyde [GRAY (124)]. La Fig. 21 montre l'application du principe de la technique de GRAY au couplage du lactose sur la DNR.

La réduction de l'imine en amine tend à déplacer l'équilibre entre la forme héli-aldéhydrique (cyclique) du sucre réducteur et sa forme ouverte, favorisant la réaction de condensation. Cette méthode a été employée pour la préparation de néoglycoprotéines par couplage de disaccharides sur les groupements aminés des résidus de lysine de la BSA [SCHWARTZ et GRAY (255)], ou pour l'obtention de supports de chromatographie d'affinité pour la purification de lectines par conjugaison de disaccharides sur des gels de chromatographie [BAUES et GRAY (32)].

2.1 - Préparation d'un conjugué de la daunorubicine et du lactose

La mise au point du procédé de couplage a été effectuée en utilisant comme modèle le lactose, disaccharide Gal(β 1 - 4)Glc.

2.1.1 - Méthode de couplage

La daunorubicine (10 mg) est incubée à 37°C sous agitation constante et à l'obscurité, en présence de 100 mg de cyanoborohydrure de sodium (JANSSEN CHIMICA) et d'un large excès de lactose (environ 20 fois) dans un tampon phosphate 0,2M, pH 8. Afin de favoriser la réaction de condensation et de limiter la dégradation de la DNR en solution, l'addition de la DNR est fractionnée dans le temps. La réaction se poursuit sous agitation pendant 7 jours, des aliquotes sont prélevées tous les jours afin

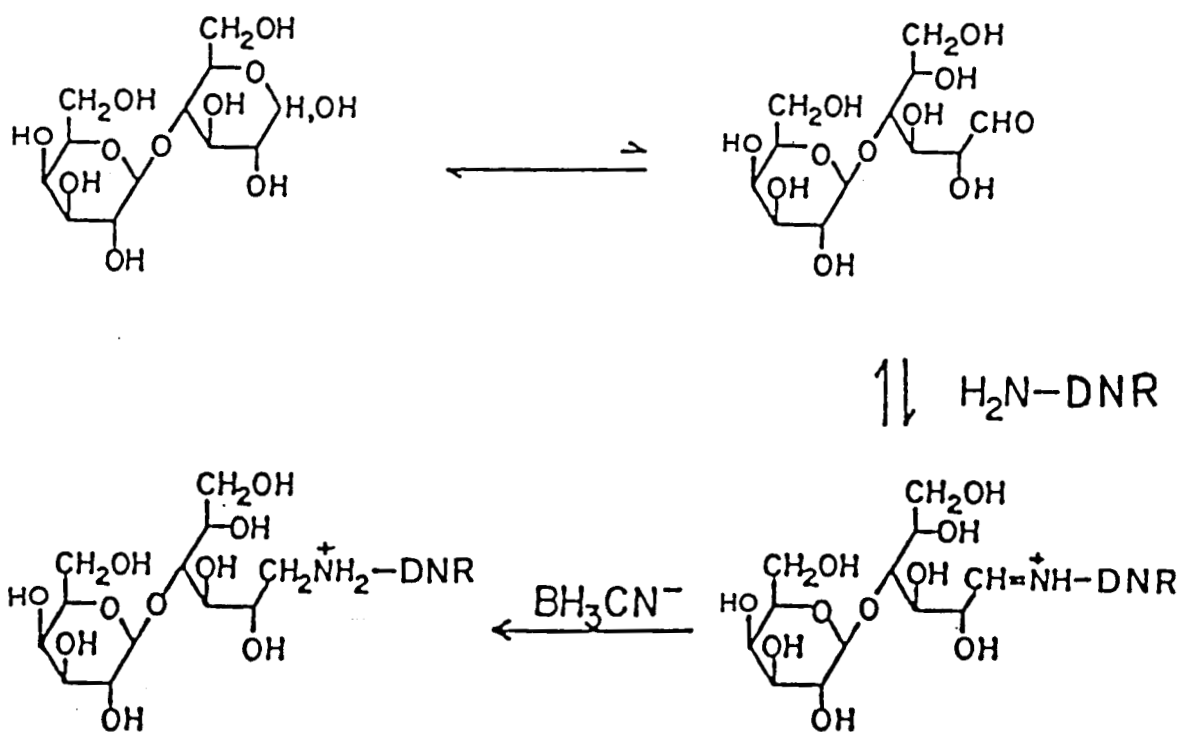


Figure 21 Application de la réaction d'amination réductive décrite par GRAY (124) au couplage du lactose sur la daunorubicine.

de suivre l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince de gel de silice (MERCK, système-solvant : chloroforme / méthanol / eau : 80 : 30 : 3).

2.1.2 - Purification du conjugué

Le mélange réactionnel est centrifugé afin d'éliminer le précipité qui apparaît pendant la réaction. Le surnageant est purifié par chromatographie sur papier dans le système-solvant de PARTRIDGE (n-butanol / acide acétique / eau : 4 : 1 : 5). Une bande ($R_f \simeq 0,34$) de migration intermédiaire entre le lactose ($R_f \simeq 0,1$) et la DNR ($R_f \simeq 0,64$) et ses produits de dégradation ($R_f \simeq 1$), dont l'aglycone est éluee par le solvant de chromatographie et concentrée sous vide. Le produit remis en solution puis lyophilisé est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

2.2 - Préparation du conjugué DNR-asialoglycannes de l'orosomucoïde

L'application du protocole décrit ci-dessus aux glycannes de l'orosomucoïde désialylés obtenus par hydrazinolyse, N-réacétylation, réduction nécessite la création sur les molécules glycaniques de groupements aldéhydiques susceptibles de réagir avec l'amine de la DNR. Ceci a été obtenu par l'oxydation periodique du polyol que constitue l'osamine libérée de l'asparagine par l'hydrazinolyse (carbones 5 et 6).

2.2.1 - Oxydation periodique des glycannes

VAN LENTEN et ASHWELL (315), tirant parti des propriétés réactionnelles des sucres à l'oxydation periodique décrites par FISCHER et RUND (103a) et HERISSEY et coll. (148a), ont décrit un protocole d'oxydation ménagée du polyol porté par l'acide N-acétyl neuraminique de la céruléoplasmine et de l'orosomucoïde en vue du

marquage de la copule glucidique de ces glycoprotéines par réduction au borohydrure tritié. Après avoir déterminé dans les conditions décrites par ces auteurs les paramètres de la cinétique de l'oxydation periodique permettant l'oxydation quantitative des polyols en limitant l'oxydation des sucres liés en 1, les glycanes désialylés de l'orosomucoïde ont été traités comme suit : les glycanes (35 μ moles soit environ 90 mg) mis en solution dans un tampon acétate/acide acétique 0,1M, pH 5,6 , NaCl 0,15M sont incubés en présence d'un excès de NaIO_4 (10 fois) pendant 1,75 minute exactement à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition d'un excès d'éthylène glycol afin de consommer le periodate n'ayant pas réagi. Le mélange est ensuite purifié par chromatographie de tamisage moléculaire.

2.2.2 - Couplage des glycanes oxydés à la daunorubicine

La condensation des glycanes sur la DNR a été réalisée selon le protocole décrit ci-dessus (Cf § 2.1.1) à l'exception du rapport entre sucre et DNR. En effet, compte tenu des quantités de glycanes dont nous disposons et de leur masse moléculaire, le rapport glycanne (aldéhyde)/DNR (amine) était de 1 pour 1 en final (18 μ moles), la DNR étant ajoutée de manière fractionnée dans le milieu réactionnel de façon à maintenir un excès de glycanne pendant le déroulement de la réaction. Afin de suivre plus aisément les glycanes au cours des manipulations ultérieures, une aliquote de glycanes marqués au tritium a été ajoutée aux glycanes avant l'étape d'oxydation periodique.

La cinétique de la réaction est suivie en chromatographie sur couche mince comme décrit précédemment (Cf § 2.1.1)

2.2.3 - Purification du conjugué

A l'issue de la réaction de couplage, le mélange est

purifié dans un premier temps par "gel filtration" sur Biogel P₂, le caractère hydrophobe de ce support permet de retenir fortement la daunorubicine libre et ses produits de dégradation (aglycone). Les glycanes recueillis ont ensuite été soumis à une étape de chromatographie sur support hydrophobe dans le but d'enrichir la préparation en glycanes conjugués en tirant parti des propriétés hydrophobes de l'aglycone de la DNR. Les glycanes sont remis en solution dans un tampon phosphate 0,01M, pH 6,9 et chromatographiés sur une colonne de Phényl-Sépharose (PHARMACIA, 1,2 X 40 cm) équilibrée dans ce même tampon. Les glycanes sont séparés en deux fractions, l'une n'est pas retenue et est éluee au volume d'exclusion de la colonne, l'autre est légèrement retardée dans les conditions utilisées. Cette dernière fraction est ensuite purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire avant lyophilisation.

2.2.4 - Autres conjugués synthétisés

Outre ces conjugués, nous avons également condensé les mêmes oligosaccharides (lactose et glycanes désialylés de l'orosomucoïde) avec la leucyl-daunorubicine dans les conditions décrites ci dessus. L'intérêt de préparer des conjugués à partir de la leucyl-DNR repose sur une possibilité d'hydrolyse plus facile du conjugué, favorisant ainsi la libération de la DNR dans le lysosome après endocytose. Cependant, il s'est avéré que dans les conditions où nous travaillions, la leucyl-DNR était beaucoup moins stable que la DNR ce qui ne nous a pas permis d'obtenir des quantités de dérivés suffisantes pour les expérimentations sur les cellules. Il est vraisemblable également que le caractère très hydrophobe de la leucyl-daunorubicine gêne la réaction de condensation. Nous avons également synthétisé un dérivé du cellobiose : Glc (β 1 - 4) Glc et de la DNR dans le but de comparer son action sur les cellules avec celle du conjugué lactose-DNR, ainsi qu'un conjugué du lactose et du glycolle purifié également par chromatographie sur papier susceptible d'être par la suite lui-même condensé par synthèse organique avec la DNR par l'intermédiaire de son groupement carboxylique, créant ainsi une liaison amide facilement hydrolysable.

2.3 - Analyse des conjugués DNR-oligosaccharide

2.3.1 - Analyse en chromatographie sur couche mince

La cinétique des réactions de condensation est suivie par chromatographie sur couche mince de gel de silice (MERCK, système-solvant : chloroforme / méthanol / eau : 80 : 30 : 3), sans révélation pour visualisation de la DNR (coloration rouge) ou sous U.V. ou révélation par l'orcinol sulfurique (mise en évidence des sucres). Dans ce solvant hydrophobe, les oligosaccharides restent au point de dépôt, la formation des produits de couplage se traduisant par l'apparition d'une tache rouge au point de dépôt. L'aglycone de la DNR très hydrophobe migre très près du front de solvant, la DNR ayant une migration intermédiaire.

Le produit de couplage de la DNR au lactose peut être séparé par chromatographie sur couche mince en solvant n-butanol / acide acétique / eau : 2 : 1 : 1, révélation identique à ci dessus. La DNR et la daunomycinone migrent très près du front de solvant, le lactose migrant beaucoup plus lentement. Lors de la condensation du lactose sur la DNR, on observe l'apparition d'un produit de migration intermédiaire.

2.3.2 - Enregistrement des spectres d'absorption et d'émission (fluorescence) des conjugués

2.3.2.1 - Enregistrement des spectres d'absorption UV-visible des conjugués

Les spectres des produits de condensation de la DNR et des oligosaccharides ont été déterminés sur spectrophotomètre CARY 219 (VARIAN). Cette technique a permis 1) de vérifier que les réactions de couplage n'ont pas modifié les propriétés

d'absorption de la DNR, 2) de doser les produits en solution dans l'eau, 3) d'identifier et de doser l'aglycone libérée par hydrolyse de la liaison aglycone-daunosamine.

2.3.2.2 - Enregistrement des spectres de fluorescence des conjugués

Les travaux tirant parti des propriétés de fluorescence des conjugués synthétisés ont été effectués dans le laboratoire de Spectrochimie INFRA-ROUGE et RAMAN de l'U.S.T.L.F.A. (CNRS, LP 2641, prof. M. DELHAYE). Les manipulations à la microsonde MOLE ont été effectuées par F. DELPLACE-DELHAYE que je remercie vivement. Je tiens à remercier également Monsieur le Professeur M. DELHAYE de nous avoir permis d'effectuer ces expérimentations. Les spectres de fluorescence de la DNR et de ses conjugués ont été effectués à l'aide de la microsonde MOLE à une longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) de 488 nm.

2.3.3. - Analyse de la composition des conjugués

2.3.3.1 - Libération de l'aglycone par hydrolyse

La liaison daunomycinone-daunosamine (Fig. 1) est hydrolysée par traitement par HCl 0,5N, 30 minutes à 100°C. L'aglycone est extraite de l'hydrolysat par le chloroforme.

2.3.3.2 - Identification du galactose dans les conjugués du lactose à la DNR

2.3.3.2.1 - Hydrolyse du conjugué

Le conjugué du lactose et de la DNR après purification est soumis à une hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4N pendant 4 heures à 100°C. Après élimination de l'ATFA par évaporation, l'hydrolysat est analysé par chromatographie sur

couche mince de gel de silice (système-solvant : n- butanol / acide acétique / eau : 2 : 1 : 1) en présence de témoins glucose et galactose et révélation des sucres par l'orcinol sulfurique.

2.3.3.2.2 - Analyse en chromatographie en phase gazeuse

Le conjugué du lactose à la DNR a été analysé par G.L.C. après méthanolyse et trifluoroacétylation pour identification du galactose.

2.3.4 - Analyse de la pureté des conjugués

La recherche des contaminants de daunorubicine libre dans les conjugués a été effectuée après migration en chromatographie sur couche mince dans le système-solvant : chloroforme / méthanol / eau : 80 : 30 : 3 et solvant : éthanol / eau / pyridine / n-butanol / acide acétique : 100 : 30 : 10 : 10 : 3, par analyse en fluorescence à la microsonde MOLE (exc = 488 nm, émission = 590 nm, sensibilité 10^{-12} g, 2×10^{-15} M).

2.3.5 - Etude de l'hydrolyse enzymatique du conjugué de la DNR au lactose

Le conjugué de la DNR au lactose a été soumis à l'action d'enzymes purifiés (galactosidase et glucosidase ainsi qu'à l'action hydrolytique d'une fraction lysosomique de foie de Rat afin d'explorer in vitro sa dégradation.

Les lysosomes sont isolés à partir de foie de Rat selon une technique voisine de celle décrite par DE DUVE (71). Je tiens à remercier D. BRASSART qui a effectué la préparation des lysosomes.

Les lysosomes provenant de 5 g de foie de Rat sont lavés 2 fois par une solution de NaCl à 9°/oo (P/V) et centrifugation 15 mn à 10 000 rpm et remis en suspension dans 3 ml de tampon citrate 0,001M, pH 5,5 contenant 1 % triton X 100 et 5 mM 2-mercaptoéthanol afin de lyser les membranes lysosomiques. La suspension est ensuite homogénéisée au Dounce et laissée 2 heures à +4°C avant les incubations. Le conjugué DNR-lactose est dissous dans un tampon citrate 0,1M, pH 5,5 contenant 5 mM 2-mercaptoéthanol à une concentration correspondant à 100 µg de DNR/ml et incubé à 37°C en présence d'enzymes lysosomiques (100 µl de solution de substrat pour 100 µl de fraction lysosomique).

A des temps déterminés, des aliquotes sont prélevées et congelées, 100 µl de fraction lysosomique sont ajoutés au mélange pour une durée d'incubation totale de 24 heures. Les échantillons sont ensuite analysés à la microsonde MOLE afin de détecter les composés fluorescents obtenus, après migration en chromatographie sur couche mince (système-solvant : n-butanol / acide-acétique / eau : 2 : 1 : 1) en présence des témoins :

- lactose conjugué à la DNR non hydrolysé ;
- lactityl-DNR hydrolysé par une galactosidase (1H à 37°C en tampon phosphate pH 6,8) ;
- lactityl- DNR + galactosidase + glucosidase (SIGMA) ;
- DNR.

3 - ETUDE DE L'ACTIVITE DU CONJUGUE DE LA DNR AU LACTOSE SUR LES CELLULES HEP G₂

Le modèle de l'hépatocyte de Rat qui avait été choisi pour l'étude de l'endocytose des glycanes ne permet pas de mesurer l'effet d'agents cytotoxiques ou cytostatiques (pas de multiplication in vitro). Dans le but d'étudier l'effet des conjugués synthétisés sur la multiplication cellulaire, nous

avons introduit au laboratoire la lignée cellulaire d'hépatome humain Hep G₂. ADEN et coll. (3), étudiant la corrélation des carcinomes hépatocellulaires avec l'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) ont établi, à partir de biopsies de tumeurs hépatiques humaines, deux lignées cellulaires : Hep G₂ et Hep 3B dont les caractéristiques morphologiques correspondent à celles des cellules parenchymateuses du foie. Ces deux lignées cellulaires ont conservé la capacité à synthétiser la plupart des protéines plasmatiques humaines [KNOWLES et coll. (167)]. La lignée Hep G₂, à la différence des cellules Hep 3B ne secrète pas l'antigène HBs. Ces deux lignées constituent d'excellents modèles expérimentaux pour l'étude de la biosynthèse des protéines plasmatiques et de la relation entre le génôme du virus de l'hépatite B et la tumorigénicité.

Outre ces propriétés, SCHWARTZ et coll. (249), ont démontré la présence d'un récepteur des asialoglycoprotéines sur la lignée Hep G₂. La fixation du ligand au récepteur nécessite la présence d'ions calcium, elle est spécifique des asialoglycoprotéines. Chaque cellule est capable de lier environ 150 000 molécules de ligand à +4°C. Les récepteurs représentent une population homogène de sites de liaison à haute affinité ($k_d = 7 \times 10^{-9}M$). Les cinétiques de l'internalisation et du recyclage des récepteurs ont été déterminées par SCHWARTZ et coll. (250) (cf. Généralités-§ 3)

Nous remercions vivement le docteur B. KNOWLES (WISTAR INSTITUTE, PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, USA) qui nous a donné l'autorisation d'utiliser la souche Hep G₂ pour nos études ainsi que le docteur Y. SCHNEIDER (U.C. LOUVAIN, BRUXELLES, BELGIQUE) qui nous a gracieusement procuré les cellules. Nous remercions également le Dr. SCHNEIDER pour les conseils qu'il nous a prodigués pour l'entretien de la souche.

3.1 - Conditions de mise en culture des cellules Hep G₂ et vérification de l'intégrité du récepteur des ASGP

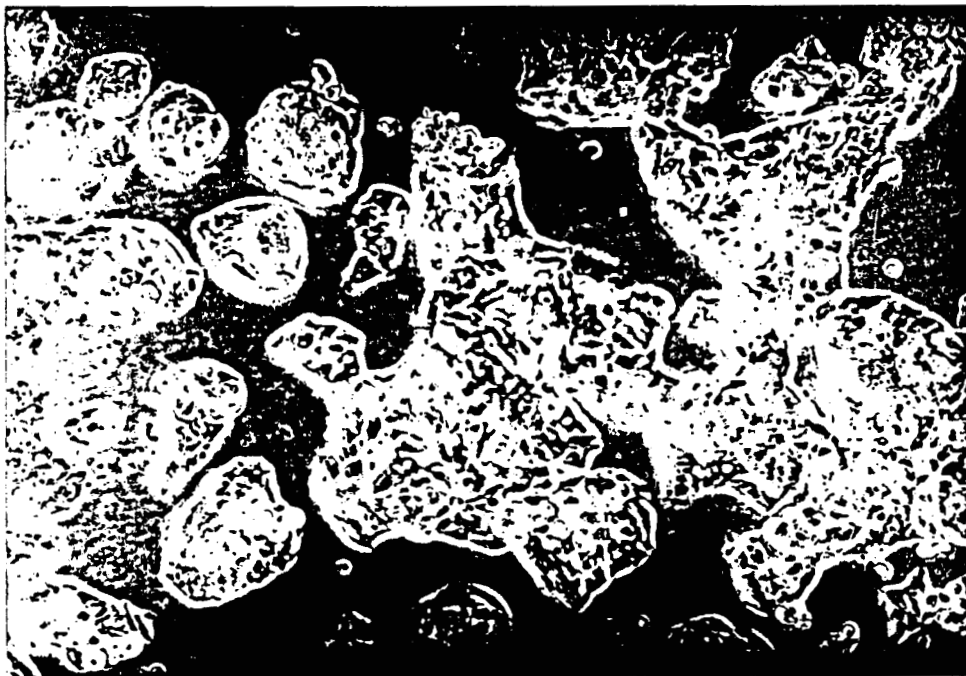
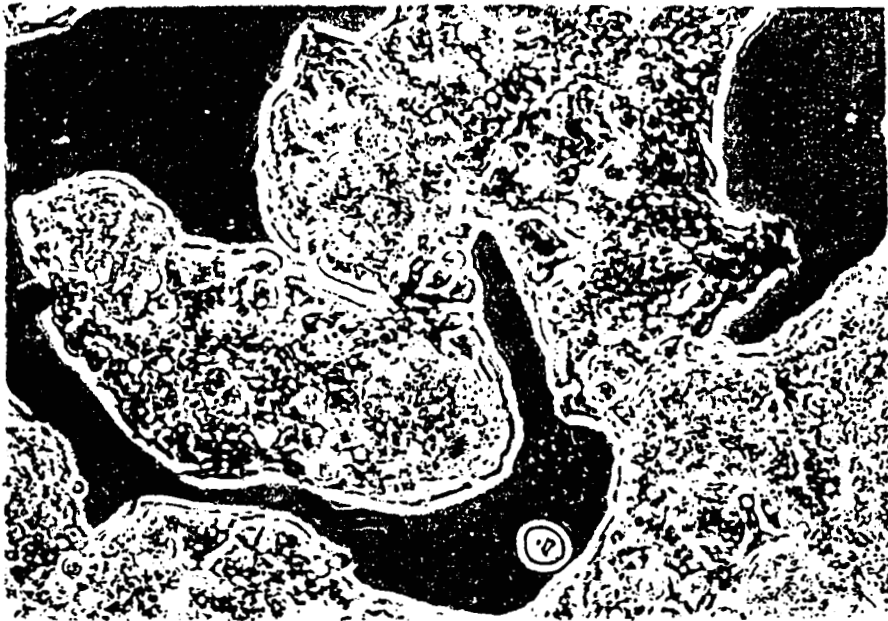
3.1.1 - Conditions de mise en culture des cellules Hep G₂

Les cellules sont cultivées dans le Milieu Minimum Essentiel de EAGLE modifié par DULBECCO (GIBCO), supplémenté en acides aminés (arginine, cystine, glutamine, histidine, tyrosine, isoleucine, alanine, acide aspartique, serine) et renfermant 10 % de sérum de veau fœtal ainsi que les antibiotiques : pénicilline et streptomycine. Les cellules sont cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂, le pH étant maintenu à 7,25 par HEPES 10 mM/NaHCO₃. Les cellules sont repiquées avant confluence tous les 5-6 jours et diluées au 1/3 dans du milieu neuf. Les repiquages sont poursuivis pendant 2 mois environ, le récepteur des ASGP risquant de disparaître au cours des repiquages par dédifférenciation des cellules (Dr. Y. SCHNEIDER, communication personnelle et observations personnelles). Les photographies 1 et 2 montrent l'aspect des cellules Hep G₂ en culture. Nous remercions Madame M. CONIEZ qui a assuré le maintien de la lignée Hep G₂ en culture durant la durée du travail et pour sa collaboration au cours des expérimentations qui ont été effectuées sur ces cellules.

Avant d'entreprendre les expérimentations concernant la capture et la cytotoxicité des différents produits de couplage de la DNR aux oligosaccharides ou aux glycopeptides, il nous a semblé important de vérifier l'intégrité du récepteur des ASGP décrit par SCHWARTZ et coll. (249). Dans ce but, nous avons reproduit les expériences de capture de l'ASOR marqué à l'iode⁻¹²⁵, utilisant l'orosomucoïde natif comme témoin négatif d'incorporation (fixation non spécifique).

3.1.2 - Marquage de l'orosomucoïde et de l'asialo-orosomucoïde à l'iode⁻¹²⁵

Les substrats glycoprotéiques ont été marqués à l'iode⁻



PHOTOGRAPHIES 1 et 2 : aspect des cellules d'hépatome humain Hep G2 en culture.

¹²⁵ selon la méthode utilisant comme réactif de transfert l'Iodo-GEN (1,3,4,6 - tétrachloro - 3 , 6 , diphenyl glycouril, PIERCE) décrit par FRAKER et SPECK (113). L'Iodo-GEN est un réactif insoluble dans l'eau qui permet l'iodation en phase solide au contact des solutions aqueuses d'iodures. Ce réactif permet l'obtention de fortes activités spécifiques tout en limitant la dénaturation des protéines par les réactifs couramment employés comme la chloramine T ou la lactoperoxydase.

Les substrats (ASOR et OROSO, environ 200 µg) sont dissous dans 200 µl de tampon Tris-HCl 0,2M, pH 8,5. Après addition de 2 µl de NaI 0,044 % et de 0,5 mCi de ¹²⁵INa (AMERSHAM, carrier free, IMS -30, 13-17 mCi/mmmole), le mélange est transvasé dans un tube dont le fond a été préalablement recouvert par l'Iodo-GEN (50 µg, dissolution dans le chloroforme 1 mg/ml et évaporation sous courant d'azote). Le mélange est maintenu sous agitation constante à 0°C pendant 1 heure. La réaction est arrêtée par transfert dans un tube sec. Le substrat marqué est ensuite purifié par chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G-25 (colonne PD-10, PHARMACIA) en tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 , NaCl 240 mM, NaI 50 mM. L'activité des substrats est mesurée en scintillation solide (compteur LKB, COMPUGAMMA 1282). L'activité spécifique des substrats marqués est de 2 à 3 x 10⁶ cpm par µg de protéine.

3.1.3 - Conditions d'incubation des cellules Hep G₂ avec les substrats

La vérification de l'intégrité du récepteur des ASGP sur les cellules Hep G₂ a été effectuée selon le protocole décrit par SCHWARTZ et coll. (249) pour la mise en évidence du récepteur. Les cellules sont réparties dans des boîtes de Pétri (35 mm), 3 à 4 jours avant les incubations (0,5 x 10⁶ cellules par boîte). Les cellules sont incubées 5 minutes à température ambiante dans le milieu DME renfermant HEPES 25 mM, pH 7,5 et traitées par un courant de 95 % O₂, 5 % CO₂ (carbogène). Les

cellules sont ensuite incubées 5 minutes à température ambiante dans le PBS. Les expériences de capture de l'asialoorosomucoïde sont effectuées à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ dans le milieu DME, HEPES 25 mM, pH 7,5 renfermant soit l'ASOR marqué à l'iode (2 µg/ml) soit de l'¹²⁵I-orosomucoïde. Les lavages précédant les incubations et les incubations sont effectués dans des milieux dépourvus de sérum de veau fœtal, celui-ci renfermant des inhibiteurs de la capture spécifique par le récepteur (asialoglycoprotéines). A des temps déterminés, le milieu est éliminé et les boîtes de Pétri sont rincées 3 fois par immersion dans 1 litre de PBS renfermant CaCl₂ 1,3 mM. Les cellules sont ensuite traitées 1/2 heure par 0,5 ml de NaOH 1N et transvasées dans un tube sec, les boîtes de Pétri sont rincées 2 fois par 250 µl d'eau.

La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation solide (LKB, COMPUGAMMA 1282). Le dosage des protéines est effectué après neutralisation des échantillons par HCl, selon une méthode dérivée de la technique de LOWRY (180). Le dosage est effectué sur une aliquote de 180 µl amenée à 1 % en SDS. Le standard est constitué par une gamme de serumalbumine bovine. Les résultats sont exprimés en ng de ligand par mg de protéines cellulaires. La fixation non spécifique est assimilée à la fixation de l'orosomucoïde natif dans les mêmes conditions.

Des expériences de déplacement du ligand associé aux membranes par action de l'EGTA 5 mM à 4°C après les incubations ont également été effectuées dans le but d'estimer la quantité de ligand internalisée par les cellules (EGTA résistant).

3.2 - Etude de l'incorporation du conjugué de la DNR au lactose par les cellules Hep G₂

Afin d'explorer l'internalisation de la DNR conjuguée au lactose par les cellules Hep G₂, celles ci ont été incubées en présence du conjugué et analysées à la microsonde MOLE ou au

microfluorimètre LASER à détection multicanale, soit directement dans la cellule afin de détecter et de localiser la fluorescence du conjugué ou de ses catabolites et d'en enregistrer le spectre intracellulaire, soit après lyse cellulaire afin d'augmenter l'intensité des signaux observés. Ces expériences utilisant la microsonde MOLE ont été effectuées en collaboration avec F. DELPLACE-DELHAYE.

Les cellules Hep G₂ (0,5 à 1 x 10⁶ cellules par boîte de Pétri) sont incubées à 37°C en présence de DNR conjuguée au lactose à une concentration équivalente à 2 µg de DNR/ml dans le milieu DME dépourvu de rouge de phénol, d'antibiotiques (composés susceptibles d'interférer avec les mesures de fluorescence) et dépourvu de serum de veau fœtal. Après incubation (1h30 à 6h) les cellules sont rincées abondamment par le DME puis analysées en microfluorimétrie LASER. L'observation directe de la fluorescence au niveau d'une cellule est effectuée à l'aide d'un objectif x 100 à immersion à eau plongeant directement dans le tampon recouvrant les cellules dans la boîte de Pétri. Afin de pallier le phénomène de la décroissance très rapide de la fluorescence observée dans les cellules incubées en présence de conjugué de la DNR au lactose, les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un microfluorimètre à détection multicanale qui enregistre le spectre en un temps très bref (0,5 s).

La fluorescence des cellules a également été analysée après lyse par le mélange HCl 0,3N/solution aqueuse d'éthanol 50 % (v/v). Cette technique permet d'augmenter l'intensité des signaux observés en intégrant la fluorescence contenue dans de nombreuses cellules mais ne permet pas de localiser le compartiment cellulaire auquel elle est associée. Après incubation des cellules en présence du conjugué et lavage comme décrit précédemment, les cellules sont recouvertes par 250 µl de mélange HCl 0,3N/éthanol 50 % (v/v) et laissées 2 à 4 H à +4°C. Le surnageant est alors recueilli afin d'être analysé en microfluorimétrie, les débris cellulaires adhérant au fond des boîtes de Pétri sont également récupérés (culot) en vue de leur

analyse après dépôt sur lame de microscope. Les spectres sont comparés avec ceux obtenus avec des cellules témoins traitées dans les mêmes conditions en l'absence de conjugué.

La spécificité de l'internalisation du conjugué de la DNR au lactose a été étudiée par des expériences de compétition de la fixation du conjugué par un excès d'asialoorosomucoïde (100 moles pour 1 mole de conjugué).

3.3 - Etude de l'action cytotoxique sur les cellules Hep G₂ des conjugués DNR-oligosaccharides (technique au ⁵¹Cr)

Afin de déterminer si les conjugués de la DNR aux oligosaccharides que nous avons préparés possédaient des propriétés cytotoxiques sur les cellules cibles que nous avons choisies, nous avons, dans un premier temps, utilisé la technique de relargage du ⁵¹Cr. La DNR et les anthracyclines exercent principalement leur action au niveau de l'ADN. Cependant nous avons vu précédemment (Généralités §1) que ces substances sont également susceptibles d'agir directement sur la membrane cellulaire soit par génération de radicaux libres, soit par d'autres mécanismes inconnus à l'heure actuelle. Dans cette optique et dans le but de vérifier si les conjugués synthétisés exerçaient une action cytotoxique sur les cellules Hep G₂, il nous est apparu intéressant d'explorer le relargage du ⁵¹Cr par les cellules traitées par nos dérivés par rapport aux témoins DNR ou leucyl-DNR. La technique de marquage des cellules et d'étude du relargage du ⁵¹Cr en présence d'agents cytotoxiques nous a été communiquée par Monsieur le Dr. JOSEPH. Nous remercions vivement Monsieur le Pr. A.CAPRON et Monsieur le Dr. JOSEPH (INSTITUT PASTEUR, LILLE) pour les conseils qu'ils nous ont prodigués pour l'utilisation de cette technique.

3.3.1 - Marquage des cellules au ^{51}Cr

Le chrome sous forme de chromate a la propriété de pénétrer à l'intérieur des cellules en traversant la membrane cellulaire par un processus ne nécessitant pas d'énergie [BUNTING et coll. (46a), MC BRIDE (188)]. Dans l'espace intracellulaire, le chromate est réduit et s'associe de façon irréversible aux protéines : 20 % du chrome se trouve complexé aux organelles cellulaires, le reste est vraisemblablement associé à des cations organiques de faible masse moléculaire [SANDERSON (245)]. La capture du chrome n'est pas influencée par le cycle cellulaire et sa toxicité est minime [MORE et coll. (198)]. Le chromate étant réduit lors de sa liaison, sa réutilisation est faible [BUNTING et coll. (46a)]. La libération de chrome radioactif dans le milieu extracellulaire est donc le témoin d'une lyse cellulaire ou de perturbations de la perméabilité membranaire permettant le passage de constituants cellulaires à l'extérieur de la cellule. Néanmoins, il faut noter que cette technique présente un inconvénient majeur constitué par un relargage spontané élevé du marqueur, variable avec le type cellulaire et qui peut être très important avec les cellules en culture.

Le marquage des cellules est effectué sur une culture riche de cellules prélevées à la veille d'un repiquage. Une boîte Falcon de 75 cm² de cellules Hep G² est incubée 2 H à 37°C dans le milieu de culture renfermant 150 µCi de $^{51}\text{CrO}_4$ (CEA SORIN, S-1). Après élimination du milieu, les cellules sont lavées 3 fois par 15 ml de milieu puis décollées de leur support par une solution de trypsine-EDTA dans le PBS. Les cellules reprises dans le milieu de culture sont centrifugées (2000 rpm, 10 min.) et remises en suspension dans un volume connu de milieu de culture pour numération. L'efficacité du marquage est contrôlée par comptage en scintillation solide (compteur LKB COMPUGAMMA-1282).

3.3.2 - Incubation avec les conjugués et mesure du relargage du ^{51}Cr

Les cellules réparties en plaques de microtitration à fond plat à raison de 1×10^5 cellules par puits (200 μ l de milieu) sont incubées 4H et 24H à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ en présence de quantités connues des substances à analyser. Chaque concentration de produit est testée sur 4 puits. Après incubation, le surnageant de chaque puit est prélevé et centrifugé (2000 rpm, 15 min.) afin de sédimenter les cellules qui auraient pu être entraînées. Une aliquote de 100 μ l correspondant à la moitié du volume du surnageant ($S/2$) est prélevée afin d'en mesurer la radioactivité. Le reste du surnageant, additionné des cellules lysées par le SDS à 1 % et des rinçages des puits correspondants est également mesuré en radioactivité (C (culot) + $S/2$). Le pourcentage de relargage du ⁵¹Cr est donné par la formule :

$$R = \frac{S/2 \times 2}{(C + S/2) + S/2} \times 100$$

Les valeurs obtenues avec les différents produits sont comparées au témoin de relargage spontané effectué en l'absence de substance toxique.

3.4 - Etude de l'action de la DNR et de son conjugué au lactose sur la survie (plating efficiency) des cellules Hep G₂

Les drogues anticancéreuses exercent leur action sur les cellules soit par un mécanisme de cytotoxicité sur la membrane ou sur les métabolismes cellulaires soit par effet cytostatique, freinant la multiplication cellulaire soit en inhibant la synthèse de l'ADN ou en perturbant sa traduction, soit en agissant sur la phase G₁ du cycle cellulaire ou sur la phase de mitose (poisons du fuseau). Afin de déterminer si le dérivé de la DNR conjugué au lactose que nous avons synthétisé présente des propriétés cytostatiques sur les cellules Hep G₂ et afin de comparer cet effet à celui de la DNR, il s'est avéré

indispensable de déterminer les doses de ces différents produits exerçant le même effet cytotoxique mesuré par la technique des courbes de survie (plating efficiency). La survie des cellules est alors estimée par le pourcentage de cellules aptes à donner naissance à un clone cellulaire par rapport à un nombre donné de cellulesensemencées. En effet, une cellule est généralement considérée comme viable lorsqu'elle donne naissance à une colonie comportant au moins 50 cellules, ce qui veut dire qu'elle est capable de donner naissance à 5 générations donc de se diviser indéfiniment. Les méthodes de clonage in vitro introduites par PUCK et MARCUS (231-232) permettent de quantifier la fraction de cellules survivantes après action de doses croissantes de différentes substances. Cette technique permet de comparer l'action cytotoxique de ces substances et de déterminer ainsi la dose de chaque substance entraînant un pourcentage choisi d'inhibition de la survie (effet cytotoxique identique). Ceci permet ensuite d'étudier, par d'autres techniques, leur effet cytostatique. Les études concernant l'effet cytostatique de nos dérivés et le choix des techniques employées ont été effectués avec la collaboration de Madame le Dr. M. COLLYN-D'HOOGHE (UNITE 124 INSERM, INSTITUT DE RECHERCHES SUR LE CANCER DE LILLE). Nous remercions vivement Madame le Dr. M. COLLYN-D'HOOGHE pour les conseils qu'elle nous a prodigués au cours de cette expérimentation et pour la gentillesse et la disponibilité dont elle a toujours fait preuve à notre égard.

3.4.1 - Détermination du pourcentage de survie (plating efficiency) des cellules Hep G₂

La détermination du plating efficiency d'une lignée cellulaire nécessite dans un premier temps de mesurer le nombre de cellules à ensemercer de façon à obtenir un nombre raisonnable de clones après incubation (environ 100 clones pour une boîte Falcon de 25 cm²). Les cellules en phase exponentielle de croissance sont prélevées 48 H après repiquage etensemencées en quantités connues en boîte Falcon de 25 cm² dans 7 ml de milieu

de culture (Cf. Matériel et Méthodes § 3.1.1). Les cellules sont incubées pendant 15 jours à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ en évitant toute manipulation des boîtes Falcon, ce qui pourrait fausser le résultat par formation de clones à partir de cellules décollées de clones déjà formés. Après incubation, le milieu est éliminé, les cellules sont rincées par NaCl 9°/oo (p/v) et fixées et colorées par le mélange suivant :

Violet cristallisé (SIGMA)	2 g
Formaldéhyde à 30 %	100 ml
Méthanol à 80 %	900 ml

(le colorant est filtré juste avant utilisation)

Le colorant est laissé en contact 1/2 heure avec les cellules. Les cellules sont ensuite rincées abondamment par lavage à l'eau. Les clones cellulaires (au minimum 50 cellules) sont comptés en microscopie optique. Le pourcentage de survie correspond au rapport entre le nombre de clones obtenus après incubation et le nombre de cellulesensemencées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 expérimentations distinctes, 3 flacons distincts par point.

3.4.2 - Détermination des courbes de survie des cellules Hep G2 en présence de DNR et de son conjugué au lactose

Après avoir déterminé le pourcentage de survie (plating efficiency) de la lignée cellulaire Hep G₂, les mêmes expériences ont été effectuées en présence de concentrations croissantes de substance à analyser, DNR et DNR conjuguée au lactose. En présence de composés exerçant une action cytotoxique, le nombre de cellules capables de donner naissance à un clone cellulaire est réduit. La mesure de cette diminution du pourcentage de survie des cellules en fonction de la concentration en substance toxique permet d'estimer la toxicité de la substance testée vis-à-vis de cellules cibles. Cette technique est très utilisée dans

la recherche de nouvelles substances ou de nouvelles techniques à visée thérapeutique, permettant la comparaison in vitro de l'action d'agents très différents comme l'hyperthermie ou l'irradiation sur les cellules EMT6 [COLLYN-D'HOOGHE et coll. (59)]. Cette technique permettant de déterminer les doses de substance exerçant un effet cytotoxique équivalent sur une lignée cellulaire, permet dans un deuxième temps l'étude de leur effet cytostatique par d'autres techniques : mesure de la durée du cycle cellulaire, du temps de mitose, de l'index mitotique, étude de la probabilité de division, incorporation de thymidine tritiée, cytofluorométrie de flux...

3.5 - Etude de l'effet cytostatique du conjugué de la DNR au lactose sur les cellules Hep G₂

L'effet cytostatique du conjugué de la DNR au lactose que nous avons synthétisé a été étudié par deux techniques complémentaires : la mesure de l'incorporation de méthyle-³H-thymidine qui renseigne sur le nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire, donc de cellules dans le cycle, et l'étude en cytofluorométrie de flux qui permet d'estimer la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle. Ces deux techniques ont été appliquées aux doses de DNR et de son conjugué au lactose entraînant 20 et 50 % de réduction de survie des cellules Hep G₂, déterminées à partir des courbes de survie.

