

Le PB100 : inhibiteur sélectif puissant de la multiplication des cellules de glioblastome humain résistantes au BCNU

M. BELJANSKI, S. CROCHET, M.S. BELJANSKI

Centre Oncologique et Biologique de Recherche Appliquée "Domaine de la Source, St-Prim 38370, France

Résumé : Le manque intrinsèque de sélectivité, responsable de dommages graves dans les cellules normales en division rapide, ainsi que la résistance des cellules aux médicaments sont les inconvénients majeurs des chimiothérapies anticancéreuses actuelles. Nous présentons ici la preuve expérimentale que le PB100, alcaloïde de type beta-carboline, inhibe sélectivement la multiplication in vitro des cellules de glioblastome humain (U251) résistantes au BCNU, sans affecter la multiplication d'une lignée astrocytaire normale (CRL 1656). L'activité du PB100 est proportionnelle à la dose utilisée. En présence de ferritine ou de CaCl_2 , fortement mitogènes pour les cellules de glioblastome, l'alcaloïde doit être employé en doses plus importantes pour inhiber complètement la multiplication. Le PB100 ainsi que d'autres composés ont été choisis car ils ont une action spécifique sur les cellules et les ADN cancéreux et n'affectent pas les cellules et les ADN normaux. C'est parce qu'il agit sur la structure secondaire de l'ADN cancéreux que le PB100 est sélectif et peut vaincre la résistance des cellules. Nous décrivons ici ce mode d'action et discutons des applications thérapeutiques possibles.

Abréviations : BCNU : Bis-(chloro-2 éthyl)-1,3 nitroso-1 urée ; ADN : acide désoxyribonucléique ; mdr-1 : gène 1 de la résistance médicamenteuse ; PB100 : flavopéridine.

Mots clé : Astrocyte, Cellules de glioblastome, Ferritine, CaCl_2 , ADN, Alcaloïde PB100.

Correspondance : Dr M. Beljanski, Centre Oncologique et Biologique de Recherche Appliquée, "Domaine de la Source", St Prim 38370, France. Tél. : (33) 74 56 58 00, Fax : (33) 74 56 54 46

La chimiothérapie classique utilisée aujourd'hui dans le traitement du cancer présente deux inconvénients majeurs. Le premier est l'absence totale de sélectivité : les substances utilisées en chimiothérapie ne font pas de différence entre les cellules tumorales et les cellules normales à division rapide, ce qui a des conséquences graves comme la destruction des cellules sanguines notamment (1,2,3,4,5). La résistance aux médicaments est le second inconvénient : environ 80% des tumeurs solides sont résistantes (résistance intrinsèque ou acquise) aux mono- ou polychimiothérapies (6,7,8).

Les chercheurs travaillent sur la résistance des cellules cancéreuses depuis de nombreuses années (9,10,11,12,13). Il semble que plusieurs mécanismes entrent en ligne de compte. On s'est notamment intéressé à la glycoprotéine-P, située sur la membrane cellulaire, régulant l'entrée des substances dans la cellule (14,15,16,17). La glycoprotéine-P est codée par le gène mdr-1, qui est souvent surexprimé ou amplifié dans divers types de cancers humains ; cependant, chez des patients atteints de leucémie par exemple, les cellules cancéreuses seront résistantes sans qu'il y ait augmentation de l'expression de l'ARN par mdr-1 (18). A ce jour, aucune explication satisfaisante n'a été proposée.

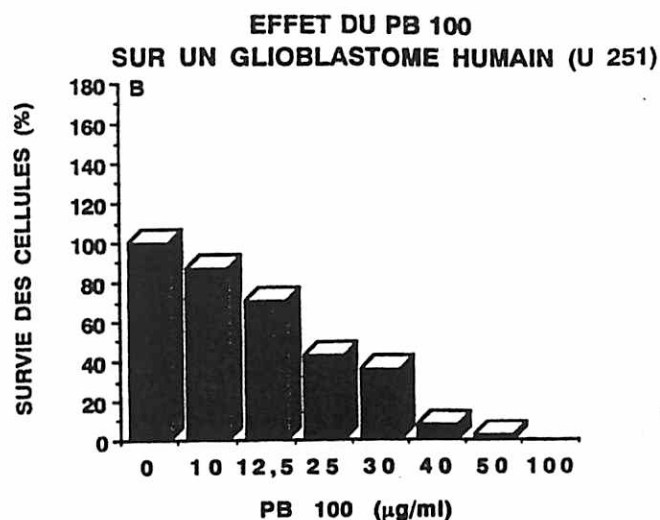
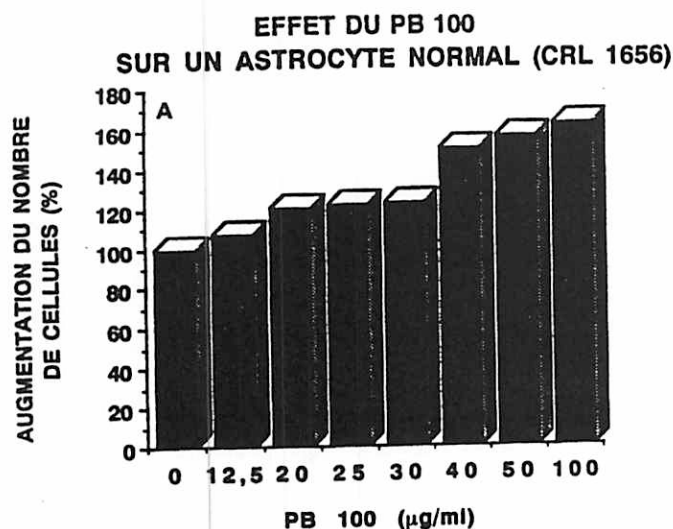


Figure 1 A et B : Effet du PB100 sur la multiplication des cellules de glioblastome résistantes au BCNU et la multiplication d'astrocytes normaux. Les cellules normales (CRL 1656) et de glioblastome (U251) ont été cultivées en trois exemplaires pendant 48 h à 37°C sans PB100 ou avec les concentrations indiquées sur la figure. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences. A : $SD \pm 13,49$; B : $SD \pm 3,95$.

Une cellule peut également devenir résistante par modification qualitative ou quantitative de plusieurs enzymes ; c'est ce qui a été observé dans différentes lignées cellulaires cancéreuses (19). La résistance croisée provoquée chez certaines lignées dépend de la substance utilisée pour la sélection (20,21).

Nous présentons dans cet article les résultats d'expériences démontrant que l'alkaloïde de type beta-carboline appelé PB100 non seulement surmonte la résistance dans une lignée de glioblastome résistante au BCNU, mais détruit sélectivement ces cellules cancéreuses, alors que la multiplication d'une lignée astrocytaire normale n'est pas affectée. Comme nous l'avions déjà démontré il y a quinze ans (22,23) les propriétés caractéristiques des cellules cancéreuses, à savoir multiplication et expression des gènes anarchiques, proviennent de la structure secondaire de l'ADN cancéreux relâchée en permanence sur des zones importantes. L'alkaloïde PB100 a été choisi parce qu'il est capable 1) de se fixer spécifiquement à l'ADN cancéreux et 2) de resserrer les zones relâchées de la molécule.

