

ANNEE 2007

**ETUDE EXPERIMENTALE DE L'IMPLICATION DU  
GENE *Kit* DANS LA GENESE DES CONTRACTIONS  
UTERINES CHEZ LA SOURIS**

THESE

pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le

par

**Delphine NOËL**

Née le 6 décembre 1982 à Rouen (Seine-Maritime)

**Edouard REYES-GOMEZ**

Né le 20 avril 1981 à Saint-Hilaire-du-Harcouët (Manche)

JURY

Président : M.

Professeur à la faculté de Médecine de Créteil

Membres

Directeur : Mme Florence BERNEX

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : M. Laurent TIRET

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

## LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques

### DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

**Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur**

<p><b>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b> Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b> Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur</p> <p><b>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b> M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b> Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE DE BIOCHIMIE</b> M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain , Maître de conférences</p>	<p><b>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b> M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE VIROLOGIE</b> M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p><b>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES</b> M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p><b>-UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET CLINIQUE</b> M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Melle ABITBOL Marie, Maître de conférences</p> <p><b>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b> M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> <p><b>-DISCIPLINE : ANGLAIS</b> Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié</p>
---	--

### DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

**Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHELON Jean-Louis , Professeur**

<p><b>- UNITE DE MEDECINE</b> M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b> M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel M. PICCOT-CREZOLLET Cyrille, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b> Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Melle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle LEDOUX Dorothée, Maître de conférences Contractuel (rattaché au DPASP)</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b> M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mlle RAVARY Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE RADIOLOGIE</b> Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE D'OPHTALMOLOGIE</b> M. CLERC Bernard, Professeur* Melle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b> M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION</b> M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
---	---

### DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

**Chef du département : M.MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences**

<p><b>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b> M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ H0ANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b> M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : BIostatistiques</b> M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p><b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b> M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b> M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
--	--

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique Contractuel

\* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche

# Remerciements

---

## **A Monsieur le Professeur,**

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de notre Jury de Thèse.

Hommage respectueux.

## **A Madame le Docteur Florence Bernex,**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui nous a proposé de réaliser ce travail passionnant, nous a offert sa confiance et a fait preuve à notre égard d'une disponibilité, d'une patience et d'une gentillesse immenses : une aventure inoubliable.

Sincères remerciements.

## **A Monsieur le Docteur Laurent Tiret,**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté de participer à notre Jury de Thèse en tant qu'Assesseur,

Dont les conseils et les remarques ont été enrichissants et constructifs tout au long de ce travail.

Sincères remerciements.

## **A Monsieur le Professeur Jean-Jacques Panthier,**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour nous avoir accueillis au sein de son laboratoire et nous avoir offert sa confiance.

Sa gentillesse et son attention constantes ont été un soutien précieux.

Sincères remerciements.

## **A Monsieur Sébastien Allix,**

Pour le savoir-faire précieux, l'aide inestimable et la finesse scientifique qu'il nous aura apportés.

Nous n'oublierons jamais la complicité qui s'est tissée durant cette étude.

Sincères remerciements.

## **A tous les membres de l'UMR955 INRA-ENVA,**

Pour l'accueil chaleureux et les conseils qu'ils nous ont prodigués.

Sincères remerciements.

## **A tous les membres de l'unité d'Anatomie Pathologique de l'ENVA,**

Pour leur contribution précieuse à ces travaux.

Sincères remerciements.

# Remerciements (Delphine Noël)

---

## **A mes parents,**

*Vous avez toujours été présents et m'avez souvent soutenue au cours de mes études dans les bons comme dans les mauvais moments... Merci de tout cœur car sans votre aide et votre patience, je n'en serais pas là aujourd'hui.*

## **A Matt, mon petit frère adoré,**

*Nous avons partagé plein de supers moments depuis 20 ans et surtout depuis que nous sommes tous les deux étudiants, j'espère que notre complicité durera toujours.*

## **A mes grands parents,**

*Où que vous soyez, merci pour votre présence dans ma vie.*

## **A mon parrain, François,**

*Pour les moments passés ensemble et à cheval le plus souvent, merci Docteur.*

## **A ma cousine Anne-Cécile,**

*J'ai suivi tes traces de vétérinaire et je te souhaite tout le bonheur du monde dans ta nouvelle entreprise.*

## **A Juliette,**

*Pour notre amitié si précieuse et pour avoir été si souvent là pour moi.*

## **A mes chers et tendres Rouennais, Cha, Rozenn, Bob, Pitou, Nanou, Bitou, Milie, Jérôme et François,**

*Pour ces années d'amitié, ces souvenirs de vacances et de soirées inoubliables depuis le lycée.*

## **A mes poufs adorées, Aurélie, Christine, France, Lili et Julie,**

*Sans vous, mes années véto auraient été beaucoup moins roses et piapiapia... Et à Charly le plus pouf de tous les vétos.*

## **Aux autres vétos, Fanny, Matthias, mes enfants de clinique et Edouard bien sûr,**

*Pour tous les bons moments passés ensemble au Grisby ou en clinique.*

## **Aux Benoîts, à Benjamine, Aude, Greg, Cédric, Romain et autres mastères,**

*Pour ces derniers mois intensifs et délirants de vie étudiante.*

## **A Murphy et Mozart,**

*Les deux premières boules de poils qui m'ont poussée à devenir véto.*

## **A mes cousins, Mathilde et Frédéric**

# Remerciements (Edouard Reyes-Gomez)

---

A mon grand-père, Edouard, *pour toi,*

A ma grand-mère, Madeleine, *pour cette promesse aujourd'hui tenue,*

A mon oncle Louis, *sensationnel,*

A Abuelito, *pienso en ti en este dia,*

A mes parents et à ma sœur, Emilie,

A ma tante Yvonne,

A Abuelita,

A ma marraine, Brigitte,

A mon parrain, Jacques,

A ma tante, Michèle,

A tous les autres membres de ma famille, oncles, tantes, cousins, cousines, d'ici ou de là-bas,

A Aurélien,

A Marie,

A mon groupe de clinique, Adeline, Caroline, Clément, Fernando, Flore, Ingrid, Julien, Laetitia, Maeva, Marie, Matthias et Sarah,

A ma co-thésarde, Delphine,

A mes drôles de dames du DESV, Anne, Anne-Laure, Emmanuelle, Laura, Patricia, Typhaine,

A Benoît, Camille, Charles, Emeric, Fabien, Fabrice, Flavien, Gaël, Guillaume, Jérôme, Julien, Pierre-Olivier, Romain, Samy, Sébastien, Vivien...,

A mes professeurs qui ont marqué mes études,

A Helliott... A Lassie...

# Liste des abréviations couramment utilisées

---

<b>µg</b> : Microgramme	<b>LLA</b> : Leucémie lymphoblastique aiguë de l'adulte
<b>µm</b> : Micromètre	<b>LMC</b> : Leucémie myéloïde chronique
<b>µM</b> : Micromolaire ( $10^{-6}$ moles.L <sup>-1</sup> )	<b>M</b> : Molaire (mole.L <sup>-1</sup> )
<b>Ach</b> : Acétylcholine	<b>MCT</b> : Monocrotaline
<b>AMP<sub>c</sub></b> : Adénosine monophosphate cyclique	<b>mg</b> : Milligramme
<b>ARN<sub>m</sub></b> : Acide ribonucléique messager	<b>MLCK</b> : Myosin Light Chain Kinase
<b>ASC</b> : Aire sous la courbe	<b>mM</b> : Millimolaire ( $10^{-3}$ moles.L <sup>-1</sup> )
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>ms</b> : Milliseconde
<b>ATPase</b> : Enzyme d'hydrolyse de l'ATP	<b>NA</b> : Noradrénaline
<b>CGP57148</b> : Imatinib mésylate	<b>nls</b> : Signal de localisation nucléaire
<b>CI<sub>50</sub></b> : Concentration inhibitrice permettant une diminution de 50% de l'activité	<b>nM</b> : Nanomolaire ( $10^{-9}$ moles.L <sup>-1</sup> )
<b>c-kit</b> : Oncogène <i>Kit</i> cellulaire	<b>nm</b> : Nanomètre
<b>COX-2</b> : Cyclo-oxygénase 2	<b>NPY</b> : Neuropeptide Y
<b>Cpm</b> : Contractions par minute	<b>pb</b> : Paire de bases
<b>DAPI</b> : 4',6-diamidino-2-phénylindol	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline
<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor	<b>PDGF</b> : Platelet Derived Growth Factor
<b>EGF-R</b> : Epidermal Growth Factor Receptor	<b>PDGF-R</b> : Platelet Derived Growth Factor Receptor
<b>EHG</b> : Electro-hystérogramme	<b>PET</b> : Tonographie par émission de positrons
<b>EMG</b> : Electro-myogramme	<b>PFI</b> : Pression des fluides interstitiels
<b>ENVA</b> : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort	<b>PKI166</b> : Inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase de EGF-R
<b>FSH</b> : Hormone folliculo-stimulante	<b>PLC</b> : Phospholipase C
<b>GIST</b> : Tumeur stromale gastro-intestinale	<b>ROC</b> : Receptor Operated Channel
<b>GMP<sub>c</sub></b> : Guanine monophosphate cyclique	<b>SCF</b> : Stem Cell Factor
<b>GOG</b> : Gynecologic Oncology Group	<b>SCID</b> : Severe Combined Immune Deficiency
<b>HAP</b> : Hypertension artérielle pulmonaire	<b>SE</b> : Erreur standard
<b>HZ4-FeSV</b> : Hardy-Zucherman 4 Feline Sarcoma Virus	<b>SHE</b> : Syndrome hyper-éosinophilique
<b>ICC</b> : Cellules interstitielles de Cajal	<b>STI571</b> : Imatinib mésylate
<b>IP<sub>3</sub></b> : Inositol triphosphate	<b>VIP</b> : Vasoactive Intestinal Peptide
<b>IRM</b> : Imagerie par résonance magnétique	<b>VOC</b> : Voltage Operated Channel
<b>kb</b> : kilobase	
<b>kDa</b> : kiloDalton	
<b>LC 20</b> : Ligh Chain 20 de la myosine	
<b>LEC</b> : Leucémie éosinophilique chronique	
<b>LH</b> : Hormone lutéinisante	



**Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)**





# Table des matières

---

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
<b><u>PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b>ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE SEXUELLES DE LA SOURIS .....</b>	<b>7</b>
I - LE TRACTUS GENITAL FEMELLE DE LA SOURIS .....	7
A - Les oviductes.....	7
B - L'utérus.....	10
C - Le col.....	13
D - Le vagin.....	15
II - LE CYCLE SEXUEL DE LA SOURIS .....	16
A - Les phases du cycle sexuel.....	16
B - Les modifications du tractus génital au cours du cycle sexuel.....	18
<b>MOTRICITE DE L'UTERUS .....</b>	<b>19</b>
I - PHYSIOLOGIE DES MUSCLES LISSES.....	19
A - Types de muscles lisses.....	19
B - Structure des muscles lisses.....	20
C - Propriétés contractiles des muscles lisses.....	24
D - Régulation des contractions des muscles lisses.....	26
II - MOTRICITE DE L'UTERUS AU COURS DU CYCLE SEXUEL .....	28
A - Appréciation de la motricité utérine.....	28
B - Evolution de la motricité utérine au cours du cycle sexuel.....	30
<b>LE GENE <i>KIT</i> ET SA PROTEINE <i>KIT</i> .....</b>	<b>35</b>
I - STRUCTURE DU GENE <i>KIT</i> .....	35
II - STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DE LA PROTEINE <i>KIT</i> .....	35
III - LES MUTATIONS DU GENE <i>KIT</i> .....	37
IV - LE LIGAND DE <i>KIT</i> , LE SCF .....	41
<b>LES CELLULES INTERSTITIELLES DE CAJAL.....</b>	<b>43</b>
I - TOPOGRAPHIE ET ORGANISATION DES CELLULES INTERSTITIELLES DE CAJAL .....	43
II - MORPHOLOGIE DES CELLULES INTERSTITIELLES DE CAJAL .....	45
III - PHYSIOLOGIE DES CELLULES INTERSTITIELLES DE CAJAL .....	47
A - Genèse des ondes lentes.....	48
B - Spécialisation des ICC.....	52
<b>L'IMATINIB MESYLATE.....</b>	<b>55</b>
I - DEVELOPPEMENT DES THERAPIES MOLECULAIRES CIBLEES ET DECOUVERTE DE L'IMATINIB .....	55
II - PROPRIETES ET MECANISMES D'ACTION DE L'IMATINIB .....	57
A - Propriétés de l'Imatinib.....	57

<i>B - Mécanisme d'action de l'Imatinib</i> .....	61
III - UTILISATION DE L'IMATINIB EN MEDECINE HUMAINE .....	63
<i>A - Utilisation de l'Imatinib en cancérologie</i> .....	64
<i>B - Utilisation de l'Imatinib dans les autres disciplines médicales</i> .....	75
<b>DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL</b> .....	<b>81</b>
<b>PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS</b> .....	<b>83</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>85</b>
I - ANIMAUX .....	85
<i>A - Lignées et mutants</i> .....	85
<i>B - Ovariectomie</i> .....	85
<i>C - Euthanasie</i> .....	86
II - ETUDE DE L'ACTIVITE CONTRACTILE UTERINE .....	86
III - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE <i>KIT</i> PAR LE GENE RAPPORTEUR <i>LACZ</i> .....	88
<i>A - Etude macroscopique</i> .....	88
<i>B - Etude microscopique</i> .....	88
IV - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE <i>KIT</i> PAR IMMUNOMARQUAGE DE <i>KIT</i> .....	89
<i>A - Préparation des organes</i> .....	89
<i>B - Révélation de la protéine KIT</i> .....	89
V - EFFET PHARMACOLOGIQUE DE L'IMATINIB .....	90
VI - ETUDE MORPHOLOGIQUE COMPAREE DES UTERUS .....	90
VII - ANALYSE STATISTIQUE .....	91
<b>RESULTATS</b> .....	<b>93</b>
I - ETUDE COMPAREE DE L'ACTIVITE CONTRACTILE UTERINE .....	93
II - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE <i>KIT</i> PAR LE GENE RAPPORTEUR <i>LACZ</i> .....	95
<i>A - Observation macroscopique</i> .....	95
<i>B - Observation microscopique</i> .....	97
III - IMMUNOMARQUAGE DE <i>KIT</i> .....	99
IV - EFFET DE L'IMATINIB SUR LES CONTRACTIONS UTERINES .....	102
V - ETUDE MORPHOLOGIQUE COMPAREE DES UTERUS .....	105
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>107</b>
I - CONTRACTILITE UTERINE ET ICC .....	107
II - ETUDE DE LA SOURIS PRM/ALF .....	109
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>113</b>

# Introduction

---

Les complications liées à la parturition ont amené médecins, vétérinaires, pharmaciens et biologistes à développer un arsenal thérapeutique visant à maîtriser les contractions utérines en agissant par antagonisme ou par mimétisme sur les différents facteurs, hormonaux ou non, connus pour les moduler. Les récentes découvertes en biologie moléculaire continuent d'ouvrir de nouvelles voies. En 2006, TYSON-CAPPER et EUROPE-FINNER ont ainsi proposé d'utiliser des morpholino-oligonucléotides antisens afin de bloquer l'expression de la protéine pro-inflammatoire et pro-kinétique COX-2<sup>1</sup>.

Cependant, le mécanisme à l'origine même des contractions utérines demeure mal connu. Les cellules interstitielles de Cajal (ICC), exprimant le gène *Kit* et à l'origine des contractions des muscles lisses intestinaux, constituent un type cellulaire candidat pour expliquer la genèse des contractions de l'utérus. La présence d'ICC a, de plus, été montrée dans d'autres tissus présentant une activité contractile comme l'urètre de la souris (PEZZONE et coll., 2003) ou la vessie de l'Homme (SHAFIK et coll., 2004). En revanche, dans le cas de l'utérus, les données sont contradictoires (CIONTEA et coll., 2005 ; DUQUETTE et coll., 2005 ; SHAFIK, EL-SIBAI et SHAFIK, 2004).

Outre l'intérêt purement physiologique et histologique d'identifier les cellules à l'origine des contractions utérines, une telle découverte ouvrirait de nouvelles voies thérapeutiques indiquées lors d'accouchements ou de dysménorrhées. Elle permettrait également de réévaluer la nature histologique de certaines tumeurs utérines avec pour conséquence le recours à un traitement plus adapté, à l'image de ce qui a été entrepris sur les tumeurs intestinales impliquant les ICC.

Dans ce travail expérimental, nous avons cherché à démontrer la présence d'ICC ou de cellules similaires, des cellules « ICC-like », dans le myomètre. Nous nous sommes basés sur les caractéristiques des ICC intestinales et notamment le fait qu'elles expriment le gène *Kit*. Déjà utilisée dans des expérimentations concernant les ICC, la lignée de souris 129S2/SvPa nous est apparue comme le meilleur modèle pour cette étude, d'autant plus que nous disposions dans cette lignée de mutants pour le gène *Kit*.

Nous avons souhaité tirer partie de ces travaux pour également étudier le phénotype de la lignée de souris PRM/Alf identifiée et entretenue à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA). Les individus de cette lignée présentent une dolichomégalie<sup>2</sup> intestinale et une

---

<sup>1</sup> Cyclo-oxygénase 2 : enzyme inductible impliquée dans la synthèse de prostaglandines.

<sup>2</sup> Augmentation de la longueur et du diamètre de viscères tubaires.

accélération du transit associée à une plus grande densité en ICC en région colique. Nous avons posé l'hypothèse que le tractus génital serait atteint également de dolichomégalie et sujet à une accélération des contractions, et réalisé des expériences pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Dans une première partie bibliographique, nous présenterons les caractéristiques histologiques et physiologiques de l'utérus de la souris. Nous exposerons également les propriétés générales des ICC intestinales, du gène *Kit* et de sa protéine KIT, ainsi que de l'Imatinib, un inhibiteur de KIT. Dans la seconde partie, nous détaillerons le travail expérimental sur l'utérus des souris. Ce travail a été entrepris sous la direction du Docteur Florence BERNEX entre septembre 2005 et juin 2006, dans l'unité mixte de recherche INRA-ENVA de Génétique Moléculaire et Cellulaire (UMR955-INRA) dirigée par le Professeur Jean-Jacques PANTHIER et localisée à l'ENVA.

**PREMIERE PARTIE :**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



# Anatomie et physiologie sexuelles de la souris

---

## I - LE TRACTUS GENITAL FEMELLE DE LA SOURIS

Le tractus génital femelle est composé de l'utérus en communication, d'une part avec deux oviductes par l'intermédiaire des cornes utérines, et d'autre part avec le vagin par l'intermédiaire du col utérin. La connaissance de la morphologie et de l'histologie de l'utérus est nécessaire pour une bonne compréhension de l'étude de la motricité utérine. Nous détaillerons aussi l'organisation des oviductes et du vagin, assez proche de celle de l'utérus. La **figure 1** illustre la morphologie et les rapports du tractus génital femelle de la souris.

### A - Les oviductes

Les oviductes, également appelés trompes de Fallope ou salpinx, constituent la partie initiale des voies génitales de la femelle. Leur structure glandulaire, ciliaire et contractile est sujette à des variations tout au long du cycle œstral.

#### 1) Anatomie

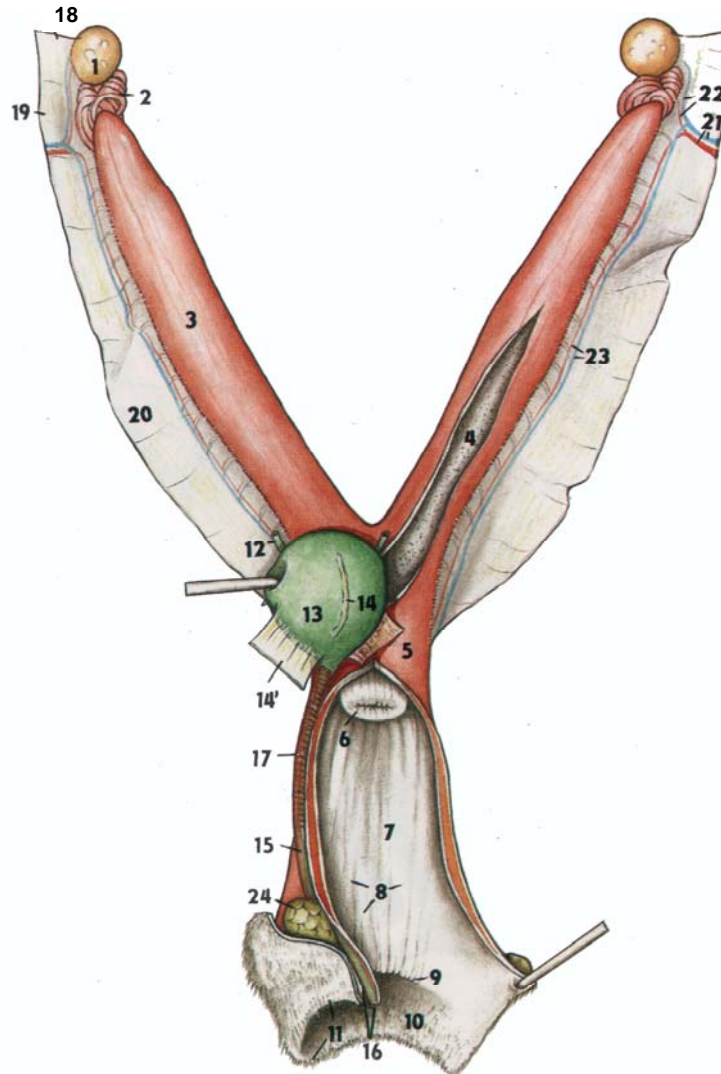
Les deux oviductes sont des structures tortueuses qui constituent des extensions de l'utérus vers la région ovarienne. Ils assurent la fécondation, le transport des gamètes mâles et, en cas de fécondation, celui de l'embryon dans sa phase de vie libre. Chaque oviducte comporte quatre segments anatomiques (VAISSAIRE, 1977) :

- un pavillon (ou pré-ampoule ou infundibulum), en forme d'entonnoir évasé et s'ouvrant par un orifice terminal (ou utérin) dans la capsule péri-ovarienne en regard de la zone germinative de l'ovaire ;
- une ampoule, portion légèrement dilatée ;
- un isthme, portion étroite et musculaire rejoignant l'utérus ;
- une portion intra-murale (ou interstitielle) s'ouvrant dans la cavité utérine par l'orifice terminal (ou utérin) qui forme une saillie entourée de replis de muqueuse déterminant une valvule s'opposant ainsi au retour dans la trompe.

#### 2) Histologie

La paroi de la trompe (ou paroi tubaire) comporte, comme l'utérus, trois couches concentriques qui sont, de la lumière vers la périphérie : une muqueuse, une musculuse et une séreuse.

Figure 1 : Tractus génital femelle de la souris (d'après POPESKO et coll., 1992)



Vue de la face ventrale : 1 : Ovaire ; 2 : Oviducte ; 3-6 : Utérus ; 3 : Corne utérine ; 4 : Cavité utérine ; 5 : Corps utérin ; 6 : Partie vaginale du col ; 7 : Fornix vaginal ; 8 : Crêtes vaginales ; 9 : Hymen ; 10 : Vestibule vaginal ; 11 : Vulve ; 12 : Uretère droit ; 13 : Vessie ; 14 : Ligament vésical médian (origine) ; 14' : Ligament vésical latéral (origine) ; 15 : Urètre ; 16 : Ostium urétral externe, clitoris ; 17 : Muscle urétral ; 18-20 : Ligament large de l'utérus ; 18 : Mésovarium ; 19 : Mésosalpinx ; 20 : Mésométrium ; 21 : Artère et veine ovarienne gauche ; 22 : Branche ovarienne de l'artère et de la veine ovarienne gauche ; 23 : Branche utérine de l'artère et de la veine ovarienne gauche ; 24 : Glande préputiale

### **α – Muqueuse**

La muqueuse est plissée et composée d'un épithélium cylindrique simple comportant des cellules ciliées et des cellules sécrétrices non ciliées en quantité relativement égale. L'épithélium ne forme pas de glandes qui s'étendent dans le chorion. Il se distingue ainsi nettement de la muqueuse utérine qui contient de nombreuses glandes tubulaires et qui, chez la souris, ne comporte pas de cellules ciliées (ROUSSEAU et MENEZO, 1991).

Les deux types de cellules, ciliées et sécrétrices, possèdent des microvillosités. Les cellules ciliées sont plus nombreuses dans la partie crâniale des oviductes où elles assistent les



mouvements des gamètes le long de la muqueuse. La ciliogenèse est stimulée par l'élévation des taux d'œstrogènes circulants. Les cellules sécrétrices se développent et grossissent sous l'influence de la progestérone. Leurs sécrétions permettent la capacitation des spermatozoïdes et la nutrition de l'œuf (BANKS, 1993).

Sous l'épithélium tubaire, le chorion est constitué d'un tissu conjonctif lâche richement vascularisé, avec de nombreux plasmocytes, mastocytes et polynucléaires éosinophiles. La muqueuse est très plissée dans les premières portions des oviductes. On peut observer des plis primaires, secondaires et tertiaires qui diminuent de l'ampoule jusqu'à l'isthme. Au niveau de la portion intra-murale, seuls quelques plis primaires persistent (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

### **β – Musculeuse**

La tunique musculaire est composée de deux couches de cellules musculaires lisses. La couche interne est circulaire, et la couche externe est composée de bandelettes longitudinales. Dans l'infundibulum et l'ampoule, la musculeuse est fine, composée d'une couche interne circulaire et de quelques bandes musculaires longitudinales externes. Au niveau de l'isthme, la couche interne circulaire est particulièrement développée et la couche externe forme une assise complète de cellules musculaires longitudinales (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; ROUSSEAU et MENEZO, 1991).

### **χ – Séreuse**

Cette tunique fibreuse est constituée d'un fin tissu conjonctif lâche recouvert par le mésothélium péritonéal. Elle contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques et des fibres nerveuses (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

### ***3) Vascularisation et innervation***

Les vaisseaux sanguins forment un plexus vasculaire dans le chorion de la muqueuse tubaire. Les vaisseaux lymphatiques ont un réseau drainant la muqueuse et la séreuse et se dirigent vers les nœuds lymphatiques lombaires.

Des fibres nerveuses myélinisées et non myélinisées sont présentes et ont de nombreuses ramifications dans le chorion. Elles sont principalement issues du système nerveux orthosympathique (PRIEDKALNS et LEISER, 1998). Des neurones noradrénergiques issus du nerf hypogastrique et des neurones noradrénergiques à axone court peptidergiques sont également présents. Les rôles respectifs de ces deux innervations sont

détaillés dans la partie consacrée à l'utérus (**Cf. Vascularisation et innervation, page 12 et tableau 1, page 13**).

## **B - L'utérus**

Par ses sécrétions et sa motricité, l'utérus est impliqué à la fois dans le transport des spermatozoïdes et/ou des ovules fécondés (ROUSSEAU et MENEZO, 1991), dans l'implantation et la croissance de l'embryon puis dans l'expulsion du fœtus à l'issue de son développement (VAISSAIRE, 1977).

### **1) Anatomie**

Sur le plan anatomique, l'utérus comporte trois parties :

- deux cornes utérines, dans lesquelles débouchent les oviductes,
- une cavité utérine,
- un col, fort épaississement de la paroi du conduit génital, qui sépare les cavités utérine et vaginale.

Selon le degré de fusion des canaux de Müller et le degré de développement du corps de l'utérus, la morphologie est très variable d'une espèce à l'autre (VAISSAIRE, 1977). On distingue ainsi trois formes anatomiques : l'utérus double, l'utérus bicornual ou l'utérus simple.

L'utérus de la souris est double car les deux cornes sont séparées sur presque toute leur longueur et elles ne fusionnent dans leur trajet postérieur qu'en un corps utérin court, qui communique avec le vagin par un seul orifice (ROUSSEAU et MENEZO, 1991).

### **2) Histologie**

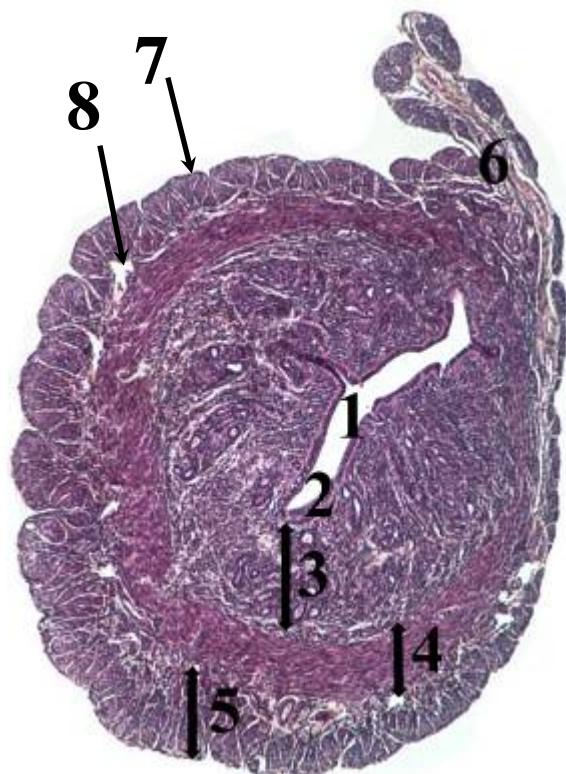
Les éléments de la structure générale de la paroi utérine sont similaires à ceux des autres viscères tubaires (BANKS, 1993). La paroi utérine comporte trois tuniques ainsi disposées de la lumière vers la périphérie : une muqueuse ou endomètre, une musculuse ou myomètre, et une séreuse. Ces trois tuniques ont une organisation similaire dans les différentes parties de l'utérus : les cornes, le corps et le col. La **figure 2** représente une coupe histologique transversale de corne utérine de souris.

#### **α – Muqueuse ou endomètre**

L'épithélium de surface est cylindrique, simple et constitué uniquement de cellules sécrétrices. Contrairement à d'autres espèces, les cellules ciliées sont absentes chez la souris (VAISSAIRE, 1977). La hauteur et la structure des cellules épithéliales varient selon la sécrétion des hormones ovariennes au cours du cycle.

Sous l'épithélium, le chorion comporte deux parties. La partie superficielle est très richement vascularisée. Elle contient de nombreux fibroblastes et des cellules inflammatoires variées : macrophages et mastocytes mais aussi polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes. A l'inverse, la partie la plus profonde du chorion est un tissu conjonctif lâche moins cellulaire (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

**Figure 2 : Coupe transversale d'une corne utérine de souris 129S2/SvPa stérilisée de 3 mois**



*Coloration à l'hémalum-éosine-safran, grossissement x 20. 1 : Lumière ; 2 : Epithélium utérin ; 3 : Chorion ; 2-3 : Endomètre ; 4-5 : Myomètre ; 4 : Couche musculaire circulaire ; 5 : Couche musculaire longitudinale ; 6 : Mésométrium ou ligament large ; 7 : Séreuse ; 8 : Couche vasculaire située entre les deux couches musculaires.*

L'endomètre est une muqueuse constituée de l'épithélium utérin et d'un chorion conjonctif vascularisé dans lequel s'invaginent les glandes utérines. L'insertion du mésométrium détermine le bord mésométrial. Le bord diamétralement opposé est le bord antimésométrial. Le diamètre de la corne utérine représentée ici est d'environ 4 mm. Il s'agit d'une corne utérine de souris 129S2/SvPa, le modèle de notre étude expérimentale.

Des expansions de l'épithélium de surface s'étendent dans le chorion et constituent les glandes tubulaires, plus ou moins ramifiées, de l'endomètre. Leur partie distale est plus ou moins contournée. Chez la souris, ces glandes sont distribuées de façon uniforme sur toute la longueur de la corne sauf sur la partie dorsale, en regard de l'insertion du ligament large (ou mésométrium) (VAISSAIRE, 1977). Les cellules sécrétrices produisent un mucus contenant des lipides, du glycogène et des protéines (BANKS, 1993).

L'élévation de la concentration en œstrogènes stimule la croissance et la ramification des glandes (hyperplasie glandulaire) mais la stimulation de la progestérone est nécessaire pour l'accentuation du contournement des glandes et pour une sécrétion abondante (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

### **β – Musculeuse ou myomètre**

Le myomètre est composé de deux couches concentriques de cellules musculaires lisses :

- une couche profonde interne, la plus épaisse, composée de fibres musculaires lisses circulaires qui sont particulièrement renforcées au niveau du col,
- une couche superficielle externe constituée de faisceaux de fibres musculaires lisses longitudinales qui augmentent en nombre et en taille au cours de la gestation.

Une couche vasculaire est intercalée entre ces deux couches musculaires. Elle comporte un important plexus vasculaire et lymphatique, des faisceaux de fibres élastiques et de fibres nerveuses (PRIEDKALNS et LEISER, 1998; VAISSAIRE, 1977).

### **χ – Séreuse**

Sa structure est identique à celle de la séreuse de l'oviducte. En revanche, elle comporte quelques cellules musculaires lisses et peut être considérée comme l'expansion des ligaments larges qui soutiennent l'utérus dans la cavité abdominale (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; VAISSAIRE, 1977).

### **3) Vascularisation et innervation**

Entre les couches interne et externe du myomètre, la couche vasculaire comporte de larges artères et veines et des vaisseaux lymphatiques. Ces vaisseaux assurent aussi l'approvisionnement de l'endomètre. De nombreux vaisseaux lymphatiques et sanguins sont présents dans la séreuse (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

L'utérus reçoit une innervation parasympathique (cholinergique) par le nerf pelvien et une innervation orthosympathique principalement par le nerf hypogastrique. L'innervation orthosympathique est la plus étudiée. Elle comprend :

- des neurones noradrénergiques dont le corps cellulaire est localisé dans les ganglions de la chaîne paravertébrale lombaire ou dans les ganglions mésentériques inférieurs et supérieurs, et dont l'ensemble des axones constitue le nerf hypogastrique ;
- des neurones noradrénergiques à axone court dont le corps cellulaire est situé à la périphérie, soit dans des amas ganglionnaires identifiables tels que le ganglion paracervical à la jonction du col et du vagin, soit au sein de plexus qui s'étalent dans la séreuse (ROUSSEAU et MENEZO, 1991).

Le rôle du système à axone court est encore hypothétique : des études montrent que la quantité ou la concentration de noradrénaline dans les tissus varie en fonction du statut hormonal. Ce système pourrait avoir un rôle d'intégration des informations nerveuses et endocriniennes (ROUSSEAU et MENEZO, 1991).

Ces neurones à axone court ne sont pas seulement noradrénergiques. Un grand nombre d'entre eux est peptidergique, synthétisant par exemple du VIP<sup>3</sup> et du neuropeptide Y (NPY) ayant un effet sur le muscle utérin ou tubaire, mais aussi sur la musculature vasculaire.