3.5.1 - Etude de la cinétique de l'incorporation de méthyle-³H thymidine en présence de DNR et de son conjugué au lactose

Les cellules Hep G₂ en phase exponentielle de croissance (48 H après repiquage) sont décollées par le mélange trypsine-EDTA et réparties en plaques de microtitration à fond plat à raison de 10 000 cellules par puits pour 200 µl de milieu

de culture, l'expérience ayant montré que l'augmentation du nombre de cellules n'entraîne pas d'augmentation de l'incorporation de $\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}$ -thymidine jusqu'à 30 000 cellules par puits et que au delà de cette valeur on observe une diminution de l'incorporation vraisemblablement due aux inhibitions de contact ou à un appauvrissement trop rapide du milieu de culture. Les cellules sont incubées 24 H à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO_2 afin de permettre leur adhésion et une bonne récupération. A l'issue de cette incubation, les substances à analyser (DNR et DNR conjuguée au lactose) sont ajoutées (4 puits par concentration et par temps) et les cellules sont incubées dans les mêmes conditions que ci dessus. La $\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}$ -thymidine (AMERSHAM, 5 mCi, 0,1 μCi dans 10 μl de PBS) est ajoutée dans le milieu 30 minutes avant l'arrêt de l'incubation. Les incubations sont arrêtées à des temps déterminés (1H, 2H, 4H, 6H et 20H), les cellules sont récupérées sur filtre de fibre de verre et rincées abondamment (appareil MASHE II, U. INSERM 42). Après séchage des filtres, la radioactivité est mesurée par comptage en scintillation liquide (compteur BECKMAN-LS 1800).

3.5.2 - Etude en cytofluorométrie de flux de l'effet de la DNR et de son conjugué au lactose sur les cellules Hep G₂

L'analyse en cytofluorométrie de flux permet d'étudier la distribution des quantités d'ADN cellulaire après incubation avec des substances antiméitotiques. L'interprétation des profils de distribution obtenus par cette technique permet de mettre en évidence des blocages du cycle cellulaire sous l'action de substances à visée antiméitotique et donc de renseigner sur leur mode d'action. Ces études ont également été effectuées avec le concours de Madame COLLYN-D'HOOGE.

3.5.2.1 - Incubation avec les substances

Les incubations sont effectuées sur des cellules Hep G₂ en phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été ensemencées à raison de 10⁶ cellules par boîte Falcon de 25 cm² dans 7 ml de milieu de culture renfermant 10 % de sérum de veau fœtal. Les cellules après 48 H de culture dans ces conditions sont incubées pendant 2 heures à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ en présence de DNR et de son conjugué au lactose. Deux concentrations différentes ont été choisies en fonction des résultats obtenus par l'étude des courbes de survie, l'une correspondant à une réduction de 20% de la survie des cellules, l'autre correspondant à une réduction de 50 %.

Après traitement, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées par 3 fois 5 ml de milieu de culture sans sérum de veau fœtal avant d'être remises à incuber dans 7 ml de milieu de culture + sérum de veau fœtal à 37°C. Les cultures témoins ont subi les mêmes manipulations.

3.5.2.2 - Préparation des échantillons pour l'analyse en cytofluorométrie de flux

A des temps déterminés après le traitement (3,6,16 et 24 heures), les cellules (5 boîtes par point) sont décollées par le mélange trypsine-EDTA dans le PBS. Après lavage, les cellules dans 1 ml de PBS sont traitées pour la détermination de leur contenu en acides nucléiques selon la méthode décrite par CRISSMAN et STEINKAMP (63) et CRISSMAN et coll. (62). Les cellules sont fixées par l'éthanol à 70° (4 ml d'éthanol à 70° refroidi à -20°C ajouté goutte à goutte et sous agitation à 1 ml de suspension cellulaire à 0°C) et incubées 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et rincées par 10 ml de PBS, avant de subir une digestion par la RNase, afin d'éliminer l'interférence due à l'ARN cellulaire. Le culot cellulaire est repris par 10 ml de PBS renfermant 1 mg/l de ribonucléase (SIGMA, Type IA) et incubé pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées dans le PBS et l'ADN cellulaire est coloré par le

bromure d'éthidium (SIGMA) à la concentration de 5 mg/l de tampon Tris à 4°C. Avant l'analyse en cytofluorométrie, les cellules sont conservées à l'obscurité dans la glace fondante.

Les échantillons de cellules ont été analysés dans un cytofluorographe BIOPHYSICS 4800A relié à un analyseur de distribution (100 canaux) modèle 2100 qui permet d'obtenir directement l'histogramme de distribution de l'ADN cellulaire (IRCL, Unité 124 INSERM, LILLE).

RESULTATS ET DISCUSSION

1 - ETUDE DE LA FIXATION ET DE L'ENDOCYTOSE DES GLYCANNES DESIALYLES DE L'OROSOMUCOÏDE PAR LES HEPATOCYTES DE RAT

La fixation et l'endocytose des glycoprotéines désialylées par l'intermédiaire du récepteur du galactose des hépatocytes de Mammifère sont largement décrites dans la littérature. En effet, c'est en utilisant l'asialocéruléoplasmine que MORELL et coll. (200) ont pu mettre en évidence la présence de ce récepteur sur les hépatocytes de Lapin. Par la suite, l'exploration de la fixation des substrats présentant le galactose en position terminale non réductrice à leur récepteur des membranes de foie de Rat et aux hépatocytes isolés ainsi que l'étude de l'endocytose du ligand ont été effectuées en utilisant comme substrats des glycoprotéines, la plus utilisée étant l'asialo-orosomucoïde (cf. Généralités, § 3).

La capacité de substrats de nature oligosaccharidique à se lier au récepteur des ASGP a également pu être démontrée puisque le galactose et la N-acétylgalactosamine inhibent la fixation de l'ASOR sur l'hépatocyte. C'est ainsi que les études concernant la spécificité de la liaison du substrat à son récepteur et l'exploration de son site de liaison ont été effectuées à l'aide de substrats oligosaccharidiques simples, utilisant leur propriété d'inhiber la fixation des ASGP [SARKAR et coll. (246)]. La comparaison des constantes d'inhibition obtenues avec des substrats oligosaccharidiques complexes de structure connue a permis de déterminer les motifs glycaniques présentant une affinité optimale pour le récepteur [LEE et coll. (173)] (cf. Généralités, § 3).

En 1980, BAENZIGER et FIETE (21) ont étudié les cinétiques de fixation et de capture de glycoprotéines et de glycopeptides présentant le galactose en position terminale et ont montré que les glycopeptides constitués d'un glycanne

triantenné de type N-acétyllactosaminique lié à l'asparagine sont endocytés avec la même cinétique que l'ASOR. Les auteurs concluent que seuls les glycopeptides présentant les résidus de galactose ou de N-acétylgalactosamine dans une configuration spatiale particulière peuvent induire une modification de conformation du récepteur qui permet leur capture et que l'endocytose de nombreuses glycoprotéines comme l'asialoceruléoplasmine humaine peut être due à la seule présence d'un oligosaccharide complexe présentant la structure appropriée.

Les fibroblastes humains présentent à leur surface un récepteur du mannose 6-phosphate impliqué dans la biosynthèse et l'excrétion des enzymes lysosomiques dont l'existence et la physiologie sont largement documentés [pour revues cf. SLY (269), SLY et FISCHER (270), SAHAGIAN (244)]. MAYNARD et BAENZIGER (187) ont établi que des glycopeptides porteurs du signal Man 6-P sont endocytés avec la même cinétique que les glycoprotéines porteuses de plusieurs copules glycaniques et que le nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire est identique pour ces deux types de substrats. A la suite de ces travaux, CREEK et SLY (61) et FISCHER et coll. (102) ont démontré que des oligosaccharides phosphorylés, isolés à partir d'hydrolases acides par action d'une endo β -N-acétylglucosaminidase H et marqués au tritium sur le mannose, sont pinocytés par le biais du récepteur du mannose-6-phosphate présent à la surface des fibroblastes humains. Ces oligosaccharides sont également capables de se lier au récepteur du Man 6-P immobilisé. Les vitesses initiales de capture de ces oligosaccharides sont comparables à celles observées pour de nombreuses enzymes lysosomiques. Comme dans le cas du récepteur des ASGP du foie de Mammifère, les cinétiques de pinocytose des glycopeptides préparés à partir des hydrolases acides et porteurs des signaux de Man 6-P sont similaires à celles des hydrolases elles-mêmes [FISCHER et coll. (103)].

Dans le but d'étudier la fixation et l'endocytose des glycannes par le récepteur des ASGP des hépatocytes de Rat, nos

travaux ont consisté à préparer à partir de glycopeptides de l'ASOR, les glycanes correspondant par hydrazinolyse, N-réacétylation et réduction, à marquer ces deux types de substrats par le tritium par la méthode de réduction par le borohydrure tritié des résidus de galactose préalablement oxydés en C₆ par la galactose oxydase et à étudier l'interaction de ces substrats avec les hépatocytes de Rat isolés par perfusion à la collagénase.

1.1 - Etude des cinétiques des interactions récepteur - ligand

L'étude de l'endocytose des glycanes de l'orosomucoïde désialylé, comparée à celle des glycopeptides démontrée par BAENZIGER et FIETE (21), a été abordée dans un premier temps en explorant la capture de ces deux substrats par les hépatocytes de Rat à 37°C et à 4°C. En effet, TOLLESHAUG (289) a démontré que l'internalisation du ligand associé à son récepteur était inhibée (inférieure à 5 % de la quantité d'ASGP associée à la cellule) à une température inférieure à 10°C. Lorsque la température est progressivement augmentée, le substrat est endocyté par l'hépatocyte et, à 37°C, la radioactivité associée aux cellules reflète la quantité de substrat fixé à la membrane cellulaire augmentée de la quantité de substrat endocyté. Nous avons ensuite étudié l'effet de l'EGTA sur le déplacement du ligand associé aux cellules à ces deux températures.

1.1.1 - Etude de la fixation des substrats aux hépatocytes

1.1.1.1 - Etude de la fixation à 4°C

La fixation des glycanes et des glycopeptides de l'ASOR à 4°C par les hépatocytes de Rat est présentée aux Fig. 22 et 23. L'analyse de ces courbes montre que, comme dans le cas des ASGP, la fixation des substrats est un phénomène lentement saturable en fonction du temps, pour une concentration donnée (6

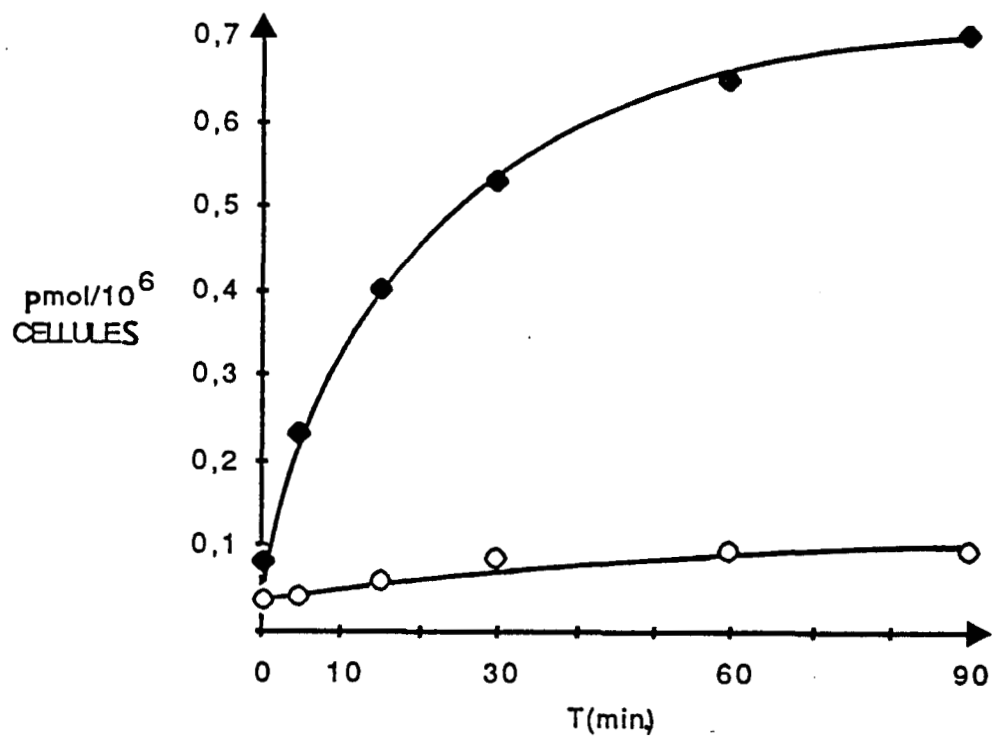


Figure 22 Fixation à 4°C des asialoglycannes de l'orosomucoïde marqués au Tritium par la technique à la galactose oxydase, par les hépatocytes de Rat : 10^6 cellules incubées en présence de glycannes 6×10^{-8} M \blacklozenge — \blacklozenge , et d'un excès (150 fois) d'asialoorosomucoïde froid, \circ — \circ .

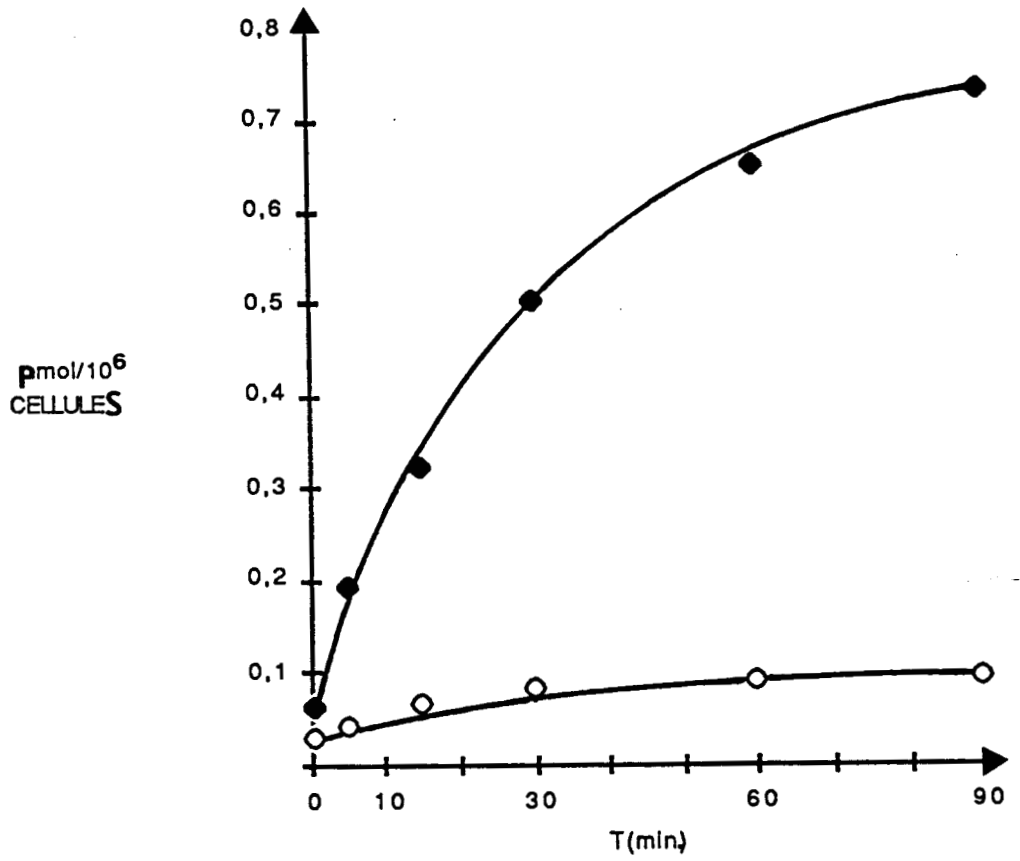


Figure 23 Fixation à 4°C des asialoglycopeptides de l'orosomucoïde marqués au Tritium par les hépatocytes de Rat : 10^6 cellules incubées en présence de glycopeptides 6×10^{-8} M, \blacklozenge — \blacklozenge , et d'un excès (150 fois) d'asialoorosomucoïde froid, \circ — \circ .

$\times 10^{-8}$ M). TOLLESHAUG (289) a en effet démontré que la fixation des ASGP aux hépatocytes est très lente à une température inférieure à 10°C et que dans ces conditions, la quantité de substrat associée à la membrane continue d'augmenter au delà de 3 heures d'incubation indiquant que le système n'est pas en équilibre.

1.1.1.2 - Etude de la spécificité de l'interaction récepteur - ligand

Afin de démontrer la spécificité de la fixation des glycannes et des glycopeptides marqués sur le récepteur des ASGP de la membrane des hépatocytes, nous avons étudié la fixation de ces ligands à 4°C, en présence d'un large excès d'ASOR non marqué (Fig. 22 et 23). Ces expériences montrent que lorsque les hépatocytes ont été incubés en présence de glycannes et de glycopeptides marqués (6×10^{-8} M) et d'un excès d'ASOR froid (150 moles pour 1 mole), la fixation des glycannes et des glycopeptides est considérablement réduite (90 %). La fixation du ligand marqué dans ces conditions d'incubation est couramment assimilée à la fixation non spécifique du ligand sur la membrane des cellules. L'analyse de ces résultats montre que l'ASOR inhibe la fixation des glycannes et des glycopeptides sur la membrane de l'hépatocyte, ces deux types de substrat entrant en compétition pour leur fixation sur l'hépatocyte, on peut en conclure que les glycannes et les glycopeptides se lient spécifiquement au récepteur des ASGP. L'étude de la spécificité de la fixation du ligand sur le récepteur des ASGP a été également abordée par le biais du déplacement du ligand associé aux membranes par l'action de l'EGTA.

1.1.1.3 - Etude du déplacement du ligand fixé aux hépatocytes par l'EGTA

Après incubation avec les substrats, des aliquotes de cellules ont été soumises à l'action de l'EGTA 5mM à 4°C. La fixation du ligand à son récepteur étant strictement calcium dépendante, ce traitement qui n'altère pas l'intégrité de la membrane cellulaire [ASSIMACOPOULOS - JEANNET et coll. (18)], conduit par complexation des ions calciques du milieu, à la dissociation du ligand non internalisé fixé à son récepteur de la membrane cellulaire, en supprimant l'affinité du récepteur pour les ASGP [TOLLESHAUG et BERG (290), WEIGEL (325)]. La fraction du substrat déplacée par action de l'EGTA est assimilée au ligand associé aux membranes, par opposition au ligand internalisé qui devient résistant au déplacement par l'EGTA. Dans le cas où les incubations ont été effectuées à 4°C avant le traitement par l'EGTA, la quasi totalité (> 90 %) du substrat qui était associée aux cellules est dissociée par action de l'EGTA, l'internalisation étant inhibée à cette température (Fig. 24 et 25). La fraction qui résiste dans ces conditions au déplacement par l'EGTA représente essentiellement la fixation non spécifique du ligand aux membranes cellulaires et pour une très faible part une fraction de ligand qui aurait pu être internalisée, l'inhibition de l'endocytose à 4°C n'étant pas tout à fait complète. La quantité de substrat fixée spécifiquement par le récepteur des ASGP de la surface des hépatocytes peut être calculée par différence entre la quantité totale de ligand associée aux cellules et la quantité qui résiste au déplacement par l'EGTA.

La capacité de fixation de la membrane des hépatocytes fraîchement isolés, estimée après 90 mn d'incubation, à proximité de la saturation est donc pour les glycanes, comme pour les glycopeptides de l'ASOR de 0,65 pmole par 10^6 cellules ce qui correspond à 390 000 molécules par cellule. La capacité totale de fixation de l'ASOR et de l'asialofétuine a été estimée par TOLLESHAUG et coll. (291) à 0,6 pmol/ 10^6 cellules, soit 350 000

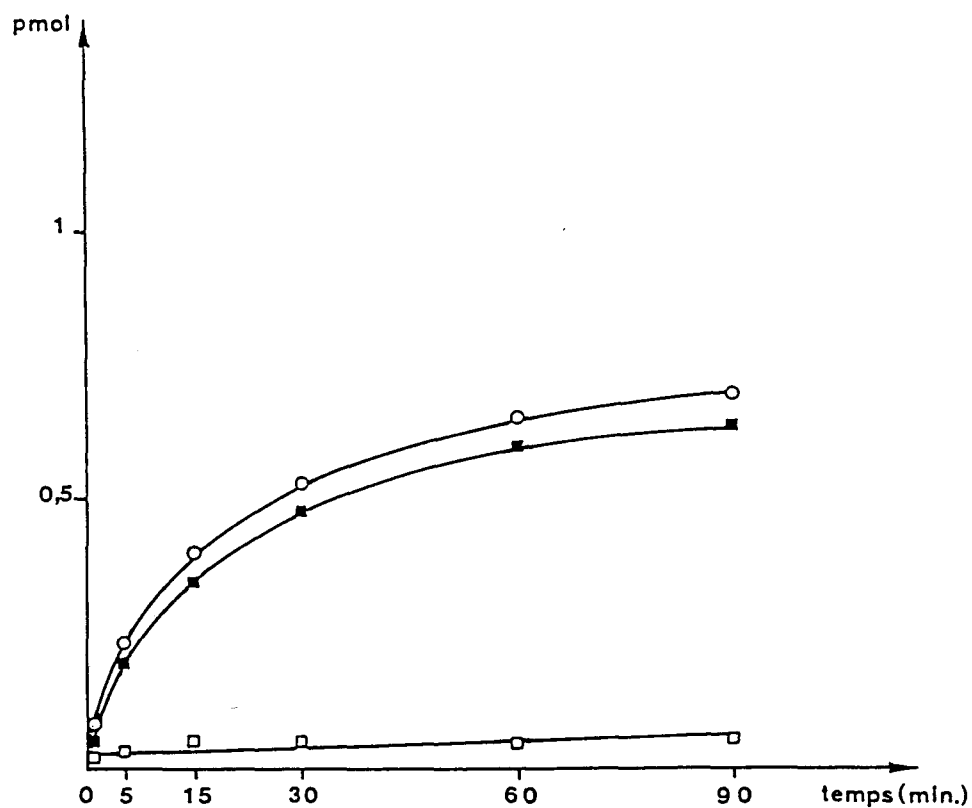


Figure 24 Action de l'EGTA (15 minutes, 5mM à 4°C) sur la fixation des asialoglycannes d'orosomucoïde marqués au Tritium par les hépatocytes de Rat (10^6 cellules)

- fixation à 4°C, substrat 6×10^{-8} M
- fraction de ligand associée aux cellules et résistante à l'action de l'EGTA (fixation non spécifique)
- fraction de ligand libérée par l'action de l'EGTA (calculée par différence) assimilée au ligand associé aux membranes.

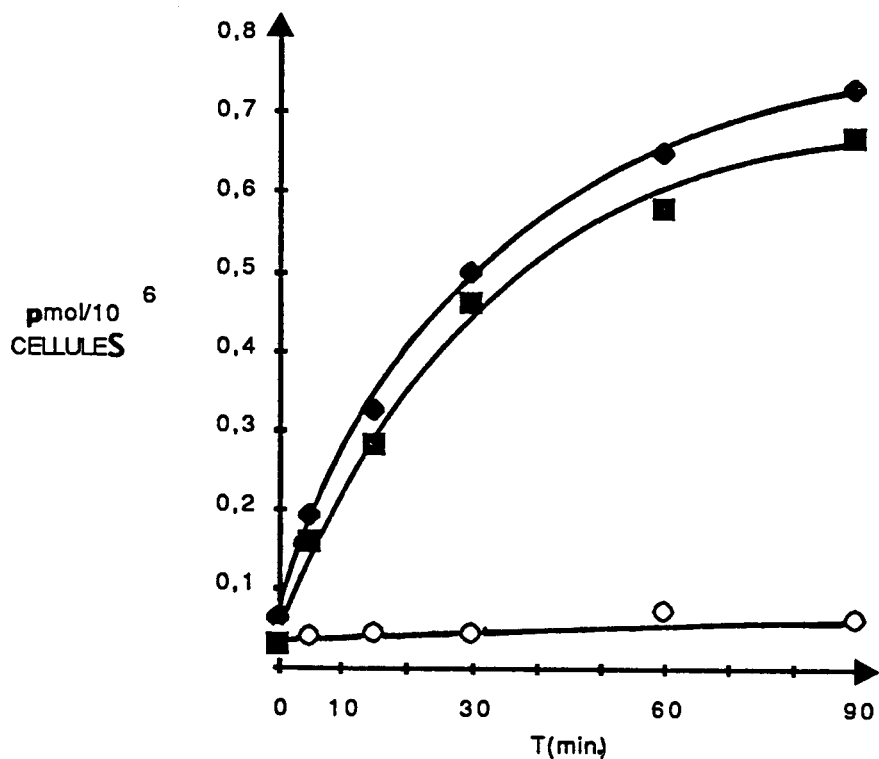


Figure 25 Action de l'EGTA (15 minutes, 5mM à 4°C) sur la fixation des asialoglycopeptides d'orosomucoïde marqués au Tritium par les hépatocytes de Rat (10^6 cellules)

- ◆—◆ fixation à 4°C, substrat 10^{-8} M
- ◇—◇ fraction de ligand associée aux cellules et résistante à l'action de l'EGTA (fixation non spécifique)
- fraction de ligand libérée par l'action de l'EGTA, assimilée au ligand associé aux membranes.

molécules par cellule. La capacité de fixation des substrats glycoprotéiques, glycopeptidiques ou glycaniques par le récepteur des ASGP des hépatocytes de Rat est donc identique, la masse moléculaire du substrat ne semble pas modifier cette fixation.

Lors des expériences de compétition entre l'ASOR froid en excès et les substrats marqués pour la fixation aux hépatocytes, la radioactivité mesurée est légèrement supérieure à celle qui est obtenue lorsque le ligand fixé est déplacé par l'EGTA après incubation. Cette légère différence pourrait s'expliquer par le fait que, en présence d'un excès de ligand froid, une faible quantité (1 mole pour 150 moles) de ligand marqué peut s'associer au récepteur des ASGP, la mesure de la fixation non spécifique serait dans ce cas plus précise en utilisant le déplacement par l'EGTA. Cette constatation est confirmée par le fait que si on soumet des cellules préalablement incubées en présence d'ASOR froid en excès et de substrats marqués à l'action de l'EGTA, une partie de la radioactivité associée aux cellules peut être déplacée. Dans les expériences ultérieures de fixation à 4°C des ligands marqués en fonction de leur concentration dans le milieu, la fixation non spécifique a donc été estimée par la mesure de la radioactivité associée aux cellules après déplacement du ligand par l'EGTA, 5mM à 4°C.

1.1.2 - Etude de la capture et de l'endocytose des substrats par les hépatocytes

Les études de capture à 37°C des glycopeptides et des glycannes de l'asialoorosomucoïde par les hépatocytes de Rat montrent que, à cette température, la fixation des substrats est largement supérieure à la fixation à 4°C (Fig. 26 et 27), cette différence (de l'ordre de 4 fois) reflète l'internalisation du ligand associé à son récepteur.

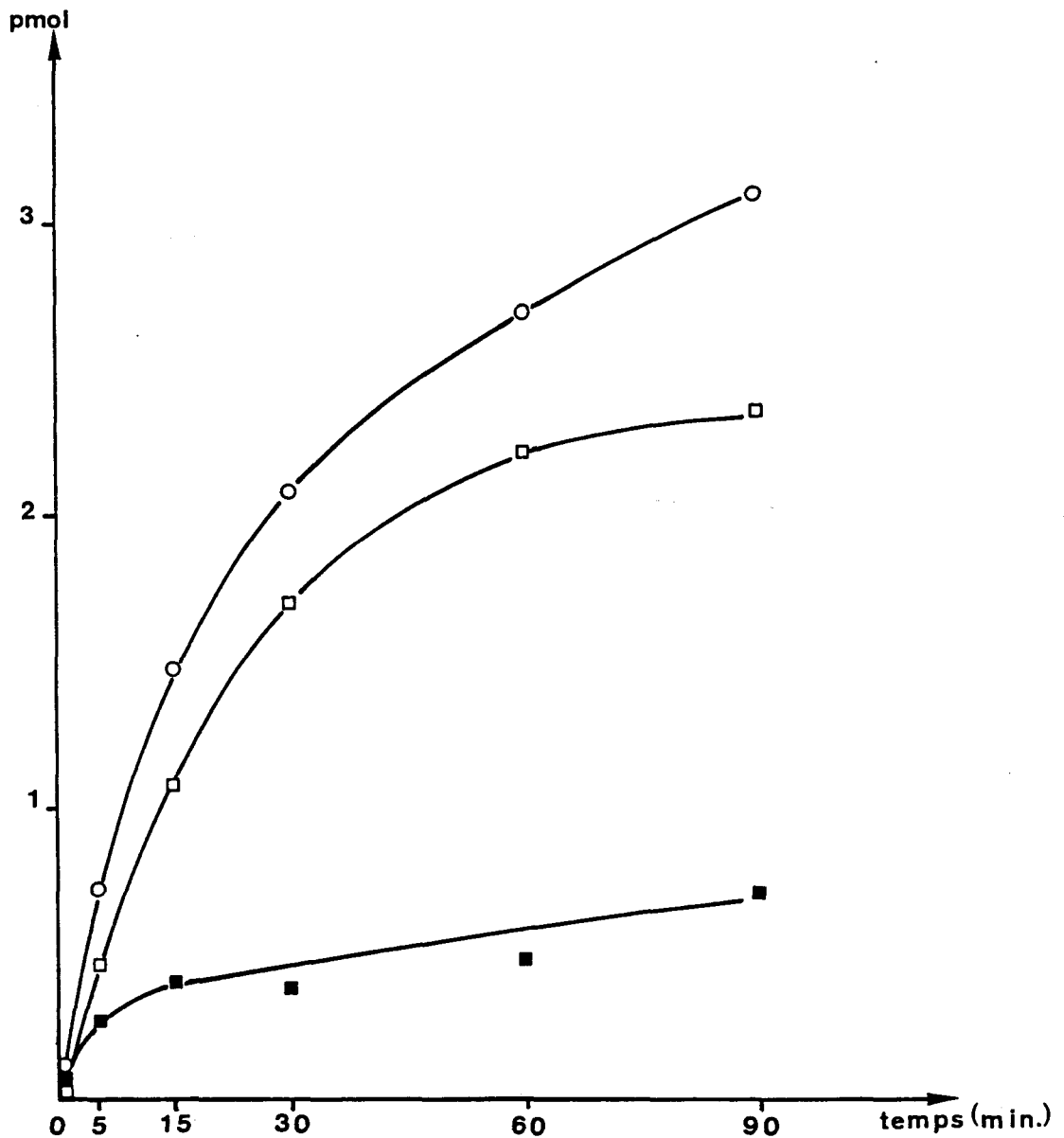


Figure 26 Capture à 37° C des asialoglycannes de l'orosomucoïde par les hépatocytes de Rat (10^6 cellules) ○—○ , et action de l'EGTA : une aliquote de cellules, à des temps déterminés est soumise à l'action de l'EGTA 5 mM à 4° C comme indiqué dans le texte

- fraction de ligand associée aux cellules et résistant au déplacement par l'EGTA (intracellulaire).
- fraction de ligand libérée par l'action de l'EGTA (assimilée au ligand associé aux membranes), calculée par différence entre la fraction de ligand EGTA résistant et la fixation totale du ligand.

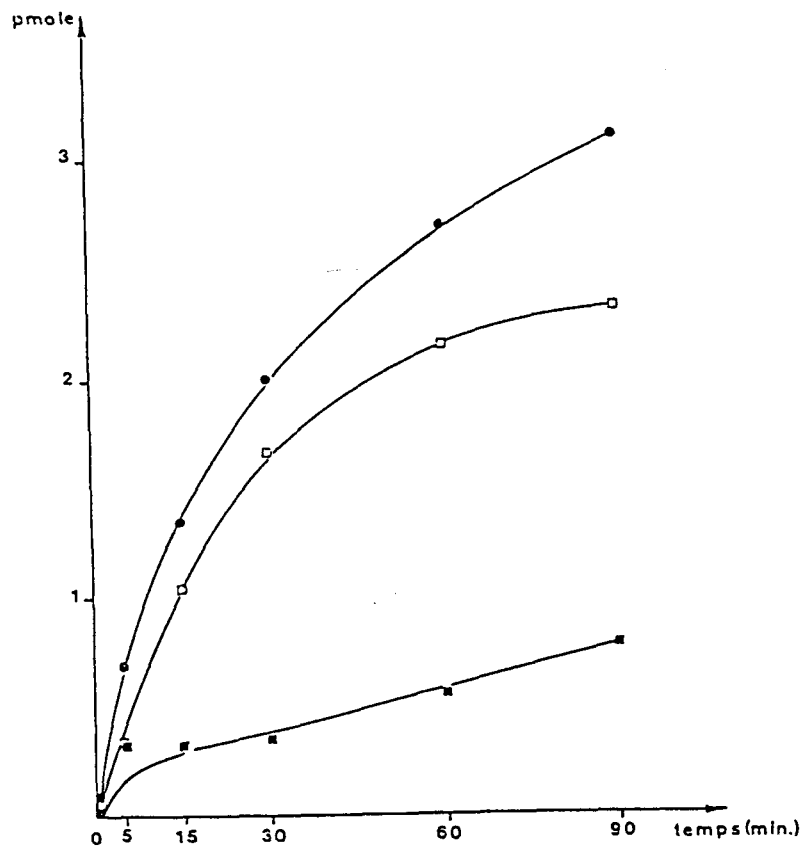


Figure 27 Capture à 37° C des asialoglycopeptides de l'orosomucoïde par les hépatocytes de Rat (10^6 cellules) ●—●, et action de l'EGTA (cf figure 26)

- EGTA résistant (ligand intracellulaire)
- EGTA libéré (ligand associé aux membranes)

1.1.2.1 - Etude de la capture à 37°C

BAENZIGER et FIETE (21) ont démontré que des glycopeptides triantennés isolés à partir d'asialofétuine et marqués à l'iode¹²⁵ sont endocytés par l'hépatocyte de Rat à la même vitesse que l'ASOR lui-même et que la quantité (pmol) de glycopeptide associée aux cellules est identique à la quantité d'ASOR fixé dans les mêmes conditions. Les expériences décrites ici étendent ces résultats aux glycopeptides de l'ASOR et aux glycanes eux-mêmes, obtenus comme indiqué au chapitre Matériel et Méthodes, § 1. Les cinétiques de capture des glycanes et des glycopeptides sont tout à fait similaires comme le montrent les figures 26 et 27. La vitesse maximale de capture des glycanes et des glycopeptides à 37°C, à une concentration de 60 nM est de 0,166 pmol/min/10⁶ cellules soit 1,6 x 10³ molécules/sec/cellule. Ce résultat est en accord avec les données décrites par TOLLESHAUG et coll. (291), qui ont montré que la vitesse maximale de capture de l'asialofétuine à une concentration extracellulaire de 150 nM est de 0,2 pmol/min/10⁶ cellules.

1.1.2.2 - Etude du déplacement du ligand associé aux cellules par l'EGTA

L'internalisation des substrats a été mesurée par détermination de la radioactivité demeurant associée aux cellules après traitement par l'EGTA 5 mM à 4°C après les incubations, comme indiqué ci-dessus. La quantité de ligand qui résiste au déplacement par l'EGTA est assimilée, lors des incubations des cellules à 37°C, à la fraction du ligand qui est endocytée par les hépatocytes. Par différence avec la radioactivité totale associée aux cellules, on estime la quantité du ligand fixée à la membrane cellulaire, non encore internalisée. Les figures 26 et 27 montrent que la fraction de substrat endocytée augmente rapidement dès les premières minutes de l'incubation. La vitesse maximale d'internalisation, dans nos conditions expérimentales, est identique pour les glycanes et les glycopeptides, voisine de

0,1 pmol/min/10⁶ cellules (1 000 molécules/sec/cellule). La fraction de substrat associée aux membranes et qui est libérée par le traitement par l'EGTA atteint une valeur de l'ordre de 60 % de la fixation totale du ligand à 4°C. Cette différence représente la population de récepteurs ayant fixé une molécule de ligand et ayant été internalisés par la cellule. Ces récepteurs, après dissociation de leur complexe avec le ligand, sont recyclés à la surface de la cellule (Généralités, § 3).

Lorsque les incubations sont poursuivies au-delà de 60 minutes, l'endocytose des substrats semble se ralentir plus rapidement que la capture, ce qui a pour effet d'augmenter la quantité de ligand associée aux membranes. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la dégradation du ligand endocyté par l'hépatocyte, l'action des exoglycosidases lysosomiques libérant en premier le galactose terminal qui, dans nos expériences, est le sucre porteur du marqueur radioactif.

1.2 - Etude des paramètres de l'association glycanne-récepteur et glycopeptide-récepteur

La détermination des constantes d'association et du nombre de sites récepteurs présents à la surface des hépatocytes pour les glycopeptides et les glycanes de l'ASOR a été effectuée en incubant les hépatocytes (1 x 10⁶ cellules par point, 2 x 10⁶ cellules/ml) pendant 3 heures à 4°C en présence de concentrations croissantes de substrats (2 à 500 nM). La fixation spécifique a été calculée comme indiqué ci-dessus, en déduisant de la radioactivité totale mesurée, la radioactivité qui demeure associée aux cellules après traitement par l'EGTA. Les données de ce type d'expériences sont classiquement analysées selon la méthode décrite par SCATCHARD (247), où le rapport ligand lié (B = bound) sur ligand libre (F = free = Total - B ; rapport B/F) pour une concentration donnée de ligand présent dans le milieu d'incubation (T) est représenté en fonction de la quantité de ligand lié (B exprimé en mol/l) à cette concentration.

L'utilisation de la représentation de SCATCHARD pour la détermination des constantes d'affinité d'un ligand pour son récepteur et pour la détermination du nombre de sites présents à la surface des cellules a été critiquée dans certains cas et KLOTZ (166) a attiré l'attention des utilisateurs de cette technique sur le risque d'erreur encouru dans la détermination du nombre de sites si la totalité des récepteurs n'est pas occupée par le ligand. KLOTZ propose une autre méthode dans laquelle la quantité de ligand lié (B) est représentée en fonction du logarithme du ligand libre ($\log F$). Afin que les résultats de telles études puissent être interprétés, selon KLOTZ, la courbe $B = f(\log F)$ doit présenter l'aspect d'une sigmoïde dont le plateau représente la capacité totale de fixation du ligand par les récepteurs (nombre de sites) et le point d'inflexion, l'affinité du récepteur pour son ligand. FELDMAN (99) insiste sur la difficulté à atteindre expérimentalement la saturation complète des récepteurs par leur ligand dans les modèles biologiques.

