Université du Québec INRS-Institut-Armand-Frappier

Activité fonctionnelle de différentes populations lymphocytaires de la rate après injection de doxorubicine couplée ou non au Pluronic L61

Par Nadia Guérin

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès science (M. Sc.)

14 Février 2000

RÉSUMÉ

Il a récemment été rapporté que l'incorporation de la doxorubicine à l'intérieur de micelles formées de molécules de Pluronic L61 (L61) permet de prolonger le temps de circulation de la drogue et d'augmenter la toxicité de la doxorubicine contre plusieurs types de cellules tumorales incluant les cellules métastatiques et celles ayant développé une résistance multiple aux drogues. Dans le but de déterminer si cette augmentation de toxicité se manifestait aussi contre les cellules du système immunitaire, nous avons effectué chez la souris une étude comparative de la toxicité de la doxorubicine et du produit doxorubicine/L61 pour les lymphocytes spléniques.

Après une injection unique de 5 ou 10 mg/kg de doxorubicine ou de doxorubicine/L61 nous avons prélevé les rates des souris à différents moments sur une période de 3 semaines. Nous avons évalué la taille relative des populations de lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et B ainsi que leur capacité à proliférer. De plus, la capacité des précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, de cellules LAK et des lymphocytes T CD4⁺ à répondre à des stimuli appropriés a été mesurée.

Nos résultats démontrent que l'augmentation de la toxicité du mélange doxorubicine/L61 envers les cellules tumorales en comparaison avec les traitements avec la doxorubicine seule ne s'accompagne pas d'un effet analogue envers les lymphocytes de la rate. En effet, même si des variations dans la taille relative des populations lymphocytaires ont été observées dans le temps, des résultats similaires ont été obtenus pour les groupes traités à la doxorubicine seule et ceux traités avec le mélange. Il en est de même en ce qui à trait à la prolifération des lymphocytes T et B stimulés par des mitogènes, à la cytotoxicité des LAK après leur stimulation par l'IL-2 ainsi que dans le cas de la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺ stimulés à la Con A et l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺. Finalement, la comparaison entre les résultats obtenus chez le groupe de souris traitées au L61 et le groupe de souris témoins non injectées, permet de conclure que ce produit est inerte. Notre étude démontre donc que

l'augmentation de l'activité antinéoplasique de la doxorubicine lorsqu'elle est associée au L61 ne s'accompagne pas d'un effet similaire envers les cellules immunitaires, ce qui permet de croire que ce produit pourrait être une alternative prometteuse dans le traitement contre le cancer.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont en premiers lieux à ma directrice Suzanne Lemieux qui m'a permis d'effectuer ce projet dans son laboratoire tout en mettant à ma disposition ses conseils, ses connaissances ainsi que son expérience du monde scientifique.

J'aimerais aussi remercier le docteur Valery Alakhov qui a permis la réalisation de ce projet par ses connaissances, ses conseils et son intérêt.

Un grand merci à Supratek Pharma inc., à la Fondation Armand-Frappier ainsi qu'au Fonds pour la Formation des chercheurs et l'aide à la recherche (Fond FCAR) conjointement avec le Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) pour leur support financier grandement apprécié.

Au sein du laboratoire, j'aimerais dire un gros merci à Yvette Lusignan qui m'a appris beaucoup techniquement et dont la présence à tout moment pour m'aider et me conseiller fut grandement appréciée. De plus, merci à Simon et Anick qui sont devenus de bons amis et qui m'ont apporté un certain support technique mais surtout un grand support moral.

Merci à Shengmin Li, chercheur chez Supratek Pharma inc., qui a effectué la préparation des produits pour les injections, à Marie Désy qui a fait l'analyse statistique des résultats et à Marcel Desrosiers pour son aide en cytométrie en flux.

Finalement, merci Patrice, Serge, Magella et Nathalie: impossible de vous passer sous silence. Grâce à vos encouragements, j'y suis parvenue!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	x
A. INTRODUCTION	1
B. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. La doxorubicine	8
2. Les transporteurs de drogues : Alternatives pour diminuer les effets seco	ondaires et
augmenter l'efficacité des agents antinéoplasiques	14
2.1 Les liposomes	
2.2 Les anticorps antitumoraux	
2.3 Les ligands spécifiques de récepteurs	
2.4 Les polymères de synthèse «Pluronics»	
2.5 Le Pluronic L61	
3. L'immunité antitumorale	
4. Raison d'être du projet	33
C. APPROCHE EXPÉRIMENTALE	35
1. Modèle animal et protocole d'inoculation	36
2. Prélèvement des rates et préparation des suspensions cellulaires	
3. Analyse cytofluorométrique	36
4. Lymphoprolifération	37
5. Production de lymphocytes T cytotoxiques	40
6. Production de Lymphokine-activated Killer (LAK)	40
7. Mesure de l'activité cytotoxique	41
7.1. Préparation des cellules cibles radiomarquées	41
7.2. Test de cytotoxicité	
7.3. Calcul du pourcentage de cytotoxicité	42
8. Induction de la sécrétion d'IL-2	43
9. Dosage de l'IL-2	43

10. Analyse statistique	44
D. RÉSULTATS	45
1. Schéma général de l'étude	46
2. Analyse cytofluorométrique	47
3. Réponse proliférative	
4. Propriétés fonctionnelles	57
4.1 Production de lymphocytes T cytotoxiques	57
4.2 Production de LAK	58
4.3 Production d'IL-2	61
E. DISCUSSION	69
F. CONCLUSION	80
BIBLIOGRAPHIE	83
ANNEXE A	101
ANNEXE B	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Mise en contexte de l'étude et schéma général de	
	l'expérimentation.	5
Figure 2.	Structure chimique de la doxorubicine	9
Figure 3.	Structure générale des Pluronics	21
Figure 4.	Représentation schématique de l'équilibre entre le Pluronic L61 et	
	la doxorubicine et illustration de l'hypothèse	
	d'hypersensibilisation des cellules MDR	26
Figure 5.	Analyse type des populations lymphocytaires de la rate par	
	cytométrie en flux.	38
Figure 6.	Effet de différentes doses de doxorubicine couplée ou non au	
	polymère L61 sur la taille relative des populations de lymphocytes	
	de la rate de souris.	48
Figure 7.	Effet de différentes doses de doxorubicine couplée ou non au	
	polymère L61 sur la capacité de prolifération des lymphocytes T	
	de la rate de souris en réponse à la ConA	53
Figure 8.	Effet de différentes doses de doxorubicine couplée ou non au	
	polymère L61 sur la capacité de prolifération des lymphocytes B	
	de la rate de souris C57BL/6 en réponse au LPS	55
Figure 9.	Effet de différentes doses de doxorubicine couplée ou non au	
	polymère L61 sur la capacité de stimulation in vitro des Tc à partir	
	des lymphocytes de la rates de souris C57BL/6 (H-2b) avec des	
	cellules allogéniques (H-2 ^d).	59
Figure 10.	Effet de différentes doses de doxorubicine couplée ou non au	
	polymère L61 sur la capacité à générer des LAK par la culture des	
	cellules spléniques de souris en présence d'IL-2.	62
Figure 11.	Exemple de courbe standard (A) et représentation graphique des	
	variations (B) dans la production d'IL-2 par les cellules de souris	
	normales mises en culture en présence de Con A	64

Figure 12.	2. Effet de différentes doses de doxorubicine couplée ou non au			
	polymère L61 sur la production d'IL-2 par les lymphocytes			
	spléniques de souris stimulés par la ConA			

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Comparaison entre la cytotoxicité de la doxorubicine seule et				
associée au polymère L61 (Dox/L61) envers deux lignées					
	cellulaires MDR et leurs lignées parentales sensibles				
	respectives.	24			
Tableau 2.	Tableau récapitulatif démontrant les valeurs significatives				
	pour les résultats obtenus lors de l'analyse				
	cytofluorométrique.	51			

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ADCC: cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps

ADN: acide désoxyribonucléique

AFP : α-foetoprotéine de rat

ATP: adénoside triphosphate

CEA: antigène carcino-embryonnaire

CL: liposome conventionnel

CMC: concentration critique de micellisation

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

Con A: concanavaline A

CPA: cellule présentatrice d'antigène

CPM: coups par minute

Cr : chrome

Dox: doxorubicine

EGFR: récepteur du facteur de croissance épidermique

FADD: domaine de mort associé à Fas

FITC: isothiocyanate de fluorescéine

G-CSF: facteur stimulant la croissance de colonies de granulocytes

GM-CSF: facteur stimulant la croissance de colonies de granulocytes et

macrophages

HBSS: solution de Hanks

³H-TDR: thymidine tritiée

IC₅₀: inhibition de la croissance à 50%

IFN: interféron

IL : interleukine

kg : kilogramme

L61 : Pluronic L61

L61 : Pluronic L61

LAK : cellule tueuse activée par une lymphokine

LCL : liposome à circulation prolongée

LPS: lipopolysacharide

MDR: résistance multiple aux drogues

mg : milligramme

mg/m²: milligramme par mètre carré

mM: millimolaire

NK : cellule tueuse naturelle

PEG: polyéthylène glycol

P-gp: glycoprotéine P

POE: polyoxyéthylène

POP: polyoxypropylène

R-PE: R-phycoérythrine

SFB: sérum fœtal bovin

Tc: lymphocytes T cytotoxiques

TNF: facteur nécrosant des tumeurs

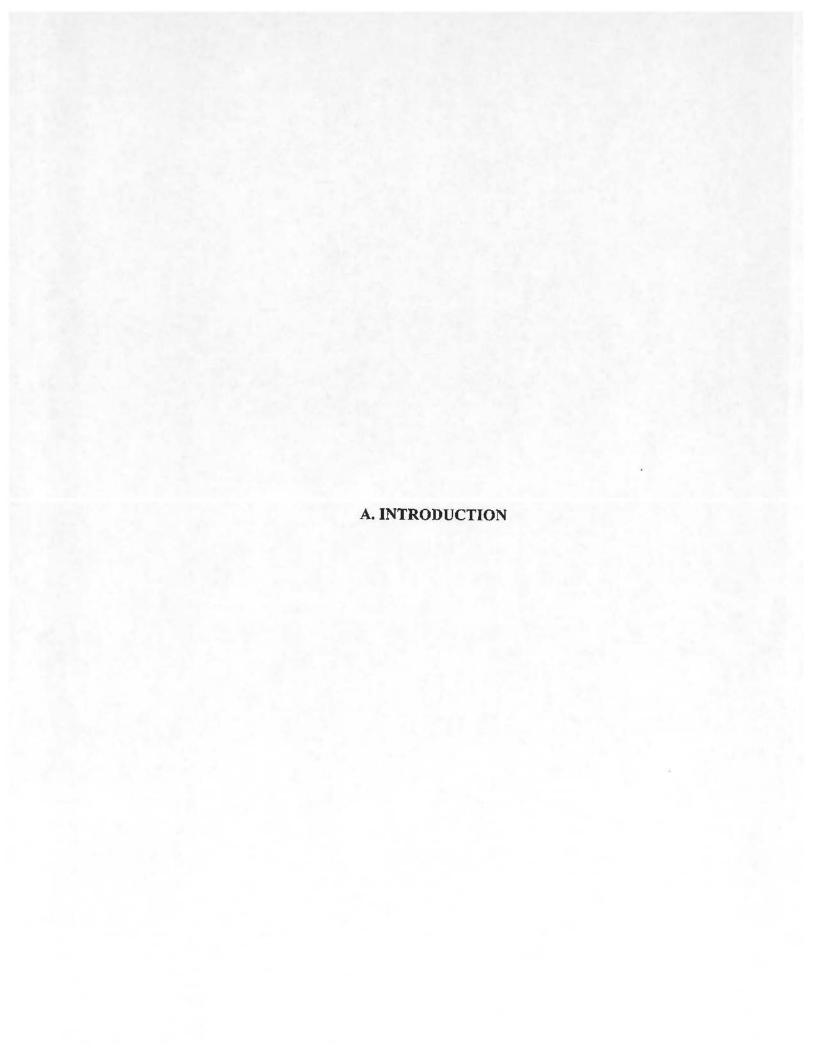
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

U : unité

WGA: agglutinine de germe de blé

μCi : microcurie

μl : microlitre



Dans son mémoire remis au Ministre de la Santé et des Services Sociaux en 1996, la Fondation québécoise du cancer estimait qu'au Québec, le cancer frapperait une personne sur trois. La chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie seule ou en combinaison sont les thérapies couramment utilisées dans le traitement des patients atteints du cancer. Il n'y a plus de doute que l'avènement de la chimiothérapie a permis d'augmenter considérablement leur espérance de vie. Malheureusement, cette approche thérapeutique s'accompagne de nombreux effets secondaires tels l'alopécie, les nausées, la myélotoxicité, la stomatite, la cardiotoxicité et la leucopénie. La leucopénie ou diminution du nombre des leucocytes dans le sang entraîne chez les patients une immunodépression augmentant ainsi le risque d'infections par les germes opportunistes de même que le risque de développer des cancers secondaires.

Lors de l'administration d'un traitement de chimiothérapie, les oncologues doivent donc constamment se préoccuper de garder un équilibre entre les effets indésirables et le maximum d'efficacité du médicament en prescrivant des doses qu'ils souhaitent assez fortes pour contrôler la tumeur mais assez faibles pour que l'atteinte des cellules normales ne soit pas trop sévère. En plus des effets secondaires qui doivent forcément être pris en compte, l'efficacité de la chimiothérapie est aussi réduite par plusieurs autres facteurs notamment l'interaction des agents antinéoplasiques avec des composantes du sang telles les protéines et les cellules, l'élimination par les organes filtrants tels les reins et le foie ainsi que la sélection de cellules résistantes.

Depuis plusieurs années, chercheurs et cliniciens travaillent avec acharnement afin d'augmenter l'efficacité des différents agents antinéoplasiques. Plusieurs solutions ont été proposées dont celle d'utiliser des structures de transport telles des anticorps, des liposomes, des microsphères et des polymères de synthèse pour accroître la persistance de ces agents dans la circulation, favoriser l'atteinte des cellules tumorales et augmenter la pénétration intracellulaire.

Les «Pluronics» constituent un groupe particulier de polymères de synthèse. Ce sont des polymères de poly-oxyéthylène et de poly-oxypropylène (POP-POE-POP) qui varient entre eux selon le nombre d'unités des composantes constituant leur structure de base. Le spectre d'utilisation des pluronics est très large : on les emploie notamment dans la composition du sang artificiel, comme adjuvant et comme véhicule pour le transport d'agent anti-tumoraux et d'agents anti-inflammatoires. Le Pluronic L61 est le transporteur concerné par la présente étude.

Des études antérieures ont démontré que le Pluronic L61 (L61) lorsqu'associé à la doxorubicine (Dox) augmentait l'efficacité de cette dernière dans le contrôle de la croissance de tumeurs conventionnelles, dans la limitation des métastases et même dans le contrôle de tumeurs ayant développé une résistance multiple aux drogues (MDR). Ces études ont cependant été effectuées uniquement *in vitro* ou dans des modèles animaux. Avant de poursuivre des études cliniques chez l'humain, il est essentiel de déterminer si l'augmentation de la toxicité des complexes Dox/L61 contre les différents types de cellules tumorales ne se retrouve pas aussi au niveau des cellules normales.

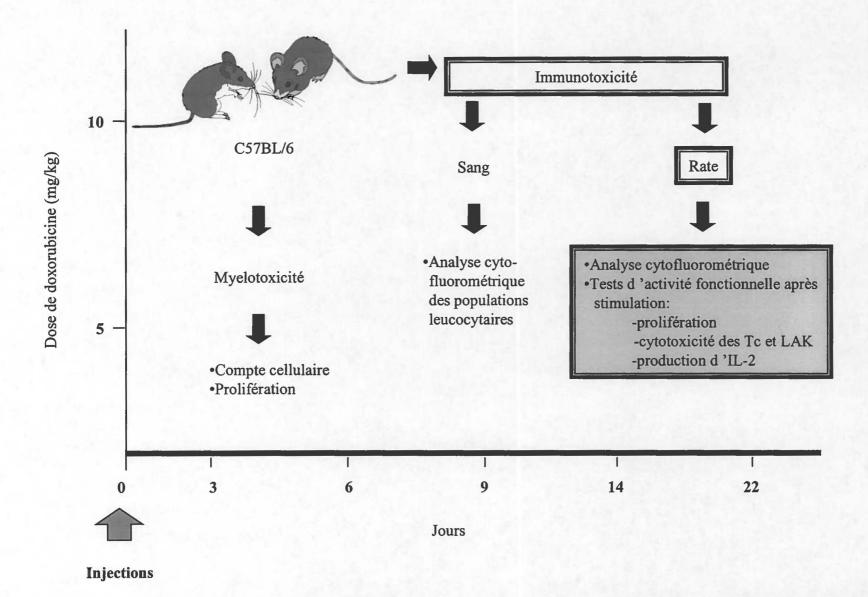
Le but de la recherche exposée dans ce mémoire était de comparer la toxicité relative de la doxorubicine sous forme libre ou associée au polymère L61, pour les cellules responsables de l'immunité antitumorale. Notre étude a porté d'abord sur l'évaluation des proportions relatives des lymphocytes B et des lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) et cytotoxiques (CD8⁺) de la rate sur une période de trois semaines après l'inoculation des produits. Nous avons à cet effet effectué une analyse cytofluorométrique des populations lymphocytaires de la rate à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes. Nous avons également suivi la capacité proliférative et/ou l'activité fonctionnelle des lymphocytes B et T spléniques en réponse à des stimuli appropriés de même que la capacité des cellules de la rate à générer des LAK (Lymphokine-Activated Killer) qui sont aussi des effecteurs importants de l'immunité antitumorale.

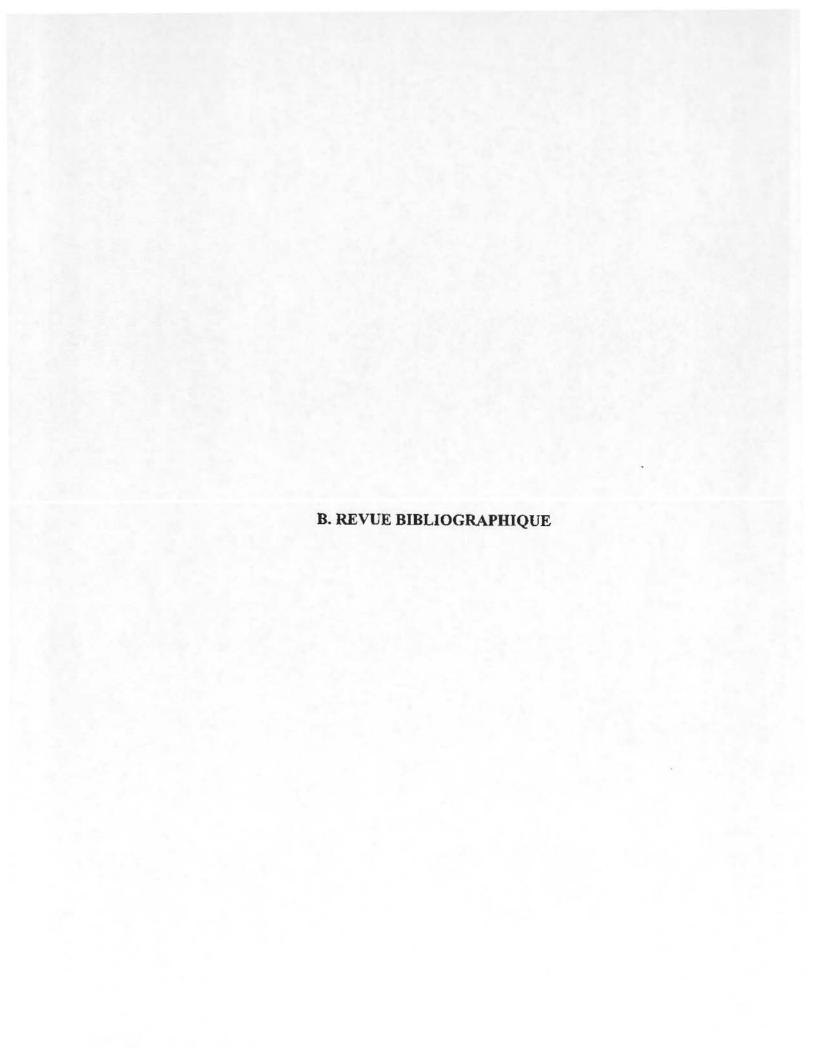
Bien que ce mémoire concerne essentiellement l'étude de toxicité des produits pour les cellules spléniques, celle-ci s'inscrivait dans un programme plus vaste (Figure 1). Les deux autres études qui ont été effectuées parallèlement ont porté sur la toxicité des produits injectés pour les cellules de la moelle osseuse et pour les différentes populations

leucocytaires du sang. Nous en relaterons sommairement les résultats à titre comparatif dans le chapitre de discussion générale.

Figure 1. Mise en contexte de l'étude et schéma général de l'expérimentation.

L'étude de l'immumotoxicité du complexe Dox/L61 pour les cellules immunitaires de la rate (encadré ombragé) se situait dans le contexte d'une étude globale comportant aussi l'étude de la myélotoxicité et de l'immunotoxicité pour les populations leucocytaires du sang. L'immunotoxicité pour les cellules immunitaires de la rate est évaluée par les variations dans les populations lymphocytaires et par les changements pouvant être observés dans les fonctions de ces cellules après stimulation.





1. La doxorubicine

Après la daunorubicine, la doxorubicine est le deuxième composé de la grande famille des anthracyclines à avoir été découvert. Il s'agit d'un dérivé de la daunorubicine dont il se différencie par la présence d'un groupement hydroxyl sur sa chaîne latérale (Figure 2). Tel que rapporté par Calabresi et Parks (1996) ainsi que par Suarato, Angelucci et Geroni (1999), les propriétés antinéoplasiques de la doxorubicine ont été identifiées en 1969 par Arcamone et ses collaborateurs. Il s'agit d'un agent antinéoplasique à large spectre utilisé dans le traitement de nombreux cancers notamment les sarcomes, les lymphomes Hodgkiniens, les leucémies aiguës, le cancer du sein, les cancers génito-urinaires, le cancer de la thyroïde, des poumons et de l'estomac ainsi que les neuroblastomes (Tan et al.1973; Benjamin, Wiernik et Bachur, 1974; O'Bryan et al., 1977; Lucas et Spielmann, 1985; Mutschler et al., 1995; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997).

Les mécanismes d'action suggérés de la doxorubicine sont multiples. Sauf exception, les observations énumérées ci-après ont été tirées de Mutschler et al. (1995), Calabresi et Parks (1996), Wynn, Meiller et Crossley (1997) et Gewirtz (1999). Tout d'abord, la doxorubicine s'intercalerait dans l'ADN et en affecterait les fonctions incluant sa propre synthèse et celle de l'ARN. Des cassures au niveau de simples et doubles brins ont été observées, ce qui entraînerait un échange entre des chromatides sœurs (crossingover). En plus de la scission de l'ADN qui serait impliquée dans la production de radicaux libres, la doxorubicine réagirait aussi avec le cytochrome P-450 en présence du NADPH pour former des radicaux intermédiaires pouvant réagir avec l'oxygène pour produire des radicaux anioniques superoxydes. Ceux-ci peuvent générer du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyls hautement toxiques pour les cellules et principalement pour celles du coeur. De plus, les réactions intramoléculaires de transfert d'électrons entraîneraient la génération de puissants agents alkylants. L'interférence de la doxorubicine avec des enzymes telles la topoisomérase II et l'hélicase serait aussi une des

Figure 2. Structure chimique de la doxorubicine

Tiré de Doroshow dans «Cancer Chemotherapy and Biotherapy» (1996). Le groupement hydroxyl de la chaîne latérale de la doxorubicine est aussi retrouvé chez tous ses dérivés.

cause des dommages faits à l'ADN (revue par Gewitrtz, 1999). L'induction de l'apoptose ou mort cellulaire programmée serait aussi un des mécanismes d'action probables (revue par Gewitrtz, 1999). Comme la doxorubicine altère les propriétés de l'ADN, le maximum de toxicité est retrouvé en phase S du cycle cellulaire mais en faible concentration de doxorubicine les cellules peuvent traverser la phase S et mourir seulement en phase G_2 (Mutschler *et al.*, 1995; Calabresi et Parks, 1996). Cependant l'arrêt de la croissance cellulaire causé par l'inhibition de certaines protéines impliquées dans la voie de transduction des signaux a aussi été observé en phase G_1 et G_2 (revue par Gewitrtz, 1999). En raison de l'occurrence fréquente du développement d'une deuxième tumeur chez les patients traités avec ce médicament il a été établi que la doxorubicine est à la fois mutagène et carcinogène (Erlichman et Moore, 1996).