La ferritine et le calcium, qui favorisent considérablement la multiplication *in vitro* des cellules de glioblastome, entrent en compétition avec l'alkaloïde pour les sites de fixation de l'ADN. Nous discutons ici de la capacité du PB100 à vaincre la résistance au BCNU, le rôle de cet alkaloïde dans le traitement des cellules cancéreuses, ainsi que ses applications thérapeutiques *in vivo*.

Matériel et méthodes

Produits : CaCl_2 grade A, Prolabo, France. Ferritine : ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA. BCNU : don du Professeur Labat, CHU, Brest. Trypsine, milieu de culture RPMI 1640, sérum foetal de veau, glutamine : Gibco, Grand Island, N.Y. Autres produits : Prolabo, France. Le PB100 a été purifié dans notre laboratoire.

Extraction de l'alkaloïde PB100 : il a été extrait et purifié dans notre laboratoire (24). La pureté a été vérifiée par chromatographie sur couche mince et spectre d'absorption UV. 5 mg de l'alkaloïde ont été dissous dans 0.1 ml d'éthanol distillé (95°). On a complété le volume à 1 ml avec de l'eau distillée stérile ; le pH a été ajusté à 7,3 - 7,5 et la solution a été filtrée en conditions stériles.

Extraction des ADN : Les ADN de glioblastome (U251) et d'astrocytes sains (CRL 1656) ont été extraits et purifiés par une méthode décrite ailleurs (25,26). On a vérifié la pureté des ADN par les méthodes habituelles (27). La quantité d'ADN a été mesurée par l'absorption UV à 260 nm ($260/280 = 2,05$). Après incubation avec 0,1 N KOH, les ADN présentaient une hyperchromicité de 45 à 56%. Pour évaluer l'activité des composés, les ADN ont été dissous dans une solution tampon de Tris-HCl 0,01 M (pH 7,3) ; l'absorption UV a été lue contre une solution témoin contenant le tampon Tris et la substance à tester (26).

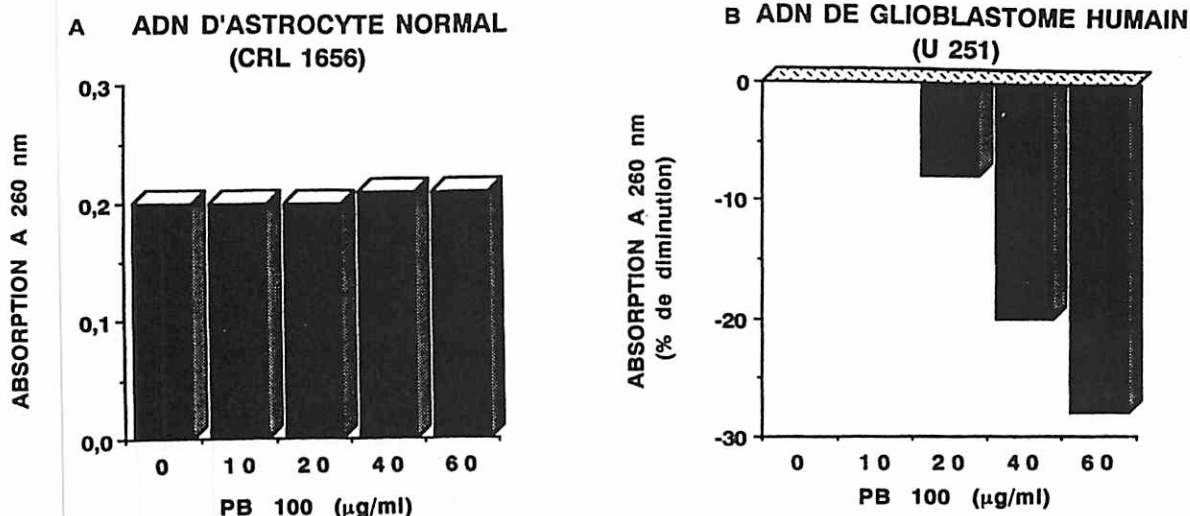


Figure 2 A et B : Effet du PB100 sur l'absorption UV des ADN d'astrocytes normaux et de cellules de glioblastome résistantes au BCNU. Les ADN purifiés d'astrocytes normaux (CRL 1656) ou de glioblastome (U251) ont été dissous dans une solution tampon de Tris-HCl à pH 7,3 (10 µg/ml). Les substances à tester ont été dissoutes dans 10 ml de tampon puis ajoutées à la solution témoin et à la solution d'ADN. Les mélanges ont été agités à 20°C avant le traçage du spectre UV. On a déterminé les concentrations qui ont provoqué une augmentation ou une diminution maximales de l'absorption UV (%). L'expérience a été répétée trois fois.

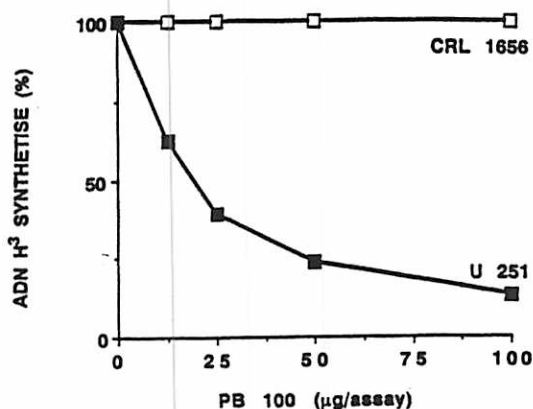


Figure 3 : Effet du PB100 sur la synthèse in vitro des ADN d'astrocytes normaux (CRL 1656) et de cellules de glioblastome résistantes au BCNU (U251). La méthode a déjà été décrite précédemment pour divers ADN normaux et cancéreux (26). Le mélange d'incubation contenait (pour 15 ml) : 25 µmoles de tampon Tris-HCl à pH 7,65 ; 2 µmoles de MgCl₂ ; 4 µmoles des d-XTTP (+ 50,000 CPM TTP-H³) ; 0,2 µg d'ADN ; 80 µg d'ADN polymérase-ADN dépendante 1 purifiée (*E. coli*) ; 10 min. d'incubation à 36°C. Le matériel précipitable par TCA (acide trichloro-acétique) a été filtré sur filtre GF/C, lavé au TCA et séché. On a mesuré la radioactivité avec un spectromètre à scintillation Packard (Prius). Les analyses ont été répétées trois fois.