Les Figures 28a et 29a représentent la fixation des ligands par les hépatocytes de Rat en fonction de leur concentration dans le milieu et montrent qu'avec les glycanes comme dans le cas des glycopeptides, la saturation des récepteurs est presque complète. De même, les Figures 28b et 29b, présentant les résultats comme préconisé par KLOTZ (166), montrent que dans les deux cas, les représentations de B en fonction du logarithme de F présentent bien l'aspect d'une sigmoïde atteignant un plateau, avec la réserve émise ci-dessus concernant la difficulté à atteindre la saturation complète des récepteurs dans les systèmes biologiques. Ces réserves ayant été émises, les résultats de nos expérimentations ont été analysés selon la représentation de SCATCHARD (Fig. 28c et 29c). Dans nos conditions expérimentales, les courbes représentant B/F en fonction de B déterminées pour les glycanes et les glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé présentent une allure biphasique, comme l'avait montré WEIGEL (325) pour des concentrations en ASOR supérieures à 15 nM. L'obtention de courbes de SCATCHARD

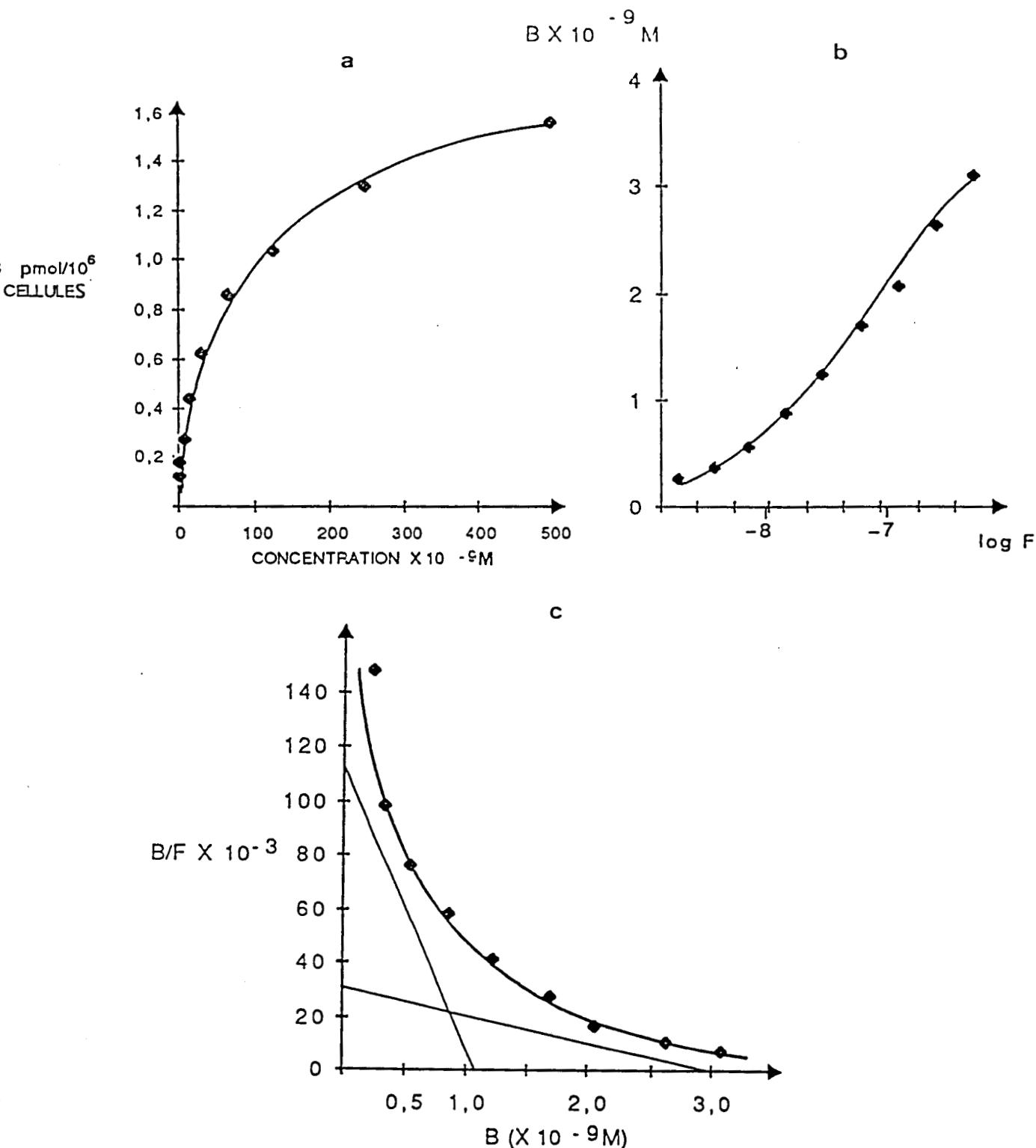


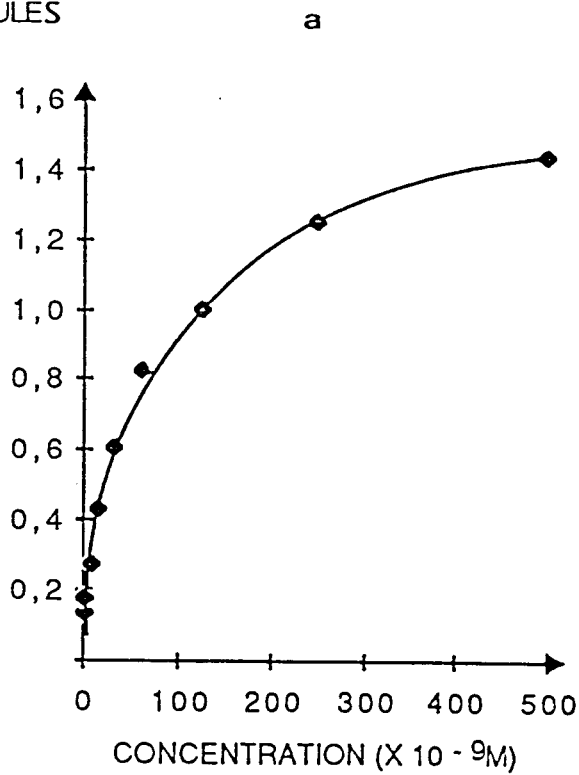
Figure 28 Etude des paramètres de fixation des asialoglycannes par les hépatocytes de Rat (10^6 cellules, 2×10^6 cellules/ml)

a : fixation des glycanes par les hépatocytes en fonction de la concentration en substrat ($B = f(T)$) ;

b : fixation des glycanes exprimée en fonction du logarithme de la quantité de ligand libre présent dans le milieu d'incubation ($B = f(\log F)$, $F = T - B$) ; représentation proposée par KLOTZ (166).

c : courbe d'association des glycanes aux hépatocytes de Rat selon la représentation de SCATCHARD ($B/F = f(B)$).

B pmol/10⁶
CELLULES



B X 10⁻⁹ M

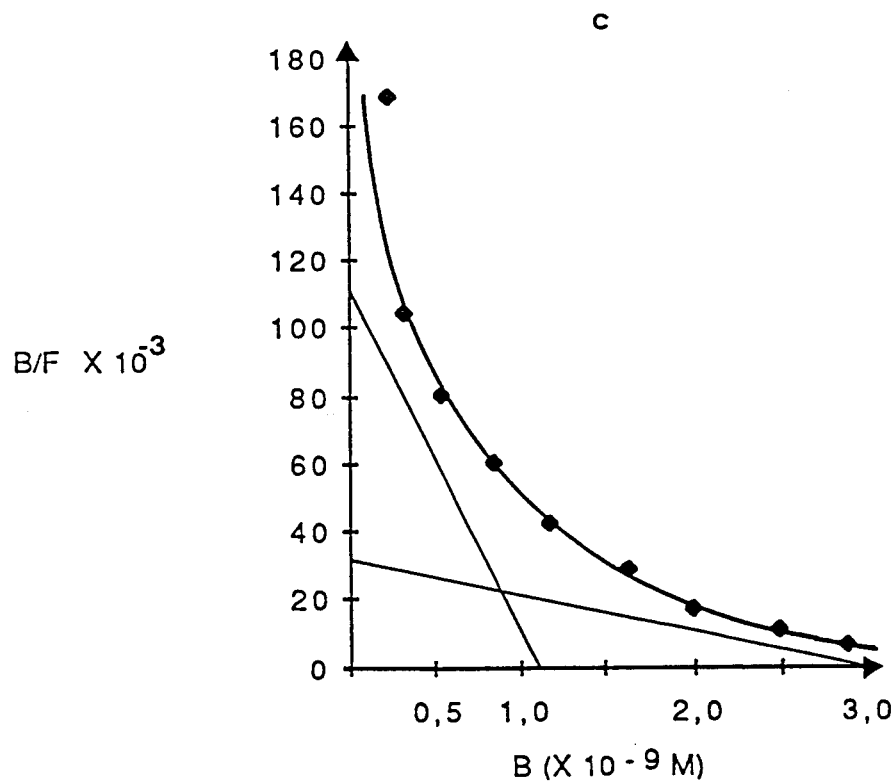
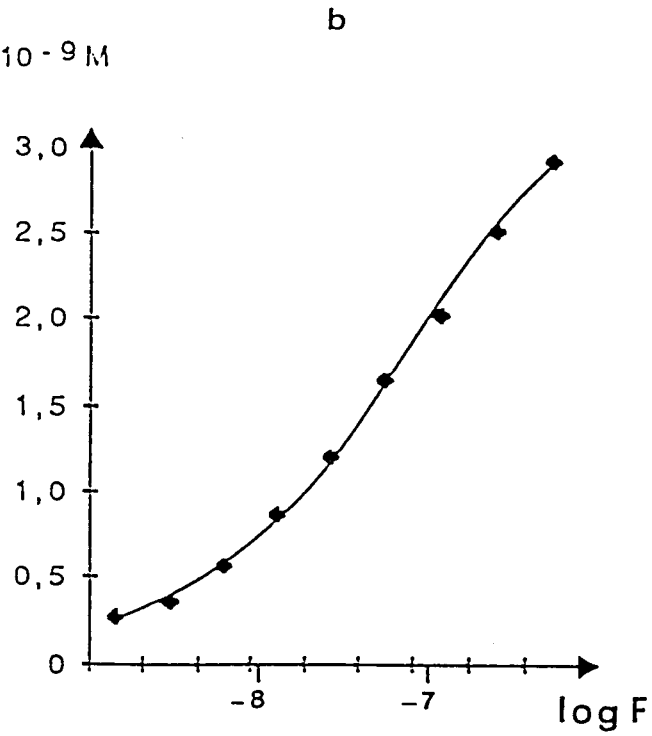


Figure 29

Etude des paramètres de fixation des asialoglycopeptides par les hépatocytes de Rat (10⁶ cellules, 2 X 10⁶ cellules/ml)

a : B = f(T)

b : B = f(log F) : [KLOTZ (166)]

c : B/F = f(B) : SCATCHARD

biphasiques (curvilignes) est le reflet soit de la présence à la surface de la cellule de plusieurs classes de sites d'affinités différentes pour le substrat, soit de l'existence d'un phénomène de coopérativité négative, l'occupation de certains récepteurs influençant l'affinité des autres récepteurs. BAENZIGER et FIETE (21) ont montré que l'ASOR et le glycopeptide triantenné de la fétuine présentent des courbes de SCATCHARD biphasiques, à la différence de O-glycopeptides présentant des motifs oligosaccharidiques Gal-Gal NAc (IgA1/GP I) ou Gal NAc (agalacto IgA1/GP I). Les auteurs suggèrent que les oligosaccharides complexes interagissent avec au moins 2 populations de sites et que cette propriété semble s'appliquer plus aux oligosaccharides complexes qu'aux glycoprotéines porteuses de nombreux motifs oligosaccharidiques.

BAENZIGER et FIETE (21) ont montré que les hépatocytes de Rat présentaient à leur surface $2,5 \times 10^5$ sites récepteurs de haute affinité et $5 - 7 \times 10^5$ sites d'affinité plus faible pour l'ASOR et pour un glycopeptide triantenné de l'asialofétuine. Les constantes de dissociation pour ces deux substrats sont identiques pour les deux classes de récepteurs, $2,1 \times 10^{-8}$ M pour les sites de haute affinité et environ 10 fois plus ($\approx 2 \times 10^{-7}$ M) pour les sites de faible affinité. L'identité des paramètres de fixation de l'ASOR et des glycopeptides triantennés (nombre de sites, k_D) sont en accord avec l'identité des vitesses d'endocytose observées pour ces deux types de substrats, à des concentrations de ligand de 10^{-8} M.

La détermination des paramètres de l'interaction récepteur-ligand montre que les glycannes préparés à partir de glycopeptides de l'ASOR par hydrazinolyse-N réacétylation-réduction et marqués au tritium sur les résidus de galactose terminaux s'associent d'une manière réversible aux récepteurs des ASGP des hépatocytes de Rat avec les mêmes paramètres de fixation que les glycopeptides. Dans nos conditions expérimentales, l'analyse de cette fixation selon la représentation de SCATCHARD révèle la présence de 2 classes de sites : $3,3 \times 10^5$ sites de

haute affinité ($K_{D1} = 9,5 \times 10^{-9} \text{ M}$) et 9×10^5 sites de faible affinité ($K_{D2} = 9,2 \times 10^{-8} \text{ M}$). Ces résultats sont en accord avec les travaux de BEZOUSKA et coll. (35) qui ont mis en évidence l'existence de deux systèmes complémentaires de reconnaissance des motifs oligosaccharidiques des glycoprotéines sériques sur le foie et les leucocytes de Mammifère en comparant la fixation à 4°C d'oligosaccharides bi-, tri- et tétraantennés à des membranes plasmiques de foie de Rat et de Porc avec leur fixation sur des membranes de leucocytes de ces mêmes animaux. Les auteurs ont démontré que la constante apparente d'association aux membranes plasmiques de foie des oligosaccharides tétraantennés (préparés à partir d'orosomucoïde) désialylés est de $0,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, elle est de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ dans le cas des oligosaccharides triantennés (orosomucoïde). De même, les constantes de dissociation que nous avons mesurées sont bien corrélées avec les constantes d'inhibition $[I_{50}]$ de la fixation de 1^{125}I-ASOR sur les hépatocytes de Lapin par des oligosaccharides synthétiques, mesurées par LEE et coll. (173), qui ont montré que dans le cas d'oligosaccharides tri- et tétraantennés, ces constantes d'inhibition sont respectivement égales à $7,4 \times 10^{-9} \text{ M}$ et $3,4 \times 10^{-9} \text{ M}$.

L'existence de deux classes de sites, observée dans nos expérimentations, pourrait en fait refléter l'hétérogénéité de la population glycanique utilisée pour ces études. En effet, les substrats glycaniques et glycopeptidiques utilisés correspondent à un mélange de glycannes tri- et tétraantennés, l'interaction de ces deux familles de glycannes présentant des affinités différentes pour le récepteur des ASGP avec ce récepteur pouvant se traduire par deux classes de sites dans les expériences effectuées, dont les différences d'affinité proviendraient non pas d'une hétérogénéité des récepteurs de la membrane cellulaire, mais du substrat lui-même. En effet, STEER et ASHWELL (274) et WEIGEL et OKA (332), détectent, à la différence d'autres travaux, l'existence d'une seule classe de sites récepteurs de haute affinité pour l'ASOR, respectivement 67 000 sites de $K_D = 3,4 \times 10^{-8} \text{ M}$ et $K_D \simeq 5,5 \times 10^{-9} \text{ M}$, selon WEIGEL et

OKA, le nombre de sites présents à la surface cellulaire étant modulé par les conditions de température auxquelles sont soumises les cellules. Les écarts observés entre les différents laboratoires concernant la détermination du nombre de sites et des constantes d'affinité pourraient s'expliquer par des variations dans les conditions expérimentales, comme la température, et dans le mode d'isolement des hépatocytes, les protéases présentes dans les préparations commerciales de collagénase pouvant entraîner une dégradation plus ou moins importante des récepteurs de la membrane cellulaire. ZEITLIN et HUBBARD (350) ont ainsi pu démontrer que la collagénase diminue le nombre des récepteurs présents sur les hépatocytes fraîchement isolés, cette diminution étant réversible lorsque les cellules sont cultivées à 37°C.

Les travaux que nous avons effectués, démontrent sans ambiguïté la liaison des oligosaccharides complexes de structure tri- et tétraantennée au récepteur des ASGP des hépatocytes de Mammifère, qui avait été suggérée par LEE et coll. (173), en montrant que ces oligosaccharides étaient capables d'inhiber la fixation de l'¹²⁵I-ASOR aux hépatocytes de Lapin et par BEZOUSKA et coll. (35), en étudiant cette fixation aux récepteurs des membranes plasmiques isolées de foie.

L'étude de l'endocytose de ces oligosaccharides, comparée à l'endocytose des glycopeptides, qui avait été démontrée par BAENZIGER et FIETE (21), au moyen des techniques classiquement employées pour l'étude de l'endocytose des asialoglycoprotéines par leur récepteur hépatique, montre que la fixation des oligosaccharides à 37°C est largement supérieure à leur fixation à 4°C, température à laquelle l'endocytose est inhibée. STEER et ASHWELL (274) ont en effet démontré que les récepteurs des ASGP des hépatocytes de Mammifère sont réutilisés au cours de l'endocytose et qu'un récepteur peut permettre l'internalisation de plusieurs molécules d'ASGP qui sont par la suite dégradées dans les lysosomes, sans que le récepteur lui-même ne soit dégradé. Ce recyclage des récepteurs des ASGP

entraîne une accumulation à 37°C du ligand à l'intérieur des cellules, phénomène qui est inhibé à 4°C.

Le traitement des cellules par l'EGTA après incubation avec les substrats qui déplace la fraction de ligand associée à la membrane cellulaire confirme l'endocytose des substrats en montrant que, à 4°C, la quasi-totalité du substrat associé aux hépatocytes est fixée à la membrane, alors qu'à 37°C, une fraction importante du ligand (> 60 %) résiste au déplacement par l'EGTA, cette fraction représentant le ligand internalisé par les hépatocytes. Ces résultats montrent que les glycanes tri- et tétraantennés présentant le galactose en position terminale non réductrice sont endocytés par les hépatocytes de Rat dans des conditions identiques aux glycopeptides. L'endocytose des substrats à galactose terminal qui avait tout d'abord été établie pour les ASGP puis étendue aux glycopeptides est donc le fait également des glycanes eux-mêmes. Comme dans le cas des oligosaccharides phosphorylés isolés à partir d'hydrolases acides qui sont endocytés par les récepteurs du mannose-6 phosphate présents à la surface des fibroblastes humains [CREEK et SLY (61)], cette similitude d'affinité pour le récepteur d'une part, et des cinétiques d'endocytose pour les glycanes, les glycopeptides et les glycoprotéines d'autre part, suggère que l'information structurale qui permet la fixation aux récepteurs des ASGP et l'endocytose est contenue dans la copule glycannique elle-même et que le squelette protéique de la glycoprotéine intacte ne semble pas apporter d'information supplémentaire pour l'endocytose. De même, l'intégrité du point d'attache de la copule glycannique à la protéine (liaison Glc NAc β 1 Asn) qui confère au glycanne une certaine rigidité conformationnelle n'est pas nécessaire à la fixation, ni à l'endocytose du ligand par le récepteur des ASGP. Ces résultats suggèrent que la seule liaison d'un substrat glycannique présentant une forte affinité pour le récepteur des ASGP, (LEE et coll. (173) ayant démontré que l'affinité optimale est obtenue pour les ligands triantennés lorsque la distance entre 2 résidus de galactose terminaux est de 15 Å), suffit à induire l'endocytose de ce ligand par le récepteur des ASGP.

Dans le cas des glycoprotéines, la copule protéique jouerait alors un rôle passif dans l'internalisation, la désialylation du glycanne suffisant à sa fixation et à son endocytose par l'hépatocyte et donc à son catabolisme. Cependant, comme dans le cas du récepteur du mannose-6 phosphate, nos travaux ne permettent pas d'exclure la possibilité que de fines modifications de la copule protéique puissent influencer à un degré moindre l'interaction avec le récepteur. Seule l'étude de l'interaction avec le récepteur des ASGP de glycoprotéines ou de néoglycoprotéines ne différant que par leur copule protéique pourrait permettre de préciser ce point.

2 - PREPARATION DE CONJUGUES DE LA DAUNORUBICINE A DES OLIGOSACCHARIDES

La démonstration que les glycannes de structure tri- et tétraantennée préparés à partir d'orosomucoïde désialylé sont endocytés par l'hépatocyte de Rat après interaction spécifique avec le récepteur des asialoglycoprotéines, permet d'envisager l'utilisation de ces glycannes comme vecteurs pour le ciblage de drogues vers les récepteurs cellulaires de type lectinique. En effet, les glycannes présentent de nombreuses propriétés du transporteur idéal décrit par GREGORIADIS (128), cf. Généralités-§2 et Tableau I : ils sont biodégradables et sont d'une taille compatible avec les drogues dans le cadre soit d'un couplage mole pour mole, soit d'un couplage de plusieurs molécules de drogue par l'intermédiaire d'un bras tel que les poly-lysines décrites par ROBBINS et coll. (237) et PONPIPOM et coll. (227). Les glycannes permettent également d'envisager un ciblage spécifique vers une cellule cible donnée, pourvu que celle-ci porte à sa surface une lectine capable de reconnaître la copule glycanne et d'internaliser le ligand fixé. Dans le cas du récepteur des ASGP, cette internalisation conduit à la dégradation du ligand qui entraînerait la libération de la drogue

couplée dans le lysosome. Dans le cadre du ciblage utilisant les systèmes de reconnaissance lectine - sucre, les glycanes comparés aux glycoprotéines et aux néoglycoprotéines sont d'une taille plus petite ($PM \approx 2\ 000$ Da), réduisant ainsi la quantité de transporteur à administrer. L'utilisation de glycanes comme transporteurs permettrait également de réduire les risques d'immunisation encourus lors de l'administration de quantités massives de glycoprotéines ou de néoglycoprotéines, ces dernières présentant par définition des motifs structuraux non rencontrés in vivo et donc susceptibles de ne pas être reconnus comme faisant partie du soi par le système immunitaire et donc de déclencher la réaction immunitaire.

L'emploi des glycanes pour le ciblage des drogues permettrait également d'utiliser la structure pour laquelle le récepteur présente une affinité optimale, des différences importantes d'affinité pouvant être observées pour de faibles différences de structure. A titre d'exemple, citons les travaux de BEZOUSKA et coll. (35) qui ont montré que les glycanes à galactose terminal de structure biantennée présentent une affinité pour les membranes de leucocytes 1 000 fois supérieure aux glycanes tri- et tétraantennés, à l'inverse de ce que l'on observe pour les membranes de foie. Citons également les travaux de LEE et coll. (173) qui ont démontré que les oligosaccharides triantennés dont la troisième glucosamine est liée en $\beta 1-4$ sur le mannose $\alpha 1,3$ ont une affinité pour le récepteur des ASGP 20 fois supérieure aux oligosaccharides dont la troisième glucosamine est liée en $\beta 1,6$ sur le mannose $\alpha 1,6$.

Nos travaux ont donc consisté à synthétiser des conjugués de la DNR à des oligosaccharides en vue de l'étude de l'action de ces conjugués sur des cellules présentant un récepteur des oligosaccharides couplés. Le couplage de la DNR sur les glycanes de l'orosomucoïde désialylé a été effectué selon la méthode d'amination réductrice décrite par GRAY (124), l'application de cette technique au greffage d'un oligosaccharide sur la DNR ayant été réalisée en utilisant le lactose.

2.1 - Préparation du conjugué de la DNR au lactose (lactityl-daunorubicine)

Les réactions de condensation de la DNR aux oligosaccharides ont été effectuées dans les conditions décrites au chapitre Matériel et Méthodes, § 2.1. La cinétique de la réaction est suivie par prélèvement tous les jours au milieu réactionnel d'une aliquote qui est congelée puis chromatographiée sur couche mince (cf. § 2.3.1).

2.1.1 - Déroulement de la réaction de condensation

Les figures 30 et 31 présentent le comportement de la DNR en solution dans le tampon phosphate pH 8 pendant 7 jours à 37°C en présence (Fig. 31) et en l'absence (Fig. 30) de cyanoborohydrure, aux mêmes concentrations et dans les mêmes conditions que lors des expériences de couplage avec les oligosaccharides. La figure 30 montre la stabilité de la DNR dans ces conditions avec toutefois l'apparition de produits de dégradation hydrophobes, quantitativement mineurs, de migration voisine de celle de la daunomycine. La figure 31 montre qu'en présence de cyanoborohydrure, la DNR est stable pendant la durée de l'incubation avec, comme dans le cas précédent, apparition de traces de produits de dégradation, aglycone et un dérivé moins hydrophobe. Ce dérivé pourrait résulter de la réduction de la fonction cétone portée par le carbone 13 (Fig. 1) qui conduit à la 13-dihydrodaunomycine, ce dérivé étant obtenu par réduction par le borohydrure de sodium de la daunomycine suivie d'une réoxydation spontanée à l'air [ARCAMONE (6)]. Cependant, d'après BORCH et coll. (41a), le cyanoborohydrure, à la différence du borohydrure, ne réduit pas les radicaux carbonyles.

La cinétique de couplage de la DNR au lactose est présentée à la figure 32. Lors de la condensation du lactose sur

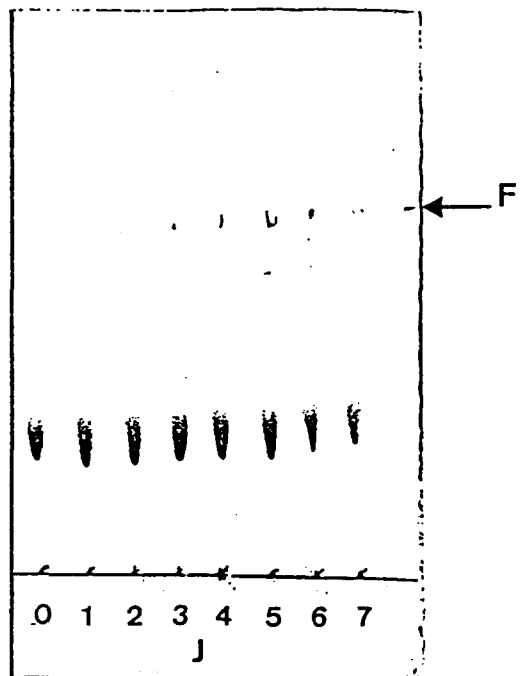


Figure 30

DNR incubée à 37° C pendant 7 jours en tampon phosphate, 0,2 M, pH 8

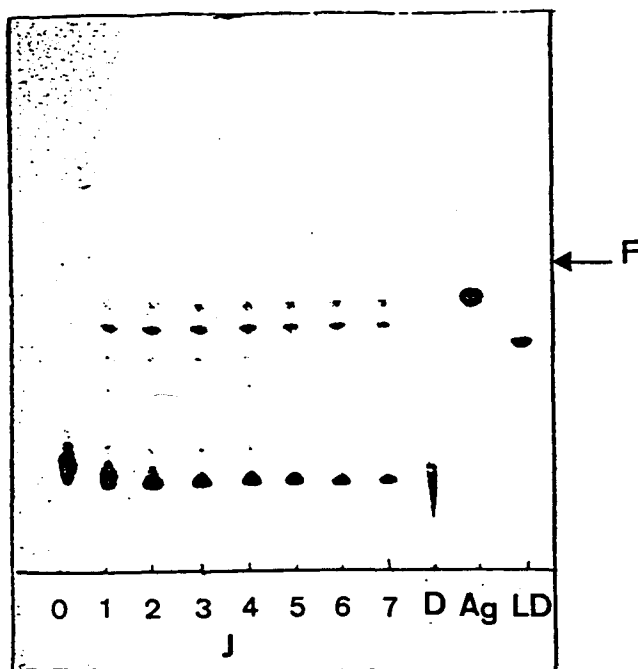


Figure 31

DNR incubée dans les mêmes conditions que ci-dessus, en présence de cyanoborohydride (Na BH₃ CN, 0,3 M)

Figures 30-31

Etude par chromatographie sur couche mince (solvant : CHCl₃/CH₃OH/H₂O : 80 : 30 : 3) du comportement dans le temps de la DNR dans les conditions de la réaction utilisée pour le couplage d'oligosaccharides :

- D = DNR
- Ag = Aglycone (daunomycinone)
- LD = leucyl - DNR
- Jo = Témoin (To de la cinétique)
- F = front du solvant

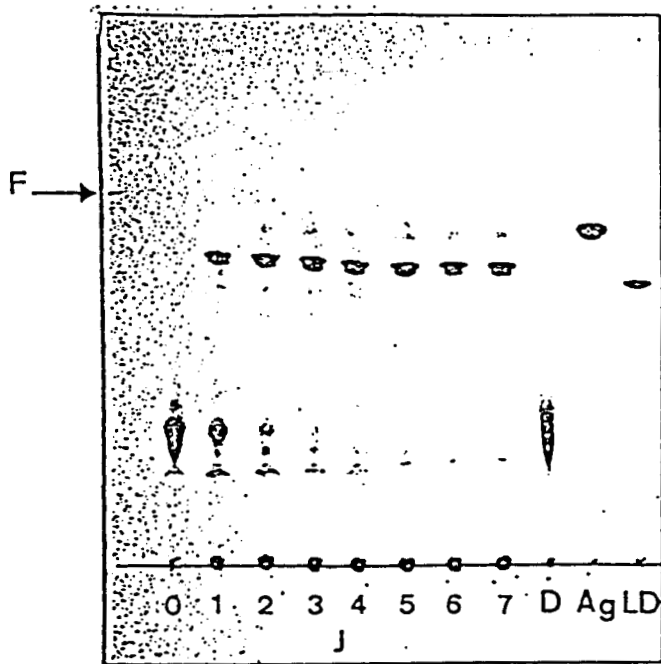


Figure 32 Etude par chromatographie sur couche mince (cf figures 30-31) de la cinétique de couplage du lactose sur la DNR : la DNR (10 mg) est incubée en présence de lactose (200 mg) dans les conditions décrites au chapitre "Matériel et Méthodes" § 2.1.

la DNR, on note l'apparition d'un spot important de coloration rouge (DNR) qui ne migre pas dans le système solvant utilisé (CHCl_3 / CH_3OH / H_2O : 80 : 30 : 3). Le témoin de lactose chromatographié dans ces conditions et révélé par l'orcinol sulfurique (coloration des oses) reste au point de dépôt. L'analyse de la figure 32 montre la disparition de la DNR au cours de l'incubation, avec apparition de produits de dégradation (aglycone et un dérivé plus polaire) identiques à ceux observés en l'absence de lactose et d'un spot coloré révélant la présence de DNR au point de dépôt. La vitesse d'apparition de ce spot est rapide, et, après 3 jours d'incubation, la réaction semble complète. Afin de limiter la dégradation de la DNR lors des réactions de couplage et de privilégier la condensation du lactose sur la DNR, nous avons fractionné dans le temps l'addition de la DNR dans le milieu réactionnel.

La séparation du lactose du composé coloré qui apparaît lors de la condensation avec la DNR a été obtenue par chromatographie sur couche mince dans les conditions décrites au chapitre Matériel et Méthodes § 2.3.1. Dans ces conditions, la condensation du lactose sur la DNR se traduit par l'apparition d'un composé coloré en rouge, de migration intermédiaire entre le lactose et la DNR et donnant une coloration bleu-vert lors de la révélation par l'orcinol sulfurique, différente de la coloration des oses et de la DNR libre. Ce composé a été purifié comme indiqué au chapitre Matériel et Méthodes, § 2.1.2, par chromatographie préparative sur papier et élution par le solvant de chromatographie. Le composé obtenu après lyophilisation et traitement par HCl dilué, se présente sous forme d'une poudre de couleur rouge brique, soluble dans l'eau, peu soluble dans le méthanol. Il est stable à la conservation sous forme lyophilisée.

La pureté du composé ainsi obtenu, a été vérifiée par les techniques chromatographiques décrites ci-dessus, l'absence de DNR libre et de contaminants fluorescents ayant été vérifiée comme décrit au chapitre Matériel et Méthodes, § 2.3.4, par analyse en fluorescence à la microsonde MOLE. La sensibilité de

la détection de la DNR dans ces conditions est de 2×10^{-15} M. Le produit ainsi préparé est exempt de toute contamination par le lactose libre n'ayant pas réagi et de DNR libre ou de ses produits de dégradation.

2.1.2 - Analyse du conjugué synthétisé

Afin de démontrer que le produit obtenu correspondait bien à un conjugué de la DNR au lactose, nous avons étudié les propriétés spectrales du produit avant et après hydrolyse acide, comparées à celle de la DNR et identifié le galactose comme produit de l'hydrolyse acide du conjugué. Nous nous sommes également attardés sur l'hydrolyse enzymatique du conjugué : action d'une galactosidase puis d'une glucosidase et action de fractions d'enzymes lysosomiques de foie de Rat.

2.1.2.1 - Spectroscopie UV - visible

Le spectre d'absorption UV - visible du conjugué synthétisé est présenté à la figure 33. Le conjugué présente les maxima d'absorption caractéristiques de la DNR ($\lambda = 234, 254, 290, 481, 500, 536$ nm), révélant la présence du chromophore 1,4,5-trihydroxyanthraquinone. L'aglycone obtenue par hydrolyse par HCl 0,5 N du conjugué et extraite par le chloroforme présente un spectre visible superposable à celui de la daunomycinone libérée par hydrolyse acide à partir de la DNR ($\lambda = 482, 498, 530$ nm) (Fig. 34). Ces résultats sont en accord avec les données de ARCAMONE et coll. (8) qui ont étudié les maxima d'absorption de la daunomycinone et de ses dérivés et l'influence de différents solvants organiques sur ces maxima. La daunomycinone a pu être identifiée également par analyse en chromatographie sur couche mince, solvant chloroforme / méthanol / eau : 80 : 30 : 3 et comparaison avec le témoin préparé par hydrolyse dans les mêmes conditions de la DNR.

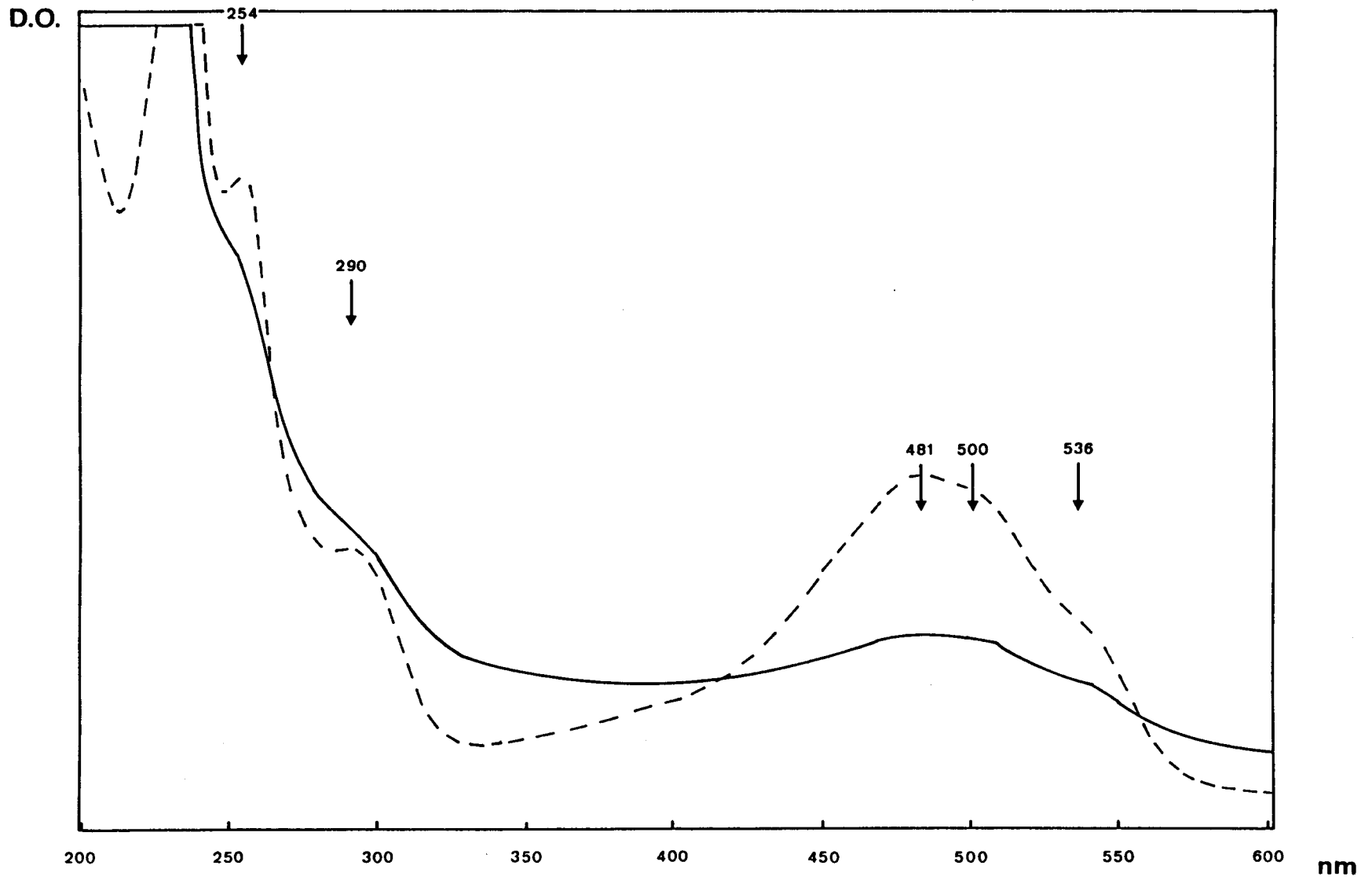


Figure 33 Spectre U.V. - visible du composé lactyl-DNR en solution dans l'eau (λ max = 234, 254, 290, 481, 500, 536 nm). Témoin : DNR (---).

D.O.

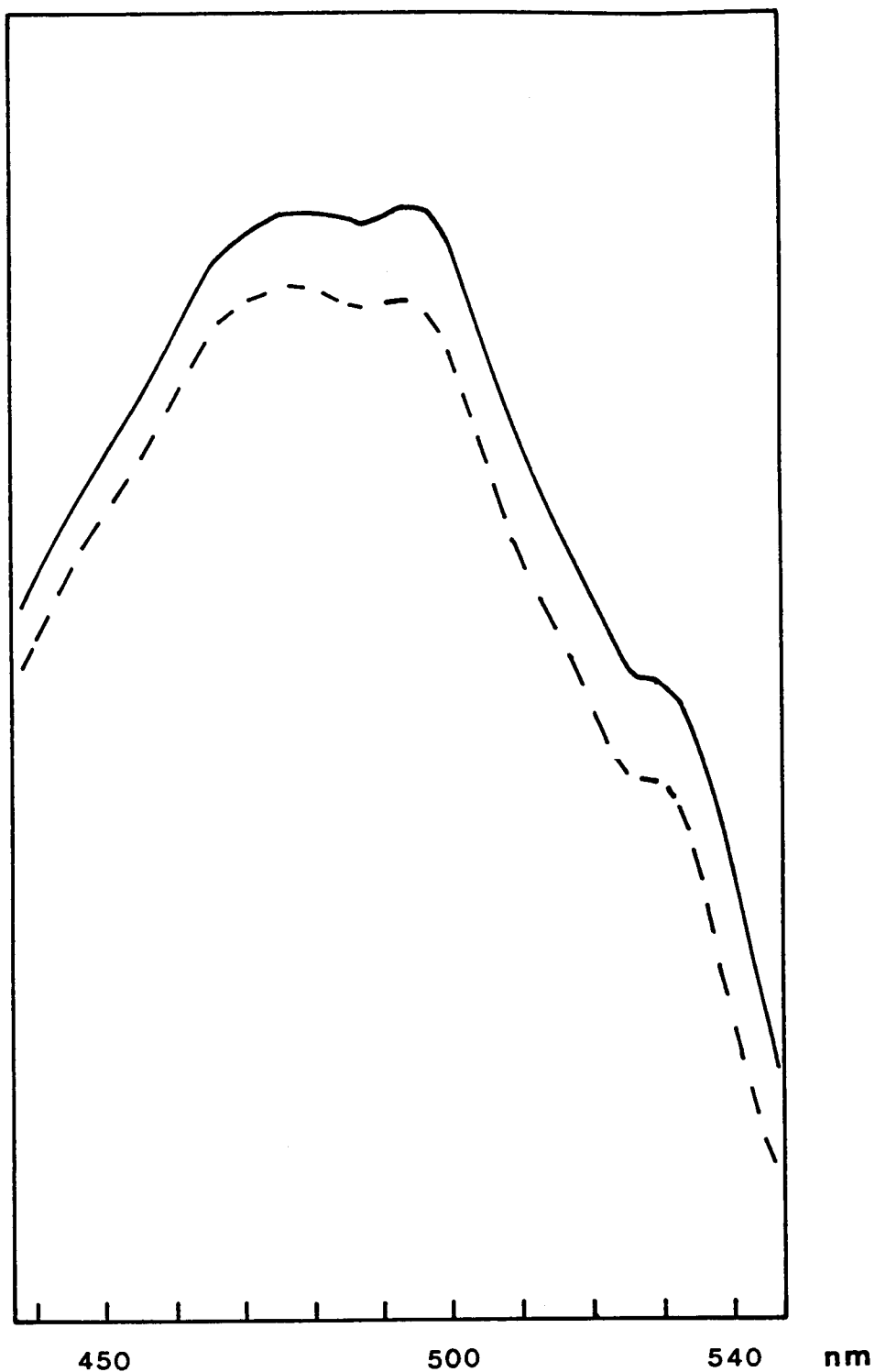


Figure 34

Spectre visible de l'aglycone du conjugué lactityl-DNR en solution dans le chloroforme. L'aglycone est préparée par hydrolyse acide du conjugué purifié et extraction par CHCl_3 comme décrit dans le texte. Témoin : daunomycinone (---).

Les propriétés d'absorption de la lumière du conjugué synthétisé nous ont permis de doser le produit en solution contre une gamme de DNR. Le rendement de la réaction de condensation du lactose sur la DNR est voisin de 10 % de la DNR introduite dans le milieu réactionnel retrouvée sous forme conjuguée. Il est vraisemblable que l'hydrophobie de la daunomycine gène la condensation de la daunosamine avec une molécule très hydrophile comme le lactose. En effet, la condensation du lactose avec un composé plus hydrophile comme le glycolle (cf. Matériel et Méthodes, § 2.2.4) conduit à des rendements nettement supérieurs. A l'inverse, la condensation du lactose sur la leucyl-daunorubicine, composé plus hydrophobe que la DNR donne des rendements de l'ordre de 1 à 2 %.

2.1.2.2 - Spectroscopie d'émission (fluorescence)

Le spectre de fluorescence du conjugué du lactose à la DNR, déterminé après migration en chromatographie sur couche mince, à l'aide du microfluorimètre LASER est superposable à celui de la DNR (Fig. 35), avec un maximum d'émission à 592 nm ($\lambda_{exc} = 488$ nm). CALENDI et coll. (48) ont démontré que la DNR présente un spectre de fluorescence typique avec un maximum d'émission à 580 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et que les dérivés modifiés au niveau de la copule amino-sucre de la DNR, comme la N-acétyldaunomycine présentent le même comportement.

