

# THESE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE III (SCIENCES)

en vue de l'obtention

DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

Spécialité : Pharmacologie antitumorale

par

**Marie-Josée CALIARO**



**CONTROLE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE  
D'ADENOCARCINOMES OVARIENS, *IN VITRO*, PAR L'ACIDE TOUT  
TRANS RETINOIQUE : INTERET POTENTIEL DE SON ASSOCIATION  
AVEC LE CISPLATINE, EN THERAPEUTIQUE**



soutenu le 4 Juillet 1996

JURY

MM. B. SALLES

Président

C. CHOMIENNE

Rapporteur

P. FORMSTECHE

Rapporteur

N. GAS

Examineur

S. JOZAN

Directeur de thèse

Thèse préparée au Centre Claudius Regaud  
20-24, Rue du Pont Saint-Pierre - 31052 Toulouse

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>GENERALITES</b>	4
<b>Chapitre I - Cancer de l'ovaire</b>	5
1 - Epidémiologie	6
2 - Différents types de tumeurs ovariennes	6
3 - Origines du cancer de l'ovaire	7
4 - Cancer de l'ovaire et facteurs de croissance	9
5 - Traitement du cancer de l'ovaire	10
6 - Thérapie de différenciation	10
<b>Chapitre II - Un Rétinoïde : l'acide tout trans rétinoïque (ATRA)</b>	13
1 - Définition	14
2 - Transport et métabolisme	14
3 - Quels sont les effets biologiques de l'ATRA ?	15
a - Rétinoïdes et morphogénèse	16
b - Rétinoïdes et prolifération	17
c - Rétinoïdes et différenciation	18

d - Rétinoïdes et apoptose	18
<b>4 - Mécanisme d'action de l'ATRA</b>	19
a - Les récepteurs à l'ATRA	20
a - 1 Les protéines de liaison cytoplasmiques ou CRABPs	20
a - 2 Les récepteurs nucléaires à l'ATRA	22
* Les " Retinoic Acid Receptors " ou RARs	22
* Les " Retinoid X Receptors " ou RXRs	26
b - Les éléments de réponse	28
c - Notion d'hétéro et d'homodimères	30
c - 1 Les hétérodimères	30
* Le RXR : partenaire " silencieux "	30
* Le RXR : partenaire " dominant "	32
c - 2 Les homodimères	33
<b>5 - Interrelations entre la voie des rétinoïdes et d'autres voies de signalisation cellulaire</b>	34
a - Rétinoïdes et voie des facteurs de croissance	35
b - Rétinoïdes et voie des protéines kinases	37
c - Rétinoïdes et complexe AP-1	39
<b>6 - Rétinoïdes et cancer</b>	39
a - Rétinoïdes, agents anticancéreux	39
b - Rétinoïdes et carcinogenèse	42
<b>Chapitre III - Le cisplatine (CDDP)</b>	45
<b>1 - Définition</b>	46
<b>2 - Propriétés physicochimiques</b>	46
<b>3 - Comportement dans le milieu intracellulaire</b>	46

4 - Mécanisme d'action	47
5 - Interaction entre le CDDP et l'ADN	48
a - Types d'adduits formés	48
b - Rôle de ces adduits dans la cytotoxicité	49
6 - Mécanismes impliqués dans la cytotoxicité	50
a - Inhibition de la réplication	50
b - Inhibition de la transcription	51
d - Induction de l'apoptose	51
7 - Mécanismes impliqués dans la résistance au CDDP	52
a - Diminution de l'accumulation intracellulaire de CDDP	52
b - Systèmes de détoxification cellulaire	53
b - 1 Rôle du système glutathion (GSH)	54
b - 2 Rôle des métallothionéines	56
c - Augmentation de la réparation de l'ADN	57
d - Mécanismes annexes	58
<b><i>MATERIEL &amp; METHODES</i></b>	62
<b><i>I - Matériel</i></b>	63
1 - Lignées cellulaires	63
2 - Produits utilisés	64
<b><i>II - Biologie cellulaire</i></b>	64
1 - Entretien des lignées cellulaires	64