Ce système de neurones à axone court pourrait avoir un rôle dans l'adaptation du débit sanguin vers le myomètre (effecteur musculaire) et vers l'endomètre (effecteur sécréteur) au cours du cycle ovarien (ROUSSEAU et MENEZO, 1991). Le **tableau 1** résume les types d'innervation et de neurotransmetteurs rencontrés dans le tractus génital femelle.

**Tableau 1 : Répartition des différents types d'innervation dans le tractus génital (d'après ROUSSEAU et MENEZO, 1991)**

		NA	NPY	VIP	Ach
<b>Oviducte</b>	<i>V</i>	+		+	
	<i>M</i>	++	+	+	
	<i>E</i>			+	
<b>Utérus</b>	<i>V</i>	+	++	++	++
	<i>M</i>	+	+	++	++
	<i>E</i>	+		++	++
<b>Cervix</b>	<i>V</i>	++	++	+++	+++
	<i>M</i>	++	++	+++	+++
	<i>E</i>	++			
<b>Vagin</b>	<i>V</i>	++		+	
	<i>M</i>	++		+	
	<i>E</i>				

**V** = Muscle vasculaire ; **M** = Muscle non vasculaire ; **E** = Innervation sous épithéliale ; **NA** = Noradrénaline ; **NPY** = Neuropeptide Y ; **VIP** = Vasoactive Intestinal Peptide ; **Ach** = Acétylcholine

## C - Le col

Le principal rôle du col est de retenir le fœtus dans l'utérus mais il permet aussi son passage et son expulsion au cours du travail. Ensuite, il récupère rapidement ses fonctions de rétention (SHENNAN et JONES, 2004).

### 1) Anatomie

Le col de l'utérus (ou cervix) est une structure annulaire musculeuse très épaisse et riche en fibres élastiques qui sépare l'utérus du vagin. La muqueuse forme des plis primaires hauts ainsi que des plis secondaires et tertiaires. La présence de ces plis peut donner une fausse impression de structure glandulaire, mais les glandes utérines ne s'étendent pas au

<sup>3</sup> Vasoactive Intestinal Peptide

niveau du col. Les seules cellules sécrétrices présentes dans le col sont essentiellement des cellules mucipares (ROUSSEAU et MENEZO, 1991).

## **2) Histologie**

Le col comporte, comme l'utérus, trois couches concentriques qui sont, de la lumière vers la périphérie : une muqueuse, une musculuse et une séreuse.

Le col est néanmoins une structure essentiellement fibreuse et comprend seulement 10% de muscles lisses. Dans le stroma, le collagène assure la force de tension et, sous action hormonale, son taux diminue vers la fin de la gestation. Les autres constituants sont des fibres d'élastine, des protéoglycanes et des glycoprotéines (SHENNAN et JONES, 2004).

### **$\alpha$ – Muqueuse**

La muqueuse présente un épithélium cylindrique simple avec de nombreuses cellules mucipares, incluant quelques cellules caliciformes. Comme dans l'utérus, les cellules ciliées sont absentes chez la souris. Le chorion est constitué d'un tissu conjonctif dense et irrégulier (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

### **$\beta$ – Musculaire**

La musculuse du col est particulièrement développée. Elle comporte deux couches de fibres musculaires lisses : une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Les fibres élastiques prédominent dans la couche circulaire. La présence de fibres élastiques et musculaires est nécessaire au rétablissement de la structure du col suite à la parturition. Les couches musculaires du col sont en continuité d'une part avec celles de l'utérus et d'autre part avec celles du vagin (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

### **$\chi$ – Séreuse**

Sa structure est identique à celle des séreuses des oviductes et de l'utérus (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

## **3) Vascularisation et innervation**

La vascularisation du col est identique à celle de l'utérus et son innervation est récapitulée dans le **tableau 1**.

## **D - Le vagin**

### **1) Anatomie**

Le vagin est un tube musculaire qui s'étend du col au vestibule. La muqueuse présente des plis longitudinaux plats qui s'étendent sur toute la longueur du vagin (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

### **2) Histologie**

La structure histologique du vagin, comme celles des autres parties du tractus génital femelle, comporte une muqueuse, une musculuse et une séreuse.

#### **$\alpha$ – Muqueuse**

L'épithélium est de type pavimenteux pluristratifié kératinisé et desquamant. Il ne contient aucune structure glandulaire et son épaisseur varie au cours du cycle sexuel. Le chorion est un tissu conjonctif lâche. Des formations lymphoïdes annexées à la muqueuse sont présentes dans la partie caudale du vagin.

#### **$\beta$ – Musculeuse**

Elle comporte deux couches de fibres musculaires lisses. Une épaisse couche interne circulaire comporte des bandes de muscles lisses séparées par du tissu conjonctif. La couche externe est fine, longitudinale et composée uniquement de fibres musculaires lisses (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

#### **$\chi$ – Séreuse**

Elle est présente en partie crâniale et se poursuit caudalement par un adventice. Elle est constituée d'un tissu conjonctif lâche comportant de nombreux vaisseaux, nerfs et ganglions. Une fine couche externe est constituée par le prolongement de fibres musculaires lisses issues du ligament large (PRIEDKALNS et LEISER, 1998).

### **3) Vascularisation et innervation**

Des plexus veineux et lymphatiques très étendus sont présents dans la séreuse ou l'adventice et dans le tissu conjonctif reliant le vagin aux structures environnantes. De nombreux faisceaux nerveux et ganglions sont présents dans la séreuse ou l'adventice. L'innervation est principalement orthosympathique et dérivée du plexus pelvien. Le **tableau 1** récapitule l'innervation du vagin.

Les structures histologiques, mais aussi la vascularisation et l'innervation des oviductes, de l'utérus, du col et du vagin sont très proches. L'organisation et le fonctionnement de l'utérus sont cependant sujets à des modifications tout au long du cycle sexuel.

## **II - LE CYCLE SEXUEL DE LA SOURIS**

Au cours de la période d'activité génitale, le tractus génital femelle présente des modifications structurales se produisant toujours avec la même chronologie et revenant à intervalles périodiques, selon un rythme bien défini. Ces modifications macroscopiques, microscopiques et comportementales, connues sous le nom de cycle sexuel ou cycle œstral, apparaissent au moment de la puberté, se poursuivent tout au long de la vie et ne sont interrompues que par la gestation (BANKS, 1993).

### **A - Les phases du cycle sexuel**

La souris est une espèce à cycle sexuel continu : les cycles se succèdent toute l'année sans interruption. Le cycle sexuel est régulé par un rythme intrinsèque hypothalamo-hypophysaire-ovarien, modulé par des facteurs environnementaux et neuro-endocriniens (PRIEDKALNS et LEISER, 1998). Le cycle de la souris est divisé en quatre périodes qui correspondent aux différentes phases de l'activité ovarienne : pro-œstrus, œstrus, métœstrus et diœstrus.

#### **1) Pro-œstrus**

Suite à la régression du corps jaune du cycle précédent, le niveau de progestérone chute et le taux de FSH<sup>4</sup> augmente. Cette première phase du cycle est caractérisée par une maturation folliculaire et une prolifération de l'endomètre, sous l'influence de la FSH. Le follicule commence à sécréter des œstrogènes qui induisent l'œstrus (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

#### **2) Œstrus**

C'est la période de réceptivité sexuelle : la femelle accepte le mâle. Cette phase est marquée par la totale influence des œstrogènes sur les organes génitaux. L'ovulation se

---

<sup>4</sup> Follicle Stimulating Hormone = Hormone folliculo-stimulante



produit suite à un pic de LH<sup>5</sup>. A la fin de l'œstrus, le taux d'œstrogènes diminue (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

### 3) *Métœstrus*

C'est une phase de transition où les taux d'œstrogènes en diminution, sont contrebalancés par le développement du corps jaune et la sécrétion de progestérone (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

### 4) *Diœstrus*

C'est la période du cycle sous la seule influence du corps jaune. L'influence de la progestérone lutéale sur les organes sexuels est alors prédominante. L'endomètre subit une hyperplasie glandulaire et ses sécrétions sont maximales afin d'accueillir un éventuel embryon et d'assurer sa nidation. La fécondation de l'ovule et la gestation entraînent un diœstrus prolongé. En l'absence de fécondation, le corps lutéal régresse et l'endomètre subit une involution avec régression glandulaire (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

### 5) *Durée du cycle*

Les durées du cycle et de ses différentes phases sont données dans le **tableau 2** selon deux sources différentes.

**Tableau 2 : Durées du cycle sexuel de la souris et de ses différentes phases (d'après RUGH, 1968\* et VAISSAIRE, 1977°)**

Cycle	Pro-œstrus	Œstrus	Métœstrus	Diœstrus
	24 à 36 heures*	24 à 72 heures*	24 à 120 heures*	48 à 96 heures*
4 à 5 jours°	24 à 36 heures°	12 à 14 heures°	24 à 48 heures°	36 à 72 heures°

Le fonds génétique des animaux étudiés n'est pas précisé.

Ce tableau montre que, chez la souris, les durées du cycle et de ses différentes phases sont assez variables d'une source à l'autre mais également au sein d'une même étude. On perçoit ici la difficulté de déterminer précisément dans quelle phase du cycle se situe une souris. Cette variabilité inter-individuelle s'accompagne d'une variabilité entre les lignées (variabilité génétique) ainsi que d'une variabilité due à l'environnement. C'est une des difficultés qu'il nous a fallu résoudre au cours de notre étude (**Cf. Matériels et méthodes, page 85**)

<sup>5</sup> Luteinizing Hormone = Hormone lutéinisante

## **B - Les modifications du tractus génital au cours du cycle sexuel**

Au cours du cycle sexuel, le tractus génital subit des modifications de structure et de fonctionnement sous l'influence de diverses hormones ovariennes. Les principales modifications histologiques de l'utérus au cours du cycle ont lieu au niveau de l'endomètre.

### **1) *Pro-œstrus***

Sous l'influence des œstrogènes, l'endomètre est restauré, la muqueuse commence à s'hypertrophier et les cellules épithéliales cylindriques deviennent plus hautes. La prolifération glandulaire débute mais le corps glandulaire est encore droit à ce stade et les glandes ne sont pas ramifiées.

La vascularisation et la congestion du chorion augmentant, quelques hémorragies peuvent survenir. Quelques polynucléaires neutrophiles commencent à envahir l'épithélium (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

### **2) *Œstrus***

La prolifération épithéliale, superficielle et glandulaire, continue. L'activité sécrétoire des cellules augmente. L'infiltration inflammatoire de l'épithélium se poursuit et devient mononucléée. Le chorion est caractérisé par une congestion maximale accompagné d'œdème et d'hémorragies (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

### **3) *Métœstrus***

L'hyperplasie glandulaire se poursuit et les glandes deviennent contournées et ramifiées. L'activité sécrétoire est toujours maximale. En revanche, la congestion des vaisseaux et l'œdème du chorion régressent (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

### **4) *Diœstrus***

Sous l'influence de la progestérone, l'hyperplasie glandulaire est maximale et les glandes apparaissent très contournées. En l'absence de fécondation, sous l'effet de la régression du corps jaune, la vascularisation diminue et l'activité sécrétoire est arrêtée. L'épithélium de surface et les glandes subissent alors une involution (PRIEDKALNS et LEISER, 1998 ; BANKS, 1993).

En parallèle de ces modifications histologiques de l'endomètre, des variations de l'activité contractile du myomètre sont observées (**Cf. Motricité de l'utérus au cours du cycle sexuel, page 28**).

# Motricité de l'utérus

---

## I - PHYSIOLOGIE DES MUSCLES LISSES

Les muscles lisses regroupent l'ensemble des systèmes contractiles contenant des cellules musculaires (ou fibres musculaires) et n'ayant pas la striation transversale typique des fibres musculaires striées. Les cellules musculaires lisses ne sont pas reliées aux éléments du squelette (GORDON, 1982).

Les cellules musculaires lisses se présentent souvent comme des éléments plus ou moins isolés au sein de tissus ou d'organes comme les vaisseaux, la vessie, l'utérus, le tube digestif, l'iris, le scrotum... Dans certains organes, comme l'utérus, les muscles lisses forment une ou plusieurs couches autour d'une lumière et permettent la conservation de la forme de l'organe et/ou assurent sa contractilité (BAGUET, 2006).

Le myomètre utérin est un muscle lisse et la connaissance de la physiologie générale de ce type musculaire est nécessaire à l'étude de la motricité utérine.

### A - Types de muscles lisses

Les muscles lisses peuvent être classés en deux catégories selon leurs propriétés fonctionnelles.

#### 1) *Muscles multi-unitaires*

Ces muscles ne présentent pas d'activité spontanée et leurs cellules ne communiquent pas entre elles par des jonctions. Elles ne présentent pas de couplage électrique. La contraction des muscles multi-unitaires est sous contrôle d'une innervation extrinsèque ou de la diffusion d'hormones. Les cellules sont arrangées en série et ont, pour la plupart, leur membrane plasmique en contact étroit avec des terminaisons nerveuses motrices. Leur dépolarisation reste essentiellement localisée au niveau de ces contacts (**Figure 3**).

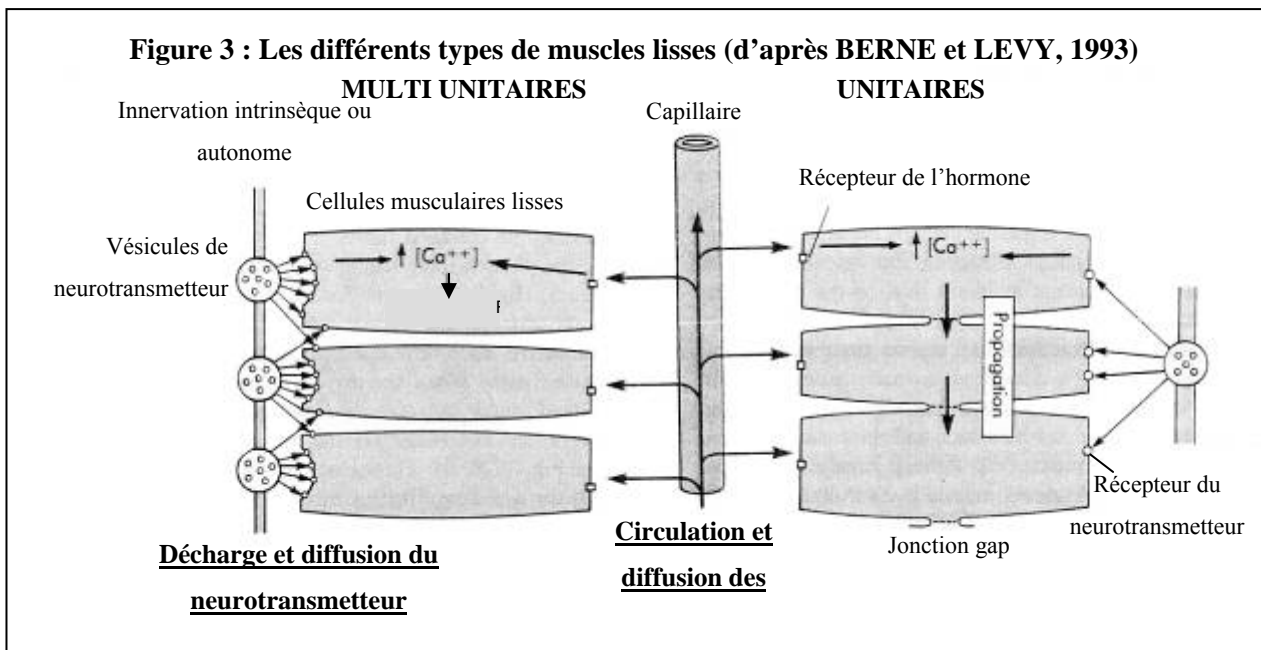
Dans ce groupe, on retrouve le muscle de la membrane nictitante, le muscle pilo-érecteur, le muscle de l'iris, du corps ciliaire et de nombreux vaisseaux sanguins (BAGUET, 2006 ; BERNE et LEVY, 1993).

#### 2) *Muscles unitaires*

D'un point de vue physiologique, ces muscles sont considérés comme des groupes de cellules présentant une continuité fonctionnelle due à la présence de jonctions inter-cellulaires communicantes entre cellules adjacentes. Les membranes ont une faible résistance électrique

au niveau des jonctions et toutes les cellules sont ainsi couplées électriquement (**Figure 3**). La dépolarisation se propage de cellule en cellule en s'affaiblissant progressivement en raison de la résistance existante (BAGUET, 2006).

Les muscles unitaires développent, à des degrés divers, une activité contractile spontanée indépendante de toute activité nerveuse extrinsèque. Cette activité, appelée « myogénique », se retrouve particulièrement développée dans les muscles viscéraux. La contraction provient souvent d'une dépolarisation spontanée de la membrane musculaire de certaines cellules appelées « pacemaker ». Le contrôle nerveux, ortho- ou parasympathique, n'intervient que pour moduler une activité inhérente au muscle. Le contrôle peut également être dû à l'activité de plexus nerveux<sup>6</sup> présents dans les tissus et dans certains cas, il peut être doublé d'un contrôle hormonal<sup>7</sup> (BAGUET, 2006). Ont été classés dans ce groupe, les muscles lisses du système gastro-intestinal, de l'utérus, de l'uretère et de certains vaisseaux sanguins.



## B - Structure des muscles lisses

La connaissance de la structure des muscles lisses est essentielle pour comprendre et étudier les modalités de leur motricité.

### 1) Structure générale

Les muscles lisses sont constitués de paquets de fibres musculaires lisses d'environ 100 µm de diamètre. Les fibres musculaires sont des cellules fusiformes d'environ 10 µm de

<sup>6</sup> Par exemple, le plexus nerveux d'Auerbach dans l'intestin grêle.

<sup>7</sup> Par exemple, l'ocytocine dans le cas de l'utérus.

diamètre et 50 à 300  $\mu\text{m}$  de longueur. Les muscles lisses se comportent comme des syncytiums (CSAPO, 1960).

Les paquets de fibres musculaires sont organisés en couche musculaire.

La structure la plus simple est tubaire, comme dans les vaisseaux sanguins ou les voies respiratoires. Les cellules musculaires lisses sont alors orientées circulairement et leur contraction diminue le diamètre de l'organe.

Une structure plus complexe est rencontrée dans le tube digestif, par exemple, où la musculature assure la motilité et le mélange du contenu intestinal. Les cellules musculaires sont alors organisées en deux couches : une longitudinale externe et une circulaire interne. On retrouve cette organisation dans l'utérus. La couche longitudinale est responsable de mouvement de compaction, et la couche circulaire de mouvements de constriction.

Dans le tube digestif, la coordination des deux couches musculaires dépend d'un système de nerfs autonomes regroupés en un plexus caractéristique disposé entre elles (BERNE et LEVY, 1993).

## ***2) Ultra-structure de la cellule musculaire lisse***

### **$\alpha$ – Membrane plasmique**

Elle possède la structure trilamellaire classique et est déformée par des digitations qui augmentent sa surface. Contrairement aux cellules musculaires striées, les cellules musculaires lisses sont dépourvues de tubules T, invaginations de la membrane plasmique qui établissent un lien électrique avec le réticulum sarcoplasmique<sup>8</sup>. En revanche, la membrane plasmique présente des cavéoles ou vésicules de surface qui sont des invaginations de 70 à 120 nm de diamètre, distribuées en rangées parallèles au grand axe de la cellule. Elles sont en général situées à proximité du réticulum sarcoplasmique et des mitochondries. Leur présence augmente d'environ 70% la surface cellulaire. On leur attribue un rôle dans les échanges ioniques, mais leur fonction n'est pas encore clairement établie (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Sur la face interne de la membrane plasmique, les bandes denses (ou corps denses membranaires) forment un épaissement de la membrane. Elles sont allongées selon le grand axe de la cellule et servent de point d'ancrage aux filaments de l'appareil contractile. Leur richesse en  $\alpha$ -actine leur a fait attribuer un rôle similaire à celui des stries Z du muscle strié.

---

<sup>8</sup> Réticulum endoplasmique de la cellule musculaire, lisse ou striée.

La jonction entre deux bandes denses de cellules voisines forme une jonction intermédiaire qui permet le couplage mécanique entre les deux cellules. Les jonctions gap, également présentes, sont des structures perméables aux ions et aux petites molécules qui assurent le couplage électro-chimique entre les cellules (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002 ; BERNE et LEVY, 1993).

### **β – Structures intracellulaires**

Les cellules musculaires lisses embryonnaires ne fusionnent pas à la différence des cellules musculaires striées et chaque cellule possède un noyau central unique.

Le réticulum sarcoplasmique est présent sous forme de citernes aplaties. Il est peu développé<sup>9</sup> et le système de tubules transverses est inexistant. Le réticulum sarcoplasmique lisse est préférentiellement situé à proximité de la surface cellulaire et plus particulièrement des cavéoles. Par endroits, la distance séparant la membrane plasmique du réticulum sarcoplasmique est inférieure à 15 nm. L'existence de ponts à ce niveau suggère un couplage fonctionnel entre ces deux structures. Le rôle du réticulum sarcoplasmique lisse est fondamental dans la régulation de la concentration en calcium intracellulaire et représente le principal site de stockage du calcium (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Le réticulum sarcoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi sont particulièrement développés et situés de part et d'autre du noyau. Cette caractéristique souligne l'importance de la synthèse protéique de la cellule (BERNE et LEVY, 1993).

Les mitochondries ont deux localisations préférentielles, de part et d'autre du noyau et à proximité de la membrane plasmique. Elles sont le siège du métabolisme oxydatif qui assure la production d'ATP<sup>10</sup> nécessaire à la contraction. Leur rôle dans la régulation de la concentration de calcium cytoplasmique semble limité (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

### **χ – Appareil contractile**

Plus de 80% du volume cellulaire est occupé par l'appareil contractile constitué de filaments fins, épais et intermédiaires, et de corps denses. Le reste de la cellule est occupé par le noyau, le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries. Le cytosquelette et les myofilaments ne sont pas alignés transversalement ce qui explique l'absence de striation des muscles lisses.

---

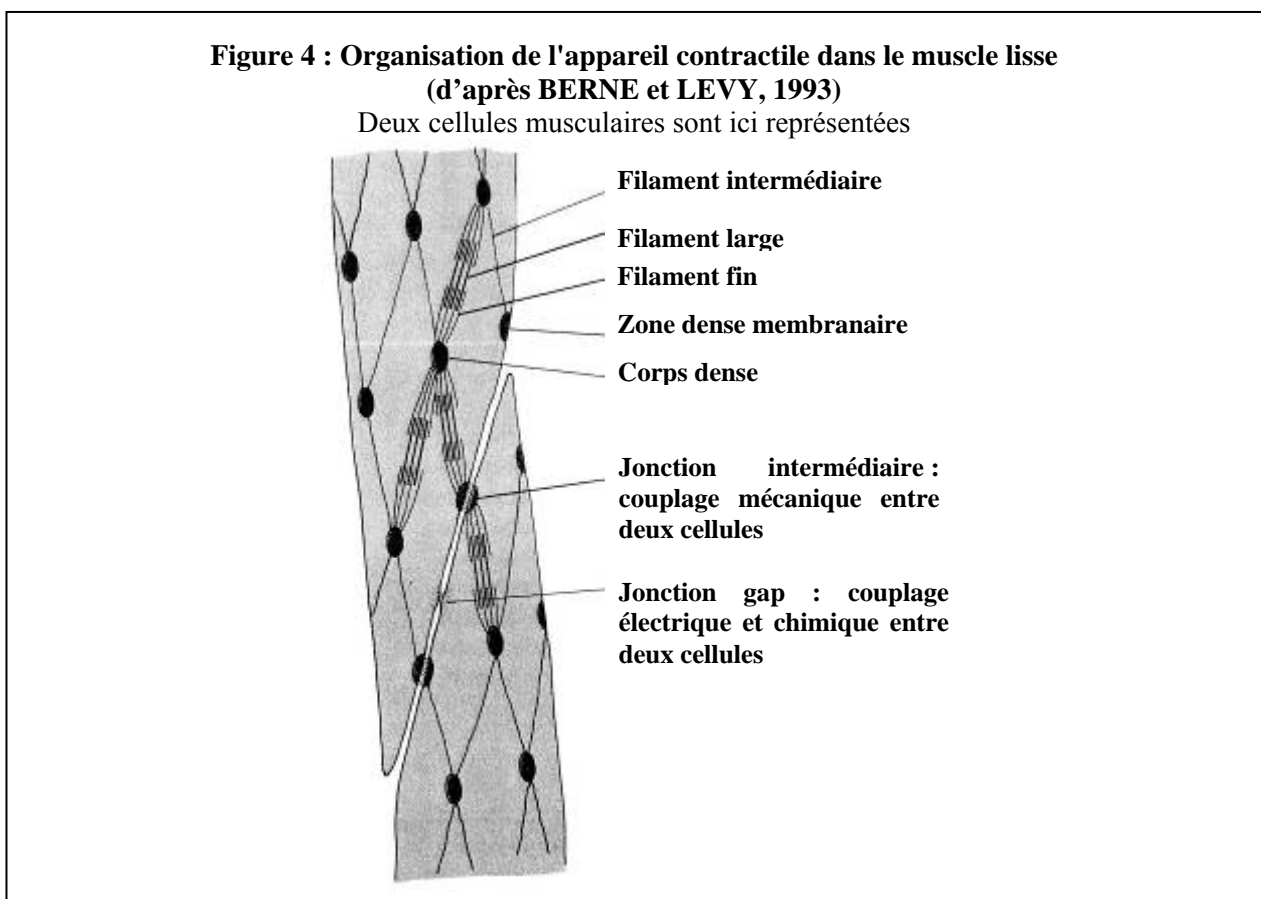
<sup>9</sup> 2 à 6% du volume cellulaire (BERNE et LEVY, 1993)

<sup>10</sup> Adénosine triphosphate

Les filaments épais (ou filaments de myosine) ont un diamètre de 16 nm. Ils sont plus épais que dans le muscle strié en raison de la présence de tropomyosine en quantité plus élevée. Cette protéine forme un squelette sur lequel sont disposées les molécules de myosine. Chaque molécule de myosine se compose de deux chaînes lourdes ayant chacune une tête globulaire reliée à deux chaînes légères. La tête globulaire de la myosine possède trois sites fondamentaux pour la contraction :

- un site d'interaction avec l'actine,
- un site de fixation de la chaîne légère de 20 kDa dont la phosphorylation est le principal élément régulateur de la contraction,
- un site enzymatique à activité ATPase, qui fournit l'énergie nécessaire à l'interaction actine-myosine et donc à la contraction (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Les filaments épais sont organisés par petits groupes de trois à cinq filaments alignés et entourés à chaque extrémité par des filaments fins interdigités (**Figure 4**).



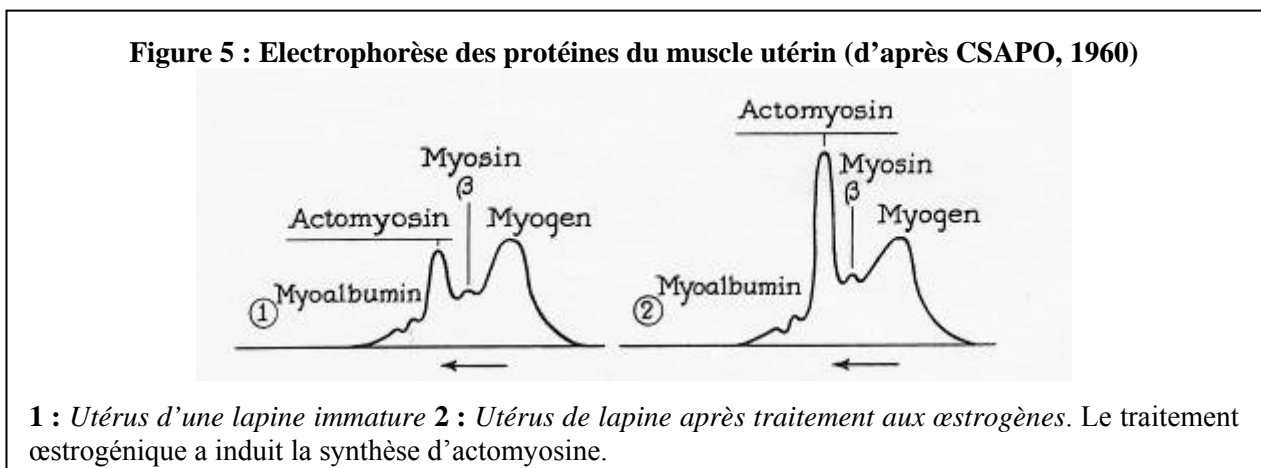
Les filaments fins ont un diamètre de 7 nm. Ils sont formés essentiellement de monomères d'actine comme dans le muscle strié. La troponine, élément régulateur de l'interaction actine-myosine dans le muscle strié, est absente dans les filaments fins du muscle lisse (BERNE et LEVY, 1993).

Les filaments intermédiaires ont un diamètre de 10 nm. Ils sont constitués principalement de deux protéines : la desmine, majoritaire, et la vimentine. Ils n'ont pas d'action contractile propre mais ils jouent un rôle dans la constitution du cytosquelette, en association avec les corps denses auxquels ils sont reliés (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Les corps denses sont répartis dans tout le cytoplasme. Ce sont les analogues des stries Z du muscle strié. Ils servent de point d'ancrage aux filaments d'actine ainsi qu'aux filaments intermédiaires, contribuant ainsi à la constitution du cytosquelette (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Les appareils contractiles des cellules adjacentes sont couplés mécaniquement entre eux, au niveau des bandes denses entre deux cellules.

Des électrophorèses réalisées sur des prélèvements de muscles lisses révèlent que les compositions protéiques sont assez proches d'un muscle à l'autre, même si quelques variations sont observables. Au sein du myomètre utérin, des électrophorèses ont été réalisées chez des lapines immatures ayant subi ou non un traitement à base d'œstrogènes (**Figure 5**).



Le profil des deux électrophorèses est semblable, mais on note une augmentation du pic d'actomyosine suite au traitement avec les œstrogènes (CSAPO, 1960). Ceci illustre l'influence que peuvent avoir les hormones ovariennes sur la composition du myomètre et donc, indirectement, sur ses propriétés contractiles.

### C - Propriétés contractiles des muscles lisses

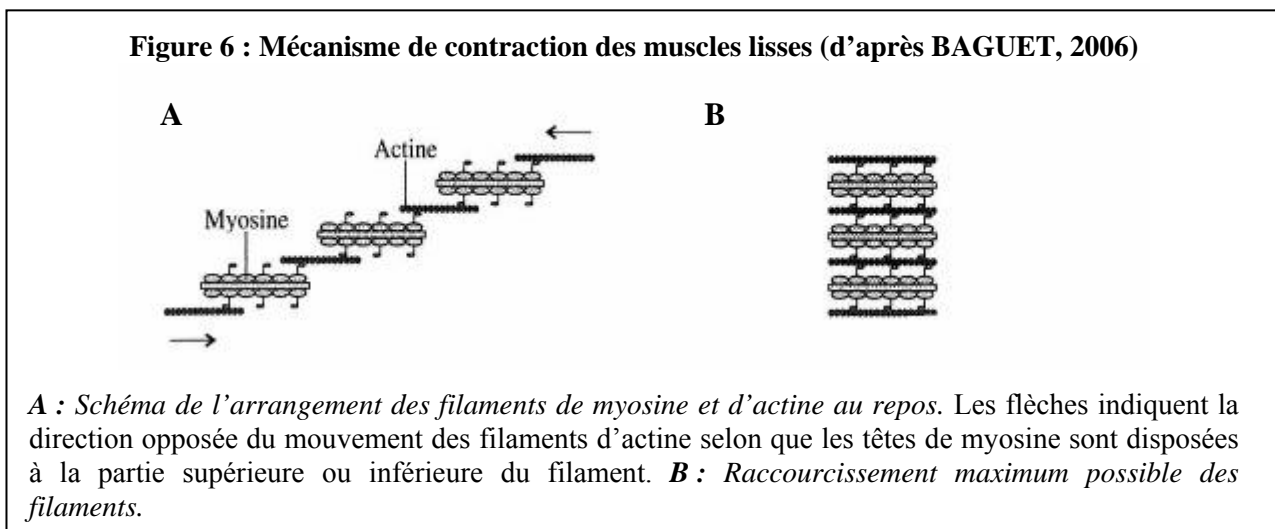
Les muscles lisses se caractérisent par une capacité étonnante de raccourcissement et de maintien de la force développée lors de la contraction, et ce pendant des temps relativement longs. Ils présentent aussi une grande lenteur dans leurs mouvements.

L'amplitude du raccourcissement s'explique par l'organisation des filaments de l'appareil contractile. La cellule musculaire lisse se contracte selon un mécanisme de



glissement de filaments semblable à celui du muscle strié. Les têtes globulaires de la myosine s'accrochent à l'actine par un site spécifique puis se détachent de façon répétitive, produisant à chaque mouvement élémentaire un déplacement d'un filament par rapport à l'autre. Il est bien admis actuellement que c'est l'élévation du calcium libre au-delà de 1  $\mu\text{M}$  qui contrôle ce phénomène (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Cependant, l'épaisseur du filament d'actine est nettement supérieure dans le muscle lisse et chaque filament de myosine présente deux faces de polarité différentes, les têtes mobiles étant orientées en sens opposés. Les filaments se trouvant d'un côté vont donc bouger dans la direction opposée à celle des filaments se trouvant de l'autre côté (**Figure 6**). Cette disposition en l'absence de striation permet un glissement très augmenté des filaments (BAGUET, 2006).



La lenteur de la contraction s'explique, au niveau tissulaire, par la présence de grande quantité de matériel non contractile et, au niveau de la cellule musculaire elle-même, par l'organisation de l'appareil contractile nettement moins favorable au développement rapide d'une force que la fibre striée.

Comme le mécanisme doit ici étirer ces éléments élastiques en série, un délai considérable précède la contraction après stimulation. Les contractions du muscle lisse sont ainsi 20 à 50 fois plus lentes que celles du muscle strié. Par ailleurs, avec cette lenteur de contraction, des fréquences de stimulation considérablement plus faibles qu'au niveau du muscle strié suffisent à produire une contraction soutenue. Le caractère particulièrement tonique de la contraction est lié à la lenteur des processus de contraction et de relaxation, en raison de la nature particulière des relations actine-myosine (BAGUET, 2006).

## D - Régulation des contractions des muscles lisses

### 1) Contrôle de la contraction des fibres musculaires

Le potentiel d'action se développe lentement, sa durée pouvant aller jusqu'à 1000 ms, en fonction du type de muscle. Il est essentiellement calcique, le calcium bivalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ) pouvant provenir du milieu extracellulaire ou intracellulaire. C'est également le  $\text{Ca}^{2+}$  qui initie le processus de contraction.