2.1.2.3 - Identification du galactose dans le produit de condensation de la DNR au lactose

2.1.2.3.1 - Hydrolyse acide

Afin d'établir que le produit isolé après condensation du lactose sur la DNR correspond bien à un conjugué lactityl-DNR, nous avons procédé à l'identification du galactose après

INTENSITE
DE
FLUORESCENCE

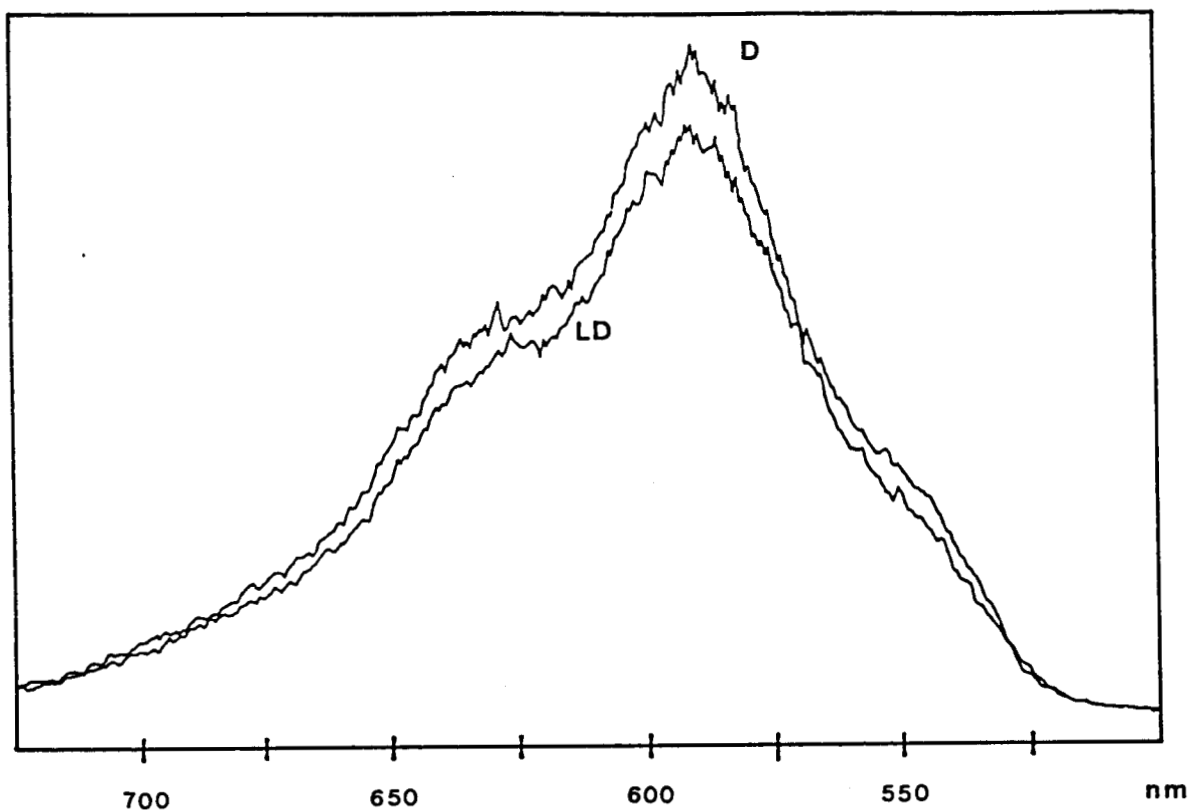


Figure 35 Spectre d'émission de fluorescence de la daunorubicine (D) et du conjugué lactyl-daunorubicine (LD) après migration en TLC, solvant : chloroforme/méthanol/eau : 80 : 30 : 3.
Microfluorimètre LASER à détection multicanale,
 λ exc = 488 nm, puissance laser : 2 μ w.

hydrolyse acide du conjugué. Le résidu de glucose de la molécule étant impliqué, selon le principe de la réaction, dans une liaison de type amine secondaire avec la daunosamine, ne peut être libéré dans les conditions d'hydrolyse employées. Après hydrolyse du conjugué par l'acide trifluoroacétique 4 N, l'identification du galactose a été effectuée par chromatographie sur couche mince qui a permis de mettre en évidence le galactose dans l'hydrolysât provenant du produit de la condensation du lactose avec la DNR, l'hydrolyse de la DNR dans les mêmes conditions ne révélant pas de tâche au niveau du galactose et l'hydrolyse du lactose conduisant à un mélange équimolaire de galactose et de glucose. La présence de galactose a également été démontrée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation.

2.1.2.3.2 - Hydrolyse enzymatique

Lorsque le conjugué de la DNR au lactose est soumis à l'action séquentielle d'une galactosidase et d'une glucosidase puis analysé en fluorescence au microfluorimètre LASER après migration en chromatographie sur couche mince, on observe après l'action de la galactosidase l'apparition d'un composé fluorescent de migration intermédiaire entre celle du conjugué non hydrolysé et de la DNR (Fig. 36). L'action de la galactosidase sur le lactityl-DNR conduit donc à un conjugué moins polaire, ce qui traduit l'hydrolyse de la liaison galactose-glucose du lactose. Ce conjugué dégalactosylé résiste au traitement par la glucosidase. Ce composé obtenu par hydrolyse de la liaison Gal β 1,4 Glc correspondrait donc au dérivé glucityl-DNR, résistant à l'action de la glucosidase, la liaison amine secondaire créée entre le glucose et la daunosamine ne pouvant être hydrolysée par l'enzyme.

L'action in vitro d'une fraction lysosomique de foie de Rat dans les conditions décrites au chapitre Matériel et Méthodes, § 2.3.5, montre l'apparition de ce même dérivé

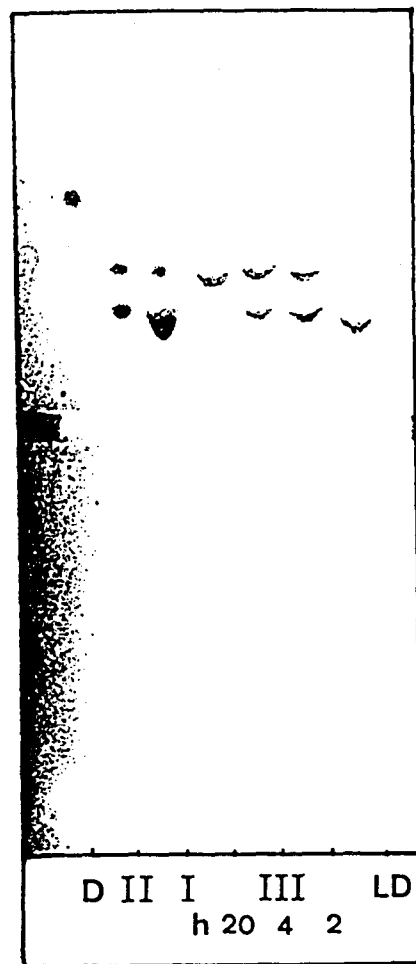


Figure 36 Etude par chromatographie sur couche mince (solvant : butanol/acide acétique/eau : 2 : 1 : 1) de l'hydrolyse enzymatique du conjugué Lactityl-DNR

- D = DNR
- LD = Lactityl-DNR
- I = action d'une galactosidase (1h) sur le Lactityl-DNR
- II = action d'une galactosidase (1h) puis d'une glucosidase (6h) sur le Lactityl-DNR
- III = action d'une fraction lysosomique de foie de Rat sur le Lactityl-DNR comme décrit au chapitre Matériel et Méthodes, § 2.3.5 : 2h, 4h et 20h d'hydrolyse.

glucityl-DNR dès la 2ème heure d'hydrolyse (premier point de la cinétique) et la disparition complète du conjugué lactityl-DNR après 20 heures d'hydrolyse (Fig. 36). L'action des enzymes lysosomiques de foie de Rat sur le conjugué de la DNR au lactose conduit, in vitro, à un dérivé de la DNR, plus polaire que celle-ci, identique au composé obtenu par action d'une galactosidase et correspondant vraisemblablement au dérivé N-alkylé de la DNR dans lequel la fonction amine de la daunosamine est liée au polyol provenant du glucose (glucitol). Le métabolisme des dérivés N-alkylés de la DNR est discuté dans un § ultérieur.

2.2 - Préparation de conjugués de la DNR à des glycanes de l'orosomucoïde désialylé

Après avoir mis au point la technique de couplage direct du lactose sur la DNR et démontré que le conjugué obtenu résultait bien de la condensation du lactose sur la DNR, nos efforts se sont portés sur la synthèse de conjugués de la DNR et de glycanes désialylés de structure tri- et tétraantennée préparés par hydrazinolyse de l'orosomucoïde humain désialylé.

La condensation des glycanes sur la DNR a été effectuée après oxydation périodique du glycol qui constituent les carbones 5 et 6 de la N-acétylglucosamine libérée de l'asparagine lors de l'hydrazinolyse, dans les conditions décrites au chapitre Matériel et Méthodes, § 2.2. La cinétique de la réaction de condensation, étudiée par chromatographie sur couche mince comme indiqué précédemment, montre l'apparition d'un spot de coloration rouge ne migrant pas dans le système solvant utilisé, moins intense que dans le cas du lactityl-DNR, notons que les glycanes ne migrent pas dans ces conditions de chromatographie (Fig. 37). Le mélange réactionnel a ensuite été purifié par chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel P₂, la fraction glycanique repérée par révélation à l'orcinoïde sulfurique ou par comptage de radioactivité (une fraction de

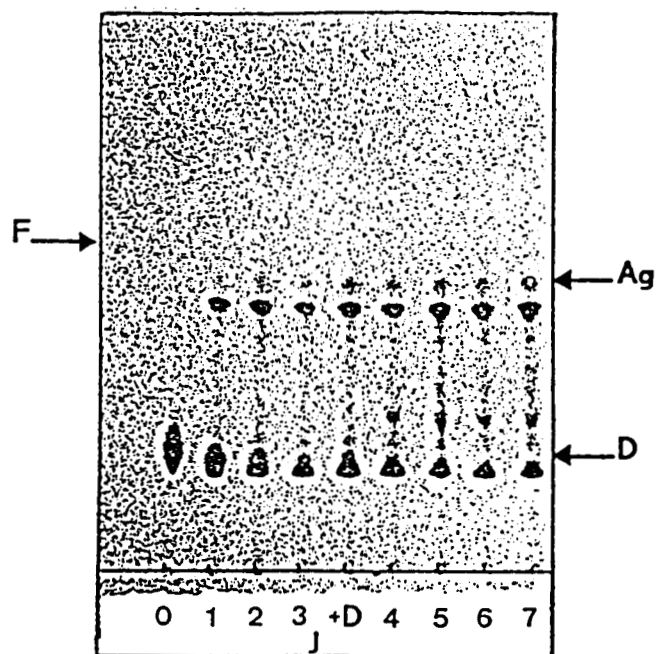


Figure 37 Etude par chromatographie sur couche mince (cf. figures 30 - 31) de la cinétique de couplage d'asialoglycannes de l'orosomucoïde, sur la DNR. La DNR est incubée en présence de glycannes oxydés par le periodate dans les conditions décrites au chapitre "Matériel et Méthodes" § 2.2.

glycannes marqués ayant été introduite lors du couplage avec la DNR) est colorée en rouge, signant la présence de DNR. Le caractère hydrophobe du support de chromatographie utilisé (acrylamide) permet d'exclure la contamination des glycannes par de la DNR libre, celle-ci étant considérablement retardée sur ce support et ne pouvant être éluée qu'en modifiant le tampon de chromatographie. La recherche de contaminants de DNR libre, après migration en chromatographie sur couche mince de la fraction glycanne, à l'aide du microfluorimètre LASER confirme la pureté du produit.

La fraction recueillie étant constituée d'un mélange de glycannes libres et de glycannes conjugués à la DNR, nous avons tenté de l'enrichir en glycannes conjugués en purifiant le mélange par chromatographie sur support hydrophobe comme indiqué au chapitre Matériel et Méthodes, § 2.2.3, en tirant parti du caractère hydrophobe de la DNR qui modifierait le comportement des glycannes conjugués par rapport aux glycannes libres sur ce type de support. L'élué de la colonne de Phényl Sépharose montre un premier pic repéré par l'orcinol sulfurique ou par comptage de radioactivité, non coloré après purification par "gel-filtration" et lyophilisation. Un second pic retardé, élué de la colonne et révélé dans les mêmes conditions est coloré en rouge après purification et lyophilisation. Ce pic représente environ 1 % de la radioactivité totale introduite lors de la réaction de couplage sous forme de glycannes marqués, ce qui coïncide avec le rendement calculé par dosage de l'aglycone libérée par hydrolyse acide du conjugué et extraction au chloroforme.

Le rendement de la réaction de condensation de la DNR sur les glycannes est inférieur à celui obtenu avec le lactose. Ceci est vraisemblablement lié, comme dans le cas du lactose, au caractère hydrophobe de la DNR, aggravé ici par l'encombrement stérique des glycannes qui gêne la réaction de condensation.

Le conjugué obtenu a été analysé en spectroscopie visible et d'émission afin d'identifier la copule daunomycinone du conjugué. La figure 38 présente le spectre d'absorption visible de ce conjugué : ce spectre montre les maxima d'absorption caractéristiques de la daunorubicine ($\lambda_{\text{max}} = 482, 499, 536 \text{ nm}$). De même, le spectre de l'aglycone obtenue par hydrolyse par HCl 0,5 N du conjugué et extraction par le chloroforme (Fig. 39) montre que l'aglycone obtenue dans ces conditions présente un spectre similaire à celui de la daunomycinone en solution dans le chloroforme. L'analyse du spectre de fluorescence du conjugué de la DNR aux glycanes, (Fig. 40) obtenu à l'aide du microfluorimètre LASER, montre que le spectre d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) est tout à fait superposable à celui de la DNR. Ces résultats sont en faveur d'un conjugué de DNR-asialoglycanes de l'orosomucoïde, ces derniers étant identifiés dans le produit de condensation par révélation des oses (orcinol sulfurique) et par comptage de radioactivité.

2.3 - Autres conjugués synthétisés

Outre des conjugués du lactose et de glycanes à la DNR, nos travaux nous ont également amenés à synthétiser des conjugués de ces mêmes oligosaccharides à la leucyl-daunorubicine. La figure 41 montre le comportement de la leucyl-DNR (Leu-DNR) dans les conditions de la réaction de condensation (Fig. 41 a) et la cinétique du couplage du lactose sur la Leu-DNR (Fig. 41 b). Le spot qui apparaît au point de dépôt, identifié précédemment au produit de condensation, est beaucoup moins intense que dans le cas de la DNR. En effet, le rendement de la réaction est nettement inférieur dans le cas de la Leu-DNR que dans le cas de la DNR. De même, l'apparition d'un produit migrant en chromatographie sur couche mince comme la DNR, révèle l'instabilité de la Leu-DNR dans nos conditions de réaction, le produit de couplage obtenu dans ce cas pouvant être un mélange de conjugués de Leu-DNR et de DNR (séparés en chromatographie sur papier). Ces résultats nous ont amené à utiliser les conjugués lactityl-DNR et glycanes-DNR pour les expériences sur les

D.O.

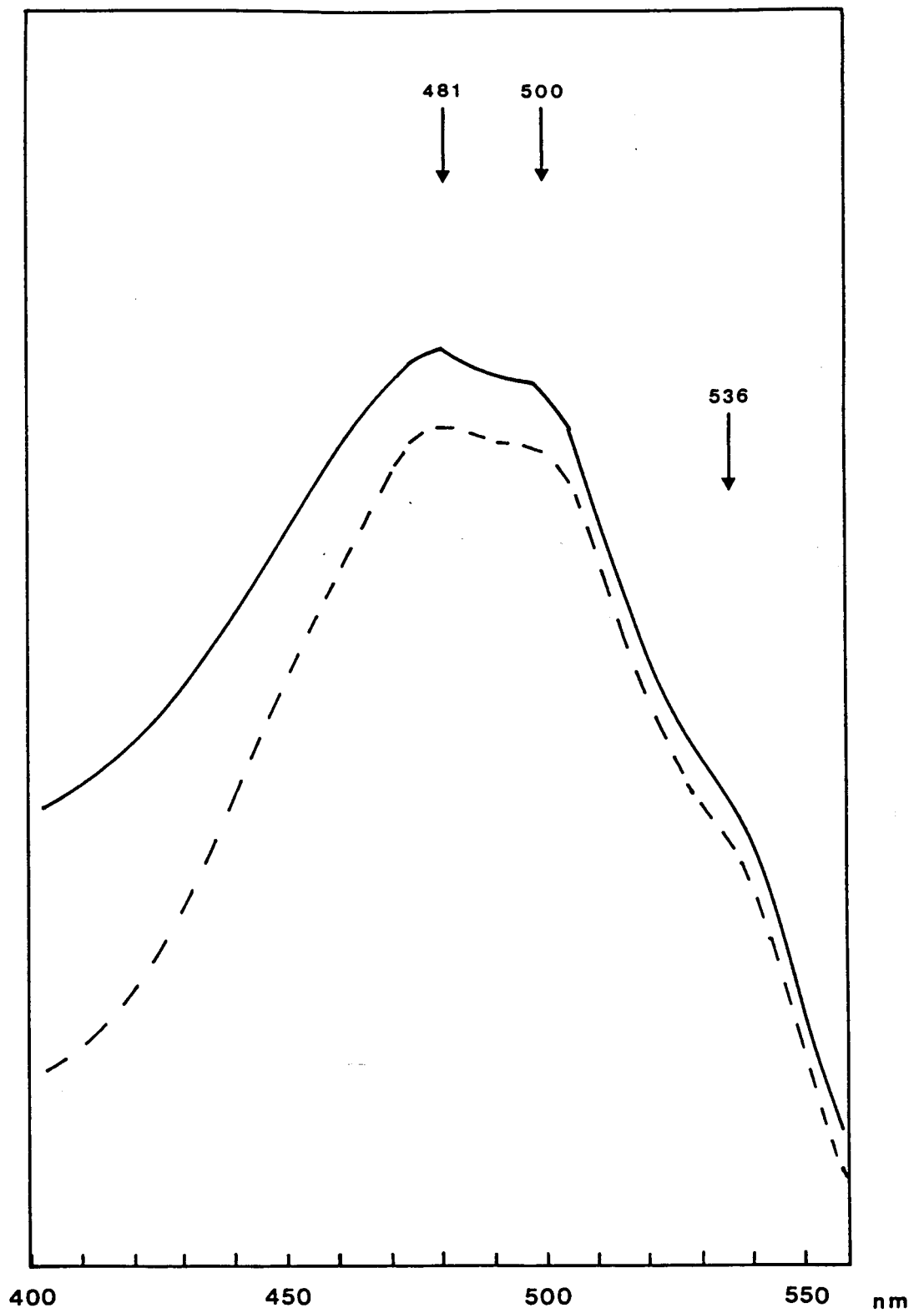


Figure 38 Spectre visible du conjugué de la DNR aux asialoglycannes de l'orosomucoïde, en solution dans l'eau. Témoin : DNR (---).

D.O.

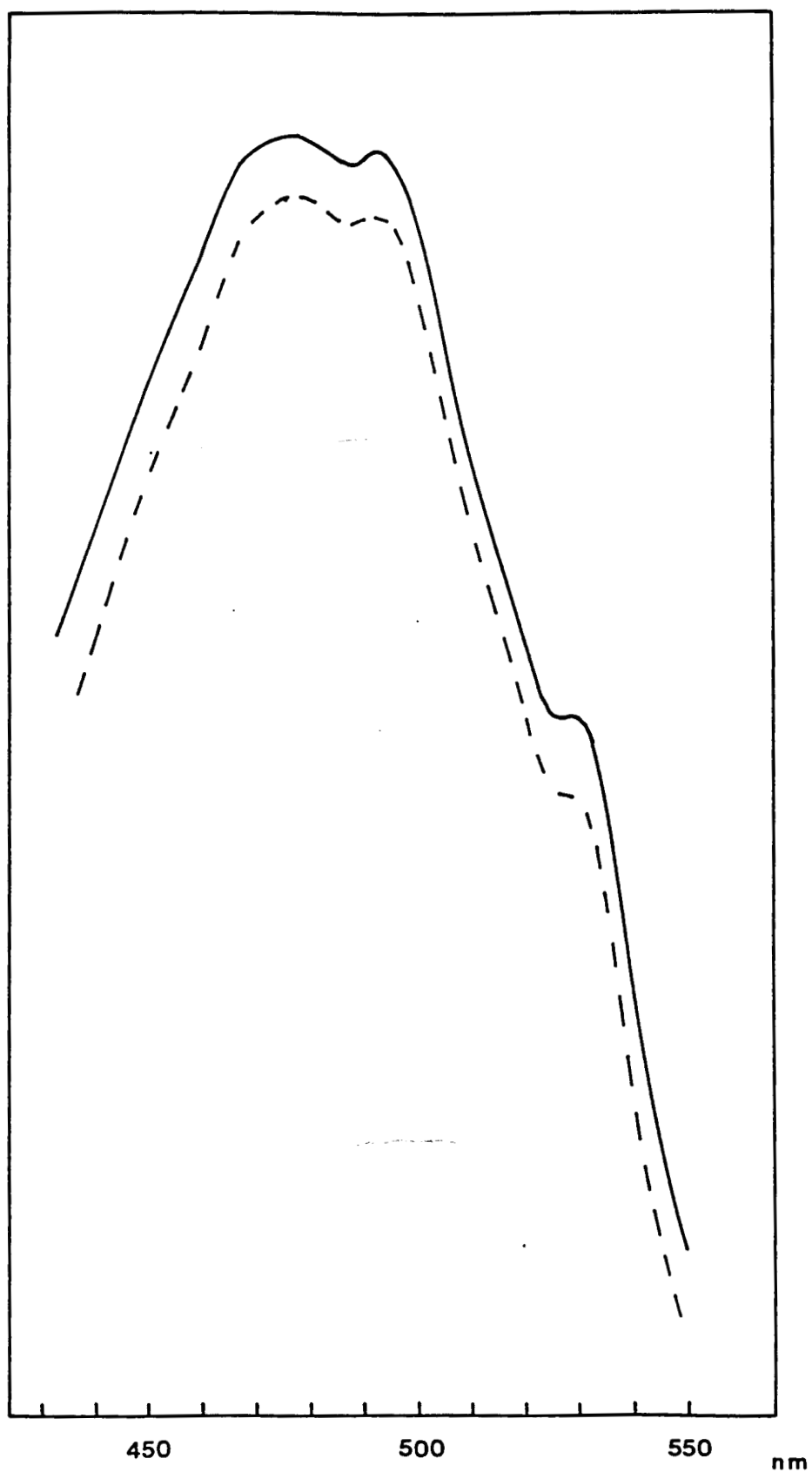


Figure 39 Spectre visible de l'aglycone du conjugué glycanne-DNR en solution dans le chloroforme, préparée par hydrolyse acide du conjugué et extraction par CHCl_3 .
Témoin : daunomycinone (---).

INTENSITE
DE
FLUORESCENCE

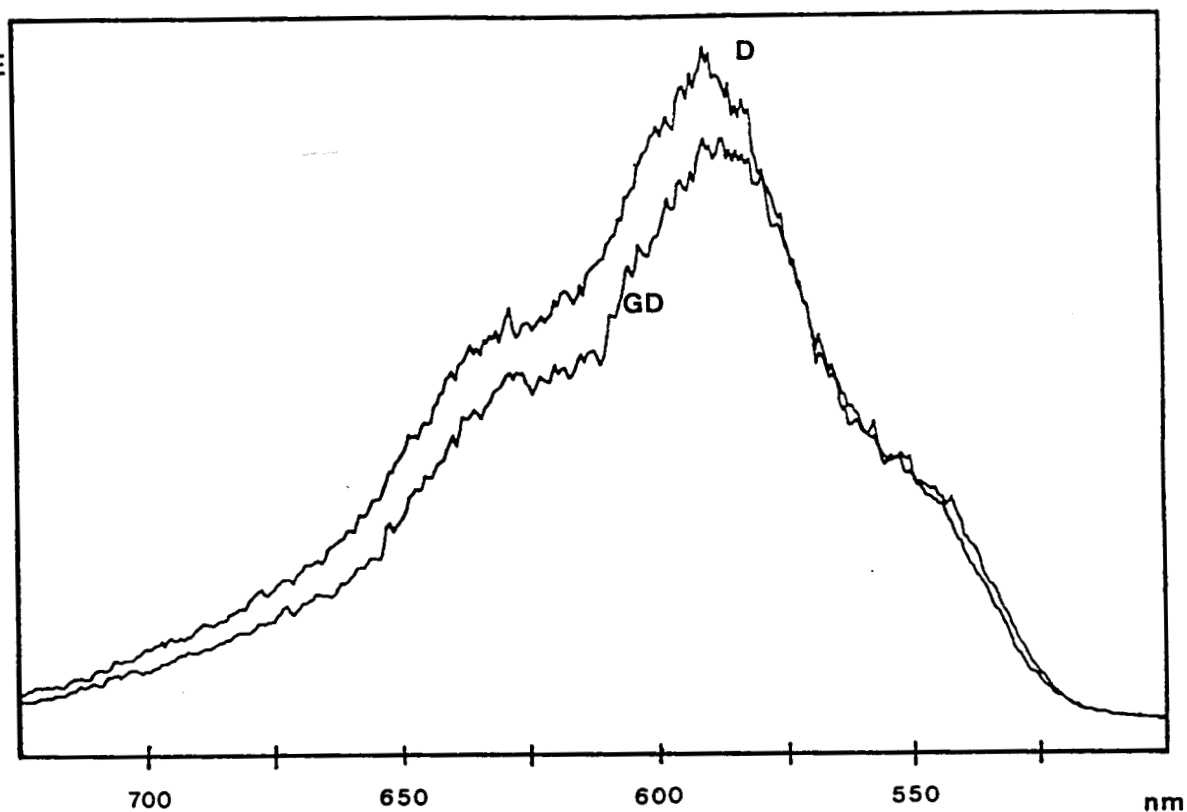
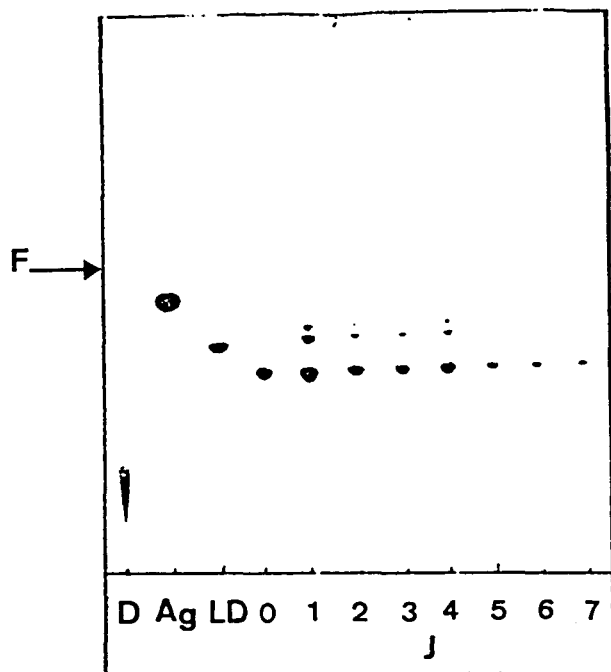
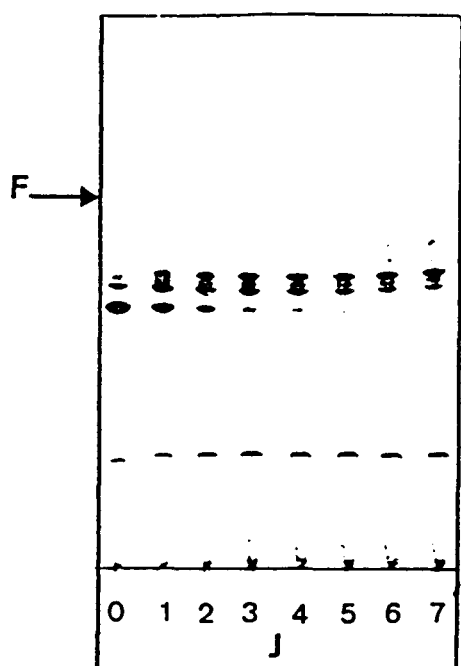


Figure 40 Spectre d'émission de fluorescence de la daunorubicine (D) et de son conjugué aux asialoglycannes de l'orosomucoïde (GD) après migration en TLC, solvant chloroforme/méthanol/eau : 80 : 30 : 3. Microfluorimètre LASER, détection multicanale, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, puissance LASER : $2 \mu\text{w}$.



A



B

Figure 41

Etude par chromatographie sur couche mince (solvant : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$: 80 : 30 : 3) du comportement de la leucyl-DNR dans les conditions de la réaction de couplage (A) et de la cinétique de couplage de la Leu-DNR sur le lactose (B) :

D = DNR
 Ag = Aglycone
 LD = leucyl DNR
 Jo = Témoin
 F = front du solvant

cellules, l'instabilité de la Leu-DNR dans nos conditions expérimentales et les faibles rendements des réactions de condensation ne nous ayant pas permis de synthétiser des quantités suffisantes de conjugué pour ces expériences.

Les travaux qui ont été effectués nous ont permis de synthétiser des quantités non négligeables d'un conjugué de lactose et de DNR exempt de contamination par de la DNR libre. L'étude de la composition de ce conjugué, par analyse des spectres UV-visible et par hydrolyse acide ou enzymatique, montre qu'il est constitué d'une aglycone ayant conservé les propriétés spectrales de la daunomycine et d'une copule glucidique libérant du galactose par hydrolyse acide ou enzymatique. L'hydrolyse enzymatique par une galactosidase libère un conjugué résistant à l'action de la glucosidase, le glucose étant impliqué dans une liaison amine secondaire avec la daunosamine non hydrolysable par cette enzyme. L'action in vitro des enzymes lysosomiques sur ce conjugué libère un composé identique à celui qui est obtenu par l'action de la galactosidase, s'agissant vraisemblablement du composé glucityl-DNR.

Les premiers travaux visant à élucider les relations structure activité de la molécule de DNR avaient montré que le groupement aminé libre de la daunosamine était essentiel pour l'action antitumorale [ARCAMONE (6)]. Cependant, certains dérivés N-substitués de la daunorubicine comme le composé N-trifluoroacétylé présentent une activité antitumorale significative, bien qu'à une dose supérieure au dérivé non-substitué [ISRAEL et coll. (156)]. LEWIS et coll. (175) ont démontré que le groupement aminé libre de l'adriamycine était le site responsable de la fixation de ce composé à l'actine, occasionnant ainsi les effets cardiotoxiques. Le blocage de la fonction amine permettrait ainsi d'obtenir de nouveaux dérivés qui auraient un meilleur index thérapeutique et une cardiotoxicité réduite, la leucyl-DNR dans laquelle la fonction amine de la DNR est engagée dans une liaison amide avec la

leucine en est un exemple. De même, HORTON et coll. (153) ont montré que la présence de la fonction amine 3' d'une anthracycline n'est pas indispensable pour la manifestation de son activité biologique. C'est ainsi que les dérivés 3'-déamino, 3'-hydroxy-DNR et 3'-déamino, 3', 4'-di-O-acétyl-DNR exercent une activité antitumorale avec une cardiotoxicité moindre que l'adriamycine [ANNE et coll. (5)].

La dialkylation du groupement aminé de la DNR et de la DXR a donné naissance à une série d'anthracyclines présentant des propriétés intéressantes [TONG et coll. (294), ACTON (1)]. Ces dérivés ont été obtenus par alkylation réductrice avec le cyanoborohydrure, par condensation avec différents aldéhydes et cétones. Ce type de substitution superpose le métabolisme du groupement N-alkyle au métabolisme des anthracyclines elles-mêmes. D'une manière générale, le métabolisme d'un groupement N-alkyle s'effectue par une hydroxylation enzymatique du carbone α qui conduit à la coupure hydrolytique de la liaison N-C [ACTON (2)]. Dans le cas des dérivés N,N-diméthylés de la DNR et de la DXR, les groupements N-alkyle et leurs produits de clivage métabolique n'altèrent pas les propriétés de la molécule d'anthracycline. En revanche, dans le cas du dérivé N,N-dibenzylé de la DNR (Fig. 42), le clivage métabolique semble représenter une étape d'activation cruciale de la molécule. Ce conjugué présente une efficacité très importante contre les tumeurs bien qu'à une dose supérieure à la DXR ; Il s'est avéré également plus actif vis-à-vis de tumeurs mammaires ou coliques chez la Souris, suggérant un spectre d'activité modifié ou élargi, ce qui représente un intérêt certain. Ce dérivé n'est pas mutagène in vitro et ne se lie pas à l'ADN.

Des études métaboliques chez le Rat ont montré que le N,N-dibenzyl DNR est une molécule inactive qui nécessite une activation métabolique in vivo : l'activité de ce composé disparaît quand on passe du dérivé monobenzylé au dérivé dibenzylé, celle-ci est restaurée par le clivage in vivo d'au moins un groupement N-benzyle [PETERS et coll. (225)].

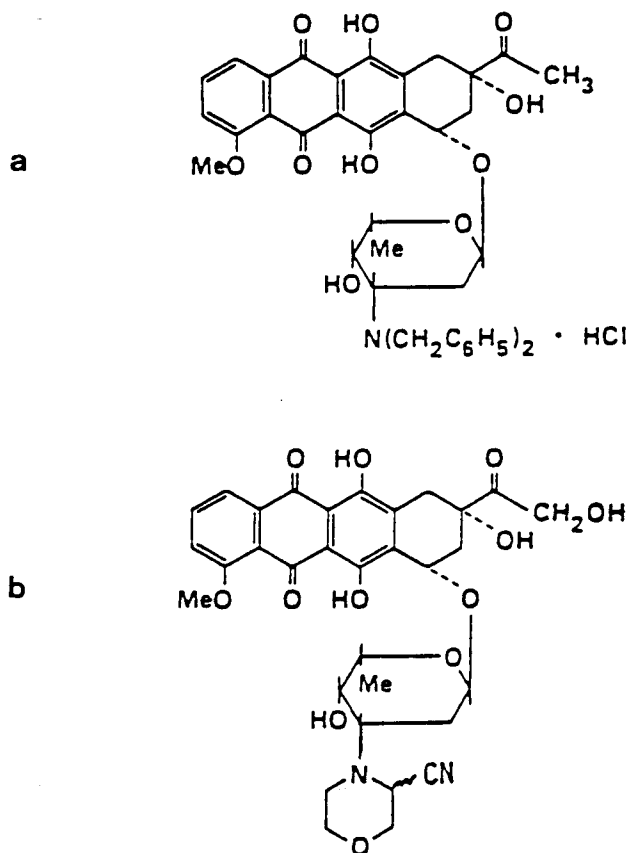


Figure 42 Formules de dérivés N - alkylés de la DNR et de la DXR :

a : N, N - dibenzyl-DNR, chlorhydrate (B2D)

b : 3' - deamino - 3'-(3 - cyano - 4 - morpholinyl)
- DXR (MRA - CN)

L'efficacité de ce clivage métabolique et donc de l'activation ainsi que l'accumulation de ce produit est variable selon les tissus, suggérant une sélectivité d'action de ce dérivé différente de celle de la DNR. Notons également que la dose cumulée de dibenzyl-DNR nécessaire pour provoquer des altérations de l'ECG évoquant la cardiotoxicité des anthracyclines est au moins 35 - 40 fois supérieure aux doses de DXR provoquant ces effets et que ces altérations sont réversibles, à la différence des altérations observées avec la DXR. Le dibenzyl-DNR représente donc une prodrogue lipophile nécessitant des doses supérieures à la DXR mais présentant une efficacité supérieure vis à vis de la leucémie de Souris, un spectre d'activité modifié chez la Souris et une absence de cardiotoxicité chez le Rat.

La N N-dialkylation de la DXR et de la DNR a été étendue à la synthèse de dérivés N-alkylés cycliques par l'utilisation de dialdéhydes lors de la réaction d'alkylation réductive. Citons les pipéridinodérivés de la DXR et de la DNR (Fig. 42) dans lesquels la fonction amine de la DNR ou de la DXR est engagée dans un cycle pipéridine, qui constituent une famille de dérivés présentant un intérêt particulier par le fait qu'ils inhibent sélectivement la synthèse de l'ARN, comparée à celle de l'ADN, dans les cellules de leucémie L-1210 en culture [TONG et coll. (294)], constituant ainsi une 2ème classe d'anthracyclines présentant des effets secondaires différents et une toxicité réduite.

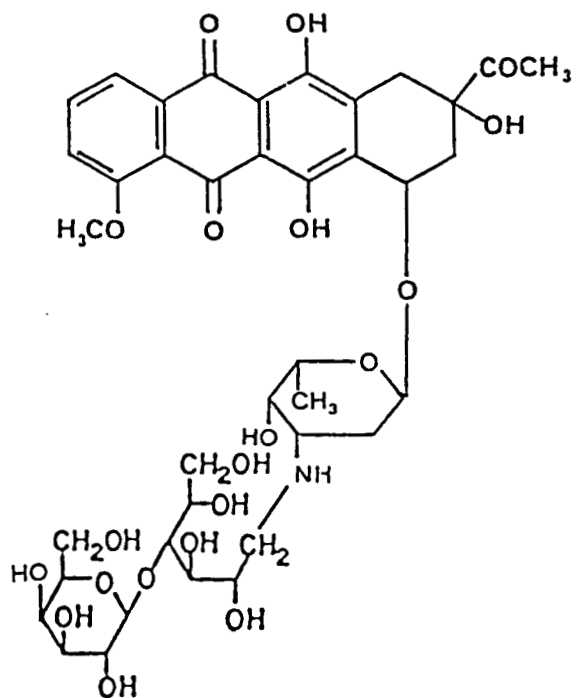
Les conjugués de la DNR au lactose, lactityl-DNR ou aux glycanes de l'orosomucoïde que nous avons synthétisés pourraient ainsi s'apparenter à ces dérivés N-alkylés de la DNR, leur catabolisme dans le lysosome décapant la copule glucidique ayant permis d'assurer la spécificité de cible et conduisant dans un premier temps à un dérivé N-alkylé de la DNR (glucityl-DNR) qui serait ensuite hydrolysé après hydroxylation du carbone α . Dans le cas du composé lactityl-DNR où il est à craindre que le résidu de galactose terminal seul ne suffise pas à assurer la spécificité pour le récepteur hépatique des ASGP, la copule

glucidique modifierait l'hydrophobie de la DNR et donc ses propriétés de transfert de membrane, conduisant à un dérivé dont le spectre d'action et éventuellement les effets secondaires seraient modifiés. A ce propos, signalons l'analogie structurale entre le lactityl-DNR dont la formule proposée est présentée à la figure 43 et l'aclacinomycine A (Fig. 43) : ces dérivés présentent une aglycone très hydrophobe liée O-glycosidiquement à une copule glucidique composée de 3 oses, le groupement aminé de l'aclacinomycine étant N-diméthylé.

L'aclacinomycine A ou aclarubicine (ACR), isolée de Streptomyces galilaeus [OKI et coll. (217)], présente une excellente activité antitumorale, comparable à celle de la DNR ou de l'ADR, une cardiotoxicité moindre que l'ADR (les altérations de l'ECG sont observées à des doses 10 fois supérieures et sont réversibles) et un effet inhibiteur sur la synthèse de l'ARN supérieur à celui de la DNR ou de l'ADR [TONE et coll. (293)]. OTA (220) a montré que l'ACR est très active vis à vis de la leucémie aigüe de l'adulte et qu'elle n'entraîne pas de résistance croisée avec la DNR et l'ADR. L'aclacinomycine A agit selon un mode d'action différent de ces dernières, la substitution du groupement aminé modifiant le mode de liaison ou d'intercalation de l'aglycone dans l'ADN [OKI (216)]. Les essais cliniques de l'ACR [OTA (220)] montrent que ses effets secondaires le plus fréquemment observés sont l'apparition de nausées et vomissements (30 %) et une suppression médullaire modérée. Une modification de l'ECG a été observée (7 %) sans apparition d'atteinte cardiaque chronique.

Les nombreux travaux concernant les analogues N-alkylés de la DNR ayant montré l'efficacité de ces dérivés, l'analogie structurale qui existe entre le conjugué lactityl-DNR et l'aclacinomycine, composé dont les propriétés sont très intéressantes et le fait que le lactityl-DNR présente le galactose en position terminale non réductrice nous ont conduit à étudier son action sur des cellules transformées présentant le récepteur des asialoglycoprotéines : les cellules HepG₂. L'étude

a



b

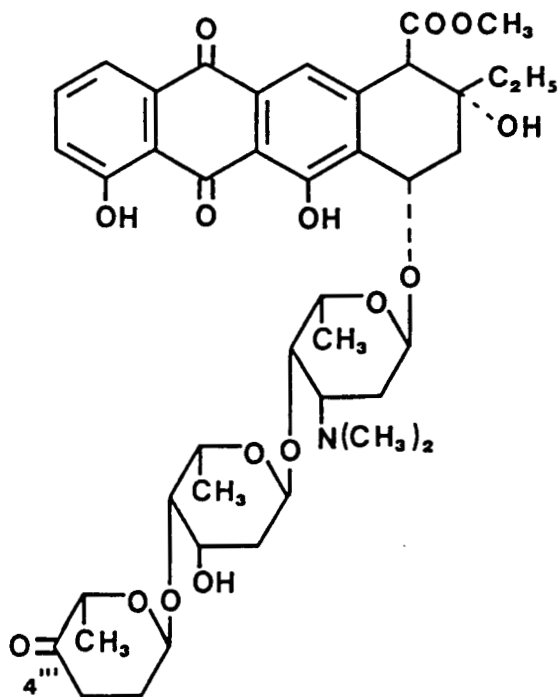


Figure 43

Formule proposée pour le conjugué de la DNR au lactose (a) et formule de l'aclacinomycine (ACLA ou ACL) (b).

de l'effet du lactityl-DNR, composé dont nous disposions de quantités suffisantes pour nos expérimentations sur ces cellules, nous a permis d'introduire au Laboratoire certaines techniques d'étude in vitro de la cytotoxicité de drogues anticancéreuses, le lactityl-DNR servant de modèle pour l'étude de conjugués de la DNR à des oligosaccharides complexes présentant une réelle affinité pour le récepteur des ASGP, permettant d'envisager un ciblage spécifique.

