

THESE

présentée

devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse (Sciences)

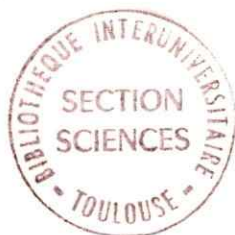
en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT de l'UNIVERSITE PAUL SABATIER de TOULOUSE

Spécialité : Pharmacologie cellulaire

par

Anna KRUCZYNSKI



CARACTERISATION, PAR ANALYSE MORPHONUCLEAIRE, DE CANCERS PULMONAIRES HUMAINS GREFFES CHEZ LA SOURIS "NUDE"

Soutenue le 19 février 1991 devant le jury composé de :

Mme S. CROS, Docteur d'état, CNRS Toulouse

MM. G. DELSOL, Professeur, Toulouse

G. FOURNIE, Directeur de Recherche, INSERM Toulouse

R. KISS, Docteur d'état, Castres

A. VERHEST, Professeur, Bruxelles

M. WRIGHT, Directeur de Recherche, CNRS Toulouse

Préparée au Centre de Recherche Pierre Fabre Médicament, 17 avenue Jean
Moulin, 81100 Castres et au Laboratoire de Pharmacologie et de
Toxicologie Fondamentales du CNRS, 205 route de Narbonne, 31400 Toulouse

PLAN

INTRODUCTION

- I- LES CANCERS PULMONAIRES : GENERALITES
- II- LES XENOGREFFES HUMAINES : MODELE EXPERIMENTAL EN
CANCEROLOGIE
- III- CARACTERISATION DES TUMEURS XENOGREFFEES AU NIVEAU
CELLULAIRE
- IV- EXPLOITATIONS DES CARACTERISTIQUES DE LA CHROMATINE POUR
L'ETUDE DES XENOGREFFES

MATERIELS ET METHODES

- I- LES MODELES UTILISES
- II- METHODES D'INVESTIGATION DES TUMEURS ETUDIEES
- III- PHARMACOLOGIE

RESULTATS

- I- INTERET DE L'ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE EVALUE IN VITRO :
ETUDE DE L'INFLUENCE D'AGENTS ANTI-CANCEREUX SUR LES
PARAMETRES DE CINETIQUE CELLULAIRE
- II- CARACTERISATION DE L'EVOLUTION DE TUMEURS PULMONAIRES
HUMAINES XENOGREFFEES AU COURS DES PASSAGES EN SERIE
- III- ETUDE PHARMACOLOGIQUE

DISCUSSION

- I- CARACTERISATION DE TUMEURS XENOGREFFEES EN FONCTION DE CRITERES
D'HISTOLOGIE, DE CYTOGENETIQUE ET MORPHONUCLEAIRES
- II- SUIVI, PAR ANALYSE D'IMAGE, DE LA REPOSE D'UNE XENOGREFE A
DIFFERENTS TRAITEMENTS
- III- LIMITES DES METHODES UTILISEES

CONCLUSIONS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RESUME

Les cancers pulmonaires "Autres qu'à Petites Cellules" constituent l'une des premières causes de mortalité due à la pathologie tumorale. Ils sont peu sensibles à la radiothérapie et insensibles à la chimiothérapie. De plus ils montrent une diversité de comportement vis-à-vis des traitements thérapeutiques.

Dans le but d'aborder ce problème, un modèle permettant d'étudier ces cancers a été proposé et de nouveaux facteurs pronostics ont été recherchés. Ce modèle est constitué de tumeurs pulmonaires humaines greffées chez la souris "nude". Il a été caractérisé au niveau cellulaire par cytogénétique, par examens anatomo-pathologiques et par une analyse multiparamétrique informatisée de l'image nucléaire. Cette dernière technique est fondée sur la caractérisation morphonucléaire de noyaux cellulaires fixés et colorés par la méthode de Feulgen. Quinze paramètres morphonucléaires de type morphométrique, densitométrique et textural ont été pris en compte.

L'intérêt de cette analyse multiparamétrique a été illustré sur le système biologique le plus simple constitué par des lignées cellulaires cultivées in vitro. L'analyse multiparamétrique morphonucléaire a permis de distinguer les phases G0-G1, S, G2 et M du cycle cellulaire de la lignée mammaire murine MXT, ce qui est impossible par une analyse monoparamétrique du contenu en ADN nucléaire. L'influence de divers agents anti-cancéreux (poison des microtubules : Navelbine, agent intercalant : Adriamycine et un composé alkylant), sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire de la lignée MXT, a été évaluée en fonction de ces critères morphonucléaires.

