

M.A. Schwaller ¹
 J. Aubard ¹
 F. Sureau ²
 G. Dodin ¹
 M.F. Ruasse ¹
 R. Leverge ³
 M.F. Poupon ⁴
 F. Moreau ⁵

Transferts de protons impliqués dans l'accumulation intracellulaire de molécules antitumorales

L'ellipticine est choisie comme modèle d'étude des transferts de protons impliqués dans l'accumulation intracellulaire d'un certain nombre de molécules antitumorales. In vitro, son pK de protonation apparent est profondément affecté lors de son interaction avec divers milieux hydrophobes organisés tels que l'ADN et les membranes. In vivo, les accumulations intracellulaires et intramitochondriales de l'ellipticine sont principalement contrôlées par les différences de potentiel transmembranaire et les pH locaux. Ce mécanisme d'accumulation électrochimique peut être modulé grâce à l'emploi de vecteurs anioniques hydrophobes.

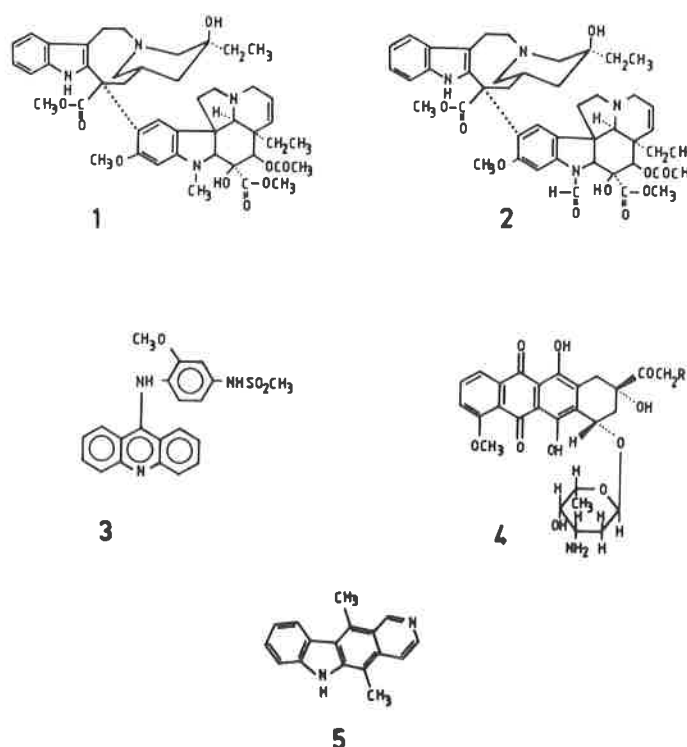
Introduction

Un certain nombre de molécules antitumorales (figure 1), telles que la vinblastine ou la vincristine, les anthracyclines (daunomycine et adriamycine), les acridines (amsacrine) ou les ellipticines, présentent un atome d'azote faiblement basique dont le pK de protonation est compris entre 7 et 8,5.

Dans les milieux biologiques, dont le pH est voisin de la neutralité, ces molécules peuvent, a priori, exister, en équilibre, sous deux formes, neutre et protonée. L'équilibre de protonation est cependant susceptible d'être déplacé lorsque ces molécules interagissent avec les macromolécules biologiques [1], lors de leurs passages transmembranaires ou lors de leurs accumulations dans des compartiments présentant un pH local spécifique. Nous présentons ici quelques travaux relatifs aux changements d'états de protonation de ces molécules mis en jeux lors de leurs interactions avec les systèmes biologiques.

L'ellipticine a été choisie comme modèle pour deux raisons. D'une part, la valeur de son pK de protonation, 7,4, est idéale et, d'autre part, son azote protonable étant intracyclique, ses deux états de protonation présentent des propriétés spectrales caractéristiques autorisant une détermination spectroscopique directe de son état de protonation "in vivo".

FIGURE 1. - Vinblastine (1), Vincristine (2), Amsacrine (3), Daunomycine (4, R = H), Adriamycine (4, R = OH), Ellipticine (5).



¹ Institut de Topologie et Dynamique des Systèmes, université Paris 7, CNRS URA 34, 1, rue Guy de la Brosse, 75005 Paris.

² Laboratoire de physique et chimie biomoléculaire, CNRS URA 198, Institut Curie, 11, rue P. et M. Curie, 75005 Paris.