3 - ETUDE DE L'ACTIVITE DU CONJUGUE DE LA DNR AU LACTOSE SUR LES CELLULES HepG₂ : PENETRATION ET EFFETS CYTOTOXIQUES

3.1 - Vérification de l'intégrité du récepteur des ASGP des cellules HepG₂

Afin de s'assurer de la qualité du modèle cellulaire que nous avons introduit au Laboratoire dans le but d'expérimenter l'effet cytotoxique des conjugués de la DNR à des structures oligosaccharidiques présentant le galactose en position terminale non réductrice, nous avons reproduit les expériences de SCHWARTZ et coll. (249) pour la caractérisation du récepteur des ASGP des cellules Hep G₂. La cinétique d'incorporation à 37°C par les cellules de l'ASOR marqué à l'iode¹²⁵, étudiée dans les conditions décrites au chapitre Matériel et Méthodes, § 3.1, est présentée à la figure 44. La fixation de l'orosomucoïde natif utilisé comme témoin négatif d'incorporation peut être assimilée à la fixation non spécifique des substrats glycoprotéiques, bien que quelques résidus de galactose exposés sur la molécule d'orosomucoïde puissent entraîner une légère incorporation du ligand. Néanmoins, la capture de l'ASOR marqué à l'iode-125 est nettement supérieure (environ 25 fois) à la capture de l'orosomucoïde natif, ce qui confirme la présence du récepteur des ASGP dans nos conditions expérimentales. La capture de l'ASOR après 120 minutes

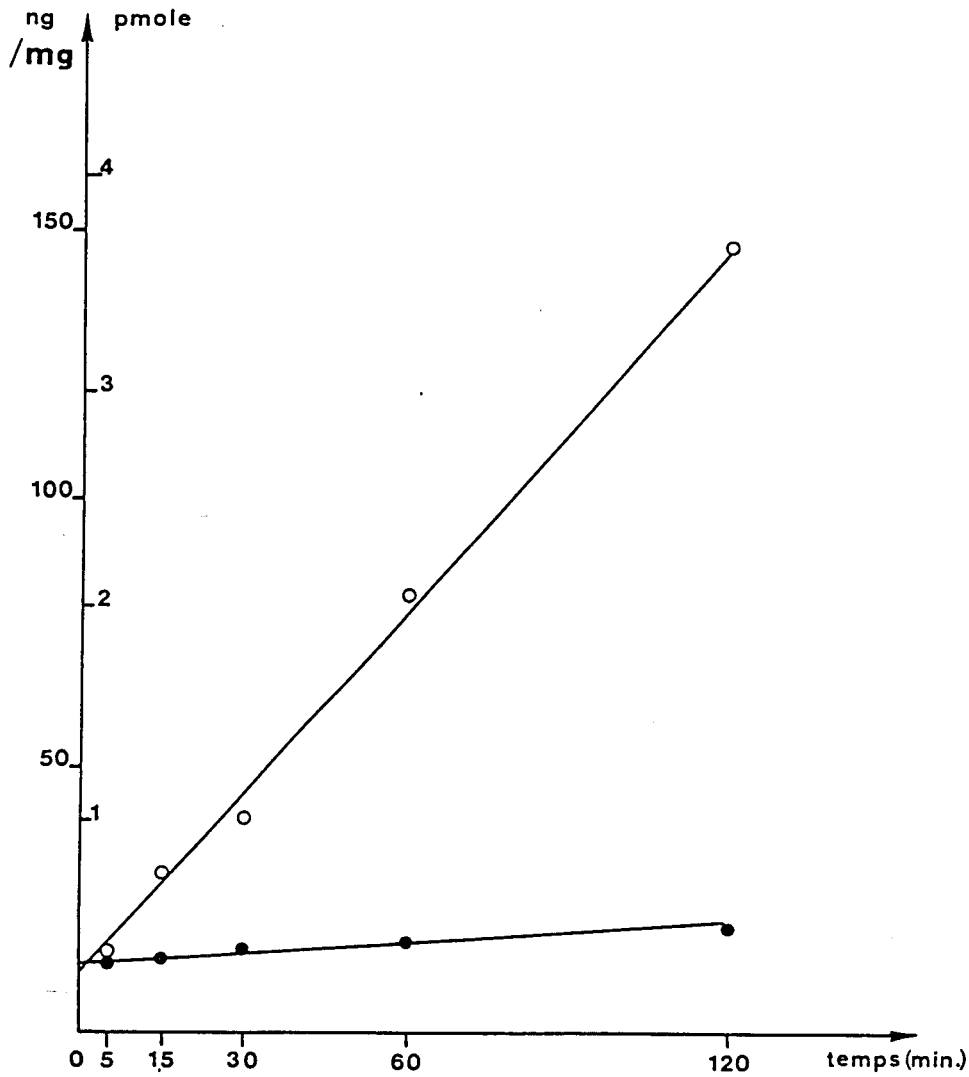


Figure 44

Cinétique de capture à 37° C de l' ^{125}I -ASOR (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) par les cellules Hep G2 (○—○), l'incorporation d' ^{125}I -orosomucoïde (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (●—●) est assimilée à la fixation non spécifique du substrat. Les cellules ont été incubées en présence des substrats et traitées comme indiqué au chapitre "Matériel et Méthodes", § 3.1.

d'incubation est voisine de 150 ng/mg de protéines, ce qui est en accord avec les données de SCHWARTZ et coll. (249).

Les expériences de fixation à 4°C de l'ASOR marqué à l'iode-125 par les cellules Hep G₂, effectuées avec la collaboration de D. DAMART, montrent que cette fixation est un phénomène saturable dans le temps (Fig. 45). La fixation spécifique de l'ASOR à 4°C, estimée par soustraction de la fixation non-spécifique de l'orosomucoïde à la fixation de l'ASOR est de 16,6 ng/mg de protéines, SCHWARTZ et coll. (249) ayant estimé cette fixation à 14,2 pg/μg de protéines.

Les expériences de capture de substrats présentant le galactose en position terminale ont été reproduites d'une manière régulière sur les cellules, afin de s'assurer qu'elles présentaient toujours le récepteur des ASGP, ce récepteur disparaissant de la surface cellulaire à mesure que les cellules sont repiquées (10 - 13 passages). Ces expériences sont également répétées à chaque décongélation de nouvelles cellules. SCHWARTZ et coll. (249) ont estimé à 150 000 le nombre de sites récepteurs de haute affinité par cellule, ce qui est inférieur au nombre de récepteurs présents sur les hépatocytes fraîchement isolés. Les auteurs proposent que cette différence est due à l'orientation des cellules en monocouche, les récepteurs présents sur la surface basolatérale de la cellule seraient inaccessibles à l'ASOR dans les conditions de la mesure.

La vérification de l'intégrité du récepteur des ASGP à la surface des cellules Hep G₂ introduites par nos soins au Laboratoire, nous a permis d'envisager l'étude de l'action des conjugués de la DNR que nous avons synthétisés sur ces cellules.

3.2 - Etude de l'incorporation du conjugué DNR-lactose par les cellules Hep G₂

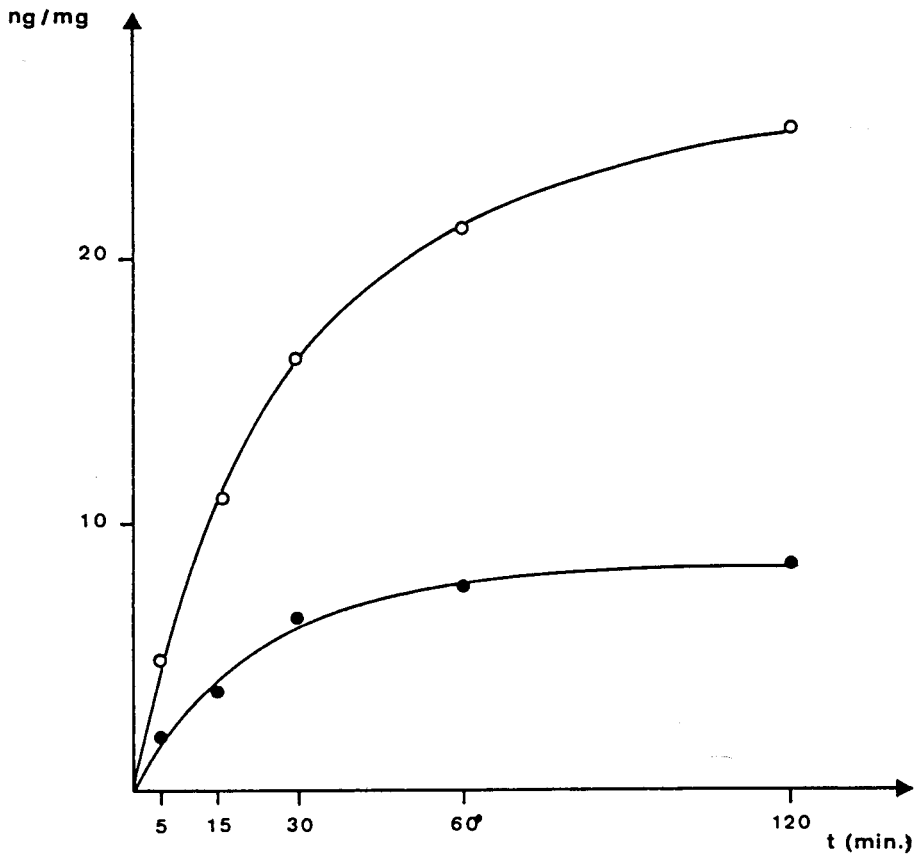


Figure 45 Cinétique de fixation à 4° C de l' ¹²⁵I-ASOR (2 µg/ml) ○—○ et de l' ¹²⁵I-orosomucoïde (2µg/ml) ●—●, par les cellules Hep G2.

3.2.1 - Visualisation et mise en évidence du conjugué lactityl-DNR dans le cytoplasme des cellules Hep G₂

L'utilisation du microfluorimètre LASER à détection multicanale nous a permis de détecter la copule fluorescente (daunomycinone) du conjugué de la DNR au lactose à l'intérieur des cellules Hep G₂. Après incubation des cellules avec le conjugué et lavage par le DME afin d'éliminer le conjugué libre, l'observation directe des cellules vivantes, non fixées, montre la pénétration intracellulaire du conjugué lactityl-DNR. Cette technique nous a permis d'établir que le composé pénètre au moins dans le cytoplasme dont le spectre de fluorescence diffère de celui du cytoplasme des cellules témoins non traitées. Le cytoplasme des cellules traitées par le lactityl-DNR présente une fluorescence très intense lorsque les cellules sont soumises à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm, mais dont l'intensité décroît rapidement. L'enregistrement du spectre de fluorescence n'a pu être obtenu qu'en utilisant le microfluorimètre à détection multicanale qui permet d'enregistrer le spectre en un temps très bref (1 seconde) : la même cellule irradiée pendant 25 secondes (50 accumulations de 0,5 seconde) donne un spectre identique mais dont l'intensité est diminuée d'un facteur 4. La figure 46 montre le spectre ainsi enregistré à l'intérieur d'une cellule (cytoplasme) de la lignée Hep G₂, incubée 2 heures à 37°C en présence de lactityl-DNR. Le spectre montre les maxima d'émission caractéristiques des anthracyclines ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{max} = 560, 590 \text{ nm}$) permettant d'établir la pénétration intracellulaire de la DNR (ou d'un dérivé) ajoutée au milieu d'incubation sous forme conjuguée au lactose. Notons que dans le cas où les cellules sont incubées avec la DNR, une fluorescence peut être mise en évidence, outre dans le cytoplasme, dans le noyau des cellules (Fig. 47).

3.2.2 - Visualisation du conjugué lactityl-DNR après lyse cellulaire

Afin de sensibiliser la technique de détection de la

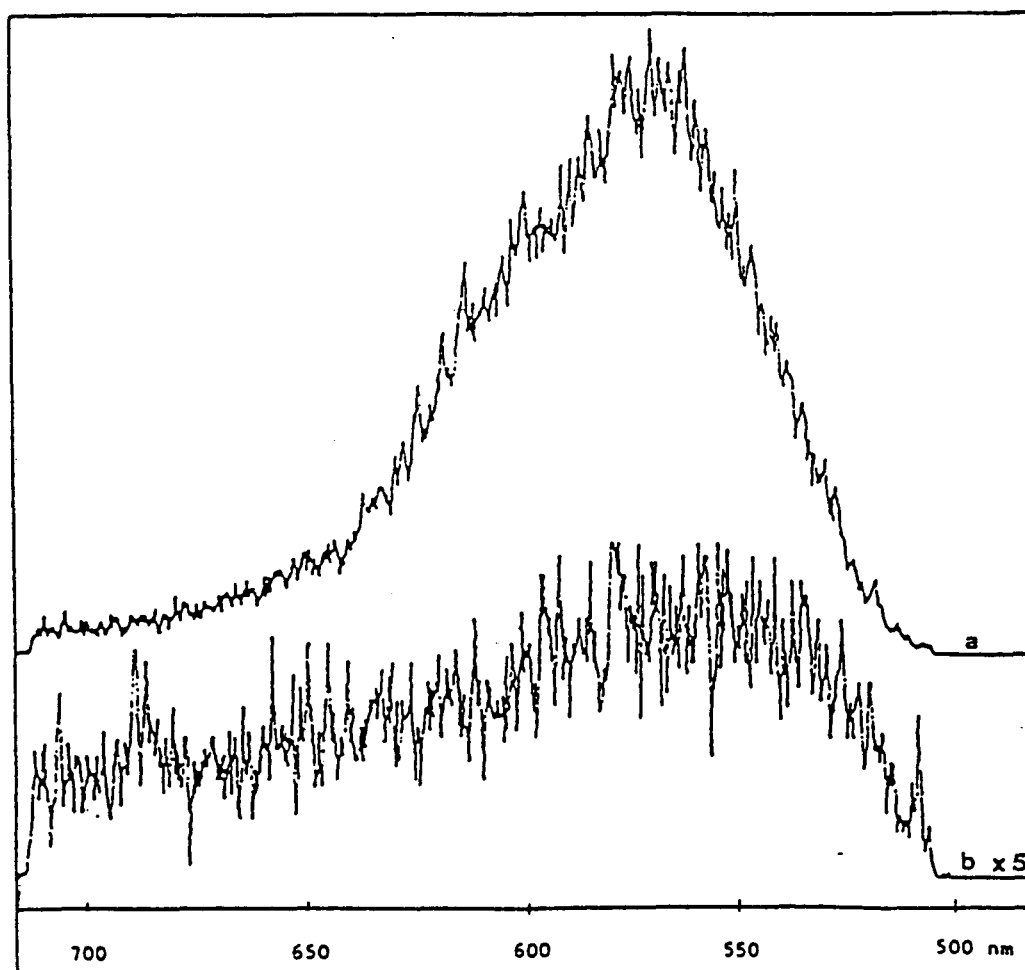


Figure 46 Spectres d'émission de fluorescence enregistrés au niveau du cytoplasme d'une cellule Hep G2 :

a : cellule incubée 2 h à 37° C en présence du conjugué lactityl-DNR ;

b : témoin : cellule non traitée.

Microfluorimètre à détection multicanale
 LASER, λ exc = 488 nm, puissance 135 μ w,
 temps d'acquisition des spectres : 1 seconde,
 objectif x 100 à immersion

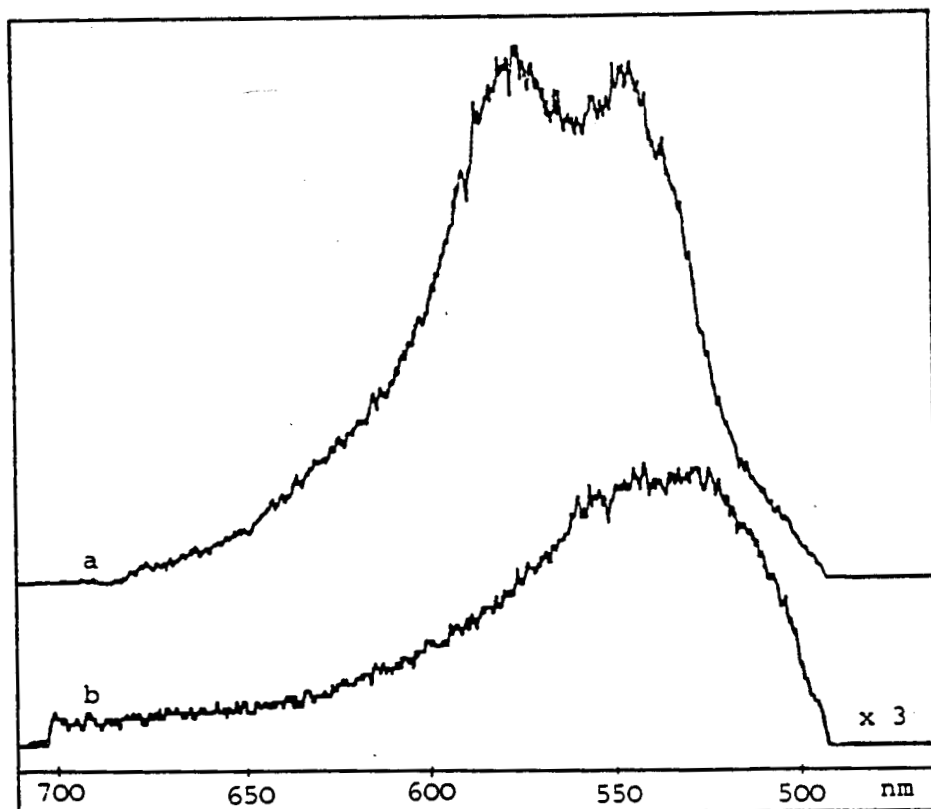


Figure 47 Spectres de fluorescence enregistrés au niveau du noyau d'une cellule Hep G2 :

a : cellule incubée 1h30 avec la daunorubicine
(4×10^{-7} M) ;

b : cellule témoin non traitée.

Microfluorimètre à détection multicanale
LASER, $\lambda_{exc} = 488$ nm, puissance $160 \mu\text{W}$,
temps d'acquisition des spectres : 12 secondes (a) et
30 secondes (b),
objectif x 100 à immersion

DNR dans les cellules, nous avons étudié la fluorescence de lysats cellulaires obtenus à partir de 10^6 cellules par action de HCl 0,3 N dans l'éthanol à 50 % (v/v). Dans ce cas, la fluorescence observée correspond à la fluorescence cellulaire totale sans distinction entre les différents compartiments. Cette technique nous a permis de mesurer l'intensité de la fluorescence associée à une quantité donnée de cellules incubées en présence de lactityl-DNR et d'étudier l'effet de l'incubation simultanée des cellules avec le lactityl-DNR et l'asialoorosomucoïde, introduit en large excès dans le milieu. La figure 48A montre le spectre de fluorescence du surnageant d'un lysat cellulaire obtenu à partir de cellules incubées 3 heures à 37°C en présence de lactityl-DNR et lavées abondamment afin d'éliminer le conjugué libre. Le culot de lyse n'est pratiquement pas fluorescent, le surnageant quant à lui présente une fluorescence intense, dont le spectre est très différent de celui du lysat témoin obtenu avec des cellules non traitées. Ce spectre est voisin de celui qui est obtenu avec les lysats de cellules incubées avec la DNR (Fig. 48B) et pourrait correspondre soit au produit lactityl-DNR intact, soit à son dérivé dégalactosylé comme décrit au chapitre Résultats et Discussion § 2.1.2.3.2, soit à la DNR elle-même.

Lorsque les cellules Hep G₂ sont incubées en présence de lactityl-DNR et d'un large excès (100 fois) d'asialoorosomucoïde, l'incorporation du conjugué, estimée par la mesure de l'intensité de fluorescence du lysat cellulaire est réduite de moitié, ce qui montre que l'incorporation de la DNR conjuguée au lactose peut être en partie inhibée par un ligand spécifique du récepteur des ASGP de la surface des cellules Hep G₂. Ce résultat est en faveur d'une interaction spécifique du conjugué lactityl-DNR avec le récepteur des ASGP des cellules Hep G₂ pour au moins une partie de son internalisation. La faible taille du ligand lactityl-DNR, associée à la faible spécificité du récepteur pour l'unique résidu de galactose présent sur le conjugué, ainsi que l'importance relative de la copule hydrophobe du conjugué lactityl-DNR, permettent d'expliquer que l'addition d'ASOR en excès ne permet pas d'inhiber totalement la pénétration

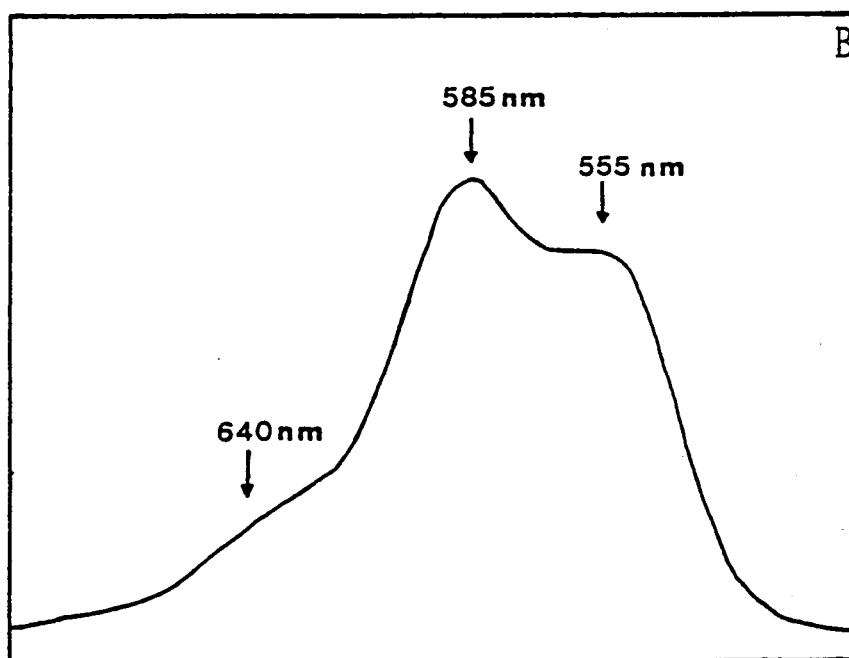
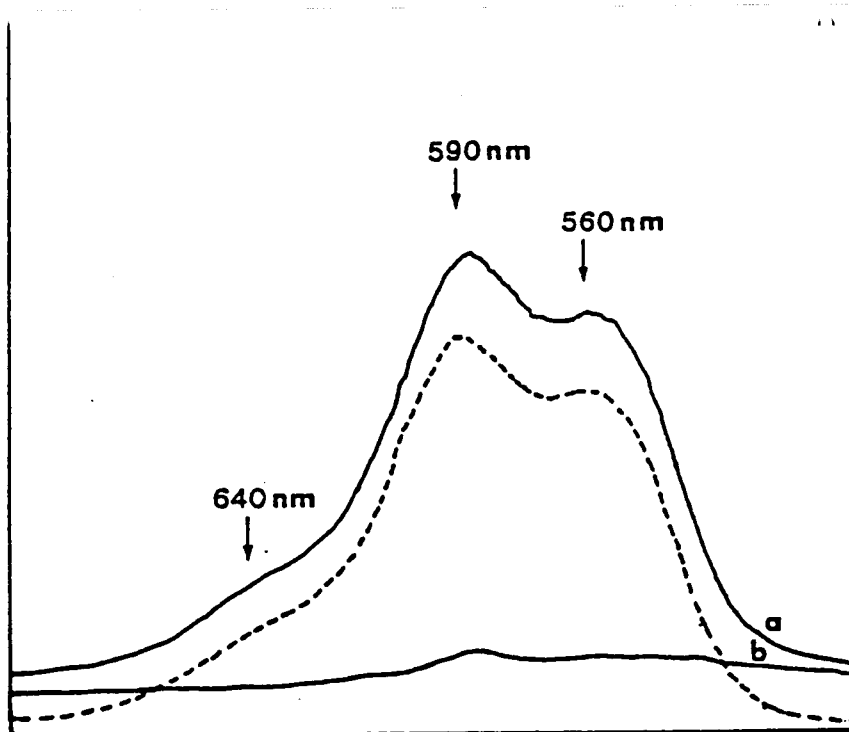


Figure 48 Spectres de fluorescence de surnageants de lyse par HCL 0,3 N - éthanol 50 % (v/v) de cellules Hep G2 :

A - a : cellules incubées 3 h à 37° C avec le conjugué lactyl - DNR ;

b : cellules témoin non traitées.

Le spectre en pointillés, obtenu par soustraction du témoin b au spectre a, représente le spectre du produit lui-même.

B - : cellules incubées pendant 3 heures à 37° C avec la DNR (1µg/ml).
Microsonde MOLE, $\bar{\lambda}$ exc = 488 nm,
temps d'acquisition des spectres : 1 minute 30.

du conjugué dans les cellules. La spécificité pour le récepteur des ASGP et l'endocytose du conjugué pourraient être favorisées par l'association en solution de plusieurs molécules de conjugué par interaction de leurs aglycones, l'auto-association des anthracyclines dans les solutions aqueuses ayant été établie par des études en spectroscopie UV-visible, en RMN du proton et par dichroïsme circulaire. Le mécanisme de cette association repose sur l'interaction entre les cycles aromatiques plans, selon un procédé nommé "stacking" basé sur l'interaction entre les systèmes électroniques π . Cette association est de nature hydrophobe, la formation de liaisons hydrogène et des effets dipolaires pouvant également y participer [BOUMA et coll. (42)].

La pénétration du conjugué lactityl-DNR dans les cellules Hep G₂ semble donc s'effectuer selon deux modes, l'un spécifique, pouvant être inhibé par l'incubation simultanée en présence d'ASOR, par interaction du résidu de galactose du conjugué avec le récepteur des ASGP de la membrane des cellules Hep G₂, l'autre non spécifique, par transfert passif du conjugué à travers la membrane selon un mécanisme voisin de la DNR, la copule glucidique du conjugué ne suffisant pas à empêcher cette pénétration.

Le mécanisme de transport des anthracyclines est controversé et SIEGFRIED et coll. (266) résumant les 3 modèles qui ont été proposés pour le transport de l'ADR : (1) un système appelé "fuite et pompe" mettant en jeu la diffusion de l'ADR à l'intérieur de la cellule et son élimination sélective par l'intermédiaire d'une pompe effluente ; (2) un système de diffusion facilitée via un transporteur ; (3) un système de diffusion passive, cette troisième hypothèse étant, selon les auteurs, la plus vraisemblable. En effet, DANO (66) a montré que la capture de la DNR est en relation linéaire avec la concentration et DALMARK et HOFFMAN (65), en étudiant l'effet de divers composés lipophiles sur le transport de l'ADR, ont établi que le transport de l'ADR dans les hématies humaines et dans les cellules d'ascite tumorale d'EHRlich met en oeuvre une diffusion

simple de FICK de la drogue à travers le domaine lipidique de la membrane cellulaire. De même, ZENEBERGH et coll. (351), étudiant la pharmacocinétique de l'aclacinomycine (cf. Résultats et Discussion, § 2 et Fig. 43) dans les cellules L-1210 ont montré que l'hydrophobie des anthracyclines influence la vitesse à laquelle ces composés pénètrent dans la cellule par perméation et donc leur concentration dans le cytosol. En 1985, BATES et coll. (31) ont montré en étudiant la capture de l'ADR par les cellules CHO que cette capture n'est pas saturable lorsque la concentration de l'ADR augmente, ce qui est en faveur du processus de diffusion passive.

Le devenir des anthracyclines après pénétration dans la cellule et leur localisation intracellulaire sont également bien documentés. Les anthracyclines sont trouvées, à l'intérieur de la cellule, associées uniquement aux lysosomes et à l'ADN du noyau dans les cultures de fibroblastes [NOEL et coll. (208)], dans les cellules L 1210 [ZENEBERGH et coll. (351)], dans les cellules d'ascite d'EHRlich, aussi bien que dans les cellules du myocarde de Rat. La localisation intracellulaire des anthracyclines est influencée quantitativement par l'équilibre entre leur pKa, leur constante de liaison à l'ADN et leur hydrophobie. Les résultats que nous présentons ici ne nous permettent pas de mettre en évidence la présence de DNR ou d'un dérivé dans le noyau, mais établissent la localisation intracytoplasmique du conjugué lactityl-DNR ou de ses produits de dégradation. Cette localisation est selon toute vraisemblance lysosomique où la copule glucidique serait décapée pour donner le dérivé glucityl-DNR qui par coupure de la liaison amine libèrerait la DNR susceptible de se lier à l'ADN du noyau. Une étude de la fluorescence intracellulaire effectuée avec des temps d'incubation plus longs et par des techniques de chasse, permettrait de confirmer cette hypothèse. L'étude de la localisation de la fluorescence après fractionnement cellulaire ou des catabolites intracellulaires du lactityl-DNR par HPLC, comme décrit par BAURAIN et coll. (33) pour la DNR, apporterait également des informations sur le devenir du lactityl-DNR et donc

sur son mode d'action. L'absence de fluorescence au niveau du noyau des cellules ne signifie pas que le composé synthétisé soit dénué d'activité. En effet, BATES et coll. (31) ont montré que la cytotoxicité de l'ADR sur les cellules CHO n'est pas corrélée avec la capture de l'ADR, dans le sens où la mort cellulaire est une fonction exponentielle du temps d'exposition à la drogue, bien avant que la concentration cellulaire en ADR n'ait atteint son maximum. Ces résultats suggèrent que l'ADR liée au noyau n'est pas directement responsable de la cytotoxicité de la drogue, tout comme les travaux de SIEGFRIED et coll. (267) qui ont constaté l'absence de corrélation entre l'inhibition de synthèse des acides nucléiques et la cytotoxicité de l'ADR dans les cellules de sarcome 180 et de TRITTON et YEE (296) qui ont montré que l'ADR peut exercer un effet cytotoxique sur les cellules sans pénétrer dans la cellule.

L'internalisation d'autres conjugués de la DNR à des structures oligosaccharidiques plus complexes que le lactityl-DNR par les cellules Hep G₂ a été analysée par cette technique. Ces dérivés préparés par F. DELPLACE - DELHAYE (77) sont des conjugués de la DNR à des glycopeptides de l'asialoorosomucoïde ou à l'ASOR lui-même, par l'intermédiaire d'un bras de couplage (cf. Généralités-§2 et Fig. 8). Au cours de ces expérimentations sur les cellules, le lactityl-DNR s'est avéré être le seul composé ayant donné des résultats nets par enregistrement direct du spectre de fluorescence dans une seule cellule et après lyse cellulaire. Par l'enregistrement du spectre de fluorescence du cytoplasme de cellules Hep G₂ incubées en présence de lactityl-DNR, nous avons pu déterminer que les cellules Hep G₂ incubées dans ces conditions présentent une accumulation d'un dérivé fluorescent dont les propriétés d'émission correspondent soit au lactityl-DNR, soit à un produit de catabolisme, soit au mélange de ces produits. L'inhibition d'une partie de cette pénétration par l'ASOR est en faveur d'un processus spécifique d'interaction avec le récepteur du galactose présent dans la lignée Hep G₂ régissant une partie de l'internalisation de ce conjugué, l'autre partie pénétrant selon un phénomène passif de simple diffusion.

Il est intéressant de noter que, afin de permettre la détection de la fluorescence dans les cellules, celles-ci ont été incubées avec des concentrations de conjugué relativement importantes ($3 \text{ à } 4 \times 10^{-6} \text{ M}$) en comparaison de l'affinité du récepteur des ASGP présent sur ces cellules ($K_d = 7 \times 10^{-9} \text{ M}$). Il est vraisemblable qu'à des concentrations massives de ligand, la pénétration passive de ce ligand de faible masse moléculaire est privilégiée par rapport à l'interaction spécifique avec le récepteur.

Afin de confirmer l'interaction spécifique du conjugué lactityl-DNR avec les cellules Hep G₂, il conviendrait d'étudier son internalisation à des concentrations beaucoup plus faibles (100 fois) et de poursuivre les expériences de compétition à 4°C et à 37°C, la détection de la fluorescence de la DNR devant dans ce cas être abandonnée au profit de techniques de détection de radioactivité, conditionnées par l'obtention d'une activité spécifique du marquage radioactif du conjugué très élevée.

Après avoir démontré que le lactityl-DNR était capable de pénétrer à l'intérieur des cellules Hep G₂, nos travaux se sont portés vers l'exploration de l'effet cytotoxique de ce conjugué sur les cellules Hep G₂ par les différentes techniques permettant la mise en évidence, in vitro, de l'effet cytotoxique et cytostatique d'une substance sur une lignée cellulaire.

3.3 - Etude de l'action cytotoxique des conjugués de la DNR aux oligosaccharides sur les cellules Hep G₂ par marquage cellulaire au ⁵¹Cr

La technique de marquage cellulaire au ⁵¹Cr permet de mesurer l'effet cytotoxique de composés ou plus généralement d'agents (cellules, anticorps, ...) entraînant une fuite des composants cellulaires, soit par lyse de la cellule, soit par modification de la perméabilité membranaire. Nous avons employé cette technique afin de rechercher un effet cytotoxique direct du

lactityl-DNR sur les cellules Hep G₂ par un mécanisme différent de celui de la DNR native. Au cours de ces expérimentations, nous nous sommes heurté à l'inconvénient majeur de cette technique, qui réside en un relargage spontané du marqueur par les cellules témoin relativement élevé, les écarts mesurés en présence des substances à tester devenant parfois difficilement interprétables. Les substances testées sont la DNR et le lactityl-DNR aux concentrations de 1, 5 et 10 µg/ml ainsi que la leucyl-DNR et un conjugué DNR-glycannes de l'ASOR aux concentrations de 1 et 5 µg/ml. Les résultats du relargage du ⁵¹Cr sous l'effet de la DNR et du lactityl-DNR, comparés au relargage spontané des cellules témoin, sont représentés dans la figure 49.

3.3.1 - Effets de la daunorubicine

Lorsque les cellules Hep G₂ ont été incubées avec la DNR, aucun effet significatif n'a pu être observé après 4 heures d'incubation, même à la plus forte concentration testée (10 µg/ml). En revanche, après 24 heures d'incubation, on enregistre des écarts significatifs par rapport au témoin (Fig. 49). Cet effet semble saturable en fonction de la concentration (Fig. 50a), proportionnel au logarithme de la concentration, comme le montre la figure 50b. Ces résultats évoquent l'existence d'un seuil de temps pour l'action cytotoxique de la DNR sur les cellules Hep G₂, aucun effet ne pouvant être observé après 4 heures d'incubation aux 3 concentrations testées. Au delà de ce seuil, la concentration en DNR influence peu le relargage du ⁵¹Cr comme le suggèrent les résultats observés après 24H d'incubation.

3.3.2 - Effets du lactityl-DNR

Lorsque les cellules sont incubées en présence de lactityl-DNR, à la concentration de 1 µg/ml, après 4 heures d'incubation le relargage ne diffère pas du relargage spontané,

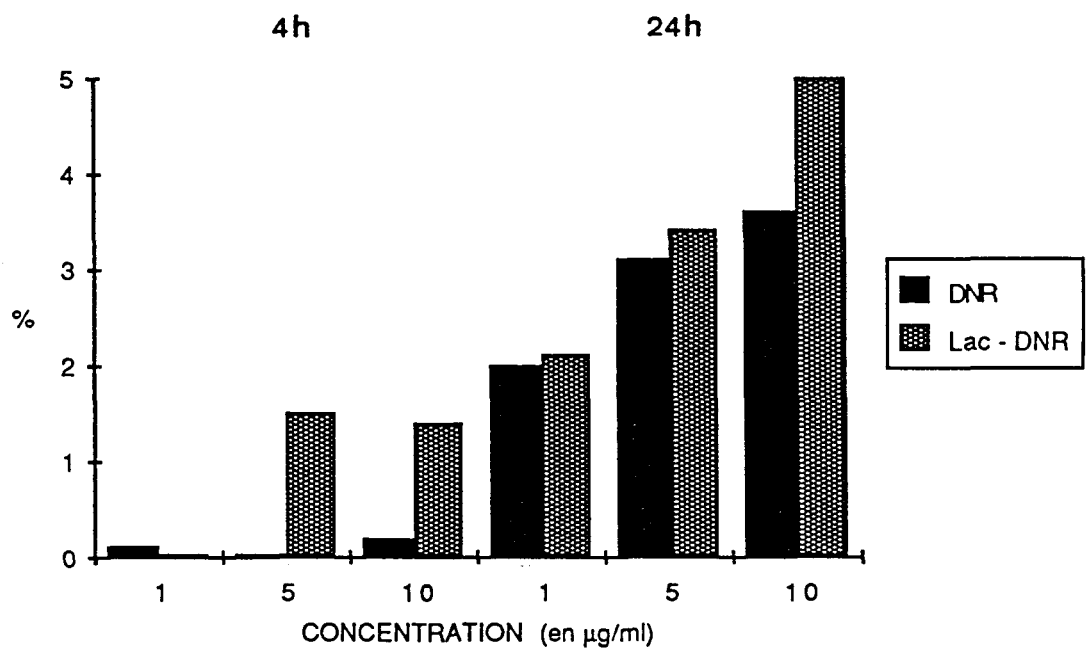


Figure 49 Etude du relargage du ^{51}Cr par les cellules Hep G2 incubées en présence de DNR ou de lactyl-DNR pendant 4 heures et 24 heures, comparé au relargage spontané par les cellules non traitées. Les cellules ont été marquées au ^{51}Cr et incubées en présence des drogues comme décrit au chapitre "Matériel et Méthodes", § 3.3

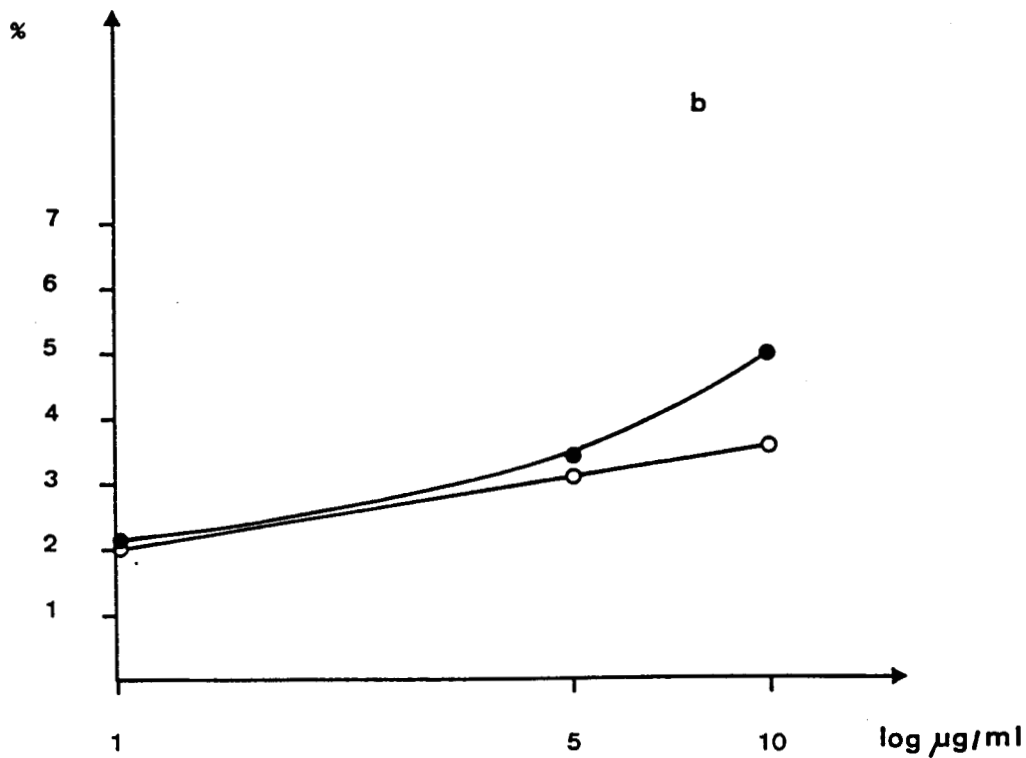
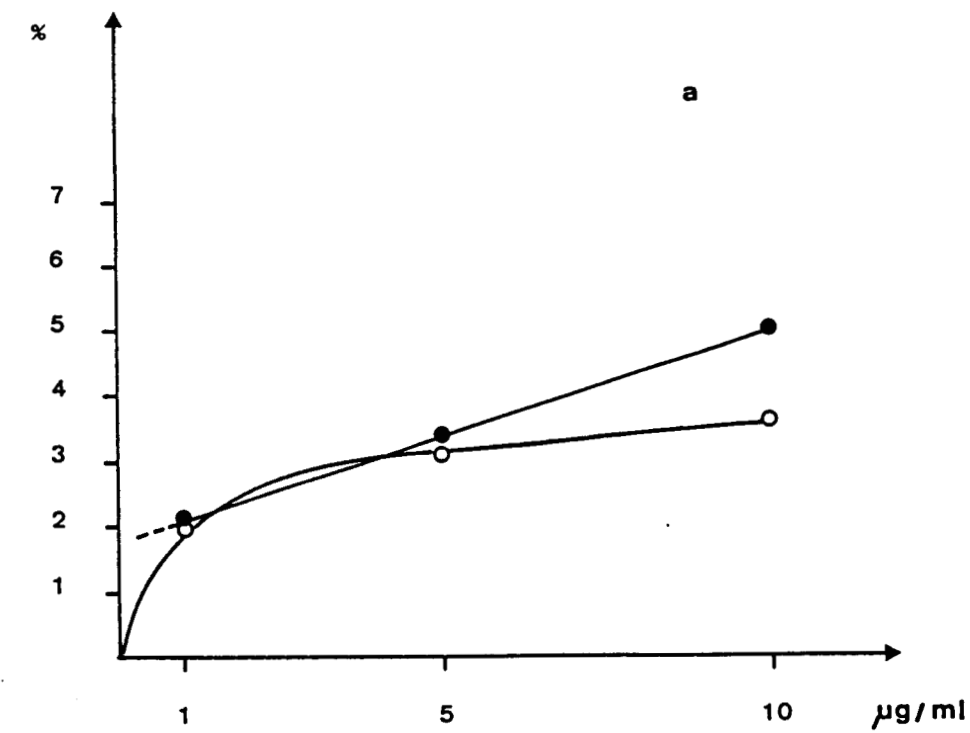


Figure 50 Etude du relargage du ⁵¹Cr par les cellules Hep G2 incubées 24 heures en présence de DNR et de son conjugué au lactose

a : relargage du ⁵¹Cr exprimé en % par rapport au témoin en fonction de la concentration en DNR et en Lac-DNR.

b : relargage du ⁵¹Cr en fonction du logarithme de la concentration en DNR et en Lac-DNR.