Lignées cellulaires et méthodes de culture :

Lignée cellulaire de glioblastome humain U251 (Swedish Cell Collection, Uppsala, Suède). Lignée astrocytaire normale Mpf, CRL 1656 (American Type Tissue Culture Collection, Rockville, MD. USA). Les cellules ont été cultivées à 37°C en monocouche jusqu'à confluence en milieu RPMI 1640 additionné de 10% de sérum de veau. On a vérifié l'absence de mycoplasme et de bactérie pour chaque type de cellule tous les 3 mois. Les cultures ont été dupliquées chaque semaine après trypsination (+ 0,05% d'EDTA) afin de décrocher les cellules pour l'ensemencement. Les deux lignées ont été cultivées pendant 48 heures, la durée de division étant de 20 à 24 h.

Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans des plaques de culture 6 puits (puits de 9,8 cm²) à partir d'un inoculum de 4×10^4 .

Inhibition et stimulation de la croissance : On a déterminé l'effet cytotoxique du PB100 et l'action stimulante de la ferritine et du CaCl₂ (stérilisés par filtration) après addition de concentrations croissantes au milieu de culture contenant déjà l'inoculum cellulaire. Les cellules mortes en suspension ont été retirées et les cellules viables restantes ont été trypsinisées et comptées avec un compteur Coulter.

Résultats

Inhibition de la multiplication des cellules de glioblastome par le PB100 : Le nombre de cellules de glioblastome résistantes au BCNU tuées par le PB100 est proportionnel à la dose utilisée (Figure 1B). Après 48 h d'incubation en présence de 50 µg de PB100/ml, 0,1 à 0,2 % seulement des cellules cancéreuses étaient encore en vie. Bien que les cellules traitées avec l'alcaloïde restaient attachées au flacon de culture, on a observé dans la majorité des cellules des modifications morphologiques de la membrane nucléaire et des trous pycnotiques multiples dans le cytoplasme, preuves de dégâts irréversibles. Les rares cellules qui n'avaient apparemment subi aucun dommage ne se sont plus multipliées après transfert dans un nouveau milieu sans PB100 ; la perte de la capacité de multiplication est sans doute due à la formation d'un complexe ADN-PB100, du type que nous avons observé antérieurement avec la serpentine (25). L'interruption de la multiplication des cellules cancéreuses s'est faite avec la même

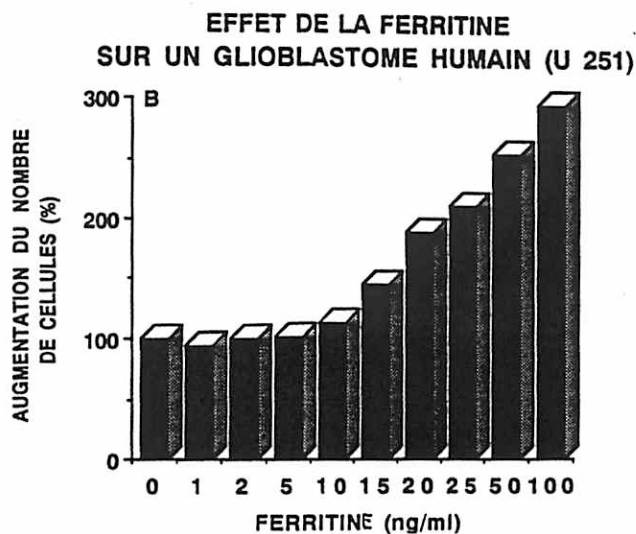
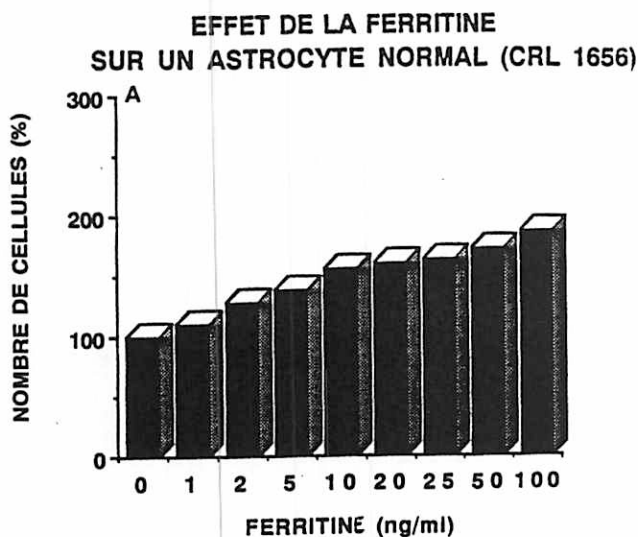


Figure 4 A et B : Stimulation de la prolifération in vitro des astrocytes normaux (CRL 1656) et des cellules de glioblastome résistantes au BCNU (U251) par la ferritine. Les cellules ont été cultivées sans ferritine ou avec différentes concentrations pendant 48h à 37°C. Les résultats représentent l'augmentation en pourcentage (valeurs moyennes de trois expériences). A : SD $\pm 10,9$; B : SD $\pm 10,8$.

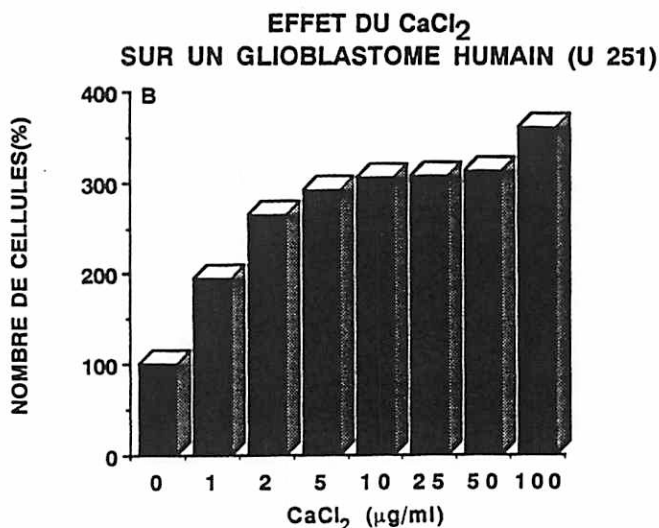
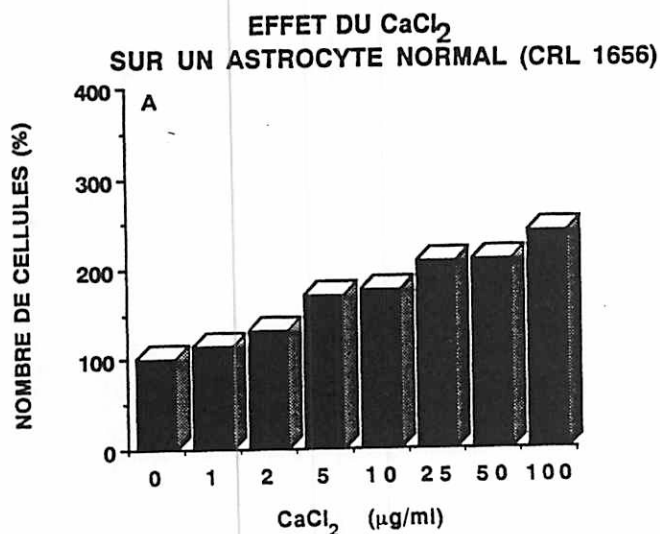


Figure 5 A et B : Stimulation de la prolifération in vitro d'astrocytes normaux et de cellules de glioblastome résistantes au BCNU (U251) par le CaCl_2 . Les cellules ont été cultivées sans CaCl_2 ou avec diverses concentrations pendant 48 h à 37°C. Les résultats représentent l'augmentation en pourcentage (valeurs moyennes de trois expériences). A : SD $\pm 15,35$; B : SD $\pm 3,72$.