³ Laboratoire de pharmacie galénique de biopharmacie, université de Rennes 1, UER du médicament, 2, avenue du Pr Léon Bernard, 35033 Rennes Cedex.

⁴ Laboratoire de biologie des métastases, CNRS UPR6, Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Boîte Postale 8, 94800 Villejuif.

⁵ Laboratoire de physiologie végétale, université Paris 6, CNRS URA 1180, 12, rue Cuvier, 75005 Paris.

I. Les modèles *in vitro*

I-1. Pouvoir dissociant et pK intrinsèque

La forme neutre de l'ellipticine absorbe à 290 nm et fluoresce dans le bleu à 430 nm alors que la forme protonée présente une bande d'absorption à 310 nm et une bande d'émission dans le vert à 520 nm (figure 2). L'étude de la variation du spectre d'absorption ou d'émission de l'ellipticine avec le pH, en solution aqueuse, permet la détermination de son pK de protonation intrinsèque (pK_i) qui est égal à 7,4 (figure 2 A et B).

Lorsque l'ellipticine est liée à des milieux hydrophobes neutres comme les micelles de triton ou les liposomes de dimirystoylphosphatidyl choline (DMPC), son pK intrinsèque est de l'ordre de 6 (tableau I). Cet abaissement de pK résulte du faible pouvoir dissociant de ces milieux par rapport à l'eau [2]. Il est ainsi possible de reproduire le même abaissement apparent de pK de l'ellipticine en solution dans les mélanges dioxane/eau.

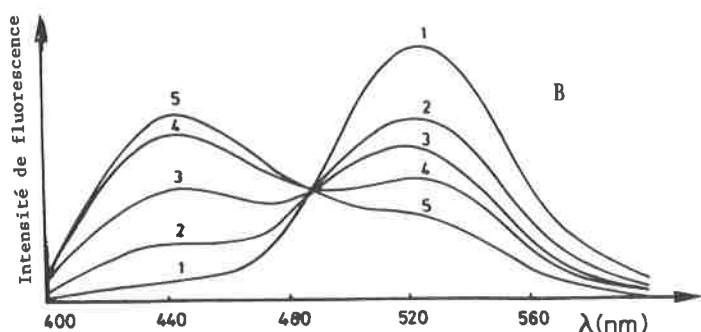
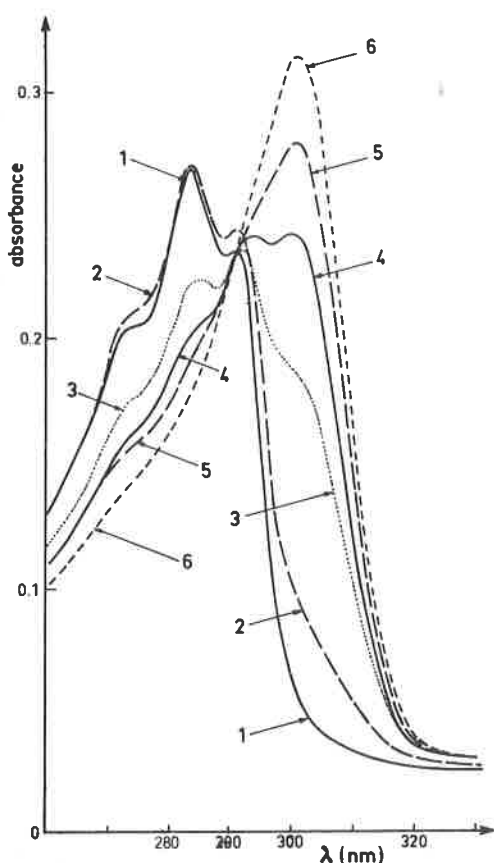


FIGURE 2. - (A) Variation du spectre d'absorption d'une solution aqueuse d'ellipticine (3 μM) avec le pH : (1) pH 9, (2) pH 8, (3) pH 7,42, (4) pH 7, (5) pH 6, (6) pH 5. (B) Variation du spectre d'émission d'une solution aqueuse d'ellipticine (1 μM) avec le pH : (1) pH 6, (2) pH 7,4, (3) pH 8, (4) pH 11,2, (5) pH 12,2.

TABLEAU I. - pK apparent de l'ellipticine fixée à différentes macromolécules.