○—○ DNR
●—● Lactityl-DNR

comme dans le cas de la DNR entre 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$. Par contre, quand la concentration en lactityl-DNR augmente (5 et 10 $\mu\text{g/ml}$), on observe une augmentation significative du relargage, effet qui semble identique pour ces deux concentrations. Lors d'une incubation brève, les cellules Hep G2 apparaissent comme sensibles à un seuil de concentration en lactityl-DNR, phénomène qui n'est pas observé avec la DNR. Après 24 heures d'incubation, l'effet du lactityl-DNR est plus intense, proportionnel à la concentration, comme le montre la figure 50a et supérieur à l'effet de la DNR. En effet, la dose de DNR extrapolée d'après la figure 50b (effet = f (log concentration)) entraînant un effet identique au lactityl-DNR à 10 $\mu\text{g/ml}$ serait de l'ordre de 80 $\mu\text{g/ml}$.

De ces expériences, il semble se dégager que les cellules Hep G₂ seraient plus sensibles à l'action du lactityl-DNR qu'à celle de la DNR, lorsque cette sensibilité est estimée par la technique de relargage du ⁵¹Cr : quels que soient le temps et la concentration testés, le relargage en présence de lactityl-DNR est supérieur à celui qui est observé en présence de DNR. Les résultats obtenus avec la DNR qui suggèrent l'existence d'un seuil de temps pour l'apparition d'un effet mesurable, effet qui est saturable en fonction de la concentration après 24 heures d'incubation, sont en accord avec les travaux de BATES et coll. (31) qui ont montré que la mort cellulaire est une fonction exponentielle du temps d'exposition de cellules CHO à l'ADR, avant même que la concentration intracellulaire en ADR n'ait atteint son maximum. Lorsque les cellules ont été incubées en présence de lactityl-DNR, après 4 heures de contact avec la drogue aux concentrations de 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ (3,75 et 7,5 $\mu\text{g/ml}$ d'équivalent DNR), les cellules relarguent du marqueur dans le milieu. Cet effet, plus intense après 24 heures d'incubation est alors proportionnel à la concentration de drogue introduite dans le milieu. Ces résultats montrent que le lactityl-DNR entraîne sur les cellules Hep G2 des altérations de la perméabilité membranaire, conduisant à une fuite de constituants cellulaires révélée par la technique de marquage au ⁵¹Cr, selon un mécanisme

différent de la DNR. Dans cette hypothèse, la fixation du lactityl-DNR aux récepteurs des ASGP des cellules Hep G₂, ou la modification de l'hydrophobie de la DNR, pourraient maintenir la DNR au niveau des membranes cellulaires où son effet toxique par formation de peroxydes (cf. Généralités, § 1.1) pourrait être intensifié.

3.3.3 - Effets de la leucyl-DNR et des glycanes conjugués à la DNR

L'incubation de cellules Hep G₂ en présence de leucyl-DNR à 1 µg/ml et 5 µg/ml n'a pas permis de mettre en évidence des écarts significatifs dans le relargage du ⁵¹Cr par les cellules, comparé au témoin, la leucyl-DNR à la concentration de 5 µg/ml entraînant un relargage inférieur à celui qui est observé à la dose de 1 µg/ml. De même, lorsque les cellules ont été incubées en présence de glycanes de l'orosomucoïde conjugué à la DNR à la dose de 1 µg/ml aucun effet n'a pu être mis en évidence et le relargage en présence de 5 µg/ml de ce conjugué est inférieur au relargage spontané après 4 heures et 24 heures d'incubation. Ces résultats nécessiteraient d'être confirmés en vue d'envisager une hypothèse permettant de les expliquer (effet protecteur de la membrane cellulaire des glycanes associés à leurs récepteurs, effet sur la multiplication cellulaire réduisant le relargage de marqueur lors des mitoses, ...). Notons que les conditions de mise en culture des cellules permettent de limiter l'interférence de la multiplication cellulaire sur le relargage du Cr⁵¹ : les cellules sont prélevées à proximité de la confluence etensemencées dans les plaques de microtitration à raison de 100 000 cellules par puits. Dans ces conditions, la densité cellulaire est telle que les cellules forment un tapis continu, peu favorable à la multiplication cellulaire, des expériences d'incorporation de méthyle-³H thymidine, utilisée comme marqueur de la multiplication cellulaire, par les cellules Hep G₂, effectuées par ailleurs (résultats non présentés) ont montré que lorsque des cellules sontensemencées dans des plaques de

microtitration, l'incorporation de thymidine diminue en fonction de la densité cellulaire. Nous avons observé que lorsque la densité cellulaire excède 40 000 cellules par puits, l'incorporation de thymidine tritiée commence à décroître et que pour une densité de 100 000 cellules par puits, elle est réduite d'un facteur 10.

Les résultats des expériences de relargage du ^{51}Cr par les cellules Hep G₂ sont en faveur d'un effet cytotoxique plus intense du lactityl-DNR comparé à l'effet de la DNR. D'autres travaux permettraient d'étendre ces résultats à une gamme de concentration des composés plus large, explorant plus particulièrement l'effet de doses beaucoup plus faibles de DNR et de lactityl-DNR, compatibles avec les doses de substance susceptibles d'atteindre les cellules in vivo et la DNR s'avérant toxique à l'égard des cellules à des doses beaucoup plus faibles, comme le montrent les expériences de survie cellulaire en fonction de la concentration en DNR.

3.4 - Etude de l'action de la DNR et de son conjugué au lactitol sur la survie des cellules Hep G₂

Technique des courbes de survie ("plating efficiency")

Avant d'étudier l'effet de la DNR et de son conjugué au lactose sur la survie des cellules Hep G₂, nous avons dans un premier temps, recherché la concentration de cellules à ensemercer permettant d'obtenir après les 15 jours d'incubation, un nombre de clones significatif, compatible avec un comptage manuel en microscopie optique. Ces travaux montrent (Fig. 51) que le nombre de clones obtenus est une fonction linéaire du nombre de cellulesensemencées (à partir de 2 000 cellules). Les incubations en présence des dérivés à tester ont donc été effectuées en ensemençant 3000 cellules par boîte Falcon de 25 cm² pour 7 ml de milieu de culture, ces 3000 cellules donnant

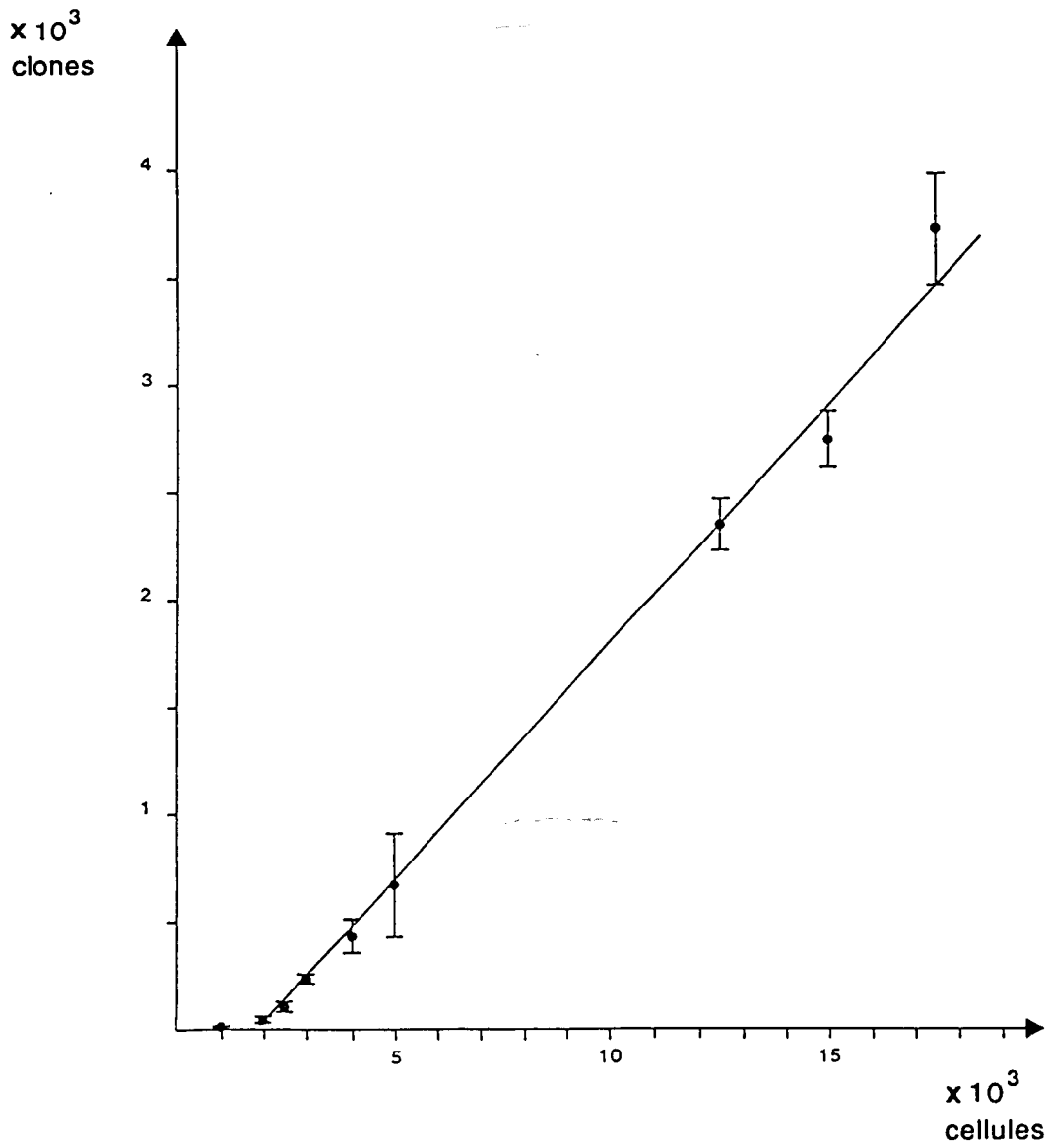


Figure 51 Etude de l'efficacité d'adhésion et de division (plating efficiency) des cellules Hep G2 : nombre de clones obtenus en fonction de la quantité de cellulesensemencées dans les conditions décrites au chapitre "Matériel et Méthodes" § 3.4.1

naissance à environ 250 clones, ce qui correspond à une efficacité d'adhésion et de division (plating efficiency) pour les cellules Hep G₂ de 8,3 %.

L'incubation des cellules Hep G₂ en présence de DNR et de lactityl-DNR en concentrations croissantes, comme indiqué au chapitre Matériel et Méthodes, § 3.4, nous a permis de tracer les courbes de survie des cellules, exprimée en % par rapport au témoin de survie en l'absence d'inhibiteur (Fig. 52). L'analyse de ces courbes montre que la DNR exerce une action cytotoxique intense à de très faibles concentrations puisqu'au delà de 7 ng/ml de DNR ($1,3 \times 10^{-8}$ M) aucun clone ne se développe (résultat de 5 expérimentations indépendantes). La dose de DNR entraînant une réduction de la survie des cellules Hep G₂ de 50 % est de 5 ng/ml ($9,5 \times 10^{-9}$ M). Notons que les écarts observés entre les différents essais sont relativement importants aux concentrations de 5 et 6 ng/ml, une erreur minime dans l'estimation de la quantité de DNR introduite dans le milieu pouvant avoir une incidence très importante sur la survie des cellules.

L'incubation des cellules Hep G₂ avec une gamme de concentration de lactityl-DNR affecte d'une manière moins dramatique la survie cellulaire pour des concentrations comprises entre 1 et $1,5 \times 10^3$ ng/ml ($1,4 \times 10^{-9}$ à $2,1 \times 10^{-6}$ M en lactityl-DNR soit 1×10^{-9} à $1,6 \times 10^{-6}$ M en équivalent DNR). Il est intéressant de constater, comme le montre la figure 52, que dans le cas où les cellules ont été incubées en présence de faibles concentrations en DNR, la courbe de survie des cellules présente un épaulement, ce qui évoque l'existence d'un mécanisme de réparation des lésions potentiellement léthales provoquées par la drogue à faible concentration, mécanisme qui est dépassé lorsque la concentration en DNR augmente (> 3 ng/ml). A l'inverse, la courbe de survie des cellules incubées en présence de lactityl-DNR ne présente pas cet épaulement, ce qui signifierait que les lésions provoquées par le lactityl-DNR à faible concentration conduisent à la mort des cellules sans réparation des lésions. Quand la concentration en DNR dans le

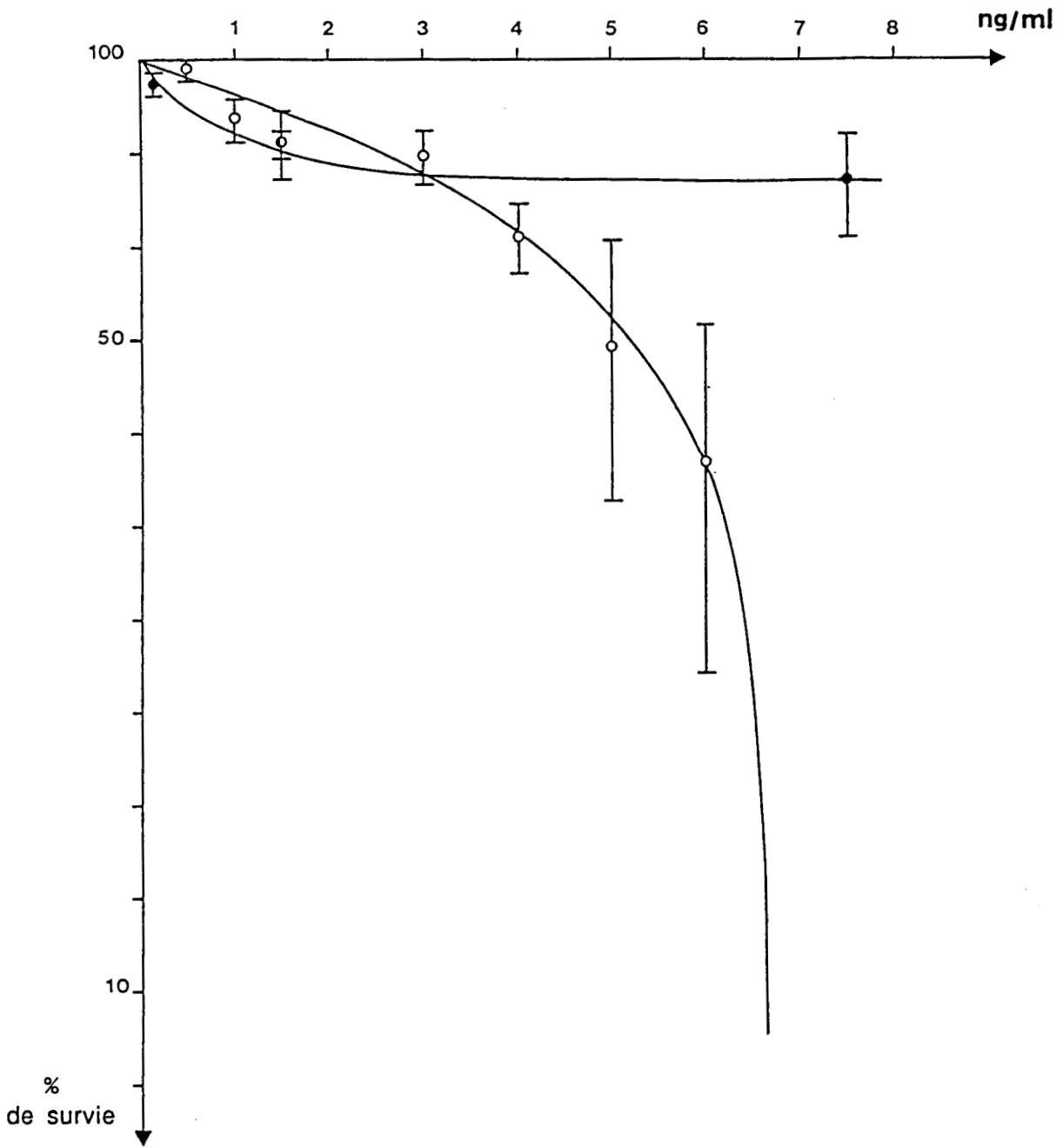


Figure 52 Courbes de survie des cellules Hep G2 incubées en présence de concentrations croissantes de

○—○ DNR
●—● Lactityl-DNR

milieu atteint 1,5 ng/ml (3×10^{-9} M), ses effets sont comparables à ceux du lactityl-DNR et ce jusqu'à la concentration de 3 ng/ml (6×10^{-9} M). A des concentrations légèrement supérieures, l'effet de la DNR sur les cellules est beaucoup plus intense que celui du lactityl-DNR, la dose de ce conjugué réduisant la survie des cellules Hep G₂ de 50 %, étant estimée à 370 ng/ml ce qui correspondrait à une concentration exprimée en DNR de 300 ng/ml, soit 60 fois la dose de DNR libre produisant le même effet.

La figure 53 montre l'inhibition de la survie des cellules Hep G₂ exprimée en fonction du logarithme de la concentration en DNR et en lactityl-DNR. A la différence de la DNR qui entraîne une mort cellulaire en croissance exponentielle avec le logarithme de la concentration, le lactityl-DNR entraîne une inhibition de la survie des cellules qui augmente d'une façon linéaire. Ceci se traduit comme nous l'avons signalé ci-dessus par un effet plus intense du lactityl-DNR à très faible concentration et à l'inverse, cet effet n'augmente que lentement quand la concentration est multipliée par un facteur 10 ou 100, atteignant un plateau à une concentration estimée à 50 ng/ml (4×10^{-8} M). A ces concentrations, des variations importantes de la concentration en lactityl-DNR ne modifient que faiblement l'inhibition de la survie des cellules.

Les auteurs qui ont étudié l'effet des anthracyclines sur la survie de différentes lignées ont mesuré la survie de cellules préincubées pendant un temps relativement court (10 minutes à 1 heure) avec la drogue puisensemencées après lavage pour éliminer la drogue. Dans nos expériences, notre hypothèse de travail étant l'interaction spécifique d'un conjugué de la drogue avec un récepteur de la membrane cellulaire, il nous est apparu nécessaire de laisser la drogue en contact avec les cellules pendant la durée de l'expérience, des temps courts d'incubation ne pouvant permettre la pénétration de quantités suffisantes de conjugué DNR-ligand par interaction avec son récepteur pour entraîner un effet sur la cellule cible. En effet, l'endocytose

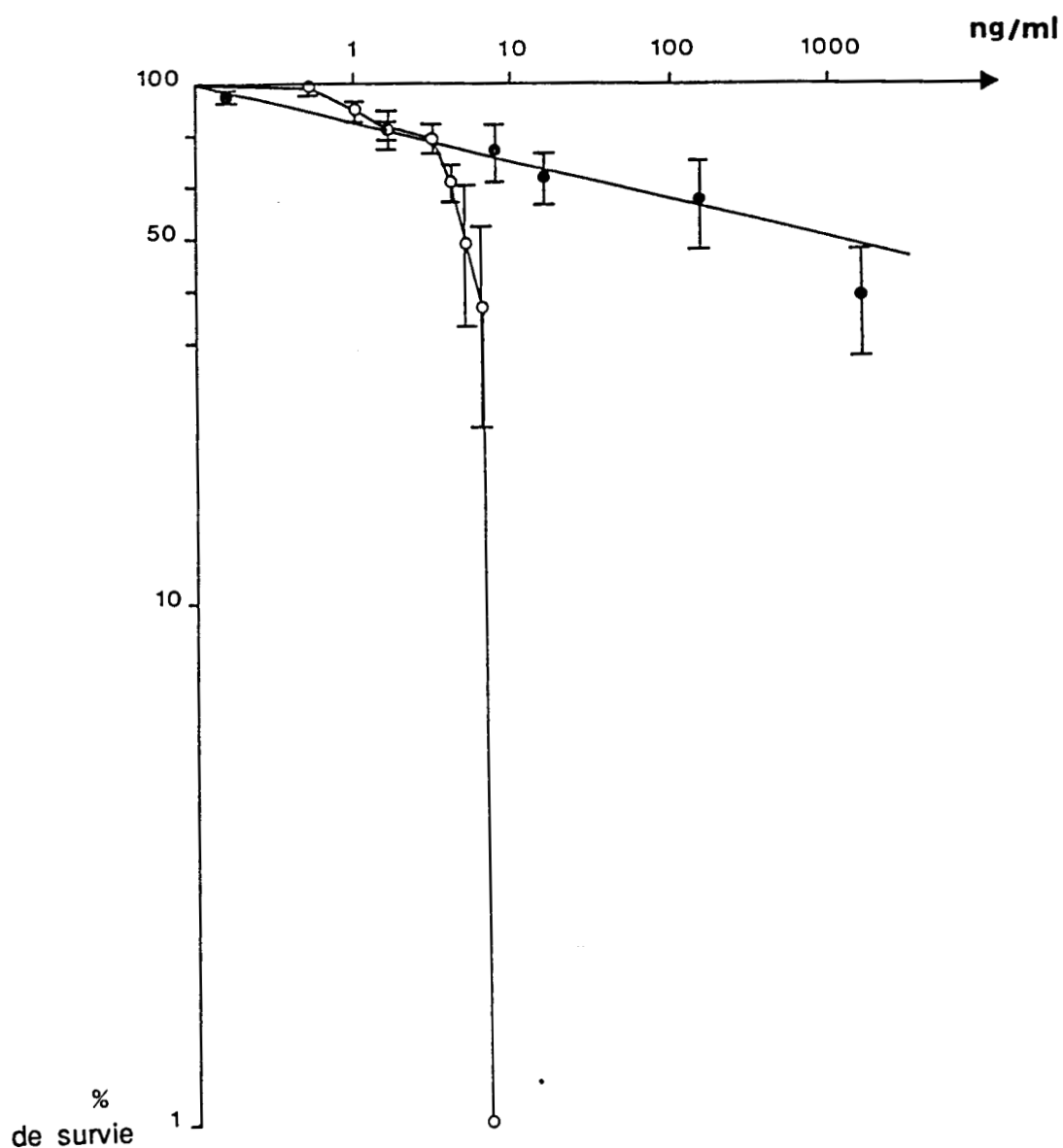


Figure 53 Courbes de survie des cellules Hep G2 incubées en présence de DNR et de lactyl-DNR, en fonction du logarithme de la concentration en substance testée

○—○ DNR
●—● Lactyl-DNR

d'un ligand qui fait suite à sa fixation sur un récepteur membranaire est un phénomène actif de la cellule, rapidement saturable en fonction de la concentration en ligand et qui permet la capture intracellulaire d'un nombre limité de molécules par unité de temps, à la différence de la diffusion passive qui permet la pénétration rapide de grandes quantités de substances. Ainsi, après 2 heures d'incubation en présence d'adriamycine à 1 µg/ml, BATES et coll. (31) estiment à $2,7 \times 10^{-10}$ mole la quantité d'ADR captée par 10^6 cellules CHO et d'après la vitesse d'internalisation de l'ASOR par les cellules Hep G2 calculée par SCHWARTZ et coll. (249), dans le même temps, la quantité d'ASOR internalisée est de $2,4 \times 10^{-12}$ mole/ 10^6 cellules, ce qui représente un facteur 100 en faveur de la pénétration de l'ADR dans les cellules CHO comparée à l'endocytose de l'ASOR par les cellules Hep G₂.

D'après les travaux de BATES et coll. (31), la survie des cellules CHO incubées 1 heure en présence d'ADR est réduite de 50 % pour une concentration en ADR voisine de 100 ng/ml, cette survie est réduite d'une manière exponentielle en fonction du temps de contact avec la drogue à la concentration de 1 µg/ml. MARIE et coll. (182), comparant la sensibilité in vitro de cellules leucémiques de malades atteints de leucémie aigüe myéloïde à 4 anthracyclines (ADR, DNR, rubidazone et aclacinomycine) ont montré que, suite à une exposition de 10 minutes de cellules CFU-L provenant d'un malade sensible à l'action des anthracyclines, la survie de ces cellules est réduite de moitié pour une concentration de DNR de l'ordre de 30 ng/ml, l'ADR nécessitant des doses environ 10 fois supérieures (Fig. 54). Les résultats que nous avons obtenus avec la DNR, compte tenu de nos conditions expérimentales, sont en accord avec ces données, l'augmentation du temps de contact des cellules avec la drogue lui procurant un effet beaucoup plus intense. La sensibilité des différents types de cellules aux anthracyclines est également un paramètre soumis à des variations considérables.

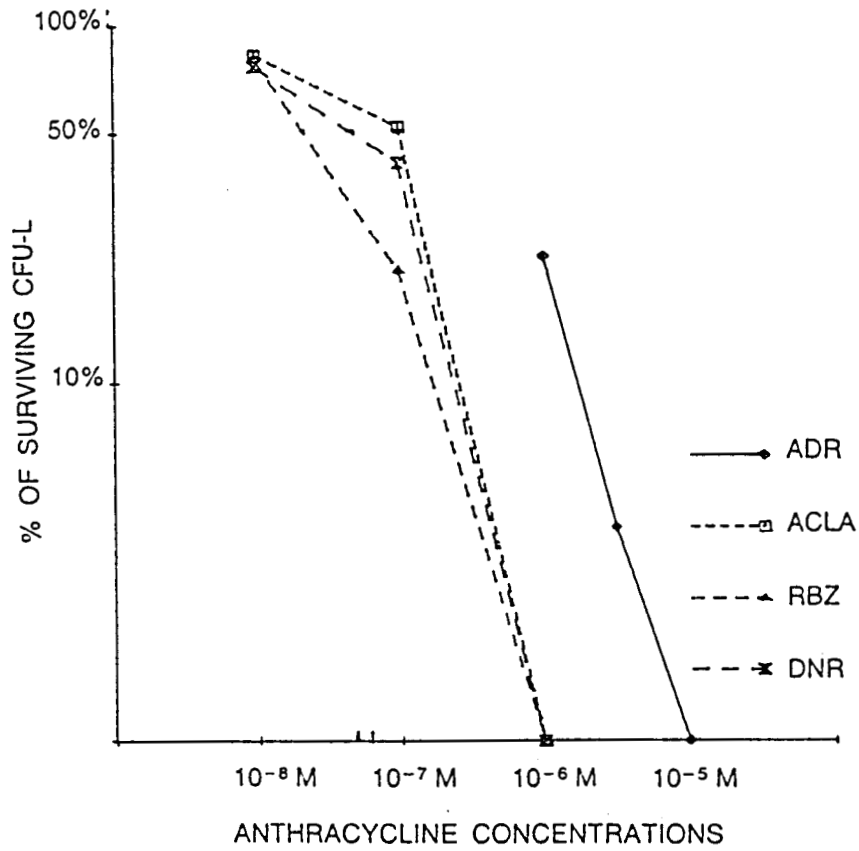


Figure 54

Courbes de survie de cellules CFU-L sensibles à l'action des anthracyclines : ADR : adriamycine, ACLA : aclacinomycine, RBZ : rubidazone, DNR : daunorubicine. [d'après MARIE et coll. (182)].

Le lactityl-DNR semble agir sur les cellules Hep G₂ selon un mécanisme différent de la DNR. En effet, l'inhibition de la survie cellulaire observée en présence de lactityl-DNR n'augmente pas significativement avec la concentration, ce qui semblerait indiquer que la copule glucidique du conjugué lactityl-DNR gêne la pénétration ou l'action du conjugué sur les cellules Hep G₂.

La modification de l'hydrophobie de la molécule de DNR par conjugaison au lactose pourrait empêcher la pénétration de ce dérivé dans les cellules. Cependant l'aclacinomycine qui, comme indiqué au chapitre Résultats et Discussion, § 2, présente un ratio copule glucidique-aglycone comparable à celui du lactityl-DNR se montre aussi active que la DNR vis à vis des cellules CFU-L provenant de patient sensible aux anthracyclines [MARIE et coll. (182)] (Fig. 54). De plus, l'activité plus importante du lactityl-DNR à très faible concentration est incompatible avec un empêchement à sa pénétration ou à son action sur les cellules.

En revanche, les résultats présentés ici sont en faveur d'une interaction du conjugué lactityl-DNR avec le récepteur des ASGP des cellules Hep G₂ permettant un transfert facilité du conjugué à l'intérieur des cellules : une incubation longue en présence de faibles concentrations de lactityl-DNR permet, par fixation du conjugué sur le récepteur, son internalisation alors qu'à ces concentrations, la DNR ne peut pénétrer dans les cellules par diffusion passive et l'augmentation de concentration de lactityl-DNR dans une gamme très large n'entraîne pas une inhibition proportionnelle de la survie des cellules.

La pénétration du lactityl-DNR par liaison au récepteur des ASGP est dans cette hypothèse un phénomène saturable en fonction de la concentration, ce qui pourrait expliquer que l'inhibition de la survie des cellules en présence de lactityl-DNR soit proportionnelle au logarithme de la concentration.

Le comportement des cellules Hep G₂ soumises à l'action du conjugué de la DNR au lactose pourrait donc s'expliquer par un mécanisme de liaison spécifique du conjugué au récepteur des ASGP présent sur ces cellules. Cependant, la preuve de cette interaction ne pourrait être apportée qu'en démontrant, soit que ce phénomène peut être spécifiquement inhibé, ce qui est relativement malaisé compte tenu des concentrations de ligand introduites dans les expérimentations, soit que l'interaction entre les cellules Hep G₂ et le lactityl-DNR est spécifique et met en jeu le récepteur des ASGP (expériences de capture), soit en montrant qu'un conjugué de la DNR à un oligosaccharide comparable au lactose mais ne présentant pas d'affinité pour le récepteur des ASGP est inactif vis-à-vis des cellules Hep G₂ (la synthèse d'un conjugué de la DNR avec le cellobiose a été effectuée dans ce but), soit en montrant que le lactityl-DNR s'avère inefficace sur des cellules comparables mais ne présentant pas le récepteur des ASGP. La sélection de cellules Hep G₂ ayant perdu leur récepteur des ASGP à la suite de nombreux repiquages (cf. chapitre Résultats et Discussion, § 3.1) pourrait permettre ces expérimentations, de telles cellules devenant, selon cette hypothèse, résistantes à l'action du lactityl-DNR.

Au cours de ces expérimentations, nous avons également essayé de déterminer si le lactityl-DNR exerçait une action sur des cellules préincubées en présence de ce composé, puis ensemencées en l'absence de lactityl-DNR. Des cellules incubées avec une gamme de lactityl-DNR dans les conditions décrites ci-dessus, ont donc été prélevées et ensemencées dans un milieu neuf après lavage, afin de déterminer la survie des cellules, comparée à un témoin effectué dans les mêmes conditions mais sans lactityl-DNR dans la préincubation. Cette expérience montre (Fig. 55) que lorsque les cellules ont été préincubées avec une

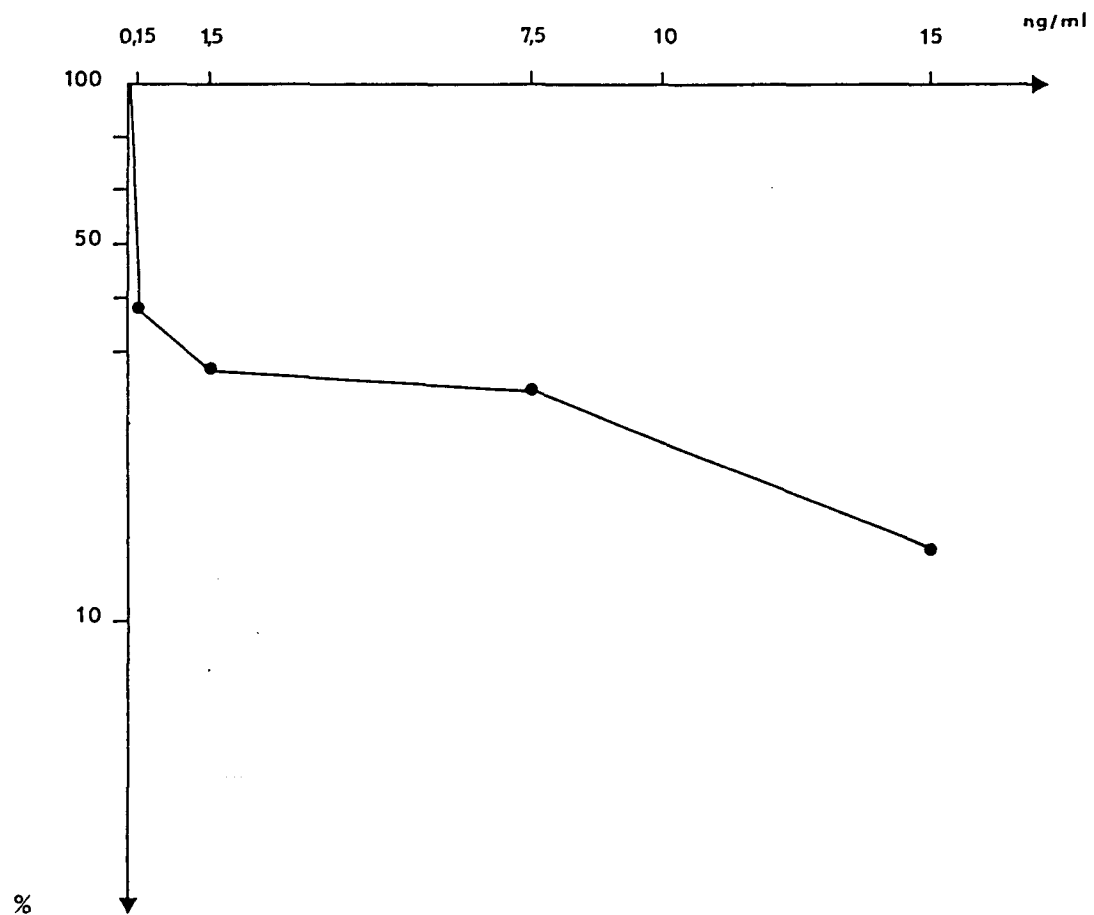


Figure 55 Courbe de survie des cellules Hep G2 préincubées 14 jours en présence de concentrations croissantes de lactityl-DNR, puis incubées dans un milieu neuf dépourvu de lactityl-DNR, en fonction de la concentration de lactityl-DNR dans la préincubation.

concentration en lactityl-DNR très faible (0,15 ng/ml), leur survie dans un milieu neuf est considérablement réduite (31 % de survie), la concentration en lactityl-DNR lors de la préincubation ne semblant pas, ici encore jouer un rôle prépondérant. Ces résultats confirment l'effet cytotoxique du lactityl-DNR décrit ci-dessus, les cellules préalablement chargées en lactityl-DNR voyant leur capacité à adhérer au substrat et à se diviser réduite d'une manière importante. Notons que la réduction importante de la survie des cellules préincubées avec une concentration très faible de lactityl-DNR (0,15 ng/ml) pourrait refléter une fragilisation des membranes des cellules par le lactityl-DNR, révélée lors du traitement par la trypsine-EDTA au moment du repiquage, ces cellules lésées lors de cette étape ayant perdu leur capacité à adhérer au plastique et donc à se diviser.

L'étude des courbes de survie des cellules Hep G₂ nous ayant permis de déterminer des doses cytotoxiques équivalentes pour la DNR et le lactityl-DNR, nous avons pu essayer de mettre en évidence un effet cytostatique du lactityl-DNR, comparé à la DNR, sur les cellules Hep G₂. Les deux techniques que nous avons employées sont : la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée en présence de ces composés et la cytofluorométrie de flux.

3.5 - Etude de l'effet cytostatique du conjugué de la DNR au lactose sur les cellules Hep G₂

L'utilisation des deux techniques citées précédemment pour la mise en évidence de l'effet cytostatique du lactityl-DNR sur les cellules Hep G₂ fournit des résultats complémentaires : la mesure de l'incorporation de méthyle³H-thymidine permet, par des expériences de chasse, de fixer un instantané de la quantité de cellules incorporant la thymidine ; celle-ci étant incorporée par les cellules en phase S de synthèse d'ADN, cette technique

permet de comparer, par rapport au témoin, le nombre de cellules présentes dans cette phase du cycle lorsque les cellules ont été traitées par les drogues. La technique de cytofluorométrie de flux, fondée sur la mesure de la distribution des quantités d'ADN dans la population cellulaire à analyser ($2n$ (G1), $2n < < 4n$ (S), $4n$ (G2 + M), ..., $8n$), permet d'estimer la répartition des cellules dans les 3 phases du cycle G1, S et G2 + M. Ces deux techniques ont été testées sur les cellules Hep G2 incubées avec des doses de lactityl-DNR et de DNR réduisant de 20 % (PE 20) et de 50 % (PE 50) la survie des cellules, déterminées comme décrit ci-dessus. Ces doses sont pour la DNR : PE 20 = 2,5 ng/ml, PE 50 = 5 ng/ml et pour le lactityl-DNR : PE 20 = 2 ng/ml, PE 50 = 370 ng/ml. L'utilisation de doses de substances exerçant un effet cytotoxique équivalent sur les cellules permet de supprimer l'interférence de cet effet, les perturbations comparées du métabolisme cellulaire, observées par ces 2 techniques, sont alors dues uniquement à l'effet cytostatique des substances.