Neuf tumeurs pulmonaires humaines "Autres qu'à Petites Cellules" xénogreffées ont ensuite été établies et constituent le modèle expérimental choisi.

Les histogrammes de répartition de la quantité d'ADN et des surfaces nucléaires ont révélé une hétérogénéité cellulaire de la majorité des tumeurs xénogreffées. L'étude histologique a confirmé l'hétérogénéité des surfaces nucléaires, lorsque les différences de

tailles étaient importantes. Elle a, de plus, mis en évidence l'hétérogénéité histologique de la seule tumeur xéno greffée homogène quant à son contenu en ADN nucléaire.

L'analyse cytogénétique a montré que les xéno greffes humaines avaient conservé leurs caractéristiques humaines au cours de l'étude. La comparaison des histogrammes d'ADN, obtenus pour différents passages, indique que les proportions relatives des sous-populations, constituant la majorité des tumeurs xéno greffées, évoluent au cours des transplantations successives. L'analyse multiparamétrique tenant simultanément compte des quinze paramètres morphonucléaires corrobore ces observations. Afin de tenter de caractériser chaque xéno greffe et d'évaluer leur stabilité, les paramètres qui présentaient les variations les plus significatives ont été combinés dans une équation définissant un facteur nommé MLI (Malignancy Level Index). Ce facteur a permis de classer les neuf cancers xéno greffés en fonction de leur degré de différenciation.

Cette approche cytophotométrique a enfin été appliquée en pharmacologie afin d'essayer de corrélérer les effets microscopiques et macroscopiques d'agents anti-tumoraux. Une variabilité de la sensibilité d'une des xéno greffes nommée KLX-7 à la Navelbine a été mise en évidence, au cours des transplantations successives, de manière conventionnelle par mesures des variations des surfaces tumorales. L'analyse biochimique des cibles potentielles de cette substance anti-tumorale, par exemple les isotubulines, n'a pas fourni d'éléments de réponse à ce problème. Par contre, le composé F 35, dérivé des cyclophosphazènes, a montré une efficacité thérapeutique stable au cours des passages en série.

Afin de pouvoir suivre, au cours du temps, l'effet de substances anti-cancéreuses ou hormonales, par analyse d'image, en n'utilisant qu'un nombre réduit d'animaux, la technique de la ponction à l'aiguille fine a été employée. Celle-ci permet de recueillir du matériel tumoral de manière atraumatique sans sacrifier l'animal. Son utilisation a été validée en cytophotométrie par rapport à celle de l'empreinte tumorale. Les efficacités thérapeutiques de la Navelbine et de l'agent F 35 ont ainsi été évaluées au cours du traitement de la tumeur xéno greffée KLX-7. Si la Navelbine induit une augmentation significative du nombre

de mitoses, ce qui peut être observé à l'aide d'un simple microscope, l'analyse d'image a été nécessaire pour mettre en évidence l'effet de l'agent F 35. Celui-ci provoque une disparition temporaire de certaines des sous-populations constituant la tumeur hétérogène KLX-7. Lorsque cet effet est maximum, la valeur correspondante du facteur MLI (Malignancy Level Index) est minimum. Les observations microscopiques et macroscopiques ont été corrélées pour les deux agents anti-tumoraux étudiés. Enfin, l'analyse d'image a été appliquée au suivi de l'influence de diverses hormones sur la tumeur xéno greffée KLX-7. Ceci a montré que l'oestradiol, la gastrine et le FGF (Fibroblast Growth Factor) ont un effet significatif sur la prolifération de cette tumeur pulmonaire xéno greffée.

Ainsi la caractérisation des tumeurs xéno greffées par diverses approches (cytogénétique, histologie et analyse d'image) est indispensable pour mieux connaître et maîtriser ce modèle. De plus, l'investigation microscopique de ces xéno greffes par analyse informatisée de l'image nucléaire a permis une quantification au niveau cellulaire de leur évolution biologique. Une importante série d'expérimentations est programmée afin de valider cette approche empirique et tenter de définir si les caractéristiques d'un cancer donné peuvent être corrélées à l'efficacité d'une chimiothérapie.