	Charge	pK apparent
Micelles SDS	-	9,4
Liposomes DMPG	-	9,2
ADN	-	9,1
H ₂ O	0	7,4
Micelles triton	0	6,1
Liposomes DMPC	0	6,2
Micelles DTAB	+	5
Micelles CTAB	+	4,9

I-2. Effet électrostatique et pK apparent

Dans les milieux hydrophobes cationiques, tels que les micelles de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) ou les liposomes de DOTMA, le pK apparent de l'ellipticine est de l'ordre de 4,5-5 (tableau I).

Au contraire, lorsque la molécule d'ellipticine est intercalée dans des milieux anioniques tels que l'ADN, les micelles de SDS ou les liposomes de dimirystoylphosphatidylglycérol (DMPG), son pK apparent est fortement augmenté, atteignant des valeurs de l'ordre de 9 (tableau I).

Au niveau des milieux chargés, ces pKs apparents varient linéairement en fonction de la concentration du milieu en contre-ion [1], ce qui implique un effet électrostatique.

En effet, l'activité en ion hydrogène à l'interface varie avec le potentiel électrique interfacial selon la loi de Boltzmann :

$$(H^+)_{\text{interface}} = (H^+)_{\text{solution}} e^{-F\psi/RT}$$

dans laquelle F est la constante de Faraday, ψ le potentiel interfacial, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue. Cette modification interfaciale de l'activité en ion hydrogène implique une variation du pK apparent selon :

$$pK_{\text{apparent}} - pK_{\text{intrinsèque}} = -F\psi/2,3 RT$$

II. Etude directe "in vivo" au niveau cellulaire

Les études de modélisation *in vitro* ont été poursuivies par des travaux sur l'état de protonation de l'ellipticine *in vivo*, c'est-à-dire à l'échelle des différents compartiments d'une cellule vivante isolée. Ces études ont été entreprises grâce à la technique récente de microspectrofluorimétrie *in vivo* [3,4] qui permet la détermination du spectre de fluorescence des molécules contenues dans un microvolume cellulaire (figure 3). Cette technique présente un certain nombre d'avantages. Il s'agit d'une méthode directe (ce qui évite une éventuelle redistribution entre les différents compartiments cellulaires), non destructive (des temps d'irradiation lumineuse très brefs permettent d'opérer dans des conditions subléthales) et extrêmement sensible (jusqu'à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans le cas de l'ellipticine).

Lorsque l'analyse porte sur le noyau cellulaire (figure 4), le spectre d'émission ne comporte que la bande verte à 530 nm qui caractérise la forme protonée, intercalée dans l'ADN. Ce résultat est conforme à la valeur élevée du pK apparent obtenue *in vitro* en présence d'ADN (tableau I).

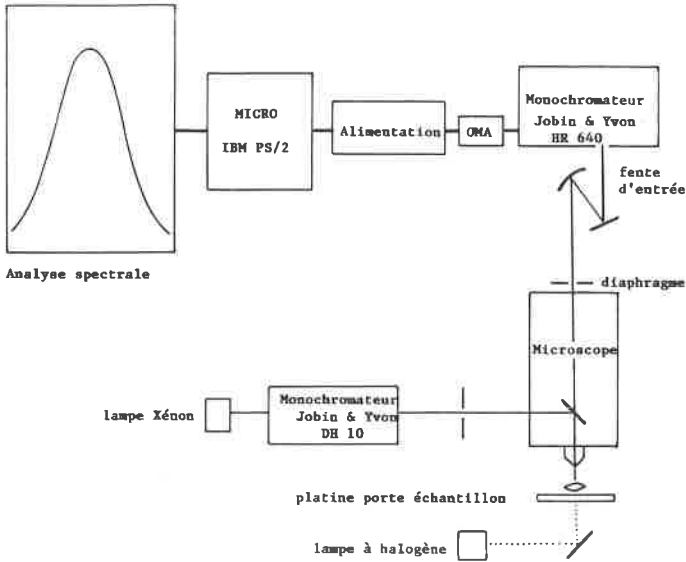


FIGURE 3. - Représentation schématique d'une installation de microspectrofluorimétrie.

III. Etude au niveau subcellulaire, les mitochondries

L'ellipticine [5], les anthracyclines [6] et les acridines [7] s'accumulent au niveau mitochondrial vis-à-vis duquel elles présentent une certaine toxicité. Ces observations nous ont conduits à étudier plus en détail le mécanisme d'accumulation de l'ellipticine dans les mitochondries.