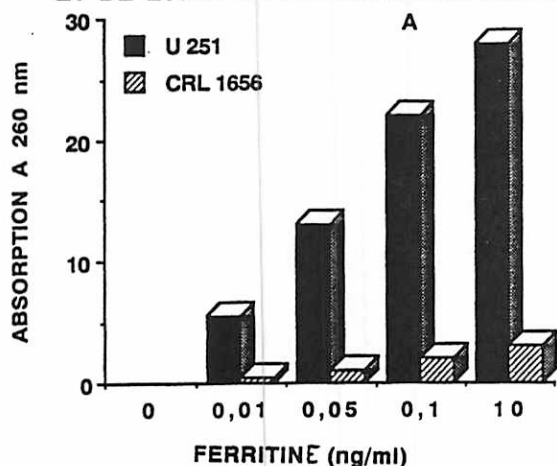
ampleur que le PB100 ait été ajouté au milieu au début de l'incubation ou 10 minutes plus tard.

Des astrocytes normaux (Mpf), cultivés dans les mêmes conditions expérimentales que les cellules de glioblastome résistantes au BCNU n'ont pas du tout été endommagées par le PB100 et leur multiplication n'a pas été interrompue. Elle a même légèrement augmenté, non à cause d'une action du PB100 sur leur ADN (voir plus bas) mais probablement à cause de l'ATPase présente dans le milieu (Figure 1A). Des concentrations identiques de PB100 ont donc détruit les cellules cancéreuses et épargné totalement les cellules normales.

Fixation sélective in vitro du PB100 à l'ADN des cellules du glioblastome : Si l'on veut comprendre cette inhibition sélective des cellules cancéreuses, il est indispensable de comparer l'effet du PB100 sur les ADN purifiés des cellules de glioblastome et des astrocytes normaux (Mpf). L'absorption UV à 260 nm montre que :

1) sans le PB100, l'absorption de l'ADN de glioblastome est plus importante que celle de l'ADN des astrocytes ; l'hyperchromicité de l'ADN cancéreux correspond au relâchement moléculaire, provoqué par les ruptures multiples des liaisons hydrogène.

EFFET DE LA FERRITINE SUR L'ABSORPTION U.V. DE L'ADN D'ASTROCYTE NORMAL (CRL 1656) ET DE L'ADN DE GLIOBLASTOME HUMAIN (U 251)



EFFET DU CaCl_2 SUR L'ABSORPTION U.V. DE L'ADN D'ASTROCYTE NORMAL (CRL 1656) ET DE L'ADN DE GLIOBLASTOME HUMAIN (U 251)

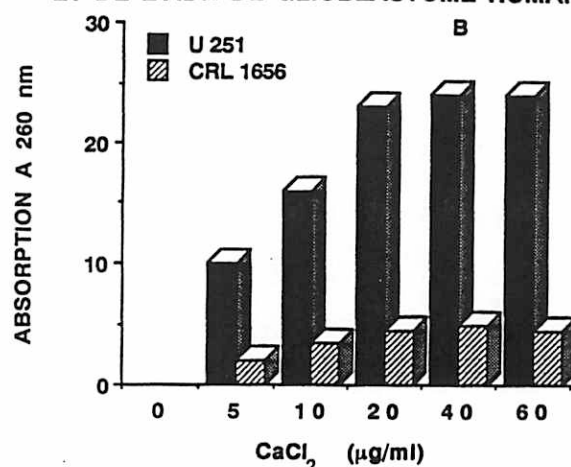
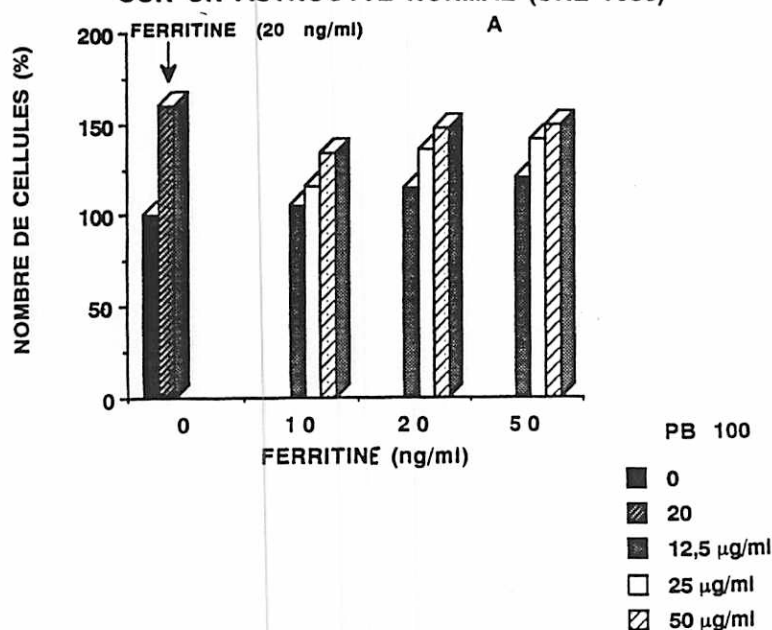


Figure 6 A et B : Effets de la ferritine et du CaCl_2 sur l'absorption UV des ADN d'astrocytes normaux (CRL 1656) et de cellules de glioblastome (U251).