La doxorubicine peut aussi réagir avec la membrane cellulaire et en altérer les fonctions ce qui peut jouer un rôle important autant dans l'action antitumorale que dans la cardiotoxicité du produit (Mutschler *et al.*, 1995; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997). Bref, la doxorubicine peut affecter à différents niveaux les fonctions des cellules en division, autant les cellules souches que celles en différenciation ou activées.

L'administration de la doxorubicine se fait par voie intraveineuse et la courbe de disparition du produit dans le sang après une seule injection est multi-phasique (Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997). Le traitement peut être administré par l'injection d'une forte dose tous les 21 jours, de faibles doses pendant 2 à 3 jours à toutes les 4 semaines, de très faibles doses une fois par semaine ou de doses intermédiaires en infusion continue pendant 96 heures toutes les 3 à 4 semaines (Wynn, Meiller et Crossley, 1997). Suite à son inoculation, la drogue est rapidement retrouvée dans le cœur, les reins, les poumons, le foie et la rate (Calabresi et Parks, 1996). La doxorubicine est principalement éliminée par le foie (60%), l'élimination par les reins étant minime et observée essentiellement durant les 6 premières heures post-injection. La demi-vie de la doxorubicine dans la rate est de 782 minutes, la plus longue après celle dans le plasma, dans la moelle osseuse et dans les muscles squelettiques. De plus, la rate est, après les

poumons, l'organe où la quantité de liaisons covalentes entre le médicament et les protéines de l'organe est la plus élevée soit 66 pmoles de doxorubicine liée par mg de protéines. Il a été démontré par plusieurs équipes que ce type de liaison est impliqué dans le mécanisme de cytotoxicité par la production de composés résultant du métabolisme de la doxorubicine présente (Marafino, Shri et Siegel, 1981). On estime que seulement 40% de la dose administrée peut être efficace, le reste se liant aux protéines du sang telles l'albumine et l'α-glycoprotéine acide (Eksborg, Ehrsson et Ekqvist, 1982; Greene et al., 1983). En raison de l'accumulation rapide et de la persistance de la doxorubicine dans la rate, les cellules immunitaires sont particulièrement exposées à son action cytotoxique. Les cellules spléniques activées par des antigènes tumoraux en circulation devraient être en multiplication rapide et sont donc des cibles de choix pour la doxorubicine.

Une des complications majeures qui surviennent lors de traitements avec la doxorubicine est la myélosuppression. Cette atteinte des cellules souches hématopoïétiques est d'ailleurs le facteur critique qui détermine la dose administrée aux patients (Manalo, Marks et Davis, 1975; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997). En ce qui concerne les autres effets secondaires observés, une leucopénie survient dans 60 à 80% des cas. Le niveau le plus bas est atteint à la deuxième semaine après traitement, la valeur normale étant rétablie à la quatrième semaine. La leucopénie est en partie une conséquence de la destruction des cellules de la moelle osseuse. On note aussi une fréquence élevée de stomatites, de nausées et de perturbations gastro-intestinales (21 à 55 % des cas) ainsi que de l'alopécie dans au moins 10% des cas (Manalo, Marks et Davis, 1975; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997). Heureusement, ces effets secondaires sont réversibles.

Ce n'est toutefois pas le cas de la cardiomyopathie, une pathologie permanente qui peut survenir lors de l'administration de ce type de médicament sur une longue période (Manalo, Marks et Davis, 1975; Minow et al., 1977; Buzdar et al., 1985; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997). Chez certains patients, les dommages cardiaques sont perceptibles de 4 à 20 ans après la fin de la thérapie (Singal et Iliskovic, 1998) et leur gravité est dépendante de la dose totale reçue. Il a été établi que lorsque des

doses cumulatives inférieures à 450 mg/m² étaient administrées, le risque de cardiomyopathie était très faible, soit une incidence de 1 à 10%; celle-ci augmente à 20% lorsque la dose est supérieure à 550 mg/m² (Calabresi et Chabner, 1990). La cause exacte de cette pathologie reste obscure mais plusieurs indices portent à croire qu'il s'agirait d'un effet des radicaux libres produits tel qu'expliqué précédemment et du stress oxydatif qui en résulte (Singal et Iliskovic, 1998; Stathopoulos *et al.*, 1998). Des recherches en cours suggèrent que des composés tel le 5-fluorouracil pourraient contribuer à éliminer ces radicaux lors de traitement avec la doxorubicine et aussi réduire sa cytotoxicité (Stathopoulos *et al.*, 1998).

Nonobstant les nombreux effets secondaires qu'elle entraîne, la doxorubicine a prouvé son efficacité et permet depuis plus de trente ans le rétablissement de plusieurs patients atteints de cancer. Cependant, un dernier problème persiste. Lors de rechutes, il devient souvent difficile de traiter les patients à cause de la présence de cellules tumorales présentant une résistance multiple aux drogues (MDR). En effet, la résistance acquise contre la drogue utilisée lors du premier traitement, s'applique à d'autres types de drogues non rencontrées par les cellules. Un des mécanismes responsables de l'apparition de ces cellules serait la sélection positive de cellules possédant un gène amplifié qui code pour la glycoprotéine P (P-gp). Cette molécule est une protéine transmembranaire de 170 kDa ayant une fonction de pompe dépendante de l'ATP. On retrouve la P-gp dans plusieurs tissus normaux tels les glandes surrénales, les reins, les intestins, les testicules, la barrière hématoencéphalique et le foie. La distribution cellulaire et subcellulaire spécifique de la P-gp suggère qu'elle aurait un rôle dans la détoxication cellulaire, en faisant sortir les produits indésirables de la cellule, de même que dans le transport extracellulaire de substrats physiologiques normaux. Cependant, dans le cas des cellules tumorales ce rôle de transporteur extracellulaire permet aux cellules d'expulser les agents antinéoplasiques qui y ont pénétré, ce qui cause un problème dans le traitement des rechutes (revue par Lepage et Gros, 1995). Pour l'instant, des inhibiteurs de cette protéine ont été développés mais leur efficacité laisse à désirer et certains inhibiteurs, comme le vérapamile (Sehested et al., 1987) et le SDZ PSC 833 (Froidevaux et Loor, 1994), sont même toxiques. Venne et ses collaborateurs ont toutefois démontré, en 1996, qu'il était possible grâce à un transporteur de rétablir l'action de la doxorubicine sur des cellules ayant développé cette résistance.

2. Les transporteurs de drogues: Alternatives pour diminuer les effets secondaires et augmenter l'efficacité des agents antinéoplasiques

La chimiothérapie étant un traitement systémique elle peut affecter toutes les composantes du corps. Elle est utilisée seule dans le cas où il est impossible d'utiliser des traitements plus localisés tels la chirurgie (ablation de la tumeur ou de l'organe affecté) et/ou la radiothérapie ou en combinaison avec ces autres traitements. Malheureusement, même si des résultats encourageants ont été rapportés concernant la biothérapie (anticorps, cytokines, hormones, thérapie génique,...), bien des cancers restent inaccessibles ou encore résistent à toutes les formes de thérapie conventionnelles. C'est pourquoi plusieurs approches nouvelles ont été proposées dans le but d'augmenter l'efficacité des agents antinéoplasiques les plus actifs et de diminuer leurs effets secondaires. L'une de celle en laquelle les chercheurs ont fondé beaucoup d'espoir est l'utilisation de transporteurs. Nous effectuerons ici le survol des principaux types rapportés dans la littérature.

2.1 Les liposomes

Les liposomes sont probablement les transporteurs de drogues les plus connus et les plus étudiés sans doute à cause de leur faible toxicité, leur grande capacité de transport et la flexibilité de leur structure (Lasic, 1996; Storm et Crommelin, 1997). Ils sont divisés en deux familles, soit les liposomes conventionnels et ceux de deuxième génération, qui ont chacune des caractéristiques propres.

Les liposomes conventionnels (CL) sont principalement composés d'une couche bilipidique ou phospholipidique incluant notamment la phosphatidylcholine, le phosphatidylglycérol et le cholestérol. Une faible efficacité peut être observée avec les CL lors de la libération des complexes après phagocytose de ces derniers par les macrophages. Il en est de même, lorsque le liposome utilisé permet la stimulation des

macrophages comme c'est le cas par exemple pour le muramyl-tripeptide-phosphatidyl-éthanolamine (Storm et Crommelin, 1997). À vrai dire l'efficacité de ces transporteurs est aujourd'hui remise en question car en plus d'être phagocytés par les macrophages du foie et de la rate, ils sont rapidement déstabilisés par les composantes du sang ce qui diminue grandement leur temps de circulation (Lasic et Papahadjopoulos, 1995; Lasic, 1996; Storm et Crommelin, 1997). Pour ces raisons, l'atteinte de cibles extravasculaires est pratiquement nulle. De plus, les rendements de l'association de la doxorubicine avec les liposomes de ce type sont très faibles (45-55%), ce qui exige d'éliminer la doxorubicine non encapsulée (Gokhale et al., 1996). Ce type de liposomes ne connaît plus aujourd'hui une très grande popularité dans la thérapie antinéoplasique. Leur utilisation ainsi que les études qui leur sont rattachées ont été réorientées vers le traitement des parasitoses des cellules phagocytaires (Lasic et Papahadjopoulos, 1995). Par exemple, pour le traitement contre Leishmania, une efficacité 700 fois plus grande a été observée lorsque l'agent thérapeutique était associé à un liposome conventionnel que lorsqu'il était utilisé seul (Proffitt et al., 1983).

Les liposomes de seconde génération sont quant à eux des liposomes à surface modifiée. Les deux types principaux sont les immunoliposomes, (des liposomes couplés à des anticorps) et les liposomes à circulation prolongée (LCL pour long-circulating liposomes) (Storm et Crommelin, 1997). Les immunoliposomes ont comme avantage de permettre un ciblage vers la tumeur grâce à la reconnaissance par les anticorps d'épitopes exprimés en surface cellulaire. Deux hypothèses expliqueraient l'augmentation de l'efficacité par les immunoliposomes après le ciblage. Il s'agirait soit de la fusion du liposome avec la cellule ce qui permettrait un relâchement intracellulaire de la drogue ou alors d'une augmentation de la quantité de drogue disponible aux environs de la tumeur. Malheureusement, l'immunogénicité des anticorps ne permet pas un temps de circulation optimal comme dans le cas des LCL ce qui s'expliquerait par une élimination des complexes immuns via les portions Fc des immunoglobulines (Aragnol et Leserman, 1986). Depuis, différentes équipes ont essayé de trouver des solutions afin de stabiliser les immunoliposomes, tout en les rendant moins immunogènes, dans le but d'augmenter leur temps de circulation. À cet effet, Phillips et collaborateurs (1994) et Huwyler, Yang

et Pardridge (1997) ont utilisé du polyéthylène glycol (PEG). Les résultats obtenus sont cependant contradictoires. L'équipe de Huwyler, Yang et Pardridge a obtenu des résultats démontrant une augmentation du temps de circulation et ainsi une meilleure atteinte, chez le rat, des organes exprimant le récepteur de transférine contre lequel leurs anticorps étaient dirigés. Au contraire, l'équipe de Phillips et collaborateur a démontré, chez la souris, que l'incorporation de PEG augmentait de façon significative l'immunogénicité des immunoliposomes. Comme Aragnol et Leserman (1986), ils ont aussi conclu que les immunoliposomes sont fortement immunogènes à cause des anticorps qu'ils contiennent. De plus, ils avancent l'hypothèse que l'efficacité des immunoliposomes dépend de l'état du système immunitaire de l'hôte.

Les liposomes qualifiés de LCL sont des polymères de polyéthylène glycol (PEG) conjugués à un phospholipide synthétique. L'efficacité des LCL serait due à l'effet combiné de la prolongation du temps de circulation, jusqu'à 100 fois plus longtemps que les CL, et à une augmentation de la perméabilité microvasculaire de plusieurs tumeurs. La prolongation du temps de circulation serait due à leur stabilisation stérique par le PEG, ce qui inhiberait les interactions électrostatiques et hydrophobiques entre une variété de composantes solubles et cellulaires du sang et la surface du liposome (Gabizon et Papahadjopoulos, 1988; Gabizon, Shiota et Papahadjopoulos, 1989; Mayhew et al., 1992; Longman et al., 1995; Storm et Crommelin, 1997). De plus les LCL permettraient, comme l'on démontré Harding et collaborateurs (1991), de diriger la libération du produit à l'intérieur de la cellule. En faisant varier la composition du liposome, il est possible de la rendre plus ou moins sensible au changement de pH ce qui permet de libérer la drogue utilisée dans différents compartiments cellulaires tels les lysosomes ou les endosomes.

Malheureusement, que le liposome soit conventionnel, couplé à des anticorps ou à circulation prolongée, aucun auteur n'a encore démontré de façon convaincante leur capacité à traiter efficacement des cellules ayant développé une MDR.

2.2 Les anticorps antitumoraux

Différents types d'anticorps plus ou moins spécifiques aux tumeurs ont été utilisés dans le but d'assurer la vectorisation d'agents cytotoxiques. Au lieu d'atteindre l'ensemble des cellules du patient, on s'attend, dans ces conditions, à ce que la spécificité de l'anticorps assure le ciblage de l'agent antinéoplasique vers les cellules tumorales et limitera les effets secondaires dus à l'atteinte des cellules normales. Une telle approche a été utilisée avec plus ou moins de succès pour transporter vers les cellules tumorales des toxines, des isotopes radioactifs ou des drogues chimiothérapeutiques. Le succès de cette approche thérapeutique est directement lié au niveau d'expression, sur les cellules tumorales, de l'antigène reconnu par l'anticorps et à l'affinité de ce dernier. Nous nous limiterons à discuter ici des effets obtenus lors de l'association de tels anticorps à la doxorubicine.

En 1982, Tsukada et collaborateurs ont démontré, en couplant des anticorps monoclonaux contre l'α-foetoprotéine de rat (AFP) à la doxorubicine, qu'il était possible d'augmenter l'efficacité de cette dernière, lorsqu'injectée chez le rat porteur d'hépatome dont les cellules expriment préférentiellement cette protéine. Yang et Reisfeld (1988) ont quant à eux couplé la doxorubicine à un anticorps contre un protéoglycan (chondroitin sulfate proteoglycan) exprimé à la surface des cellules d'un mélanome humain. Ils ont ainsi démontré, grâce à l'injection i.v. du conjugué dans le modèle de souris BALB/c nu/nu, qu'ils étaient capables de cette façon d'augmenter d'un facteur 7 l'efficacité de la drogue. Aboud-Pirak et collaborateurs (1989) ont eux aussi couplé la doxorubicine à des anticorps. Ils ont pour leur part visé le domaine extracellulaire du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) surexprimé sur les cellules de carcinome épidermoïde humain. En utilisant le modèle de souris CD-1 nu/nu, ils ont observé que cette association doublait l'efficacité de la doxorubicine contre ces cellules. En 1992, Hurwitz et collaborateurs ainsi que Yeh, Roffler et Yu ont de leur côté lié la doxorubicine à des anticorps dirigés respectivement contre des antigènes à la surface de cellules du colon et des cellules de carcinome hépatocellulaire ainsi que contre des antigènes retrouvés à la surface des cellules d'un carcinome cervical humain. Ces deux équipes ont elles aussi rapporté une augmentation de l'efficacité de la doxorubicine lorsqu'utilisée respectivement dans les modèles de souris CD-1 nu/nu et BALB/c nu/nu. Plus récemment, Stan et collaborateurs (1999) ont attaché à la doxorubicine un anticorps contre l'antigène carcino-embryonnaire (CEA). Leur étude in vitro sur des lignées de cellules de carcinomes du colon humain LoVo et SW-480 qui expriment fortement le CEA a démontré que la toxicité du complexe était 8 fois supérieure à celle de la doxorubicine seule. De plus, le traitement des cellules après leur implantation à l'intérieur d'oeufs de poule embryonnés diminue la progression des tumeurs de moitié et ne cause aucun dommage visible aux tissus environnants.

Même si plusieurs équipes ont démontré que les anticorps monoclonaux pouvaient être de bons transporteurs, il est important de mentionner les problèmes qui sont associés à leur utilisation. Tout d'abord, la plupart des anticorps monoclonaux disponibles ont été produits dans les rongeurs et sont fortement immunogènes chez l'humain ce qui ne peut permettre un traitement que sur une courte période de temps. De plus la taille de ces molécules empêche souvent le complexe de pénétrer à l'intérieur des tumeurs solides. Pour ce qui est des antigènes visés ils se doivent d'être exprimés en grande quantité à la surface des cellules pour que le traitement puisse avoir un maximum d'efficacité. L'hétérogénéité de leur expression entre les cellules d'une même tumeur peut souvent causer des problèmes en créant une sélection des cellules démontrant une faible expression de l'antigène lorsque toutes les cellules avec une forte expression ont été détruites. D'un autre côté, l'accessibilité aux cellules cibles est souvent empêchée à cause de l'irrégularité de la vascularisation dans les différentes parties d'une tumeur. On retrouve aussi dans plusieurs cas des liaisons spécifiques et non spécifiques avec des antigènes des cellules des tissus normaux et avec des antigènes circulants se liant aux anticorps avant qu'ils aient atteint la tumeur. Finalement, les anticorps peuvent être métabolisés avant d'avoir atteint la cible visée (Clark, 1996).

2.3 Les ligands spécifiques de récepteurs

L'utilisation de ligands spécifiques à certains récepteurs fortement exprimés sur certains types de cellules tumorales a aussi été envisagée pour favoriser le ciblage de médicaments antinéoplasiques. Par exemple, l'augmentation des récepteurs de transférine à la surface des cellules en prolifération et donc sur les cellules cancéreuses a suscité de l'intérêt pour l'utilisation de la transférine pour le couplage avec les drogues contre le cancer. Ainsi, après une incubation de 3 h à 37°C en présence d'un tel conjugué, on a pu observer une augmentation de l'efficacité in vitro de la doxorubicine en comparaison à celle non couplée envers des promyelocytes HL-60 et des cellules Daudi provenant d'un lymphome de Burkitt (Yeh et Faulk, 1984). Plus récemment, les travaux de Singh, Atwal et Micetich (1998) ont prouvé eux aussi qu'en couplant la transférine à la doxorubicine, on obtenait une toxicité de 5 à 10 fois plus élevée qu'avec la doxorubicine seule sur une variété de cellules tumorales. Arap, Pasqualini et Ruoslahti (1998) ont de leur côté, grâce à une banque de phages, identifié un peptide se liant à l'a_v-intégrine, une molécule d'adhésion exprimée sur les vaisseaux sanguins et donc dans les tumeurs vascularisées chez l'humain. Conjuguée à ce peptide, on a pu observer chez la souris nude une augmentation de la toxicité de la doxorubicine pour les cellules MDA-MB-435 dérivées d'un carcinomes du sein et une toxicité plus faible pour le foie et le coeur que la doxorubicine libre. Finalement, en exploitant la propriété de l'agglutinine de germe de blé (WGA) de se lier de façon spécifique aux cellules de carcinome du colon et en considérant l'absence de toxicité de cette dernière qui fait d'ailleurs partie de la diète normale, Wirth et collaborateurs (1998) ont préparé un conjugué doxorubicine-WGA et observé une plus forte toxicité par rapport à la doxorubicine libre contre la lignée cellulaire Caco-2 provenant d'un carcinome du colon humain.

Quoi qu'il en soit, même si l'utilisation de ligands protéiques ou peptidiques semble prometteuse, il reste encore beaucoup de chemin à faire avant que cette approche soit généralisée. Entre autres, l'efficacité de cette méthode pour atteindre des cellules ayant développé une MDR n'a pas encore été démontrée de façon significative. Enfin, la

liaison de ces ligands à la doxorubicine se fait de façon covalente et demande dans la plupart des cas une préparation et une purification longues et fastidieuses.

2.4 Les polymères de synthèse «Pluronics»

Pluronic est, à l'origine, le nom que donna la compagnie BASF aux polymères de polyoxyéthylène-polyoxypropylène-polyoxyéthylène (POE-POP-POE). Ce nom est aujourd'hui couramment utilisé pour désigner l'ensemble de ces produits. Il s'agit d'une grande famille de composés qui diffèrent par leur poids moléculaire et leur composition relative en POP et POE (Figure 3). Selon leur composition, leur forme à la température ambiante pourra être liquide, en pâte ou en flocons. Ils sont généralement blanchâtres et sans odeur ni saveur (Newman et al., 1998). Dans les écrits scientifiques, les pluronics portent parfois d'autres noms tels poloxalkol (Vasko, Riley et DeWall, 1972), synperonic (Losa et al., 1991; Huatan et al., 1995; Draper et al., 1995), lutrol (Garg et Muller, 1992; Misselwitz et al., 1997; Rowley et al., 1998) ou poloxamer (Gilbert et al., 1998; Wirtanen et al., 1998; Barreleiro et Alexandridris, 1998).

Figure 3. Structure générale des Pluronics

D'après Alakhov et collaborateurs (1996)

Les Pluronics sont des copolymères formés de blocs de Poly(oxyéthylène-β-oxypropylène-β-oxyéthylène) (POE-POP-POE). La partie centrale composée de plusieurs résidus d'oxypropylène constitue la partie hydrophobe du polymère alors que les parties externes composées de résidus d'oxyéthylène sont quant à elles hydrophiles. Le nombre de fragments X et Y varie selon le Pluronic.

Poly(oxyéthylène)-poly(oxypropylène)



 $HO-[POE]_x-[POP]_y-[POE]_x-H$

hydrophile hydrophile

Les Pluronics étant non-toxiques, ils ont tout d'abord été utilisés dans la composition du sang artificiel (Hymes et al., 1968; Yokoyama et al, 1984; Chubb et Drapper, 1987; Nagata, Mondon et Cooper, 1990; Spence et al., 1994) et comme adjuvant immunitaire pour l'administration de vaccins (Hunter, Strickland et Kézdy, 1981; Snippe et al., 1981; Byars et Allison, 1987; Newman et al., 1998). Ils peuvent entre autres être utilisés comme émulsifiant, comme agent gélifiant, comme stabilisateur, comme base de suppositoire, comme excipient de même que pour enrober des comprimés et pour la solubilisation de composés hydrophobes (Newman et al., 1998). Kabanov et collaborateurs (1989, 1992) ont rapporté qu'il était possible de faire traverser la barrière hémato-encéphalique à certains neuroleptiques à l'aide de tels composés. Par ailleurs, il a tout récemment été démontré que certains des pluronics augmentaient de façon significative l'activité cytotoxique d'agents antinéoplasiques, dont la doxorubicine, pour les cellules tumorales et ce même pour les cellules MDR (Venne et al., 1996).

2.5 Le Pluronic L61

Parmi les différents types de pluronics étudiés pour le transport de la doxorubicine, le L61 est celui qui paraît le plus efficace pour accroître sa toxicité envers les cellules déjà sensibles à cet agent autant qu'envers celles ayant développé une résistance multiple aux drogues (MDR). En effet, Batrakova et collaborateurs (1996) ont rapporté une plus grande efficacité *in vivo* du mélange dox/L61 vis-à-vis des cellules tumorales SP2/0 non résistantes et SP2/0^{dnr} résistantes. Par la suite, Venne et collaborateurs (1996) ont démontré que lorsque l'on mettait *in vitro* les cellules MCF-7/ADR, qui sont des cellules MDR, en présence de la doxorubicine associée au L61, ces cellules étaient 740 fois plus sensibles à la doxorubicine qu'en présence d'une concentration équivalente de cette dernière seule. Considérant l'importance de cette observation, nous reproduisons dans le Tableau 1 les conditions exactes de leurs observations.

Tableau 1. Comparaison entre la cytotoxicité de la doxorubicine seule et associée au polymère L61 (Dox/L61) envers deux lignées cellulaires MDR et leurs lignées parentales sensibles respectives.

Lignées cellulaire	IC ₅₀ ng/ml Dox	IC ₅₀ ng/ml Dox/L61	Augmentation de la sensibilité par L61 (nombre de fois)	Facteur de résistance Dox	Facteur de résistance Dox/L61
MCF-7 MCF7/ADR	2 000 222 000	2 000 300	1 740	111	0.15
Aux-B1 CH ^R C5	1 000 70 000	700 250	1,3 280	70	0.35

D'après Venne et collaborateurs (1996).