Ces organites, spécialisés dans la production énergétique de la cellule, présentent une double membrane (figure 5). La membrane externe joue un rôle essentiellement structural alors que la membrane interne présente un rôle métabolique fondamental, car elle renferme les protéines de la chaîne respiratoire. L'énergie libérée lors de l'oxydation des substrats réduits par la chaîne respiratoire est utilisée pour la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) par une autre enzyme, l'ATP synthétase. Le couplage entre la libération d'énergie (oxydation des substrats réduits par la chaîne respiratoire) et la mise en réserve de cette énergie (synthèse d'ATP) a longtemps été l'objet de controverses jusqu'à ce que l'hypothèse du couplage chimio-osmotique, défendue par Mitchell, finisse par s'imposer [8]. Selon la théorie de Mitchell, le couplage est lié à l'existence d'un gradient électrochimique entre la face interne et la face externe de la membrane mitochondriale. Ce gradient électrochimique résulte d'une différence de potentiel transmembranaire (c'est-à-dire une différence de distribution de charges électriques, orientées négativement vers l'intérieur) et d'une différence de pH (l'intérieur étant plus alcalin que l'extérieur). Lorsque les mitochondries sont fonctionnelles, le gradient électrochimique global (environ 220 mV) se répartit en une différence de potentiel (environ 160 mV) et une différence de pH (1,2 unité pH, soit environ 60 mV).

La figure 6 représente l'évolution du spectre d'émission de l'ellipticine fixée à des mitochondries entre l'état de repos et l'état énergisé (l'état énergisé étant obtenu par l'addition d'un substrat réduit, le succinate). Lors du démarrage de l'activité mitochondriale, la proportion de forme neutre augmente au détriment de

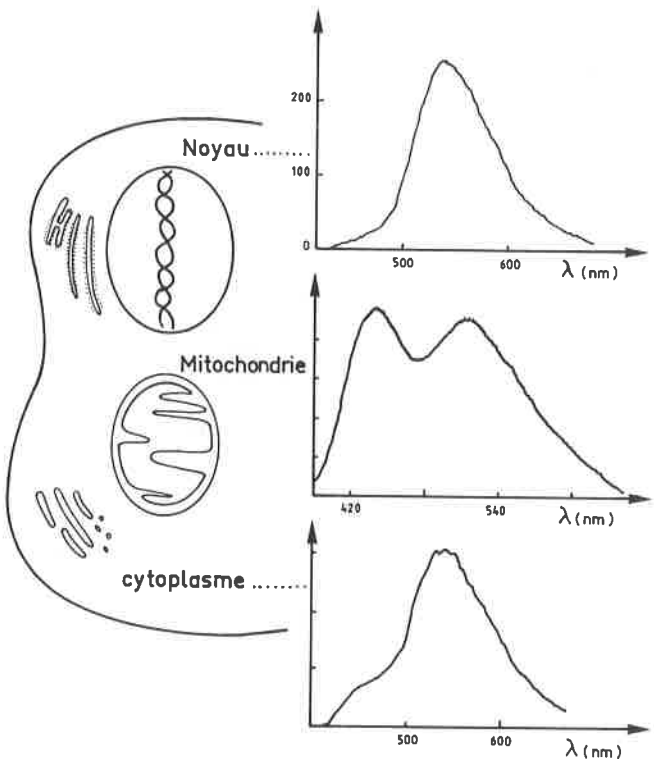


FIGURE 4. - Représentation simplifiée de l'architecture mitochondriale et du gradient électrochimique de la membrane interne.