2 - Effet de l'ATRA sur la prolifération cellulaire	65
3 - Clonage en milieu semi-solide	66
4 - Modulation de l'effet cytotoxique du CDDP par l'ATRA	67
5 - Analyse de l'interaction entre l'ATRA et le CDDP	68

### ***III - Biologie moléculaire*** 70

1 - Extraction des ARNs totaux	70
2 - Extraction des ARNmessagers (ARNm)	71
3 - Analyse des transcrits par Northern Blot	72
a - Séparation des ARNs par électrophorèse sur gel dénaturant	
- Transfert sur membrane de nylon	72
b - Préhybridation-Hybridation	73
c - Lavages	73
4 - Marquage des sondes	74
5 - Obtention des sondes utilisées pour le Northern Blot	75
a - Extraction plasmidique	75
b - Obtention des inserts	75
b - 1 Les récepteurs à L'ATRA	76
b - 2 Les métallothionéines	77
b - 3 Les sondes constantes	77
6 - Analyse des transcrits par RT-PCR	77
a - Transcription inverse (RT)	77
b - Polymerase Chain Reaction (PCR)	78
7 - Densitométrie	80

<b>VI - Biochimie</b>	80
<b>1 - Mise en évidence de la CRABP</b>	80
a - Extraction des protéines	80
b - Liaison à l'équilibre	81
c - Electrophorèse en gel non dénaturant	81
<b>2 - Etude de l'activité Protéine Kinase C (PKC)</b>	82
a - Extraction des protéines membranaires et cytosoliques	82
b - Dosage des protéines	83
c - Purification partielle de la PKC	83
d - Dosage de l'activité PKC	84
e - Calcul de l'activité PKC	85
<b>3 - Détermination du taux de glutathion intracellulaire (GSH)</b>	86
<b>4 - Détermination de l'activité glutathion-S-transférase (GST)</b>	88
<b>5 - Détermination de l'accumulation intracellulaire de CDDP</b>	89
<b>6 - Quantification des adduits totaux ADN-CDDP</b>	90
<b>RESULTATS</b>	92
<b>Chapitre I - Caractérisation des effets de l'ATRA sur des lignées humaines d'adénocarcinome ovarien</b>	93
<b>1 - Effet sur la croissance cellulaire</b>	94
<b>2 - Relation effet antiprolifératif - capacité clonogénique</b>	95
a - Etude de la capacité clonogénique des lignées cellulaires OVCCR <sub>1</sub> , NIHOVCAR <sub>3</sub> , IGROV <sub>1</sub> et SKOV <sub>3</sub>	95

b - Effet de l'ATRA sur la prolifération des clones issus de la lignée SKOV3 - Relation avec leur capacité clonogénique	96
<b>3 - Modulation du pouvoir tumorigène</b>	<b>100</b>
<b>4 - L'ATRA est-il un modulateur de la différenciation des lignées d'adénocarcinome ovarien ?</b>	<b>101</b>
a - Effet sur la morphologie des cellules	101
b - Modulation de l'expression des cytokératines	104
c - Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline placentaire	105
d - Effet sur la sécrétion de CA 125	105
<b>5 - Relation sensibilité à l'ATRA et voie de transmission du signal</b>	<b>107</b>
a - Mise en évidence des protéines cytoplasmiques de liaison à l'ATRA (CRABPs)	107
b - Mise en évidence des récepteurs nucléaires à l'ATRA	108
b - 1 Expression des RAR $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$	108
b - 2 Expression des RXR $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$	110
c - Interrelations entre les voies de transmission de l'ATRA et du TGF $\beta$	112
 <b><i>Chapitre II - Intérêt potentiel en thérapeutique:</i></b>	
<b><i>Association ATRA-Cisplatine</i></b>	<b>114</b>
<b>1 - Modulation de la sensibilité des cellules au CDDP par un pré-traitement par l'ATRA</b>	<b>115</b>
<b>2 - Cinétique d'apparition du phénomène de potentialisation</b>	<b>116</b>
<b>3 - Analyse de l'interaction entre l'ATRA et le CDDP</b>	<b>117</b>