La concentration du calcium libre intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) est le principal facteur de régulation de la contraction du muscle lisse. Elle évolue de 0,1  $\mu\text{M}$  à l'état de repos à 1  $\mu\text{M}$  lors de la contraction. Plusieurs phénomènes peuvent déclencher l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  :

- les potentiels d'action transmis de cellule en cellule par le couplage électromagnétique, induisent une dépolarisation de la membrane. Des canaux calciques voltage-dépendants ( $\text{VOC}^{11}$ ) s'ouvrent et permettent la diffusion passive du calcium extracellulaire<sup>12</sup> vers le cytoplasme ;
- la liaison d'un agoniste à son récepteur membranaire peut provoquer l'ouverture d'un canal calcique récepteur-dépendant ( $\text{ROC}^{13}$ ) et/ou via l'activation de la phospholipase C (PLC), la formation d'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) qui provoque la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum sarcoplasmique ;
- les stimuli mécaniques de la cellule musculaire pourraient également favoriser l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par l'ouverture de canaux sensibles à l'étirement (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Dans le muscle lisse, c'est essentiellement au niveau de la myosine que se produit la régulation de l'interaction avec l'actine. Cette interaction nécessite la phosphorylation d'une des chaînes légères de la myosine (LC 20) sous l'action de sa propre kinase, la MLCK<sup>14</sup>. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline se lie à une région spécifique de la MLCK, ce qui permet l'exposition du site de liaison de l'ATP à la myosine. La myosine ainsi activée se lie à l'actine, les ponts se forment et les têtes de myosine pivotent, entraînant la contraction (BAGUET, 2006).

La phosphorylation de la LC 20 est corrélée à la vitesse du raccourcissement musculaire. Cependant, en cas de stimulation prolongée, la force de contraction peut être maintenue alors que la phosphorylation de la LC 20 et la consommation d'ATP diminuent. En

---

<sup>11</sup> Voltage Operated Channel

<sup>12</sup>  $[\text{Ca}^{2+}]_e \approx 1 \text{ mM}$

<sup>13</sup> Receptor Operated Channel

<sup>14</sup> Myosin Light Chain Kinase

effet, les ponts entre actine et myosine ne sont rompus que très lentement, suite à la déphosphorylation des chaînes LC 20. Les ponts sont alors dits en état de « latch » (loquet), état dans lequel la tension développée est maintenue sans hydrolyse d'ATP et donc de façon économique. Cette propriété permet aux muscles lisses vasculaires de maintenir une contraction soutenue à faible dépense d'énergie et ainsi d'entretenir une pression sanguine constante pendant plusieurs heures (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Dans le muscle lisse utérin, il n'y aurait pas d'état « latch ». En effet, la corrélation entre la contraction et le degré de phosphorylation de la LC 20 est étroite dans ce muscle, que ce soit au cours du développement ou du maintien de la tension (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Les activités électrique et mécanique initiées par l'élévation du calcium intracellulaire se propage ensuite de cellule en cellule au sein du muscle lisse, entraînant un couplage des contractions.

## ***2) Contrôle de la relaxation des fibres musculaires lisses***

Le mécanisme de relaxation du muscle lisse reste mal connu. Il est activé par l'intervention d'un système de nerfs inhibiteurs libérant des catécholamines. Celles-ci agissent *via* une étape impliquant un second messenger cyclique ( $\text{GMP}_c^{15}$  ou  $\text{AMP}_c^{16}$ ) en provoquant le détachement du  $\text{Ca}^{2+}$  de la calmoduline, ce qui désactive la MLCK. Elles induisent également une diminution de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  (BAGUET, 2006).

La relaxation nécessite une  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inférieure ou égale à  $0,1 \mu\text{M}$  et implique un mouvement actif du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire et contre le gradient électrochimique, ainsi qu'une mobilisation vers les sites de stockage intracellulaires tel que le réticulum sarcoplasmique (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Dans certains cas, il y a également une activation de canaux potassiques, ce qui provoque une hyperpolarisation et donc une réduction de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  *via* les canaux voltage-dépendants (BAGUET, 2006).

L'utérus est un muscle lisse unitaire et les mécanismes physiologiques de la contraction utérine sont identiques à ceux des autres muscles lisses. En revanche, l'utérus, contrairement aux autres organes contenant des muscles lisses, est en permanence sous

---

<sup>15</sup> Guanosine monophosphate cyclique

<sup>16</sup> Adénosine monophosphate cyclique

influence des hormones sexuelles. Cette imprégnation hormonale entraîne des modifications morphologiques et histologiques de l'utérus (**Cf. Les modifications du tractus génital au cours du cycle sexuel, page 18**). Il convient donc d'étudier les effets hormonaux sur les contractions utérines.

## **II - MOTRICITE DE L'UTERUS AU COURS DU CYCLE SEXUEL**

L'étude des contractions utérines au cours de la parturition est courante. En revanche, l'étude de la motricité de l'utérus non gravide au cours du cycle sexuel est plus récente. L'intérêt porté à la motricité de l'utérus non gravide chez la femme ne cesse d'augmenter avec le développement des techniques de procréation médicalement assistée. En effet, la préparation de l'utérus et surtout la gestion des contractions utérines sont des étapes cruciales pour une implantation correcte de l'embryon.

### **A - Appréciation de la motricité utérine**

Plusieurs méthodes de mesures des contractions sont disponibles, elles peuvent être regroupées en deux ensembles : les mesures *in vivo* et les mesures *ex vivo*.

#### **1) Etude de la contraction utérine *in vivo***

Il existe principalement trois techniques de mesure des contractions utérines : la tocographie, l'électro-myogramme utérin et l'échographie utérine.

##### **α – Tocographie**

Il s'agit de mesurer la pression intra-utérine. Le principe de la méthode s'appuie sur le fait que le raccourcissement physiologique de la fibre musculaire utérine pendant la contraction entraîne une augmentation de la pression intra-utérine de manière proportionnelle à son intensité et à sa durée (FANCHIN et coll., 2002).

Dans la méthode de tocographie interne, un cathéter ouvert rempli de sérum physiologique connecté à un capteur de pression externe, et dont l'extrémité libre est placée par voie trans-cervicale dans la cavité utérine, permet d'enregistrer la pression endoluminale globale. Cette technique fiable est utilisée comme méthode de référence et comme méthode de surveillance du travail dans certaines situations obstétricales difficiles (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Dans la méthode de tocographie externe, un dispositif manométrique placé sur l'abdomen en regard du fond de l'utérus permet d'apprécier les variations d'intensité et de

fréquence de la contraction utérine. Très utilisée du fait de son innocuité et de sa simplicité, cette méthode souffre d'une évaluation incomplète de l'intensité vraie des contractions et du tonus de base (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Un des inconvénients de la tocographie est la difficulté de quantification d'une activité musculaire qui n'entraînerait pas de changements significatifs de la pression intra-utérine, comme lors de possibles glissements et frottements subtiles entre les parois utérines (FANCHIN et coll., 2002).

### **$\beta$ – Electro-myogramme utérin**

Une autre méthode de référence pour le suivi des contractions utérines est la mesure de l'activité électro-mécanique de l'utérus en électro-myographie (EMG). Cette technique nécessite l'introduction de plusieurs électrodes dans la cavité utérine afin de pouvoir détecter des modifications du « pace-setter » et des potentiels d'action (« spikes » rapides) de l'utérus. L'activité électro-myographique de l'utérus peut aussi être recueillie par des électrodes cutanées placées sur l'abdomen en regard du fond de l'utérus. On obtient alors un électro-hystérogramme (EHG). Cette technique est utilisable chez la femme enceinte dès 18 mois d'aménorrhée (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

L'activité électrique, et notamment les potentiels d'action, est associée au déclenchement de la contraction utérine. L'EMG et l'EHG peuvent donc refléter l'activité contractile de l'utérus (FANCHIN et coll., 2002).

Il existe deux inconvénients principaux et communs aux techniques de tocographie interne et d'EMG. D'une part, ces méthodes sont relativement invasives et constituent de ce fait un facteur limitant dans les études cliniques. D'autre part, les électrodes intra-utérines ou les capteurs de pression peuvent avoir une influence propre sur les contractions utérines et altérer la qualité des mesures obtenues (FANCHIN et coll., 2002).

### **$\chi$ – Echographie utérine**

L'échographie utérine trans-abdominale permet la visualisation directe des contractions utérines. Cette méthode présente trois avantages principaux : elle est non invasive et elle permet, contrairement aux méthodes précédentes, de déterminer la couche musculaire qui se contracte ainsi que la direction dans laquelle se propagent les contractions utérines (BULLETTI et coll., 2004).

Afin de faciliter l'identification et la quantification des contractions utérines, les séquences échographiques sont enregistrées en bande VHS ou numérisées. Néanmoins l'analyse des séquences demeure subjective. Aussi, dans un souci d'améliorer la fiabilité et la

reproductibilité des résultats, des systèmes informatiques d'analyse d'images sont utilisés pour modéliser et analyser les échographies (FANCHIN et coll., 2002).

Les fréquences des contractions utérines mesurées par échographie sont identiques aux résultats obtenus par mesure de la pression intra-utérine. Cette technique est donc aussi fiable que les précédentes (BULLETTI et coll., 2004).

## **2) Etude de la contraction utérine ex vivo**

### **$\alpha$ – Etude de l'activité mécanique**

Une approche courante utilise des lambeaux musculaires prélevés en différents sites de l'utérus et maintenus dans des solutions physiologiques oxygénées et tamponnées. Les variations de tension musculaire sont le plus souvent enregistrées en condition isométrique à l'aide de jauge de contraintes dans une cuve à organe isolé. C'est la variation de la longueur du muscle qui est enregistrée.

Il est possible lorsque les tuniques musculaires croisent à angle droit, en orientant judicieusement les lambeaux selon l'axe principal des fibres circulaires ou longitudinales, de dissocier l'activité musculaire propre à chacune des couches (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

### **$\beta$ – Etude de l'activité électrique**

Les études électro-physiologiques utilisent des micro-électrodes pour la mesure des variations spontanées du potentiel de membrane ou des courants ioniques en potentiel imposé (voltage clamp). La mesure des flux ioniques par les techniques de « patch clamp » complète les mesures de l'activité mécanique. La réponse étudiée est l'intensité d'un courant ionique. Ces mesures sont résolutive jusqu'à l'échelle d'un canal ionique unique (CARBONNE, GERMAIN et CABROL, 2002).

Ces différentes techniques de mesures des activités électrique et mécanique de l'utérus *in vivo* chez la femme et *ex vivo* chez l'animal d'expérience, ont permis d'objectiver les variations de la motricité de l'utérus non gravide au cours du cycle sexuel.

## **B - Evolution de la motricité utérine au cours du cycle sexuel**

La contraction utérine se modifiant au cours du cycle sexuel, des variations ont été enregistrées avec les différentes méthodes citées précédemment. Ces diverses études, réalisées

le plus souvent chez la femme mais extrapolables à l'animal, concordent dans l'établissement d'un profil général des contractions au cours du cycle sexuel.

Le cycle sexuel a été divisé en six intervalles égaux, appelés phases folliculaire précoce, médio-folliculaire, folliculaire tardive, lutéale précoce, médio-lutéale et lutéale tardive. Ces différentes phases du cycle sexuel peuvent être corrélées aux quatre périodes classiquement décrites et qui correspondent à différentes phases de l'activité ovarienne. Ainsi la phase folliculaire précoce correspond au pro-œstrus, la phase médio-folliculaire se situe à la fin du pro-œstrus et la phase folliculaire tardive correspond à l'œstrus. La phase lutéale précoce se situe pendant le métœstrus et les phase médio-lutéale et lutéale tardive correspondent au diœstrus. Les contractions utérines ont été quantifiées et qualifiées au cours de ces diverses phases (IJLAND et coll., 1996).

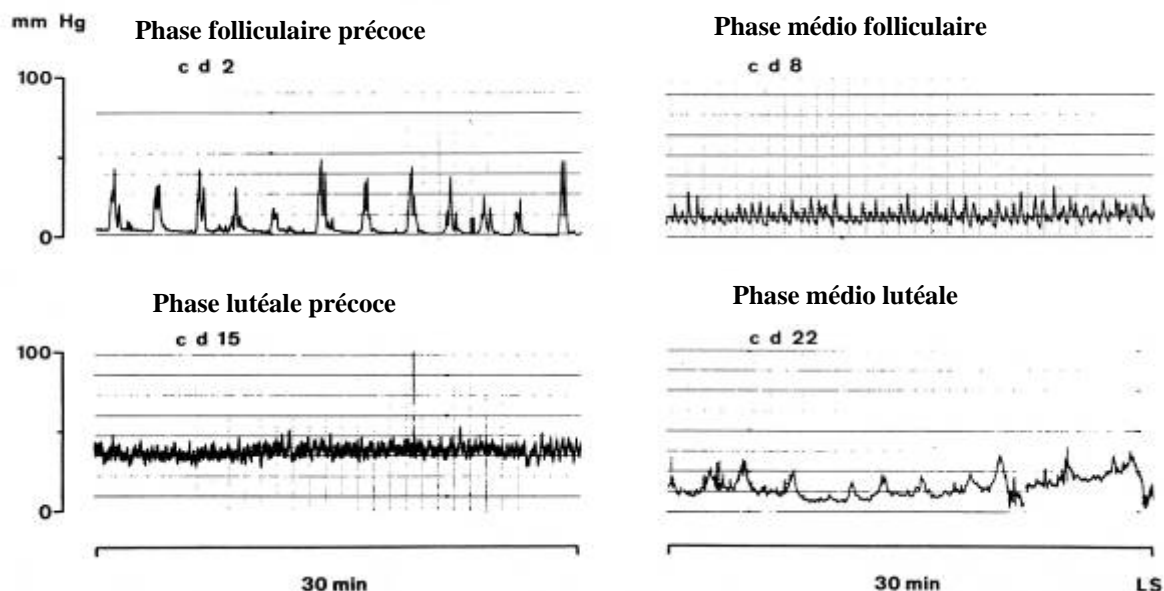
Indépendamment de la méthode utilisée, les auteurs décrivent, chez la femme, une augmentation de la fréquence des contractions utérines au cours de la phase folliculaire tardive, soit juste avant l'ovulation. L'influence maximale des œstrogènes à ce stade du cycle déclenche l'augmentation pré-ovulatoire de la fréquence des contractions. Au cours de cette phase folliculaire tardive, les contractions rétrogrades, du col de l'utérus vers les cornes, prédominent. Elles permettraient le transport des spermatozoïdes dans l'utérus (BULLETTI et coll., 2004).

Après l'ovulation, au cours de la phase lutéale précoce, l'influence des œstrogènes devient minoritaire par rapport à la celle de la progestérone et en conséquence la fréquence des contractions utérines diminue progressivement. La phase médio-lutéale est caractérisée par une relative quiescence de l'utérus. Seules des contractions aléatoires, débutant en des points variables de l'utérus, sont observées. Cette quiescence est propice au positionnement et à l'implantation de l'embryon. Les contractions convergentes, qui débutent simultanément depuis le col et les cornes de l'utérus, prédominent juste après l'ovulation. Les contractions antégrades, des cornes vers le col, sont totalement absentes au cours de la phase lutéale (VAN GESTEL et coll., 2003).

A partir de la phase lutéale tardive, mais surtout au cours de la phase folliculaire précoce, la fréquence des contractions reste faible mais leur amplitude augmente. Les contractions antégrades, répliquées miniatures des contractions d'expulsion au cours de la parturition, prédominent pendant les phases médio-folliculaire et folliculaire tardive. La fréquence des contractions antégrades augmente progressivement de la phase médio-folliculaire à la phase folliculaire tardive (BULLETTI et coll., 2004).

La **figure 7** montre un exemple de mesure de la pression intra-utérine chez une femme au cours du cycle sexuel. Les profils de pression sont clairement différents selon les jours du cycle où ils ont été réalisés.

**Figure 7 : Mesure de la pression intra-utérine à différents stades du cycle, chez une femme en bonne santé (d'après AKERLUND, 1997)**

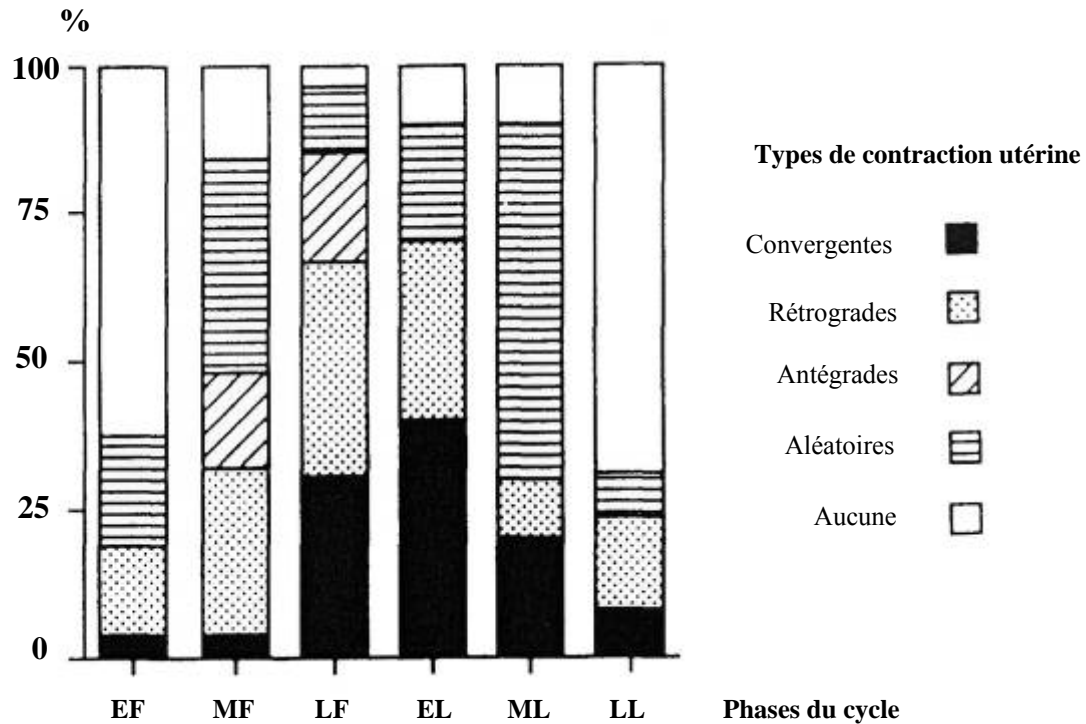


Durant la phase folliculaire précoce, les contractions sont faibles mais leur amplitude augmente. En phase médio-folliculaire, elles augmentent progressivement. Durant la phase lutéale, les contractions diminuent. En phase médio-lutéale, l'utérus est quiescent et seules quelques contractions aléatoires surviennent.

La **figure 8** récapitule la répartition des différents types de contractions utérines au cours des phases du cycle sexuel. Les différentes études décrites ci-dessus ont été réalisées chez la femme. Nous ne disposons pas de données similaires chez la souris dans la bibliographie actuelle. On sait cependant que la motricité de l'utérus au cours du cycle sexuel est très variable et que des modifications des contractions de l'utérus apparaissent entre chacune des 6 phases du cycle. Le cycle sexuel de la souris ayant une durée moyenne de 4 à 5 jours (**Tableau 2, page 17**), le profil des contractions utérines se modifie donc toutes les 16 à 20 heures en moyenne. Dans ces conditions, l'étude de la contractilité de l'utérus chez la souris doit tenir compte de ce profil de contraction en constant changement (**Cf. Matériel et méthodes, page 85**).



**Figure 8 : Répartition de l'activité contractile selon les types de contraction utérines au cours du cycle sexuel de la femme (d'après IJLAND et coll., 1996)**



Phases du cycle sexuel : *EF* : Folliculaire précoce ; *MF* : Médio-folliculaire ; *LF* : Folliculaire tardive ; *EL* : Lutéale précoce ; *ML* : Médio-lutéale ; *LL* : Lutéale tardive.

**En résumé, l'utérus est un organe contractile composé de fibres musculaires lisses. Deux types de fibres musculaires sont présentes : des fibres musculaires circulaires assurant des mouvements de constriction, et des fibres musculaires longitudinales assurant des mouvements de compaction. L'activité contractile de l'utérus subit une influence hormonale et nerveuse.**



# Le gène *Kit* et sa protéine KIT

---

## I - STRUCTURE DU GÈNE *KIT*

Chez la souris et l'Homme, le gène *Kit*, anciennement dénommé *c-kit*<sup>17</sup>, a pu être cloné et localisé à partir de l'oncogène viral *v-kit* du rétrovirus félin HZ4-FeSV<sup>18</sup> par BESMER et coll. (1986). Chez la souris, *Kit* est localisé sur le chromosome<sup>19</sup> 5 au locus *W* (*dominant white spotting locus*)<sup>20</sup> et encadré par les gènes *Pdgfra* (à moins de 500 kb) et *Flkl1* (à 300-500 kb). Il s'étend sur environ 80 kb et est découpé en 21 exons et 20 introns. Les exons sont de petite taille (100 à 180 pb) excepté l'exon 21 (2,3 kb). La taille des introns est très variable et atteint 30 kb pour le premier (GOKKEL et coll., 1992). Après transcription, le gène *Kit* produit un ARN<sub>m</sub> de 5,5 kb. Dans les spermatozoïdes, un épissage alternatif aboutit à deux autres transcrits de 3,2 kb et 2,3 kb. La traduction de l'ARN<sub>m</sub> de *Kit* conduit à la synthèse de la protéine KIT.

## II - STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DE LA PROTEINE KIT

La protéine KIT, également appelée CD117, est composée de 975 acides aminés lui conférant un poids moléculaire de 109 kDa<sup>21</sup>. Elle appartient à la grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase qui comprend également le PDGF-R<sup>22</sup> et la protéine ABL<sup>23</sup>. Ces molécules possèdent toutes, en plus d'un peptide signal, trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. Chez les Vertébrés, cette famille est subdivisée en 14 sous-familles dont les membres, bien que présentant des variations essentiellement dans la partie extracellulaire, ont une structure de base identique.

On distingue donc quatre régions dans la protéine KIT (SCHLESSINGER et ULLRICH, 1992) (**Figure 9**) :

---

<sup>17</sup> *c-kit*, pour oncogène *Kit* cellulaire par opposition à l'oncogène viral *v-kit*.

<sup>18</sup> Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Virus, isolé à partir d'un fibrosarcome félin.

<sup>19</sup> Le caryotype de la souris comporte 20 chromosomes qui sont acrocentriques (centromère en position haute).

<sup>20</sup> Ce nom fait référence à la mutation *W* prototype, la première caractérisée, qui provoque, de façon dominante, un défaut de pigmentation du pelage sous forme de tâches blanches.

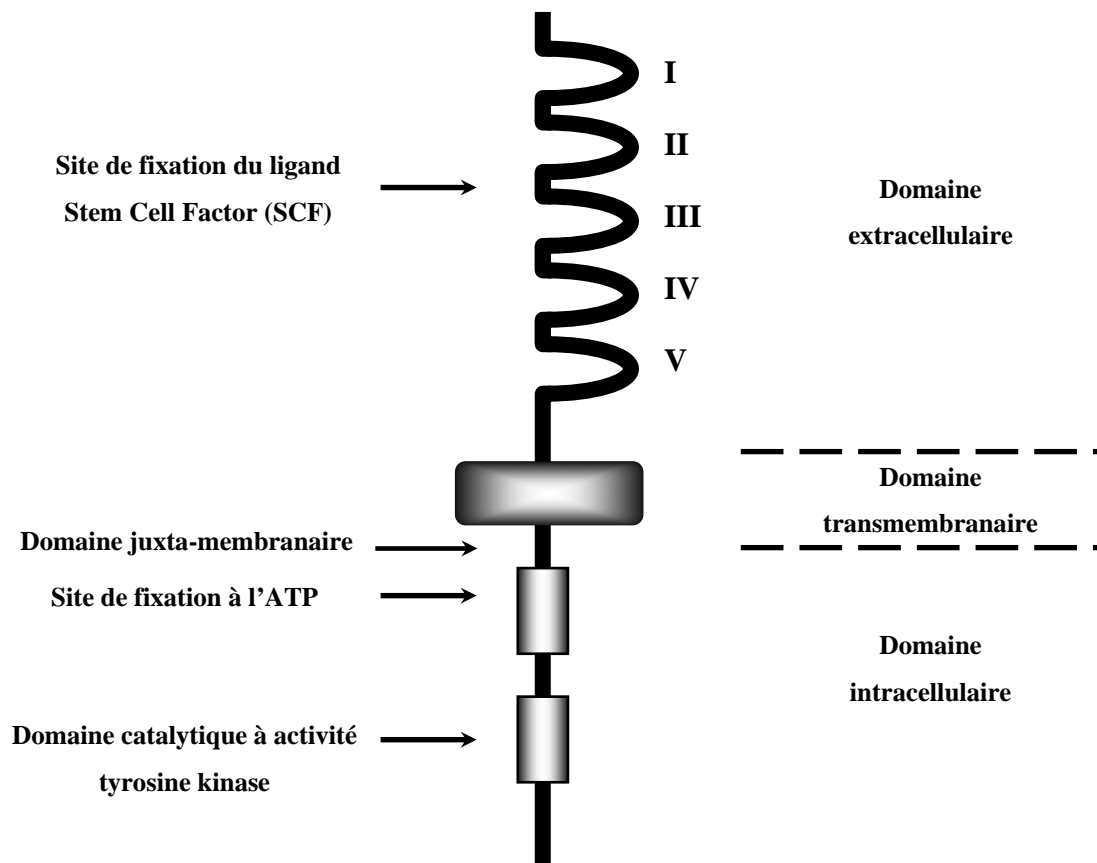
<sup>21</sup> Après synthèse, une maturation par glycosylation aboutit à deux formes, de 124 kDa et 160 kDa.

<sup>22</sup> Platelet Derived Growth Factor Receptor : Récepteur du PDGF présent sous les formes PDGF-RA ou PDGF-RB codées respectivement par *pdgfra* ou *pdgfrb*.

<sup>23</sup> Protéine Abelson

- 1) la partie N-terminale contenant le peptide signal, correspondant aux 21 premiers acides aminés, qui permet la maturation dans le réticulum endoplasmique et dirige la protéine nouvellement synthétisée vers la membrane cytoplasmique,
- 2) une séquence de 518 acides aminés correspondant au domaine extracellulaire, formant 5 boucles de type immunoglobuline, et entrant en jeu dans la fixation au ligand,
- 3) une séquence de 25 acides aminés hydrophobes correspondant au domaine transmembranaire,
- 4) une partie cytoplasmique contenant un domaine de fixation à l'ATP et un domaine catalytique permettant le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP au substrat.

**Figure 9 : Structure du récepteur KIT**



Après maturation et encre dans la membrane cytoplasmique, le récepteur KIT est composé de trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. Dans le domaine extracellulaire, les cinq boucles de type immunoglobulines sont numérotées en chiffres romains. La fixation du ligand de KIT, le SCF, s'effectue sur les boucles I à III.

Le ligand de KIT est le Stem Cell Factor ou SCF (Cf. **Le ligand de KIT, le SCF, page 41**). Lors de la transduction du signal, la fixation SCF au récepteur KIT est de forte affinité ( $10^{-9}$  M) et induit un changement conformationnel de la protéine favorisant sa dimérisation (Cf. **Mécanisme d'action de l'Imatinib, page 61**). Deux récepteurs rapprochent

alors leur domaine intracellulaire ce qui aboutit à une autophosphorylation, chaque dimère phosphorylant la chaîne de l'autre. Cet état ouvre alors l'accès des substrats au site catalytique et sont phosphorylés à leur tour. Parmi les protéines cibles, on trouve des enzymes, des protéines du cytosquelette ou des polypeptides sans activité catalytique servant d'intermédiaire avec d'autres protéines impliquées dans la signalisation. Parmi les protéines cibles, citons PI3-K, p21ras, PLC-gamma ou p95vav (SCHLESSINGER et ULLRICH, 1992).

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont principalement impliqués dans les voies de signalisation aboutissant à la différenciation, la prolifération, la migration et/ou la survie de diverses lignées cellulaires au cours du développement. C'est l'étude de mutants qui a en grande partie permis d'identifier les types cellulaires exprimant *Kit*.

### III - LES MUTATIONS DU GENE *KIT*

On décrit quatorze mutations spontanées du gène *Kit* : dix sont des mutations ponctuelles dans la partie codante de *Kit* ( $W$ ,  $W^{37}$ ,  $W^{41}$ ,  $W^{42}$ ,  $W^{55}$ ,  $W^v$ ,  $W^f$ ,  $W^{jc}$ ,  $W^n$  et  $W^{ei}$ ) et quatre sont des remaniements du locus ( $W^{19H}$ ,  $W^x$ ,  $W^{44}$  et  $W^{sh}$ ). Les caractéristiques de ces mutations sont résumées dans le **tableau 3**.

Le phénotype associé à la mutation  $Kit^W$  prototype est un défaut de pigmentation du pelage, une anémie macrocytaire et une baisse de la fertilité. Il a pu être établi ainsi que les lignages cibles des mutations  $Kit^W$  sont, dès le développement embryonnaire, les lignages mélanocytaire, hématopoïétique (avec notamment la lignée érythrocytaire et les mastocytes) et germinale. Dans la période post-natale, les ICC sont également affectées (HUIZINGA et coll., 1995). *Kit* est également exprimé dans d'autres types cellulaires (neurones, cellules endothéliales...) mais ceux-ci ne sont pas dépendants de *Kit* pour leur survie, leur développement et leur prolifération.

Les mutations peuvent être classées en deux catégories, selon qu'elles affectent l'expression (mutations de régulation) ou l'activité kinase de KIT (mutations de structure). Les mutations se traduisent souvent par des anomalies de la pigmentation en raison d'une insuffisance de prolifération et de migration des mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes, depuis la crête neurale d'où ils sont originaires vers les parties distales du corps. Or, les mutations nulles, qui sont un cas de mutation de régulation dans laquelle KIT n'est pas du tout synthétisée, sont associées à ce phénotype à l'état hétérozygote. Le gène *Kit* est donc haplo-insuffisant, c'est-à-dire que les deux copies du gène sont nécessaires pour assurer la fonction normale des mélanoblastes.

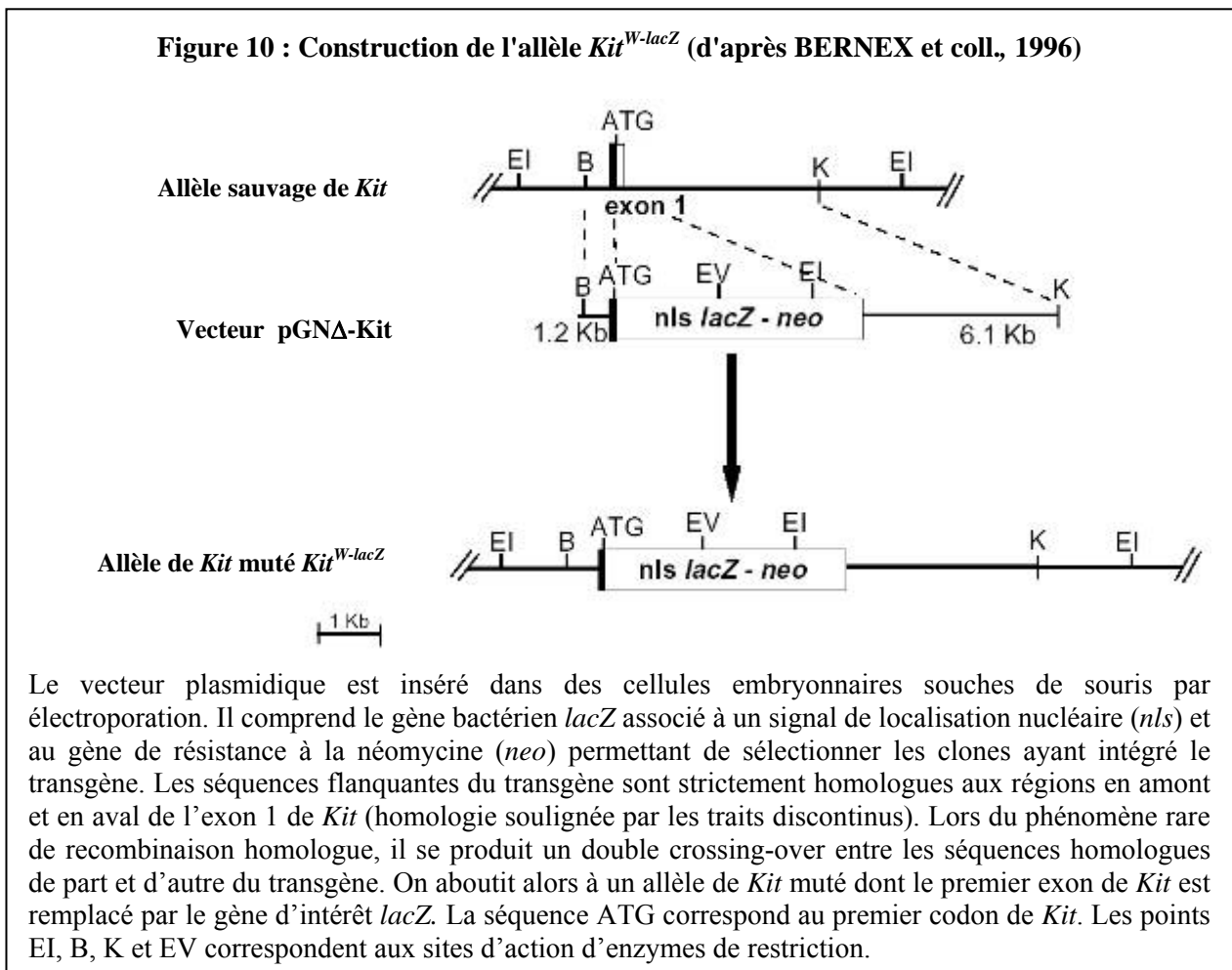
Par ailleurs, à l'état hétérozygote, les mutations de structure sont plus sévères que les mutations nulles. Il existe un effet de dominance négative expliqué par le fonctionnement en dimère de KIT. Les monomères s'associant au hasard, on a ainsi chez les hétérozygotes une partie des protéines sauvages liée à des protéines anormales. Dans ces conditions, seuls 25% des dimères sont normalement actifs au lieu des 50% *a priori* attendus.