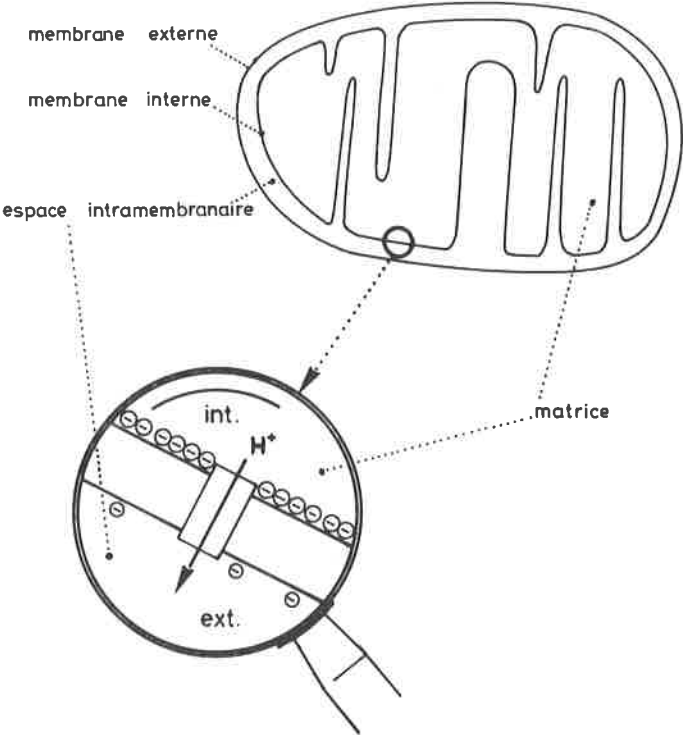


FIGURE 5. - Spectres d'émission de l'ellipticine (0,1 μM) obtenus lors de l'analyse de trois compartiments intracellulaires d'une cellule leucémique humaine K562.

Au niveau du cytoplasme, le spectre s'enrichit d'un épaulement centré à 430 nm qui correspond à la fraction neutre de l'ellipticine libre dans le cytoplasme (pK de l'ordre de 7). Lorsque l'analyse porte sur certains organites cytoplasmiques, tels que les mitochondries, la proportion de forme neutre devient nettement plus importante, ce qui suggère que l'ellipticine s'accumule principalement sous forme neutre dans ces organites.

la forme protonée. Le pH analytique étant maintenu rigoureusement constant grâce au tampon présent dans la suspension, l'ellipticine détecte la variation de pH du compartiment intramitochondrial. Lorsque l'on ajoute un agent découplant, c'est-à-dire un transporteur de protons susceptible d'équilibrer les pH intra et extra mitochondriaux, un retour aux conditions initiales est observé (figure 6). L'évaluation des rapports d'intensité de fluorescence à 430 et 530 nm, avant et après énergisation, permet d'estimer une variation de pH de 1,2 unité pH, en parfait accord avec les prévisions de la théorie du couplage chimio-osmotique.

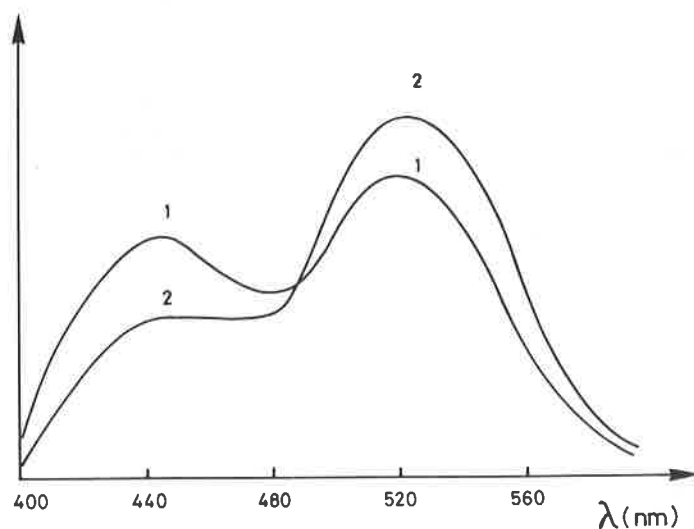


FIGURE 6. - Spectre d'émission de fluorescence de l'ellipticine (0,5 µM) en présence d'une suspension de mitochondries de foie de rat purifiées (0,1 mg/ml). Les états énergisés (1) et découplés (2) sont successivement obtenus par addition de succinate puis de valinomycine.

IV. Modèle électrochimique d'accumulation

IV-1. Accumulation intramitochondriale

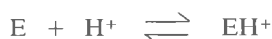
Les résultats obtenus ci-dessus suggèrent que l'ellipticine se comporte comme une sonde de pH spécifique du compartiment mitochondrial interne, ce qui implique une accumulation de la molécule du côté interne de la membrane.