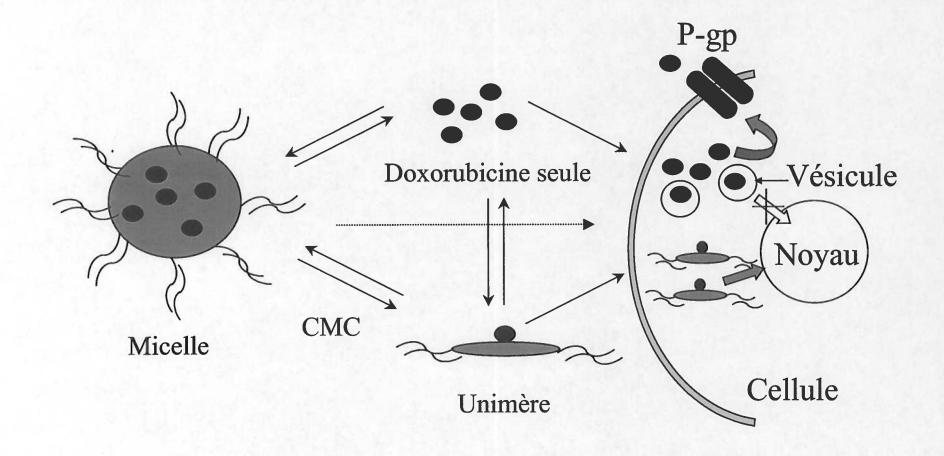
Ce tableau compare la capacité de la doxorubicine associée ou non au polymère L61 d'inhiber à 50% (IC₅₀) la croissance de cellules tumorales ayant ou non développé une MDR. Les 2^{ième} et 3^{ième} colonnes donnent la quantité en ng/ml de doxorubicine requise pour obtenir l'effet escompté. La quatrième colonne chiffre l'augmentation relative de la sensibilité des cellules au complexe Dox/L61 par rapport à la doxorubicine seule. Les deux dernières colonnes établissent le facteur de résistance des cellules MDR à la doxorubicine libre ou associée au L61 par rapport à leur lignée parentale respective.

À l'instar des autres pluronics, le L61 est un copolymère formé de blocs de Poly(oxyéthylène-β-oxypropylène-β-oxyéthylène) (POE-POP-POE) (Figure 3). Il est très hydrophobe (90% d'hydrophobicité) et de faible poids moléculaire. Le poids moléculaire du segment hydrophobe de POP de la molécule est de 1750 alors que le poids moléculaire des parties hydrophiles de POE est de 195 (Batrakova et al., 1996). Une des principales propriétés du L61 est sa capacité à lier la doxorubicine de façon non covalente. Aucun intermédiaire de clivage n'est donc nécessaire au site d'action. La préparation des complexes Dox/L61 est d'autant plus facile et plus rapide à réaliser. C'est la partie centrale hydrophobe du L61 qui entre en contact avec la doxorubicine qui est aussi hydrophobe. Tel que mentionné précédemment, la partie externe composée de résidus d'oxyéthylène est quant à elle hydrophile. Cette double caractéristique du polymère permet la formation de micelles possédant un coeur hydrophobe et une couronne hydrophile. La petite taille des micelles qui varie de 10 à 100 nm (Alakhov et Kabanov, 1998) est essentielle pour permettre la pénétration de ceux-ci dans les tissus par les capillaires. La formation des micelles est dépendante de la concentration critique de micellisation (CMC). En effet, en faible concentration, le polymère se retrouve sous forme d'unimères puisque chaque molécule se complexe avec des molécules de doxorubicine qui sont en plus grande quantité. Au fur et à mesure que la concentration du polymère augmente en solution, on finit par atteindre une concentration permettant la formation de micelles (CMC) (Figure 4). La CMC dépend de la longueur des segments dans la molécule. Une augmentation de la longueur des segments hydrophobes se traduit par une diminution de la CMC. La CMC du L61 est de 0,02% (p/v) (Batrakova et al., 1996). Lorsque la concentration de L61 s'élève au dessus de la CMC, on retrouve alors des micelles contenant le médicament.

Deux hypothèses pourraient expliquer la capacité du L61 à hypersensibiliser les cellules MDR. En effet, le L61 pourrait modifier le transport de la drogue au moins à deux niveaux. Tout d'abord, le mélange permettrait de contourner l'action de la P-gp qui diminue habituellement l'accumulation de la drogue dans la cellule. Deuxièmement, en présence du polymère, la doxorubicine ne serait pas séquestrée dans les vésicules

Figure 4. Représentation schématique de l'équilibre entre le Pluronic L61 et la doxorubicine et illustration de l'hypothèse d'hypersensibilisation des cellules MDR.

D'après Alakhov et collaborateurs (1996)



cytoplasmiques mais serait plutôt dirigée directement vers le noyau (Alakhov et Kabanov, 1998).

Finalement, les hypothèses développées proposent aussi que ce sont des unimères de Pluronic qui seraient les principaux responsables de la réversion de la résistance et de l'inhibition de la P-gp (Figure 4) car le pourcentage de L61 le plus efficace *in vitro*, soit 0,01% (p/v), se situe en bas de la CMC qui est de 0,02% (p/v) (Alakhov et Kabanov, 1998).

3. L'immunité antitumorale

L'immunité antitumorale aussi appelée immunosurveillance est un phénomène d'une grande complexité dont la portée est l'objet de controverses. En réalité, la contribution de l'immunosurveillance dans la résistance anticancer se situe quelque part entre l'hypothèse qui suggère que le système immunitaire réagit contre certaines cellules tumorales mais n'arrive malheureusement pas à empêcher le développement des tumeurs malignes et l'hypothèse selon laquelle plusieurs tumeurs malignes ne sont pas détectées, précisément parce qu'elles sont contrôlées par le système immunitaire. Étant donné que les patients cancéreux ayant une bonne réponse inflammatoire ont de meilleures chances de guérison, que l'incidence des tumeurs est plus élevée chez les patients immunodéficients, tels les patients transplantés sous médication immunosupressive ou ceux atteints par le VIH, et que certaines immunothérapies expérimentales ont donné des résultats prometteurs, on ne peut douter que le système immunitaire intervient dans la lutte contre les cellules tumorales (Speiser et Ohashi, 1998). Plusieurs effecteurs cellulaires y participent les principaux étant les lymphocytes T CD8⁺ (Shresta et al, 1998; Whiteside et al., 1998), les lymphocytes T CD4⁺ (Pardoll et Topolian, 1998; Thomas et Hersey, 1998a et 1998b; Hung et al., 1998), les cellules NK et LAK (Whiteside et Herberman, 1995; Whiteside et al., 1998) et les macrophages (Zavadova et al., 1999); leur mode de reconnaissance des cellules tumorales et leurs mécanismes d'action sont très variés.

Les lymphocytes T CD8⁺ ont longtemps été considérés comme les principaux acteurs dans la réponse antitumorale. Leur reconnaissance des cellules tumorales étant restreinte par les molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH-I), ils semblent les plus aptes à intervenir puisque la majorité des tumeurs primaires expriment des CMH-I alors que seulement un nombre restreint d'entre elles portent des CMH-II à leur surface. Les précurseurs de lymphocytes T CD8⁺ acquièrent des propriétés cytotoxiques après que leurs TCR ont reconnu des peptides dérivés d'antigènes tumoraux présentés par les CMH-I. L'activité lytique des lymphocytes T CD8⁺ matures se manifeste surtout par la voie perforine/granzymes, aussi appelée exocytose granulaire. Elle peut aussi être la conséquence de la liaison de la molécule Fas (CD95), à la surface d'une cellule tumorale, au ligand de Fas (FasL) dont l'expression sur la cellule effectrice aura été augmentée suite à sa stimulation via le TCR (Shresta et al., 1998). L'exocytose granulaire, de même que l'interaction Fas/FasL, induisent l'apoptose de la cellule tumorale. Dans le cas de la voie Fas/FasL, l'interaction récepteur/ligand engendre l'agrégation des récepteurs Fas sur la cellule tumorale, plus précisément celle de leurs domaines de mort, ce qui entraîne la liaison de la protéine adaptatrice FADD (Fasassociated death domain) à la portion cytoplasmique de Fas. Le complexe moléculaire ainsi formé permet le recrutement des procaspases 8a et 8b qui seront ultérieurement clivées libérant la forme active de la caspase 8 qui amorce alors toute la cascade des caspases dont l'action terminale est d'engendrer la fragmentation de l'ADN cellulaire ou apoptose (Berger et al., 1998; Peter et Krammer, 1998). Ce mécanisme est indépendant du calcium ce qui n'est pas le cas de la lyse provoquée par l'exocytose granulaire. La polymérisation de la perforine à la surface de la cellule cible crée un pore d'entrée pour les enzymes protéolytiques appelés granzymes qui sont concentrés dans les granules cytoplasmiques de la cellule effectrice. Dans les lymphocytes T CD8⁺, l'exocytose granulaire est en général dépendante de l'activation via le TCR. Si l'importance relative des différents granzymes, de même que leurs substrats respectifs, ne sont que partiellement élucidés, on sait toutefois que leur action se solde par la fragmentation de l'ADN de la cellule cible qui, comme dans le cas de la voie Fas/FasL, meurt par apoptose (Shresta et al., 1998).

Des données récentes suggèrent que ce sont les lymphocytes T CD4⁺ plutôt que les lymphocytes T CD8⁺ qui exercent le rôle central dans l'immunité antitumorale (Hung et al., 1998). D'abord, les cytokines produites par la sous-population Th1 fournissent les signaux auxiliaires requis pour l'activation d'autres effecteurs notamment les lymphocytes T CD8⁺, les cellules NK/LAK et les macrophages. Celles dérivées de la sous-population Th2 jouent non seulement un rôle dans l'activation et la différenciation des lymphocytes B et la production des anticorps, mais elles contribuent également au recrutement et à l'activation des éosinophiles dont la dégranulation intervient dans la lyse des cellules tumorales. En outre, des lymphocytes T CD4⁺ peuvent induire l'apoptose de certaines cellules tumorales. Si des travaux ont identifié la voie Fas/FasL comme étant le principal mécanisme d'action des lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques dans un contexte de restriction par CMH-II (Stalder, Hahn et Erb, 1994), d'autres ont rapporté que des cellules de mélanomes étaient tuées par ce type d'effecteurs via un mécanisme indépendant de Fas comme des récepteurs du facteur de nécrose des tumeurs (TNF-R) (Thomas et Hershey, 1998b). La molécule déterminante dans ce contexte est TRAIL (TNF-related apoptosisinducing ligand), une cytokine membranaire de la famille TNF (Goldstein, 1997). Au contraire du ligand de Fas dont l'expression membranaire est induite suite à l'activation du lymphocyte T, une expression constitutive de TRAIL sur des clones de lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques a été rapportée (Mariani et Kramer, 1998; Kayagaki et al., 1999). Par ailleur, l'action de TRAIL s'apparente à celle du ligand de Fas. TRAIL se lie à des récepteurs membranaires (DR4 et DR5) qui, comme Fas et TNF-RI, ont une portion intracellulaire contenant des domaines de mort. Il s'en suit une induction d'apoptose par la voie des caspases (Golstein, 1997; French et Tschopp, 1999). L'implication du TCR de la cellule T CD4⁺ dans un contexte de présentation via CMH-II pourrait être nécessaire pour l'induction d'apoptose via TRAIL mais en réalité, on ne dispose pas encore de données suffisantes pour affirmer que c'est toujours le cas. Les récepteurs DR4 et DR5 sont préférentiellement exprimés sur des cellules tumorales alors que des récepteurs leurres dépourvus de domaine de mort sont présents sur les cellules normales. La voie d'induction d'apoptose via TRAIL pourrait donc être très importante pour tenir en échec des cellules tumorales qui résistent aux autres mécanismes. En résumé, les lymphocytes T CD4⁺ disposent de plusieurs mécanismes pour attaquer des cellules tumorales. Ceux qui font appel à l'induction d'apoptose via des cytokines ou des ligands (TNF, FasL, TRAIL) qui se lient à des récepteurs de la famille TNF-R (TNF-R1, Fas, DR4 et DR5) semblent rendre compte d'une partie importante de leur activité cytotoxique. L'utilisation de la voie perforine/granzymes est rare dans ce type de lymphocytes.

Les cellules NK, ou leur forme activée par l'IL-2 les LAK, sont des lymphocytes cytotoxiques dont l'activité lytique dépend de l'équilibre entre les signaux générés via des récepteurs d'activation et des récepteurs d'inhibition (Yokoyama, 1993). Les premiers, très diversifiés, impliquent le récepteur CD16, une foule de récepteurs dits de coactivation (tels CD2, CD28, CD44, CD69) et des récepteurs plus ou moins exclusifs aux cellules NK/LAK parmi lesquels on compte notamment NKR-P1, KIR2DS, CD94/NKG2C et Ly49D (revue par Lanier, 1998). Ceux-ci enclenchent l'activité lytique et la sécrétion de cytokines (IFN-γ, TNF- α, GM-CSF) dans un contexte dépendant de la phosphorylation des protéines tyrosine kinases. Sauf dans les cas où les récepteurs stimulés présentent un ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) dans leur portion intracellulaire, il devra y avoir recrutement d'une molécule adaptatrice possédant un tel motif pour qu'il y ait transduction du signal d'activation. Les récepteurs d'inhibition ont pour fonction de protéger les cellules normales autologues de la lyse par les cellules NK. Leurs ligands sont des molécules de classe I du CMH. Ces récepteurs ont en commun la présence d'un ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) dans leur portion cytoplasmique. Lorsqu'ils sont phosphorylés, ces motifs ont la propriété de recruter des phosphatases intracellulaires qui inhibent les phophorylations engendrées par le co-engagement de récepteurs d'activation. Le fait que plusieurs cellules tumorales présentent des niveaux réduits de CMH-I est une des causes de leur susceptibilité à la lyse par les cellules NK. Le principal mécanisme par lequel les cellules NK tuent des cellules tumorales est semblable à celui des lymphocytes T CD8⁺. Outre la voie perforine/ granzymes, des auteurs ont rapporté que les cellules NK pouvaient aussi induire l'apoptose des cellules tumorales via des molécules telles FasL (Arase, Arase et Saito, 1995), et TRAIL (Zamai et al., 1999). La présence à leur surface du récepteur CD16 leur permet aussi de tuer des cellules tumorales recouvertes d'anticorps, un phénomène appelé

ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Enfin, leur capacité de sécréter de l'IFN-γ, du TNF-α et du GM-CSF leur permet de coopérer avec d'autres effecteurs dans la lutte contre les tumeurs (Perussia, 1991). Les cellules NK interviennent surtout dans la lutte contre les tumeurs d'origine hématopoïétique. Parce qu'elles sont abondantes dans le sang, elles participent aussi au contrôle de la dispersion des métastases.

Le rôle premier des macrophages est le recrutement et l'activation des lymphocytes par la présentation d'antigènes. Dans le contexte de la réponse antitumorale, ils contribuent à la régulation des réponses des autres lymphocytes par la production d'une grande variété de cytokines. Ils peuvent aussi provoquer directement la nécrose des cellules tumorales par la production de TNF-α. Ils sécrètent également une quantité de produits toxiques pour les cellules tumorales notamment des protéases cytolytiques et des intermédiaires du métabolisme oxydatif. A l'instar des cellules NK, ils peuvent aussi agir comme effecteur de l'ADCC. Leur contribution est majeure dans les tumeurs solides. Ainsi, dans des tumeurs de l'ovaire, on a rapporté qu'ils pouvaient représenter jusqu'à 80% de la population leucocytaire infiltrée (Zavadova et al, 1999).

La dernière cellule dont nous ferons mention à titre d'effecteur de l'immunité antitumorale est le polynucléaire éosinophile. Après activation par des lymphokines de type Th2, les éosinophiles peuvent libérer le contenu de leurs granules dans, ou à proximité, d'une cellule tumorale et causer sa destruction (Pardoll et Topalian, 1998). La contribution des éosinophiles à l'immunité antitumorale reste toutefois modeste par rapport aux autres effecteurs précédemment mentionnés.

Malheureusement, le système immunitaire n'est pas infaillible lorsque vient le temps de contrôler la croissance d'une tumeur chez un individu. Au même titre que certains microorganismes pathogènes, les cellules tumorales ont développé des mécanismes d'échappement qui leur permettent de déjouer de façon efficace l'action des effecteurs de l'immunité antitumorale ou leur activation. Ainsi, des cellules tumorales pourront détruire les cellules immunitaires de la même façon que celles-ci les détruiraient par l'expression à leur surface du ligand de Fas (Walker, Saas et Dietrich, 1997; Berger et

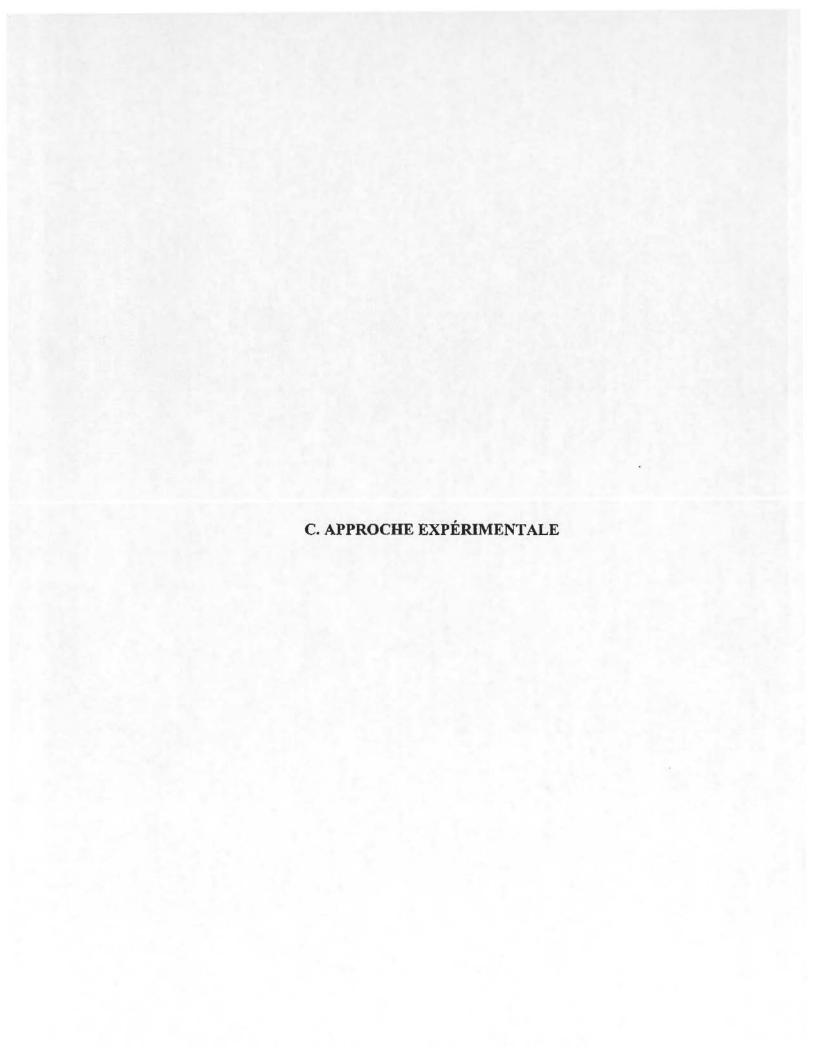
al., 1998; Chappell et Restifo, 1998). Elles peuvent aussi empêcher leur propre mort par l'expression de FLIP (FLICE (FADD(Fas-associating protein with death domain)-like interleukine-1-beta converting enzyme) inhibitory protein), une molécule qui inhibe la transduction des signaux engendrés par l'interaction de FasL ou de TRAIL avec leurs récepteurs (Chappell et Restifo, 1998). La diminution de l'expression des molécules du CMH qui leur permet d'échapper à l'action des lymphocytes T est un mécanisme qui favorise la sélection de mutants sur lesquels le système immunitaire spécifique n'aura plus prise (Speiser et Ohashi, 1998). Enfin, la production de médiateurs ayant des propriétés immunosuppressives a été observée dans nombre de cas (Pawelec, Zeuthen et Kissling, 1997). L'efficacité mitigée des mécanismes d'immunosurveillance est l'une des raisons pour lesquelles il faut souvent avoir recours à des traitements par des agents antinéoplasiques dont l'action manque toutefois grandement de spécificité.

4. Raison d'être du projet

Des études in vitro et in vivo ont montré que le Pluronic L61 était un transporteur d'agent antinéoplasique prometteur par sa capacité à augmenter la cytotoxicité de la doxorubicine pour des lignées cellulaires sensibles à ce médicament autant que pour des lignées ayant développé une résistance multiple aux drogues (Kabanov et al., 1995; Venne et al, 1996). Étant donné que la doxorubicine est aussi toxique pour les cellules du système immunitaire et leurs précurseurs myéloïdes (Manalo, Marks et Davis., 1975; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997), il est important de se demander si l'augmentation de la cytotoxicité de la doxorubicine associée au L61 ne pourrait aussi, en situation in vivo, affecter les cellules normales de façon encore plus critique que la doxorubicine seule. En outre, sachant que la doxorubicine, en plus de son action sur l'ADN, peut réagir avec la membrane cellulaire et en altérer les propriétés, il est essentiel de s'assurer de la préservation de l'activité fonctionnelle des cellules immunitaires qui auront apparemment résisté au traitement.

À ce jour, les travaux ayant démontré la toxicité de la doxorubicine pour les cellules immunitaires et leurs précurseurs ont porté essentiellement sur le suivi de la taille

des différentes populations leucocytaires après administration du traitement. On considère généralement que l'immunité antitumorale fait davantage appel aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ et aux cellules NK qu'aux anticorps. En outre, des travaux récents ont établi l'intervention de lymphocytes T CD4⁺ dans le contrôle de certaines tumeurs, soit par une action cytotoxique, restreinte ou non par les antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, soit par la production de cytokines. Aussi dans notre étude comparative de l'effet sur les cellules immunitaires de la doxorubicine administrée sous forme libre ou associée au pluronic L61 (Dox/L61) avons-nous choisi de mesurer non seulement la taille de ces populations lymphocytaires après traitement, mais également la capacité des cellules spléniques des souris traitées à répondre à des stimuli qui induisent la prolifération des lymphocytes T et B, la génération de lymphocytes T cytotoxiques et de cellules LAK (Lymphokine activated killers) et enfin la sécrétion d'interleukine 2 (IL-2) par les lymphocytes T CD4⁺.



1. Modèle animal et protocole d'inoculation

Des souris C57BL/6 femelles âgées de 7 semaines (Charles River Inc., St-Constant, Canada) ont reçu par voie i.v. soit de la doxorubicine sous forme libre soit le complexe Dox/L61 à des doses de 5 ou 10 mg/kg. Les produits ont été préparés dans les laboratoires de Supratek Pharma inc. (Laval, Canada). Les groupes témoins étaient constitués de souris injectées avec le L61 seul et de souris non injectées de même âge. Pour toute la durée de l'expérimentation, les souris ont été hébergées dans une salle à confinement 2 au Centre de Biologie Expérimentale de l'Institut Armand-Frappier reconnu par le « Conseil Canadien de la Protection des Animaux » (CCPA) et « l'Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International » (AAALAC).

2. Prélèvement des rates et préparation des suspensions cellulaires

À différents temps après l'inoculation des produits, des souris de chaque groupe ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les rates ont été prélevées stérilement dans la solution de Hanks (HBSS). Après avoir trituré les rates et éliminé les globules rouges par lyse osmotique, les cellules spléniques ont été remises en suspension à la concentration de 4,8 x 10⁷ cellules/ml dans du milieu complet constitué de RPMI 1640 contenant 25 mM d'HEPES (Boehringer Mannheim, Laval, Canada), 5000 U/ml de penicilline/streptomycine, 10% (v/v) de sérum foetal de boeuf, des acides aminées non-essentiels à 0,1 mM, du pyruvate de sodium à 1 mM et 0,05 mM de β-mercaptoéthanol (Sigma, Oakville, Canada). Tous les produits dont la provenance n'est pas indiquée ont été obtenus de Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA.

3. Analyse cytofluorométrique

Des échantillons de 25 µl contenant 3 x 10⁵ cellules préalablement lavées 2 fois dans de l'eau physiologique tamponnée contenant 1% (p/v) de sérumalbumine bovine (Gibco BRL) et 0,2% (p/v) d'azide de sodium (PBS complet) ont été incubés 30 min sur

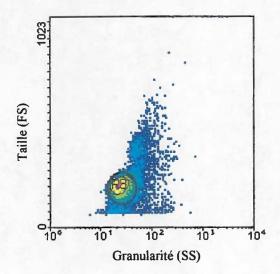
glace avec des concentrations pré-déterminées d'anticorps monoclonaux anti-CD4 couplés à la R-phycoérythrine (R-PE), anti-CD8 couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou anti-CD45 R/B220 couplés au FITC (Pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada). Après 2 lavages dans du PBS complet, les cellules remises en suspension dans 600 µl de paraformaldéhyde à 1% (v/v) (Gibco BRL) ont été analysées à l'aide d'un cytofluoromètre Coulter Epics XL (Beckman Instrument Inc., Mississauga, Ont, Canada) muni d'un laser Argon de 15 MW émettant à 488 nm. L'analyse a été effectuée sur des comptes de 10 000 événements par échantillon, mesurés dans une zone d'intérêt correspondant à la population lymphocytaire définie selon les paramètres usuels de taille et de granularité. Une analyse type avec des cellules spléniques de souris nontraitées est présentée à la Figure 5. Aucune variation dans l'intensité moyenne de fluorescence n'ayant été notée entre les groupes, le seul paramètre retenu pour l'analyse statistique est la fréquence relative du nombre de cellules marquées avec chacun des conjugués utilisés.