**Tableau 3 : Caractéristiques des mutations de *Kit* (locus *W*) (d'après BERNEX, 1996)**

Allèle <i>W</i> *	Phénotype des homozygotes	Phénotype des hétérozygotes	Nature moléculaire de la mutation	Protéine KIT mutée
<b><u>Mutations de régulation</u></b>				
<i>19H</i>	Létal embryonnaire	Tache blanche sur le ventre et sur les extrémités des membres	Délétion	Non synthétisée
<i>W</i>	Mortalité périnatale	Idem	Mutation ponctuelle	Délétion de la partie transmembranaire
<i>X</i>	Idem	Idem	Délétion dans le gène	?
<i>n</i>	Idem	Peu de taches blanches irrégulières	Mutation ponctuelle	Non exprimée
<i>44</i>	Fertilité réduite, peu de pigmentation, pas d'anémie	Idem	Insertion dans un intron, synthèse d'ARN réduite	Réduction de l'expression
<i>57</i>	Fertilité normale, fourrure tachetée, pas d'anémie	Idem	Synthèse d'ARN réduite	Idem
<i>sh</i>	Fertilité normale, non pigmenté, pas de mastocytes, pas d'anémie	Ceinture blanche	Réarrangement en 5' du gène	Idem
<i>lacZ</i>	Mortalité périnatale	Taches blanches sur le ventre et les extrémités des membres	Délétion dans le gène	Non synthétisée
<b><u>Mutations de structure</u></b>				
<i>42</i>	Mortalité périnatale, pas de mélanocytes et de cellules germinales	Absence de pigmentation, anémie, fertilité réduite	Mutation ponctuelle	Pas d'activité kinase
<i>37</i>	Idem	Peu pigmenté, faible anémie	Idem	Idem
<i>ei</i>	Idem	Idem	Idem	Idem
<i>jic</i>	Idem	Idem	Idem	Idem
<i>v</i>	Stérile, fourrure blanche, anémie	Tache ventrale, dilution de la coloration, faible anémie	Idem	Activité kinase réduite
<i>41</i>	Fertilité normale, fourrure tachetée, anémie	Taches ventrales et sur le front, faible anémie	Idem	Idem
<i>f</i>	Fertilité normale, pigmentation réduite en bandes, anémie	idem	Idem	Idem

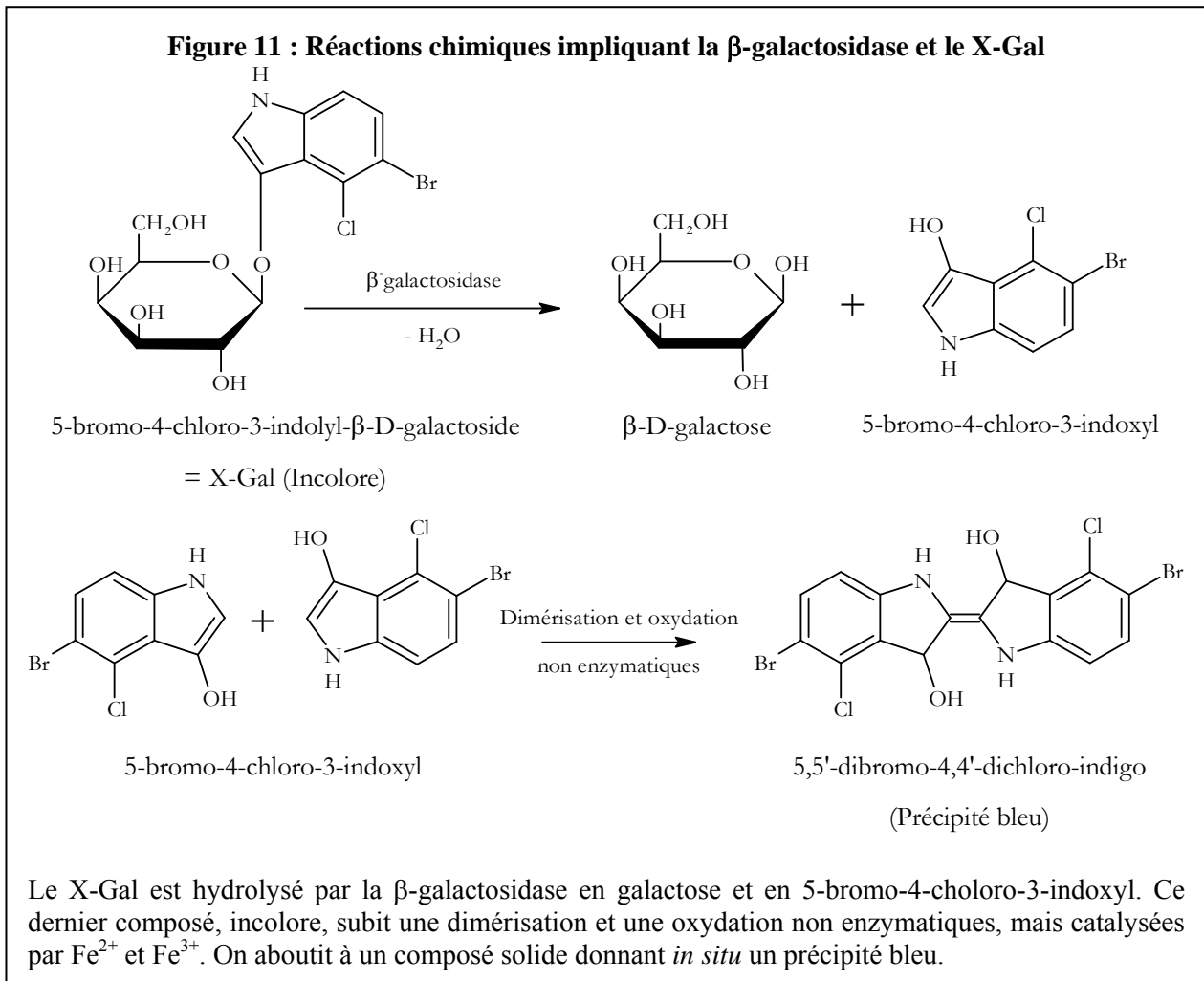
*Kit* est un oncogène et par conséquent les mutations gain-de-fonction, qui entraînent une surexpression de la protéine, sont impliquées dans la pathogénie de processus tumoraux touchant les lignages mélanocytaire (mélanomes), hématopoïétique (leucémies, mastocytomes) et germinale (séminomes). Elles jouent également un rôle dans la survenue des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) qui dérivent des ICC. 90% des GIST sporadiques présentent une mutation de *Kit*, dont 80% sont localisées entre la lysine 550 et l'arginine 586, région correspondant au domaine juxta-membranaire intracellulaire (HIROTA et coll., 1998).

Parmi les mutations de *Kit*, nous allons particulièrement nous intéresser à deux d'entre elles : *Kit*<sup>W-lacZ</sup> et *Kit*<sup>W-v</sup>. La mutation *Kit*<sup>W-lacZ</sup> est une mutation créée par BERNEX et coll. en 1996 (**Figure 10**).



Elle correspond à l'introduction dans le premier exon de *Kit* du gène rapporteur *lacZ* d'*Escherichia coli* codant la  $\beta$ -galactosidase et associé ici à un signal de localisation nucléaire (*nls*). L'insertion de ce transgène par recombinaison homologue, à l'aide d'un plasmide pGNΔ-Kit dans des cellules embryonnaires souches, aboutit à l'inactivation du gène *Kit*, et constitue une mutation nulle ou knock-out (KO). Le gène *lacZ*, remplaçant l'exon 1 de *Kit*, est

alors placé sous contrôle du promoteur de *Kit* et n'est par conséquent transcrit que dans les cellules exprimant normalement *Kit*. Cette stratégie, dite « du gène rapporteur », permet de visualiser aisément la topographie de l'expression tissulaire de *Kit*, macroscopiquement et microscopiquement. En effet, en présence de son substrat, le X-Gal, la  $\beta$ -galactosidase produit un précipité bleu uniquement observable dans le noyau des cellules exprimant *Kit*. La **figure 11** décrit les étapes conduisant à la formation de ce précipité.



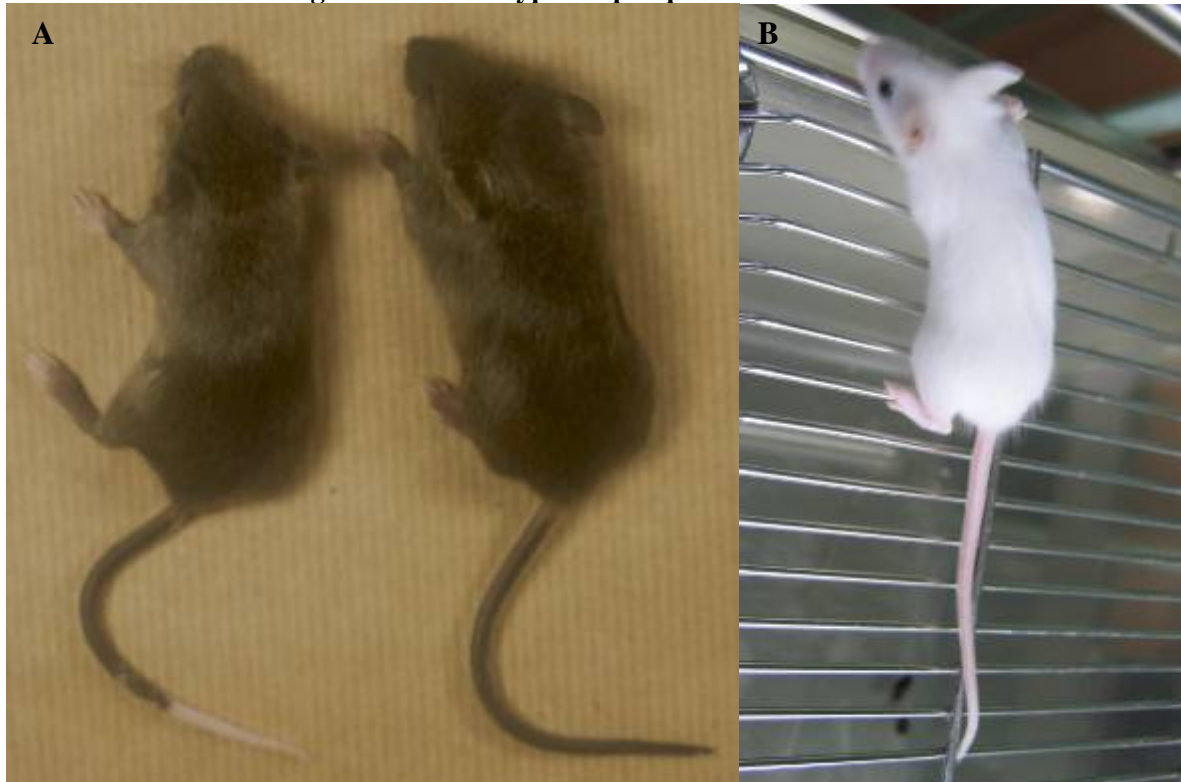
S'agissant d'une mutation nulle, les individus hétérozygotes (*Kit*<sup>W-lacZ/+</sup>) possèdent l'extrémité de la queue et des membres non pigmentée, c'est-à-dire blanche. Cette caractéristique rend aisé le génotypage des individus (**Figure 12-A**). L'utilisation de ces animaux est donc particulièrement intéressante lorsque l'on recherche à localiser des cellules exprimant *Kit*. Les individus homozygotes (*Kit*<sup>W-lacZ/W-lacZ</sup>), en raison de l'absence totale d'expression de *Kit*, ne sont pas viables et meurent d'anémie à la naissance (BERNEX et coll., 1996).

La mutation *Kit*<sup>W-v</sup> est une mutation de structure hypomorphe apparue spontanément. Ainsi, bien que la protéine KIT soit exprimée normalement, son activité est extrêmement



réduite. Phénotypiquement, les individus hétérozygotes ( $Kit^{W-v/+}$ ) présentent une légère dilution de la couleur du pelage, un ventre plus clair, ainsi qu'une absence de pigmentation de l'extrémité de la queue et des membres. Les individus homozygotes ( $Kit^{W-v/W-v}$ ) sont viables en raison de l'activité résiduelle de KIT. Ils sont cependant stériles, anémiés et leur fourrure est entièrement blanche (**Figure 12-B**). Etant donné que les individus homozygotes pour des mutations nulles ne sont pas viables, les homozygotes  $Kit^{W-v/W-v}$  sont intéressants si l'on souhaite étudier des animaux présentant une expression minimale de KIT.

**Figure 12 : Phénotype de quelques mutants de *Kit***



**A** : Une souris 129S2/SvPa  $Kit^{W-lacZ/+}$  (à gauche) et une souris sauvage 129S2/SvPa  $Kit^{+/+}$  (à droite). L'hétérozygote présente l'extrémité de la queue et des membres non pigmentée. **B** : Une souris 129S2/SvPa  $Kit^{W-v/W-v}$ . Le pelage de ces animaux est entièrement blanc. Les hétérozygotes présentent un phénotype presque semblable à celui des hétérozygotes  $Kit^{W-lacZ/+}$  auquel s'ajoute une dilution discrète du pelage.

#### IV - LE LIGAND DE KIT, LE SCF

Le SCF, ou Stem Cell Factor, est le ligand de *Kit*. Il s'agit d'une protéine codée par le gène *Steel* au locus *Sl* localisé chez la souris sur le chromosome 10. Les mutations au locus *Steel* touchent les mêmes populations cellulaires que les mutations *W* et aboutissent donc à des phénotypes similaires. Des mutations spontanées et induites ont été décrites pour *Steel*, et les principales sont décrites dans le **tableau 4**.

**Tableau 4 : Caractéristiques des mutations du gène *Steel* (d'après BESMER et coll., 1993)**

Allèles	Phénotypes des homozygotes	Phénotypes des hétérozygotes	Nature moléculaire de la mutation	Protéine mutée
<i>Sl, J, gb, 8H, 10H, 18H</i>	Létaux	Dilution de la coloration sur le ventre, tache blanche occasionnelle	Délétion du gène	Pas d'expression
<i>d</i>	Non pigmenté, stérilité et anémie	Dilution légère de la coloration et tache blanche	Délétion d'une partie du gène	Pas de forme membranaire de SCF
<i>17H</i>	Non pigmenté, légère anémie, mâles stériles, femelles fertiles	Pigmentation plus claire	Mutation au niveau d'un site d'épissage	Pas de partie C-terminale dans la forme membranaire de SCF
<i>pan</i>	Non pigmentée, légère anémie, mâles fertiles, femelles stériles	Idem	Réarrangement en 5' du gène	Faible expression
<i>con</i>	Idem, mais moins de cellules germinales	Idem	Idem	Idem

La protéine SCF est présente sous deux formes : une forme membranaire, SCF<sub>m</sub>, et une forme soluble, SCF<sub>s</sub>. L'épissage alternatif de l'exon 6 conduit à l'une ou l'autre. Lorsque l'exon 6 est présent, il code une séquence contenant des sites de clivage protéolytique aboutissant au clivage du SCF : on obtient alors la forme soluble. Lorsque l'exon 6 est excisé, la protéine n'est pas clivée et on obtient la forme membranaire.

**Le gène *Kit* code une protéine KIT membranaire impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Cette protéine est notamment exprimée par les cellules interstitielles de Cajal.**

# Les cellules interstitielles de Cajal

---

La découverte des cellules interstitielles de Cajal (ICC), il y a plus d'un siècle, est attribuée à Santiago Ramón y Cajal. Historiquement mises en évidence par une coloration au bleu de méthylène, elles ont été localisées initialement dans le tube digestif.

## I - TOPOGRAPHIE ET ORGANISATION DES CELLULES INTERSTITIELLES DE CAJAL

Les ICC sont présentes tout le long du tractus digestif mais ne représentent que 5% des cellules gastro-intestinales (ÖRDÖG et coll., 2004). Le tube digestif est composé de quatre tuniques concentriques qui sont, de la lumière vers l'extérieur :

- la muqueuse,
- la sous-muqueuse,
- la musculuseuse,
- la séreuse.

La musculuseuse contient elle-même deux couches de fibres musculaires lisses dont l'orientation est en relation avec le type de contractions générées. Dans l'estomac, que nous étudierons par la suite, les couches les plus internes sont des couches musculaires circulaires (interne et externe), responsables de mouvements de constriction. Sur une coupe longitudinale, les fibres apparaissent grossièrement rondes car coupées transversalement. La couche la plus externe est la couche musculaire longitudinale. Sur une coupe longitudinale, ses fibres apparaissent allongées car coupées longitudinalement. Sur des coupes transversales d'estomac, la morphologie des fibres musculaires est inversée.

L'orientation des ICC suit celle des fibres musculaires auxquelles elles sont rattachées. On distingue plusieurs catégories d'ICC selon leur localisation dans la paroi digestive (HORIGUCHI, SANDERS et WARD, 2003) (**Figure 13**) :

- les ICC-SS, situées sous la séreuse, présentes ou absentes suivant la portion de tube digestif,
- les ICC-IM, mélangées aux cellules musculaires lisses, dans les deux couches musculaires, longitudinale et circulaires,
- les ICC-MY, associées au plexus nerveux myentérique<sup>24</sup>, entre les couches musculaires circulaires et longitudinales,

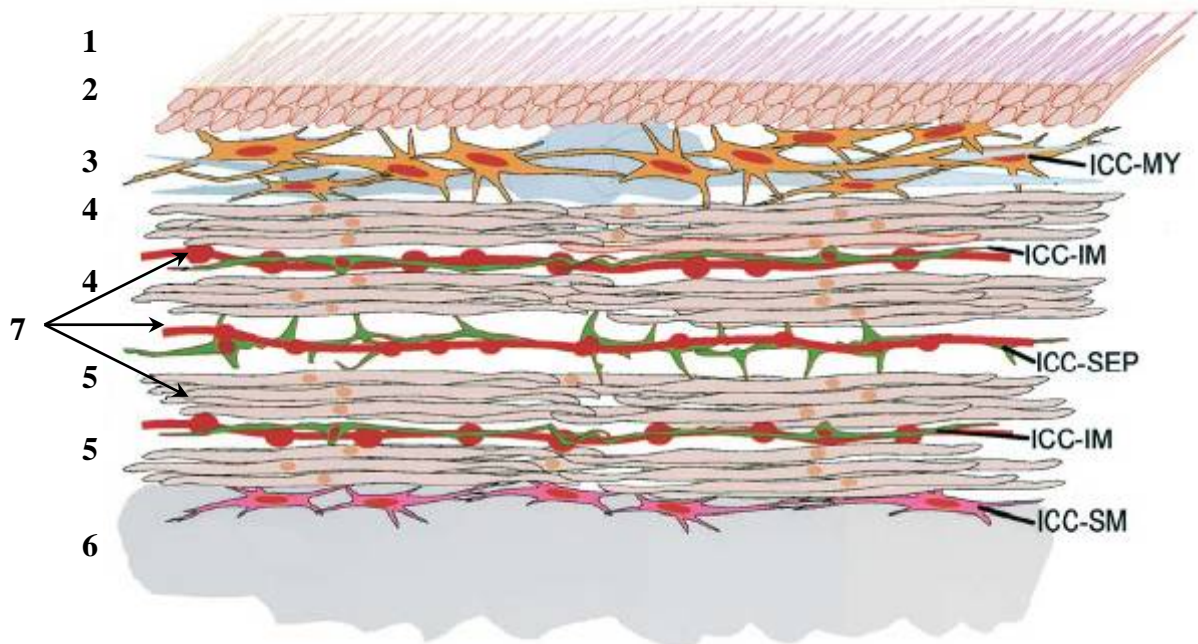
---

<sup>24</sup> Egalement appelées ICC-MP, ou ICC-AP pour « Auerbach plexus »

- les ICC-SM<sup>25</sup>, le long de la surface interne de la couche musculaire circulaire contre la sous-muqueuse, associées au plexus nerveux sous-muqueux,
- les ICC-SEP, uniquement dans l'estomac, et situées entre les deux couches musculaires circulaires.

Cette classification n'est pas seulement topographique mais également fonctionnelle comme nous le verrons par la suite.

**Figure 13 : Topographie des ICC dans la région antrale de l'estomac du chien, coupe transversale (d'après HORIGUCHI, SANDERS et WARD, 2003)**



**1** : Séreuse **2** : Couche musculaire longitudinale externe **3** : Plexus nerveux myentérique **4** : Couche musculaire circulaire externe **5** : Couche musculaire circulaire interne **6** : Muqueuse **7** : Neurones entériques et leurs prolongements ; **ICC-MY** : ICC myentériques ; **ICC-IM** : ICC intermusculaires ; **ICC-SEP** : ICC septales ; **ICC-SM** : ICC sous-muqueuses.

Les ICC expriment le gène *Kit* et leur développement, leur survie et leur activité sont dépendants de KIT (Cf. **Effet de l'Imatinib sur les cellules musculaires lisses intestinales, page 77**). Les techniques d'immunofluorescence<sup>26</sup> ont donc permis révéler les ICC et de comprendre leur organisation en réseau dans le tube digestif, en relation étroite avec les plexus nerveux et les cellules musculaires lisses. Une des premières caractéristiques des ICC qui avait retenu l'attention de Cajal<sup>27</sup> est leur arrangement en réseau. La coloration historique au bleu de méthylène mais surtout l'immunofluorescence anti-KIT permettent d'observer

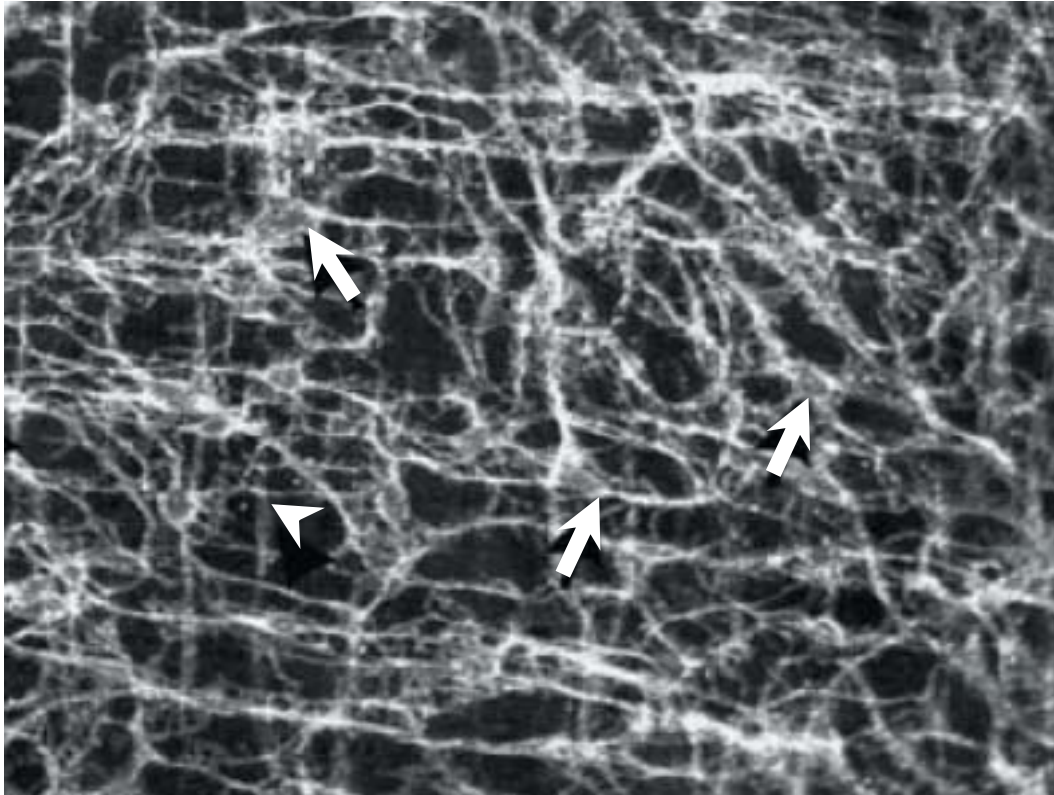
<sup>25</sup> Également appelées ICC-DMP, pour « plexus nerveux de la couche musculaire profonde »

<sup>26</sup> Utilisation d'un anticorps anti-KIT, ou ACK2, couplé à un fluorochrome tel que la fluorescéine (verte).

<sup>27</sup> Cajal décrit les ICC comme des « neurones interstitiels ».

cette organisation particulière en deux dimensions, voire en trois dimensions grâce à la microscopie confocale (**Figure 14**).

**Figure 14 : Organisation en réseau des ICC dans l'intestin grêle de souris (d'après TORIHASHI, HORISAWA et WATANABE, 1999)**



Visualisation des ICC par immunofluorescence anti-KIT. On observe ici les ICC-MY (flèches) et les ICC-DMP (têtes de flèches) dans un arrangement complexe en réseau. La barre d'échelle équivaut à 20  $\mu\text{m}$ .

## II - MORPHOLOGIE DES CELLULES INTERSTITIELLES DE CAJAL

C'est la microscopie électronique (**Figure 15**) qui a permis de préciser la morphologie des ICC (SANDERS, KOH et WARD, 2006). L'ICC typique possède un corps cellulaire assez allongé présentant plusieurs fins prolongements cytoplasmiques, de section ronde et non aplatie et reposant sur une lame basale qui peut être discontinue. Deux à cinq prolongements primaires donnent naissance à des processus secondaires et tertiaires. Le noyau ovoïde, délimité par une chromatine marginée, est entouré par une fine couronne cytoplasmique qui s'élargit dans les prolongements. Le cytoplasme présente des caractéristiques ultra-structurales : de nombreuses mitochondries, de gros faisceaux de filaments intermédiaires (10 nm) et de moindres filaments fins (5 nm, actine) en l'absence de filaments épais (myosine), des microtubules, un volumineux appareil de Golgi, un abondant système de citernes interconnectées de réticulum endoplasmique lisse et des cavéoles. Certains de ces détails sont difficilement perceptibles voire invisibles en microscopie photonique et rendent parfois

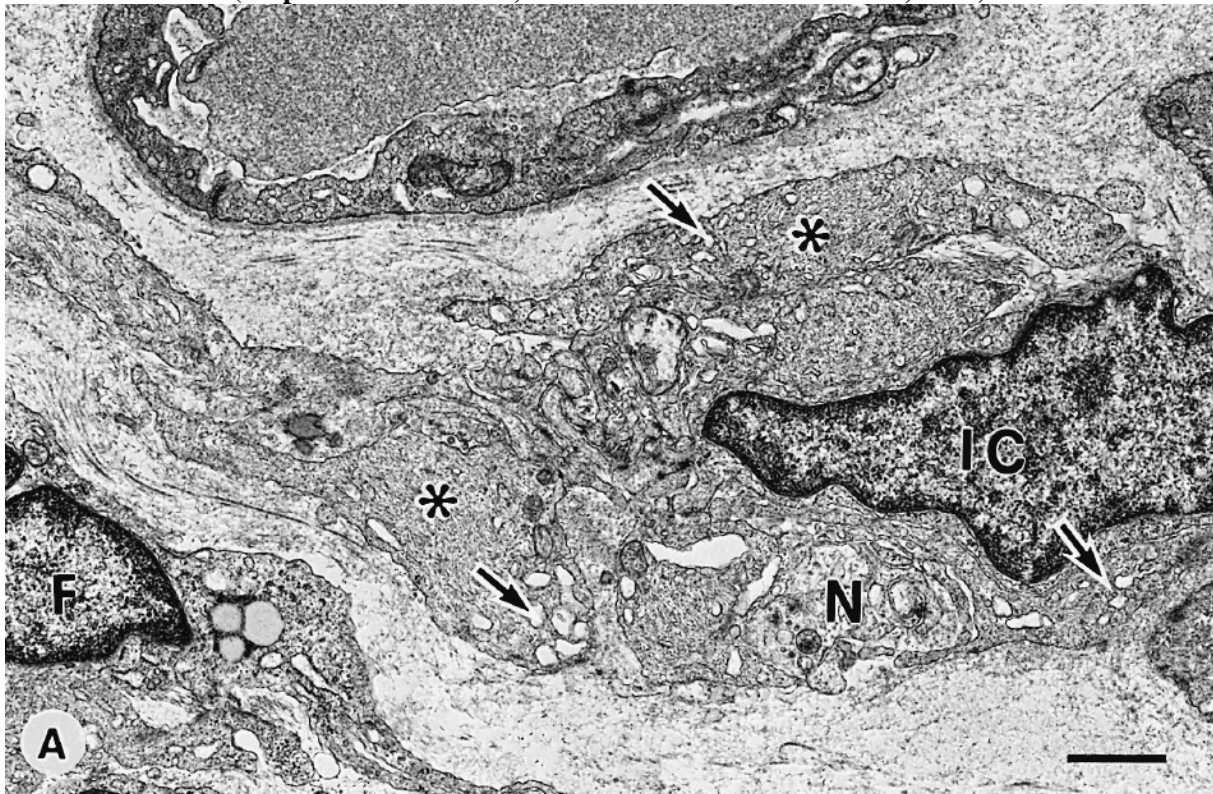


délicate l'identification des ICC. De plus, la morphologie peut varier entre les différentes classes d'ICC. Ainsi, même en microscopie électronique, l'aspect des ICC s'éloigne quelque peu du profil type et évolue dans un spectre morphologique allant des fibres musculaires lisses (cellules myoïdes) aux fibroblastes (cellules fibroïdes) (HUIZINGA et FAUSSONE-PELLEGRINI, 2005).

La microscopie électronique permet d'observer des contacts cellulaires établis :

- entre ICC par de larges zones de contact entre les processus cytoplasmiques,
- entre ICC et cellules musculaires lisses par des contacts étroits de type gap-jonctions,
- et entre ICC et structures nerveuses par des contacts intimes avec formation occasionnelle de jonctions de type synaptique.

**Figure 15 : Cellule interstitielle de Cajal en microscopie électronique à transmission (d'après TORIHASHI, HORISAWA et WATANABE, 1999)**



On observe une ICC (noyau annoté **IC**) et son cytoplasme périnucléaire comportant de nombreux filaments intermédiaires (étoiles) et du réticulum endoplasmique lisse (flèches). Des expansions cytoplasmiques entourent intimement une fibre nerveuse (**N**). On distingue également un fibroblaste (**F**) qui contient moins de filaments intermédiaires. La barre d'échelle indique 1 µm.

Bien que ressemblant à des neurones, il est à présent clairement établi que les ICC n'en sont pas, et que leur origine est mésodermique comme les fibres musculaires auxquelles elles sont associées (LECOIN, GABELLA et LE DOUARIN, 1996).

Dans le tube digestif, les mastocytes expriment aussi *Kit* et sont également marqués en immunofluorescence. Néanmoins, leur localisation, principalement dans la sous-muqueuse et à proximité des vaisseaux, ainsi que leur morphologie<sup>28</sup> permettent de les distinguer. Leur présence sert de témoins positifs aux réactions d'immunofluorescence. L'utilisation d'anticorps anti-KIT est donc relativement spécifique et est considérée comme la référence actuelle pour le marquage des ICC.

### III - PHYSIOLOGIE DES CELLULES INTERSTITIELLES DE CAJAL

Il est à présent établi que les ICC jouent un rôle primordial dans la genèse et la coordination des contractions intestinales aboutissant au péristaltisme. Ces cellules sont excitables et dotées d'une activité électrique spontanée *in vivo* et *in vitro*. Leur potentiel de membrane n'est pas stable et présente des dépolarisations et des repolarisations oscillantes. Ce phénomène électrique est mesurable par des électrodes sur des cultures cellulaires d'ICC, sur les muscles lisses intestinaux *in situ* ou sur des organes isolés. Il porte le nom d'ondes lentes. Ces ondes lentes n'entraînent aucune activité mécanique directe des fibres musculaires lisses et ne sont en aucun cas des potentiels d'action mais elles peuvent en générer si elles parviennent à élever le potentiel membranaire des fibres musculaires lisses au dessus du seuil d'environ  $-37$  mV. La transmission de ces potentiels d'action par des courants locaux entre cellules musculaires avoisinantes aboutit à leur contraction (**Figure 16**). Les oscillations du potentiel, transmises aux cellules musculaires, font en fait cycliquement passer le potentiel de membrane de ces dernières d'un état où leurs canaux calciques voltage-dépendants sont à une faible probabilité d'ouverture<sup>29</sup> à un état où ils sont à une forte probabilité d'ouverture<sup>30</sup>. Le seuil d'excitation correspond ainsi au degré de dépolarisation permettant une entrée de  $Ca^{2+}$  suffisante pour assurer le couplage excitation-contraction.

La fréquence des ondes lentes est caractéristique pour chaque espèce et pour un segment donné du tractus digestif. L'amplitude des ondes lentes, le niveau maximum de polarisation (potentiel de repos) et le seuil de genèse de potentiels d'action diffèrent également (SANDERS, KOH et WARD, 2006). Une onde lente comprend une phase de dépolarisation rapide suivie d'une brève repolarisation puis d'une phase dite « en plateau »

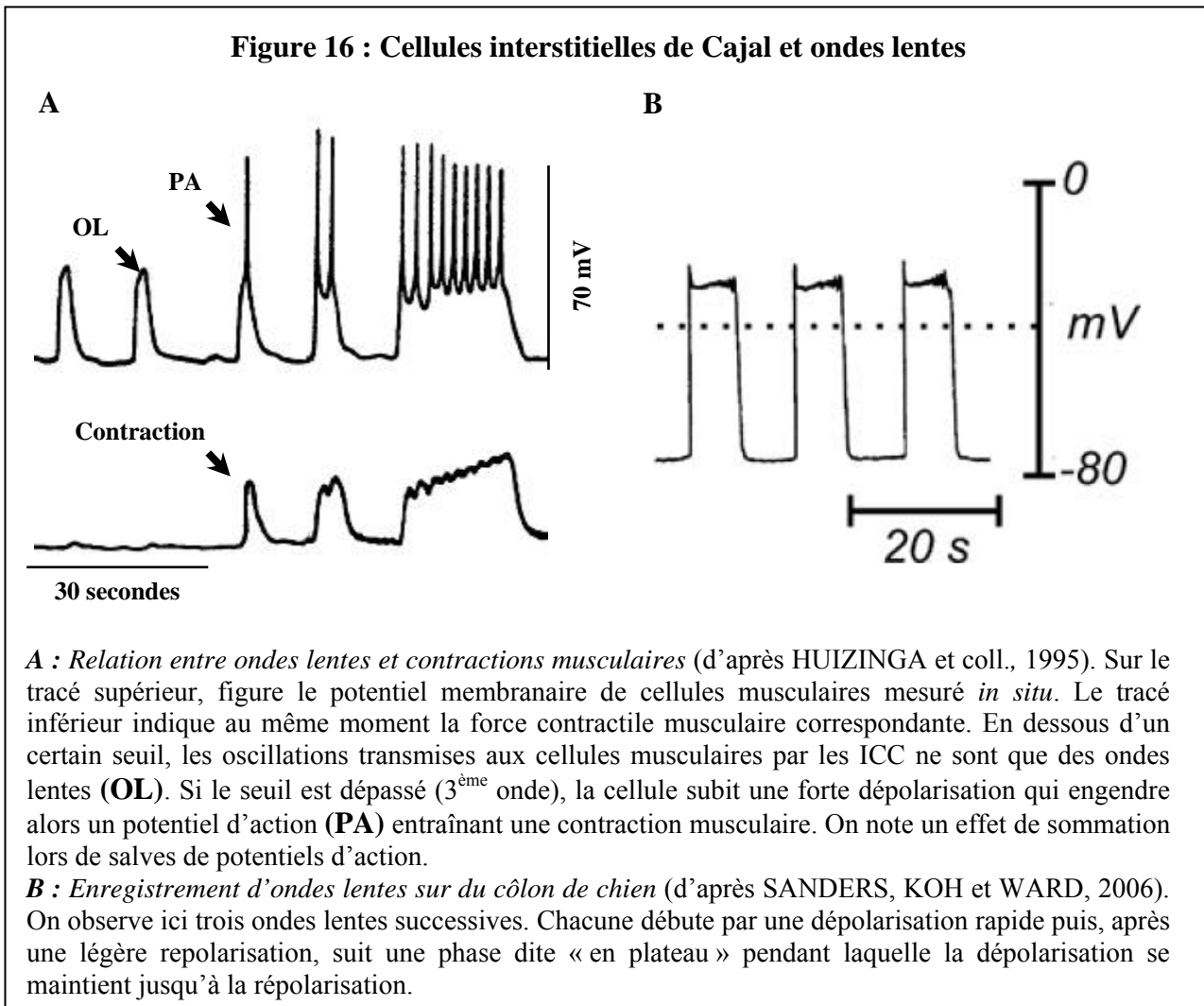
---

<sup>28</sup> Les mastocytes sont des cellules ovoïdes non jointives au cytoplasme abondant. De manière caractéristique, ils portent des granulations intracytoplasmiques qui, à la coloration de Giemsa, apparaissent métachromatiques (coloration violacée intense).