Cette accumulation est liée à la seconde composante du gradient électrochimique, la différence de potentiel transmembranaire. En effet, lorsque l'on annule la différence de potentiel (ddp) transmembranaire par addition d'un agent ionophore tel que la valinomycine (ionophore sélectif des ions K⁺), l'ellipticine perd ses propriétés d'accumulation intramitochondriale et, du même coup, ses propriétés de sonde spécifique du pH interne. L'accumulation apparaît ainsi contrôlée par la ddp transmembranaire de la membrane interne. En effet, la ddp transmembranaire crée, du fait de la très faible épaisseur de la membrane, un champ électrique local de l'ordre de 400 000 volts par cm qui entraîne une électrophorèse de la forme protonée (cationique) vers l'intérieur.

Au niveau de la membrane mitochondriale interne, l'ellipticine est soumise à deux équilibres.

- Le premier équilibre, chimique, correspond à l'équilibre de protonation au niveau de la membrane interne où le pK apparent

de l'ellipticine est égal à 7,2 :



$$pK = pH + \text{Log} \frac{(E)}{(EH^+)}$$

- Le second équilibre, physique, correspond à l'accumulation matricielle qui ne s'applique qu'à l'espèce protonée et est régi par la loi de Nernst :



$$(EH^+) \text{ int.} / (EH^+) \text{ ext.} = 10^{-\Delta\psi/nRT}$$

Si l'on admet que le facteur d'accumulation de l'espèce protonée est compris entre 10³ et 10⁴ (nRT = 59, Δψ compris entre 160 et 220 mV), l'équilibre de protonation se trouve déplacé d'un facteur équivalent, ce qui correspond à une élévation du pK apparent de l'ordre de trois à quatre unités.

Ainsi, en présence de membranes énergisées, l'équilibre de protonation est très fortement déplacé en faveur de l'espèce protonée qui, dans ces conditions, peut être considérée comme la forme de transport de l'ellipticine (figure 7).

Au niveau de la matrice, le pH étant plus alcalin d'environ 1,2 unité pH, l'équilibre de protonation est à nouveau déplacé en faveur de la forme neutre, qui peut ainsi être considérée comme la forme de stockage intramitochondriale (figure 7).

Si l'on effectue le bilan des protons mis en jeu dans ce mécanisme (figure 7), on s'aperçoit que l'ellipticine a transporté un proton de l'extérieur vers l'intérieur. Ainsi, ce mécanisme permet d'expliquer l'activité découplante de l'ellipticine [5].

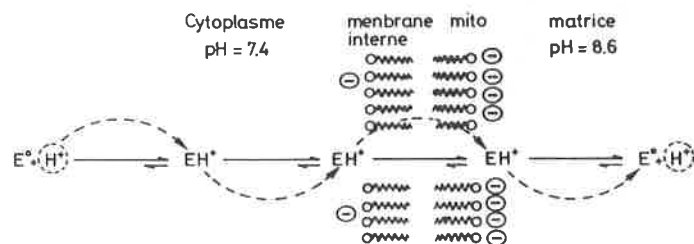


FIGURE 7. - Représentation schématique de l'accumulation électrophorétique au niveau de la membrane mitochondriale interne.

V-2. Accumulation intracellulaire

La membrane plasmique des cellules eucaryotes présente elle-même une ddp transmembranaire de l'ordre de 50 à 100 mV orientée négativement vers l'intérieur. Afin de tester l'éventuelle participation de cette ddp dans le processus d'accumulation intracellulaire, nous avons comparé les concentrations d'ellipticine dans le cytoplasme, avant et après dissipation du potentiel de la membrane plasmique. Lorsque la ddp transmembranaire de la membrane cellulaire est annulée, le taux d'accumulation intracellulaire de l'ellipticine est très diminué. Ainsi, l'accumulation intracellulaire apparaît être également contrôlée par un mécanisme électrochimique lié à la ddp transmembranaire de la membrane cellulaire (figure 8).

répartition intracellulaire est déplacée de la mitochondrie vers le compartiment nucléaire (figure 8).

Conclusion et perspectives

L'étude des états de protonation de l'ellipticine est considérablement facilitée par le fait que les deux formes de la molécule présentent des caractéristiques spectrales spécifiques. La molécule subit de multiples transferts de protons lors de son parcours intracellulaire. La connaissance de l'état de protonation de la molécule à l'intérieur des différents compartiments de la cellule permet de proposer un mécanisme électrochimique d'accumulation rendant compte de son activité découplante. Des transferts de protons assez similaires sont probablement mis en jeu lors de l'accumulation intracellulaire de nombreuses molécules d'intérêt pharmacologique présentant des propriétés basiques faibles, tels que les alcaloïdes.