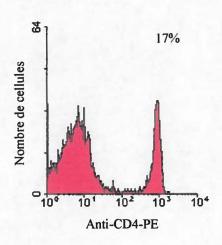
4. Lymphoprolifération

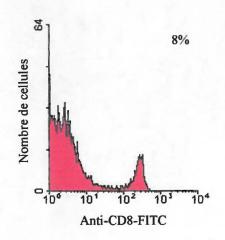
La capacité proliférative des cellules spléniques en réponse à des mitogènes T et B a été mesurée par un test standard d'incorporation de thymidine tritiée (³H-TDR). À cet effet, des échantillons contenant 0,25-2 x 10⁵ cellules spléniques dans 200 μl de milieu RPMI 1640 additionné de sérum foetal de boeuf (10% (v/v) final), de β-mercaptoéthanol (0,05 mM) (RPMI complet) et de Concanavaline A (Con A, 4 μg/ml, Sigma, St Louis, Mi, USA) ou de lipopolysaccharide (LPS, 10 μg/ml, Sigma) sont préparés en quadriplicata dans des microplaques de 96 puits à fond plat. Celles-ci sont d'abord incubées 48 h à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Après addition de thymidine tritiée (1 μCi/puits, ICN, Costa Mesa, USA), l'incubation est prolongée de 18 h dans les mêmes conditions. Les cellules sont alors prélevées sur des filtres de laine de verre à l'aide de l'appareil Microcell Harvester (Skatron, Norway) et la radioactivité incorporée dans l'ADN des cellules est mesurée dans un compteur à scintillation. Pour chaque détermination, les résultats calculés correspondent à la moyenne ± l'écart-type. Il n'a pas

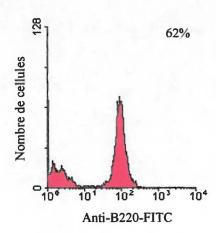
Figure 5. Analyse type des populations lymphocytaires de la rate par cytométrie en flux.

L'histogramme de gauche en haut illustre la zone d'intérêt (encerclée) à partir de laquelle les autres paramètres ont été mesurés. Les autres histogrammes illustrent en ordonnée le nombre relatif des cellules marquées avec le conjugué indiqué et en abcisse l'intensité relative de fluorescence sur une échelle logarithmique. Les chiffres correspondent au pourcentage de cellules colorées par rapport au nombre de cellules analysées.









été tenu compte de l'incorporation spontanée (en absence de mitogène), celle-ci ayant été négligeable dans tous les groupes. Les résultats illustrés pour chaque groupe traité correspondent à la moyenne des mesures obtenues à partir de 3 à 9 déterminations différentes. Un même lot de Con A et de LPS a été utilisé pour l'ensemble des expériences. Des souris individuelles ont été utilisées pour les activations sauf pour certaines analyses avec les souris injectées avec 10 mg/kg de doxorubicine qui ont requis que soient mélangées les cellules spléniques de plusieurs souris.

5. Production de lymphocytes T cytotoxiques

La génération de lymphocytes T cytotoxiques a été effectuée dans le contexte d'une réponse allogénique en cultivant dans un volume de 5 ml de RPMI complet, 1 x 10⁷ cellules spleniques de souris C57BL/6 (H-2^b), traitées ou non avec les produits à l'étude, avec 5 x 10⁶ cellules spléniques de souris BALB/c (H-2^d) préalablement irradiées à 20 grays. Les flacons de culture sont incubés durant 5 jours à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules sont centrifugées et remises en suspension à la concentration de 1 x 10⁷ cellules/ml dans du RPMI 1640 contenant 10 % de SFB.

6. Production de Lymphokine-activated Killer (LAK)

Pour générer des LAK, 1 x 10⁷ cellules spléniques ont été cultivées dans du RPMI complet pendant 5 jours en présence d'IL-2 murine à la concentration de 1000 U/ml. L'IL-2 utilisée à cet effet nous a été gracieusement fournie par le Dr. A. Rinfret (Hôpital Hotel-Dieu de Montréal). La solution stock contenait 1 x 10⁵ U/ml. Les conditions de culture pour la production des LAK sont les mêmes que pour la production des lymphocytes T cytotoxiques sauf que la concentration est ajustée à 2,5 x 10⁷ cellules/ml à la fin de la période d'incubation.

7. Mesure de l'activité cytotoxique

L'activité cytotoxique des lymphocytes T et des LAK a été mesurée à l'aide de la méthode de libération du chrome radioactif. Des concentrations variables de cellules effectrices sont incubées dans du RPMI complet pendant 4 h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ en présence d'une concentration constante de cellules cibles marquées au chromate de sodium (Na₂⁵¹CrO₄, ICN, Costa Mesa, USA). Le chrome radioactif incorporé dans les cellules cibles est libéré dans le surnageant lorsque celles-ci sont tuées par les cellules cytotoxiques. La quantité de cellules cibles étant constante, la quantité de radioactivité mesurée dans le surnageant est proportionnelle à la quantité de cellules cytotoxiques contenues dans la suspension de cellules effectrices à l'étude.

7.1. Préparation des cellules cibles radiomarquées

Des cellules de la lignée P815, un mastocytome provenant de la souris DBA/2, ont servi de cellules cibles pour la mesure de l'activité cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules LAK. Les cellules P815 possèdent en effet le même haplotype (H-2^d) que les cellules de BALB/c utilisées pour générer la réponse allogénique. D'autre part, ces cellules sont résistantes à l'activité cytotoxique naturelle des cellules NK mais elles sont sensibles à l'activité cytotoxique des LAK.

Des cellules P815 en croissance exponentielle dans du milieu RPMI complet sont centrifugées, remises en suspension dans du HBSS à la concentration de 5 x 10⁶ cellules/ml puis incubées en présence de 150 μCi de Na₂⁵¹CrO₄ durant 1 h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules sont ensuite lavées 4 fois avec 10 ml de HBSS afin d'éliminer toute la radioactivité non incorporée dans les cellules puis la concentration est ajustée à 1 x 10⁵ cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SFB. Des cellules de la lignée EL-4, un lymphome d'haplotype H-2^b, ont servi de témoin négatif pour la mesure de l'activité T cytotoxique. Elles sont cultivées et marquées de la même façon que les P815 sauf qu'elles exigent l'addition d'une quantité plus grande de ⁵¹Cr (200 μCi) pour l'obtention d'un marquage équivalent.

7.2. Test de cytotoxicité

La mesure de l'activité cytotoxique s'effectue en incubant durant 4 h dans les conditions habituelles (37°C, 5% CO₂) des dilutions sériées de cellules effectrices avec 1 x 10⁵ cellules cibles radiomarquées. Les rapports cellules effectrices: cellules cibles utilisés sont de 10:1 à 1,25:1 pour les cellules T cytotoxiques et de 25:1 à 3:1 pour les LAK. Tous les tests sont effectués en triplicata dans des microplaques à fond rond. À la fin de la période d'incubation, les surnageants sont prélevés avec un système de prélèvement automatique de surnageant (Skatron, Norway) et la radioactivité des échantillons est mesurée dans un compteur gamma (Beckman gamma 7000, Beckman, Fort Worth, USA). Des cellules cibles incubées dans les mêmes conditions mais en absence de cellules effectrices sont utilisées pour établir le niveau de ⁵¹Cr libéré spontanément des cellules cibles durant la période d'incubation. Avec les cellules cibles utilisées, cette valeur était inférieure à 20%. Des cellules radiomarquées lysées avec du Triton X100 servent à déterminer la quantité maximale de radioactivité qui peut être récupérée dans le surnageant. Elle représente généralement plus de 90% de la radioactivité incorporée.

7.3. Calcul du pourcentage de cytotoxicité

L'activité cytotoxique des cellules T et des LAK est exprimée en pourcentage. Elle est calculée à l'aide la formule suivante :

dans laquelle chaque donnée correspond à la radioactivité moyenne exprimée en cpm des triplicatas de chaque échantillon.

8. Induction de la sécrétion d'IL-2

La sécrétion d'IL-2 a été induite en incubant 3 x 10⁶ cellules spléniques avec 2,5 μg de Con A dans 1 ml de milieu RPMI complet pendant 24 h (37°C, 5% CO₂). Ces tests sont effectués en duplicata dans des plaques de 24 puits à fond plat. Au terme de la période d'incubation, des échantillons de 500 μl de surnageant sont récoltés et congelés à -20°C jusqu'au moment du dosage de l'IL-2.

9. Dosage de l'IL-2

La mesure de l'IL-2 a été effectuée à l'aide d'un bio-essai utilisant les cellules indicatrices CTLL-2. Il s'agit d'une lignée de lymphocytes cytotoxiques provenant de la souris C57BL/6 et dont la croissance est dépendante de l'IL-2. Ces cellules étaient maintenues dans du milieu RPMI complet additionné de 5% de Rat T-STIM avec Con A (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA). La croissance des cellules CTLL-2 en fonction de dilutions sériées du mélange Rat T-STIM dont la concentration d'IL-2 est fixée par la compagnie à 100 U/ml sert d'abord à établir une courbe de référence. Les valeurs de prolifération obtenues en présence des surnageants de cellules spléniques cultivées avec la Con A seront portées sur cette courbe de référence pour déterminer le nombre d'unités d'IL-2 contenues dans les échantillons.

Des dilutions sériées (1:2) des surnageants à tester sont effectuées en triplicata dans des microplaques à fond plat. Des dilutions sériées d'IL-2 standard sont préparées en même temps. Les cellules CTLL-2 lavées 3 fois avec du HBSS seront d'abord incubées pendant 2 h sans IL-2 et lavées à nouveau 2 fois avec le même milieu. Elles sont ensuite distribuées à raison de 1 x 10⁴ cellules par puits dans un volume de 100 μl. Après 20 h d'incubation dans les conditions habituelles (37°C, 5% CO₂) on ajoute 1 μCi de thymidine tritiée (ICN) et l'incubation est prolongée de 5 h. Le prélèvement des cellules et la mesure de radioactivité incorporée sont identiques à ce qui a été décrit pour les tests de lymphoprolifération.

10. Analyse statistique

Le but du travail expérimental effectué dans le cadre de ce mémoire était de comparer la toxicité du produit Dox/L61 à celle de la doxorubicine libre. Pour chaque dose administrée aux souris traitées, les moyennes de 3 à 9 déterminations ont été comparées d'abord à celles des groupes témoins et ensuite entre elles, c'est-à-dire Dox/L61 versus Dox aux mêmes doses de doxorubicine. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test t de Student. Les différences dont la valeur de p est inférieure à 0,05 sont considérées significatives. Les résultats détaillés de l'analyse statistique sont présentés à l'annexe A.

D. RÉSULTATS

1. Schéma général de l'étude

L'étude globale a été effectuée sur 4 doses de doxorubicine soit 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 7.5 mg/kg et 10 mg/kg. Cependant pour la partie de l'étude présentée ici, deux doses seulement ont été utilisées. Il s'agit de la dose thérapeutique qui est de 5 mg/kg et d'une dose plus élevée de 10 mg/kg. Nous avons choisi plus particulièrement ces deux doses pour les raisons suivantes: tout d'abord, connaissant déjà l'efficacité de la dose thérapeutique, il était important de vérifier que l'augmentation de cette efficacité par le L61 n'augmentait pas la toxicité de cette dose. Pour ce qui est de la seconde dose, nous voulions vérifier la possibilité, dans le cas où il y aurait diminution de la toxicité et donc des effets secondaires par le L61, d'utiliser de plus fortes doses lors des traitements.

La durée de l'étude s'est étalée sur une période de 22 jours puisque lors de traitements avec la doxorubicine les variations dans le nombre des leucocytes sont perceptibles jusqu'au 21^{ième} jour post injection, le nombre de cellules s'étant totalement rétabli au 28^{ième} jour. Les prélèvements ont été effectués aux jours 3, 6, 9, 14 et 22 suivant les injections.

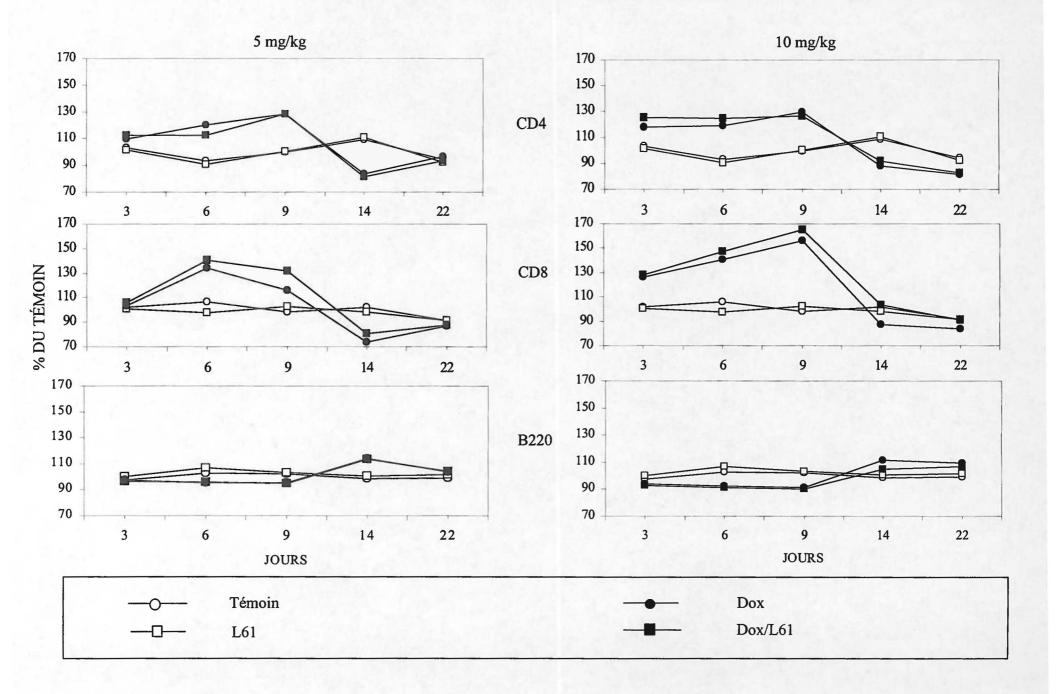
Pour les différents tests effectués, 3 à 9 déterminations ont été compilées à chacun des jours. Pour faciliter l'analyse, les résultats sont présentés soit avec les unités de mesure obtenues lors des tests (réponse proliférative, activité cytotoxique des cellules Tc et LAK) soit en pourcentage des groupes de souris normales du jour (analyse cytofluorométrique, production d'IL-2). Lors de l'analyse statistique la comparaison a été effectuée avec les groupes de souris normales sauf pour les résultats présentés dans l'analyse cytofluorométrique et la production d'IL-2 puisque les souris normales servaient déjà de référence dans l'expression des données. Cependant, puisque les résultats des groupes de souris normales et de souris injectées seulement avec le L61 correspondaient parfaitement, l'analyse statistique a été effectuée en comparaison avec ce dernier groupe.

2. Analyse cytofluorométrique

Puisque le but principal de l'étude était de comparer l'activité fonctionnelle des différentes populations lymphocytaires de la rate des souris traitées avec la doxorubicine sous forme libre ou associée au polymère L61, il était tout d'abord essentiel de mesurer les variations dans la taille relative de ces populations cellulaires au cours de la période d'observation. Nous devions en effet nous assurer que, le cas échéant, les changements observés ne seraient pas essentiellement attribuables à des variations dans les proportions relatives des différentes populations cellulaires à l'étude. Tel qu'illustré à la Figure 5, la taille relative des trois principales populations de lymphocytes spléniques chez les souris normales est de 17 % ± 2 pour les lymphocytes T CD4⁺, 8 % ± 2 pour les lymphocytes T CD8⁺ et 62 % ± 6 pour les lymphocytes B. Les valeurs rapportées ici correspondent à la moyenne de toutes les souris normales utilisées (45 souris) comme témoins dans toutes les expériences effectuées entre 3 et 22 jours après traitements. Les valeurs normales obtenues à chacun des jours ont servi de référence pour confirmer d'abord l'absence de variations significatives dans le groupe témoin durant toute la durée de l'expérimentation (Figure 6, cercles vides). De même, il est très clair que l'inoculation du polymère L61 seul n'affecte aucune des populations lymphocytaires étudiées puisque les valeurs correspondant à ce groupe (carrés vides) se superposent parfaitement à celles des souris non traitées et qu'il n'y a aucune différence significative entre les données de ces 2 groupes (résultats non illustrés). Cependant, des différences significatives (p < 0.05) sont observées dans la taille relative de la population T CD4⁺ après 3 jours chez les souris traitées avec 10 mg/kg de Dox (cercles pleins) ou Dox/L61 (carrés pleins), après 6 jours chez les souris traitées avec 5 mg/kg de Dox ou 10 mg/kg de Dox/L61 et enfin après 9 et 14 jours chez toutes les souris ayant reçu de la doxorubicine, indépendamment de la dose ou de la forme sous laquelle l'agent antinéoplasique a été administré. Les variations observées se manifestent par une augmentation de 20 à 30 % de la population T CD4⁺ entre le 3^{ième} et le 9^{ième} jours après traitement, suivie d'une chute du même ordre, perceptible seulement au 14 ième jour.

Figure 6. Effet de la doxorubicine couplée ou non au polymère L61 sur la taille relative des populations de lymphocytes de la rate de souris.

La quantité de lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et B dans les rates de souris traitées avec 5 (graphiques de gauche) ou 10 (graphiques de droite) mg/kg de doxorubicine couplée ou non au pluronic L61 est exprimée en pourcentage de la quantité de ces mêmes lymphocytes contenus dans les rates de souris témoins non traitées. Chacun des points représente la moyenne de 5 à 10 déterminations.



La population de lymphocytes T CD8⁺ suit à peu près la même distribution sauf que les variations observées sont un peu plus fortes, l'augmentation de la taille de cette population, par rapport à celle du groupe de souris normales atteignant 60 % au 9^{ième} jour chez les souris traitées avec la plus forte dose de doxorubicine libre ou associée au polymère. On ne note toutefois une chute significative de cette population au 14^{ième} jour que dans le groupe traité avec 5 mg/kg de doxorubicine.

Puisque l'analyse cytofluorométrique mesure la taille relative des différentes populations à l'intérieur d'une zone d'intérêt elle-même établie selon les paramètres usuels de taille et de granularité (Forward and side scatters), il fallait s'attendre à identifier une population de lymphocytes subissant des variations opposées à celles notées pour les deux populations de lymphocytes T. De fait, on observe une légère chute de la population des lymphocytes B dans certains groupes entre le 6^{ième} et le 9^{ième} jour après traitement, suivie d'une augmentation au 14^{ième} jour. Quel que soit le traitement reçu, la taille relative de toutes les populations lymphocytaires est revenue à la normale au 22^{ième} jour après traitement.

Puisque c'est la toxicité du mélange Dox/L61 par rapport à celle de la drogue administrée sous forme libre qui nous intéressait tout particulièrement, la comparaison entre ces deux groupes est la donnée la plus importante de l'analyse statistique présentée dans le Tableau 2 dans lequel nous n'avons inscrit que les valeurs de p inférieures à 0,05. En aucun temps et pour aucune des deux doses injectées, nous n'avons observé de valeur significative selon la forme sous laquelle l'agent antinéoplasique a été administré (Dox/L61 versus Dox). Bien entendu, les variations dans la taille relative des différentes populations de lymphocytes spléniques seront prises en compte dans l'analyse des résultats concernant la capacité proliférative et les propriétés fonctionnelles qui ont été mesurées dans le cadre de cette expérimentation.

La moyenne des valeurs obtenues pour les comptes des leucocytes totaux de la rate, qui a aussi été vérifié en même temps que les populations relatives, suggère une diminution de la quantité de ces cellules au 3^{ième} et 6^{ième} jour à la dose de 10 mg/kg de

Tableau 2. Tableau récapitulatif démontrant les valeurs significatives pour les résultats obtenus lors de l'analyse cytofluorométrique.

Dox, 5 m	g/kg														
	CD4							CD8		B220					
jr	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22
E vs N	N. S.	0,03 ↑	0,001	0,001 ↓	N. S.	N.S.	0,04↑	N.S.	0,003 ↓	N. S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,02 ↑	N. S.

			CD4			CD8				B220					
jr	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22
E vs N	N. S.	N.S.	0,001	0,001 ↓	N.S.	N.S.	0,02	0,03 ↑	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,03 ↓	N. S.
E vs L61	0,02 ↑	0,05 ↑	0,001 1	0,005 ↓	N.S.	N.S.	0.01	0,01	N.S.	N. S.	0,03 ↓	0,03 ↓	0,02↓	N. S.	N. S.
E vs Dox	N.S.	N. S.	N. S.	N. S.	N.S.	N. S.	N.S.	N.S.	N. S.	N.S.	N. S.	N.S.	N. S.	N. S.	N.S.

	mg/kg CD4						CD8					B220					
jr	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22		
E vs N	0,01 ↑	N. S.	0,001	0,01 ↓	N. S.	0,05 1	0,011	0,001 1	N. S.	N.S.	N.S.	0,05 ↓	0,02↓	N. S.	N.S.		

jr			CD4					CD8			B220				
	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22	3	6	9	14	22
E vs N	0,001 ↑	0,04 ↑	0,001 1	0,05↓	N. S.	N.S.	0,04 1	0,001 ↑	N.S.	N.S.	N.S.	0,02↓	0,01 ↓	N. S.	N. S.
E vs L61	0,02 ↑	0,03 ↑	0,02 ↑	N.S.	N. S.	N.S.	N.S.	0,02 ↑	N. S.	N.S.	0,04↓	0,006↓	0,001 ↓	N. S.	N. S.
E vs Dox	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N.S.	N. S.	N. S.	N. S.

Seules les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées. Les valeurs de 0,001 signifient \leq 0,001.

Les flèches indiquent la nature de la variation observée. Les carrés ombragés gris foncé indiques une augmentation de la variation alors que les carrés ombragés gris pâle indique une diminution.

^{*} Pour chacun des groupes expérimentaux traités (E) les valeurs significatives sont indiquées lorsque les comparaisons statistiques ont été fai avec le groupe normal (N), le groupe L61 (L61) et le groupe traité à la doxorubicine seule correspondant (Dox) lorsque cela s'appliquait.

doxorubicine associée ou non au L61 (résultats non illustrés). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée après l'analyse statistique.

3. Réponse proliférative

La première propriété que nous avons mesurée est la capacité des lymphocytes T et B des rates de souris traitées de proliférer en réponse à une stimulation polyclonale par la Con A et le LPS. Ces mesures ont été faites à plusieurs concentrations de cellules par puits afin de nous assurer que, le cas échéant, l'absence de variations ne soit pas due à l'atteinte d'un niveau de prolifération optimal, attribuable à une insuffisance de facteurs de croissance dans le milieu de culture. Les données présentées dans la Figure 7 montrent que dans les conditions retenues et pour tous les groupes, l'incorporation de thymidine tritiée dans les cultures contenant de la Con A augmente proportionnellement à la quantité de cellules ajoutées, du moins jusqu'à la concentration de 1 x 10⁵ cellules/puits. Un certain épuisement des facteurs de croissance du milieu de culture est probable dans certains groupes, pour les cultures contenant 2 x 10⁵ cellules/puits. C'est le cas notamment des cultures qui correspondent aux prélèvements des jours 14 et 22 après traitement, l'incorporation de thymidine tritiée étant dans ces puits pratiquement de même niveau que pour les cultures contenant deux fois moins de cellules. Par ailleurs, la réponse à la Con A des cellules spléniques de souris traitées n'a pas été modifiée puisque les courbes de prolifération de tous les groupes se superposent et qu'aucune différence significative n'est observée dans la comparaison des moyennes pour chaque groupe de mesures. Les comparaisons des moyennes ont été faites pour chaque concentration cellulaire utilisée (annexe A). Puisqu'il n'y a aucune valeur significative, nous ne présentons pas de tableau récapitulatif.

Les résultats obtenus en réponse au LPS et illustrés dans la Figure 8 sont du même ordre. L'incorporation de thymidine tritiée est proportionnelle à la quantité de cellules par puits jusqu'à la concentration de 1 x 10⁵, un plateau étant alors obtenu dans la plupart des groupes. Dès lors, la seule comparaison des niveaux de prolifération dans des cultures contenant 2 x 10⁵ cellules n'eut pas été valide puisque des chutes de 50% n'auraient pas

Figure 7. Effet de la doxorubicine couplée ou non au polymère L61 sur la capacité de prolifération des lymphocytes T de la rate de souris en réponse à la ConA

La prolifération lymphocytaire en réponse à la ConA est mesurée en CPM représentant la quantité de thymidine tritiée incorporée dans les lymphocytes T de rates de souris traitées avec 5 ou 10 mg/kg de doxorubicine couplée ou non au pluronic L61 et de souris témoins (non injectées et injectées avec le L61 seulement). Chacun des points représente la moyenne de 3 à 9 déterminations.