<b>4 - Mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction synergique existant entre l'ATRA et le CDDP pour la lignée NIHOVCAR<sub>3</sub></b>	119
a - Effet de l'ATRA sur l'accumulation de CDDP	120
b - Modulation des systèmes de détoxification du CDDP par l'ATRA	121
c - L'ATRA module - t-il la quantité d'adduits CDDP-ADN	123
d - Effet de l'ATRA sur l'activité protéine kinase C (PKC)	124
d - 1 Modulation de l'activité PKC par l'ATRA	125
d - 2 Modulation de l'activité PKC par le TPA	126
e - Effet de l'ATRA sur l'expression du récepteur à l'EGF (EGFR)	128
<b><i>DISCUSSION</i></b>	131
<b><i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i></b>	161

## RESUME

L'adénocarcinome ovarien reste un cancer de mauvais pronostic en raison de l'apparition très rapide de polychimiorésistance. De nouvelles stratégies thérapeutiques ont donc été envisagées, incluant notamment la thérapie de différenciation. Basée sur la réversion possible du phénotype cancéreux, elle implique des agents modulant les fonctions biologiques cellulaires, comme l'acide tout *trans* rétinoïque (ATRA). Dérivé physiologique de la vitamine A, il intervient dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des cellules normales et tumorales. Afin de montrer l'intérêt potentiel de ce rétinoïde dans cette pathologie, nous avons étudié ses effets sur quatre lignées d'adénocarcinome ovarien humain, OVCCR<sub>1</sub>, NIHOVCAR<sub>3</sub>, SKOV<sub>3</sub> et IGROV<sub>1</sub> et mis en évidence un effet antiprolifératif et antitumorigène seulement pour les trois premières lignées. Par ailleurs, une corrélation entre le degré de différenciation cellulaire et la réponse à l'inhibition de prolifération engendrée par ce dérivé a pu être montrée. L'absence de marqueurs de différenciation spécifiques de l'épithélium ovarien ne nous a pas permis de conclure à un effet de l'ATRA sur la différenciation des cellules sensibles. Afin d'expliquer l'hétérogénéité de réponse concernant l'inhibition de croissance induite par l'ATRA, nous avons exploré certains éléments de la voie de transmission du signal de ce rétinoïde. Aucune corrélation entre la sensibilité des cellules à l'effet antiprolifératif de l'ATRA et la présence des protéines de liaisons cytoplasmiques (CRABPs) n'a été observée. En revanche, une faible expression des RAR $\gamma$  et RXR $\alpha$  a été retrouvée dans les cellules IGROV<sub>1</sub>, résistantes à l'ATRA, en faveur d'une implication de l'un ou de l'autre ou de ces deux récepteurs dans l'inhibition de croissance engendrée par ce dérivé. Enfin, nous avons montré que l'ATRA induisait l'ARNm du TGF $\beta$ 1, seulement dans la lignée OVCCR<sub>1</sub>, pour laquelle l'effet antiprolifératif de l'ATRA est associé à des modifications morphologiques et biologiques, suggérant une implication éventuelle de la voie TGF $\beta$  dans l'inhibition de prolifération ou dans l'un des effets l'accompagnant.

L'ATRA inhibant la croissance cellulaire de façon réversible, nous avons combiné ce dérivé avec le Cisplatine (CDDP), cytotoxique le plus employé dans le traitement de la pathologie néoplasique ovarienne et étudié l'effet de cette association sur la prolifération. Une synergie a été observée entre ces deux médicaments uniquement pour les lignées sensibles à l'ATRA. Les mécanismes responsables de cette synergie ont alors été recherchés. Nous avons pu montrer que la potentialisation de la cytotoxicité du cisplatine par l'ATRA était associée à une diminution de l'activité GST ainsi qu'à un taux d'adduits totaux ADN-CDDP plus élevé. L'induction de l'expression du récepteur à l'EGF par ce rétinoïde pourrait également intervenir dans cette synergie. L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction synergique entre l'ATRA et le CDDP implique un mécanisme multifactoriel et permet de penser qu'un meilleur effet thérapeutique pourrait être obtenu en associant ce rétinoïde à la chimiothérapie conventionnelle, dans le cancer de l'ovaire.