EFFETS DU PB 100 ET DE LA FERRITINE SUR UN ASTROCYTE NORMAL (CRL 1656)



EFFETS DU PB 100 ET DE LA FERRITINE SUR UN GLIOBLASTOME HUMAIN (U 251)

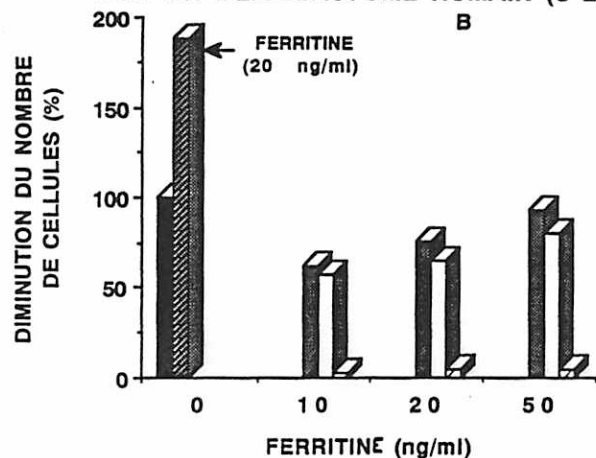


Figure 7 A et B : Inhibition par le PB100 de la stimulation provoquée par la ferritine pendant la prolifération d'astrocytes normaux et de cellules de glioblastome résistantes au BCNU. Le PB100 a été ajouté au milieu de culture 5 minutes avant la ferritine. Incubation : 48 h à 37 °C. Les résultats sont les valeurs moyennes de trois expériences. A : $SD \pm 8,79$; B : $SD \pm 2,99$

2) en présence de quantités croissantes de PB100, l'hyperchromicité de l'ADN de glioblastome disparaît progressivement, ce qui indique que l'alcaloïde corrige les conséquences

des ruptures anarchiques de liaisons hydrogène et rapproche les brins qui ont été séparés. Cette activité est proportionnelle à la dose utilisée.

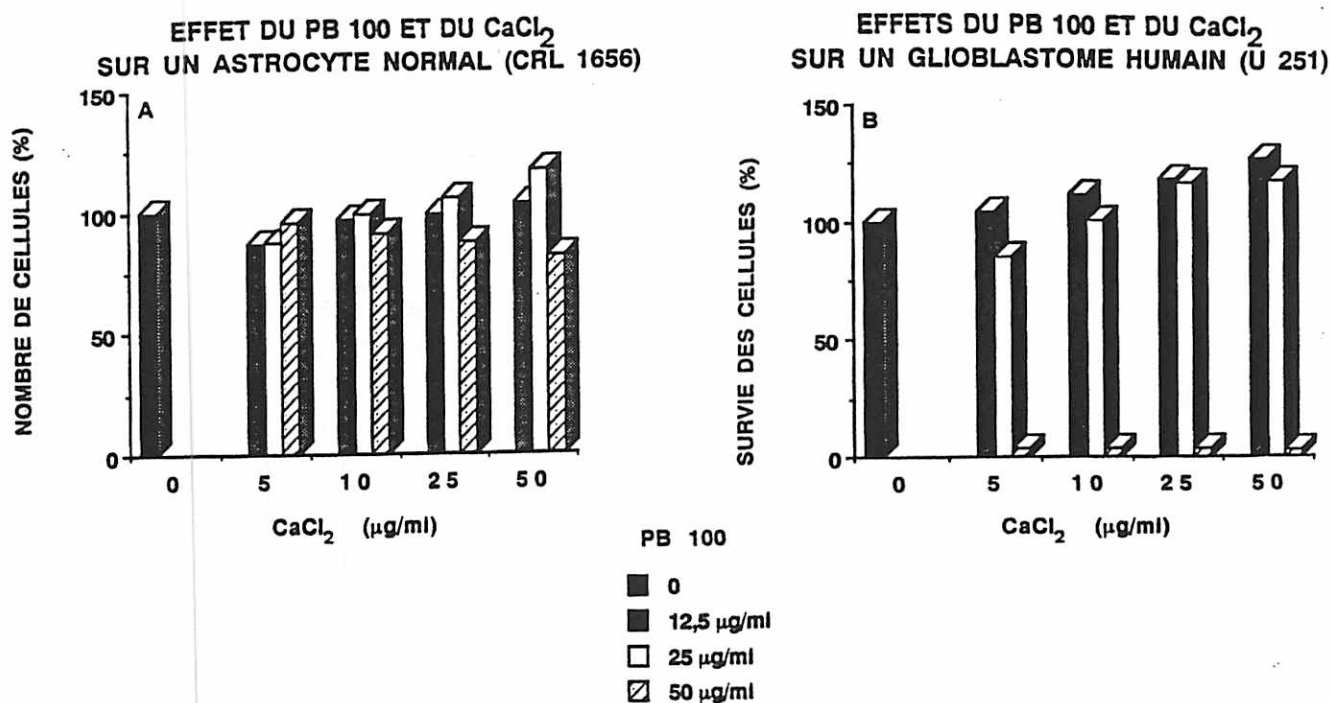


Figure 8 A et B : Inhibition par le PB100 de la stimulation du calcium sur la prolifération d'astrocytes normaux et de cellules de glioblastome résistantes au BCNU. Le PB100 a été ajouté au milieu de culture avant le CaCl_2 . Incubation : 48h à 37°C. Les résultats sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes. A : $\text{SD} \pm 9,13$; B : $\text{SD} \pm 9,85$

3) en présence de PB100, l'absorption des ADN d'astrocytes normaux ne change pas.

D'autres expériences (résumées aux figures 2A et 2B) nous ont permis de démontrer que le PB100 se fixait à l'ADN cancéreux relâché de glioblastome, mais pas à l'ADN normal des astrocytes. Ceci confirme nos résultats précédents sur la fixation sélective de l'alstonine à divers ADN cancéreux (25).

La figure 3 illustre l'effet de diverses concentrations de PB100 sur la synthèse *in vitro* d'ADN de glioblastome et d'astrocyte. On peut constater que l'alcaloïde fait rapidement diminuer la synthèse d'ADN cancéreux, proportionnellement à la dose utilisée, alors que la synthèse d'ADN normal n'est pas affectée. De même, nous avons démontré précédemment que le PB100 inhibait la synthèse *in vitro* d'ADN purifié à partir d'une tumeur du sein, sans affecter la synthèse d'ADN purifié à partir de tissu mammaire normal (25). Les résultats présentés ici confirment la corrélation existant entre l'inhibition de la synthèse d'ADN cancéreux par le PB100 et la correction de l'hyperchromicité de l'ADN cancéreux, c'est-à-dire le resserrément des chaînes relâchées d'ADN par l'alcaloïde.

Effet de la ferritine et du CaCl_2 sur la multiplication des cellules de glioblastome :

Après 48 heures d'incubation en présence de ferritine (Figures 4A-B), la multiplication des cellules de glioblastome augmente proportionnellement à la dose utilisée de 300 à 400 % et celle des astrocytes normaux de 80%. On a obtenu des résultats semblables en utilisant le CaCl_2 à la place de la ferritine (Figures 5A-B). L'effet variable proportionnel à la dose utilisée de ces activateurs sur la multiplication des cellules de glioblastome et d'astrocytes indique qu'il est nécessaire de les doser, non seulement pour évaluer des résultats *in vitro* mais surtout *in vivo* dans le traitement du glioblastome.

Effet de la ferritine et du calcium sur les ADN de glioblastome et d'astrocytes : L'absorption UV à 260 nm des ADN de glioblastome et d'astrocytes a été mesurée avec et sans la ferritine et le CaCl_2 .