<sup>29</sup> Du potentiel de repos des ICC à l'intervalle maximum des ondes lentes, soit  $-80$  à  $-55$  mV environ.

<sup>30</sup> Du pic de dépolarisation jusque  $-40$  à  $-25$  mV.

précédant la repolarisation (**Figure 16-B**). Les ondes lentes sont produites de façon continue et indépendamment des stimuli nerveux. En revanche, systèmes nerveux et hormonal permettent de réguler la fréquence des contractions intestinales. De ce point de vue, les ICC peuvent être considérées, pour le tube digestif, comme l'analogie véritable du tissu nodal pour le myocarde : elles agissent comme un pacemaker.



### A - Genèse des ondes lentes

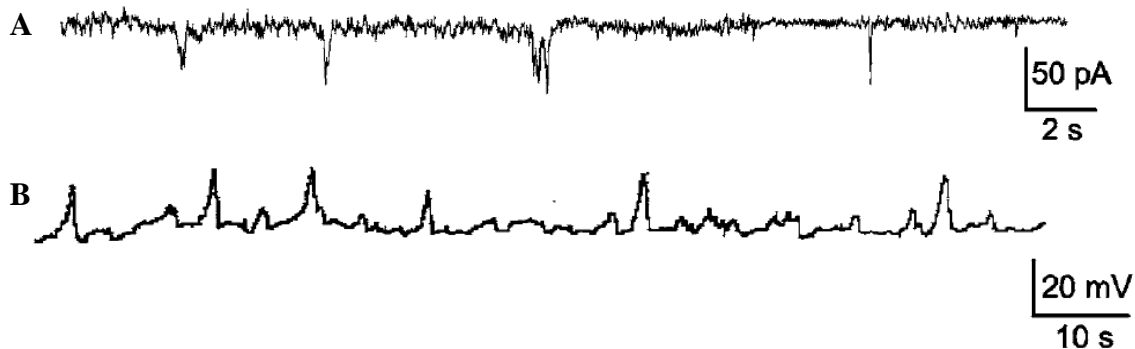
Le mécanisme exact à l'origine des ondes lentes est encore mal connu. SANDERS, KOH et WARD (2006) ont cependant proposé un modèle basé en partie sur la synthèse de leurs observations. C'est ce modèle que nous présentons ici.

Les muscles lisses intestinaux, les ICC-MY *in situ* ou les cultures d'ICC présentent des fluctuations du potentiel de membrane. Ces fluctuations sont la conséquence de petits courants entrants ou courants pacemaker que génèrent l'activité pacemaker des ICC. A l'échelle d'une cellule, la somme des courants pacemaker se traduit par un courant unitaire se manifestant par un potentiel unitaire que l'on peut observer sur des ICC isolées (**Figure 17**).



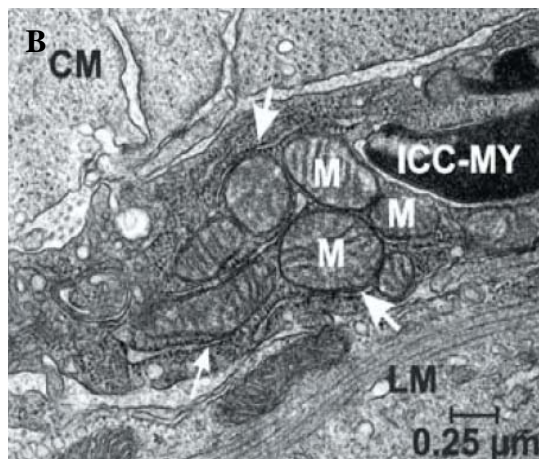
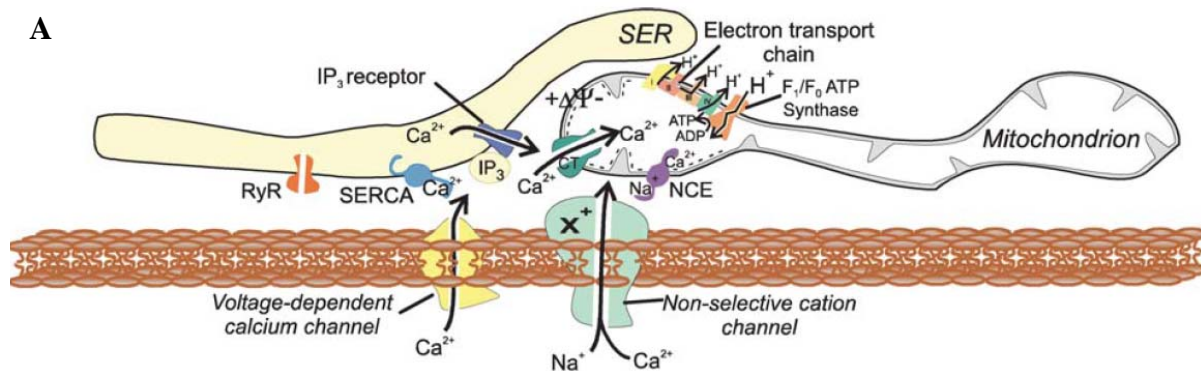
Les courants pacemaker surviennent de manière stochastique sur les ICC, et le bruit de fond enregistré sur des cultures cellulaires ou *in situ* correspond à la sommation de tous les potentiels unitaires produits par les ICC. Pour expliquer leur genèse, SANDERS, KOH et WARD (2006) soulignent la relation étroite observée entre membrane plasmique, réticulum endoplasmique lisse et mitochondries dans les ICC, cette association délimitant un espace cytoplasmique étroit. Ce complexe est appelé unité pacemaker (**Figure 18**).

**Figure 17 : Courant et potentiel unitaires des ICC (d'après SANDERS, KOH et WARD, 2006)**



*A* : Courant unitaire enregistré sur une ICC isolée. *B* : Potentiel unitaire enregistré sur une ICC isolée. L'aspect irrégulier des enregistrements traduit la survenue stochastique de ces événements à la surface des ICC.

**Figure 18 : Unité pacemaker des ICC (d'après SANDERS, KOH et WARD, 2006)**



*A* : Schématisation de l'unité pacemaker. **SER** : Réticulum sarcoplasmique lisse ; **RyR** : Récepteur à la Ryanodine ; **SERCA** : Pompe à calcium. Les trois partenaires de l'unité pacemaker sont le réticulum endoplasmique lisse, la mitochondrie et la membrane plasmique. Ils délimitent un sous-compartiment du cytoplasme.

*B* : Unité pacemaker sur une ICC-MY en microscopie électronique à transmission. On note de nombreuses mitochondries (**M**) étroitement liées au réticulum sarcoplasmique lisse (flèches) et à la membrane plasmique. **LM** : Fibre musculaire longitudinale ; **CM** : Fibre musculaire circulaire.

Le sous-compartiment cytoplasmique délimité étant étroit, les partenaires présents sont plus sensibles aux faibles variations de concentrations. Tous s'accordent à dire que l'élément déclencheur du courant pacemaker est le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis les réserves du réticulum endoplasmique lisse et ce, sous contrôle du récepteur de l' $\text{IP}_3$ . Dans l'espace cytoplasmique limité de l'unité pacemaker, cette augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  provoquerait l'ouverture de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  à la surface de la mitochondrie. Comme cette dernière n'est pas en équilibre avec le cytoplasme, l'ouverture des canaux tend à faire entrer plus de  $\text{Ca}^{2+}$  que le réticulum endoplasmique en a relargué. Par conséquent, la baisse du  $\text{Ca}^{2+}$  local déclencherait l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$ ) sur la membrane cytoplasmique permettant un courant entrant : le courant pacemaker. Ces hypothèses découlent de plusieurs observations :

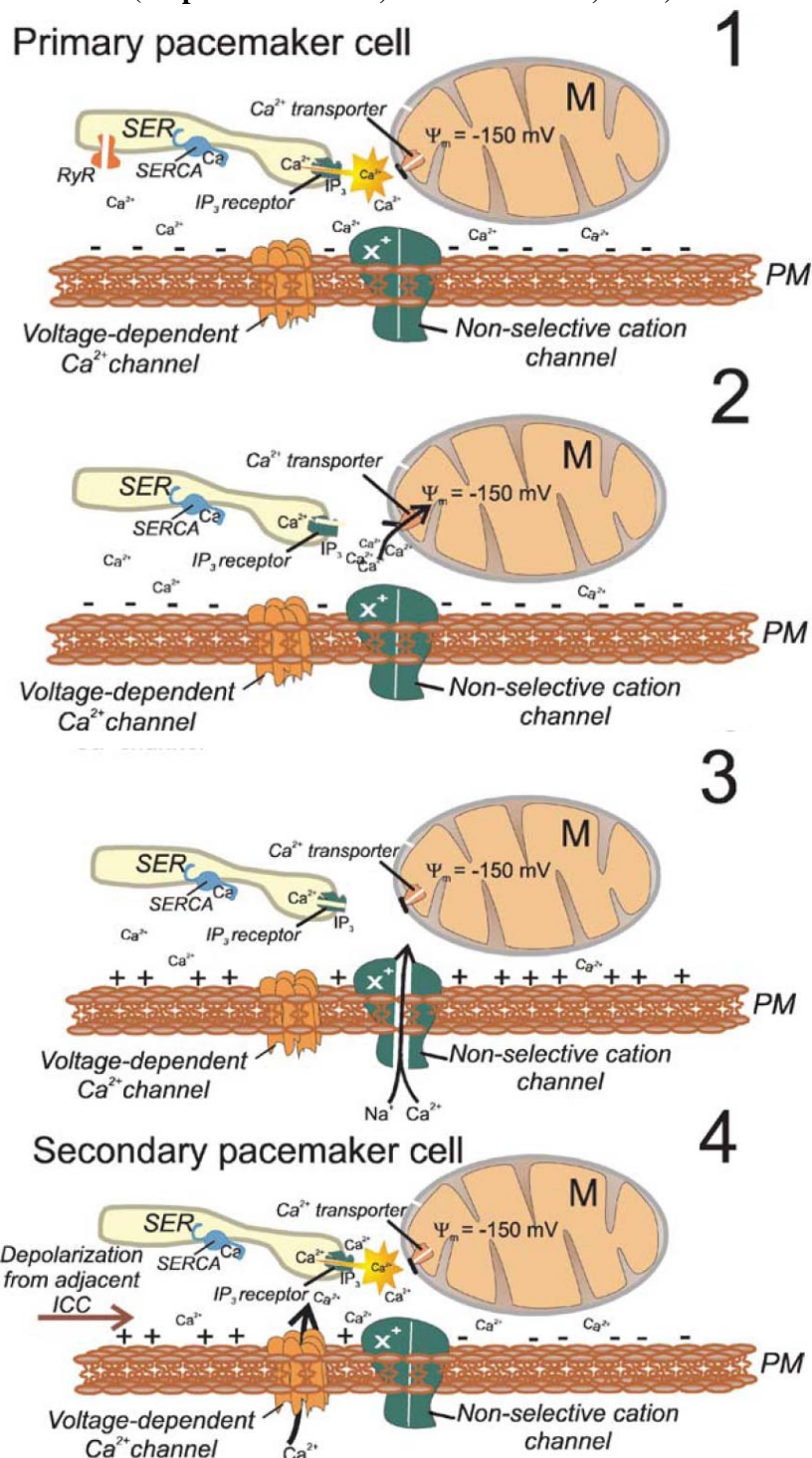
- l'activation du courant pacemaker est précédée d'une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie,
- l'inhibition de la capture du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie bloque la formation de courant pacemaker,
- une conductance cationique non sélective inhibée par le  $\text{Ca}^{2+}$  a été observée sur les ICC de souris.

La nature-même du canal permettant le courant entrant est discutée. A ce stade, il n'y a cependant toujours pas d'onde lente produite. Il est nécessaire avant tout que le courant pacemaker se propage. Pour cela, l'intervention d'un canal  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendant à proximité des unités pacemaker est envisagée. Contrairement au canal des cellules musculaires, celui-ci ne serait pas inhibé par la dihydropyridine. Sensible au courant pacemaker de l'unité voisine, il permettrait une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  au voisinage des récepteurs à l' $\text{IP}_3$ . De nombreux éléments suggèrent que ceux-ci puissent se comporter comme des canaux- $\text{Ca}^{2+}$  à activité  $\text{Ca}^{2+}$ -induite. Ils libèreraient du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'espace cytoplasmique, entraînant la même cascade réactionnelle que précédemment. On aboutit alors progressivement à une synchronisation des unités pacemaker avoisinantes mais également des ICC entre elles grâce à leurs jonctions intercellulaires. La synchronisation progressive, durant laquelle la fréquence des courants pacemaker augmente, aboutit finalement à la survenue massive de potentiels unitaires responsables de la phase dite « en plateau » des ondes lentes. Cette théorie est soutenue par l'observation d'une conductance du  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendante responsable de la dépolarisation et de la propagation des ondes lentes.

Selon ce modèle, résumé dans la **figure 19**, les molécules qui permettraient une augmentation de l' $\text{IP}_3$  auraient un effet chronotrope positif, et inversement pour les antagonistes. Or, il s'avère que la stimulation muscarinique, qui augmente la production d'

IP<sub>3</sub>, élève bien la fréquence des courants pacemaker des ICC. A l'heure actuelle, l'implication de KIT dans la genèse des ondes lentes n'est en revanche toujours pas expliquée.

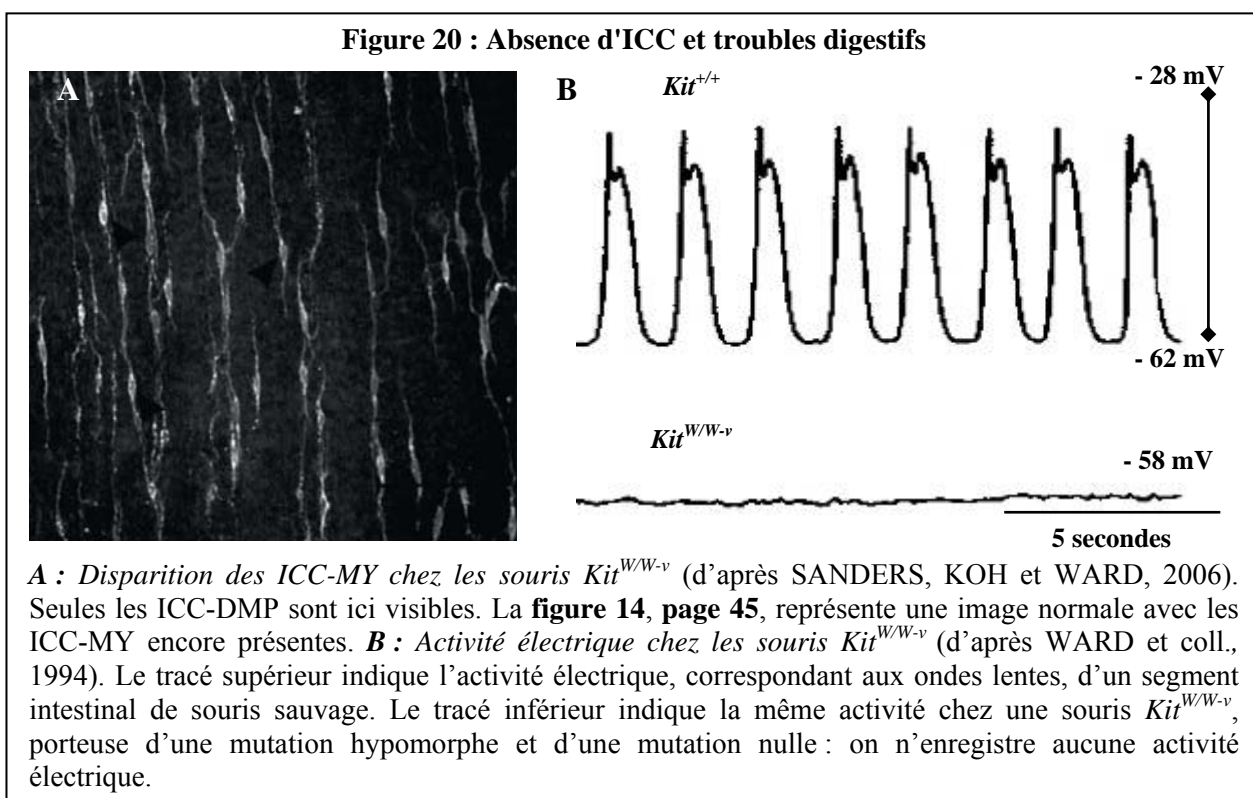
**Figure 19 : Modèle proposé pour la genèse et la propagation des courants pacemaker (d'après SANDERS, KOH et WARD, 2006)**



Le courant pacemaker a pour origine le relargage de Ca<sup>2+</sup> par le réticulum (1). Le Ca<sup>2+</sup> est ensuite capté, mais en excès, par la mitochondrie (2) avec pour conséquence un abaissement du Ca<sup>2+</sup> localement, ce qui provoque l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs (3). C'est ce courant entrant qui correspond au courant pacemaker. Sur les unités pacemaker ou les cellules voisines, la dépolarisation à proximité entraîne l'ouverture d'un canal Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendant. Sous l'augmentation du Ca<sup>2+</sup>, le canal-récepteur de l'IP<sub>3</sub> s'ouvre et la réaction se répète de nouveau (4).

## B - Spécialisation des ICC

Chez la souris  $Kit^{W/W-v}$ , la coexistence d'une mutation nulle et d'une mutation de structure hypomorphe diminuant l'activité de KIT a permis de préciser la fonction des ICC. Chez ces individus, on observe une absence d'ICC-MY associée à l'absence totale d'ondes lentes malgré la présence des autres ICC. Les conséquences sur l'activité péristaltique de l'intestin grêle sont la génération de contractions diminuées et désorganisées (**Figure 20**). Cette insuffisance prédispose gravement ces animaux à la survenue d'un iléus paralytique mortel (HUIZINGA et coll., 1995).



La classification des ICC n'est donc pas seulement topographique mais également fonctionnelle. A l'heure actuelle, il ressort principalement que seules les ICC-MY, ICC-IM et ICC-SEP sont capables de générer des potentiels unitaires et ont donc véritablement une activité pacemaker. A l'instar de ce qui se produit dans le cœur, les ICC-MY semblent donner le rythme dominant. En leur absence, ICC-IM et ICC-SEP peuvent prendre le relais mais à un rythme plus faible. Par leurs relations synaptiques avec les neurones entériques, les ICC-IM agissent comme un intermédiaire entre système nerveux autonome et muscle lisses. Ils intègrent ainsi les signaux inhibiteurs (cholinergiques) ou excitateurs (nitroergiques). Entre ICC-IM et neurones entériques, l'espace synaptique n'est parfois que deux 20 nm alors que neurones et cellules musculaires sont éloignées d'au moins 100 nm. La membrane des ICC-IM en regard des synapses présente de plus un phénotype morphologique et biochimique de

synapses du système nerveux central avec expression de protéines typiquement post-synaptiques, qui en revanche ne sont pas retrouvées sur les cellules musculaires. De plus, elles pourraient agir comme des mécano-récepteurs sensibles à la distension du tube digestif (SANDERS, KOH et WARD, 2006).

**En résumé, les ICC sont les cellules pacemaker du tube digestif et elles expriment *Kit*. Leur développement, leur survie et leur activité dépendent de KIT. Les ondes lentes sont la manifestation électro-physiologique de leur activité. Les propriétés des ICC ont amené les scientifiques à chercher leur présence dans d'autres organes comportant des fibres musculaires lisses comme l'urètre de la souris (PEZZONE et coll., 2003) ou la vessie de l'Homme (SHAFIK et coll., 2004).**



# L'Imatinib mésylate

---

L'Imatinib mésylate, que nous appellerons Imatinib par la suite, a été développé par le laboratoire Novartis sous le nom de Glivec<sup>®</sup> en Europe ou de Gleevec<sup>®</sup> aux Etats Unis. Il s'agit d'une molécule utilisée en cancérologie, dans les thérapies moléculaires ciblées, notamment chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) ou de GIST (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003).

## I - DEVELOPPEMENT DES THERAPIES MOLECULAIRES CIBLEES ET DECOUVERTE DE L'IMATINIB

Les protéines à activité tyrosine kinase sont des enzymes qui transfèrent des groupes phosphates de molécules d'ATP sur des groupes hydroxyles, contenus dans des résidus tyrosines de molécules transductrices de signaux. La phosphorylation de ces molécules transductrices de signaux constitue l'une des étapes clés dans les modifications dramatiques de la croissance tumorale. Les tyrosine kinases jouent un rôle central dans les signaux de transduction. Elles constituent des relais dans un réseau complexe de molécules signal interdépendantes, qui, au final affectent la transcription des gènes dans le noyau. La régulation stricte de l'activité tyrosine kinase contrôle les étapes cruciales de la vie cellulaire : le cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, la motilité et l'apoptose ou la survie cellulaire. Ces protéines à activité tyrosine kinase présentent des anomalies de régulation ou sont surexprimées dans de nombreux cancers (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003).

La translocation chromosomique du chromosome de Philadelphie – t(9;22)<sup>31</sup> – a été découverte dans la LMC. Elle entraîne la synthèse d'une protéine hybride de fusion, BCR-ABL<sup>32</sup>, à activité tyrosine kinase dérégulée car constitutivement activée, qui est responsable de la pathogénie de la maladie (GUILHOT, 2004). Suite à cette découverte, les investigations se sont naturellement orientées vers la recherche d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques pour le traitement de tels cancers.

---

<sup>31</sup> La translocation correspond à un échange de matériel chromosomique entre deux chromosomes non homologues. La notation t(9;22) indique que l'échange se fait ici entre le chromosome 9 et le chromosome 22.

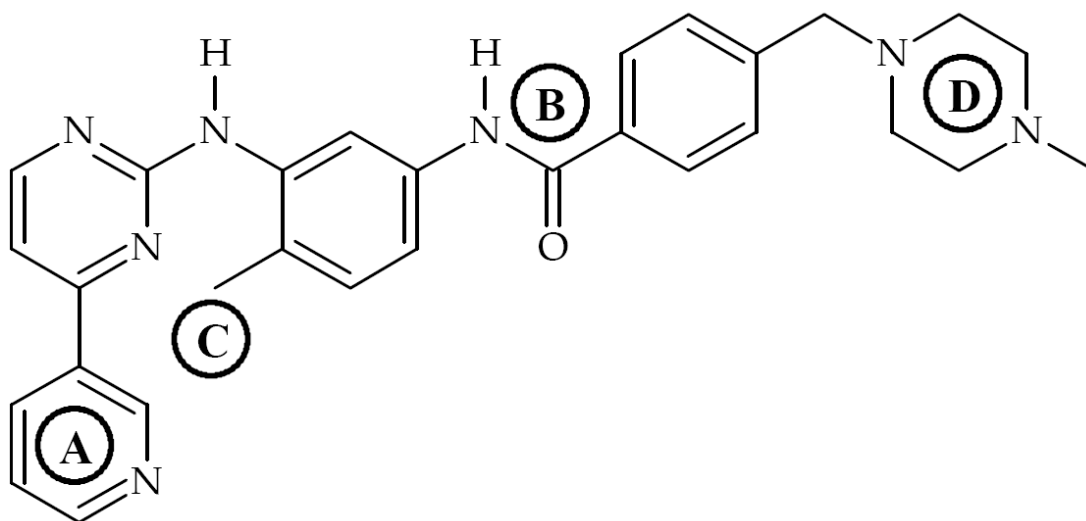
<sup>32</sup> En raison de la translocation, une partie du gène *Bcr* fusionne avec le gène *Abl* qui code la protéine ABL. La protéine de fusion qui en résulte a un poids moléculaire de 210 kDa et est également appelée p210<sup>BCR-ABL</sup>. Dans certains cas, la fusion génère une protéine de 185 kDa, p185<sup>BCR-ABL</sup>.

ANAFI et coll. (1993) montrent que la tyrphostine a des propriétés inhibitrices sur l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL et suggèrent qu'il est possible de trouver d'autres composés spécifiques du traitement des leucémies associées à ABL (ANAFI et coll., 1993). Plusieurs tyrphostines ont ainsi été étudiées. Certaines entraînaient une diminution de la croissance des lignées cellulaires de la LMC à des concentrations micro-molaires et associée à une inhibition de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL (KAUR et coll., 1994). Les tyrphostines sont compétitives envers l'ATP, ou un autre substrat, ou les deux (KOVALENKO et coll., 1997). Malgré leur activité *in vitro*, les tyrphostines n'ont jamais été développées pour un usage clinique (DEININGER et DRUKER, 2003).

En 1988, l'herbimycine A, un antibiotique synthétisé par *Streptomyces hygroscopicus*, est découverte pour ses propriétés inhibitrices de la protéine BCR-ABL (UEHARA et coll., 1988). On a d'abord pensé que l'herbimycine A inhibait BCR-ABL mais il a été ensuite démontré qu'elle ne faisait qu'accélérer sa dégradation (SHIOTSU, SOGA et AKINAGA, 2002).

BUCHDUNGER et coll. (1995, 1996) rapportent la synthèse d'une série de composés possédant une activité inhibitrice spécifique à l'encontre du PDGF-R et de la protéine ABL. Un composé s'est particulièrement distingué, le 2-phénylaminopyrimidine. Il possède une faible activité inhibitrice envers les sérine/thréonine kinases et les tyrosines kinases mais il sert de chef de file pour la synthèse de nombreux dérivés (DEININGER et DRUKER, 2003).

**Figure 21 : Structure de l'Imatinib mésylate (d'après DEININGER et DRUKER, 2003)**



*Développement de l'Imatinib à partir d'une 2-phénylaminopyrimidine* : (A) : L'activité dans les essais cellulaires a été augmentée par l'introduction d'un groupe 3-L-pyridyle sur la position 3-L de la pyrimidine. (B) : L'activité contre les tyrosines kinases a été stimulée par l'addition d'un groupe benzamide sur l'anneau phényle. (C) : L'attachement d'un groupe « flag-méthyle » en ortho sur l'anneau diaminophényle a fortement réduit l'activité contre la protéine kinase C. (D) : L'addition d'une N-méthylpiperazine a augmenté la solubilité aqueuse et biodisponibilité orale.



Une étape importante, dans le développement de ces dérivés, est la substitution à la position 6 de l'anneau anilino-phényle qui diminue l'activité inhibitrice envers les sérine/thréonine kinases. L'introduction d'un groupe méthyle à cette position augmente l'activité envers les tyrosines kinases. L'activité contre le récepteur tyrosine kinase du PDGF-R a été stimulée par l'introduction d'un groupe benzamide sur l'anneau phényle. Ces composés possèdent aussi une activité inhibitrice envers la protéine ABL (DEININGER et DRUKER, 2003). Un de ces composés, CGP57148 (STI571, maintenant Imatinib mésylate) a émergé comme le chef de file pour le développement clinique (**Figure 21**). L'introduction d'un groupe N-méthylpiperazine à une des extrémités de la chaîne a considérablement augmenté l'hydrosolubilité et donc la biodisponibilité orale de la molécule (DEININGER et DRUKER, 2003).

## II - PROPRIETES ET MECANISMES D'ACTION DE L'IMATINIB

### A - Propriétés de l'Imatinib

L'Imatinib est un inhibiteur sélectif de certaines protéines kinases : la kinase intracellulaire ABL, les récepteur transmembranaires KIT et PDGF-R (DEMETRI et coll., 2002).

#### 1) *Etude in vitro*

##### $\alpha$ – Etude sur des kinases

Pour préciser le spectre d'activité, les effets de l'Imatinib mésylate ont été testés sur plusieurs sérine/thréonine kinases et tyrosine kinases par un test *in vitro* sur des kinases obtenues par immunoprécipitation ou purification de protéines. L'Imatinib mésylate possède une activité envers la protéine ABL et ses dérivés activés V-ABL, BCR-ABL, et TEL-ABL à partir de valeurs de  $CI_{50}^{33}$  de 0,25  $\mu$ M (**Cf. première colonne du tableau 5**). L'activité contre PDGF-R et KIT est observée pour des  $CI_{50}$  de même ordre de grandeur. A l'inverse les valeurs de  $CI_{50}$  pour de nombreuses autres tyrosine et sérine/thréonine kinases sont généralement au moins cent fois supérieures. Ces tests *in vitro* montrent la haute sélectivité de l'Imatinib (DEININGER et DRUKER, 2003).

---

<sup>33</sup> Concentration inhibitrice en Imatinib entraînant 50 % de réduction de l'activité tyrosine kinase

**Tableau 5 : Inhibition des protéines kinases par l'Imatinib  
(d'après DEININGER et DRUKER, 2003)**

Kinases	CI <sub>50</sub> sur l'activité tyrosine kinase de la kinase purifiée	CI <sub>50</sub> sur l'activité tyrosine kinase de cultures cellulaires
	μM	
c-Abl	0,2 ; 0,025	
v-Abl	0,038	0,1 – 0,3
p210 <sup>BCR-ABL</sup>	0,025	0,25
p185 <sup>BCR-ABL</sup>	0,025	0,25
Tel-Abl		0,35
PDGF-R α and β		0,1
Tel-PDGF-R		0,15
c-Kit		0,1
Flt-3		> 10
c-fms and v-fms		> 10
c-Src	> 100	
v-Src		> 10
c-Lyn	> 100	
c-Fgr	> 100	
Lck	9,0	
Syk (TPK-IIIB)	> 100	
Jak-2	> 100	> 100
EGF-R	> 100	> 100
Insulin receptor		> 100
IGF-IR		> 100
FGF-R1	31,2	
VEGF-R2 (Kdr)	10,7	
VEGF-R1 (Flt-1)	19,5	
Tie-2 (Tek)	> 50	
c-Met	> 100	
PKA	> 500	
PPK	> 500	
PKCα, β1, β2, γ, δ, ε, ζ or η	> 100	
Protein kinase CK-1, CK-2	> 100	
Cde2/cyclin B	> 100	

### **β – Etude sur des lignées cellulaires**

Pour déterminer si l'Imatinib est capable de traverser la membrane cellulaire, les tests sont poursuivis sur des cellules intactes. La plupart des investigations utilise des lignées cellulaires créées pour exprimer *Bcr-Abl* ou des lignées cellulaires issues de patients atteints de LMC et en crise blastique. Ces expériences montrent que les valeurs de  $CI_{50}$  nécessaires à l'inhibition de la phosphorylation de la tyrosine BCR-ABL varient de 0,25 à 0,5  $\mu\text{M}$ , soit des valeurs environ dix fois supérieures à celles mesurées sur les extraits de kinases (**Cf. deuxième colonne du tableau 5**). Les causes précises de cette différence ne sont pas connues, mais doivent être en partie liées aux mécanismes de régulation intracellulaires qui affectent la liaison de l'Imatinib à la kinase ABL (DEININGER et DRUKER, 2003).

L'incubation de diverses lignées cellulaires exprimant BCR-ABL avec de l'Imatinib entraîne une inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose dans la grande majorité des cas. Les valeurs de  $CI_{50}$  nécessaires à l'inhibition de la prolifération cellulaire sont identiques aux valeurs nécessaires à l'inhibition de la phosphorylation de la tyrosine kinase observées dans les essais sur les lignées cellulaires. Il est important de noter que les valeurs de  $CI_{50}$  observées dans ces différentes études sont largement inférieures aux concentrations plasmatiques qui peuvent être obtenues chez les patients (DEININGER et DRUKER, 2003).

Sur les nombreuses lignées cellulaires étudiées, deux seulement présentaient une résistance primaire à l'Imatinib. Ces deux lignées étaient issues de patients atteints de LMC à des stades très avancés et en crise blastique. Les cellules dérivées de crise blastique de LMC présentent de très nombreuses anomalies génétiques qui s'ajoutent à la translocation chromosomique de Philadelphie. Ces anomalies très diverses expliqueraient en partie la résistance primaire à l'Imatinib (DEININGER et DRUKER, 2003).

### **χ – Etude sur des cellules primaires**

Pour déterminer les effets de l'Imatinib sur les précurseurs hématopoïétiques, des tests de formation de colonies ont été réalisés sur des cellules mononucléées de patients atteints de LMC et d'individus normaux. La formation des colonies érythroïdes et myéloïdes est réduite dans le cas des cellules LMC avec des concentrations en Imatinib supérieures à 10  $\mu\text{M}$ . A l'inverse, il y a relativement peu d'effet sur les cellules normales (DRUKER et coll., 1996 ; DEININGER et coll., 1997). Cette différence d'action observée est maximale pour des doses d'environ 1  $\mu\text{M}$ , ce qui correspond à la concentration plasmatique obtenue chez les patients traités avec des doses thérapeutiques d'Imatinib.