3.5.1 - Etude de l'incorporation de méthyle- 3 H thymidine

L'étude de l'incorporation de méthyle- 3 H-thymidine par les cellules Hep G2 a été effectuée comme décrit au chapitre Matériel et Méthodes § 3.5.1, la thymidine marquée est ajoutée au milieu d'incubation 30 minutes avant l'arrêt de l'incubation avec les substances à tester. Dans ces conditions, les effets du lactityl-DNR et de la DNR sur l'incorporation de la thymidine tritiée, exprimés par rapport au témoin, en fonction du temps de contact avec les drogues sont présentés dans la figure 56. L'analyse des courbes montre que aux 2 concentrations utilisées (PE 20 et PE 50), le lactityl-DNR et la DNR entraînent une déplétion de l'incorporation du marqueur dans la première heure de contact avec les drogues. A la dose PE 20, l'inhibition de cette incorporation sous l'action du lactityl-DNR semble plus intense que dans le cas de la DNR (Fig. 56a). Par contre, à la dose PE 50 (Fig. 56b) l'effet du lactityl-DNR est comparable à l'effet de la dose PE 20 et à celui de la DNR, bien que

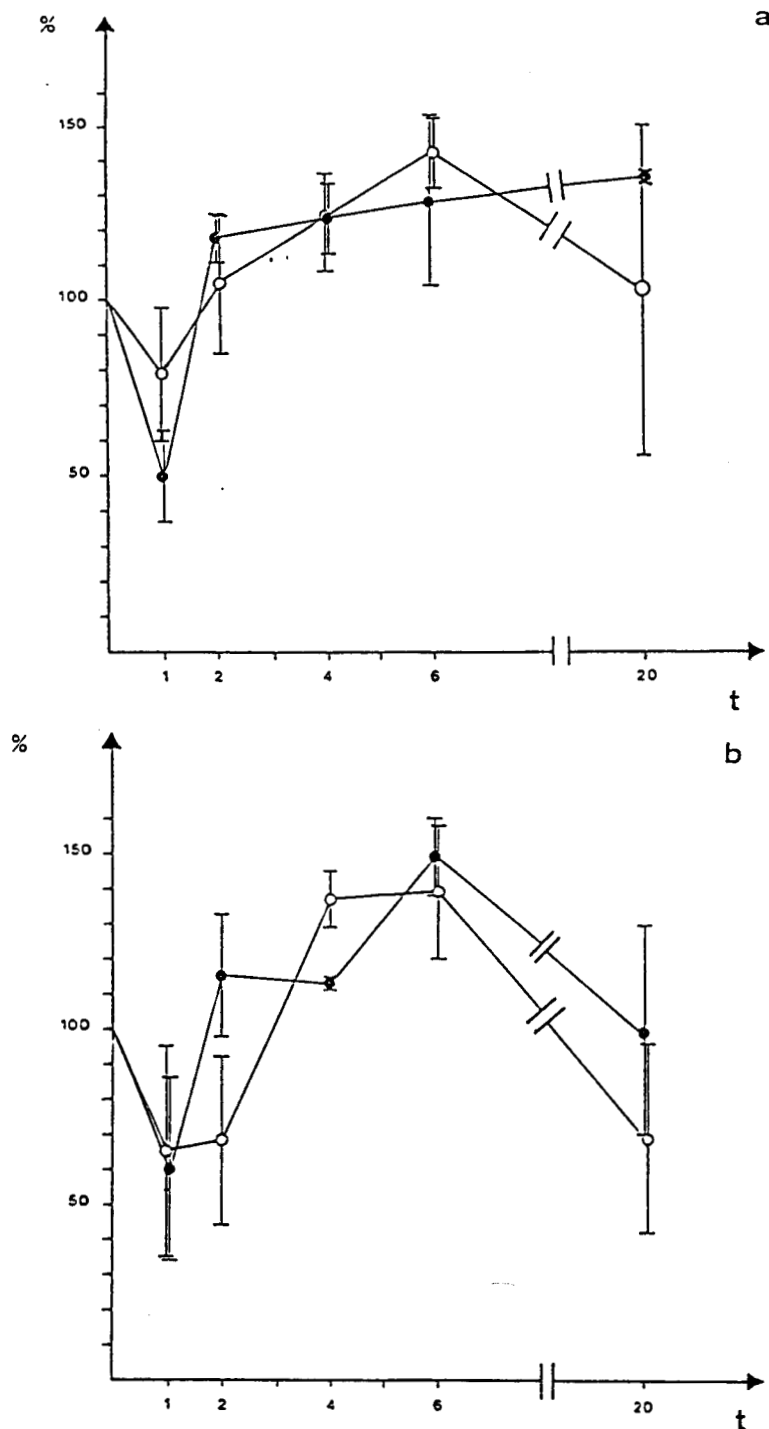


Figure 56

Etude de l'incorporation en fonction du temps de méthyle - ^3H - thymidine par les cellules Hep G2 incubées en présence de DNR et de lactityl-DNR, comparée au témoin (100 % d'incorporation). La méthyle - ^3H - thymidine est ajoutée au milieu d'incubation 30 minutes avant la mesure qui est effectuée dans les conditions décrites au chapitre "Matériel et Méthodes", § 3.5.1.

○—○ DNR
●—● Lactityl-DNR

a : doses de DNR et de lactityl-DNR réduisant de 20 % la survie des cellules Hep G2 déterminées par les expériences de plating efficiency (courbes de suivie) ;

b : doses de DNR et de lactityl-DNR réduisant de 50% la survie des cellules Hep G2.

l'inhibition de l'incorporation soit plus durable sous l'action de la DNR à la dose PE 50 (persistant après 2 heures d'incubation). Le lactityl-DNR et la DNR semblent donc induire une diminution rapide du nombre de cellules présentes en phase S, vraisemblablement liée à un ralentissement du passage des cellules de G₁ en S par action sur les cellules en phase G₁ du cycle cellulaire. Cette diminution plus intense à dose plus faible de lactityl-DNR semble, en revanche, plus durable lorsque les cellules sont incubées avec la DNR. Néanmoins, il paraît nécessaire de préciser que, dans nos conditions expérimentales, le tracé de la courbe entre les temps 0 et 1 heure est hypothétique et que des temps plus courts d'incubation montreraient peut-être que l'inhibition observée après une heure est précédée d'une déplétion plus profonde de l'incorporation de thymidine.

La diminution de l'incorporation de méthyle-³H thymidine est suivie d'une incorporation de marqueur supérieure au témoin ce qui, dans le cas d'expériences de chasse, est cohérent avec une synchronisation des cellules dans le cycle conduisant à un nombre de cellules présent en phase S au moment où le marqueur est ajouté, supérieur au témoin sous l'effet des drogues. Cette synchronisation est le corollaire de la réduction du nombre de cellules en phase S observée après 1 heure d'incubation et d'un ralentissement des cellules dans la phase S (inhibition de la synthèse de l'ADN). Lorsque les incubations en présence des drogues sont poursuivies jusqu'à 20 heures, les résultats obtenus sont difficilement interprétables compte tenu des écarts observés. La multiplication des mesures dans l'intervalle compris entre 6 heures et 20 heures d'incubation permettrait de préciser le tracé de la courbe entre ces points et d'affiner les résultats en vue de leur interprétation.

3.5.2 - Etude en cytofluorométrie de flux

L'étude de la distribution de l'ADN dans les

populations de cellules Hep G₂ traitées par la DNR et le lactityl-DNR a été effectuée après une incubation de 2 heures des cellules en présence des drogues suivie de l'élimination des substances par lavage et analyse des cellules après 3, 6, 16 et 24 heures de culture. Les cellules ont ensuite été traitées comme indiqué au chapitre Matériel et Méthodes, § 3.5.2, en vue de l'enregistrement en cytofluorométrie de flux des histogrammes de répartition des quantités d'ADN cellulaire coloré par le bromure d'éthidium. Les histogrammes de distribution de l'ADN dans les populations traitées, comparées aux populations témoins de cellules ayant subi les mêmes manipulations, sont présentés à la figure 57 ; La quantité d'ADN est représentée en abscisse, en ordonnée sont reportées les quantités de cellules renfermant une quantité donnée d'ADN. De gauche à droite, le premier pic représente la population cellulaire renfermant une quantité d'ADN équivalent à 2n chromosomes (G₁), la zone intermédiaire, la population renfermant de 2n à 4n chromosomes (S) et le deuxième pic, la population à 4n chromosomes (G₂). Le non retour à la ligne de base de l'histogramme signe l'existence d'une population de cellules polyploïdes (entre 4n et 8n chromosomes).

L'analyse des histogrammes obtenus avec les cellules ayant subi l'action de la DNR ou du lactityl-DNR montre que sous l'action de ces substances, après 3H et 6H de culture, les populations diffèrent d'une manière significative des cellules témoins par une augmentation des populations présentes dans les phases S et G₂ du cycle. Cette augmentation s'accompagne d'une réduction de la population cellulaire en G₁. Ces effets semblent plus intenses dans le cas où les cellules ont été incubées en présence de lactityl-DNR à la dose PE 20 que dans le cas de la DNR à dose équivalente (Fig. 57a). Aux doses de DNR et de lactityl-DNR réduisant de 50 % la survie des cellules (Fig. 57b), on observe une répartition similaire des populations après 3 heures de culture, correspondant à une augmentation nette des populations en G₂ et S et à une réduction des cellules en G₁. Après 6 heures de culture après l'élimination des composés testés, les effets de la DNR à la dose PE 20 et du lactityl-DNR

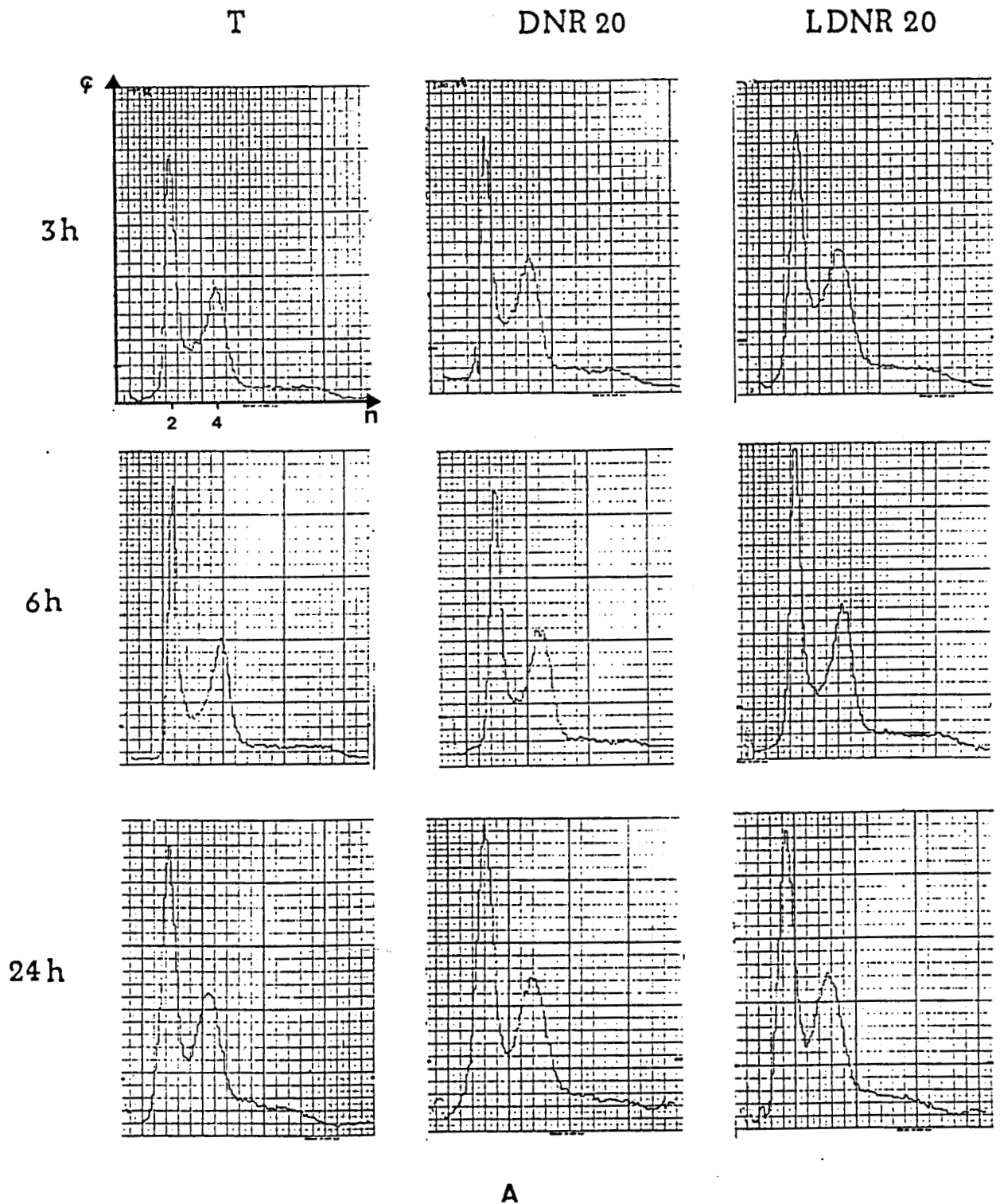


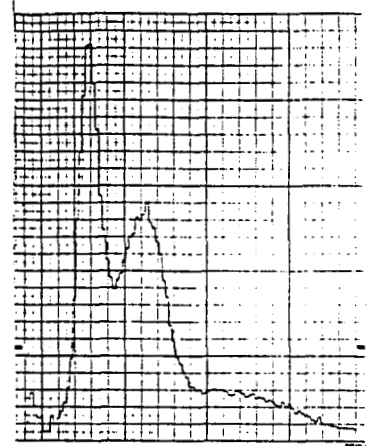
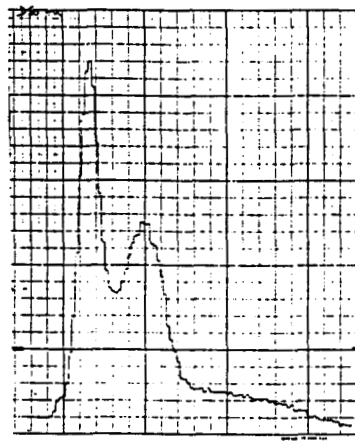
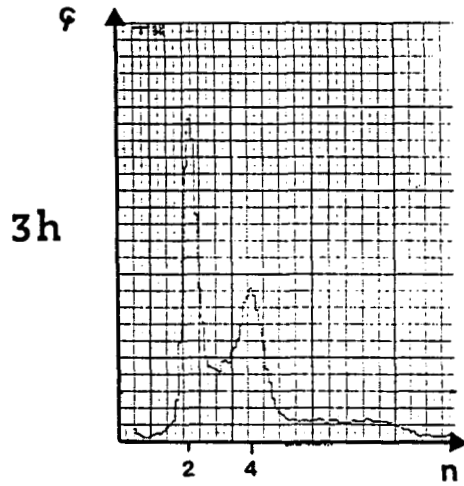
Figure 57 Histogrammes de distribution de l'ADN cellulaire des cellules Hep G2 incubées 3 heures, 6 heures et 24 heures en présence de DNR (D) et de lactityl-DNR (LD) obtenus par la technique de cytofluorométrie de flux :

A : incubation en présence de doses de DNR ou de lactityl-DNR réduisant de 20 % la survie des cellules.

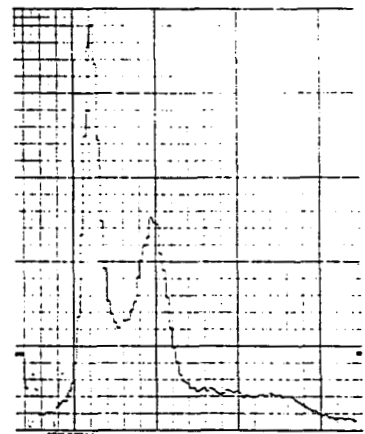
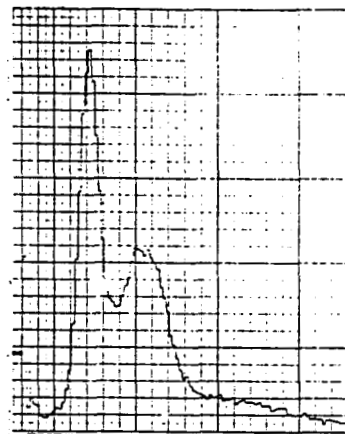
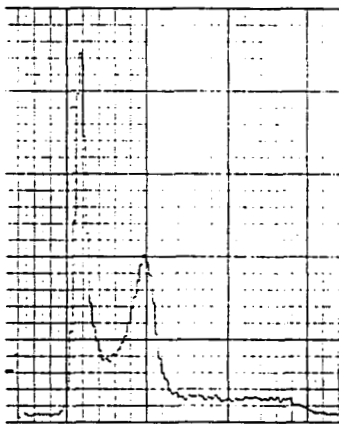
T

DNR 50

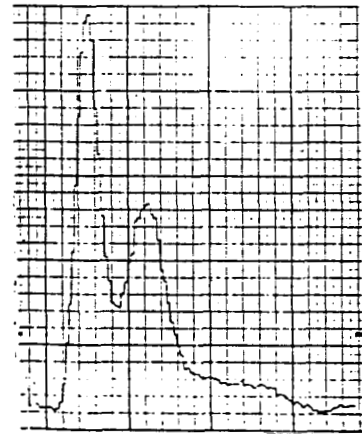
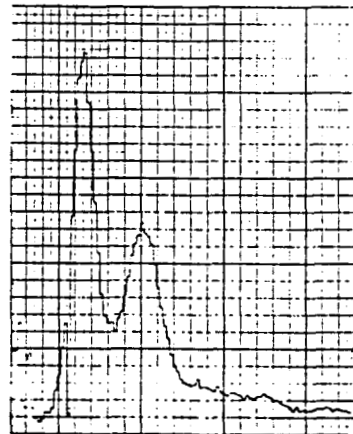
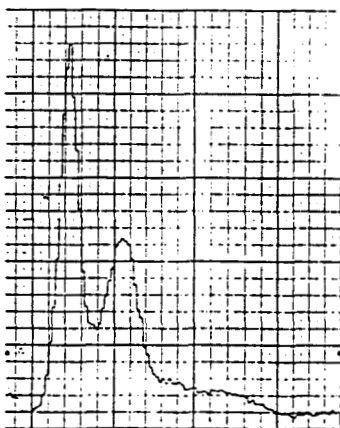
L DNR 50



6h



24 h



B

B : incubation en présence de doses réduisant de 50 % la survie des cellules.

à dose équivalente sont encore marqués et comparables, l'effet de la DNR à la dose PE 50 semble plus intense que celui du lactityl-DNR. Après 16h et 24h de culture, on assiste à une normalisation des histogrammes de répartition des populations cellulaires, l'effet des drogues testées serait donc réversible en cas d'incubation brève avec de faibles concentrations.

Les anthracyclines agissent sur les cellules en phase G₁, selon un mécanisme qui a été largement discuté au chapitre Généralités § 1.1. L'inhibition de la synthèse de l'ADN se traduit par un ralentissement du cycle cellulaire avec une augmentation des populations cellulaires présentes en S et en G₂ au détriment de G₁. Ces effets cytostatiques entraînent une diminution rapide et brève de l'incorporation de méthyle-³H-thymidine par ralentissement du passage des cellules de G₁ en S, suivie après 2 heures d'incubation d'une augmentation de cette incorporation par synchronisation des cellules, augmentant ainsi le nombre de cellules présentes en un temps donné en phase S. Ce phénomène est confirmé par les études en cytofluorométrie de flux qui montrent que la répartition cellulaire des cellules soumises à l'action de la DNR et du lactityl-DNR, après 3 heures de culture, est altérée, faisant apparaître une augmentation des populations présentes en S et en G₂ au détriment de G₁.

L'analyse des résultats des études d'incorporation de méthyle-³H-thymidine et de répartition des populations cellulaires en cytofluorométrie de flux montre que les effets cytostatiques du lactityl-DNR sur les cellules Hep G₂, à des doses entraînant un effet cytotoxique équivalent, déterminées par la technique des courbes de survie, sont comparables, voire plus marqués que les effets de la DNR. Le lactityl-DNR à la dose réduisant la survie des cellules de 20 % (2 ng/ml soit 1,5 ng/ml en équivalent DNR) semble induire une diminution plus importante de l'incorporation de méthyle-³H-thymidine que la DNR à dose équivalente (2,5 ng/ml). La comparaison des histogrammes de répartition des cellules obtenus après incubation avec le lactityl-DNR ou la DNR confirment cette différence : après 3

heures de culture, le lactityl-DNR entraîne une altération plus marquée du cycle cellulaire que la DNR à ces mêmes doses. Après 6 heures de culture, les effets de ces deux composés sont similaires. Aux concentrations de ces dérivés réduisant la survie de 50 %, l'inhibition de l'incorporation de méthyle-³H-thymidine par le lactityl-DNR est comparable à celle de la DNR après un contact d'une heure, bien que moins durable. De même, l'altération du cycle cellulaire observée en cytofluorométrie de flux après 3 heures de culture, est similaire pour ces deux produits, un effet légèrement plus marqué de la DNR, à cette dose, pouvant être observé après 6 heures de culture. Les effets de la DNR et du lactityl-DNR aux concentrations testées sont réversibles dans le cas d'une incubation brève (2 heures), les différences de répartition des cellules dans les phases du cycle comparées au témoin deviennent non significatives après 24 heures de culture, ce qui est en accord avec les données de la littérature concernant des incubations brèves de cellules en présence d'ADR à faible concentration.

Les résultats que nous présentons ici, qui montrent une accumulation des cellules Hep G₂ en phase S et G₂ + M du cycle cellulaire, sous l'action de la DNR et de son conjugué au lactose étendent les données de la littérature à une autre lignée cellulaire (hépatome) et au dérivé de la DNR que nous avons synthétisé. En 1975, PAWELSKI et MAJ (224), étudiant en cytophotométrie de flux des cellules leucémiques de sujets atteints de leucémie aigüe myéloblastique avant et après traitement par la daunorubicine, ont montré que dans 2 cas sur 4 observations, la DNR entraîne une accumulation des cellules dans les phases S et G₂ du cycle suggérant que la DNR bloquerait les cellules en phase G₂. Ces résultats sont confirmés par HILLEN et coll. (151) qui ont observé chez des patients atteints de leucémie aigüe lymphoblastique et myéloblastique, 24 heures après une injection d'ADR à la dose relativement faible de 30 mg/m² ou de DNR à la dose de 50 mg/m², une augmentation de la population cellulaire présente en G₂ + M et que cette augmentation est d'autant plus nette que les patients présentent plus de cellules

en phase S et $G_2 + M$ avant le traitement. Cette augmentation s'accompagne d'une réduction de l'index mitotique des blastes.

L'augmentation des cellules en phase $G_2 + M$ serait due à une accumulation de cellules en G_2 comme le suggèrent la réduction de l'index mitotique et la stabilité du pourcentage de cellules en phase S, les cellules en phase S avant le traitement sont bloquées en phase G_2 par l'ADR. Le blocage des cellules en phase G_2 par l'ADR a également été rapporté par WHEATLEY (339) pour les cellules HELA et par GOHDE (121) pour les cellules de tumeur d'ascite d'EHRlich. En 1973, ERNST (96) et STRIJCKMANS et coll. (282), ont également observé un effet similaire avec la DNR chez des patients atteints de leucémie aigüe.

D'un point de vue thérapeutique, l'augmentation globale des cellules dans les phases S et $G_2 + M$ du cycle, 24 heures après l'injection d'ADR ou de DNR présente un intérêt certain. En effet, les cellules dans ces phases du cycle sont plus sensibles aux agents cytostatiques, l'administration de ces agents spécifiques de certaines phases définies du cycle cellulaire serait plus efficace 24 heures après l'injection d'ADR ou de DNR.

CONCLUSION

Les travaux que nous présentons ici s'inscrivent dans le cadre des recherches effectuées dans de nombreux laboratoires et qui visent à diriger (cibler), de préférence sélectivement, des molécules pharmacologiquement actives dans l'organisme. Même si l'idée de "cibler" les médicaments est née il y a près d'un siècle, ces travaux ont connu un réel essor depuis que les connaissances dans le domaine de la biologie moléculaire se sont rapidement étendues (anticorps monoclonaux, structure des membranes des cellules normales et transformées, récepteurs lectiniques des cellules animales...). L'axe de recherche poursuivi au laboratoire depuis près de 10 ans est le ciblage des médicaments par glycosylation.

Dans ce contexte, nos travaux nous ont permis :

1 - en utilisant comme modèle cellulaire l'hépatocyte de Rat préparé par perfusion à la collagénase, de démontrer l'interaction spécifique des asialo-glycannes préparés à partir de l'orosomucoïde par hydrazinolyse, avec le récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes de Mammifère et d'étendre l'endocytose des glycoprotéines et des glycopeptides désialylés par l'hépatocyte aux glycannes eux-mêmes. Leur utilisation comme vecteurs lectiniques vers les cellules animales a donc pu être envisagée.

2 - de synthétiser et purifier des conjugués de daunorubicine à des oligosaccharides (lactose et asialoglycannes d'orosomucoïde) dépourvus de DNR libre susceptible d'interférer dans les expériences de capture ou de toxicité cellulaire. L'étude de l'hydrolyse enzymatique du conjugué de la DNR au lactose, d'une part sous l'action d'une galactosidase puis d'une glucosidase, d'autre part sous l'action d'une fraction lysosomique de foie de Rat, nous a permis de proposer un mécanisme pour son métabolisme cellulaire.

3 - de démontrer que le conjugué de la DNR au lactose possède des propriétés intéressantes in vitro, tant au point de vue de son métabolisme que de son action sur les cellules Hep G₂ en culture : les techniques de mesure du relargage du chrome-51, de détermination des courbes de survie, de mesure de l'incorporation de thymidine marquée et de cytofluorométrie de flux permettent d'affirmer que ce conjugué a conservé des propriétés toxiques in vitro vis-à-vis des cellules HepG₂ comparables à celles de la DNR. Ces expériences montrent, en outre, que la conjugaison du lactose à la DNR modifie l'interaction de la drogue avec les cellules : certains résultats suggèrent, sans toutefois la démontrer, une interaction spécifique de ce conjugué avec le récepteur du galactose des cellules HepG₂ : inhibition de sa pénétration intracellulaire par l'ASOR en excès visualisée par la technique de microfluorimétrie LASER, effet cytostatique saturable en fonction de la concentration mis en évidence par la technique des courbes de survie.

A ce stade de nos travaux, deux principaux axes de recherche peuvent être envisagés. Le premier vise à explorer d'une manière plus approfondie la spécificité de l'interaction de ce conjugué avec le récepteur du galactose. Le second, tirant parti, 1 - des résultats concernant la cytotoxicité du conjugué, 2 - de la modification de son métabolisme par augmentation de son hydrophilie comparée à la DNR et 3 - de son analogie structurale avec l'aclacinomycine, vise à explorer in vivo sa pharmacocinétique et son action anticancéreuse sur des modèles animaux. L'optimisation de la technique de condensation de glycanes avec la DNR permettrait, d'autre part, d'obtenir les quantités de conjugué nécessaires pour envisager les mêmes études avec un conjugué dont l'affinité pour le récepteur du galactose des hépatocytes serait optimale.

BIBLIOGRAPHIE

	Pages
1 - ACTON, E.M., in Anthracyclines : current status and new developments, (CROOKE, S.T., REICH, S.D., ed.) Acad. Press, NY, 1980, 17	173
2 - ACTON, E.M., Drugs Exptl. Clin. Res., 11 (1985) 1-8	173
3 - ADEN, D.P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I., KNOWLES B.B., Nature, 282 (1979) 615-616	115
4 - ALVING, C.R., Pharmac. Ther., 22 (1983) 407-424	26
5 - ANNE, A., BENNANI, F., FLORENT, J.C., MOIROUX, J., MONNERET, C., Tetrahed. Lett., 26 (1985) 2641-2644	173
6 - ARCAMONE, F., in Top. Antibiot. Chem., 2, (SAMMES, P.G., ed.) Halsted Press, 1978, 99-239	4,11 153,172
7 - ARCAMONE, F., Cancer Res., 45 (1985) 5995-5999	16
8 - ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., FRANCESCHI, G., MONDELLI, R., OREZZI, P., PENCO, S., Gazz. Chim. Ital., 100 (1970) 949	157
9 - ARMSTRONG, K.J., NOALL, N.W., STOUFFER, J.E., Biochem. Biophys. Res. Com., 47 (1972) 354-360	33
10 - ARNON, R., HURWITZ, E., in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, (BALDWIN, R.W., BYERS, V.S., ed.) Acad. Press, 1985, 365	21

	Pages
11 - ARNON, R., SCHECHTER, B., WILCHEK, M., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, UCLA, Symposia on Molecular and Cellular Biology, 27 (REISFELD, R.A., SELL, S., ed.) Alan R Liss Inc, NY, 1985, 237-242	21
12 - ARONSON, N.N.Jr, DOCHERTY, P.A., J. Biol. Chem., 258 (1983) 4266-4271	82
13 - ASHWELL, G., HARFORD, J., Ann. Rev. Biochem., 51 (1982) 531-554	59,61 62
14 - ASHWELL, G., KAWASAKI, T., in Methods in Enzymology, 50, (GINSBURG, V., ed.) Acad. Press, NY, 1978, 287-288	59
15 - ASHWELL, G., MORELL, A.G., in Adv. Enzymol., 41 (1974) 99-128	59
16 - ASHWELL, G., MORELL, A.G., Trends Biochem. Sci., 2 (1977) 76-78	57
17 - ASHWELL, G., STEER, C.J., J. Amer. Med. Ass., 246 (1981) 2358-2364	62
18 - ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.D., BLACKMORE, P.F., EXTON, J.H., J. Biol. Chem., 252 (1977) 2662-2669	136
19 - AUBEL-SADRON, G., CONDOS-GAGLIARDI, D., Biochimie, 66 (1984) 333-352	4
20 - BAENZIGER, J.U., J. Biol. Chem., 254 (1979) 789-798	103
21 - BAENZIGER, J.U., FIETE, D., Cell, 22 (1980) 611-620	66,70,103,104 130,132,142,147,149

	Pages
22 - BAENZIGER, J.U., FIETE, D., J. Biol. Chem., 257 (1982) 6007-6009	80
23 - BAENZIGER, J.U., MAYNARD, Y., J. Biol. Chem., 255 (1980) 4607-4613	64,66
24 - BALBONI, P.G., MINIA, A., GROSSI, M.P., BARBANTI-BRODANO, G., MATTIOLI, A., FIUME, L., Nature, 264 (1976) 181-183	19
25 - BALDWIN, R.W., in Neuro Oncology, Progress in Experimental Tumor Research, 29, (ROSE, F.C., FIELDS, W.S., ed.) S. KARGER AG (Basel), 1985, 140-151	21
26 - BARBANTI-BRODANO, G., FIUME, L., Nature, 243 (1973) 281-283	19
27 - BARKER, S.A., GIBLIN, A.G., GRAY, C.J., BOWEN, W.H., Carbohyd. Res., 36 (1974) 23-33	37
28 - BARONDES, S.H., in Annu. Rev. Biochem., 50 (1981) 207-231	59
29 - BARONDES, S.H., Science, 223 (1984) 1259-1264	57
30 - BARONDES, S.H., in The lectins : Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine (LIENER, I.I., SHARON, N., GOLDSTEIN, I.J, ed.), Acad. Press., 1986, 438-466	59
31 - BATES, D.A., FUNG, H., MACKILLOP, W.J., Cancer Lett., 28 (1985) 213-221	10,188, 189,194,202
32 - BAUES, R.J., GRAY, G.R., J. Biol. Chem., 252 (1977) 57-60	106

	Pages
33 - BAURAIN, R., ZENEBERGH, A., TROUET, A., J. Chromatogr., 157 (1978) 331-336	188
34 - BAYARD, B., MONTREUIL, J., Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci., 220 (1974) 209-218	98
35 - BEZOUSKA, K., TABORSKY, O., KUBRYCHT, J., POSPISIL, M., KOCOUREK, J., Biochem. J., 227 (1985) 345-354	148,149,152
36 - BLOMHOFF, R., TOLLESHAUG, H., BERG, T., J. Biol. Chem., 257 (1982) 7456-7459	64
37 - BLUMENTHAL, R., KLAUSNER, R.D., WEINSTEIN, J.N., Nature, 288 (1980) 333-338	71
38 - BLYTHMAN, H.E., CASELLAS, P., GROS, O., JANSEN, F.K., LAURENT, J.C., RICHER, G., VIDAL, H., in Monoclonal Antibodies and Cancer, (BOSS, B.D., LANGMAN, R., TROWBRIDGE, I., DULBECCO, R., ed.) Acad. Press, Orlando, 1983, 99-106	21
39 - BODMER, J.L., DEAN, R.T., in Methods in Enzymology, 112 (WIDDER, K.J., GREEN, R., ed.) Acad. Press, 1985, 298-308	43,44
40 - BOLDT, D.H., SPECKART, S.F., RICHARDS, R.L., ALVING, C.R., Biochim. Biophys. Res. Com., 74 (1977) 208-214	53
41 - BOROWITZ, M.J., STEIN, R.B., Arch. Pathol. Lab. Med., 108 (1984) 101-105	20
41a - BORCH, R.F, BERNSTEIN, N.D, DURST, H.D, J. Am. Chem. Soc., 93 (1971) 2897	106,153

	Pages
42 - BOUMA, J., BEIJNEN, J.H., BULT, A., UNDERBERG, W.J.M., Pharm. Weekbl. (Sci)., 8 (1986) 109-133	4,187
43 - BREITFELD, P.P., RUP, D., SCHWARTZ, A.L., J. Biol. Chem., 259 (1984) 10414-10421	84
44 - BRIDGES, K., HARFORD, J., ASHWELL, G., KLAUSNER, R.D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (1982) 350-354	78
45 - BRON, D., DELFORGE, A., STRYCKMANS, P., Eur. J. Cancer. Clin. Oncol., 21 (1985) 283-286	20,21 23
46 - BUMOL, T.F., WANG, Q.C., REISFELD, R.A., KAPLAN, N.O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 (1983) 529-533	42
46a - BUNTING, W.L, KIELY, J.M, OWEN, C.A., Proc. Soc. Exptl. Biol., 113 (1963) 370-377	122
47 - BURGER, R.L., SCHNEIDER, R.J., MEHLMAN, C.S., ALLEN, R.H., J. Biol. Chem., 250 (1975) 7707-7713	83
48 - CALENDI, E., DI MARCO, A., REGGIANI, M., SCARPINATO, B., VALENTINI, L., Biochim. Biophys. Acta., 103 (1965) 25	160
49 - CARL, P.L., CHAKRAVARTY, P.K., KATZENELLENBOGEN, J.A., WEBER, M.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (1980) 2224-2228	55
50 - CAWLEY, D.B., SIMPSON, D.L., HERSCHMAN, H.R., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 78 (1981) 3383-3387	51
51 - CHAHWALA, S.B., HICKMAN, J.A., Biochem. Pharmacol., 34 (1985) 1501-1505	10
52 - CHAIRES, J.B., DATTAGUPTA, N., CROTHERS, D.M., Biochemistry, 21 (1982) 3933-3940	9

	Pages
53 - CHAIRES, J.B., DATTAGUPTA, N., CROTHERS, D.M., Biochemistry, 24 (1985) 260-266	9
54 - CHERESH, D.A., VARKI A.P., VARKI, N.M., STALLCUP, W.B., LEVINE, J., REISFELD, R.A., J. Biol. Chem., 259 (1984) 7453-7459	43
55 - CHIACCHIA, K.B., DRICKAMER, K., J. Biol. Chem., 259 (1984) 15440-15447	71
56 - CHINAMI, M., KATO, T., OGURA, R., SHINGU, M., Biochem. Int., 8 (1984) 299-304	15
57 - CLARKE, B.L., WEIGEL, P.H., J. Biol. Chem., 260 (1985) 128-133	81,82,83
58 - COBBOLD, S.P., WALDMAN, H., Nature, 308 (1984) 460-462	23
59 - COLLYN D'HOOGHE, M., HEMON, D., MALAISE, E.P., Int. J. Radiat. Biol., 44 (1983) 267-274	126
60 - CONNOLLY, D.T., TOWNSEND, R.R., KAWAGUCHI, K., BELL., W.R., LEE, Y.C., J. Biol. Chem., 257 (1982) 939-945	67
61 - CREEK, K.E., SLY, W.S., J. Biol. Chem., 257 (1982) 9931-9937	131,150
62 - CRISSMAN, H.A., OKA, M.S., STEINKAMP, J.A., J. Histochem. Cytochem., 24 (1976) 64	128
63 - CRISSMAN, H.A., STEINKAMP, J.A., J. Cell. Biol., 59 (1973) 766	128

	Pages
64 - CROOKE, S.T., in Cancer and Chemotherapy, 3, (CROOKE, S.T., PRESTAYKO, A.W., ed.), Acad. Press., 1981, 111-132	4
65 - DALMARK, M., HOFFMAN, E.K., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 43 (1983) 241-248	187
66 - DANO, K., Biochim. Biophys. Acta, 323 (1973) 466-483	187
67 - DAVIES, K.J.A., DOROSHOW, J.H., J. Biol. Chem., 261 (1986) 3060-3067	15
68 - DAVIS, F.M., RAO, P.N., in Novel approaches to cancer chemotherapy, Cell Biology : A series of monographs, (SUNKARA, P.S., ed.) Acad. Press, 1984, 23-92	21
69 - DEBANNE, M.T., BOLYOS, M., GAULDIE, J., REGOECZI, E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984) 2995-2999	73
70 - DEBRAY, H., QIN, Z., DELANNOY, P., MONTREUIL, J., DUS, D., RADZIKOWSKI, C., CHRISTENSEN, B., KIELER, J., Int. J. Cancer, 37 (1986) 607-611	43
71 - DE DUVE, C., Biochem. J., 60 (1955) 604-617	113
72 - DELHAYE, M., DELPLACE-DELHAYE, F., MONTREUIL, J., DHAMELINCOURT, P., MERLIN, J.C., LENAIN, B., BOUSSEKEY, L., in Spectroscopy of Biological Molecules , Proceedings of the first European Conference on the spectroscopy of biological molecules, Reims, FRANCE, 1985, (ALIX, A.J.P., BERNARD, L., MANFAIT, M., ed.) John WILEY & Sons LTD, 1985, 51-53	49

	Pages
73 - DELHAYE, M., DHAMELINCOURT, P., MERLIN, J.C., LENAIN, B., DELPLACE-DELHAYE, F., FLAN, B., MONTREUIL, J., Second International Symposium on Drug Analysis, BRUXELLES, BELGIUM, 27-30 mai 1986	49
74 - DELOACH, J.R., SPRANDEL, U., GREEN, R., in Bibliotheca Haematologica, 51, Red Blood cells as carriers for drugs (DELOACH, J.R., SPRANDEL, U., ed.) S. KARGER, A.G., 1985, 157	24
75 - DELPLACE, F., FLAN, B., MONTREUIL, J., LENAIN, B., BARBILLAT, J., DELHAYE, M., ANALUSIS, 18 (1990) 27-31	49
76 - DELPLACE-DELHAYE, F., Thèse Doctorat 3è Cycle, 1982, (BIOCHIMIE) LILLE I	49
77 - DELPLACE-DELHAYE, F., Thèse Doctorat Etat, (Sciences Naturelles), USTLFA, 1988, LILLE	49,90,189
78 - DELPLACE-DELHAYE, F., FLAN, B., MONTREUIL, J., LENAIN, B., MERLIN, J.C., Laser Scattering spectroscopy of biological objects, PRAGUE, TCHECOSLOVAQUIE, 6-10 juillet 1986	49
79 - DENNIS, P.A., ARONSON, N.N.Jr., Biochim. Biophys. Acta, 798 (1984) 14-20	82
80 - DESCHUYTENEER, M., PRIEELS, J.P., MOSSELMANS, R., Biol. Cell., 50 (1984) 17-30	73
81 - DIENER, E., DINER, U.E., SINHA, A., XIE, S., VERGIDIS, R., Science, 231 (1985) 148	56

	Pages
82 - DI MARCO, A., ARCAMONE, F., ZUNINO, F., in Antibiotics, 3, (CORCORAN, J.W., HAHN, F.E., ed.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-NY, 1974, 101	7
83 - DI MARCO, A., GAETANI, M., OREZZI, P., SCARPINATO, B.M., SILVESTRINI, R., SOLDATI, M., DASDIA, T., VALENTINI, L., Nature, 201 (1964) 706	4
84 - DI PAOLA, M., MAXFIELD, F.R., J. Biol. Chem., 259 (1984) 9163-9171	79
85 - DODD, N.J.F., MUKHERJEE, T., Biochem. Pharmacol., 33 (1984) 379-386	15
86 - DOROSHOW, J.H., DAVIES, K.J.A., J. Biol. Chem., 261 (1986) 3068-3074	15
87 - DRICKAMER, K., J. Biol. Chem., 256 (1981) 5827-5839	85
88 - DRICKAMER, K., MAMON, J.F., BINNS, G., LEUNG, J.O., J. Biol. Chem., 259 (1984) 770-778	84
89 - DUNN, W.A., HUBBARD, A.L., ARONSON, N.N.Jr., J. Biol. Chem., 255 (1980) 5971-5978	76
90 - DUNN, W.A., LABADIE, J.H., ARONSON, N.N.Jr., J. Biol. Chem., 254 (1979) 4191-4196	82
91 - DU VERNAY, V.H., in Cancer and Chemotherapy, 3, (CROOKE, S.T., PRESTAYKO, A.W., ed.) Acad. Press, 1981, 233-271	4
92 - EHRKE, M.J., MACCUBBIN, D., RYOYAMA, K., COHEN, S.A., MIHICH, E., Cancer Res., 46 (1986) 54-60	11