Les figures 6A et 6B montrent que les ions de la ferritine et du calcium accroissent, en fonction de la dose utilisée, l'absorption UV. Cette augmentation est plus importante pour l'ADN de glioblastome que pour l'ADN d'astrocytes. Dans les deux cas, l'ampleur de cette hyperchromicité provoquée correspond à l'accélération de la

multiplication cellulaire. On peut observer que l'augmentation de l'hyperchromicité de l'ADN cancéreux et de la multiplication des cellules cancéreuses est considérable alors qu'on n'obtient qu'une très faible réponse avec des cellules et des ADN normaux. Ceci confirme les résultats des essais comparatifs que nous avons effectués précédemment sur les effets des cancérogènes sur les cellules et les ADN normaux et cancéreux (28,29,30).

Le PB100 inhibe la stimulation de la multiplication des cellules de glioblastome et d'astrocytes provoquée par la ferritine et le Ca^{2+} : Etant donné la forte activité mitogène des ions ferritine et Ca^{2+} sur les cellules de glioblastome, on pouvait se demander si le PB100 entrerait en compétition avec ces activateurs et pourrait encore inhiber la croissance des cellules cancéreuses. On a donc ajouté d'abord le PB100 puis soit la ferritine soit le Ca^{2+} au milieu de culture et les cellules viables ont été comptées après 48 h d'incubation. Les figures 7A-B et 8A-B indiquent que, bien que l'activité du PB100 ne soit jamais enrayée, de plus fortes concentrations sont alors nécessaires pour que l'alcaloïde recouvre son activité totale. Il faut cependant noter que ces concentrations demeurent tout à fait dans les limites de celles que nous utilisons habituellement pour nos expériences (cf. Figure 1).

L'activité de la ferritine est importante avec des concentrations de l'ordre du ng/ml, alors que le Ca^{2+} est actif avec des concentrations en μ g/ml. Nous avons démontré précédemment que les ions ferritine (31) et calcium (résultats non publiés) se fixaient à divers ADN cancéreux. Le PB100, les ions ferritine et Ca^{2+} entrent donc en compétition pour les sites de fixation de l'ADN. Il faut cependant noter que le PB100, alcaloïde indole, possède un atome d'azote nucléophile (N^+) qui réagit avec Fe^{3+} et d'autres ions métalliques ; la capture d'ions peut donc aussi jouer un rôle.

Discussion

Comme nous l'avons mentionné dans de précédentes publications (22,25,26), la comparaison entre les ADN de divers tissus cancéreux et les ADN des mêmes tissus normaux nous a permis de démontrer que les ADN cancéreux présentaient toujours une plus forte absorption UV à 260 nm. Les expériences ont montré que cette hyperchromicité était

étroitement liée à l'augmentation de la synthèse *in vitro* d'ADN cancéreux et de la multiplication *in vivo* des cellules tumorales.

Un grand nombre d'expériences ont permis de mettre au point un modèle fonctionnel de l'ADN cancéreux que nous avons proposé à la fin des années 70. Nous ne pouvons que le décrire brièvement ici. L'hyperchromicité de l'ADN cancéreux, généralement assez prononcée, est le signe que la molécule présente, en de multiples endroits, des zones importantes où la double chaîne est ouverte en permanence. Alors que les brins d'ADN normal se séparent localement et brièvement pour la réplication et l'expression des gènes, opérations étroitement contrôlées, les brins isolés de l'ADN cancéreux sont accessibles de manière permanente aux enzymes responsables de la réplication et de la transcription, de sorte que ces opérations deviennent anarchiques. La molécule d'ADN cancéreux peut être décrite comme une hélice déstabilisée avec des zones relâchées facilement accessibles aux enzymes et à de nombreuses autres molécules endogènes ou exogènes, bordée de part et d'autre de zones où les spirales de l'hélice sont trop resserrées et les gènes rendus inopérants. C'est cette déstabilisation de la structure secondaire de l'ADN cancéreux qui est responsable de la multiplication anarchique des cellules tumorales et de la dérégulation de l'expression des gènes.

De nombreux tests effectués *in vitro* avec des cancérogènes bien connus nous ont montré que ces composés augmentaient sélectivement l'hyperchromicité des ADN cancéreux ainsi que leur synthèse *in vitro*, mais affectaient très peu les ADN normaux. Nous avons donc mis au point un test rapide et spécifique (Oncotest) qui associe l'absorption UV et la synthèse *in vitro* de l'ADN ; nous l'avons utilisé dans un premier temps pour détecter des cancérogènes ; on peut mentionner au passage que des réponses positives incontestables ont été obtenues avec les hormones stéroïdes et un grand nombre d'antimitotiques fortement dilués, qui sont maintenant reconnus comme cancérogènes à très faibles doses.

Mais notre Oncotest nous a également permis de chercher des composés qui au lieu d'augmenter la déstabilisation des ADN cancéreux comme les cancérogènes, pourraient réduire sélectivement la séparation des brins d'ADN cancéreux tout en restant inactifs sur les ADN normaux. Des publications font état de nos découvertes concernant des composés capables de normaliser

les cellules cancéreuses (29). Nous avons montré qu'*in vivo* ils inhibaient la prolifération des cellules tumorales sans affecter la multiplication des cellules normales. Ils sont attirés spécifiquement par les brins dédoublés facilement accessibles des zones relâchées des ADN cancéreux. Une exposition prolongée de l'ADN d'une cellule normale à des cancérogènes peut déborder les mécanismes de réparation cellulaire et initier un processus malin. Si cette transformation n'est pas trop avancée, des composés normalisants peuvent rétablir l'état normal. En revanche, lorsque le processus malin est bien entamé, le métabolisme cellulaire dépend de l'expression de gènes modifiés (car des sites d'initiation faussés qui ne sont pas normalement exposés dans l'ADN sain sont devenus accessibles) : les cellules cancéreuses fabriquent et utilisent de nombreux ARN spécifiques. Lorsque des composés normalisants se fixent à l'ADN cancéreux et resserrent les zones distendues de l'hélice, le plus souvent en se fixant aux sites d'initiation ou, pour certaines molécules, en s'intercalant, ils empêchent la fabrication de métabolites anormaux et la cellule cancéreuse meurt (la sempervirine par exemple est partiellement un agent intercalant) (34).

Dans cet article, nous étudions l'activité d'un de ces composés normalisants, le PB100, sur la multiplication *in vitro* d'une lignée cellulaire de glioblastome résistante au BCNU (U251) et d'une lignée cellulaire normale d'astrocyte (CRL 1656). Notre double objectif était de démontrer que le PB100 pouvait vaincre la résistance des cellules malignes et arrêter leur multiplication, sans affecter les cellules normales.