## 2) Etude chez l'animal

La lignée cellulaire myéloïde murine 32D, créée pour exprimer BCR-ABL (cellules 32D<sup>BCR-ABL</sup>), forme des tumeurs chez les souris syngéniques. Un traitement à base d'Imatinib, administré une fois par jour par voie intra-péritonéale à raison de 10 à 50 mg/kg, a été mis en place une semaine après l'injection des cellules 32D<sup>BCR-ABL</sup>. Ce traitement entraîne une inhibition dose-dépendante de la croissance tumorale. A l'inverse, l'Imatinib (50 mg/kg) était inefficace envers les tumeurs induites par des cellules 32D v-Src-transformées. Ces expériences montrent de nouveau la spécificité de l'Imatinib (DRUKER et coll., 1996).

L'efficacité de l'Imatinib a également été testée envers la lignée cellulaire KU812 issue de patient humain atteint de LMC et injectée à des souris nude<sup>34</sup>. Ces expériences montrent qu'une inhibition continue de BCR-ABL est nécessaire pour obtenir un effet anti-tumoral maximal. Dans ce modèle, le traitement reposait sur trois administrations quotidiennes de 50 mg/kg d'Imatinib par voie intra-péritonéale ou sur une administration quotidienne de 160 mg/kg d'Imatinib *per os*, pendant 11 jours consécutifs. Ces traitements entraînent une inhibition continue de l'activité tyrosine kinase de p210<sup>BCR-ABL</sup> et permettent une survie sans développement de tumeur suite à l'injection de cellules KU812. De plus, un traitement à 160 mg/kg, administrés *per os* toutes les 8 heures pendant 11 jours, inhibe la croissance tumorale même dans les cas les plus avancés. Les nodules tumoraux commencent à régresser dans les 48 heures suivant le début du traitement. A partir du huitième jour, la tumeur n'est plus mesurable chez tous les animaux traités. Sur les 12 souris étudiées, 4 sont mortes entre les 48<sup>ème</sup> et 60<sup>ème</sup> jours. En revanche, les 8 autres souris ont survécu, sans développer de tumeur, plus de 200 jours après le début du traitement. De plus, l'Imatinib n'inhibe pas la croissance tumorale sur des lors de greffe de cellules U937 n'exprimant pas BCR-ABL, ce qui démontre de nouveau sa spécificité (LE COUTRE et coll., 1999).

Enfin, l'Imatinib a été testé sur un modèle de transplantation de LMC plus perfectionné. Dans ces expériences, la moelle osseuse murine est infectée avec un vecteur rétroviral contenant le gène *Bcr-Abl* et ensuite transplantée sur des lignées syngéniques (PEAR et coll., 1998). Généralement, ces souris meurent de LMC en 3 jours. A l'inverse, les animaux traités avec l'Imatinib survivent mais les réponses sont toutefois variables et 25% des souris présentent une résistance primaire à l'Imatinib (WOLFF et ILARIA, 2001). Dans aucun des cas le traitement n'a cependant été capable de prévenir la maladie, même lorsque le traitement débutait 48 heures après l'injection de la moelle osseuse transfectée par *Bcr-Abl*. Aucune cause universelle de résistance n'a pu être établie dans cette étude. L'analyse des

---

<sup>34</sup> Souris athymiques et présentant une immunodéficience.

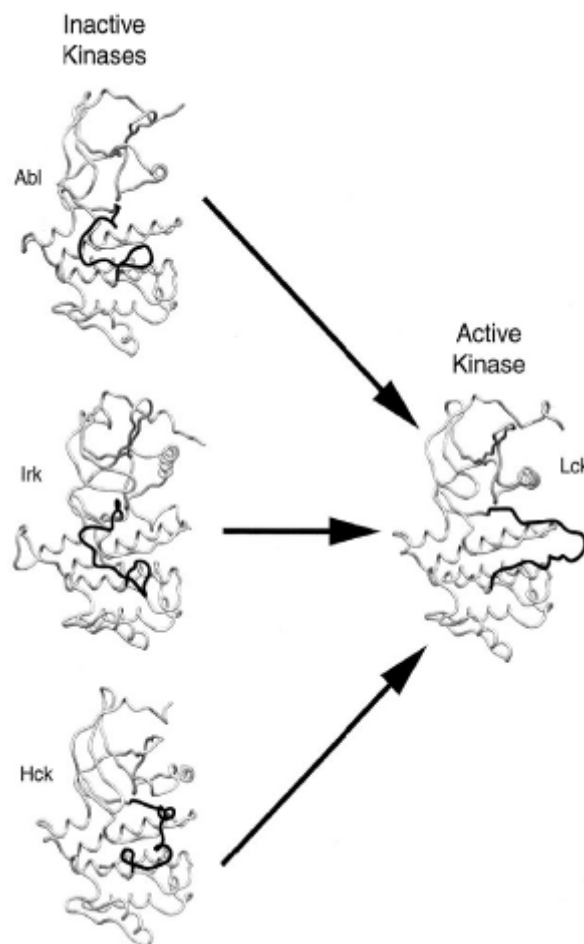
différents clones a toutefois montré la présence d'une déplétion clonale chez les animaux répondant à l'Imatinib, indiquant que ce composant est capable de cibler certains clones leucémiques.

## B - Mécanisme d'action de l'Imatinib

Le domaine catalytique des sérine/thréonine et tyrosine kinases possède une structure bilobée très conservée. Le lobe terminal NH<sub>2</sub> (lobe N) comprend un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  (hélice C) conservée. Au contraire, le lobe C est hélicoïdal. Dans l'interface entre les deux lobes, une série de résidus hautement conservés forment les sites de liaison à l'ATP et de catalyse (DEININGER et DRUKER, 2003).

L'état d'activation des kinases est dépendant de la position de la boucle d'activation (boucle A), une portion du lobe C. Dans les kinases actives, la boucle A est en conformation « ouverte », parce qu'elle s'écarte du site catalytique de la kinase (**Figure 22**).

**Figure 22 : Structure de la boucle d'activation dans les kinases ABL, IRK et HCK dans leurs états inactivé et activé (d'après DEININGER et DRUKER, 2003)**



A l'état inactif, les boucles A (représentées par un tracé noir épais) des trois kinases présentent des conformations différentes. En revanche, une fois la kinase activée, la boucle A adopte une conformation identique.

Les trois résidus NH<sub>2</sub> terminaux de la boucle A (acides aminés 381 et 383) contiennent un motif DFG (aspartate-phénylalanine-glycine) strictement conservé. Ce motif est crucial pour l'activité catalytique. L'aspartate 381 est capable de lier le Mg<sup>2+</sup>, qui coordonne le groupe phosphate de l'ATP. Le groupement carboxyle –COOH terminal de la boucle A sert de plateforme pour la liaison au substrat (DEININGER et DRUKER, 2003).

Bien que la conformation de la boucle A soit hautement conservée dans les kinases actives, on observe des différences considérables de conformation de la boucle A entre ces même kinase à l'état inactif. Les kinases sont activées par la phosphorylation des résidus clés sérine/thréonine ou tyrosine à l'intérieur de la boucle A (DEININGER et DRUKER, 2003).

Dans le cas de ABL, la tyrosine 393 est phosphorylée et s'écarte du centre de la kinase, permettant ainsi la liaison du substrat. Dans l'état inactivé de ABL, la tyrosine 393 n'est pas phosphorylée et elle recouvre le centre de la kinase. Elle mime ainsi un substrat en formant des liaisons hydrogènes avec l'asparagine 363. Dans cette conformation, la bouche de la kinase est occluse, empêchant ainsi la liaison du substrat (SCHINDLER et coll., 2000 ; NAGAR et coll., 2002)

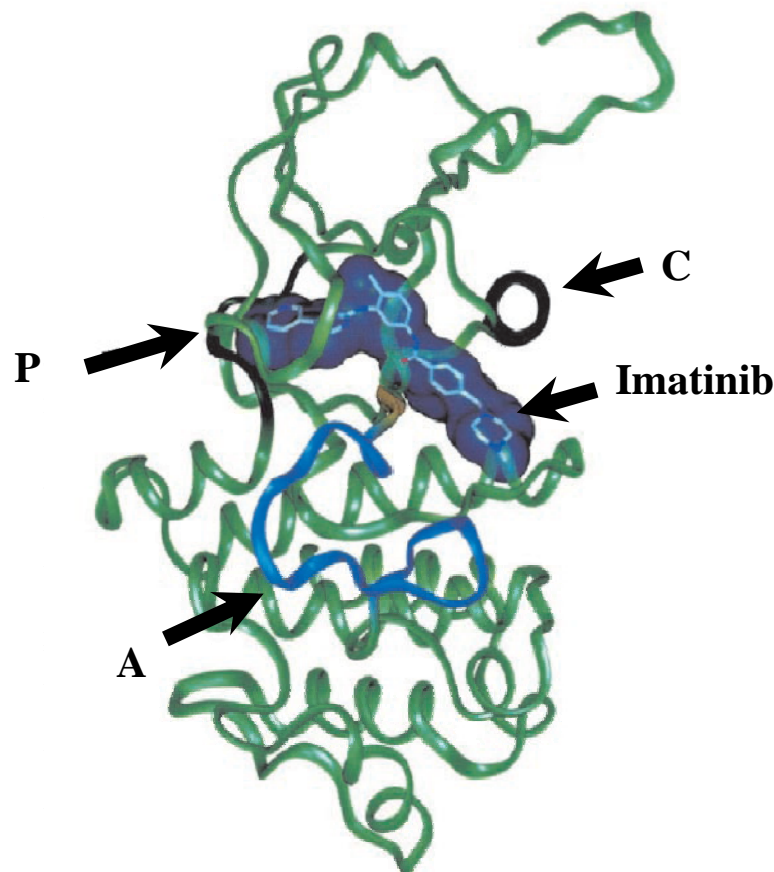
L'Imatinib fonctionne comme un inhibiteur compétitif de liaison de l'ATP. L'Imatinib se lie à la forme inactivée de ABL. Les conformations inactives de la boucle A étant très différentes, l'Imatinib possède une grande spécificité. Aucun réarrangement majeur n'est nécessaire pour la liaison de l'Imatinib à la boucle A. A l'inverse, il existe un mécanisme d'ajustement provoqué pour la liaison avec le lobe N. Le lobe N s'attache normalement au groupe phosphate de l'ATP et est ainsi appelé la boucle P. Cette boucle P se replie sur les liaisons de l'Imatinib, entraînant une augmentation de complémentarité. Ce changement de position est stabilisé par une liaison hydrogène. En conséquence, de cet ajustement provoqué, une cage hydrophobe est formée autour de la molécule d'Imatinib et elle est maintenue par des liaisons de Van Der Waals (**Figure 23**). De plus, un réseau de liaisons hydrogène se forme autour de la molécule d'Imatinib. Il n'est donc pas surprenant que le changement d'un seul acide aminé dans une kinase rende cet ajustement très précis impossible et empêche la liaison de l'Imatinib (DEININGER et DRUKER, 2003).

Selon ces études, lorsque ABL est phosphorylée sur la tyrosine 393, la molécule est beaucoup moins sensible à l'Imatinib parce que la phosphorylation de la tyrosine 393 stabilise la conformation ouverte (active) de la boucle A, à laquelle l'Imatinib ne peut se lier. Or BCR-ABL est phosphorylée au niveau de la tyrosine 393, elle est donc dans une conformation inapte à la liaison avec l'Imatinib. Les expériences avec des lignées cellulaires transfectées avec *Bcr-Abl* et traitées par l'Imatinib montrent pourtant une inhibition de l'activité tyrosine kinase en quelques minutes. Ceci indique la présence d'un turn-over rapide entre les formes

phosphorylée (forme la plus couramment prise par BCR-ABL) et non phosphorylée, qui est capable de se lier à l'Imatinib. Ce point souligne le rôle des tyrosines phosphatases (DEININGER et DRUKER, 2003).

Les mécanismes décrits pour ABL sont valables pour les autres kinases inhibées par l'Imatinib.

**Figure 23 : Structure de l'Imatinib liée au domaine kinase de ABL**  
(d'après DEININGER et DRUKER, 2003)



**P** indique la boucle P. **C** indique l'hélice C. La boucle d'activation est indiquée par **A**. L'Imatinib pénètre au centre de la kinase et stabilise la conformation inactive de la boucle d'activation. La liaison à la boucle A se produit sans changement majeur, en revanche la liaison avec la boucle P nécessite un mécanisme d'ajustement provoqué.

### III - UTILISATION DE L'IMATINIB EN MEDECINE HUMAINE

L'Imatinib a d'abord été utilisé pour ses propriétés d'inhibition de l'activité tyrosine kinase de la protéine ABL et de ses dérivés afin de traiter les patients atteints de LMC. Très rapidement, ses autres propriétés, son action inhibitrice envers les protéines KIT et PDGF-R sont apparues intéressantes pour la thérapie d'autres processus néoplasiques.

## A - Utilisation de l'Imatinib en cancérologie

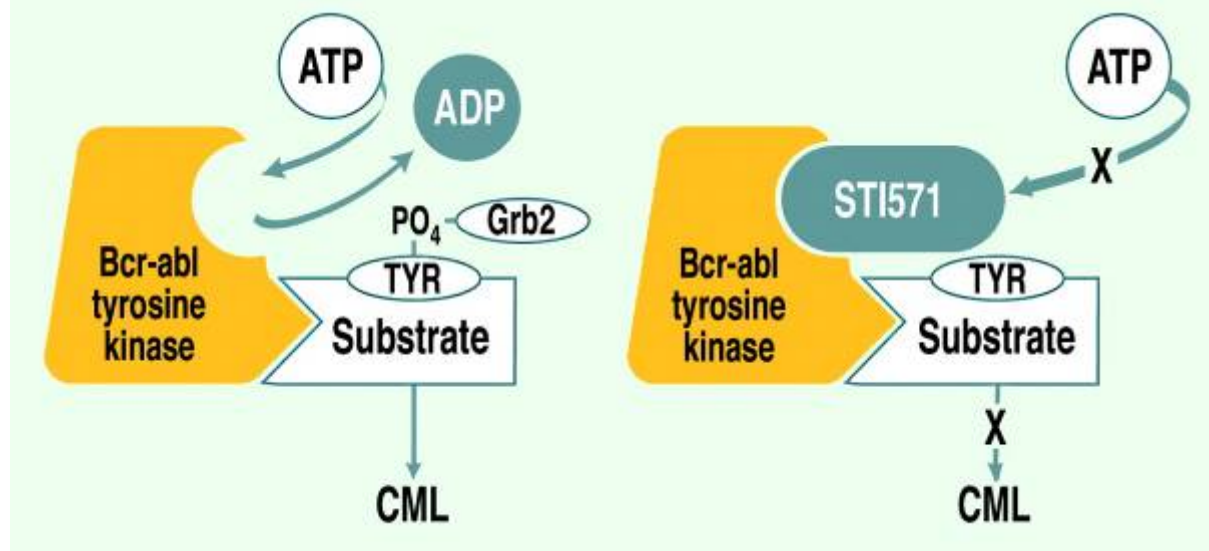
### 1) Les tumeurs des cellules sanguines

#### $\alpha$ – La leucémie myéloïde chronique

L'Imatinib a eu un impact très important dans le traitement de la LMC. L'Imatinib est actuellement utilisé en traitement de première ligne chez tous les patients adultes avec une LMC de Philadelphie nouvellement diagnostiquée, quel que soit le stade de développement. Chez les patients pédiatriques, l'usage de l'Imatinib est approuvé aux Etats-Unis pour les patients en phase chronique avec une rechute suite à une transplantation de cellules souches ou une résistance à la thérapie à base d'interféron. Dans l'union européenne, l'usage de l'Imatinib est approuvé pour toutes les phases de la maladie (GUILHOT, 2004).

La translocation de Philadelphie est retrouvée dans différentes formes de leucémie dont la plupart des LMC mais aussi dans de nombreux cas de leucémie lymphoblastique aiguë de l'adulte (LLA). En inhibant BCR-ABL, l'Imatinib bloque la croissance des cellules tumorales *Bcr-Abl* transformées et induit leur apoptose (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003) (Figure 24).

Figure 24 : Inhibition de BCR-ABL par l'Imatinib (d'après VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003)



La tyrosine kinase BCR-ABL est une protéine de fusion, elle est activée et entraîne une phosphorylation inappropriée et une activation de molécules de signalisation et de molécules effectrices. L'Imatinib (STI571) occupe le site de fixation à l'ATP de BCR-ABL et bloque ainsi l'activité enzymatique kinase. CML = LMC

Dans les stades initiaux de la maladie, l'Imatinib se révèle très efficace pour inhiber la progression de la LMC et des LLA adultes à chromosome de Philadelphie. Dans les premiers stades de la maladie, BCR-ABL est la seule ou la principale tyrosine kinase responsable de la croissance des cellules leucémiques et un traitement par l'Imatinib seul est efficace. En



revanche, à un stade avancé de la maladie, la plupart des patients possèdent des cellules tumorales variantes et résistantes à l'Imatinib. La LMC possède une longue phase initiale qui peut durer jusqu'à 3 ou 4 ans. Ensuite, la phase blastique est beaucoup plus rapide et se caractérise par l'accumulation de mutations additionnelles (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003).

Ainsi dans les études de phase I de l'Imatinib sur des patients en crise blastique, 55% des patients LMC et 70% des patients LLA répondent à l'Imatinib initialement. Mais 70% du premier groupe et 100% du second ne répondent plus au bout de six mois (SAWYERS, 2001).

A l'inverse les patients traités au tout début de la phase chronique de la maladie ne développent que très rarement une résistance à l'Imatinib et connaissent une rémission prolongée (WEISBERG et GRIFFIN, 2001).

Ces études suggèrent que dans les premiers stades de LMC, la translocation de Philadelphie est sûrement la seule altération génétique responsable de la progression tumorale et que l'Imatinib est alors très efficace. Dans les stades plus avancés, d'autres mutations développant une résistance à l'Imatinib doivent apparaître. Le contrôle de la progression tumorale est par conséquent moins efficace (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003).

Suite à une translocation t(5;12), la tyrosine kinase PDGF-R est activée chez certains patients entraînant une LMC. Ce type de LMC répond rapidement et durablement à l'Imatinib (DEININGER et DRUKER, 2003).

### **β – Le syndrome hyper-éosinophilique et la leucémie éosinophilique chronique**

Le premier cas de traitement d'un syndrome hyper-éosinophilique (SHE) par de l'Imatinib a été reporté en 2001. Le patient était résistant ou intolérant aux thérapies précédentes incluant des corticostéroïdes, l'hydroxyurée et l'interféron  $\alpha$ . Aux vues de l'efficacité de l'Imatinib dans le traitement de la LMC et partant de l'hypothèse que ces deux maladies pouvaient partager la même pathogénie, ce patient a été traité au Glivec<sup>®</sup>. Après seulement 4 jours de traitement, une rémission hématologique complète a été observée. D'autres tentatives de traitement chez des patients atteints de leucémie éosinophilique chronique (LEC) se sont aussi révélées efficaces (GOTLIB et coll., 2004).

L'efficacité de l'Imatinib chez les patients avec un SHE ou une LEC a amené à l'identification d'une tyrosine kinase issue de la fusion de deux gènes codant FIP1-like-1 et PDGF-RA. Toutefois, chez certains patients cette mutation n'est pas retrouvée et l'Imatinib demeure efficace. De nouvelles investigations sont donc nécessaires pour déterminer la base moléculaire de la réponse à l'Imatinib chez ces patients (COOLS et coll., 2003).

## 2) Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)

Les GIST sont des proliférations cellulaires tumorales des ICC. Les GIST expriment le récepteur transmembranaire KIT. Dans les GIST, les mutations gain-de-fonction de *Kit* sont très fréquentes et conduisent à une activation constitutive de KIT qui entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée et une résistance à l'apoptose (DEMETRI et coll., 2002).

La résection chirurgicale est le traitement de choix des GIST. Toutefois la récurrence est fréquente et le taux de survie à 5 ans après résection complète varie de 40% à 65%. Les GIST inopérables ou avec dissémination métastatique sont fatales et résistent à la chimiothérapie conventionnelle (DEMETRI et coll., 2002). Une étude récente reporte que le taux de réponse à la doxorubicine est inférieur à 5% (GOSS et coll., 2000). L'efficacité des radiations pour les GIST inopérables ou avec métastases n'est pas prouvée. La médiane de survie des patients avec une GIST métastasée est de 20 mois, et pour les patients avec une récurrence locale de 9 à 12 mois (DEMETRI et coll., 2002).

L'Imatinib bloque l'activité tyrosine kinase de KIT, stoppe la prolifération et entraîne l'apoptose des cellules tumorales. L'Imatinib induit une réponse objective et soutenue chez plus de la moitié des patients avec des GIST avancés (YEH et coll., 2006). Le PET<sup>35</sup> standard avec du [<sup>18</sup>F] fluoro-2-déoxy-D-glucose est un indicateur sensible, rapide et fiable de la réponse ou de la résistance à l'Imatinib. Chez tous les patients avec une réponse, l'absorption du [<sup>18</sup>F] fluoro-2-déoxy-D-glucose dans la tumeur diminue nettement et parfois dès les premières 24 heures suivant une unique dose d'Imatinib. Une augmentation de l'activité glycolytique, l'apparition d'activité en d'autres sites, ou les deux, sont observés chez tous les patients avec une progression de la maladie. Les résultats du PET avec une évidence de réponse ou de progression sont corrélés aux observations d'un scanner traditionnel ou d'une IRM<sup>36</sup> (DEMETRI et coll., 2002). Un PET et une coupe transversale de scanner (PET-scan) d'un patient représentatif, avec une réponse, sont rapportés dans la **figure 25**.

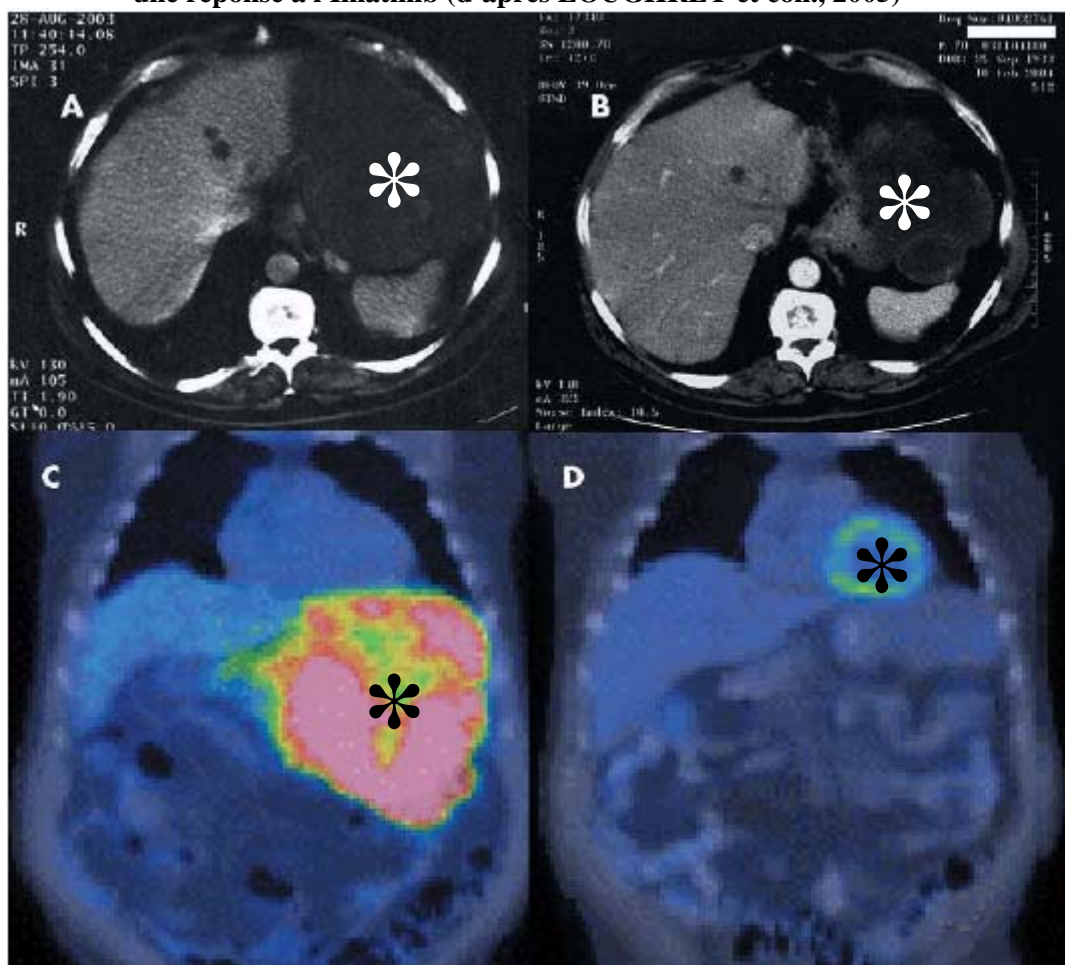
Des taux élevés de réponse positive ont été obtenus dans les essais cliniques de phase I et II pour la thérapie des GIST avec l'Imatinib. Des doses supérieures à 400 mg deux fois par jour étaient bien tolérées dans les essais de phase I : en effet, chez 32 des 36 patients l'Imatinib a inhibé la croissance tumorale. Plus de la moitié des patients en essai de phase II ont eu une réduction de la masse tumorale supérieure à 50% sans progression de la maladie ou développement d'autres lésions.

---

<sup>35</sup> Positron Emission Tomography = Tomographie par émission de positron.

<sup>36</sup> Imagerie par résonance magnétique.

**Figure 25 : Scanner et PET (PET-scan) d'un patient atteint d'une GIST avancée et présentant une réponse à l'Imatinib (d'après LOUGHREY et coll., 2005)**



(A, C) : Avant le traitement avec de l'Imatinib. (B, D) : Six mois après l'administration de 400 mg d'Imatinib par jour. La tumeur est signalée par un astérisque. On observe une réduction d'environ 50% de la taille de la tumeur sur le scanner et une perte totale de la fixation du [<sup>18</sup>F] fluoro-2-déoxy-D-glucose sur le PET-scan. Ceci indique une réponse métabolique complète.

Les deux doses de 400 mg et 600 mg par jour étaient bien tolérées (**Tableau 6**) (GUILHOT, 2004).

La nature de l'altération moléculaire est le facteur critique de la réponse à l'Imatinib. Les mutations dans l'exon 11 de *Kit* (codant le domaine juxta membranaire intracellulaire) représentent environ 70% des cas et sont associées à un taux de réponse à l'Imatinib de 85% (**Tableau 7**). Toutefois, l'Imatinib est moins efficace sur d'autres mutations de *Kit* et sur les mutations ne concernant pas *Kit*, comme celles de *Pdgfra* (CLARK et coll., 2005).

En effet, une mutation gain-de-fonction de *Pdgfra* a été récemment découverte dans certains cas de GIST (HEINRICH et coll., 2003) et d'autres études ont reporté que les mutations de *Pdgfra* et de *Kit* sont mutuellement exclusives (YEH et coll., 2006).

PDGF-RA est aussi une cible de l'Imatinib, c'est pourquoi certaines GIST sans mutation de *Kit*, mais avec mutation de *Pdgfra*, répondent à l'Imatinib.

**Tableau 6 : Efficacité de l'Imatinib dans le traitement des GIST : résumé des résultats des essais de phase I et II (d'après GUILHOT, 2004)**

	Phase I <sup>a</sup>	Phase II <sup>b</sup>		
	400-1000 mg/j (n = 36) n (%)	Total (n = 147)	400 mg/j (n = 73) n (%)	600 mg/j (n = 74)
Réponse objective	25 (69)	-	-	-
Réponse partielle	19 (53) <sup>c</sup>	79 (54)	36 (49)	43 (58)
Maladie stable	7 (19)	41 (28)	23 (32)	18 (24)
Progression	4 (11)	20 (13)	12 (16)	8 (11)
Non évaluable	NR	7 (5)	2 (3)	5 (7)

**NR** : Non reporté ; <sup>a</sup>VAN OOSTEROM et coll., 2001 <sup>b</sup>DEMETRI et coll., 2002 <sup>c</sup>Réponse partielle confirmée. Six autres réponses étaient des réponses partielles non confirmées ou 20-29% de régression selon les critères d'évaluation des réponses des tumeurs solides.

**Tableau 7 : Effets de la mutation *Kit* sur la réponse à l'Imatinib chez les patients atteint de GIST\* (d'après CLARK et coll., 2005)**

Exon	Site	Incidence (%)	Réponse (%)
11	Domaine juxta-membranaire	67	85
9	Domaine externe	17	45
13	TK 1	2	?
17	TK 2	2	?
Aucun	Pas de mutation de <i>Kit</i> <sup>o</sup>	13	10

\* Les données sont issues de HEINRICH et coll., 2003. Plus de 90% des patients avec un GIST ont des mutations gain-de-fonction pour *Kit* ou *Pdgfra*. <sup>o</sup>Certaines tumeurs peuvent être mutées pour *Pdgfra*.

Toutefois, contrairement aux mutations *Kit*, de nombreuses mutations gain de fonction de *Pdgf-RA* concernent le domaine kinase et de telles mutations sont insensibles à l'Imatinib (CLARK et coll., 2005).

### 3) Les tumeurs pulmonaires

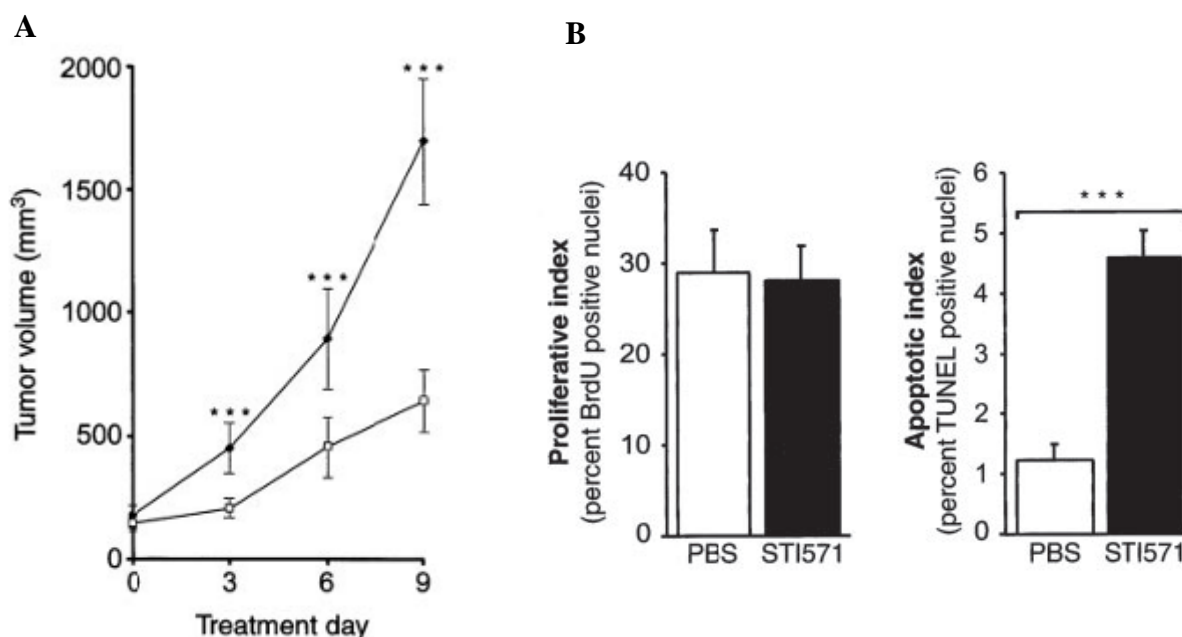
Une boucle autocrine de croissance impliquant KIT et son ligand semble caractériser 70% des cancers pulmonaires à petites cellules (KRYSTAL et coll., 2000). L'Imatinib est en cours d'essai pour le traitement des SCLC (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003).

De plus, environ 50 à 60% des spécimens d'adénocarcinomes pulmonaires réséqués expriment le PDGF-R (KAWAĪ, HIROI et TORIKATA, 1997). Il a été démontré que la voie de signalisation du PDGF-R augmente la pression des fluides interstitiels ce qui provoque une hypertension interstitielle et une diminution de l'absorption des molécules anticancéreuses

(Cf. **Diminution de la pression des fluides interstitiels tumoraux**, page 74). L'inhibition de PDGF-R par l'Imatinib diminue la pression interstitielle et augmente le transport interstitiel des molécules (PIETRAS et coll., 2001). Ces données suggèrent que l'Imatinib peut être utilisée dans le traitement des cancers du poumon comme une nouvelle stratégie pour augmenter l'absorption des agents de chimiothérapie (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003).

#### 4) Les tumeurs cutanées

**Figure 26 : Traitement de dermatofibrosarcomes cutanés avec de l'Imatinib : inhibition de la croissance tumorale et induction de l'apoptose (d'après SJÖBLOM et coll., 2001)**



**A :** Des souris SCID<sup>37</sup> ont été inoculées avec des cellules 149333 ( $5 \times 10^5$ ) issues de dermatofibrosarcomes humains. Un traitement oral avec de l'Imatinib (**STI571**) (□) à raison de 200 mg/kg/j ou avec du PBS (témoin) (♦) a été entrepris dès que les tumeurs ont atteint un volume de 100 mm<sup>3</sup>. Après neuf jours de traitement, les tumeurs des animaux traités avec de l'Imatinib mesuraient seulement un tiers de la taille des tumeurs contrôles. \*\*\* $P < 0,001$  (Test de Student).

**B :** Les tumeurs ont été incluses, puis sectionnées et immunomarquées pour déterminer la prolifération cellulaire et l'apoptose. Les cellules en prolifération et les cellules apoptotiques ont été comptées sous microscope. Les indices sont exprimés en pourcentage de noyaux positifs sur les 2000 cellules comptées. \*\*\* $P < 0,001$  (Test de Student).

Les dermatofibrosarcomes et les fibrosarcomes à cellules géantes sont des tumeurs récidivantes et infiltrantes de la peau. La résection chirurgicale était jusqu'alors le seul traitement efficace. Le taux de récurrence élevé nécessite souvent des réinterventions multiples, très défigurantes pour les patients. Ces tumeurs cutanées sont caractérisées au niveau génétique par des réarrangements chromosomiques entraînant une fusion des gènes codant le

<sup>37</sup> Severe Combined Immune Deficiency. Il s'agit d'une lignée de souris immunodéficientes.

collagènes de type I $\alpha$ 1 (Col1a1) et *Pdgfrb*. Il en résulte une protéine de fusion qui s'apparente à un PDGF-RB mature (SJÖBLOM et coll., 2001).