	Pages
93 - EHRLICH, P., in Studies in Immunity, Wiley, N.Y, 1906, 441	2
94 - EMBLETON, M.J., GARNETT, M.C., in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy (BALDWIN, R.W., BYERS, V.S., ed.) Acad Press, 1985, 317-344	21
95 - EMBLETON, M.J., PIMM, M.V., BALDWIN, R.W., in Basic Mechanisms and Clinical treatment of Tumor Metas- tasis, (TORISU, M., YOSHIDA, T., ed.) Acad. Press, Orlando, 1985, 485-510	21
96 - ERNST, P., Scand. J. Haematol., 11 (1973) 13	216
97 - FEIZI, T., in Genes and antigens in Cancer Cells. The Monoclonal Antibody Approach, Contribution to Oncology, 19, (RIETHMULLER, G., KOPROWSKI, H., KLEIST, S.V., MUNK, K., ed.), S. KAGER AG (Basel), 1984, 51-63	43
98 - FEIZI, T., Nature, 314 (1985) 53-57	41
99 - FELDMAN, H.A., J. Biol. Chem., 258 (1983) 12865-12867	144
100 - FIETE, D., BROWNELL, M.D., BAENZIGER, J.U., J. Biol. Chem., 258 (1983) 817-823	78
101 - FILIPOVICH, A.H., VALLERA, D.A., YOULE, R.J., NEVILLE, D.M., KERSEY, J.H., Transplant. Proc., 17 (1985) 442-444	56
102 - FISCHER, H.D., CREEK, K.E., SLY, W.S., J. Biol. Chem., 257 (1982) 9938-9943	131

	Pages
103 - FISCHER, H.D., CREEK, K.E., STRISCIUGLIO, P., SLY, W.S., J. Cell Biochem., 22 (1983) 69-86	131
103a - FISCHER, E., RUND, C., BER., 49 (1916) 93-99	108
104 - FIUME, L., BASSI, B., BUSI, C., MATTIOLI, A., SPINOSA, G., Biochem. Pharmacol., 35 (1986) 967-972	48
105 - FIUME, L., BUSI, C., MATTIOLI, A., FEBS Lett., 146 (1982) 42-46	48
106 - FIUME, L., BUSI, C., MATTIOLI, A., FEBS Lett., 153 (1983) 6-9	47
107 - FIUME, L., BUSI, C., MATTIOLI, A., BALBONI, P.G., BARBANTI-BRODANO, G., FEBS Lett., 129 (1981) 261-264	48
108 - FIUME, L., MATTIOLI, A., BALBONI, P.G., TOGNON, M., BARBANTI-BRODANO, G., DE VRIES, J., WIELAND, Th., FEBS Lett., 103 (1979) 47-51	47
109 - FIUME, L., MATTIOLI, A., BUSI, C., BALBONI, P.G., BARBANTI-BRODANO, G., DE VRIES, J., ALTMANN, R., WIELAND, Th., FEBS Lett., 116 (1980) 185-188	47
110 - FOLKERS, K., LIU, M., WATANABE, T., PORTER, T.H., Biochem. Biophys. Res. Com., 77 (1977) 1536	15
111 - FOURNET, B., D.E.A. Biochimie Appliquée, Université des Sciences et Techniques de LILLE, 1968	92
112 - FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIAGENTHART, J.F.G., BINETTE, J.P., SCHMID, K., Biochemistry, 17 (1978) 5206-5214	67,92,93

	Pages
113 - FRAKER, P.J., SPECK, J.C.Jr., Biochem. Biophys. Res. Com., 80 (1978) 849-857	118
114 - FUKUSHI, Y., HAKOMORI, S.I., NUDELMAN, E., COCHRAN, N., J. Biol. Chem., 259 (1984) 4681-4685	42
115 - FUKUSHI, Y., NUDELMAN, E., LEVERY, S.B., HAKOMORI, S.I., RAUVALA, H., J. Biol. Chem., 259 (1984) 10511-10517	42
116 - GABBAY, E.J., GRIER, D., FINGERLE, R.E., REIMER, R., LEVY, R., PEARCE, S.W., WILSON, W.D., Biochemistry, 15 (1976) 2062-2070	7
117 - GABIUS, H.J., ENGELHARDT, R., CRAMER, F., Med. Hypothesis, 18 (1985) 47-50	45
118 - GARDNER, C.R., Biomaterials, 6 (1985) 153-160	56
119 - GIANNI, L., ZWEIER, J.L., LEVY, A., MYERS, C.E., J. Biol. Chem., 260 (1985) 6820-6826	11
120 - GILLILAND, D.G., COLLIER, R.J., MOEHRING, J.M., MOEHRING, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978) 5319-5323	39
121 - GOHDE, W., in Fluorescence Techniques in Cell Biology, (THAER, A.A., SERNETZ, M., ed.) SPRINGER, NY, 1973, 79	216
122 - GOLDMAN, R., FEBS Lett., 46 (1974) 203-208	34
123 - GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N., Nature, 285 (1980) 66	34

	Pages
124 - GRAY, G.R., Arch. Biochem. Biophys., 163 (1974) 426-428	106,107, 152
125 - GRAY, G.R., Methods in Enzymology, 50, (GINSBURG, V., ed.) Acad Press, 1978, 155-160	105
126 - GREEN, M.D., SPEYER, J.L., MUGGIA, F.M., Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 20 (1984) 293-296	16
127 - GREGORIADIS, G., in Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases, (TAGER, J.M., HOOGHWINKEL, G.J.M., DAEMS, W.T., ed.) North-Holland/American Elsevier, 1974, 131-148	52
128 - GREGORIADIS, G., Nature, 265 (1977) 407-411	17,18 31,151
129 - GREGORIADIS, G., ed., Drug Carriers in Biology and Medicine, Acad. Press, 1979	17
130 - GREGORIADIS, G., in Drug Carriers in Biology and Medicine, (GREGORIADIS, G., ed.) Acad. Press, 1979, 287-341	26,27
131 - GREGORIADIS, G., Nature, 283 (1980) 814-815	26
132 - GREGORIADIS, G., ALLISON, A.C., ed., Liposomes in Biological Systems, John Wiley and Sons, CHICHESTER, 1980	26
133 - GREGORIADIS, G., MORELL, A.G., STERNLIEB, I., SCHEINBERG, I.H., J. Biol. Chem., 245 (1970) 5833-5837	82

	Pages
134 - GREGORIADIS, G., NEERUNJUN, E.D., Biochem. Biophys. Res. Com., 65 (1975) 537-544	52
135 - GREGORIADIS, G., SENIOR, J., TROUET, A., ed., Targeting of drugs, Plenum Press, NY, 1982	26
136 - GUEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.J.A.M., LODISH, H.F., SCHWARTZ, A.L., Cell, 32 (1983) 277-287	79
137 - HAIMES, H.B., STOCKERT, R.J., MORELL, A.G., NOVIKOFF, A.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 6936-6939	82
138 - HAKOMORI, S.I., Cancer Res., 45 (1985) 2405-2414	40,41
139 - HAKOMORI, S.I., NUDELMAN, E., LEVERY, S.B., REIJI, K., J. Biol. Chem., 259 (1984) 4672-4681	42
140 - HAKOMORI, S.I., WANG, S.M., YOUNG, W.W.Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 3023-3027	41
141 - HAKOMORI, S.I., YOUNG, W.W.Jr., Scand. J. Immunol., 7 (1978) 97-117	41
142 - HARDY, M.R., TOWNSEND, R.R., PARKHURST, S.M., LEE, Y.C., Biochemistry, 24 (1985) 22-28	68,69
143 - HARFORD, J., ASHWELL, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 1557-1561	71
144 - HARFORD, J., ASHWELL, G., in The Glycoconjugates, 4, (HOROWITZ, M.I., ed.) Acad. Press, NY, 1982, 27-55	62

	Pages
145 - HARFORD, J., ASHWELL, G., in Endocytosis, (PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C., ed.) Plenum Publishing Corp., 1985, 69-84	62
146 - HARFORD, J., BRIDGES, K., ASHWELL, G., KLAUSNER, R.D., J. Biol. Chem., 258 (1983) 3191-3197	79
147 - HARFORD, J., KLAUSNER, R.D., WOLKOFF, A.W., BRIDGES, K.R., ASHWELL, G., in Endogenous Lectins, AUSSOIS-FRANCE, INSERM-CNRS Colloquium on The role of Carbohydrates in Cellular Recognition, 1984, 24-25	25
148 - HELENIUS, A., MELLMAN, I., WALL, D., HUBBARD, A., Trends Biochem. Sci., 8 (1983) 245-250	72
148a - HERISSEY, H., FLEURY, P., JOLY, N., J. Pharm. et Chim., 20 (1934) 149	108
149 - HICKMAN, J., ASHWELL, G., MORELL, A.G., VAN DEN HAMER, C.J.A., SCHEINBERG, I.H., J. Biol. Chem., 245 (1970) 759-766	59
150 - HILDENBRANDT, G.R., ARONSON, N.N., Biochim. Biophys. Acta, 631 (1980) 499-502	53
151 - HILLEN, H.F.P., WESSELS, J.M.C., HAANEN, C.A.M., Cell proliferation patterns in acute leukemia monitored by pulse-cytophotometry (HILLEN, H.F.P., WESSELS, J.M.C., HAANEN, C.A.M., ed.) European Press Medikon, 1975, 75-93	215
152 - HOLLAND, E.C., LEUNG, J.O., DRICKAMER, K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984) 7338-7342	85
153 - HORTON, D., PRIEBE, W., VARELA, O., J. Antibiot., 37 (1984) 853	173

	Pages
154 - HSUEH, E.C., HOLLAND, E.C., CARRERA, G.M.Jr., DRICKAMER, K., J. Biol. Chem., 261 (1986) 4940-4947	88
155 - HUDGIN, R.L., PRICER, W.E.Jr., ASHWELL, G., STOCKERT, R.J., MORELL, A.G., J. Biol. Chem., 249 (1974) 5536-5543	62
156 - ISRAEL, M., MODEST, E.J., FREI, E., Cancer Res., 35 (1975) 1365	172
157 - JAMIESON, G.A., JETT, M., DE BERNARDO, S.L., J. Biol. Chem., 246 (1971) 3686-3693	67
158 - JENSEN, R.A., ACTON, E.M., PETERS, J.H. J. Cardiovasc. Pharmacol., 6 (1984) 186-200	13,14
159 - KALOVS, V., Biochim. Biophys. Acta, 107 (1965) 139-141	96
160 - KAWASAKI, T., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 251 (1976) 1296-1302	64
161 - KAWASAKI, T., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 251 (1976) 5292-5299	62
162 - KAYE, S., MERRY, S., Cancer Chemother. Pharmacol., 14 (1985) 96-103	16
163 - KIEDA, C.M.T., DELMOTTE, F.M., MONSIGNY, M.L.P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 168-172	40
164 - KITAO, T., HATTORI, K., Nature, 265 (1977) 81-82	38

	Pages
165 - KLAUSNER, R.D., BRIDGES, K., TSUNOO, H., BLUMENTHAL, R., WEINSTEIN, J.N., ASHWELL, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (1980) 5087-5091	71
166 - KLOTZ, I.M., Science, 217 (1982) 1247-1249	144,145,146
167 - KNOWLES, B.B., HOWE, C.C., ADEN, D.P., Science, 209 (1980) 497-499	115
168 - KOHLER, G., MILSTEIN, C., Nature, 256 (1975) 495-497	20
169 - KOLB-BACHOFEN, V., Biochim. Biophys. Acta, 645 (1981) 293-299	70
170 - LABADIE, J.H., CHAPMAN, K.P., ARONSON, N.N.Jr. Biochem. J., 152 (1975) 271-279	82
171 - LARSON, S.M., J. Nucl. Med., 26 (1985) 538-545	21
172 - LEE, R.T. Biochemistry., 21 (1982) 1045-1050	68
173 - LEE, Y.C., TOWNSEND, R.R., HARDY, M.R., LÖNNGREN, J., ARNARP, J., HARALDSSON, M., LÖNN, H., J. Biol. Chem., 258 (1983) 199-202	68,130,148, 149,150,152
174 - LEUNG, J.O., HOLLAND, E.C., DRICKAMER, K., J. Biol. Chem., 260 (1985) 12523-12527	88,89
175 - LEWIS, W., BECKENSTEIN, K., SHAPIRO, L., PUSZKIN, S., Exptl. Mol. Pathol., 43 (1985) 64-73	172

	Pages
176 - LIENER, I.E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I.J., ed., The Lectins : properties, functions and applications in Biology and Medicine, Acad. Press, 1986	57
177 - LIS, H., SHARON, N., Annu. Rev. Biochem., 43 (1973) 541-574	34
178 - LOWE, M., NILSSON, B., J. Biol. Chem., 258 (1983) 1885-1887	62,63
179 - LOWN, J.W., SONDHI, S.M., SHAU-FUNG YEN, PLAMBECK, J.A., PETERS, J.H., ACTON, E.M., GORDON, G.R., Drugs Exptl. Clin. Res., 10 (1984) 735-744	12
180 - LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, J.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., J. Biol. Chem., 192 (1951) 265-275	119
181 - MAGNANI, J.L., GINSBURG, V., Monoclonal Antibodies and Cancer, (BOSS, B.D., LANGMAN, R., TROWBRIDGE, I., DULBECCO, R., ed.) Acad. Press, Orlando, 1983, 251-260	43
182 - MARIE, J.P., THEVENIN, D., ZITTOUN, R., Nouv. Rev. FR. Hematol., 27 (1985) 163-168	202,204
183 - MARSH, W., CENTER, M.S., Biochem. Pharmacol., 34 (1985) 4180-4184	16
184 - MARX, J.L., Science, 216 (1982) 283-285	21
185 - MATHE, G., LOC, T.B., BERNARD, J., C.R. Acad. Sci. (Paris), 246 (1958) 1626	2

	Pages
186 - MAYHEW, E., Liposome Letters, (BANGHAM, A.D., ed.) Acad. Press LONDON, 1983, 357-368	30
187 - MAYNARD, Y., BAENZIGER, J.U., J. Biol. Chem., 256 (1981) 8063-8068	131
188 - MC BRIDE, W.H., Handbook of Exptl. Immunology in 3 vol., Cellular Immunology, 2, (WEIR, D.M., ed.) Blackwell Scientific Publications, 1978, 36.1-36.14	122
189 - MIKHAIL, J.W., MANSOUR, N.S., KHAYYAL, M.T., Exptl. Parasitol., 37 (1975) 348	33
190 - MOLTENI, L., Drug Carriers in Biology and Medicine (GREGORIADIS, G., ed.) Acad. Press, 1979, 107-125	33
191 - MONSIGNY, M., KIEDA, C., ROCHE, A.C., Biol. Cell., 36 (1979) 289-300	58,59
192 - MONSIGNY, M., KIEDA, C., ROCHE, A.C., Biol.Cell., 47 (1983) 95-110	36,43,46
193 - MONSIGNY, M., KIEDA, C., ROCHE, A.C., DELMOTTE, F., FEBS Lett., 119 (1980) 181-186	38,49,50
194 - MONSIGNY, M., ROCHE, A.C., BAILLY, P., Biochem. Biophys. Res. Com., 121 (1984) 579-584	51
194a - MONSIGNY, M., ROCHE, A.C., MIDOUX, P., Ann. N.Y. Acad. Sci., 551 (1988) 399-414	45
195 - MONTREUIL, J., Comprehensive Biochemistry, 19B P.II, (NEUBERGER, A., ed.) Elsevier Scientific Publishing Company, 1982, 1-188	32

	Pages
196 - MONTREUIL, J., DEBRAY, H., DEBEIRE, P., DELANNOY, P., Structural Carbohydrates of the Liver, Falk Symposium, (POPPER, H., REUTTER, W., KÖTTGEN, E., GUDAT, F., ed.) M.T.P. Press, 1983, 239-258	34
197 - MONTREUIL, J., SPIK, G., Monographies du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de LILLE, 1 (1963) 21-31	100
198 - MORE, R., YRON, I., BEN SASSON, S., WEISS, D.W., Cell. Immunol., 15 (1975) 382	122
199 - MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, I.H., HICKMAN, J., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 246 (1971) 1461-1467	59,62,67
200 - MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB, I., SCHEINBERG, I.H., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 243 (1968) 155-159	57,59,60,130
201 - MORELL, A.G., SCHEINBERG, I.H., Biochem. Biophys. Res. Com., 48 (1972) 808-815	62
202 - MYERS, C., Monoclonal Antibodies for cancer detection and therapy (BALDWIN, R.W., BYERS, V.S., ed.) Acad. Press, 1985, 249-268	56
203 - MYERS, C., ZWEIER, J., GIANNI, L., BATIST, J., SINHA, B., MUINDI, J., KLECKER, R., YEH, G., Leukemia : Recent advances in Biology and Treatment, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New series, 28, (GALE, R.P., GOLDE, D.W., ed.) Alan R Liss Inc, 1985, 537-546	6,11
204 - NAKADA, H., SAWAMURA, T., TASHIRO, Y., J. Biochem., 89 (1981) 135-141	71

	Pages
205 - NEIDLE, S., in Top. Antibiot. Chem., 2, (SAMMES, P.G., ed.) Halsted Press, 1978, 240-278	6,11
206 - NEUBERGER, M.S., WILLIAMS, G.T., FOX, R.O., Nature, 312 (1984) 604-608	23
207 - NEUFELD, E.F., ASHWELL, G., in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, 6, (LENNARZ, W.J., ed.), Plenum Press, 1980, 241-266	57
208 - NOEL, G., PETERSON, C., TROUET, A., TULKENS, P., Eur. J. Cancer, 14 (1978) 363-368	188
209 - NUDELMAN, E., FUKUSHI, Y., LEVERY, S.B., HIGUCHI, T., HAKOMORI, S.I., J. Biol. Chem., 261 (1986) 5487-5495	42
210 - NUDELMAN, E., KANNAGI, R., HAKOMORI, S.I., LIPINSKI, M., WIELS, J., PARSON, M., FELLOUS, M., TURSZ, T., Science, 220 (1983) 508-511	42
211 - NUSS, M.E., JAMES, T.L., APPLE, M.A., KOLLMAN, P.A., Biochim. Biophys. Acta, 609 (1980)136-147	7
212 - OFFORD, R.E., PITT, E., LEWIS, D., Drug Targeting, Intl. Symp. on Drug Targeting (BURI, P., GUMMA, A., ed.) Elsevier Science Publ. BV, 1985, 13-24	24
213 - OKA, J.A., WEIGEL, P.H., J. Biol. Chem., 258 (1983) 10253-10262	79
214 - OKANO, T., OHNUMA, T., EFREMIDIS, A., HOLLAND, J.F., Cancer Treat. Rep., 67 (1983) 1075-1078	16

	Pages
215 - O'KEEFE, D.O., DRAPER, R.K., J. Biol. Chem., 260 (1985) 932-937	52
216 - OKI, T., Stud. Biophys., 104 (1985) 169-200	176
217 - OKI, T., MATSUZAWA, Y., YOSHIMOTO, A., NUMATA, K., KITAMURA, I., HORI, S., TAKAMATSU, A., UMEZAWA, H., ISHIZUKA, M., NAGANAWA, H., SUDA, H., HAMADA, M., TAKEUCHI, T., J. Antibiot., 28 (1975) 830	176
218 - OLSNES, S., PIHL, A., FEBS Lett., 20 (1972) 327-329	34
219 - O'NEILL, G.J., in Drug Carriers in Biology and Medicine, (GREGORIADIS, G., ed.) Acad. Press, 1979, 23-41	21
220 - OTA, K., Drugs Exptl. Clin. Res., 11 (1985) 17-22	176
221 - PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C., Trends Biochem. Sci., 8 (1983) 250-254	73,74
222 - PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C., in Endocytosis, (PASTAN, I., WILLINGHAM, M.C., ed.) Plenum Publishing Corp., 1985, 1-44	73,75
223 - PAULSON, J.C., HILL, R., TANABE, T., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 252 (1977) 8624-8628	64,65
224 - PAWELSKI, S., MAJ, S., in First Intl. Symposium on Pulse-Cytophotometry, (HAANEN, C.A.M., HILLEN, H.F.P., WESSELS, J.M.C., ed.) European Press Medikon, 1975, 286-292	215

	Pages
225 - PETERS, J.H., GORDON, G.R., KASHIWASE, D., ACTON, E.M., HUNT, C.A., Cancer Res., 43 (1983) 1477	173
226 - PLANCKE, Y., MONTREUIL, J., in Proc. of the VII th. Int. Symp. of Biochemistry, HOUSTON-TEXAS, (DAVIDSON, E.A., WILLIAMS, J.C., DI FERRANTE, N.M., ed.), 1985, 91	43
227 - PONPIPOM, M.M., BUGIANESI, R.L., ROBBINS, J.C., DOEBBER, T.W., SHEN, T.Y., J. Med. Chem., 24 (1981) 1388-1395	51,151
228 - POSTE, G., KIRSH, R., BUGELSKI, P., in Novel Approaches to Cancer Chemotherapy, Cell Biology : a series of monographs (SUNKARA, P.S., ed.) Acad. Press, 1984, 165-230	26
229 - PRICER, W.E.Jr., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 246 (1971) 4825-4833	60,70,80
230 - PRICER, W.E.Jr., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 251 (1976) 7539-7544	80
231 - PUCK, T.T., MARCUS, P.I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 41 (1955) 432-437	124
232 - PUCK, T.T., MARCUS, P.I., J. Exptl. Med., 103 (1956) 653-666	124
233 - QUIGLEY, G.J., WANG, A.H.I., UGHETTO, G., VAN DER MAREL, G., VAN BOOM, J.H., RICH, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (1980) 7204-7208	7,8
234 - RASO, V., BASALA, M., J. Biol. Chem., 259 (1984) 1143-1149	52

	Pages
235 - REGOECZI, E., HATTON, M.W.C., WONG, K.L., Can. J. Biochem., 52 (1974) 155-161	67
236 - REGOECZI, E., TAYLOR, P., HATTON, M.W.C., WONG, K.L., KOJ, A., Biochem. J., 174 (1978) 171-178	67
237 - ROBBINS, J.C., LAM, M.H., TRIPP, C.S., BUGIANESI, R.L., PONPIPOM, M.M., SHEN, T.Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 7294-7298	51,151
238 - ROCHE, A.C., BAILLY, P., MONSIGNY, M., Invasion and Metastasis, 5 (1985) 218-232	51
239 - ROCHE, A.C., BARZILAY, M., MIDOUX, P., JUNQUA, S., SHARON, N., MONSIGNY, M., J. Cell. Biochem., 22 (1983) 131-141	52
240 - ROGERS, J.C., KORNFELD, S., Biochem. Biophys. Res. Com., 45 (1971) 622-629	45
241 - ROLIN-VAN SWIETEN, D., SCHNEIDER, Y.J., LESUR, B., BAURAIN, R., TROUET, A., Arch. Inter. Physiol. Bioch., 92 (1984) B57-58	48
242 - ROSENFELDER, G., YOUNG, W.W.Jr, HAKOMORI, S.I., Cancer Res., 37 (1977) 1333-1339	41
243 - RYMAN, B.E., TYRRELL, D.A., in Liposomes in Biology and Pathology, (DINGLE, J.T., JACQUES, P.J., SHAW, I.H., ed.) North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1979, 549-574	26
244 - SAHAGIAN, G.G., in Endogenous lectins, AUSSOIS-FRANCE, INSERM-CNRS Colloquium on the Role of Carbohydrates in Cellular Recognition, 1984, 26	131

	Pages
245 - SANDERSON, C.J., Transplantation, 21 (1976) 526	122
246 - SARKAR, M., LIAO, J., KABAT, E.A., TANABE, T., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 254 (1979) 3170-3174	66,130
247 - SCATCHARD, G., Ann. NY Acad. Sci., 51 (1949) 660-672	143
248 - SCHULTE, H., MONSIGNY, M., Biol. Cell., 42 (1981) 13-18	80
249 - SCHWARTZ, A.L., FRIDOVICH, S.E., KNOWLES, B.B., LODISH, H.F., J. Biol. Chem., 256 (1981) 8878-8881	48,115,116 118,178,180,202
250 - SCHWARTZ, A.L., FRIDOVICH, S.E., LODISH, H.F., J. Biol. Chem., 257 (1982) 4230-4237	115
251 - SCHWARTZ, A.L., MARCHAK-ROJHSTEIN, A., RUP, D., LODISH, H.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 3348-3352	84
252 - SCHWARTZ, A.L., RUP, D., J. Biol. Chem., 258 (1983) 11249-11255	66,84
253 - SCHWARTZ, A.L., RUP, D., LODISH, H.F., J. Biol. Chem., 255 (1980) 9033-9036	70
254 - SCHWARTZ, A.L., STEER, C.J., KEMPNER, E.S., J. Biol. Chem., 259 (1984) 12025-12029	66
255 - SCHWARTZ, B.A., GRAY, G.R., Arch. Biochem. Biophys., 181 (1977) 542	106

	Pages
256 - SEGLEN, P.O., in Methods in Cell Biology, 13 (PRESCOTT, D.M., ed.) Acad. Press, NY, San Francisco, London, 1976, 29-83	101
257 - SEON, B.K., Cancer Res., 44 (1984) 259-264	43
258 - SEON, B.K., NEGORO, S., BARCOS, M.P., TEBBI, C.K., CHERVINSKY, D., FUKUKAWA, T., J. Immunol., 132 (1984) 2089-2095	42
259 - SHARON, N., in Glycoconjugate Research, 1, (JEANLOZ, R.W., GREGORY, J.R., ed.) 1979, 459-491	59
260 - SHARON, N., LIS, H., Science, 177 (1972) 949-959	34
261 - SHEN, W.C., RYSER, J.P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 81 (1984) 1445-1447	23
262 - SHIER, W.T., in Drug Carriers in Biology and Medicine, (GREGORIADIS, G., ed.) Acad. Press, 1979, 43-70	37
263 - SHIER, W.T., LIN, Y., DE VRIES, A.L., FEBS Lett., 54 (1975) 135-138	35
264 - SHIER, W.T., TROTTER, J.T., ASTUDILLO, D.T., Int. J. Cancer, 18 (1976) 672-678	37
265 - SHOHAM, J., INBAR, M., SACHS, L., Nature (London), 227 (1970) 1244-1246	35
266 - SIEGFRIED, J.M., BURKE, T.G., TRITTON, T.R., Biochem. Pharmacol., 34 (1985) 593-598	187

	Pages
267 - SIEGFRIED, J.M., SARTORELLI, A.C., TRITTON, T.R., Cancer Biochem. Biophys., 6 (1983) 137-142	10,189
268 - SIMPSON, D.L., THORNE, D.R., LOH, H.H., Life Sciences, 22 (1978) 727-748	59
269 - SLY, W.S., in Adv. Exptl. Med. Biol., Structure and function of Gangliosides, 125 (1980) 433-451	131
270 - SLY, W.S., FISCHER, H.D., J. Cell. Biochem., 18 (1982) 67-85	131
271 - SORIANO, P., DIJKSTRA, J., LEGRAND, A., SPANJER, H., LONDOS-GAGLIARDI, D., ROERDINK, F., SCHERPHOF, G., NICOLAU, C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 (1983) 7128-7131	53
272 - SPIESS, M., LODISH, H.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 (1985) 6465-6469	85,87
273 - SPIESS, M., SCHWARTZ, A.L., LODISH, H.F., J. Biol. Chem., 260 (1985) 1979-1982	85,86
274 - STEER, C.J., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 255 (1980) 3008-3013	70,72,81,148,149
275 - STEER, C.J., KEMPNER, E.S., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 256 (1981) 5851-5856	64
276 - STIRPE, F., OLSNES, S., PIHL, A., J. Biol. Chem., 255 (1980) 6947-6953	39
277 - STOCKERT, R.J., in Receptor Mediated Endocytosis, Receptors and Recognition, B-15, (CUATRECASAS, P., ROTH, T., ed.), Chapman and Hall LTD, 1983, 167-186	62

	Pages
278 - STOCKERT, R.J., HAIMES, H.B., MORELL, A.G., NOVIKOFF, P.M., NOVIKOFF, A.B., QUINTANA, N., STERNLIEB, I., Lab. Invest., 43 (1980) 556-563	72
279 - STOCKERT, R.J., HOWARD, D.J., MORELL, A.G., SCHEINBERG, I.H., J. Biol. Chem., 255 (1980) 9028-9029	80
280 - STOCKERT, R.J., MORELL, A.G., SCHEINBERG, I.H., Science, 186 (1974) 365-366	57
281 - STOWELL, C.P., LEE, Y.C., J. Biol. Chem., 253 (1978) 6107-6110	66
282 - STRIJCKMANS, P.A., MANASTER, J., LACHAPELLE, F., SOQUET, M., J. Clin. Invest., 52 (1973) 126	216
283 - SULLIVAN, S.M., CONNOR, J., HUANG, L., Med. Res. Rev., 6 (1986) 171-196	21
284 - SUNDAN, A., SANDVIG, K., OLSNES, S., Biochim. Biophys. Acta, 761 (1983) 296-302	40
285 - SUROLIA, A., BACHHAWAT, B.K., PODDER, S.K., Nature, 257 (1975) 802-804	53
286 - TAKAHASHI, T., NAKADA, H., OKUMURA, T., SAWAMURA, T., TASHIRO, Y., Biochem. Biophys. Res. Com., 126 (1985) 1054-1060	85
287 - TAKI, T., HIRABAYASHI, Y., ISHIKAWA, H., ANDO, S., KON, K., TANAKA, Y., MATSUMOTO, M., J. Biol. Chem., 261 (1986) 3075-3078	43
288 - TANABE, T., PRICER, W.E.Jr., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 254 (1979) 1038-1043	64

	Pages
289 - TOLLESHAUG, H., Int. J. Biochem., 13 (1981) 45-51	70,72,132,135
288 - TANABE, T., PRICER, W.E.Jr., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 254 (1979) 1038-1043	64
290 - TOLLESHAUG, H., BERG, T., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 361 (1980) 1155-1164	70,136
291 - TOLLESHAUG, H., BERG, T., NILSSON, M., NORUM, K.R., Biochim. Biophys. Acta, 499 (1977) 73-84	70,82,136,142
292 - TOLLESHAUG, H., KOLSET, S.O., BERG, T., Biochem. Pharmacol., 34 (1985) 1639-1646	82
293 - TONE, H., NISHIDA, H., TAKEUCHI, T., UMEZAWA, H., Drugs Exptl. Clin. Res., 11 (1985) 9-16	176
294 - TONG, G.L., WU, H.Y., SMITH, T.H., HENRY, D.W., J. Med. Chem., 22 (1979) 912	173,175
295 - TOONEN, P.A.H.M., CROMMELIN, D.J.A., Pharmaceut. Weekbl., 5 (1983) 269-280	21
296 - TRITTON, T.R., YEE, G., Science, 217 (1982) 248-250	10,189
297 - TROUET, A., DEPRez DE CAMPENEERE, D., BAURAIN, R., HYUBRECHTS, M., ZENEBERGH, A., in Drug Carriers in Biology and Medicine, (GREGORIADIS, G., ed.) Acad. Press, 1979, 87-106	23
298 - TROUET, A., DEPRez DE CAMPENEERE, D., BAURAIN, R., SCHNEIDER, Y.J., in Drug Design : Fact or Fantasy, Proceedings of the Third Rhône -Poulenc Round Table Conference (JOLLES, G., WOOLDRIDGE, K.R.H., ed.) Acad. Press, 1984, 3-19	48

	Pages
299 - TROUET, A., DEPRez-DE-CAMPENEERE, D., DE DUVE, C., Nature (London) New Biol, 239 (1972) 110-112	17,23
300 - TROUET, A., JOLLES, G., Seminars in Oncology, 11 (1984) 64	23
301 - TROUET, A., MASQUELIER, M., BAURAIN, R., DEPRez-DE- CAMPENEERE, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (1982) 626-629	19,49
302 - TROUET, A., SCHNEIDER, Y.J., in Drug Targeting, Intl., Symp. on Drug Targeting (BURI, P., GUMMA, A., ed.) Elsevier Science Publ. B.V., 1985, 1-12	56
303 - TSUKADA, Y., HURWITZ, E., KASHI, R., SELA, M., HIBI, N., HARA, A., HIRAI, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (1982) 7896-7899	16
304 - TYCKO, B., KEITH, C.H., MAXFIELD, F.R., J. Cell. Biol., 97 (1983) 1762-1776	79
305 - UCHIDA, T., YAMAIZUMI, M., MEKADA, E., OKADA, Y., TSUDA, M., KAROKAWA, T., SUGINO, Y., J. Biol. Chem., 253 (1978) 6307-6310	39
306 - UNVERFERTH, D.V., JAGADEESH, J.M., UNVERFERTH, B.J., MAGORIEN, R.D., LEIER, C.V., BALCERZAK, S.P., J. Nat. Cancer. Inst., 71 (1983) 917-920	13
307 - URDAL, D.L., HAKOMORI, S.I., J. Biol. Chem., 255 (1980) 10509-10516	41
308 - VAN BERKEL, T.J.C., KRUIJT, J.K., KEMPEN, H.J.M., J. Biol. Chem., 260 (1985) 12203-12207	55

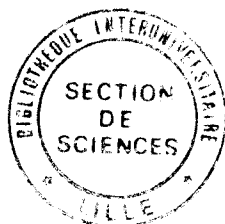
	Pages
309 - VAN BERKEL, T.J.C., KRUIJT, J.K., SPANJER, H.H., NAGELKERKE, J.F., HARKES, L., KEMPEN, H.J.M., J. Biol. Chem., 260 (1985) 2694-2699	53
310 - VAN DEN BOSCH, R.A., GUEUZE, H.J., STROUS, G.J., Exptl. Cell. Res., 162 (1986) 231-242	80
311 - VAN DER SLUIJS, P., OOSTING, R., WEITERING, J.G., HARDONK, M.J., MEIJER, D.K.F., Biochem. Pharmacol., 34 (1985) 1399-1405	83
312 - VAN HEYNINGEN, S., Trends Biochem. Sci., 1 (1976) 114-116	39
313 - VAN HEYNINGEN, S., FEBS Lett., 164 (1983) 132-134	40
314 - VAN HOESEL, Q.G.C.M., STEERENBERG, P.A., CROMMELIN, D.J.A., VAN DIJK, A., VAN OORT, W., KLEIN, S., DOUZE, J.M.C., DE WILDT, D.J., HILLEN, F.C., Cancer Res., 44 (1984) 3698-3705	16
315 - VAN LENTEN, L., ASHWELL, G., J. Biol. Chem., 246 (1971) 1889-1894	108
316 - VITETTA, E.S., CUSHLEY, W., UHR, J.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 (1983) 6332-6337	40
317 - VITETTA, E.S., UHR, J.W., Cell., 41 (1985) 653-654	21
318 - VON HOFF, D.D., ROZENCWEIG, M., LAYARD, M., SLAVIK, M., MUGGIA, F.M., Am. J. Med., 62 (1977) 200-208	13

	Pages
319 - WALKER, E.M.Jr., GALE, G.R., GLASSMAN, A.B., ATKINS, L.M., BENNETT, C.E., BURGIS, J.T., Ann. Clin. Lab. Sci., 14 (1984) 10-20	35
320 - WALL, D.A., HUBBARD, A.L., J. Cell. Biol., 101 (1985) 2104-2112	73
321 - WALL, D.A., TOWNSEND, R.R., LEE, Y.C., HUBBARD, A.L., J. Cell. Biol., 95 (1982) 425	83
322 - WALL, D.A., WILSON, G., HUBBARD, A.L., Cell, 21 (1980) 79-93	70,72,82
323 - WARD, D.C., REICH, E., GOLDBERG, I.H., Science, 149 (1965) 1259-1263	6
324 - WARREN, R., DOYLE, D., J. Biol. Chem., 256 (1981) 1346-1355	81,84
325 - WEIGEL, P.H., J. Biol. Chem., 255 (1980) 6111-6120	70,78,136,144
326 - WEIGEL, P.H., J. Cell. Biol., 87 (1980) 855-861	71
327 - WEIGEL, P.H., Biochem. Biophys. Res. Com., 101 (1981) 1419-1425	80
328 - WEIGEL, P.H., J. Cell. Biol., 95 (1982) 441	78
329 - WEIGEL, P.H., OKA, J.A., J. Biol. Chem., 256 (1981) 2615-2617	76,104
330 - WEIGEL, P.H., OKA, J.A., J. Biol. Chem., 257 (1982) 1201-1207	78

	Pages
331 - WEIGEL, P.H., OKA, J.A., J. Biol. Chem., 258 (1983) 5089-5094	78
332 - WEIGEL, P.H., OKA, J.A., J. Biol. Chem., 258 (1983) 5095-5102	78,148
333 - WEIGEL, P.H., OKA, J.A., J. Biol. Chem., 259 (1984) 1150-1154	80
334 - WEIMER, J. Biol. Chem., 185 (1950) 561-568	92,95
335 - WEINSTEIN, J.N., Cancer Treat. Rep., 68 (1984) 127-136	28,30
336 - WEINSTEIN, J.N., BLUMENTHAL, R., SHARROW, S.O., HENKART, P.A., Biochim. Biophys. Acta, 509 (1978) 272-288	21,30
337 - WEINSTEIN, J.N., LESERMAN, L.D., Pharmac. Ther., 24 (1984) 207-233	26,28,29,53
338 - WEINSTEIN, J.N., MOGIN, R.L., YATUIN, M.B., ZAHARKO, D.S., Science, 204 (1979) 188-191	28
339 - WHEATLEY, D.N., International Symposium on Adriamycin (CARTER, S.K. et coll., ed.), SPRINGER, BERLIN, 1972, 47	216
340 - WIELS, J., JUNQUA, S., DUJARDIN, P., LEPECQ, J.B., TURSZ, T., Cancer Res., 44 (1984) 129-133	42
341 - WILCHEK, M., HURWITZ, E., in Affinity Chromatography and Biological Recognition (CHAIKEN, I.M., WILCHEK, M., PARIKH, I., ed.) Acad. Press, Orlando, 1983, 331-336	22

	Pages
342 - WILLINGHAM, M.C., PASTAN, I., Cell, 21 (1980) 67-77	72
343 - WILLINGHAM, M.C., PASTAN, I., Trends Biochem. Sci., 10 (1985) 190-192	73
344 - WILSON, G., J. Biol. Chem., 253 (1978) 2070-2072	47
345 - WOLKOFF, A.W., KLAUSNER, R.D., ASHWELL, G., HARFORD, J., J. Cell. Biol., 98 (1984) 375-381	77,80
346 - YAMASHINA, MAKINO J. Biochem., 51 (1962) 359	97
347 - YOULE, R.J., MURRAY, G.J., NEVILLE, D.M.Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 5559-5562	51
348 - YOUNG, W.W.Jr., HAKOMORI, S.I., Science, 211 (1981) 487-489	42
349 - ZANETTA, J.P., BRECKENBRIDGE, W.C., VINCENDON, G., J. Chromatog., 69 (1972) 291-304	94
350 - ZEITLIN, P.L., HUBBARD, A., J. Cell. Biol., 92 (1982) 634-647	149
351 - ZENEBERGH, A., BAURAIN, R., TROUET, A., Cancer Chemother. Pharmacol., 8 (1982) 243-249	188
352 - ZORZATO, F., SALVIATI, G., FACCHINETTI, T., VOLPE, P., J. Biol. Chem., 260 (1985) 7349-7355	15
353 - ZUNINO, F., DI MARCO, A., ZACCARA, A., GAMBETTA, R.A., Biochim. Biophys. Acta, 607 (1980) 206-214	7

354 - ZUNINO, F., GAMBETTA, R., DI MARCO, A., ZACCARA, A.,
Biochim, Biophys. Acta, 277 (1972) 489-497



FLAN Benoit

**LA GLYCOSYL DAUNORUBICINE,
UN MODELE D'ETUDE POUR LE CIBLAGE CELLULAIRE DE MEDICAMENTS**

Thèse de Doctorat de l'Université de LILLE I - 1990

**Mots-clefs : CIBLAGE DE DROGUES, GLYCOSYLATION, LECTINE
MEMBRANAIRE, ASIALO-GLYCANNES, HEPATOCYTE,
HEPATOME HEPG₂, DAUNORUBICINE.**



RESUME

L'existence dans le règne animal de lectines membranaires conduisant à l'endocytose de leur ligand et à son hydrolyse dans les lysosomes, a permis d'envisager le couplage sur le ligand d'un principe actif afin de diriger celui-ci dans l'organisme et de lui permettre d'atteindre sa cible endocellulaire après libération dans le lysosome.

Afin d'envisager l'utilisation des glycanes dans le ciblage des médicaments par glycosylation, nous démontrons que ceux-ci interagissent avec le récepteur du galactose des hépatocytes de Rat de la même manière que les glycoprotéines et les glycopeptides et que cette interaction entraîne leur endocytose.

La mise au point de la synthèse et de la purification de conjugués de la daunorubicine ou DNR (substance anticancéreuse dont la cardiotoxicité limite l'usage en thérapeutique) à des oligosaccharides nous permet de préparer un conjugué de DNR au lactose dont l'action sur les cellules d'hépatome humain HepG₂ qui possèdent le récepteur membranaire du galactose a été étudiée.

Nos travaux montrent que le conjugué "lactityl-DNR" est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules HepG₂ et exerce un effet cytostatique mis en évidence par les techniques des courbes de survie, de l'incorporation de thymidine tritiée et de la cytofluorométrie de flux, comparable à celui de la DNR. Ils suggèrent la possibilité d'une interaction spécifique de ce conjugué avec le récepteur du galactose. Les intérêts potentiels de ce conjugué sont discutés.