Nous avons effectivement montré que le PB100 supprimait l'hyperchromicité de l'ADN de glioblastome (il resserre les chaînes), qu'il inhibait la synthèse *in vitro* de l'ADN du glioblastome (il contrôle sa réplication), et qu'il inhibait efficacement la multiplication *in vitro* des cellules de glioblastome. En revanche, l'absorption UV des ADN d'astrocytes normaux n'est pas modifiée et leur réplication n'augmente pas ; compte tenu de ces résultats, on peut supposer que la faible augmentation de la multiplication des astrocytes observée lors de nos expériences est due à la présence de métabolites provenant de l'activité de l'ATPase (probablement du sérum) dans le milieu. Nous avons également démontré que le PB100 se fixait à l'ADN de glioblastome (et non à l'ADN des astrocytes). L'activité du PB100 est proportionnelle à la dose utilisée. Avec des

concentrations de 50 µg/ml, pratiquement toutes les cellules de glioblastome sont détruites ; les cellules restantes (0,1 à 0,2 %) ne sont plus capables de se multiplier. Il est probable qu'un complexe se forme entre l'ADN et le PB100 comme avec l'alstonine, autre composé normalisant (25).

La lignée cellulaire de glioblastome que nous avons utilisée est résistante au BCNU. La résistance aux substances anticancéreuses peut se manifester de différentes manières. La résistance multiple aux produits (MDR) observée dans de nombreux types de cancers dépend du gène *mdr-1*. Il code la glycoprotéine-P, qui régule l'entrée des substances et possède un large spectre d'activité contre de multiples produits chimiothérapeutiques aux structures très différentes. Le gène *mdr-1*, également actif dans les cellules normales (4), est selon de nombreux auteurs, soit surexprimé soit amplifié dans les cellules cancéreuses résistantes, pour des raisons non encore élucidées (17,19). La circulation des substances régulée par la glycoprotéine-P se fait par un canal de calcium membranaire (32).

Lorsque la contraction des chaînes (proportionnelle à la dose utilisée) augmente, l'inhibition de l'expression des gènes d'ADN cancéreux augmente également : le gène *mdr-1* est réduit au silence. Ce phénomène se produit dans un nombre croissant de cellules de glioblastome.

Il a été dit récemment que la ferritine stimulait la croissance les lignées cellulaires de neuroblastome (33). Nous avons décidé de tester cette molécule sur des cellules de glioblastome et des astrocytes. Nous avons également choisi d'étudier l'effet des ions Ca^{2+} sur nos cultures. On a montré que le calcium agissait *in vitro* sur la prolifération des cellules de glioblastome humain : les substances qui bouchent les canaux de calcium ont un effet antiprolifératif pouvant être inversé par l'addition simultanée de chlorure de calcium (33).

Nous avons déjà démontré voilà quelques années que la ferritine, comme tous les autres marqueurs tumoraux, se comportait comme un cancérogène (31). Il n'est donc pas surprenant que la ferritine augmente fortement l'hyperchromicité des ADN de glioblastome, ce qui favorise à la fois la synthèse *in vitro* de l'ADN de glioblastome et la multiplication cellulaire. En revanche, l'absorption UV et la synthèse des ADN d'astrocytes normaux ne subissent aucune

modification, alors que la multiplication cellulaire augmente faiblement, ce qui en l'absence de tout effet de la ferritine sur l'ADN des astrocytes peut être attribué à des métabolites cellulaires provenant de l'activité de l'ATPase dans le milieu de culture. Le CaCl_2 a les mêmes effets. Des ions comme le Ca^{2+} peuvent facilement se fixer aux groupements phosphate situés sur les brins isolés des chaînes ouvertes d'ADN ; ceci entraîne une déformation stéréochimique favorisant la rupture des liaisons hydrogène et la déstabilisation de l'ADN, accélérant ainsi la réplication de l'ADN et la multiplication des cellules tumorales. De plus, les propriétés spécifiques de la membrane des cellules cancéreuses facilite le passage des ions.

Lorsque la ferritine ou le CaCl_2 sont testés avec le PB100, il y a compétition entre le mitogène et l'inhibiteur. Bien que l'action du PB100 ne soit jamais totalement enrayée, elle diminue et il faut alors des concentrations plus importantes pour que la multiplication des cellules cancéreuses soit complètement inhibée. Ces concentrations demeurent cependant bien en-deçà de celles utilisées lors de nos expériences. La compétition entre la ferritine, le CaCl_2 et le PB100 est liée à la dose utilisée. Les expériences ont montré (Figures 8A-B) que ces trois composés sont attirés par les sites de fixation de l'ADN. En ce qui concerne la ferritine, il est possible que la capture des ions Fe^{3+} par un atome d'azote nucléophile de l'alkaloïde indole permette à ces composés de neutraliser leur activité respective. La réversibilité partielle de l'effet inhibiteur du PB100 par la ferritine ou le CaCl_2 prouve que l'alkaloïde ne se fixe pas à l'ADN cancéreux par liaison covalente (**).

Les données présentées dans cet article soulignent l'activité importante et très sélective du PB100 sur les cellules de glioblastome résistantes au BCNU. La capacité du PB100 à vaincre la résistance provient du fait que le resserrement des chaînes relâchées des ADN

cancéreux empêche l'expression des gènes. Ceci s'applique fondamentalement aux divers gènes que la cellule cancéreuse utilise pour engendrer la résistance : le gène *mdr-1* codant la glycoprotéine-P et les gènes codant diverses enzymes impliquées dans le phénomène de résistance médicamenteuse.

L'effet inhibiteur sélectif du PB100 sur les cellules cancéreuses du système nerveux central, de même que sa capacité à traverser la barrière hématoencéphalique (en cours de publication), font de cet alcaloïde un candidat potentiel pour le traitement des tumeurs cérébrales. D'autres résultats nous ont montré que l'activité du PB100 s'étendait à des tumeurs très diverses, *in vitro* et *in vivo*. Le PB100 n'ayant aucun effet sur les cellules normales, son utilisation n'engendre donc aucun effet secondaire toxique comme la destruction des cellules sanguines et des expériences *in vivo* ont démontré qu'à des doses thérapeutiques très diverses, il était totalement dépourvu de toxicité. De plus, de multiples essais ont prouvé que dans le cadre de la normalisation des ADN cancéreux, le PB100 inhibe spécialement la réplication des enzymes des virus à ADN et à ARN, y compris la transcriptase inverse, et qu'il a une activité antivirale très puissante, notamment contre le VIH. Les études sont en cours et les résultats seront publiés ultérieurement.

(**) Il est vrai que des alcaloïdes similaires au PB100 ont une très forte affinité pour les membranes cellulaires, mais les faits présentés ici ne peuvent en aucun cas suggérer que l'effet inhibiteur de la résistance exercé par le PB100 soit dû à l'inhibition de la glycoprotéine-P par restriction membranaire.

Remerciements

Nous remercions les Dr L. Le Goff et M.Y. Aaron-da-Cunha pour avoir testé l'activité inhibitrice du PB100 sur les systèmes végétaux avec le virus de la mosaïque du tabac (VMT).