Références

- [1] Dodin G., Pantigny J., Aubard J., Schwaller M.A., *Anti-Cancer Drug Design*, **1990**, 5, 129-134.
- [2] Fernandez M.S., Fromherz P., *J. Phys. Chem.*, **1977**, 18, 1755-1763.
- [3] Gigli M., Doglia S.M., Millot J.M., Valentini L., Manfait M., *Biochem. Biophys. Acta*, **1988**, 950, 13-20.
- [4] Sureau F., Chinsky L., Duquesne, Laigle A., Turpin P.-Y., Amirand C., Ballini J.P., Vigny P., *Eur. J. Biophys.*, **1990**, 18, 301-307.
- [5] Dupont J., Dodin G., Schwaller M.A., *Plant Science*, **1987**, 54, 109-115.
- [6] Porumb H., Petrescu I., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **1986**, 48, 103-128.
- [7] Baguley B.C., Ferguson L., *Biochem. Pharmacol.*, **1986**, 35, 4581-4584.
- [8] Nicols D.G., "Bioenergetics, an introduction to the chemi-osmotic theory", Academic Press, London, **1982**.
- [9] Un groupement d'équipes de recherches sur la réversion de la résistance aux médicaments anticancéreux vient d'être créé à l'initiative du département Chimie du CNRS.
- [10] Bradeley G., Juranka P.F., Ling V., *Biochem. Biophys. Acta*, **1988**, 948, 87-128.
- [11] Couvreur P., Roblot-Treupel L., Poupon M.F., Brasseur F., Puisieux F., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1990**, 5, 209-230.

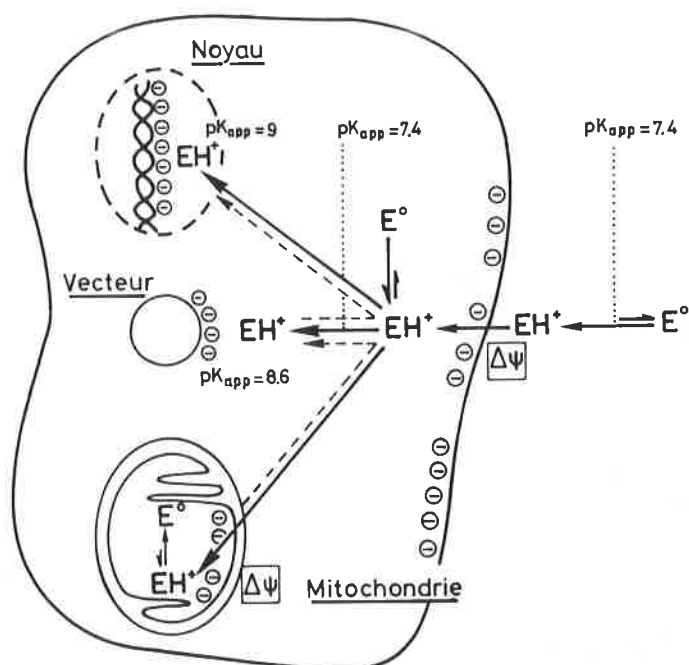


FIGURE 8. - Schéma général d'accumulation intracellulaire.

V. Exemple d'application, les cellules multirésistantes

Nous nous sommes récemment intéressés [9] au cas particulier des cellules résistant aux molécules antitumorales. Ces cellules présentent une diminution de leurs capacités d'accumulation des molécules antitumorales par rapport aux cellules sensibles [9]. L'une des voies utilisées pour tenter d'augmenter l'accumulation intracellulaire et de retrouver ainsi l'activité thérapeutique, consiste à coupler les molécules antitumorales à des vecteurs nanosphériques polycarboxyliques [9,10]. Nous avons pu montrer que l'ellipticine se fixe aux nanosphères sous forme protonnée ($pK_{app} = 8,5$) selon le rapport de 1 molécule fixée pour 2 carboxylates. Dans ces conditions, la charge cationique de l'ellipticine protonnée est neutralisée et la rétention intracellulaire devient indépendante des ddp transmembranaires, tant au niveau de la membrane cellulaire qu'au niveau de la membrane mitochondriale. L'accumulation intracellulaire s'effectue alors selon un processus non électrophorétique d'endocytose [11] et la