Une étude récente montre que l'Imatinib inhibe la croissance tumorale de ces deux types de tumeurs cutanées, *in vitro* et *in vivo*. Le mécanisme principal de cette inhibition est une induction de l'apoptose (**Figure 26**) (SJÖBLOM et coll., 2001). L'Imatinib peut être utile chez les patients avec une récurrence locale inopérable ou une extension métastatique (CLARK et coll., 2005).

### 5) Tumeurs du système nerveux

Dans un autre type de tumeur, les glioblastomes, il existe une boucle autocrine d'activation de PDGF-R. Ce type de tumeur répond aussi à l'Imatinib par une diminution de la croissance et une apoptose. Ces réactions ont été montrées *in vitro* et dans les modèles de xénogreffe (VLAHOVIC et CRAWFORD, 2003).

### 6) Les tumeurs ovariennes

Le carcinome ovarien est la cinquième cause de décès par cancer chez la femme aux Etats-Unis et la cause la plus courante de décès parmi les tumeurs gynécologiques. La plupart des patientes diagnostiquées avec un carcinome ovarien présente un stade avancé de la maladie avec une extension métastatique à la cavité péritonéale. La clé du traitement de ces cancers ovariens avancés est la chirurgie suivie d'une chimiothérapie adjuvante. Ce traitement présente un taux de réussite initiale élevé (> 70%). Toutefois, plus de 50% des patientes présentent une récurrence en moyenne dans les deux années suivantes et le taux de survie à 5 ans est seulement de 15% à 25%. Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire pour augmenter la survie de ces patientes (DUSHKIN et SCHILDER, 2005).

Il a été démontré que l'épithélium de surface ovarien normal exprime KIT et son ligand, le SCF. Plusieurs groupes ont décrit des niveaux élevés de KIT dans les tumeurs épithéliales ovariennes (**Tableau 8**).

**Tableau 8 : Expression de *Kit* dans le tissu ovarien (d'après DUSHKIN et SCHILDER, 2005)**

Etudes	Tissu ovarien normal Expression de KIT	Carcinome ovarien Expression de KIT en %
ARBER et coll., 1998	-	8
TONARY et coll., 2000	Non détectable	76 (19/25 patientes)
PAROTT et coll., 2000	Un peu d'immunoréactivité	100, stade I 100, stade II
SCHMANDT et coll., 2003	Non détectable	26, grade élevé (8/31 patientes) 0, grade faible (0/23 patientes)

TONARY et coll. (2000) ont montré que 92% des carcinomes ovariens exprimant *Kit*, expriment aussi le SCF. Toutefois, KIM et coll. (2006) contestent ses résultats et insiste sur le fait que l'Imatinib n'est efficace que dans le cas des tumeurs avec une mutation gain-de-fonction de *Kit*. Pour déterminer l'efficacité de l'Imatinib, KIM et coll. (2006) ont réalisé une étude des mutations sur les exons 11 et 17 de *Kit* dans les carcinomes de l'épithélium de surface ovarien. Une mutation de l'exon 11 n'a été retrouvée dans aucun des cas et la mutation de l'exon 17 était présente dans 3 cas de cette étude. Ils ont également étudié le taux d'expression de KIT par immunohistochimie. Ce taux est plus élevé dans les tumeurs mucipares que dans les tumeurs séreuses. Dans les tumeurs mucipares, les tumeurs « borderline » (bénignes) ont un taux de cellules KIT-positives plus élevé que les malignes. Enfin, contrairement aux études précédentes, ils ne constatent pas de différence d'expression de *Kit* entre les différents stades tumoraux ou les différents grades histologiques.

Les résultats de cette étude indiquent que malgré des réactions immunohistochimiques positives pour KIT dans certaines tumeurs ovariennes, la thérapie à base d'Imatinib peut ne pas être indiquée si l'expression de KIT n'est pas due à une mutation gain-de-fonction. Selon cette étude, le rôle de *Kit* dans la pathogénie des carcinomes ovariens n'est pas clairement compris et il faut s'attendre à des échecs thérapeutiques avec l'Imatinib.

D'après une étude immunohistochimique, environ 73% des carcinomes ovariens expriment le PDGF et 50% d'entre eux co-expriment le PDGF-RA (HENRISKEN et coll., 1993). Les patientes atteintes d'un cancer ovarien exprimant le PDGF-RA ont une espérance de vie moindre que celles avec des tumeurs ne l'exprimant pas. MATEI et coll. ont prouvé que 39% des tumeurs ovariennes expriment le PDGF-RA par immunohistochimie et que, dans ces cas, l'Imatinib inhibe la phosphorylation du PDGF-RA et la croissance des cellules cancéreuses (MATEI, CHANG et JENG., 2004).

Plusieurs groupes, dont le GOG<sup>38</sup>, mènent des essais de phase II sur l'Imatinib mésylate dans le traitement des carcinomes ovariens persistants ou récidivants. Des prélèvements sont en cours d'analyses pour déterminer l'expression de *Kit* et de *Pdgfr* durant la progression tumorale. Des études plus approfondies de l'efficacité de l'Imatinib dans les cancers ovariens sont nécessaires pour démontrer son utilité comme unique agent thérapeutique ou comme promoteur d'autres agents antinéoplasiques (**Cf. Diminution de la pression des fluides interstitiels tumoraux, page 74**). L'établissement des profils moléculaires de ces cancers permettra de mieux sélectionner les patients susceptibles de répondre à une thérapie à base d'Imatinib (DUSHKIN et SCHILDER, 2005).

---

<sup>38</sup> Gynecologic Oncology Group

## **7) Les tumeurs de la prostate avec métastases**

Le cancer de la prostate est la seconde cause de décès par cancer chez l'homme en Amérique du nord. Lorsqu'un patient avec un cancer de la prostate présente des métastases osseuses, la chimiothérapie conventionnelle est inefficace. L'expression du PDGF et l'activation, par autophosphorylation, de son récepteur le PDGF-R sont associées à la prolifération des cellules métastatiques prostatiques dans le parenchyme osseux (UEHARA et coll., 2003). PDGF et PDGF-R sont impliqués dans la division cellulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse et la survie cellulaire. De même, EGF<sup>39</sup> et EGF-R<sup>40</sup> sont impliqués dans la prolifération cellulaire, l'activation des effets anti-apoptotiques et la progression tumorale (KIM et coll., 2004).

L'hypothèse a été émise que l'inhibition du EGF-R et du PDGF-R en combinaison avec l'agent de chimiothérapie habituel de ce type de cancer, le Paclitaxel, pourrait réduire les métastases osseuses de cancer de la prostate. Cette hypothèse a été testée sur des souris nude en utilisant des cellules humaines de cancer de la prostate, PC-3MM2. Les cellules PC-3MM2 prolifèrent à proximité du tissu osseux et les cellules endothéliales associées à ces lésions expriment l'EGF-R et les PDGF-RA et PDGF-RB phosphorylés à leur surface. Le pourcentage de cellules exprimant ces récepteurs et l'intensité de leur expression sont directement corrélés à la proximité avec le tissu osseux.

L'administration orale de PKI166<sup>41</sup> inhibe la phosphorylation de l'EGF-R mais pas celle du PDGF-R. Au contraire, l'administration orale d'Imatinib inhibe la phosphorylation du PDGF-R mais pas celle du EGF-R. La thérapie combinée utilisant PKI166 et Imatinib oralement et des injections intra-péritonéales de Paclitaxel induit un haut niveau d'apoptose des cellules vasculaires endothéliales et des cellules tumorales, ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale dans l'os, la préservation de la structure osseuse et la réduction des métastases dans les nœuds lymphatiques. Ces données démontrent que le blocage de la phosphorylation de l'EGF-R et du PDGF-R, associé à l'administration de Paclitaxel, réduit significativement les métastases osseuses expérimentales du cancer de la prostate chez la souris (**Tableau 9 et figure 27**) (KIM et coll., 2004).

---

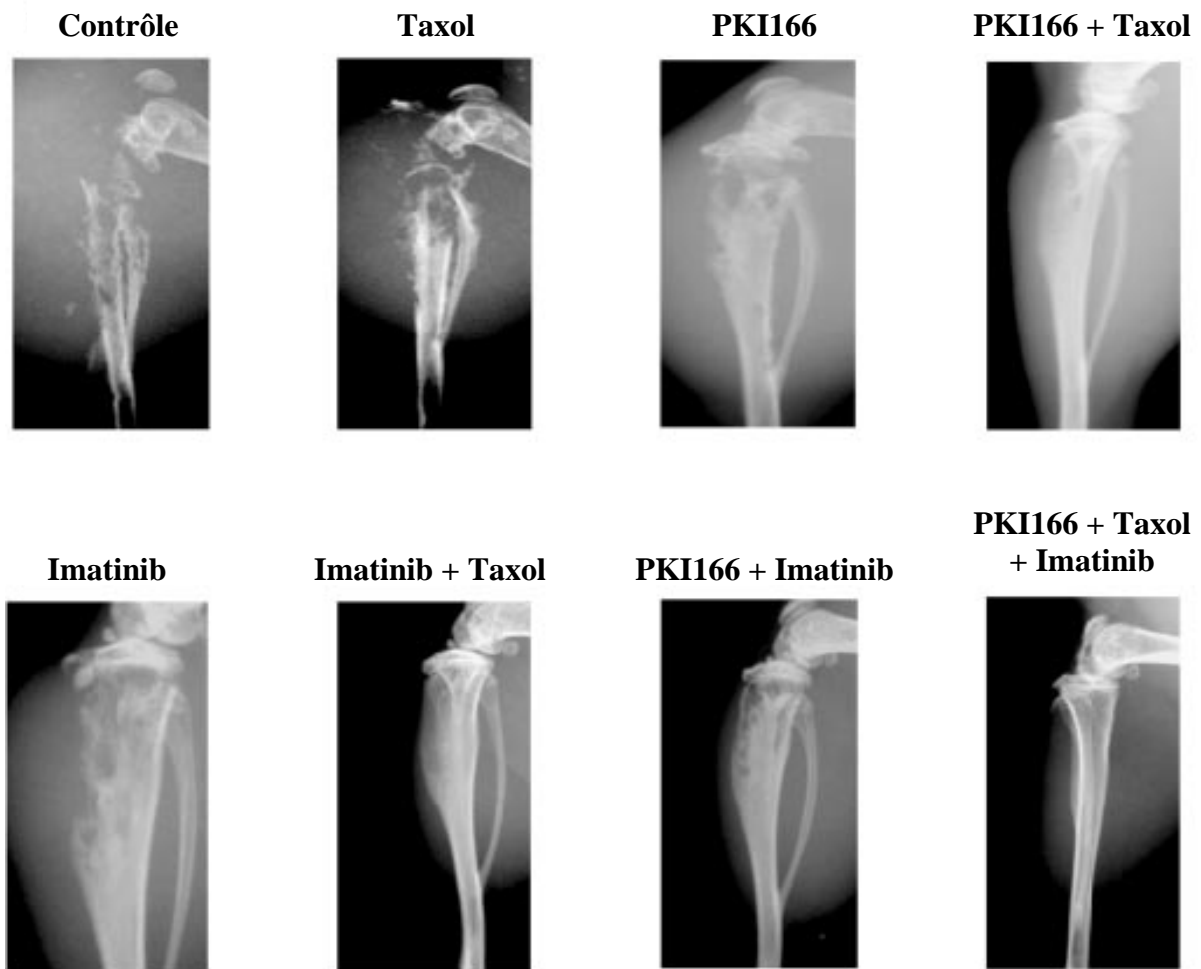
<sup>39</sup> Epidermal Growth Factor

<sup>40</sup> Epidermal Growth Factor Receptor

<sup>41</sup> PKI166 est un inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase de EGF-R



**Figure 27 : Radiographies des membres postérieurs des souris nude (d'après KIM et coll., 2004)**



Des cellules PC-3MM2, issues de cancers prostatiques humains, ( $2 \times 10^5$ ) ont été injectées dans les tibias de souris nude. Après cinq semaines de traitement avec du Paclitaxel (8 mg/kg, par voie intrapéritonéale, 1 fois par jour) et/ou PKI166 (100 mg/kg, *per os*, 3 fois par jour) et/ou Imatinib (STI571) (50 mg/kg, *per os*, 1 fois par jour), les souris ont été sacrifiées puis radiographiées. Les tibias des souris traitées avec PKI166 et/ou Imatinib et du Paclitaxel étaient bien préservés. La thérapie combinée PKI166, Imatinib et Paclitaxel produit l'inhibition la plus significative de la croissance tumorale et la meilleure préservation de la structure osseuse (KIM et coll., 2004).

**Tableau 9 : Résultats du traitement avec PKI166, Imatinib et Paclitaxel du cancer de la prostate humain évoluant dans les os de souris nude (d'après KIM et coll., 2004)**

Groupes de traitement	Lésions osseuses			Incidence des métastases dans les nœuds lymphatiques
	Incidence de la tumeur	Poids de la tumeur (g)		
		Moyen	Ecart	
Contrôle	20/20	4,0	2,5-6,4	20/20
Paclitaxel	20/20	3,4	1,2-5,0	20/20
PKI166	14/20 <sup>a</sup>	2,0	0-4,5 <sup>a</sup>	12/20 <sup>a</sup>
Imatinib	15/20 <sup>a</sup>	2,4	0-4,3 <sup>a</sup>	12/20 <sup>a</sup>
PKI166 + Paclitaxel	10/20 <sup>b</sup>	1,2	0-3,9 <sup>b</sup>	9/20 <sup>b</sup>
Imatinib + Paclitaxel	10/20 <sup>b</sup>	1,0	0-3,6 <sup>b</sup>	9/20 <sup>b</sup>
PKI166 + Imatinib	14/20 <sup>a</sup>	1,9	0-3,6 <sup>a</sup>	13/20 <sup>a</sup>
PKI166 + Imatinib + Paclitaxel	6/20 <sup>c</sup>	0,2	0-2,1 <sup>c</sup>	3/20 <sup>c</sup>

Des cellules PC-3MM2 ( $2 \times 10^5$ ) ont été injectées dans les tibias de souris nude. Trois jours après le traitement a débuté avec du Paclitaxel (8 mg/kg, par voie intra-péritonéale, 1 fois par jour), PKI166 (100 mg/kg, *per os*, 3 fois par jour) et Imatinib (50 mg/kg, *per os*, 1 fois par jour). Les souris ont été sacrifiées après 5 jours de traitement. L'incidence de la tumeur, son poids et l'incidence des métastases dans les nœuds lymphatiques régionaux ont été déterminés. <sup>a-c</sup> comparés au groupe de contrôle : <sup>a</sup>  $P < 0,05$  ; <sup>b</sup>  $P < 0,01$  ; <sup>c</sup>  $P < 0,001$ .

### 8) Diminution de la pression des fluides interstitiels tumoraux

La pression des fluides interstitiels (PFI) des tissus normaux est régulée par les interactions entre les cellules du stroma et les molécules de la matrice extracellulaire.

En 1987, JAIN suggérait que la PFI tumorale élevée pouvait être un obstacle à la diffusion optimale des agents de chimiothérapie (JAIN, 1987).

De nombreuses études ont ensuite montré que la PFI des tumeurs solides est augmentée. Bien que l'étiologie de l'hypertension interstitielle dans les tumeurs ne soit pas exactement connue, plusieurs hypothèses impliquent des anomalies vasculaires sanguines et lymphatiques, une fibrose interstitielle et une augmentation de la contractilité de la matrice interstitielle par les fibroblastes du stroma. Le stroma réactif associé à la matrice extracellulaire tumorale est caractérisé par une micro-vascularisation augmentée, des fibroblastes activés et une infiltration de cellules inflammatoires, qui libèrent de nombreuses cytokines, dont le PDGF (DUSHKIN et SCHILDER, 2005).

Dans des modèles pré cliniques, PIETRAS et son équipe ont démontré que l'Imatinib diminue la PFI tumorale et augmente l'absorption des agents de chimiothérapie (PIETRAS et coll., 2002). Il a été montré que l'Imatinib potentialise les effets anti-tumoraux de plusieurs agents de chimiothérapie dans des modèles murins de carcinomes de la thyroïde et du côlon. Ces études encouragent à mener des essais cliniques pour explorer les effets des inhibiteurs du

PDGF-R, comme l'Imatinib, sur la PFI tumorale, l'absorption des molécules et la réponse à la chimiothérapie (DUSHKIN et SCHILDER, 2005).

## **B - Utilisation de l'Imatinib dans les autres disciplines médicales**

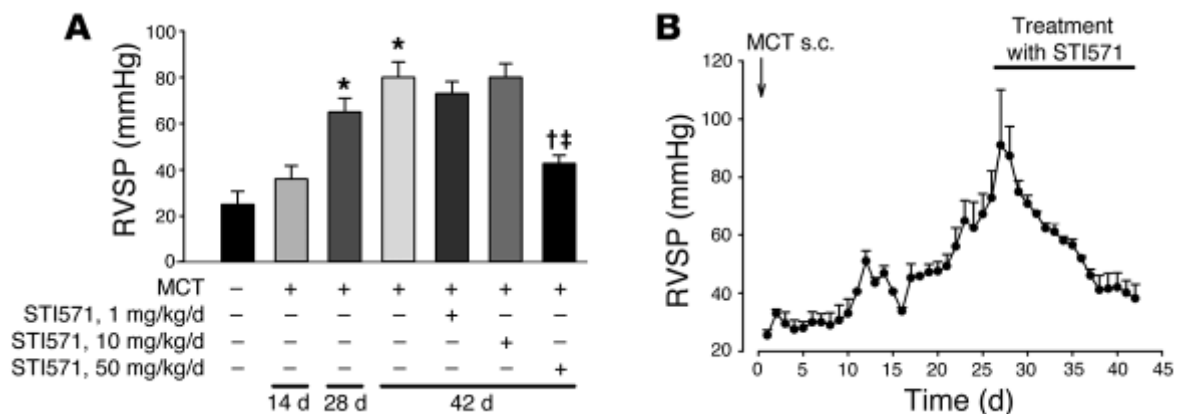
### ***1) L'Imatinib et l'hypertension pulmonaire artérielle***

L'hypertension artérielle pulmonaire (HAP) idiopathique est une maladie nécessitant un traitement à vie. Elle est caractérisée par une élévation significative et soutenue de la pression artérielle pulmonaire et entraîne des troubles de la pression systolique voire la mort. Les thérapies actuelles, essentiellement symptomatiques, s'accompagnent de nombreux effets secondaires et sont assez contraignantes.

Plusieurs changements pathologiques sont observés dans cette maladie : altération endothéliale, prolifération et hyper-contraction des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires. De nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans les anomalies de prolifération et de migration des cellules musculaires lisses, dont le PDGF-R. Celui-ci agit comme mitogène et agent chimio-attractif des cellules musculaires lisses. Dans des biopsies pulmonaires de patients avec une hypertension artérielle pulmonaire sévère, l'expression du PDGF-RA est significativement augmentée (HUMBERT et coll., 1998). L'Imatinib, qui altère les effets du signal transmis par le PDGF-R, semble donc pouvoir jouer un rôle dans le traitement de la HAP.

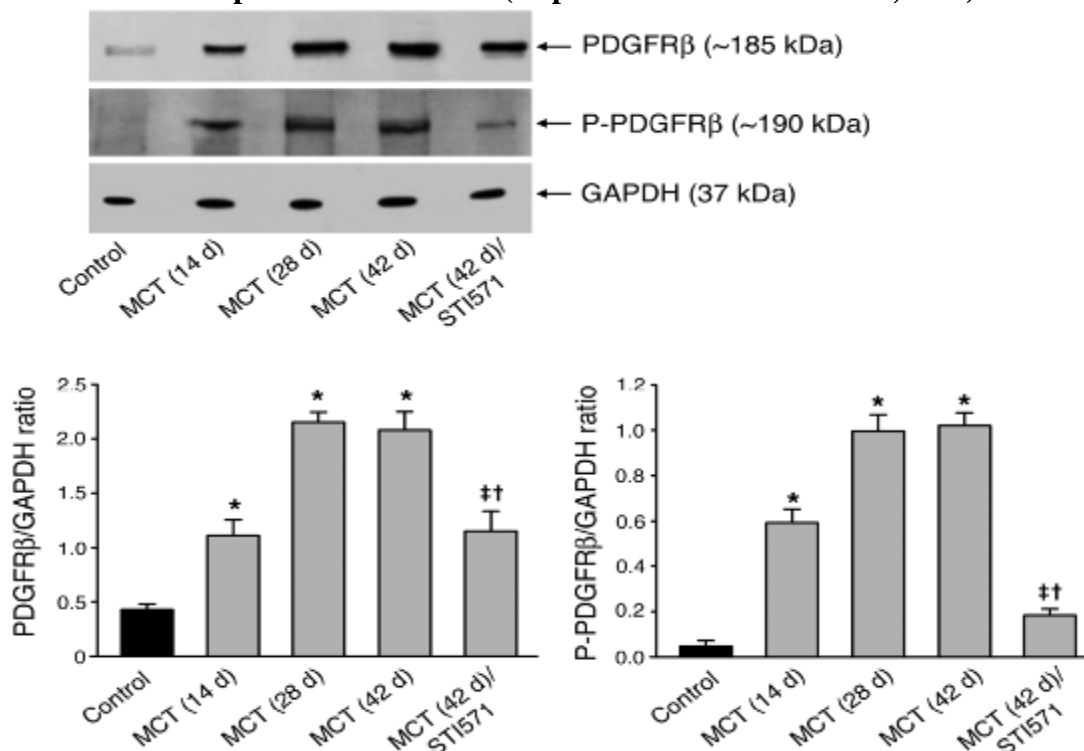
SCHERMULY et son équipe ont étudié deux modèles animaux de HAP : des rats avec une hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline et des souris hypoxiques chroniques. L'action de l'Imatinib a été étudiée sur les effets hémodynamiques et sur le remodelage vasculaire pulmonaire (SCHERMULY et coll., 2005). Les rats ont reçu de la monocrotaline et ont développé une hypertension artérielle sévère en 28 jours, maintenue (lorsque les animaux survivaient) jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour. L'Imatinib était administré en injections intra-péritonéales entre le 28<sup>ème</sup> et 42<sup>ème</sup> jour, selon différentes posologies. Le traitement avec de l'Imatinib à raison de 50 mg/kg/j entraîne un retour à la normale et une disparition de la HAP. La pression systolique redevient presque identique à celle d'individus sains (**Figure 28**). Le taux de survie des rats non traités est de 50% à 42 jours, tandis que les rats traités avec 50 mg/kg/j d'Imatinib ont un taux de survie de 100%. L'Imatinib réduit aussi le remodelage vasculaire. Ainsi chez les animaux traités, on observe une régression des lésions associées à la HAP : la prolifération des cellules musculaires lisses diminue dans les artères pulmonaires. De plus, l'expression et la phosphorylation du PDGF-R sont diminuées chez les animaux traités (**Figure 29**) (SCHERMULY et coll., 2005).

**Figure 28 : Influence de l'Imatinib sur la pression systolique dans la HAP induite par la monocrotaline (d'après SCHERMULY et coll., 2005)**



**A : RVSP :** Pression systolique. Elle est donnée dans les différents groupes d'animaux de l'étude. **B :** Effets de l'Imatinib sur une courbe de pression systolique. **MCT :** Monocrotaline. La pression systolique diminue significativement dès le début du traitement par l'Imatinib. \* $P < 0,05$  par rapport au contrôle ; \* $P < 0,05$  par rapport à la monocrotaline seule, au 28<sup>ème</sup> jour ; \*\* $P < 0,05$  par rapport à la monocrotaline seule, au 42<sup>ème</sup> jour.

**Figure 29 : Augmentation de l'expression et de la phosphorylation du PDGF-RB dans la HAP induite par la monocrotaline (d'après SCHERMULY et coll., 2005)**



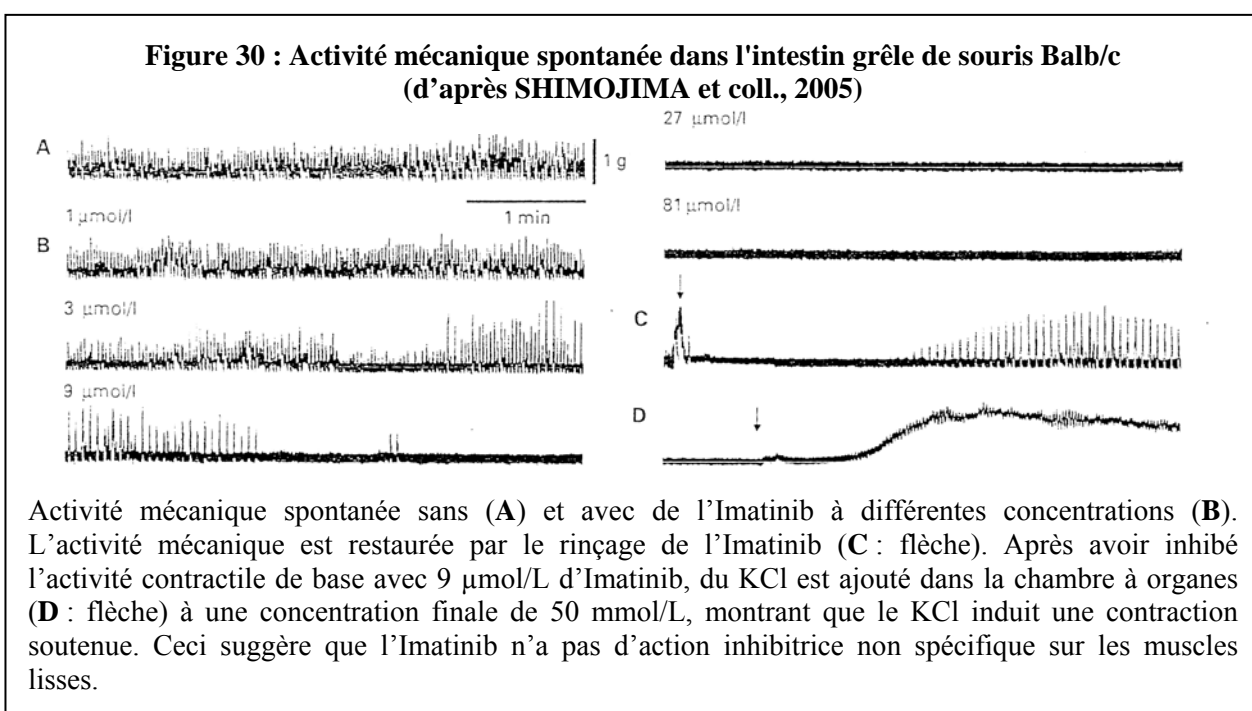
Une analyse western blot a été utilisée pour montrer l'expression de PDGF-RB et la phosphorylation du PDGF-RB (P-PDGFRβ) dans les poumons de rats (contrôle et HAP induit par la monocrotaline au jours 14, 28 et 42) et chez des rats HAP induit par la monocrotaline (MCT) et traités avec de l'Imatinib (STI571). PDGF-R et la phosphorylation de PDGF-R sont normalisés par rapport à GAPDH. \* $P < 0,05$  par rapport à la monocrotaline seule au 28<sup>ème</sup> jour ; \*\* $P < 0,05$  par rapport à la monocrotaline seule au 42<sup>ème</sup> jour.

Dans les deux modèles animaux de cette étude, l'administration d'Imatinib renverse les modifications pulmonaires vasculaires. Cette étude apporte les preuves pré-cliniques d'un nouveau concept : le développement clinique d'inhibiteurs du PDGF comme thérapie moléculaire ciblée pour les patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire (BARST, 2005).

## 2) L'Imatinib et les contractions des cellules musculaires lisses

### α – Effet de l'Imatinib sur les cellules musculaires lisses intestinales

Dans une étude de 2005, SHIMOJIMA et son équipe montrent que des anneaux d'intestin grêle de souris Balb/c, montés dans une chambre à organes isolés, présentent une activité contractile spontanée à raison de  $40,8 \pm 4,9$  cpm<sup>42</sup> (**Figure 30-A**). Le profil des contractions a une allure sinusoïdale régulière. L'addition d'Imatinib dans le milieu réduit de manière dose-dépendante l'activité contractile spontanée. Un effet est décelable dès 1  $\mu$ M. L'amplitude des contractions diminue et devient irrégulière à partir de 3  $\mu$ M. La fréquence est également diminuée. L'activité contractile spontanée est presque complètement abolie pour des concentrations de l'ordre de 9 à 27  $\mu$ mol/L et indétectable à partir de 81  $\mu$ M (**Figure 30-B**). Le rinçage par une solution tamponnée du milieu restaure l'activité contractile des anneaux intestinaux (**Figure 30-C**) et l'introduction de chlorure de potassium dans le milieu entraîne une contraction musculaire rapide et soutenue démontrant que le muscle est toujours opérationnel (**Figure 30-D**).



<sup>42</sup> Contractions par minute

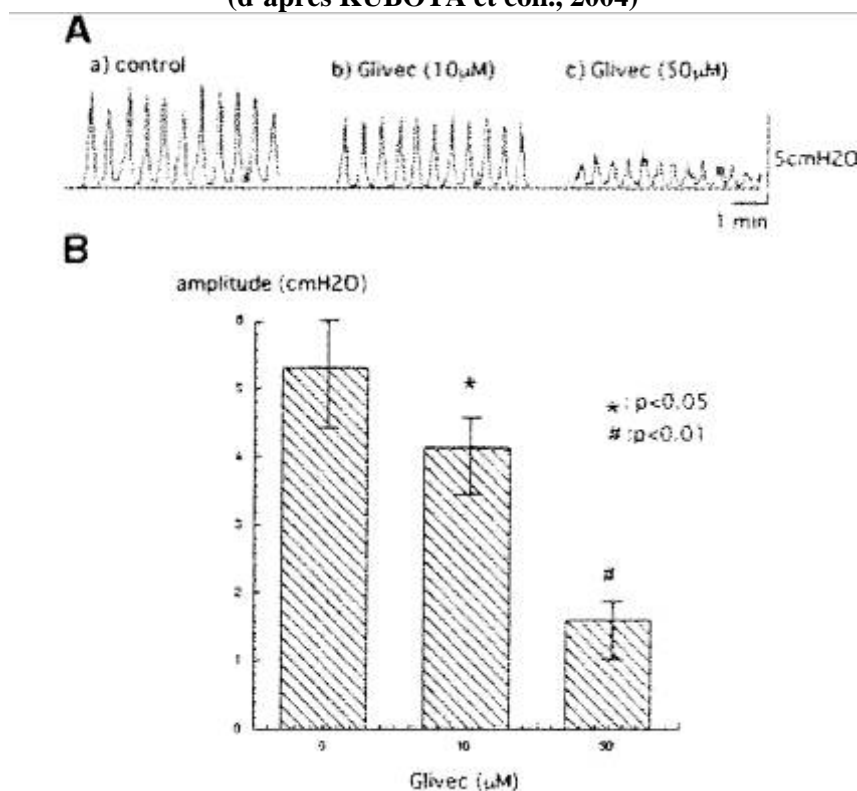
L'action de l'Imatinib semble donc limitée aux ICC (SHIMOJIMA et coll., 2005). Cette étude montre que l'activité mécanique spontanée des muscles circulaires de l'intestin de souris adultes est diminuée par l'Imatinib et que KIT joue un rôle dans l'activité mécanique spontanée de l'intestin grêle de la souris adulte (SHIMOJIMA et coll., 2005). L'activité des ICC est clairement KIT-dépendante.

### **β – Effet de l'Imatinib sur la vessie**

Les cellules musculaires lisses du dérusor sont à l'origine des contractions de la vessie et des modifications de la pression vésicale. Une étude de la vessie du cobaye illustre l'action de l'Imatinib sur les cellules musculaires lisses vésicales.

Sur des vessies isolées, des changements phasiques de la pression intra vésicale sont observés. L'Imatinib diminue l'amplitude de ces augmentations de pression spontanées de manière dose dépendante. En revanche l'Imatinib n'a pas d'effet manifeste sur la fréquence (**Figure 31**) (KUBOTA et coll., 2004).

**Figure 31 : Effets de l'Imatinib sur l'activité spontanée de la vessie du cobaye (d'après KUBOTA et coll., 2004)**



L'Imatinib diminue l'amplitude des contractions spontanées de pression vésicale de manière dose-dépendante. **0 µM** : Groupe contrôle, amplitude moyenne de 5,32 ± 1,25 cmH<sub>2</sub>O. **10 µM** : amplitude moyenne de 4,15 ± 0,69 cmH<sub>2</sub>O, 77% de l'amplitude du groupe contrôle, \*P < 0,05. **50 µM** : amplitude moyenne de 1,61 ± 0,40 cmH<sub>2</sub>O, 30% de l'amplitude du groupe contrôle, # P < 0,01.

De même, l'Imatinib diminue la fréquence ou abolit les potentiels d'action observés sur des préparations de muscle lisse vésical (KUBOTA et coll., 2004).

Dans la vessie du cobaye, des cellules marquées en immunofluorescence anti-KIT et s'apparentant aux ICC gastro-intestinales ont été identifiées (MCCLOSKEY et GURNEY, 2002). Leur rôle au sein du muscle vésical est encore inconnu mais ces résultats suggèrent que ces cellules ICC-like pourraient être responsables des contractions des cellules musculaires lisses du détrusor (KUBOTA et coll., 2004).

**En résumé, l'Imatinib est un inhibiteur de la protéine KIT utilisée essentiellement en thérapie anti-cancéreuse. Sur des anneaux intestinaux étudiés *ex vivo*, il diminue significativement l'amplitude et la fréquence des contractions, démontrant que l'activité des ICC dépend de KIT.**





## **DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL**



## Problématique et objectifs

---

Les ICC sont les cellules pacemaker du tube digestif. Leur activité, leur développement et leur survie sont dépendants de *Kit*. L'utérus étant, comme le tube digestif, un organe contractile constitué de fibres musculaires lisses, nous nous sommes demandés si des cellules similaires aux ICC, des cellules « ICC-like », y sont présentes et y assurent une fonction similaire. A l'heure actuelle, les données sur l'utérus sont contradictoires. Les travaux démontrant la présence de cellules exprimant *Kit* dans le myomètre humain (CIONTEA et coll., 2005) s'opposent à ceux ne décrivant pas de telles cellules dans l'utérus de la femme ou de la ratte (DUQUETTE et coll., 2005).