References

- 1 Patil SR, Corder MP, Jochimsen PR and Dix FR: Bone marrow chromosome abnormalities in breast patients following adjuvant chemotherapy. *Cancer Res* 40: 4076-4080, 1980.
- 2 Anderson M, Storm HM and Mouridsen HT: Incidence of new primary cancers after adjuvant tamoxifen therapy and radiotherapy for early cancer. *J Natl Cancer Inst* (Reports) 83: 13-16, 1991.
- 3 Schmähl D and Habs M: Carcinogenic action of low-dose cyclophosphamide given orally to Sprague-Dawley rats in a life time experiment. *Int J Cancer* 23: 706-712, 1979.
- 4 Evans R, Madison LD and Eidlen DM: Cyclophosphamide-induced changes in the cellular composition of a Methylcholanthrene-induced tumor and their relation to bone marrow and blood leucocyte levels. *Cancer Res* 40: 395-402, 1980.
- 5 Rossi L, Mollener T, Munhall A and Shubiak Ph: Induction of tumors by injection of N-ethyl-N-nitrosourea into the amniotic space of the mouse fetus. *J Natl Cancer Inst* 63: 987-989, 1979.
- 6 Griswold DP, Schabel FM, Wilcox WS *et al*: Success and failure in the treatment of solid tumors. I. Effects of cyclophosphamide (NSC-26271) on primary and metastatic plasmacytoma in the hamster. *Cancer, Chemother* 52: 345-387, 1968.
- 7 Mathé G: Cancer «cures» in children, adolescents and young adults versus general cancer cure failure after 50 years of age *Biomed Pharmacother* 42: 227-236, 1988.
- 8 Israel L: Les Résistances causes échec des chimiothérapies anticancéreuses *Path Biol* 37: 125-127, 1989.
- 9 Moscow JA and Cowan KH: Multidrug resistance. *J Nat Cancer Inst* 80: 14-20, 1988.
- 10 Mackillop WJ: Intrinsic versus acquired drug resistance: *Cancer Treat Rep* 70: 817-818, 1986.
- 11 Bradley G, Juranca PF and Ling V: Mechanics of multi-drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 948: 87-128, 1988.
- 12 Benard J, Da Silva J, Teyssier JR, and Riou G: Over expression of *mdr 1* gene with no DNA amplification in a multi-drug resistant human ovarian carcinoma cell line. *Int J Cancer* 43: 471-477, 1989.
- 13 Skovsgaard T, Dano K and Nissen NI: Chemosensitizers counteracting acquired resistance to anthracyclines and Vinca alkaloids *in vivo*. A new treatment principle. *Cancer Treat Rev* 11: 63-72, 1984.
- 14 Kessel De and Wilberding C: Anthracycline resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonists. *Cancer Res* 45: 1687-1691, 1985.
- 15 Meyers MB, Schneider KA, Spengler BA, Chang TD and Biedler JL: Sorcin (V 19) a soluble acidic calcium-binding protein overproduced in multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 36: 2373-2380, 1987.
- 16 McCrath T and Center MS: Adriamycin resistance in HI-GO cells in the absence of detectable P-glycoprotein *Biochem Biophys Res Commun* 145: 1171-1176, 1987.
- 17 Merkel DE, Fuqua SA, Hill SM and McGuire WL: P-Glycoprotein gene amplification or overexpression is not detected in clinical breast cancer specimens. In: Hall TC (ed), *Prediction of Response to Cancer Therapy*. New York, Alan R. Liss, 1988, pp.1-73.
- 18 Gekeler V, Weger S and Probst H: MDR-1/P-glycoprotein gene segments analyzed from various human leukemic cell lines exhibiting different multidrug resistance profiles. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 796-802, 1991.
- 19 Van der Bliek AM, Van der Velde-Koertz T, Ling V and Borst P: Overexpression and amplification of five genes in a multidrug-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Mol Cell Biol* 6: 1671-1678, 1986.
- 20 Choi K, Chen C, Kriegler M and Roninson IB: An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the MDR-1 (P-Glycoprotein) gene. *Cell* 53: 520-529, 1988.
- 21 Nooter K and Herweijer H: Multidrug resistance (*mdr*) genes in human cancer. *Br J Cancer* 63: 663-669, 1991.
- 22 Beljanski M: Oncotest: a DNA assay system for the screening of carcinogenic substances. *IRCS* 7: 476, 1979.
- 23 Beljanski M: The regulation of DNA replication and transcription. The role of trigger molecules in normal and malignant gene expression. Edited by A. Wolsky. Basel: Karger, 1983. 190 p. *Experimental biology and medicine*: V. 8.
- 24 Hugues NA and Rapoport H: Flavopereirine, an alkaloid from *Geissospermum vellosi* *J Am Chem Soc* 80: 1604-1608, 1958.
- 25 Beljanski M and Beljanski MS: Selective inhibition of *in vitro* synthesis of cancer DNA by alkaloids of β -carboline class. *Expl. Cell Biol* 50: 79-87, 1982.
- 26 Beljanski M, Bourgarel P and Beljanski M: Correlation between *in vitro* DNA synthesis, strand separation and *in vivo* multiplication of cancer cells. *Expl Cell Biol* 49: 220-231, 1981.
- 27 Hotchkiss, RD: Methods for characterization of nucleic acids I. Characterization of nucleic acids by spectrophotometry. Colowick S.P. and Kaplan NO (eds). *Methods in Enzymology* in Academic Press, New York, 1957, pp. 708-715.
- 28 Beljanski M and Beljanski MS: Three alkaloids as selective destroyers of the proliferative capacity of cancer cells. *IRCS Med Sci* 12: 587-588, 1984.
- 29 Beljanski M and Beljanski MS: Three alkaloids as selective destroyers of cancer cells in mice. Synergy with classic anticancer drugs. *Oncology* 43: 198-203, 1986.
- 30 Beljanski M: Cancer therapy: a new approach. *Deut Zeit für Onkologie* 22: 145-152, 1990.
- 31 Beljanski M, Nawrocki T and Le Goff L: Possible role of markers synthesized during cancer evolution: I-Markers in mammalian tissues. *IRCS Med. Sci*, 14: 809-810, 1986.
- 32 Tsuda K, Tsuda S and Masuyama Y: Effects of calcium antagonists on dopamine release in the central nervous system, *Japanese Circulation Journal* 56: 248-254, 1992.
- 33 Blatt J and Wharton V: Stimulation of growth of neuroblastoma cells by ferritin *in vitro*. *Labo Clin Med* 119: 139-143, 1992.
- 34 Basseler R, Clermeont D, Marnette JM *et al*: Effets de la dihydroflavopereirine et de la sempervirine (alcaloïdes dérivés de la β -carboline) sur les cellules cancéreuses en culture. *Ann Pharmaceutiques Françaises* 43: 83-88, 1985.