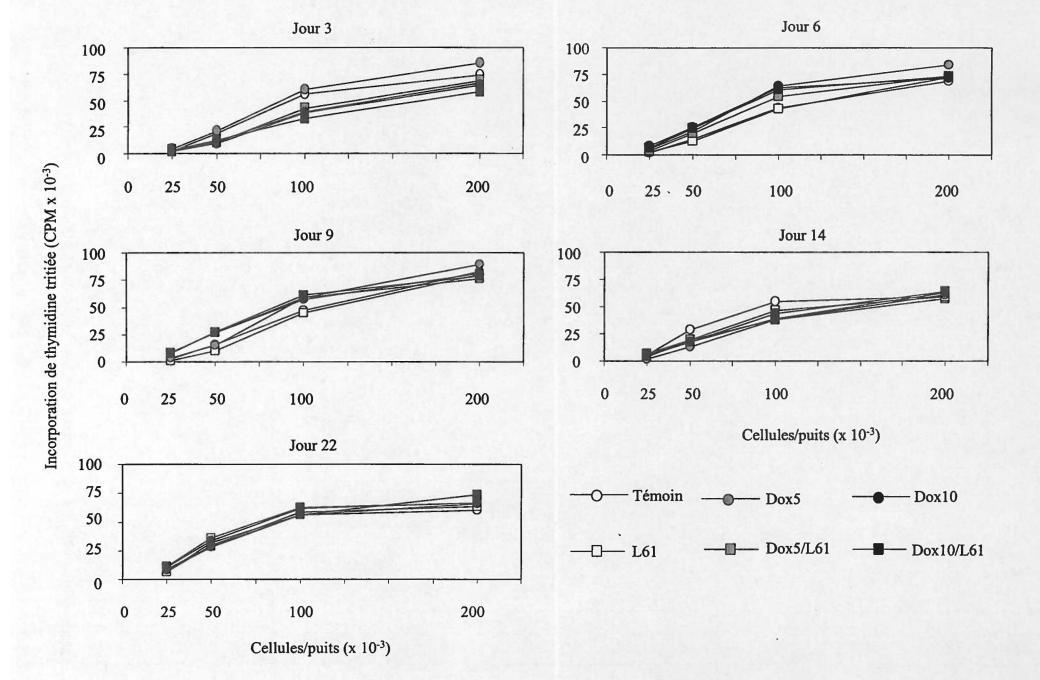
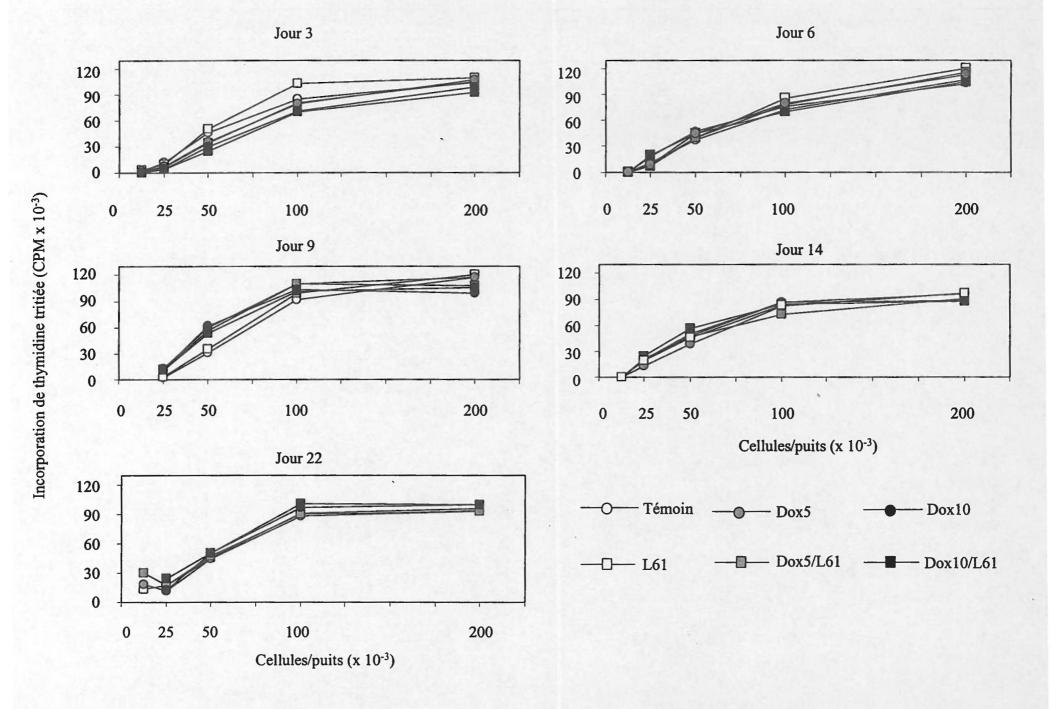


Figure 8. Effet de la doxorubicine couplée ou non au polymère L61 sur la capacité de prolifération des lymphocytes B de la rate de souris en réponse au LPS

La prolifération lymphocytaire en réponse au LPS est mesurée en CPM représentant la quantité de thymidine tritiée incorporée dans les lymphocytes B de rates de souris traitées avec 5 ou 10 mg/kg de doxorubicine couplée ou non au pluronic L61 et de souris témoins (non injectées et injectées avec le L61 seulement). Chacun des points représente la moyenne de 5 à 10 déterminations.



été perceptibles. Comme il n'y a pas de différences significatives entre les groupes pour les cultures contenant 2,5 x 10⁴ à 1 x 10⁵, il est clair que les traitements n'ont pas affecté la réponse des cellules spléniques à un mitogène B. On peut donc dire que dans les conditions de l'expérimentation, quelle que soit la dose de doxorubicine administrée, la forme sous laquelle elle est inoculée et le temps écoulé depuis le traitement, la doxorubicine n'affecte pas la capacité des lymphocytes spléniques de proliférer lorsqu'ils sont cultivés en présence de mitogènes.

4. Propriétés fonctionnelles

4.1 Production de lymphocytes T cytotoxiques

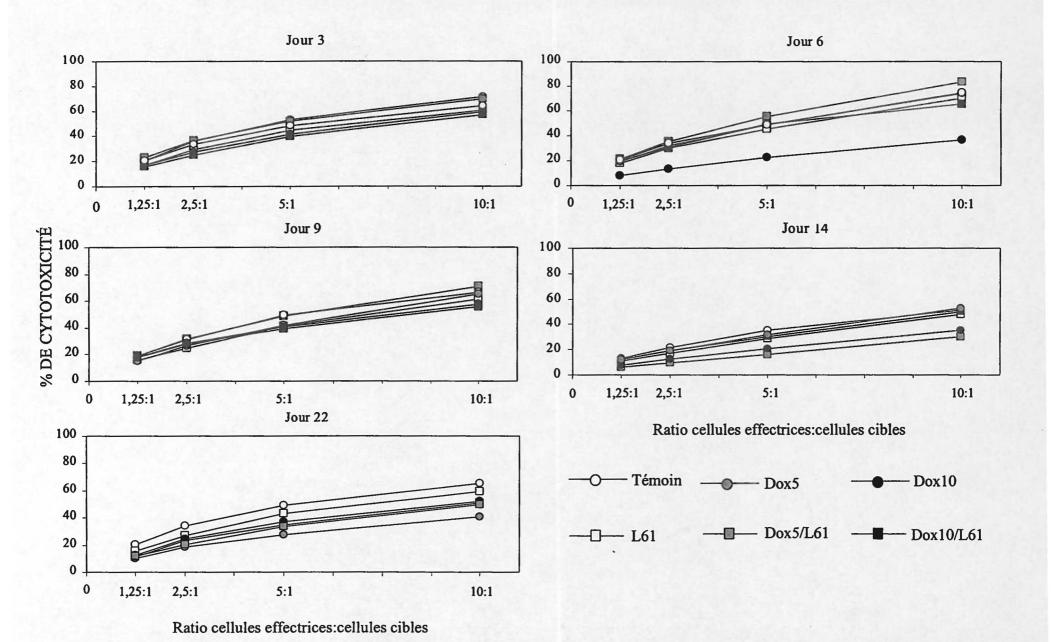
Les lymphocytes T cytotoxiques sont d'importants intervenants dans l'immunité antitumorale. L'amplitude d'une réponse T cytotoxique contre une tumeur est fonction de différents paramètres, incluant notamment la fréquence des précurseurs capables de reconnaître un peptide donné présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, le plus souvent de classe I. Ce n'est pas de ce type de réponse dont il sera ici question. Afin de vérifier si les traitements avec les produits à l'étude affectaient la capacité des cellules spléniques de développer une réponse cytotoxique, nous avons plutôt choisi un contexte de forte stimulation, soit celle d'une réponse allogénique. Bien qu'il existe deux mécanismes d'alloréactivité qualifiés respectivement d'alloréactivité directe et indirecte, ce n'était pas le but de l'expérimentation que de les distinguer. Nous voulions simplement savoir si les produits injectés avaient affecté la capacité des précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques de se différencier. En choisissant un modèle dans lequel la concentration des précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques est élevée, il nous était possible de nous en tenir à des stimulations in vitro ce qui nous donnait l'opportunité de comparer la réponse des différents groupes de souris dans des conditions dans lesquelles tous les paramètres sauf le traitement des souris étaient strictement identiques. Nous avons estimé avoir là des conditions appropriées pour évaluer l'effet des traitements chimiothérapeutiques sur les précurseurs de cellules T cytotoxiques. La comparaison s'effectue sur la base de l'activité cytotoxique des cellules spléniques des souris de chaque groupe envers les cellules tumorales d'une lignée exprimant le même haplotype que les cellules allogéniques irradiées avec lesquelles elles ont été préalablement cultivées durant 5 jours. Tous les tests ont été effectués à des ratios cellules effectrices: cellules cibles de 1,25 à 10:1. Les résultats présentés dans la Figure 9 correspondent au pourcentage de cytotoxicité à ces différents ratios pour tous les groupes et à chacun des temps de prélèvement. Il est clair, d'après l'aspect des courbes, que les réponses cytotoxiques observées dans les cultures de cellules spléniques provenant des souris traitées sont identiques à celles obtenues avec les cellules spléniques des souris témoins qui, soit n'ont rien reçu, soit ont été inoculées seulement avec le polymère L61. Une seule exception à cette observation: au 6ième jour après traitement, la réponse des souris traitées avec la plus forte dose de doxorubicine sous forme libre est nettement inférieure à celle des témoins (p < 0.05). On note aussi au $14^{ième}$ jour que la moyenne des valeurs obtenues suggère une réponse plus faible dans les cultures de cellules spléniques provenant des souris traitées avec 5 mg/kg de Dox/L61 ou 10 mg/kg de doxorubicine libre. Toutefois, ces différences ne sont pas significatives après l'analyse statistique (Annexe A).

4.2 Production de LAK

Les LAK sont des cellules NK qui en présence d'IL-2 acquièrent un potentiel cytotoxique plus marqué ainsi que la capacité de tuer un plus large spectre de cellules tumorales. La contribution de ces cellules à l'immunité antitumorale a été démontrée dans différents modèles animaux mais aussi chez l'humain, notamment dans le cas de traitements de patients atteints de mélanome chez qui des leucocytes autologues du sang ont été ré-inoculés après avoir été préalablement cultivés avec de l'IL-2 (Rosenberg et al.,1994). Les cellules NK étant de distribution ubiquitaire, leur prolifération survient lorsque l'IL-2 ou d'autres cytokines telles l'IL-12, l'IL-18 ou les interférons est (sont) disponible(s) en concentration suffisante dans leur micro-environnement immédiat (Tomura et al., 1998) Pour l'étude qui nous concerne, la génération des LAK en culture en présence d'IL-2 a été utilisée comme indice de la fréquence splénique de leurs

Figure 9. Effet de la doxorubicine couplée ou non au polymère L61 sur la capacité des lymphocytes de la rate de souris de développer une réponse cytotoxique suite à une stimulation par des cellules allogéniques (H-2^d).

Les résultats illustrés correspondent à la lyse des cellules cibles P815 (H-2^d) par les lymphocytes Tc de rates de souris traitées avec 5 ou 10 mg/kg de doxorubicine couplée ou non au pluronic L61 et de souris témoins (non injectées et injectées au L61 seulement). Ils sont présentés à différents ratios cellules effectrice:cellules cibles. Chacun des points représente la moyenne de 4 à 7 déterminations.



précurseurs, les cellules NK. Pour mesurer l'activité cytotoxique des LAK, nous avons utilisé comme cellules cibles les cellules P815, une lignée cellulaire résistante à la lyse par les cellules NK mais sensible à l'activité cytotoxique des LAK. En comparant la libération du chrome radioactif des cellules cibles incubées en présence de différentes quantités de cellules spléniques pré-cultivées avec de l'IL-2, nous n'avons noté encore une fois aucune différence entre les groupes à l'étude (Figure 10). A l'exception des mesures effectuées au 14^{ième} jour après traitement qui donnent des résultats plus élevés, soit environ 60% de lyse au plus haut rapport cellules effectrices:cellules cibles testé, les suspensions spléniques de tous les autres points de la cinétique ont généré des quantité équivalentes de LAK. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes, pas plus au 14^{ième} jour qu'à aucun autre moment (Annexe A).

4.3 Production d'IL-2

L'IL-2 est une cytokine produite principalement par les lymphocytes T CD4⁺ activés. Cette cytokine joue un rôle déterminant dans les réponses immunitaires puisqu'elle contrôle la prolifération et la différenciation de plusieurs populations cellulaires incluant les lymphocytes T et B et les cellules NK. Le taux d'IL-2 présent dans les surnageants de culture de lymphocytes spléniques stimulés avec la concanavaline A est considéré comme étant un bon indicateur de l'activité fonctionnelle des cellules T CD4⁺ contenues dans la suspension. Selon ce paramètre, nous avons donc comparé la capacité des cellules spléniques des différents groupes expérimentaux à produire de l'IL-2 en mesurant son taux dans le surnageant de culture par un bioessai basé sur la prolifération des cellules CTLL-2 dont la croissance est dépendante de l'IL-2. Dans chaque expérience, les taux d'IL-2 ont été calculés à partir d'une courbe de référence établie en mesurant la radioactivité incorporée dans les cellules indicatrices cultivées avec différentes dilutions d'une source commerciale d'IL-2. Nous illustrons à la Figure 11, l'aspect d'une courbe standard et les variations observées d'une expérience à l'autre dans la production d'IL-2 par les cellules spléniques de souris normales cultivées 24 h en présence de Con A. Étant donné les variations observées d'une expérience à l'autre, vraisemblablement attribuables à des paramètres propres au bioessai tels la sensibilité des CTLL-2 à l'IL-2 qui peut varier

Figure 10. Effet de la doxorubicine couplée ou non au polymère L61 sur la capacité à générer des LAK dans des cultures de cellules spléniques de souris en présence d'IL-2.

Les résultats illustrés correspondent à la lyse des cellules cibles P815 par les LAK de rates de souris traitées avec 5 ou 10 mg/kg de doxorubicine couplée ou non au pluronic L61 et de souris témoins (non injectées et injectées au L61 seulement). Ils sont présentés à différents ratios cellules effectrice:cellules cibles. Chacun des points représente la moyenne de 3 à 7 déterminations.

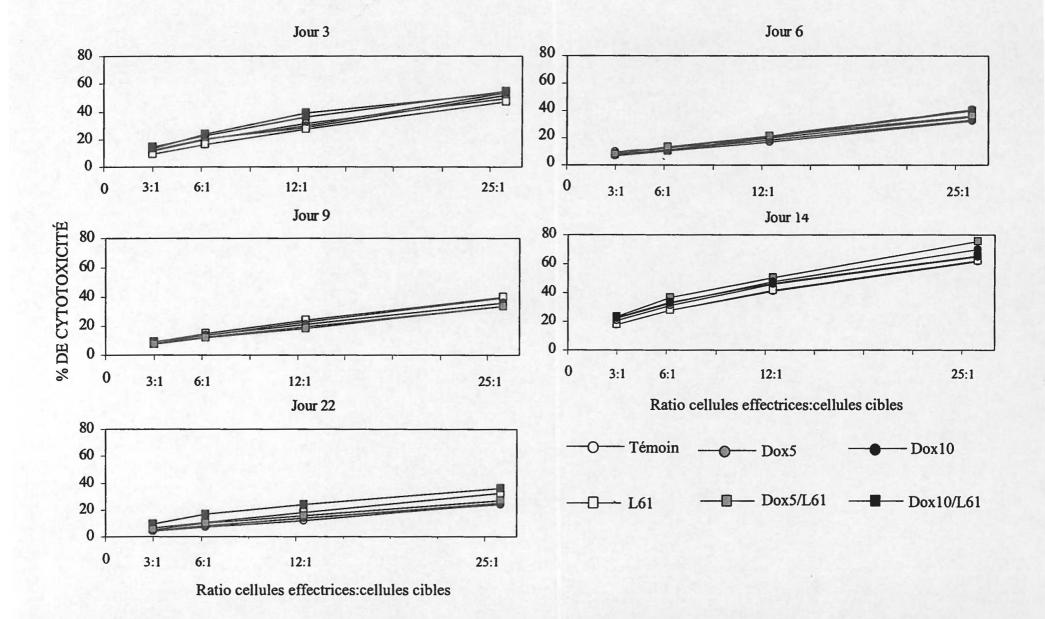
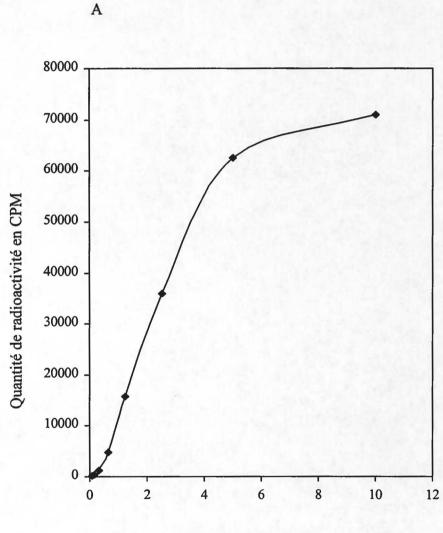
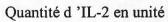
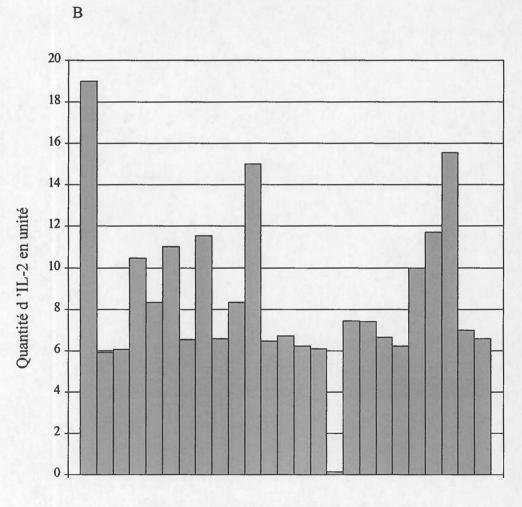


Figure 11. Exemple de courbe standard (A) et représentation graphique des variations (B) dans la production d'IL-2 par les cellules de souris normales mises en culture en présence de Con A.

En A, la courbe standard a été obtenue grâce à la stimulation des CTLL-2 à l'aide de T-STIM de la compagnie Becton Dickson Labware. Le nombre d'unité d'IL-2 a été calculé à partir de la concentration d'IL-2 proposée par la compagnie qui est de 100 U/ml.





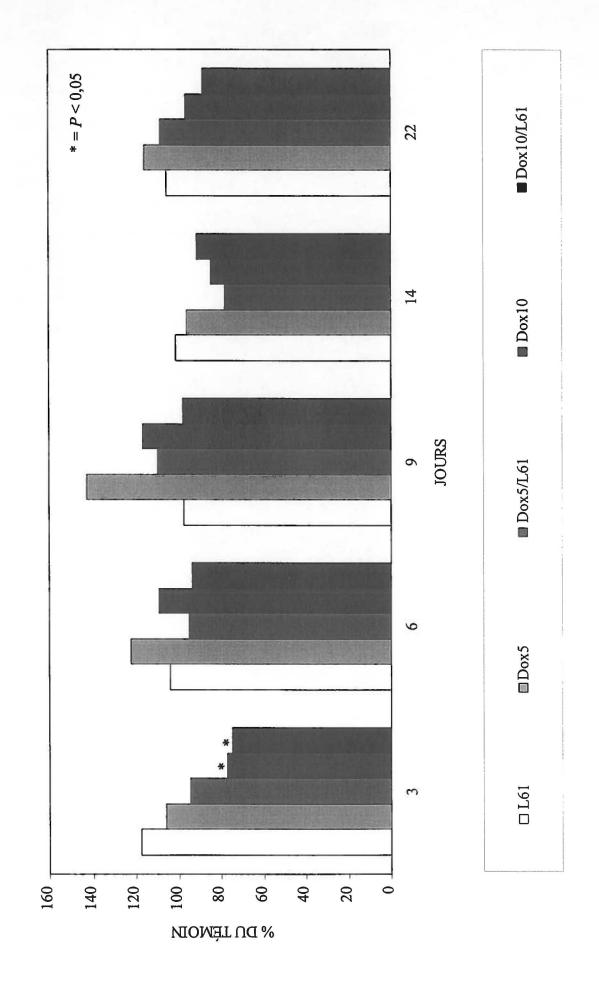


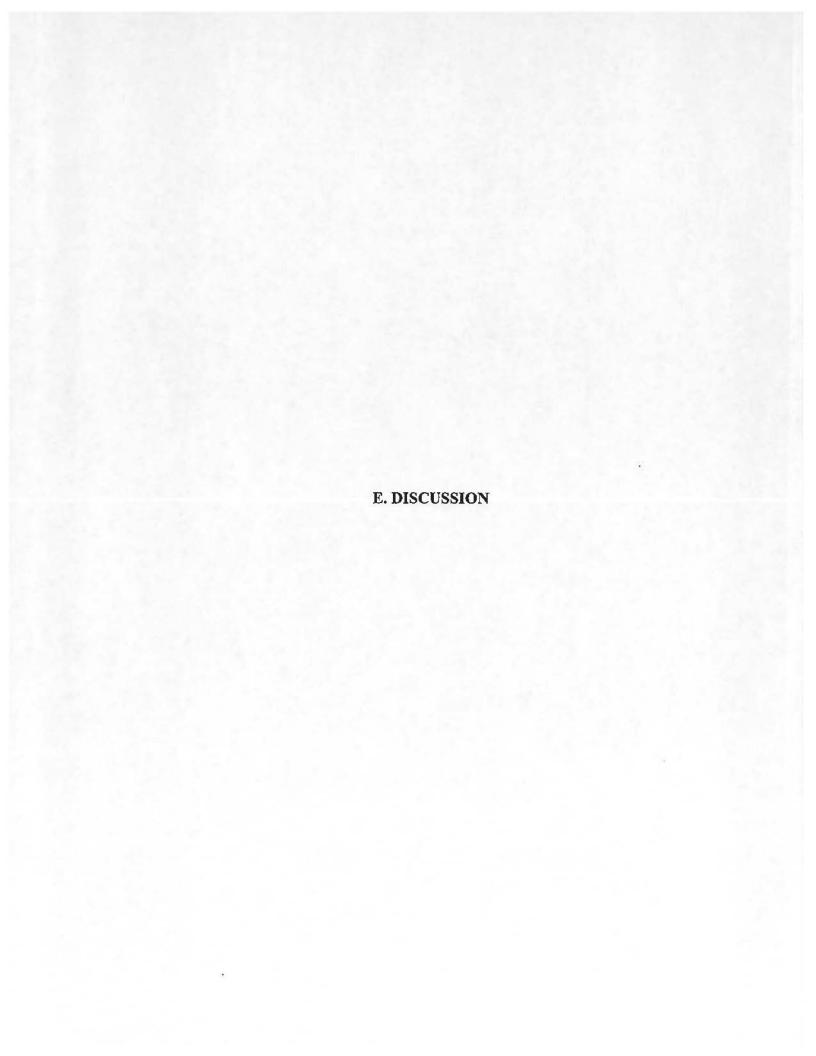
Surnageants des cellules de souris normales

en fonction de leur stade de croissance, les données obtenues pour chaque groupe expérimental ont été transformées en pourcentage de celles des groupes de souris normales du jour afin de pouvoir avoir une base uniforme de comparaison. Les résultats illustrés dans la Figure 12 démontrent que ce n'est qu'au $3^{ième}$ jour après traitement qu'une diminution significative (p<0,05) du taux d'IL-2 est observée en comparant les souris non traitées avec celles ayant reçu la plus forte dose de doxorubicine couplée ou non au polymère L61. Cependant, comme dans les expériences précédentes, il n'y a pas de différence significative entre les groupes de souris ayant reçu la doxorubicine sous forme libre ou couplée au transporteur (Annexe A).

Figure 12. Effet de la doxorubicine couplée ou non au polymère L61 sur la production d'IL-2 par les lymphocytes spléniques de souris stimulés par la Con A

La quantité d'IL-2 produite par les lymphocytes T CD4⁺ après stimulation à la Con A des cellules spléniques de souris traitées avec 5 ou 10 mg/kg de doxorubicine couplée ou non au pluronic L61 est exprimée en pourcentage de la quantité d'IL-2 mesuréedans les surnageant de culture des cellules spéniques. Chacun des points représente la moyenne de 4 à 5 déterminations.





Parmi les transporteurs d'agents antinéoplasiques, le Pluronic L61 est certainement digne d'intérêt. Sa biocompatibilité, l'absence de toxicité et d'immunogénicité du produit, le long temps de circulation des micelles, leur petite taille, la possibilité de l'utiliser autant de façon covalente que non-covalente ainsi que de le coupler à des molécules de ciblage tels les anticorps le démontrent bien (Batrakova et al., 1996). Bien sûr, sa propriété la plus importante est sa capacité à augmenter de façon considérable la toxicité de la doxorubicine envers les cellules tumorales autant in vitro que in vivo mais surtout contre celles ayant développé une résistance multiple aux drogues (MDR) (Batrakova et al., 1996; Venne et al., 1996). Le fait que nous connaissions déjà la toxicité de la doxorubicine pour les cellules normales et plus particulièrement celles appartenant au système immunitaire (Manalo, Marks et Davis, 1975; Froidevaux et Loor, 1994; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997) tout en sachant que le L61 seul est peu toxique mais toutefois capable d'augmenter la cytotoxicité de la doxorubicine pour les cellules tumorales, justifiait que l'on se préoccupe qu'il n'y ait pas d'effets analogues sur les cellules du système immunitaire. D'un autre côté, la protection de la doxorubicine assurée par le L61 contre des éléments extérieurs tels les protéines et les cellules sanguines nous autorisait à poser l'hypothèse que les cellules circulantes étaient peut-être même moins vulnérables à l'action cytotoxique de la doxorubicine inoculée en association avec ce transporteur. Notre étude avait donc pour but d'établir s'il y avait une variation de la toxicité de la doxorubicine pour les cellules du système immunitaire lors de son association avec le L61.

La toxicité de la doxorubicine se situe à plusieurs niveaux. L'alopécie et les nausées sont les signes de toxicité les plus connus parce qu'ils sont les plus apparents. Cependant, la cardiotoxicité de cet agent antinéoplasique par sa permanence ainsi que la myélosuppression et la leucopénie causant l'affaiblissement du système immunitaire sont plus importants bien qu'intangibles. C'est d'ailleurs sur ces deux derniers effets secondaires de la doxorubicine, soit la myélotoxicité et la toxicité pour les leucocytes, que nous nous sommes penchés dans le cadre de l'étude globale illustrée à la figure 1 et plus particulièrement sur la toxicité pour les lymphocytes de la rate dans le cadre du travail exposé dans ce mémoire.

Tout d'abord, la myélotoxicité contribue certainement à la diminution de la quantité de cellules immunitaires chez les patients traités avec la doxorubicine (Manalo, Marks et Davis, 1975; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997). Aussi, la possibilité qu'il y ait une augmentation de cette toxicité par le L61 nous préoccupait-elle. L'atteinte plus sévère des cellules souches dans la moelle osseuse aurait pu se traduire par une diminution accrue des leucocytes de la rate et du sang. En outre, les cellules du système immunitaire étant en constante recirculation, elles sont particulièrement exposées à la toxicité du produit injecté par voie i.v. En effet, puisque le L61 augmente le temps de circulation de la doxorubicine, on pouvait s'attendre à ce qu'un contact prolongé entre cet agent antinéoplasique et les cellules affecte certaines ou la totalité des populations leucocytaires.

Il a aussi été démontré que la doxorubicine seule s'accumule dans la rate, se lie fortement aux protéines (Marafino, Shri et Siegel, 1981) et affecte grandement les cellules qui composent cet organe (Ehrke, Cohen et Mihich, 1982). En effet, une toxicité pour les cellules spléniques a été observée chez la souris une journée après une injection i.v. de 5 mg/kg de doxorubicine. Elle se présentait sous la forme d'une nécrose cellulaire à l'intérieur de la pulpe blanche, partie de la rate composée principalement de lymphocytes. L'effet du L61 sur l'accumulation de la doxorubicine dans la rate et son action sur les cellules spléniques étant inconnue, nous avons jugé intéressant d'étudier cette question puisque la rate constitue un organe de choix pour suivre l'évolution de la capacité fonctionnelle des différentes populations lymphocytaires après traitement.

La détermination de la taille relative des différentes populations lymphocytaires de la rate par cytométrie en flux avait pour but d'identifier les cellules les plus vulnérables. C'est pour nous assurer de l'état fonctionnel des cellules ayant apparemment résisté aux traitements que nous avons ensuite évalué la capacité des différentes populations à répondre à un stimulus approprié. À cet effet, nous avons utilisé des mitogènes pour induire la prolifération des lymphocytes T et B et la production d'IL-2 par les cellules T CD4⁺, des cellules allogéniques pour la réponse des lymphocytes

cytotoxiques T CD8⁺ et de l'IL-2 pour la génération des LAK. Il s'agit dans tous les cas de stimuli de forte intensité qui atteignent un nombre élevé de précurseurs dans les populations visées.

Nous nous questionnions au sujet de l'effet du produit Dox/L61 sur la capacité fonctionnelle des cellules immunitaires notamment parce qu'il a été rapporté que la doxorubicine agit directement sur les membranes cellulaires et en altère les propriétés (Mutschler et al., 1995; Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997). Des auteurs ont rapporté une forte augmentation de la molécule FasL sur des cellules leucémiques T de la ligné CEM incubées avec des doses de doxorubicine correspondant à celles retrouvées dans le sérum de patients traités (Friesen et al., 1996). Étant donné la présence constitutive de Fas sur les cellules de cette lignée, ils postulent que ce phénomène aurait pour effet d'augmenter l'apoptose des cellules tumorales de façon autocrine (suicide) ou paracrine (fraticide) en augmentant les interactions Fas/FasL. L'induction de FasL après traitement avec des drogues cytotoxiques ne concerne pas que les tumeurs d'origine hématopoiétique. Elle a aussi été observé pour des tumeurs solides, notamment des neuroblastomes et des carcinomes hépatocellulaire. Par ailleur, plusieurs auteurs considèrent que l'expression de FasL sur les cellules tumorales peut tourner à l'avantage de la tumeur puisqu'elle permet précisément de contrer l'action du système immunitaire en induisant la mort programmée des effecteurs T qui expriment Fas (Walker, Saas et Dietrich, 1997; Strand et Galle, 1998; Whiteside et Rabinovitch, 1998; Chappell et Restifo, 1998; Gutierrez et al., 1999). Plusieurs admettent toutefois que ces deux phénomènes existent sans doute simultanément au sein d'une tumeur. La perte d'expression de Fas sur les cellules tumorales ayant acquis une résistance multiple aux drogues n'est probablement pas une action directe du médicament mais plutôt la résultante de la sélection engendrée par un traitement prolongé avec de fortes doses de doxorubicine (Landowski, Gleason-Guzman et Dalton, 1997). Quoi qu'il en soit, il n'y aucune raison de croire que l'effet modulateur de la doxorubicine sur l'expression de FasL soit exclusif aux cellules tumorales. Plusieurs populations lymphocytaires activées expriment à leur surface Fas et FasL et la modulation de ces molécules membranaires participe à la régulation des populations lymphocytaires (Dhein et al., 1995; Truman et al., 1997). Ainsi, la doxorubicine pourrait théoriquement affecter les populations lymphocytaires mais on ne pouvait sans doute pas percevoir la portée de cet effet dans les condition de notre étude. Celle-ci ayant été effectuée sur des souris qui ne portaient pas de tumeurs, leurs lymphocytes étaient sans doute moins vulnérables puisqu'ils n'étaient pas activés.

Comme nous l'espérions, les résultats que nous avons obtenus ont démontré clairement que l'association du L61 à la doxorubicine n'amplifiait pas les effets négatifs de la doxorubicine sur les cellules du système immunitaire ainsi que sur leur capacité à répondre à des stimuli. Tout d'abord, le nombre de cellules dans la rate n'est pas significativement affecté à la dose thérapeutique de 5 mg/kg de doxorubicine associée ou non au L61. À la dose de 10 mg/kg, la moyenne des valeurs obtenues semble toutefois faiblement affecté à la baisse dans les deux cas au 3^{ième} et 6^{ième} jour post injection mais ne l'est pas de façon significative après l'analyse statistique. Des résultats similaires ont été obtenus en ce qui concerne les lymphocytes du sang (résultats non illustrés). Ces résultats sont cependant étranges étant donné que, dans la moelle osseuse, une chute des cellules souches, plus prononcée pour la dose de 10 mg/kg de doxorubicine en présence ou en absence de L61, a été observée au 3^{ième} jour post injection (résultats non illustrés). Cette chute est cependant transitoire, le nombre de cellules devenant même supérieur au groupe témoin au 14 ième jour. L'absence de diminution du nombre de leucocytes dans la rate et le sang alors qu'il y a une diminution du nombre de cellules souches dans la moelle osseuse peut probablement s'expliquer de différentes façons. Tout d'abord, il s'agit peut-être d'une compensation grâce à une faible mais tout de même observable augmentation de la capacité de prolifération de ces cellules souches au 3ième jour. D'autre part, l'atteinte pourrait s'appliquer d'avantage aux cellules myéloïdes précurseurs des globules rouges plutôt qu'aux précurseurs lymphoïdes. À l'appui de cette hypothèse, nous avons noté une diminution significative du pourcentage de globules rouges du 3^{ième} jour au 9^{ième} jour post injection avec les deux doses de doxorubicine associée ou non au L61 (résultats non illustrés). Quoi qu'il en soit, l'association du L61 à la doxorubicine n'affecte pas la toxicité de cette dernière pour les lymphocytes puisque les résultats sont absolument identiques à ceux obtenus avec la doxorubicine seule.

Il en est de même pour l'analyse par cytométrie en flux des populations lymphocytaires de la rate. Tout d'abord il est bon de noter que dans le cas des traitements avec la doxorubicine seule, nos résultats confirment ceux d'une autre étude du genre effectuée par Froidevaux et Loor (1994). Comme eux, nous avons observé des variations dans les tailles relatives des populations lymphocytaires. Ces variations se traduisent par une diminution de la population des lymphocytes B et une augmentation proportionnelle des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. Ces variations illustrent vraisemblablement une toxicité plus grande pour les lymphocytes B (3ième au 9ième jour). La leucopénie étant bel et bien un effet secondaire de la doxorubicine (Calabresi et Parks, 1996; Wynn, Meiller et Crossley, 1997), la similitude des résultats obtenus chez les souris traitées à la doxorubicine seule ou avec la combinaison Dox/L61 démontre que le L61 n'affecte pas la toxicité naturelle de la drogue autant pour les lymphocytes de la rate que ceux du sang (résultats non illustrés). Dans les deux cas, les proportions de lymphocytes observées lors du traitement avec la doxorubicine seule et Dox/L61 de même que le rétablissement des différentes populations après 22 jours étaient comparables. Dans le cas du sang, les globules rouges sont une autre population cellulaire affectée par la doxorubicine. Chez ces cellules non nucléées l'effet de la doxorubicine s'explique soit par une atteinte directe de la membrane des cellules circulantes, soit par un effet sur les cellules souches myéloïdes ainsi que nous l'avons évoqué précédemment.

Nous nous sommes demandés par la suite s'il était possible que la doxorubicine seule ou en complexe affecte la capacité de prolifération des lymphocytes T et B. D'après nos résultats, il semblerait que ce ne soit pas le cas puisque les courbes de croissance des lymphocytes T et B sont comparables entre elles et ne démontrent pas de différence significative. Les faibles variations observables du 3ième au 14^{ième} jour sont probablement la conséquence de différences dans les populations lymphocytaires pour la période concernée. En effet, comme il a été démontré dans l'analyse cytofluorométrique, les suspensions cellulaires testées ne contenaient pas toujours les mêmes proportions de lymphocytes T et B.

Pour ce qui est de l'activité propre aux différents types cellulaires de la rate, certaines études dans le passé ont démontré un effet de la doxorubicine sur plusieurs d'entre elles. Contrairement à ce à quoi l'on pouvait s'attendre, ce sont des augmentations d'activité qui ont été observées dans la majorité des cas (Santoni et al., 1980; Ehrke, Cohen et Mihich, 1982; Ehrke, Ryoyama et Cohen, 1984; Ehrke et al., 1986; Maccubin et al., 1992). Pour notre part, nous avons voulu vérifier l'activité cytotoxique des cellules Tc et LAK ainsi que la capacité de production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺ dans le but de savoir si les précurseurs des cellules ayant résisté à la destruction induite par les produits injectés aux souris avaient conservé leur pleine capacité de répondre à des stimuli.

Dans un contexte de réponse allogéniques, Ehrke, Ryoyama et Cohen (1984) avaient rapporté que l'injection i.v. de 5 mg/kg de doxorubicine à des souris C57BL/6 amenait après 5 jours une augmentation de l'activité cytotoxique des Tc spléniques, les niveaux atteints étant de 10 à 20% supérieurs à ceux de cellules de souris non traitées. Pour notre part, nous n'observons pas d'augmentation significative après l'analyse statistique lors de l'inoculation de 5 mg/kg de doxorubicine associée ou non au L61 aux différents jours que nous avons choisis. Cependant, la moyenne des valeurs obtenues suggère des hausses non significatives de 5 à 10 % pour certains ratio cellules effectrices:cellules cibles ont été notées au 3ième jour pour les groupes traités à la doxorubicine seule et ceux traités avec Dox/L61 et au 6^{ième} jour pour le groupe Dox/L61. L'objectif de notre étude étant essentiellement d'évaluer les effets du pluronic, l'important pour nous demeure toujours que l'addition du L61 à la doxorubicine n'augmente pas sa toxicité pour les précurseurs de lymphocytes T CD8⁺ et que l'activation des cellules soit normale. Il semblerait même que pour une dose de 10 mg/kg, le L61 ait un effet bénéfique. En effet, alors qu'une diminution significative de la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ est observée au 6^{ième} jour post injection dans le cas de la doxorubicine seule, aucune diminution n'est observée pour Dox/L61. Un point porte cependant au questionnement: soit l'effet de la doxorubicine sur les précurseurs T CD8⁺ changeant ainsi leur propriété d'adhésion (Ehrke, Cohen et Mihich, 1982). En effet, nous avons présumé que les lymphocytes T cytotoxiques n'adhéraient pas et n'avons donc pas pris en considération les cellules ayant cette capacité lors de nos tests. Cependant, si la capacité d'adhésion de ces lymphocytes avait en effet été changée, les résultats obtenus seraient tout de même positifs car ils indiqueraient que le L61 associé à la doxorubicine l'empêche d'agir sur les précurseurs de lymphocytes T, conservant ainsi leur propriété de non adhérence.

Jusqu'à présent, une seule étude a démontré clairement l'effet de la doxorubicine sur les cellules NK (Santoni et al., 1980). On y rapporte que l'inoculation i.p. de la doxorubicine à des souris C57BL/6 augmente l'activité cytotoxique des cellules NK péritonéales contre les cellules YAC-1 alors que dans la rate cette activité diminue. Les auteurs postulent que cela puisse être dû à la présence de cellules suppressives spléniques. Notre objectif était différent puisque ce que nous avons mesuré est la génération des LAK à partir des suspensions de cellules spléniques. Nous n'avons observé dans ces conditions aucune différence dans l'activité cytotoxique des LAK obtenues, peu importe le traitement administré aux souris. Une forte réponse comme dans le cas des souris non traitées est en effet observée chez tous les groupes démontrant ainsi qu'aucun des traitements n'affecte la fréquence des précurseurs de LAK.

Contrairement à Abdul-Hamied et Turk (1987) qui ont observé une augmentation de la sécrétion d'IL-2 par les cellules spléniques de rat stimulées à la Con A *in vitro* durant 24 heures après avoir injecté les animaux avec une dose de 1 mg/kg de doxorubicine, nous observons une diminution, dépendante de la dose, de la production d'IL-2 par ces cellules au 3^{ième} jour post injection. Ici encore, l'effet observé est transitoire. La quantité de drogue injectée explique probablement ces résultats contradictoires. Il est aussi possible qu'il y ait une variation de récepteurs à la surface cellulaire influençant ainsi la stimulation de certaines cellules. C'est en effet le cas, comme nous l'avons déjà mentionné, de certaines molécules telles Fas et FasL pour lesquelles l'expression semble varier lors de traitements avec la doxorubicine. Chose certaine, cette observation n'est pas le résultat d'une diminution des cellules T CD4⁺ puisque leur proportion au 3^{ième} jour post injection est équivalente à celle des souris témoins, peu importe le traitement administré. Ce qu'il est encore important de noter, c'est

la similitude des résultats entre les groupes traités à la doxorubicine seule et ceux traités avec Dox/L61.

Même si ces résultats sont très prometteurs, un point n'a cependant pas été vérifié. Il a en effet été démontré que la capacité d'activation des leucocytes peut être influencée par l'effet de la présence de doxorubicine dans l'environnement immédiat de ces cellules en division (Mutschler et al., 1995; Calabresi et Parks, 1996; Gewitrtz, 1999). Ainsi, 5 jours après l'injection de la doxorubicine seule, le niveau d'activité des cellules LAK, des monocytes/macrophages ainsi que l'activité cytotoxique allogénique des Tc étaient augmentés (Santoni et al., 1980; Ehrke, Cohen et Mihich, 1982; Ehrke, Ryoyama et Cohen, 1984; Ehrke et al., 1986; Maccubin et al., 1992). La présence de plus ou moins de doxorubicine lors de son association au L61, pourrait donc être maléfique ou bénéfique lors de la stimulation du système immunitaire via certains antigènes tumoraux. Nous savons en effet que chez l'humain quatre principales catégories de familles de gènes, codant pour des antigènes hautement spécifiques aux tumeurs, ont été découvertes jusqu'à présent comme étant impliquées dans l'activation des cellules de l'immunité (Lucas et al., 1998). La principale catégorie et la mieux caractérisée comporte les gènes des familles RAGE (Gaugler et al., 1996), MAGE, BAGE, GAGE (Boon, Coulie et Van den Eynde, 1997) et LAGE (Lethé et al., 1998). Les antigènes codés par ces gènes se retrouvent sur plusieurs types de tumeurs (mélanomes, carcinomes) et sont généralement absents des tissus humains normaux (Boon, Coulie et Van den Eynde, 1997). Pour ces antigènes, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (Van Der Bruggen et al., 1991; Boon, Coulie et Van den Eynde, 1997; Chaux et al., 1998; Huang et al., 1999) et T CD4⁺ (Chaux et al., 1999) a été obtenue lors de leur présentation par les molécules du CMH I ou II. Ces cellules pourraient donc être potentiellement affectées par la doxorubicine. De plus, les nouvelles thérapies combinant la chimio- et l'immunothérapie (par exemple une combinaison avec l'IL-2 ou l'interféron-α ou γ (Lumsden et al., 1996; Naglieri et al., 1998) sont d'autres situations dans lesquelles les cellules du système immunitaire sont fortement activées. Ces deux exemples prouvent bien qu'une étude plus poussée démontrant l'effet de Dox/L61 sur l'activité des cellules après ce genre de stimulation in vivo serait appropriée.

Malgré tout, l'étude globale que nous avons effectuée nous a permis de confirmer que le L61 administré seul est totalement inerte puisque tous les résultats obtenus avec les souris de ce groupe sont identiques à ceux obtenus avec le groupe de souris témoins. Aussi, même si en présence de L61 l'efficacité de la doxorubicine est fortement accrue pour les cellules tumorales, surtout celles ayant développé une MDR, on ne peut conclure à une toxicité supérieure du mélange pour les cellules immunitaires. Là où une toxicité était perceptible, l'effet était d'une part transitoire et surtout absolument identique que la doxorubicine ait été administré seule ou associée au L61. Cette observation s'applique en effet autant dans le cas de la variation du nombre de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, de la taille relative des populations lymphocytaires du sang et de la rate, de la diminution de la quantité de globules rouges que pour la diminution de sécrétion d'IL-2 par les T CD4⁺ stimulés. Tout ceci place le L61 en situation avantageuse par rapport à d'autres agents chimiosensibilisants tel le SDZ PSC 833 qui va jusqu'à doubler la lymphotoxicité et la myélotoxicité de la doxorubicine (Pourtier-Manzanedo et al., 1995). Pourquoi alors en plus d'utiliser le L61 comme transporteur, ne pas profiter de la présence de celui-ci pour améliorer le traitement ou pour aider à diminuer les effets néfastes de la doxorubicine? Les progrès récents sont importants en ce qui a trait à la compréhension des processus qui mènent à la formation des tumeurs de même que des mécanismes d'échappement de ces dernières. Il en est de même pour les modes de reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires qui sont très variés. Par exemple, l'utilisation de différentes cytokines hydrophiles tel l'IL-2 (Pollera et al., 1994; Lumsden et al., 1996; Cabanes et al., 1999; Le Cesne et al., 1999), l'interféron γ (Lumsden et al., 1996), le G-CSF (Hansen et al., 1995; Erkisi et al., 1996; Tjan-Heijnen et al., 1998) et le GM-CSF (Ardizzoni et al., 1994; Venturini et al., 1996) a permis une augmentation de l'efficacité des traitements antinéoplasiques par l'activation en parallèle des cellules immunitaires. La partie hydrophile du Pluronic L61 nous permettrait de complexer ces molécules en même temps que la doxorubicine dans le but d'effectuer des traitements combinés. Puisque la recherche d'antigenes de surface spécifiques aux tumeurs dans le but de développer des anticorps est aussi d'un grand intérêt, le développement d'anticorps démontrant une grande spécificité et efficacité permettrait de lier ces molécules de façon covalente au L61. Conséquemment, il serait ainsi possible de mieux cibler les tumeurs et ainsi transporter plus de doxorubicine à ces sites. De la même manière, certains effets secondaires pourraient être atténués. En effet, la chute de la quantité de globules rouges causée par la doxorubicine pourrait être évitée par l'injection d'erythropoïétine (Venturini et al., 1996) complexée de la même manière que les autres produits solubles. On pourrait aussi envisager d'intégrer au complexe Dox/L61 d'autres molécules telles le 5-fluorouracile (Stathopoulos et al., 1998) et le dexrazoxane (Hochster et al., 1992) impliqués dans la diminution de la cardiotoxicité de la doxorubicine ou encore le diethyldithiocarbamate qui diminue la myélotoxicité (Schmalbach et Borch, 1989). Ainsi, la structure du L61, par ses propriétés hydrophiles et hydrophobes en plus des possibilités de liaison covalentes ou non, permet de songer à son utilisation dans une multitude d'autres contextes plutôt qu'uniquement celui de transporteur de doxorubicine.

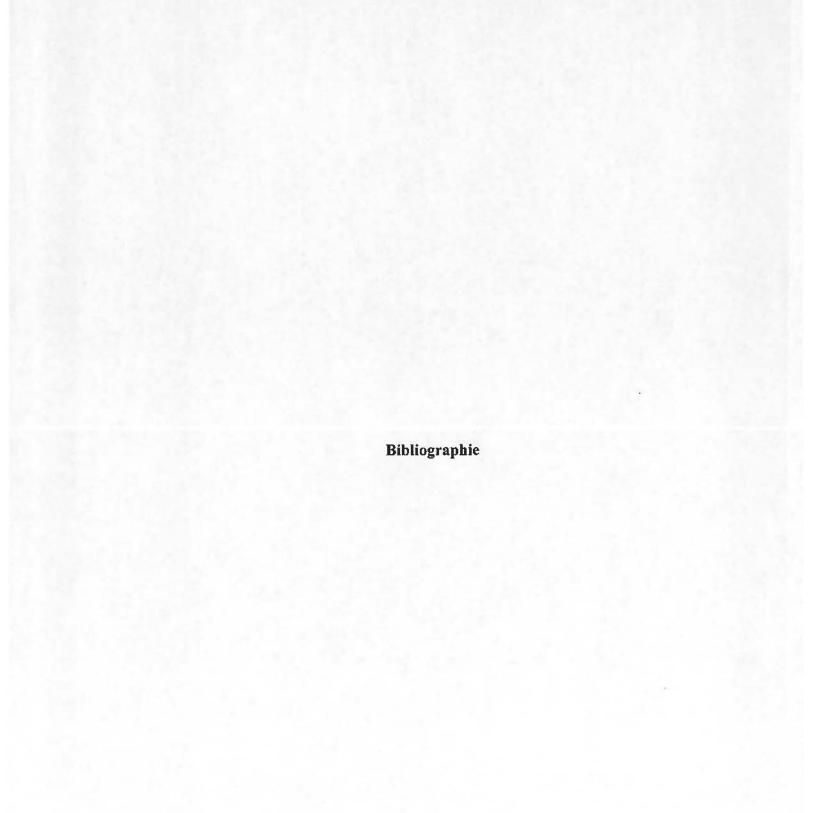


Notre travail qui avait donc pour but d'évaluer la toxicité de la doxorubicine associée au pluronic L61 pour les lymphocytes de la rate en comparaison avec celle de la doxorubicine seule nous permet de conclure que i) le L61 seul à la dose utilisée est inerte et que ii) son association à la doxorubicine crée un produit qui n'est pas plus toxique que la doxorubicine seule pour les lymphocytes spléniques même si l'efficacité de celle-ci en tant qu'agent antinéoplasique est supérieure en présence de L61.

Le travail que nous avons effectué ne concerne cependant que la toxicité du produit à l'étude pour les lymphocytes de la rate. Bien sûr, d'autres cellules spléniques impliquées dans l'immunité antitumorale, telles les macrophages et les lymphocytes B, pourraient être affectées ou ce qui a trait à leurs propriétés fonctionnelles, mais nous ne les avons pas prises en compte car il est généralement admis que leur contribution à l'immunité antitumorale n'est pas majeure. L'absence d'une plus grande toxicité du mélange Dox/L61 pour les lymphocytes T CD4⁺ qui jouent un rôle central dans la stimulation des autres cellules et pour les lymphocytes T CD8+ et les LAK dont l'implication est déterminante dans la destruction des cellules tumorales illustre de manière convaincante l'innocuité du produit pour les effecteurs de l'immunité antitumorale. De plus les résultats obtenus dans les expériences impliquant le sang et les cellules de la moelle osseuse qui ont été effectuées en parallèle dans notre laboratoire supportent la même conclusion. D'un autre côté, il serait intéressant de se demander pourquoi, en égard à des particularités de structures membranaires propres aux tumeurs étudiées et aux populations lymphocytaires étudiées dans le présent travail, les résultats expérimentaux n'ont pas ligitimé la crainte qui était à l'origine du travail, selon laquelle une combinaison plus toxique vis-à-vis de cellules tumorales aurait pu également être plus toxique vis-à-vis de cellules immunocompétentes.

Les résultats exposés dans ce mémoire renforcent donc l'intérêt pour le produit Dox/L61 dont la plus grande efficacité en tant qu'agent antinéoplasique a été rapportée dans d'autres études. Son utilisation pour le traitement de tumeurs humaines pourrait éventuellement permettre de réduire la dose de doxorubicine et ainsi diminuer les effets

secondaires ou encore de limiter la durée des traitements réduisant ainsi les souffrances qui y sont associées. On ne peut conclure d'emblée que les observations faites dans un modèle animal se reproduiront exactement chez l'humain mais on peut au moins considérer que les résultats que nous avons présentés sont très encourageants.



ABDUL-HAMIED, T. A. et J. L. Turk. 1987. «Enhancement of interleukin-2 release in rats by treatment with bleomycin and adriamycin *in vivo*». Cancer Immunol Immunother, vol. 25. p. 245-249.

ABOUD-PIRAK, E., E. Hurwitz, F. Bellot, J. Schlessinger et M. Sela. 1989. «Inhibition of human tumor growth in nude mice by a conjugate of doxorubicin with monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptor». <u>Proc Natl Acad Sci USA</u>, vol. 86. p. 3778-3781.

ALAKHOV, V. Y. et A. V. Kabanov. 1998. «Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery». Exp Opin Invest Drugs, vol. 7. p. 1453-1473.

ALAKHOV, V. Y., E. Y. Moskaleva, E. V. Batrakova et A. V. Kabanov. 1996. «Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 block copolymer». Bioconjug Chem, vol. 7. p. 209-215.

ARAGNOL, D. et L. D. Leserman. 1986. «Immune clearance of liposomes inhibited by an anti-Fc receptor antibody *in vivo*». <u>Proc Natl Acad Sci USA</u>, vol. 83. p. 2699-2703.

ARAP, W., R. Pasqualini et E. Ruoslahti. 1998. «Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model». <u>Science</u>, vol. 279. p. 377-380.

ARASE, H., N. Arase et T. Saito. 1995. «Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells». J Exp Med, vol. 181. p. 1235-1238.

ARDIZZONI, A., M. Venturini, M. R. Sertoli, P. G. Giannessi, F. Brema, M. Danova, F. Testore, G. L. Mariani, M. C. Pennucci et P. Queirolo. 1994. «Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) allows acceleration and dose intensity increase of CEF chemotherapy: a randomised study in patients with advanced breast cancer». Br J Cancer, vol. 69. p. 385-391.

BARRELEIRO, P. C. A. et P. Alexandridis. 1998. «13C-NMR evidence on amphiphile lifetime in reverse (water-in-oil) micelles formed by a poloxamer block copolymer». <u>J</u> Colloid Interface Sci, vol. 206. p. 357-360.

BATRAKOVA, E. V., T. Y. Dorodnych, E. Y. Klinskii, E. N. Kliushnenkova, O. B. Shemchukova, O. N. Goncharova, S. A. Arjakov, V. Y. Alakhov et A. V. Kabanov. 1996. «Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: *in vivo* evaluation of anti-cancer activity». <u>Br J Cancer</u>, vol. 74. p. 1545-1552.

BENJAMIN, R. S., P. H. Wiernik et N. R. Bachur. 1974. «Adriamycin chemotherapyefficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high-dosage schedule». Cancer, vol. 33. p. 3319-3327.

BERGER, A., B. Piqueras, F. Pages, E. Tartour, P. H. Cugnene et W. H. Fridman. 1998. «Fas, fas ligand, immune tolerance, and cancer: implications in cancer of the colon». <u>Bull Cancer</u>, vol. 85. p. 129-133.

BOON, T., P. G. Coulie et B. Van den Eynde. 1997. «Tumor antigens recognized by T cells». Immunol Today, vol. 18. p. 267-268.

BUZDAR, A. U., C. Marcus, T. L. Smith et G. R. Blumenschein. 1985. «Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin». Cancer, vol. 55. p. 2761-2765.

BYARS, N. E. et A. C. Allison. 1987. «Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity». <u>Vaccine</u>, vol. 5. p. 223-228.

CABANES, A., S. Even-Chen, J. Zimberoff, Y. Barenholz, E. Kedar et A. Gabizon. 1999. «Enhancement of antitumor activity of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin with soluble and liposomal interleukin-2». Clin Cancer Res, vol. 5. p. 687-693.

CALABRESI, P. et R. E., Parks Jr. 1996. «Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression». Dans A. Goodman Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies et P. Taylor. (ed). <u>The pharmacological basis of therapeutics</u>. Toronto, ONT.: Pergamon Press, 1996, p. 1247-1314.

CALABRESI, P. et B. R. Chabner. 1990. «Antineoplastic Agents». Dans A. Goodman Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies et P. Taylor. (ed). <u>The pharmacological basis of therapeutics</u>. Toronto, ONT.: Pergamon Press, 1990, p. 1209-1261.

CHAPPELL, D. B. et N. P. Restifo. 1998. «T cell-tumor cell: a fatal interaction?». <u>Cancer Immunol Immunother</u>, vol. 47. no. 2. p. 65-71.

CHAUX, P., V. Vantomme, P. Coulie, T. Boon et P. van der Bruggen. 1998. «Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T-lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer». <u>Int J Cancer</u>, vol. 77. p. 538-542.

CHAUX, P., V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. M. Eggermont, T. Boon et P. van der Bruggen. 1999. «Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4⁺ T lymphocytes». <u>J Exp Med</u>, vol. 189. p. 767-777.

CHUBB, C. et P. Draper. 1987. «Efficacy of perfluorodecalin as an oxygen carrier for mouse and rat testes perfused *in vitro*». Proc Soc Exp Biol Med, vol. 184. p. 489-494.

CLARK, J. W. 1996. «Targeted therapy». Dans B. A. Chabner et D. L. Longo. (ed.). Cancer chemotherapy and biotherapy. New York, New York: Lippincott-Raven, 1996, p. 691-708.

DHEIN, J., H. Walczar, C. Baumler, K. M. Debatin et P. H. Krammer. 1995. «Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1». Nature, vol. 373. p. 438-441.

DOROSHOW, J. H. 1996. «Anthracyclines and anthracenediones». Dans B. A. Chabner et D. L. Longo. (ed.). <u>Cancer chemotherapy and biotherapy</u>. New York, New York: Lippincott-Raven, 1996, p. 409-434.

DRAPER, M., M. Savage, J. H. Collett, D. Attwood, C. Price, C. Booth et Q. G. Wang. 1995. «Solubilisation of drugs in micellar systems studied by eluent gel permeation chromatography». <u>Pharm Res</u>, vol. 12. p. 1231-1237.

EHRKE, J. M., S. A. Cohen et E. Mihich. 1982. «Selective effects of adriamycin on murine host defense systems». <u>Immunological Rev</u>, vol. 65. p. 55-78.

EHRKE, J. M., D. Maccubbin, K. Ryoyama, S. A. Cohen et E. Mihich. 1986. «Correlation between adriamycin-induced augmentation of interleukin-2 production and of cell-mediated cytotoxicity in mice». <u>Cancer Res</u>, vol. 46. p. 54-60.

EHRKE, J. M., K. Ryoyama et S. A. Cohen. 1984. «Cellular basis for adriamycin-induced augmentation of cell-mediated cytotoxicity in culture». <u>Cancer Res</u>, vol. 44. p. 2497-2504.

EKSBORG, S., H. Ehrsson et B. Ekqvist. 1982. «Protein binding of anthraquinone glycosides, with special reference to adriamycin». <u>Cancer Chemother Pharmacol</u>, vol. 10. p. 7-10.

ERKISI, M., E. Erkurt, S. Ozbarlas, R. Burgut, F. Doran et E. Seyrek. 1996. «The use of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in combination with single or fractionated doses of ifosfamide and doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma». J Chemother, vol. 8. p. 224-228.

ERLICHMAN, C. et M. Moore. 1996. «Carcinogenesis: A late complication of cancer chemotherapy». Dans B. A. Chabner et D. L. Longo. (ed.). <u>Cancer chemotherapy and biotherapy</u>. New York, New York: Lippincott-Raven, 1996, p. 45-58.

FRENCH, L. E. et J. Tschopp. 1999. «The TRAIL to selective tumor death». Nat Med, vol. 5. p. 146-147.

FRIESEN, C., I. Herr, P. H. Krammer et K.-M. Debatin. 1996. «Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells». <u>Nat Med</u>, vol. 2. p. 574-577.

FROIDEVAUX, S. et F. Loor. 1994. «Myeloid and lymphoid cell alterations in normal mice exposed to chemotherapy with doxorubicin and/or the multidrug-resistance reversing agent SDZ PSC 833». Int J Cancer, vol. 59. p. 133-140.

GABIZON, A. et D. Papahadjopoulos. 1988. «Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors». <u>Proc Natl Acad Sci USA</u>, vol. 85. p. 6949-6953.

GABIZON, A., R. Shiota et D. Papahadjopoulos. 1989. «Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times». J Natl Cancer Inst, vol. 81. p. 1484-1488.

GARG, A. P. et J. Muller. 1992. «Preparation of antigens from trichophyton mentagrophytes using a new semi-solid culture medium and their characterization by SDS-PAGE and immunological techniques». Mycoses, vol. 35. no. 11-12. p. 349-355.

GAUGLER, B., N. Brouwenstijn, V. Vantomme, J.-P. Szikora, C. W. Van der Spek, J.-J. Patard, T. Boon, P. Schrier et B. J. Van den Eynde. 1996. «A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma». Immunogenetics, vol. 44. p. 323-330.

GEWIRTZ, D. A. 1999. «A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin». Biochem Pharmacol, vol. 57. p. 727-741.

GILBERT, P., M. V. Jones, D. G. Allison, S. Heys, T. Maira et P. Wood. 1998. «The use of poloxamer hydrogels for the assessment of biofilm susceptibility towards biocide treatments». J Appl Microbiol, vol. 85. no. 6. p. 985-990.

GOKHALE, P. C., B. Radhakrishanan, S. R. Husain, D. R. Abernethy, R. Sacher, A. Dritscilo et A. Rahman. 1996. «An improved method of encapsulation of doxorubicin in liposomes: pharmacological, toxicological and therapeutic evaluation». <u>Br J Cancer</u>, vol. 74. p. 43-48.

GOLSTEIN, P. 1997. «Cell death: TRAIL and its receptors». <u>Curr Biol</u>, vol. 7. p. R750-753.

GREENE, R. F., J. M. Collins, J. F. Jenkins, J. L. Speyer et C. E. Myers. 1983. «Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of *in vitro* experiments and treatment protocols». <u>Cancer Res</u>, vol. 43. p. 3417-3421.

GUTIERREZ, L. S., M. Eliza, T. Niven-Fairchild, F. Naftolin et G. Mor. 1999. «The Fas/Fas-ligand system: a mechanism for immune evasion in human breast carcinomas». Breast Cancer Res Treat, vol. 54. p. 245-253.

HANSEN, P. B., H. E. Johnsen, E. Ralfkiaer, L. Jensen, E. Gaarsdal et N. E. Hansen. 1995. «Short-term rhG-CSF priming before chemotherapy does mobilize blood progenitors but does not prevent chemotherapy induced myelotoxicity: a randomized study of patients with non-Hodgkin's lymphomas». <u>Leuk Lymphoma</u>, vol. 19. p. 453-460.

HARDING, C. V., D. S. Collins, J. W. Slot, H. J. Geuze et E. R. Unanue. 1991. «Liposome-encapsulated antigens are processed in liposomes, recycled, and presented to T cells». Cell, vol. 64. p. 393-401. HOCHSTER, H., L. Liebes, S. Wadler, R. Oratz, J. C. Wernz, M. Meyers, M. Green, R. H. Blum et J. L. Speyer. 1992. «Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin». <u>J Natl Cancer Inst</u>, vol. 84. p. 1725-1730.

HUANG, L.-Q., F. Brasseur, A. Serrano, E. De Plaen, P. van der Bruggen, T. Boon et A. Van Pel. 1999. «Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma». <u>J Immunol</u>, vol. 162. p. 6849-6854.

HUATAN, H., J. H. Collett, D. Attwood et C. Booth. 1995. «Preparation and characterization of poly(epsilon-caprolactone) polymer blends for the delivery of proteins». Biomaterials, vol. 16. p. 1297-1303.

HUNG, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll et H. Levitsky. 1998. «The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response» <u>J Exp Med</u>, vol. 188. p. 2357-2368.

HUNTER, R., F. Strickland et F. Kézdy. 1981. «The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants». J Immunol, vol. 127. p. 1244-1250.

HURWITZ, E., R. Adler, D. Shouval, H. Takahashi, J. R. Wands et M. Sela. 1992. «Immunotargeting of daunomycin to localized and metastatic human colon adenocarcinoma in athymic mice». Cancer Immunol Immunother, vol. 35. p. 186-192.

HUWYLER, J., J. Yang et W. M. Pardridge. 1997. «Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat». <u>JPET</u>, vol. 282. p. 1541-1546.

HYMES, A. C., M. H. Safavian, A. Arbulu et P. Baute. 1968. «A comparison of pluronic F-68, low molecular weight dextran, mannitol, and saline as priming agents in the heartlung apparatus. I. pluronic F-68: first use as a plasma substitute». <u>J Thorac Cardiovasc Surg</u>, vol. 56. p. 16-22.

KABANOV, A. V., V. P. Chekhonin, V. Y. Alakov, E. V. Batrakova, A. S. Lebedev, N. S. Melik-Nubarov, S. A. Arzhakov, A. V. Levashov, G. V. Morozov et E. S. Severin. 1989. «The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. Micelles as microcontainers for drug targeting». <u>FEBS Lett</u>, vol. 258. p. 343-345.

KABANOV, A. V., V. I. Slepnev, L. E. Kuznetsova, E. V. Batrakova, V. Y. Alakov, N. S. Melik-Nubarov, P. G. Sveshnikov et V. A. Kabanov. 1992. «Pluronic micelles as a tool for low-molecular compound vector delivery into a cell: effect of staphylococcus aureus enterotoxin B on cell loading with micelle incorporated fluorescent dye». <u>Biochem Int</u>, vol. 26. p. 1035-1042.

KAYAGAKI, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, A. Kawasaki, K. Okumura et H. Yagita. 1999. «Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity». <u>J Immunol</u>, vol. 162. p. 2639-2647.

LANDOWSKI, T. H., M. C. Gleason-Guzman et W. S. Dalton. 1997. «Selection for drug resistance results in resistance to Fas-mediated apoptosis». <u>Blood</u>, vol. 89. p. 1854-1861.

LANIER, L. L. 1998. «NK cell receptors». Annu Rev Immunol, vol. 16. p. 359-393.

LASIC, D. D. 1996. «Doxorubicin in sterically stabilized liposomes». <u>Nature</u>, vol. 380. p. 561-562.

LASIC, D. D. et D. Papahadjopoulos. 1995. «Liposomes revisited». <u>Science</u>, vol. 267. p. 1275-1276.

LE CESNE, A., G. Vassal, F. Farace, M. Spielmann, T. Le Chevalier, E Angevin, D. Valteau-Couanet, K. Fizazi, I. Cojean, A. Liombard, T. Tursz et B. Escudier. 1999. «Combination interleukin-2 and doxorubicin in advanced adult solid tumors: circumvention of doxorubicin resistance in soft-tissue sarcoma?». J Immunother, vol. 22. p. 268-277.

LEPAGE, P. et P. Gros. 1995. «La glycoprotéine P: de la résistance croisée aux médicaments au transport des lipides biliaires». Médecine/Sciences, vol. 11. p. 357-366.

LETHÉ, B., S. Lucas, L. Michaux, C. De Smet, D. Godelaine, A. Serrano, E. De Plaen et T. Boon. 1998. «LAGE-1, a new gene with tumor specificity». <u>Int J Cancer</u>, vol. 76. p. 903-908.

LONGMAN, S. A., P. G. Tardi, M. J. Parr, L. Choi, P. R. Cullis et M. B. Bally. 1995. «Accumulation of protein-coated liposomes in an extravaxcular site: influence of increasing carrier circulation lifetimes». <u>J Pharmacol Exp Ther</u>, vol. 275. p. 1177-1184.

LOSA, S., P. Calvo, E. Castro, J. L. Vila-Jato et M. J. Alonso. 1991. «Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticules». <u>J Pharm Pharmacol</u>, vol. 43. p. 548-552.

LUCAS, P. et M. Spielmann. 1985. «Traitement médical des sarcomes des tissus mous de l'adulte». Bull Cancer, vol. 72. p. 183-201.

LUCAS, S., C. De Smet, K. C. Arden, C. S. Viars, B. Lethé, C. Lurquin et T. Boon. 1998. «Identification of new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis». <u>Cancer Res</u>, vol. 58. p. 743-752.

LUMSDEN, A. J., J. P. Codde, P. H. Van der Meide et B. N. Gray. 1996. «Immunohistochemical characterisation of immunological change at the tumour site after chemo-immunotherapy with doxorubicin, interleukin-2 and interferon-gamma». Anticancer Res, vol. 16. p. 1145-1154.

MACCUBBIN, D. L., K. R. Wing, K. F. Mace, R. L. X. Ho, M. J. Ehrke et E. Mihich. 1992. «Adriamycin-induced modulation of host defenses in tumor-bearing mice». <u>Cancer Res</u>, vol. 52. p. 3572-3576.

MANALO, F. B., A. Marks et H. L. Davis Jr. 1975. «Doxorubicin toxicity Onycholysis, Plantar calus formation, and epidermolysis». JAMA, vol. 233. no. 1. p. 56-57.

MARAFINO Jr., B. J., N. Shri et D. M. Siegel. 1981. «Pharmacokinetics, covalent binding and subcellular distribution of [³H]doxorubicin after intravenous administration in the mouse». <u>J Pharmacol Exp Ther</u>, vol. 216. p. 55-61.

MARIANI, S. M. et P. H. Krammer. 1998. «Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells». Eur J Immunol, vol. 28. p. 1492-1498.

MAYHEW, E. G., D. Lasic, S. Babbar et F. J. Martin. 1992. «Pharmacokinetics and antitumor activity of epirubicin encapsulated in long-circulating liposomes incorporating a polyethylene glycol-derivatized phospholipid». <u>Int J Cancer</u>, vol. 51. p. 302-309.

MINOW, R. A., R. S. Benjamin, E. T. Lee et J. A. Gottlieb. 1977. «Adriamycin cardiomyopathy-risk factors». Cancer, vol. 39. p. 1397-1402.

MISSELWITZ, B., A. Muhler, A. I. Heinzelmann, J. C., Bock et H. J., Weinmann. 1997. «Magnetic resonance imaging of pulmonary ventilation. Initial experiences with a gadolinium-DTPA-based aerosol». Invest Radiol, vol. 32. p. 797-801. MUTSCHLER, E., H. Derendorf, M. Schäfer-Korting, K. Elrod et K. S. Estes. 1995. «Chemotherapy of malignant tumors». Dans <u>Drug Actions</u>. London: CRC Press. p. 605.

NAGATA, Y., C. E. Mondon et A. D. Cooper. 1990. «The effect of perfluorochemical artificial blood on lipoprotein metabolism in rats». Metabolism, vol. 39. p. 682-689.

NAGLIERI, E., V. Gebbia, E. Durini, G. Lelli, I. Abbate, F. P. Selvaggi, P. Di Tonno et G. Colucci. 1998. «Standard interleukin-2 (IL-2) and interferon-alpha immunotherapy versus an IL-2 and 4-epirubicin immuno-chemotherapeutic association in metastatic renal cell carcinoma». Anticancer Res, vol. 18. p. 2021-2026.

NEWMAN, M. J., J. K. Actor, M. Balusubramanian et C. Jagannath. 1998. «Use of nonionic block copolymers in vaccines and therapeutics». <u>Crit Rev Ther Drug Carrier Syst</u>, vol. 15. p. 89-142.

O'BRYAN, R. M., L. H. Baker, J. E. Gottlieb, S. E. Rivkin, S. P. Balcerzak, G. N. Grumet, S. E. Salmon, T. E. Moon et B. Hoogstraten. 1977. «Dose response evaluation of adriamycin in human neoplasia». <u>Cancer</u>, vol. 39. p. 1940-1948.

PARDOLL, D. M. et S. Topalian. 1998. «The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity». <u>Curr Opin Immunoly</u>, vol. 10. p. 588-594.

PAWELEC, G., J. Zeuthen et R. Kiessling. 1997. «Escape from host-antitumor immunity». Crit Rev Oncog, vol. 8. p. 111-141.

PERUSSIA, B. 1991. «Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines». <u>Curr Opin Immunol</u>, vol. 3. p. 49-55.

PETER, M. E. et P. H. Krammer. 1998. «Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis». Curr Opin Immunoly, vol. 10. p. 545-551.

PHILLIPS, N. C., L. Gagné, C Tsoukas et J. Dahman. 1994. «Immunoliposome targeting to murine CD4⁺ leucocytes is dependent on immune status». <u>J Immunol</u>, vol. 152. p. 3168-3174.

POLLERA, C. F., F. Calabresis, M. Moreschi, E. M. Ruggeri, D. Giannarelli, R. Masciulli, U. Testa et C. Peschle. 1994. «High dose-intense chemotherapy alone or in combination with interleukin-2 for small cell lung cancer: a pilot study». <u>Cancer Invest</u>, vol. 12. p. 574-587.

POURTIER-MANZANEDO, A., A. Didier, S. Froidevaux et F. Loor. 1995. «Lymphotoxicity and myelotoxicity of doxorubicin and SDZ PSC 833 combined chemotherapies for normal mice». <u>Toxicology</u>, vol. 99. p. 207-217.

PROFFITT, R. T., L. E. Willians, C. A. Presant, G. W. Tin, J. A. Uliana, R. C. Gamble et J. D. Baldeschwieler. 1983. «Liposomal blockade of the reticuloendothelial system: improved tumor imaging with small unilamellar vesicles». Science, vol. 220. p. 502-505.

ROSENBERG, S. A., J. R. Yannelli, J. C. Yang, S. L. Topolian, D. J. Schwartzentruber, J. S. Weber, D. R. Parkinson, C. A. Seipp, J. H. Einhorn et D. E. White. 1994. «Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukine-2». J Natl Cancer Inst, vol. 86. p. 1159-1166.

ROWLEY, G., A. R. Hawley, C. L. Dobson et S. Chatham. 1998. «Rheology and filling characteristics of particulate dispersions in polymer melt formulations for liquid fill hard gelatin capsules». <u>Drug Dev Ind Pharm</u>, vol. 24. p. 605-611.

SANTONI, A., C. Riccardi, V. Sorci et R. B. Herberman. 1980. «Effect of adriamycin on the activity of mouse natural killer cells». <u>J Immunol</u>, vol. 124. p. 2329-2335.

SCHMALBACH, T. K. et R. F. Borch. 1989. «Myeloprotective effect of diethyldithiocarbamate treatment following 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, adriamycin, or mitomycin C in mice». Cancer Res, vol. 49. p. 2574-2577.

SEHESTED, M., T. Skovsgaard, B. V. Deurs et H. Winther-Nielsen. 1987. «Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukaemic cells. Effect of daunorubicin and verapamil». <u>Br J Cancer</u>, vol. 56. p. 747-751.

SHRESTA, S., C. T. Pham, D. A. Thomas, T. A. Graubert et T. J. Ley. 1998. «How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?». Curr Opin Immunol, vol. 10. p. 581-587.

SINGAL, P. K. et N. Iliskovic. 1998. «Doxorubicin-induced cardiomyopathy». <u>The New England Journal of Medicine</u>, vol. 339. p. 900-905.

SINGH, M., H. Atwal et R. Micetich. 1998. «Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells». Anticancer Research, vol. 18. p. 1423-1428.

SNIPPE, H., M. J. De Reuver, F. Strickland, J. M. N. Willers et R. L. Hunter. 1981. «Adjuvant effect of nonionic block polymer surfactants in humoral and cellular immunity». Int Archs Allergy Appl Immun, vol. 65. p. 390-398.

SPENCE, R. K., E. D. Norcross, J. Costabile, S. McCoy, A. C. Cernaianu, J. B. Alexander, M. J. Pello, U. Atabek et R. C. Camishion. 1994. «Perfluorocarbons as blood substitutes: the early years. Experience with fluosol DA-20% in the 1980s». <u>Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol</u>, vol. 22. p. 955-963.

SPEISER, D. E. et P. S. Ohashi. 1998. «Activation of cytotoxic T cells by solid tumours?». Cell Mol Life Sci, vol. 54. p. 263-271.

STALDER, T., S. Hahn et P. Erb. 1994. «Fas antigen is the major target molecule for CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity». <u>J Immunol</u>, vol. 152. p. 1127-1133.

STAN, A. C., D. L. Radu, S. Casares, C. A. Bona et T.-D. Brumeanu. 1999. «Antineoplastic efficacy of doxorubicin enzymatically assembled on galactose residues of a monoclonal antibody specific for the carcinoembryonic antigen». <u>Cancer Research</u>, vol. 59. p. 115-121.

STATHOPOULOS, G. P., N. A. Malamos, I. Dontas, G. Deliconstantinos, D. Perrea-Kotsareli et P. E. Karayannacos. 1998. «Inhibition of adriamycin cardiotoxicity by 5-fluorouracil: A potential free oxygen radical scavenger». <u>Anticancer Res</u>, vol. 18. p. 4387-4392.

STORM, G. et D. J. A. Crommelin. 1997. «Colloidal systems for tumor targeting». Hybridoma, vol. 16. p. 119-125.

STRAND, S. et P. R. Galle. 1998. «Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implication». <u>Mol Med Today</u>, vol. 4. p. 63-68.

SUARATO, A., F. Angelucci et C. Geroni. 1999. «Ring-B modified anthracyclines». Curr Pharm Design, vol. 5. p. 217-227.

TAN, C., E. Etcubanas, N. Wollner, G. Rosen, A. Gilladoga, J. Showel, M. L. Murphy et I. H. Krakoff. 1973. «Adriamycin- An antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic diseases». Cancer, vol. 32. p. 9-17.

THOMAS, W. D. et P. Hersey. 1998a. «CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95)». <u>Int J Cancer</u>, vol. 75. p. 384-390.

THOMAS, W. D. et P. Hersey. 1998b. «TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells». J Immunol, vol. 161. p. 2195-2200.

TJAN-HEIJNEN, V. C., B. Biesma, J. Festen, T. A. Splinter, A. Cox, D. J. Wagener et P. E. Postmus. 1998. «Enhanced myelotoxicity due to granulocyte colony-stimulating factor administration until 48 hours before the next chemotherapy course in patients with small-cell lung carcinoma». <u>J Clin Oncol</u>, vol. 16. p. 2708-2714.

TOMURA, M., X. Y. Zhou, S. Maruo, H. J. Ahn, T. Hamaoka, H. Okamura, K. Nakanishi, T. Tanimoto, M. Kurimoto et H. Fujiwara. 1998. «A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1⁺CD3⁻ cells». <u>J Immunol</u>, vol. 160. p. 4738-4746.

TRUMAN, J. P., C. Choqueux, J. Tschopp, J. Vedrenne, F. Le Deist, D. Charron et N. Mooney. 1997. «HLA class II-mediated death is induced via Fas/Fas ligand interactions in human splenic B lymphocytes». <u>Blood</u>, vol. 89. p. 1996-2007.

TSUKADA, Y., E. Hurwitz, R. Kashi, M. Sela, N. Hibi, A. Hara et H. Hirai. 1982. «Chemotherapy by intravenous administration of conjugates of daunomycin with monoclonal and conventional anti-rat α-fetoprotein antibodies». <u>Proc Natl Acad Sci</u> USA, vol. 79. p. 7896-7899.

VAN DER BRUGGEN, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth et T. Boon. 1991. «A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma». <u>Science</u>, vol. 254. p. 1643-1647.

VASKO, K. A., A. M. Riley et R. A. DeWall. 1972. «Poloxalkol R (pluronic F-68): a priming solution for cardiopulmonary bypass». <u>Trans Am Soc Artif Intern Organs</u>, vol. 18. p. 526-531.

VENNE, A., S. Li, R. Mandeville, A. Kabanov et V. Alakhov. 1996. «Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells». Cancer Res, vol. 56. p. 3626-3629.

VENTURINI, M., L. Del Mastro, F. Testore, M. Danova, O. Garrone, C. Lanfranco, F. Latini, M. R. Sertoli, R. Lionetto, P. Queirolo, A. Ardizzoni et R. Rosso. 1996. «Erythropoietin and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor allow acceleration and dose escalation of cyclophosphamide/epidoxorubicin/5-fluorouracil chemotherapy: a dose-finding study in patients with advanced breast cancer». Cancer Chemother Pharmacol, vol. 38. p. 487-494.

WALKER, P. R., P. Saas et P. Y. Dietrich. 1997. «Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back». J Immunol, vol. 158. p. 4521-4524.

WHITESIDE, T. L. et R. B. Herberman. 1995. «The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer». Curr Opin Immunol, vol. 7. p. 704-710.

WHITESIDE, T. L. et H. Rabinowich. 1998. «The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors». <u>Cancer Immunol Immunother</u>, vol. 46. p. 175-184.

WHITESIDE, T. L., M. W. Sung, S. Nagashima, K. Chikamatsu, K. Okada et N. L. Vujanovic. 1998. «Human tumor antigen-specific T lymphocytes and interleukin-2-activated natural killer cells: comparison of antitumor effects *in vitro* and *in vivo*». Clin Cancer Res, vol. 4. p. 1135-1145.

WIRTANEN, G., S. Salo, D. G. Allison, T. Mattila-Sandholm et P. Gilbert. 1998. «Performance evaluation of disinfectant formulations using poloxamer-hydrogel biofilm-constructs». J Appl Microbiol, vol. 85. p. 965-971.

WIRTH, M., A. Fuchs, M. Wolf, B. Ertl et F. Gabor. 1998. «Lectin-mediated drug targeting: preparation, binding characteristics, and antiproliferative activity of wheat germ agglutinin conjugated doxorubicin on caco-2 cells». Pharm Res, vol. 15. p. 1031-1037.

WYNN, R. L., T. F. Meiller et H. L. Crossley. 1997. <u>Drug information handbook for dentistry</u>. Hudson (Cleveland): Lexi-comp Inc. p. 299-301.

YANG, H. M. et R. A. Reisfeld. 1988. «Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan supresses the growth of established tumor xenografts in nude mice». Proc Natl Acad Sci USA, p. 1189-1193.

YEH, C.-J. et W. P. Faulk. 1984. «Killing of human tumor cells in culture with adriamicin conjugates of human transferrin». <u>Clin Immunol Immunopathol</u>, vol. 32. p. 1-11.

YEH, M.-Y., S. R. Roffler et M.-H. Yu. 1992. «Doxorubicin: monoclonal antibody conjugate for therapy of human cervical carcinoma». <u>Int J Cancer</u>, vol. 51. p. 274-282.

YOKOYAMA, K., T. Suyama, H. Okamoto, M. Watanabe, H. Ohyanagi et Y. Saitoh. 1984. «A perfluorochemical emulsion as an oxygen carrier». Artif Organs, vol. 8. p. 34-40.

YOKOYAMA, W. M. 1993. «Recognition structures on natural killer cells». <u>Curr Opin Immunol</u>, vol. 5. p. 67-73.

ZAMAI, L., M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri et B. Perussia. 1998. «Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells». J Exp Med, vol. 188. p. 2375-2380.

ZAVADOVA, E., A. Loercher, S. Verstovsek, C. F. Verchragen, M. Micksche et R. S. Freedman. 1999. «The role of macrophages in antitumor defense of patients with ovarian cancer». Hematol Oncol Clin North Am, vol. 13. p. 135-144.

ANNEXE A

Analyses Statistiques

NOTE: Dans les tableaux de statistiques, le SP1000 est l'équivalent du L61 retrouvé dans le texte.

remplace por space

						publishe list 20,000			
Jour	Comparaison	CD4/Lympho	CD8/Lympho	B220/Lympho	somme	CD4%norm.	CD8%norm.	B220%norm	
3	Normal vs SP1000	.73	.91	.22	.53				
,	Normal vs Doxo5.0	.37	.91	.97	.71	.11	.89	.15	
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.17	.72	.62	.67	.02 P	.61	.03 💠	
	Normal vs Doxo10.0	.01 4	.05 4	.23	.36	.02 +	.06	.05 ♦	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.001 4		.19		.02 4			
			.09		.20		.14	.04 ♦	
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.70	.80	.76	.99	.59	.73	.72	
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.11	.90	.76	.78	.41	.87	.73	
6	Normal vs SP1000	.82	.44	.21	.67				
	Normal vs Doxo5.0	.03 4	.04 4	.09	.56	.04 7	.08	.007 👌	
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.16	.02 4	.07	.61	.05 4	.01 4	.03 👈	
	Normal vs Doxo10.0	.09	.01 4	.05 1	.87	.16	.04 4	.02 🕏	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.04 4	.04 🕈	.02 \$.71	.03 4	.08	.006 ₺	
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	48	.55	.90	.87	.40	.86	.80	
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.73	.69	.86	.81	.91	.77	.94	
	DOXOTO,O VS SPIOOU+DOXOTO,O	./3	,09	,80	.01	.91	."	.74	
9	Normal vs SP1000	.91	.72	.86	.73			•	
	Normal vs Doxo5.0	<.001 4	.14	.22	.53	.004 4	.21	.006	
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	<.001 4	.03 ٩	.11	.27	.001 4	.08	.02 1	
	Normal vs Doxo10.0	<.001	<.001 4	.02 ♦	.34	.003 🕈	.005 +	<.001 +	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.001	<.001 9	.01 🕹	.37	.02 4	.02 4	.001 👃	
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.99	.37	.85	.77	.90	.38	.97	
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.60	.48	.64	.85	.55	.74	.83	
14	Normal vs SP1000	0.4		70	-				
14		.84	.64	.70	.63	002 1	002	05 4	
	Normal vs Doxo5.0	<.001 4	.003 +	.02 1	.33	.003 🕹	.003 ♦		
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	<.001 \$.06	.03 ♦	.34	.005 +	.07	.07	
	Normal vs Doxo10.0	.01 ♦	.19	.11	.34	.05	.07	.11	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.05 +	.92	.46	.78	.12	1.0	.68	
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.67	.53	.93	.97	.80	.40	.78	
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.72	.35	.49	.52	.79	.26	.31	
22	Normal vs SP1000	.75	1.0	.74	.84		346		
	Normal vs Doxo5.0	.78	.74	.49	.53	.73	.14	.57	
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.86	.75	.53	.70	.80	.41	.79	
	Normal vs Doxo10.0	.08	.57	.18	.63	.23	.75	.12	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.09	.97	.29	.58	.40	.45	.32	
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.69	.97	.96	.89	.56	.69	.68	
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.87	.59	.78	.97	.80	.41	.41	

Jour	Comparaison	# cellules
3	Normal vs SP1000	.76
,	Normal vs Doxo5.0	.69
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.97
	Normal vs Doxo10.0	.08
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.06
	Dox 05.0 vs SP1000+Dox 05.0	.78
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.81
6	Normal vs SP1000	.46
	Normal vs Doxo5.0	.87
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.65
	Normal vs Doxo10.0	.12
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.05 -
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.73
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.67
9	Normal vs SP1000	.75
	Normal vs Doxo5.0	.85
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.65
	Normal vs Doxo10.0	.35
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.29
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.69
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.88.
14	Normal vs SP1000	.66
	Normal vs Doxo5.0	.11
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.21
	Normal vs Doxo10.0	.36
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.72
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.69
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.51
22	Normal vs SP1000	.52
	Normal vs Doxo5.0	.57
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.90
	Normal vs Doxo10.0	.97
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.76
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.62
	Daniel 10 0 CD1000 D 10 0	10

Jour	Comparaison	Transfo2E5 ConA	Transfo1E5 ConA	Transfo5E4 ConA	Trans2.5E4 Con.
	N. A Chica				
3	Normal vs SP1000	.74	.22	.19	.92
	Normal vs Doxo5.0	.55	.73	.74	.38
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.77	.30	.25	.99
	Normal vs Doxo10.0	.59	.16	.07	.77
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.37	.12	.38	.81
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.38	.25	.28	.44
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.71	.74	.68	.67
6	Normal vs SP1000	.81	.89	.82	.38
	Normal vs Doxo5.0	.40	.07	.25	.08
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.75	.31	.37	.17
	Normal vs Doxo10.0	.84	.06	.13	.08
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.76	.09	.17	.12
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.60	.33	.74	.54
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.91	.86	.84	.61
		•			
9	Normal vs SP1000	.91	.81	.23	.28
	Normal vs Doxo5.0	.75	.49	.89	.81
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.70	.29	.16	.17
	Normal vs Doxo10.0	.96	.33	.14	.19
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.83	.36	.19	.23
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.50	1.0	.14	.20
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.87	.80	.94	.87
14	Named on CD1000	0.5		26	40
14	Normal vs SP1000	.95	.45	.26	.40
	Normal vs Doxo5.0	.81	.14	.04 -	.19
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.92	.21	.31	.87
	Normal vs Doxo10.0	.75	.16	.18	.97
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.64	.31	.14	.70
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.75	.99	.46	.15
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.92	.69	.92	.63
22	Normal vs SP1000	.76	.83	.71	.87
	Normal vs Doxo5.0	.62	.98	.51	.55
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.61	.53	.59	.09
	Normal vs Doxo10.0	,55	.59	.81	.15
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.25	.97	.55	.48
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.97	.56	.34	.36
	DONOS, O TE OF TOUR DONOS, O	.71	,50	1.77	, , , ,

Jour	Comparaison	Transfo2E5 LPS	TransfolE5 LPS	Transfo5E4 LPS	Trans2.5E4 LPS	Tran1.25E4 LP
	Named or CD1000	70			70	24
3	Normal vs SP1000	.72	.26	.83	.72	.74
	Normal vs Doxo5.0	.85	.74	.66	.41	.88
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.93	.85	.62	.42	.30
	Normal vs Doxo10.0	.73	.49	.42	.16	.18
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.30	.39	.27	.19	.17
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.89	.93	.94	.92	.26
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.51	.92	.60	.79	.83
6	Normal vs SP1000	.42	.43	.94	.59	.78
	Normal vs Doxo5.0	.72	.71	.72	.71	.74
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.64	.79	.93	.79	.32
	Normal vs Doxo10.0	.81	.88	.57	.59	.28
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.91	.90	.72	.49	.94
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.83	.95	.78	.85	.47
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.93	.82	.88	.90	.39
9	Normal vs SP1000	.85	.65	.67	.41	
	Normal vs Doxo5.0	.97	.25	.14	.13	
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.61	.31	.18	.17	
	Normal vs Doxo10.0	.30	.45	.06	.12	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.54	.49	.23	.17	
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.57	.98	.89	.82	
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.70	.86	.68	.95	
14	Normal vs SP1000	.98	.83	.93	.97	
. •	Normal vs Doxo5.0	.98	.79	.62	.49	
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.73	.48	.97	.83	
	Normal vs Doxo10.0	.62	.99	.94	.93	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.59	.88	.69		
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.71	.67	.70	.62	
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.97	.87	• • • •	.45	
	D0x010.0 V8 SF1000+D0x010.0	.97	.87	.76	.69	
2	Normal vs SP1000	.85	.79	.96	1.0	
	Normal vs Doxo5.0	.92	1.0	.97	.64	
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.97	.86	.87	.99	
	Normal vs Doxo10.0	.68	.55	.73	.69	
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.70	.37	.77	.65	- T. T.
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.96	.88	.85	.73	

Compasion Diec War lemplace Day

our	Comparaison	Tc10:1	Tc5:1	Tc2.5:1	Tc1.25:1	U.L.50	%normale
3	Normal vs SP1000	.60	.65	.56	.44	.60	
	Normal vs Doxo5.0	.32	.62	.73	1.0	.69	.19
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.58	.72	.69	.70	.57	.09
	Normal vs Doxo10.0	.56	.51	.49	.49	.56	.57
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.36	.31	.27	.25	.30	.73
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.83	.94	.92	.71	.80	.76
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.79	.85	.79	.78	.69	.98
6	Normal vs SP1000	.67	.65	.47	.64	.91	
	Normal vs Doxo5.0	.97	.97	.74	.82	.71	.98
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.17	.22	.29	.31	.31	.19
	Normal vs Doxo10.0	.007 b	.02 ₺	.004 ₺	.02 &	.005 🕹	.05
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.59	.99	.66	.90	.95	.84
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.20	.24	.27	.28	.27	.14
	Dox 010.0 vs SP1000+Dox 010.0	.13	.08	.10	.07	.11	.08
9	Normal vs SP1000	.52	.29	.30	.36	.54	
	Normal vs Doxo5.0	.87	.32	.42	.29	.64	.86
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.59	.95	.82	.99	.90	.69
	Normal vs Doxo10.0	.29	.32	.79	.84	.99	.94
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.36	.30	.71	.81	.72	.71
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.32	.18	.24	.26	.37	.81
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.88	.87	.92	.96	.76	.67
14	Normal vs SP1000	.83	.61	.55	.75	.73	
	Normal vs Doxo5.0	.96	.84	.79	.87	.98	.97
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.09	.09	.05 -	.13	.14	.80
	Normal vs Doxo10.0	.27	.19	.14	.22	.24	.98
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.94	.73	.81	.98	.91	.88
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.30	.28	.35	.38	.29	.80
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.50	.50	.47	.41	.48	.88
22	Normal vs SP1000	.64	.64	.51	.46	.50	
	Normal vs Doxo5.0	.12	.16	.21	.19	.21	.72
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.21	.23	.25	.25	.24	.67
	Normal vs Doxo10.0	.31	.36	.40	.25	.38	.93
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.25	.25	.32	.16	.27	.64
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.55	.64	.81	.75	.73	1.0
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.91	.87	.91	.69	.71	.71

1

compasion sec

Jour	Comparaison	LAK25:1	LAK12:1	LAK6:1	LAK3:1	U.L.30	%normal
	Name to CD1000					••	
3	Normal vs SP1000	.68	.23	.07	.26	.19	-
	Normal vs Doxo5.0	.50	.58	.81	.79	.86	.44
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.64	.38	.88	.95	.27	.74
	Normal vs Doxo10.0	.31	.33	.33	.15	.22	.15
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.50	.10	.11	.30	.06	.03.
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.77	.76	.90	.65	.30	.68
	Dox 010.0 vs SP1000+Dox 010.0	.76	.52	.70	.58	.73	.99
6	Normal vs SP1000	.62	.79	.62	.57	.61	
	Normal vs Doxo5.0	.35	.42	.51	.37	.31	.58
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.61	.96	.91	.82	.95	.68
	Normal vs Doxo10.0	.35	.54	.65	.48	.38	.88
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.88	.95	.72	.87	.79	.53
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.75	.56	.59	.60	.47	.36
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.13	.08	.82	.21	.15	.70
9	Normal vs SP1000	.95	.70	.69	.45	.74	
	Normal vs Doxo5.0	.19	.17	.55	.98	.10	.10
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.03	.01	.40	.56	.01 ♦	.20
	Normal vs Doxo10.0	.34	.48	.95	.46	.49	.42
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.37	.45	.67	.82	.60	.64
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.98	.71	.93	.53	.79	.56
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.72	.74	.72	.47	.91	.97
4	Normal vs SP1000	.99	.98	.97	1.0	.93	
•	Normal vs Doxo5.0	.90	.82	.83	.77	.41	.70
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.63	.71	.66	.66	.37	.67
	Normal vs Doxo10.0	.78	.78	.78	.76	.58	.79
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.90	.83	.79	.75	.65	.78
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.65	.83	.75	.83	.81	.93
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.87	.97	.98	.96	.95	.96
2	Normal vs SP1000	.34	.22	.21	.27	.38	
-	Normal vs Doxo5.0	.94	.66	.46	.56	.94	.94
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.77	.46	.25	.56	.78	.70
	Normal vs Doxo10.0	.92	.66	.51	.87	.83	.70
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.41	.31	.28	,34	.35	.52
	Doxo5,0 vs SP1000+Doxo5.0						
		.84	.70	.55	.90	.84	.83
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.40	.38	.34	.36	.34	,28

,

continued offer r

						100	
Jour	Comparaison	IL-2 50 141	IL-2 25 til	IL-2 1241	II-2 6 W	unité	%normal
•	No CD1000		60	70	47	.59	
3	Normal vs SP1000 Normal vs Doxo5.0	.65 .97	.68 .94	.78 .77	.67	.95	.26
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.98	1.0	.56	.01	.96	.05 €
	Normal vs Doxo10.0	.26	.30	.09	.02	.19	.03 4
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.24	.31	.11	.003	.17	.02
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.95	.94	.65	.18	.92	26
	Dox 010.0 vs SP1000+Dox 010.0	.82	.71	.50	.70	.84	.88
	N	•		04		00	
6	Normal vs SP1000	.95	.80	.86	.29	.98	•
	Normal vs Doxo5.0	.42	.19	.15	.52	.30	.22
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.38	.44	.44	.62	.41	.42
	Normal vs Doxo10.0	.63	.73	.91	.24	.66	.79
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.78	.88	.39	.19	.50	.50
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.50	.67	.56	.44	.57	.59
	Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.55	.70	.66	.25	.45	.44
-		0.1					
9	Normal vs SP1000	.82	.81	.95	.47	.75	07
	Normal vs Doxo5.0	.40	.54	.38	.63	.33	.07
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.77	.96	.97	.13	.75	.19 .15
	Normal vs Doxo10.0	.66	.92	.81	.40	.62 .73	.15
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.76	.51	.61	.14		
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0 Doxo10.0 vs SP1000+Doxo10.0	.57 .48	.60 .47	.36 .40	.21 .31	.50 .43	.13 .23
14	Normal vs SP1000	.20	.56	.99	.74	.80	-
	Normal vs Doxo5.0	.38	.41	.70	.62	.88	.63
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.10	.39	.69	.64	.76	.18
	Normal vs Doxo10.0	.38	.97	.89	.51	.85	.27
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.89	.86	.91	.98	.94	.59
	Doxo5.0 vs SP1000+Doxo5.0	.20	.80	.99	.83	.88	.20
	Dox 010.0 vs SP1000+Dox 010.0	.57	.88	.66	.52	.80	.71
22	Normal vs SP1000	.91	.84	.80	.59	.97	
to to	Normal vs Doxo5.0	.58	.66	.69	.87	.60	.58
	Normal vs SP1000+Doxo5.0	.76	.66	.85	.31	.80	.87
	Normal vs Doxo10.0	.94	.82	.96	.42	.90	.55
	Normal vs SP1000+Doxo10.0	.47	.47	.34	.18	.42	.28
	Dox 05.0 vs SP1000+Dox 05.0	.81	1.0	.82	.26	.79	.62
	Dox 010.0 vs SP1000+Dox 010.0	.59	.68	48	81	60	20

ANNEXE B

Communications

A new anti-neoplastic formulation: immuno- and myelotoxicity studies of doxorubicin/pluronic L61 in a mouse model.

12^{ième} Réunion de la Société Canadienne d'immunologie (SCI), Sainte Adèle, Québec, 13 au 16 mars 1998.