Afin de mettre en évidence des cellules « ICC-like » dans l'utérus, nous avons choisi de travailler sur trois caractéristiques des ICC intestinales :

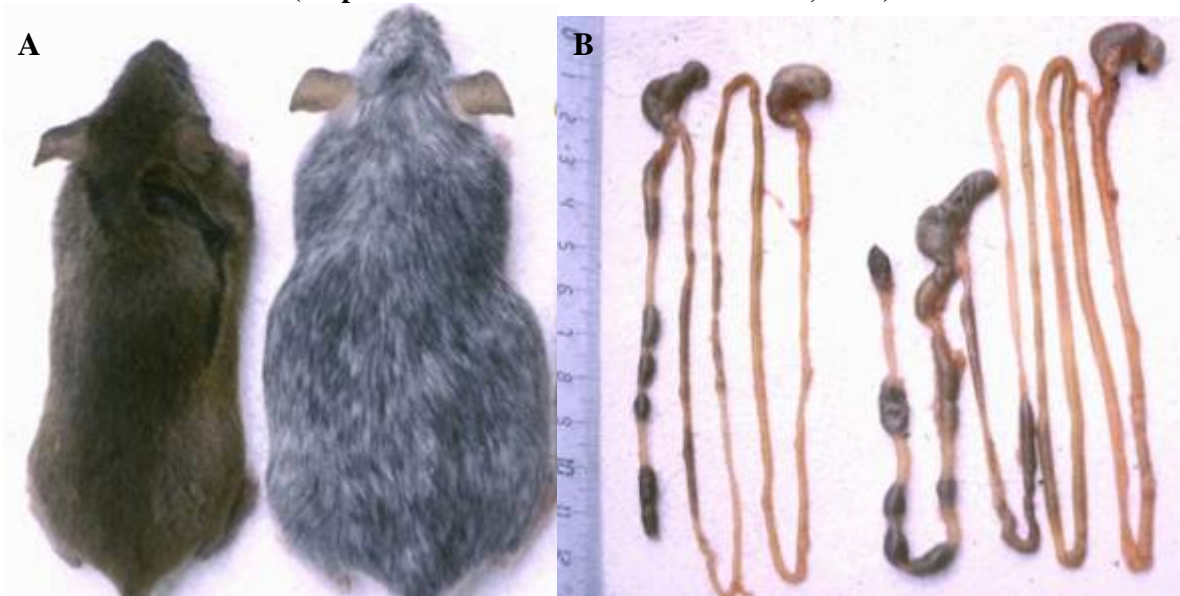
- Ces cellules génèrent une activité contractile spontanée, organisée et observable *ex vivo* ;
- Elles expriment le gène *Kit* ;
- Leur activité est inhibée par l'Imatinib.

A partir d'un modèle murin, l'objectif de cette étude était donc :

- chez les souris 129S2/SvPa, de caractériser l'activité contractile utérine spontanée *ex vivo*, en dehors de toute influence hormonale ou nerveuse ;
- de mettre en évidence, dans l'utérus des souris 129S2/SvPa, des cellules exprimant le gène *Kit* et, le cas échéant, décrire leur localisation et leur morphologie ;
- d'étudier la dépendance des contractions utérines chez les souris 129S2/SvPa vis-à-vis de KIT en étudiant l'effet de l'Imatinib sur les contractions utérines.

Par ailleurs, nous disposions à l'ENVA de la lignée de souris PRM/Alf (**Figure 32**). Ces animaux présentent un allongement et une dilatation de l'intestin (dolichomégalie intestinale), sans pour autant présenter d'allongement de la durée du transit. En effet, on observe chez eux une augmentation de la fréquence des contractions intestinales associée à une densité plus élevée en ICC (BELLIER et coll., 2005 ; AUBIN-HOUZELSTEIN et coll., 2003). Nous avons donc souhaité savoir si le tractus génital femelle présentait des caractéristiques similaires, c'est-à-dire une dolichomégalie utérine et une augmentation de la fréquence des contractions utérines. Pour cette étude, la lignée 129S2/SvPa constituait notre lignée de référence.

**Figure 32 : Phénotype des souris de la lignée PRM/Alf**  
(d'après AUBIN-HOUZELSTEIN et coll., 2003)



**A** : Comparaison entre une souris 129S2/SvPa (à gauche) et une souris PRM/Alf (à droite). Les souris PRM/Alf sont porteuses de la mutation *patchwork* leur conférant un pelage composé de poils entièrement blancs ou noirs. **B** : Comparaison des tractus digestif entre souris 129S2/SvPa (à gauche) et PRM/Alf (à droite). La dolichomégaly intestinale des souris PRM/Alf est ici clairement mise en évidence.

# Matériels et méthodes

---

## I - ANIMAUX

### A - Lignées et mutants

La référence de cette étude était la lignée consanguine 129S2/SvPa (notée par la suite 129S2), issue de l'Institut Pasteur et entretenue dans l'animalerie de l'UMR955 INRA-ENVA. La lignée consanguine PRM/Alf est le résultat de croisements frères-sœurs sur plus de 30 générations à partir de trois couples de souris homozygotes pour la mutation *patchwork* dans un fonds génétique indéterminé. Elle est également entretenue dans l'animalerie de l'UMR955 INRA-ENVA. Chaque lignée comportait des individus sauvages, *Kit*<sup>+/+</sup>, et hétérozygotes, *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup>. La mutation *Kit*<sup>W-lacZ</sup> a été établie initialement chez la lignée 129S2 (BERNEX et coll., 1996) puis transférée par croisements et backcross successifs chez la lignée PRM/Alf. Le génotypage des animaux a été fait sur des critères phénotypiques : les individus *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> ont une absence de pigmentation à l'extrémité distale de la queue et des membres.

Toutes les souris étudiées étaient des femelles nullipares, ovariectomisées et âgées en moyenne de 108 ± 18 jours. Les animaux étaient élevés dans les mêmes conditions de température, d'éclairage et d'alimentation (*ad libitum*).

### B - Ovariectomie

Afin de s'affranchir des facteurs de variations inter-individuelles que pouvait entraîner le cycle œstral de la souris et améliorer la reproductibilité des résultats, nous avons choisi de stériliser les animaux. De plus, la perte de l'imprégnation hormonale pouvait permettre, comme chez la ratte, d'observer des contractions à la fois plus intenses et plus nombreuses (VEDERNIKOV et coll., 2003).

Au jour J<sub>0</sub>, les souris femelles ont été ovariectomisées. Nous les avons anesthésiées par voie intra-péritonéale<sup>43</sup>. Après un délai d'attente de 5 minutes, la peau du flanc en regard de l'ovaire a été épilée manuellement, désinfectée à l'alcool à 70% et incisée sur 5 mm. Après

---

<sup>43</sup> Posologie par gramme de poids vif : 90 µg/g de chlorhydrate de kétamine, 9 µg/g de chlorhydrate de xylazine, dans une solution de NaCl isotonique à 0,9 %. Nous disposons d'une solution mère composée de 8,5 mL de solution isotonique à 0,9 % de NaCl, de 2 mL d'IMALGENE 500<sup>®</sup> (Kétamine) et de 0,5 mL de ROMPUN<sup>®</sup> (Xylazine). A partir de cette solution, injection par voie intra-péritonéale de 0,01 mL/g de poids vif.

dissection des plans sous-cutanés et musculaires, le péritoine a été incisé et l’ovaire saisi en limitant les tractions sur la corne utérine. Le ligament suspenseur et l’oviducte ont été ligaturés avec un fil résorbable VICRYL 3-0 et sectionnés afin de libérer l’ovaire. Avec le même fil résorbable, péritoine et plan musculaire ont été suturés par un point en « X » et le plan cutané par un surjet simple. Cette technique est donc une adaptation à la souris de la technique d’ovariectomie dite « sur le flanc » des carnivores domestiques. Les animaux ont ensuite été placés dans des cages individuelles jusqu’à leur utilisation 8 jours plus tard, durée estimée suffisante pour la disparition de l’impregnation hormonale œstrogénique.

### C - Euthanasie

Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale, en accord avec les principes de bonnes pratiques sur les animaux de laboratoire.

## II - ETUDE DE L’ACTIVITE CONTRACTILE UTERINE

Une cuve à organes isolés (Panlab) contenant de l’eau et thermostatée à 35°C a été utilisée (**Figure 33**) selon le protocole suivi pour l’enregistrement de l’activité contractile intestinale (BELLIER et coll., 2005). Cette cuve pouvait recevoir deux échantillons en parallèle dans deux chambres à organes de 25 mL contenant une solution de Krebs thermostatée à 35°C, garantissant ainsi un apport nutritionnel et une homéostasie des tissus. Par l’intermédiaire de petits crochets métalliques, nous avons relié les cornes utérines à un transducteur de force (Panlab) étalonné pour une tension de 250 mg. Le transducteur traduisait le signal mécanique en un signal analogique repris par un convertisseur analogique-numérique MP100 (Biopac). Le signal numérique a été traité par le logiciel d’acquisition ACKNOWLEDGE 3.9.0. (Biopac). La composition de la solution de Krebs est indiquée dans le **tableau 10**. Cette solution était alimentée en continu par un mélange gazeux à 95% d’O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tableau 10 : Composition de la solution de Krebs en mM**

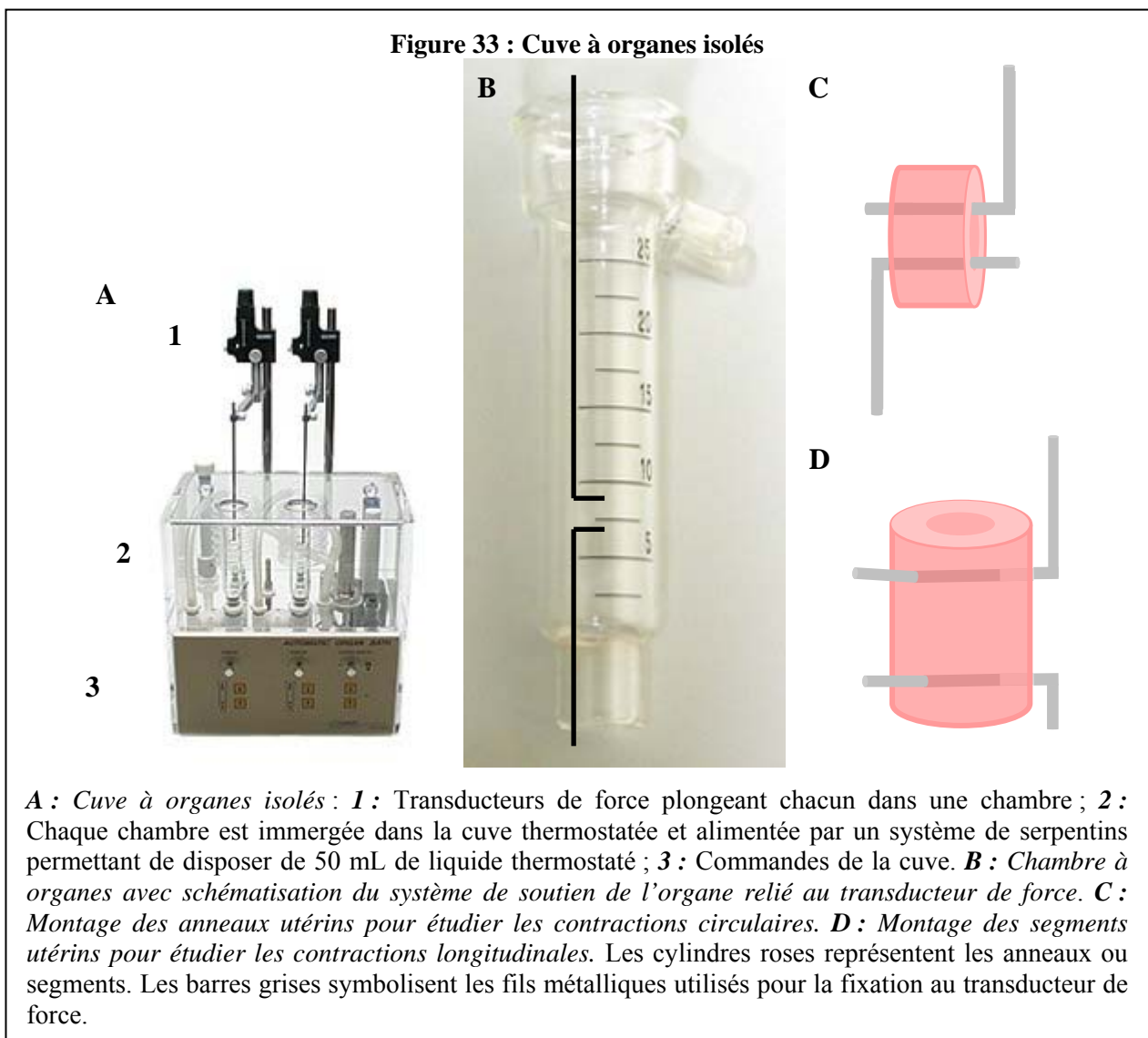
NaCl	KCl	NaHCO <sub>3</sub>	Glucose	CaCl <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O
118	4,7	25	10	1,25	1	1,4

Nous avons effectué les mesures sur des souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup>, 129S2 *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup>, PRM/Alf *Kit*<sup>+/+</sup> et PRM/Alf *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup>. Après l’euthanasie des femelles à J<sub>8</sub>, le tractus génital

complet<sup>44</sup> a rapidement été prélevé et les tissus conjonctif et adipeux ont été disséqués. Nous avons pesé le tractus génital et mesuré la longueur des cornes utérines.

Afin d'étudier les contractions circulaires, l'utérus a été recoupé transversalement en sections de 2 mm d'épaisseur, prélevées au milieu de chaque corne. Les deux anneaux obtenus ont été montés en parallèle, reliés au transducteur de force, de manière à déceler des variations du diamètre des anneaux, et soumis à une tension de 250 mg (**Figure 33-C**). Les données ont été enregistrées pendant une durée minimale d'une heure et maximale de 3 heures.

Afin d'étudier les contractions longitudinales, nous avons prélevé un segment d'environ 1 cm de longueur au milieu de chaque corne. Ceux-ci ont ensuite été reliés au transducteur de force de manière à déceler des variations de leur longueur (**Figure 33-D**). La tension d'étalonnage et les durées d'enregistrement étaient similaires.



<sup>44</sup> Vulve, vagin, cornes utérines et oviductes

Pour déterminer le nombre de contractions, nous avons analysé les tracés obtenus dans l'intervalle [T<sub>0</sub> + 15 min ; T<sub>0</sub> + 30 min]. Les contractions, définies par la succession d'une tension et d'un relâchement (**Figure 34-A et C, page 94**), ont été comptées par au moins deux manipulateurs et de façon indépendante. Les tracés litigieux ont été exclus de l'étude.

### III - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE *KIT* PAR LE GENE RAPPORTEUR *LACZ*

#### A - Etude macroscopique

Le tractus génital et l'estomac (témoin positif) de souris 129S2 *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> et PRM/Alf *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> ont été prélevés 8 jours après ovariectomie (J<sub>8</sub>). Le tractus génital et l'estomac d'un individu sauvage ont également été prélevés dans les mêmes conditions (témoin négatif). Les organes ont d'abord été rincés dans une solution de PBS puis fixés 1 heure à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4%. Après rinçage dans le PBS, ils ont été placés *in toto* à 32°C, une nuit, dans une solution de X-Gal dont la composition apparaît dans le **tableau 11**.

**Tableau 11 : Composition de la solution de X-Gal (dilution dans du PBS)**

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside	Ferricyanure de potassium	Ferrocyanure de potassium	Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate (Tween 20)	MgCl <sub>2</sub>
0,4 mg/mL	2 mM	2 mM	11 mg/mL	4 mM

Le lendemain, les organes ont été rincés dans le PBS et conservés à 4°C dans le PFA à 4%. La localisation anatomique du marquage a été observée sous loupe binoculaire du côté séreuse de l'organe et photographiée (Nikon Coolpix 995).

#### B - Etude microscopique

Pour chaque tractus génital prélevé et coloré *in toto*, les cornes ont été isolées. Une corne a été conservée en intégralité pour être recoupée et incluses longitudinalement (notée **Lg**). L'autre a été recoupée en trois parties (notées **1**, **2** et **3**, respectivement de la plus proximale à la plus distale par rapport à l'oviducte) afin d'effectuer des coupes transversales à trois localisations distinctes. L'estomac a été coupé et inclus longitudinalement. Avant l'inclusion en paraffine, chaque échantillon d'utérus a été préalablement inclus dans un gel d'agarose à 1,2% afin d'assurer une bonne orientation dans les blocs de paraffine. Les blocs



obtenus ont été coupés à une épaisseur de 3,5  $\mu\text{m}$  au microtome (Leica RM 2245). Les coupes ont été déposées sur lames SuperFrost (Menzel Gläser). Cinq lames, correspondant à des coupes espacées d'au moins 21  $\mu\text{m}$ , ont été faites pour chaque partie (**1**, **2**, **3** et **Lg**). Les lames ont été traitées par coloration au trichrome Hémalum-Eosine-Safran ou au Giemsa et montées avec Eukitt et lamelles. Les coupes ont été observées sous un microscope optique (Leica DMLB) et photographiées à l'aide d'une caméra (CoolSNAP, RS Photometric) et du logiciel RS Image 1.9.2. (Ropper Scientific).

## **IV - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE *KIT* PAR IMMUNOMARQUAGE DE *KIT***

### **A - Préparation des organes**

Le tractus génital et l'estomac (témoin positif) de souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup> et PRM/Alf *Kit*<sup>+/+</sup> ont été prélevés à J<sub>8</sub>, rincés dans du PBS et fixés 1 heure à 4°C dans une solution de PFA à 4%. Après deux rinçages dans le PBS, ils ont été placés *in toto* dans une solution de PBS-sucrose à 30% pendant une nuit. Le lendemain, les échantillons ont été inclus dans l'OCT (Tissue Tek), congelés en vapeur d'azote et conservés à - 80°C. Pour l'inclusion, l'estomac a été recoupé dans le plan longitudinal. Pour l'utérus, les cornes ont été séparées : l'une incluse en vue de coupes longitudinales, l'autre en vue de coupes transversales.

Des coupes de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées au cryostat et recueillies sur lames SuperFrost + (Menzel Gläser). Chaque lame comportait deux coupes longitudinales, une d'estomac et une de corne utérine, et une coupe transversale de corne utérine. Les lames ont été fixées 10 minutes dans l'acétone et conservées à - 80°C.

### **B - Révélation de la protéine *KIT***

Après décongélation, les coupes ont été fixées 10 minutes dans l'acétone et rincées trois fois pendant 5 minutes dans du PBS. Les sites non-spécifiques ont été bloqués par une solution de sérum de chèvre à 5% (Interchim) dans du PBS pendant 20 minutes. Les coupes ont été incubées 1 heure à 37°C en présence d'un anticorps de rat monoclonal anti-KIT de souris (Santa Cruz Tebu) dilué au 1/50 dans du PBS en présence de sérum de chèvre à 5%. Une lame n'a pas été incubée en présence de cet anti-corps (témoin négatif). Après trois rinçages de 5 minutes dans du PBS, les coupes ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante et dans l'obscurité avec un anticorps de chèvre anti-IgG<sub>2b</sub> de rat dilué au 1/200 dans

du PBS et couplé au fluorochrome FITC (Alexa Fluor 488, Molecular Probes). Trois rinçages de 5 minutes au PBS ont été effectués avant un marquage nucléaire de 3 minutes par une solution de DAPI<sup>45</sup> (Molecular Probes) à 1,25 µg/mL. Un dernier rinçage de 10 minutes dans le PBS a été effectué avant montage en milieu aqueux (DAKO Fluorescent Mounting Medium). Les lames ont été conservées à + 4°C dans l'obscurité. Les coupes ont été observées sous un microscope à fluorescence (Leica DMLB) et lumière fluorescente (Leica HBO100), et photographiées à l'aide d'une caméra (CoolSNAP, RS Photometric) et du logiciel RS Image 1.9.2. (ROPPER Scientific).

## V - EFFET PHARMACOLOGIQUE DE L'IMATINIB

Les anneaux et les segments utérins de souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup> ont été prélevés et montés comme précédemment. Après un temps d'équilibration dans la solution de Krebs, chacun a été soumis à une dose d'Imatinib (Gleevec<sup>®</sup>, Novartis) de 8, 20, 40 ou 80 µM, à l'instant  $T_{\text{Imatinib}}$ . Chaque dose a été testée sur au moins trois anneaux utérins ou trois segments utérins. L'aire sous la courbe (ASC) a été calculée, pendant les périodes [ $T_{\text{Imatinib}} - 15$  minutes ;  $T_{\text{Imatinib}}$ ] ( $ASC_{\text{avant Imatinib}}$ ) et [ $T_{\text{Imatinib}}$  ;  $T_{\text{Imatinib}} + 15$  minutes] ( $ASC_{\text{après Imatinib}}$ ), par le logiciel ACKNOWLEDGE. Pour apprécier un effet, nous avons défini et calculé un rapport  $R_1$  défini ainsi :

$$R_1 = \frac{ASC_{\text{après Imatinib}}}{ASC_{\text{avant Imatinib}}}$$

## VI - ETUDE MORPHOLOGIQUE COMPAREE DES UTERUS

Les mesures de longueur des cornes utérines ont été comparées entre les souris 129S2 et PRM/Alf. Les carcasses des animaux ont également été pesées. La masse de la carcasse correspond à la masse du corps sans les organes abdominaux internes. Le tractus génital complet des femelles a également été pesé. Le rapport  $R_2$  entre la masse de ce tractus et celle de la carcasse a été calculé. Masses de carcasses, masse du tractus génital et rapport  $R_2$  ont été comparés entre souris 129S2 et PRM/Alf.

---

<sup>45</sup> 4',6-diamidino-2-phénylindol : colorant se fixant à l'ADN et fluorescent en lumière ultra-violet.

## VII - ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  erreur standard (SE)<sup>46</sup> et ont été comparés statistiquement par un test-t non apparié. Les rapports R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> ont été comparés par un test de Fisher. Les calculs ont été effectués par le logiciel STAT-VIEW version 4.51.3.PPC (Abacus Concepts). Les différences obtenues ont été considérées significatives pour une valeur de *P* inférieure à 0,05.

---

<sup>46</sup>  $SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ , où  $\sigma$  est l'écart-type et  $n$  est le nombre de mesures effectuées.



# Résultats

---

## I - ETUDE COMPAREE DE L'ACTIVITE CONTRACTILE UTERINE

L'étude d'anneaux utérins *ex vivo* a mis en évidence des contractions circulaires spontanées, dues à l'activité de la couche musculaire circulaire. Le nombre et l'amplitude de ces contractions décroissaient lentement au cours du temps. Après 3 heures dans la cuve, il existait encore une activité contractile (résultats non montrés).

Chez les souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup> ( $n^{47} = 7$ ), le profil de ces contractions présentait un aspect sinusoïdal régulier et continu (**Figure 34-A**). En effet, les phases de repos séparant deux contractions successives étaient virtuelles. Les anneaux utérins présentaient une fréquence moyenne de contractions de  $34 \pm 2,3$  sur 15 minutes. Le profil des souris 129S2 *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> ( $n = 7$ ) était identique à celui des souris sauvages (**Figure 34-B**). En moyenne, ces animaux présentaient  $36 \pm 2,1$  contractions. La comparaison avec les souris sauvages par un test-t (**Figure 34-E**) indiquait qu'il n'y avait pas de différence significative entre individus sauvages et hétérozygotes ( $P = 0,5042$ ). En rassemblant les données sur les souris de fonds génétique 129S2, on comptabilisait un nombre moyen de  $35 \pm 1,5$  contractions circulaires sur une période de 15 minutes.

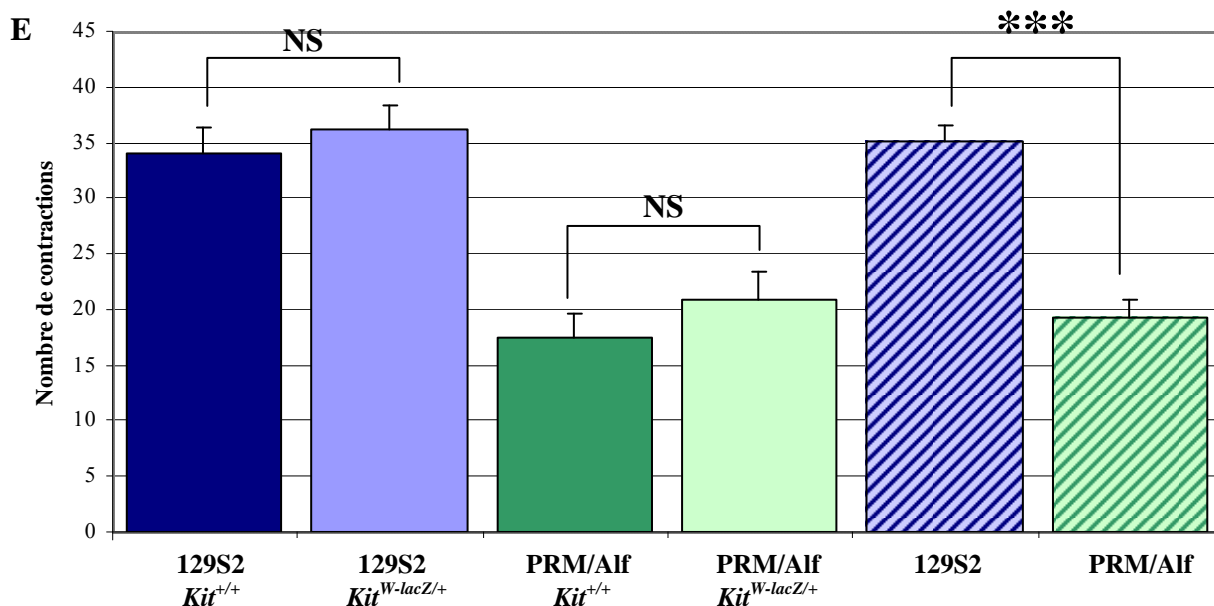
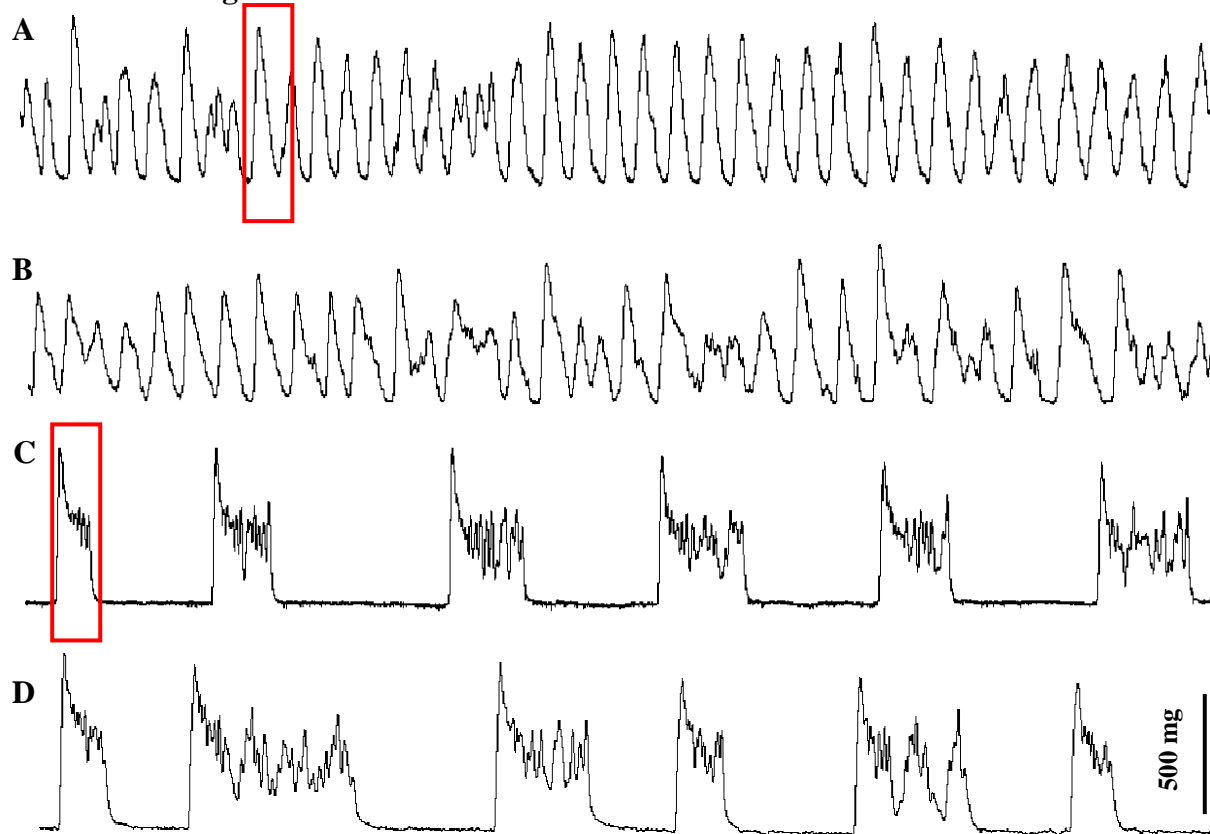
Les souris du fonds génétique PRM/Alf ont été étudiées de la même façon. Les animaux PRM/Alf *Kit*<sup>+/+</sup> présentaient un profil différent des souris 129S2. Les contractions étaient davantage regroupées en salves séparées entre elles par des pauses, définies par une absence de contraction (**Figure 34-C**). Les durées des salves et des pauses semblaient relativement constantes. Chez les femelles PRM/Alf *Kit*<sup>+/+</sup> ( $n = 8$ ), on comptait en moyenne  $17,5 \pm 2,1$  contractions pour 15 minutes. Les animaux hétérozygotes présentaient également ce profil de contractions (**Figure 34-D**). Chez les femelles PRM *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> ( $n = 8$ ), on dénombrait en moyenne  $20,8 \pm 2,5$  contractions. Le test-t non apparié indiquait que la différence entre le nombre de contractions des homozygotes et hétérozygotes (**Figure 34-E**) n'était pas significative ( $P = 0,3295$ ). En rassemblant les données sur les animaux de fonds génétique PRM/Alf, on comptabilisait un nombre moyen de  $19,1 \pm 1,6$  contractions longitudinales sur une période de 15 minutes.

La comparaison entre les souris 129S2 et PRM/Alf (**Figure 34-E**) a montré une différence significative ( $P < 0,001$ ) entre la moyenne de contractions de ces deux lignées.

---

<sup>47</sup>  $n$  définit ici le nombre d'anneaux étudiés et non le nombre d'animaux.

**Figure 34 : Etude *ex vivo* des contractions utérines circulaires**

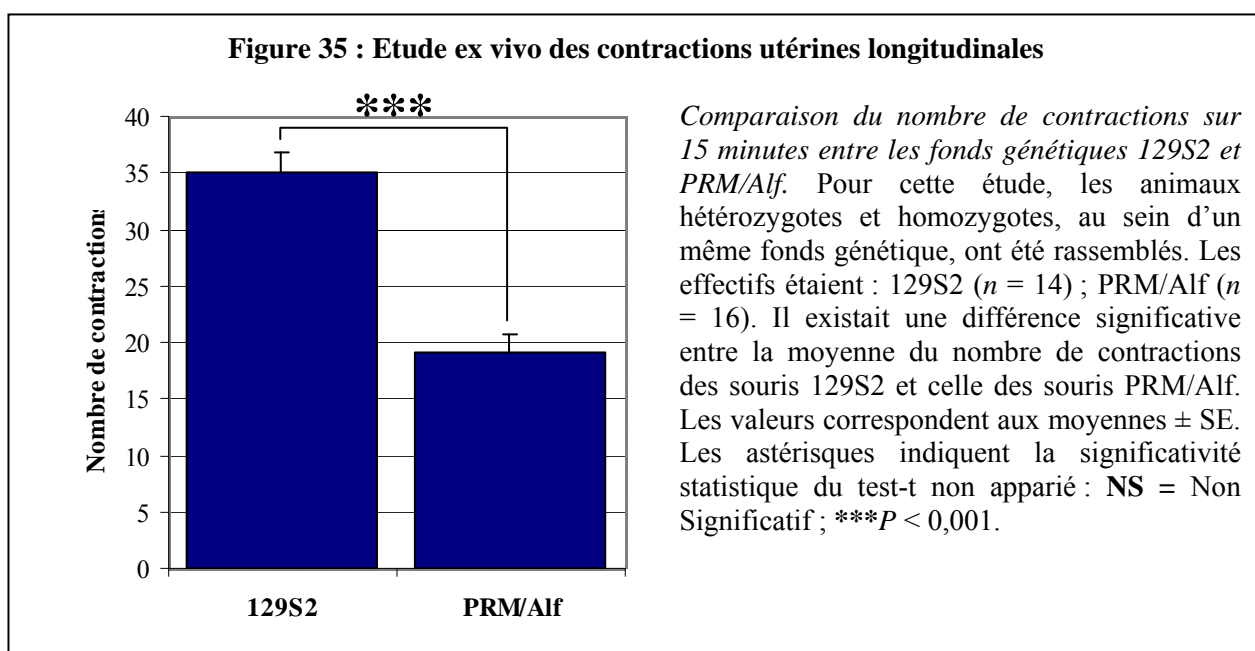


**A, B, C, D :** Enregistrements dans les différents génotypes. **A :** 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup> **B :** 129S2 *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> **C :** PRM/Alf *Kit*<sup>+/+</sup> **D :** PRM/Alf *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> Les tracés correspondent à une durée d'expérimentation de 15 minutes et débutent environ 15 minutes après la mise en place des organes dans la cuve. Les rectangles rouges délimitent une phase de contraction. **E :** Comparaison du nombre de contractions sur 15 minutes, au sein d'un même fonds génétique et entre les fonds génétiques 129S2 et PRM/Alf. Les effectifs étaient : 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup> (*n* = 7) ; 129S2 *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> (*n* = 7) ; PRM/Alf *Kit*<sup>+/+</sup> (*n* = 8) ; PRM/Alf *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> (*n* = 8). Il existait une différence significative entre la moyenne du nombre de contractions des souris 129S2 et celle des souris PRM/Alf. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SE. Les astérisques indiquent la significativité statistique du test-t non apparié : \*\*\**P* < 0,001 ; NS = Non Significatif.

Nous avons également mis en évidence des contractions spontanées longitudinales dues à l'activité de la couche musculaire longitudinale. Leur nombre et leur amplitude décroissaient également au cours du temps et une activité contractile persistait encore après 3 heures d'expérimentation. Les individus homozygotes sauvages et hétérozygotes n'ont pas été séparés pour cette étude. Chez les souris 129S2 ( $n = 14$ ), le profil des contractions était le même que pour les contractions circulaires (résultats non montrés). On dénombrait en moyenne, sur 15 minutes,  $35,1 \pm 1,6$  contractions.

Les souris PRM/Alf ( $n = 16$ ) avaient le même profil en contractions longitudinales qu'en contractions circulaires. Elles présentaient en moyenne, sur 15 minutes,  $19,2 \pm 1,5$  contractions.

La comparaison entre souris 129S2 et PRM/Alf a révélé que la différence entre leur fréquence moyenne de contractions était significative ( $P < 0,001$ ) (**Figure 35**).



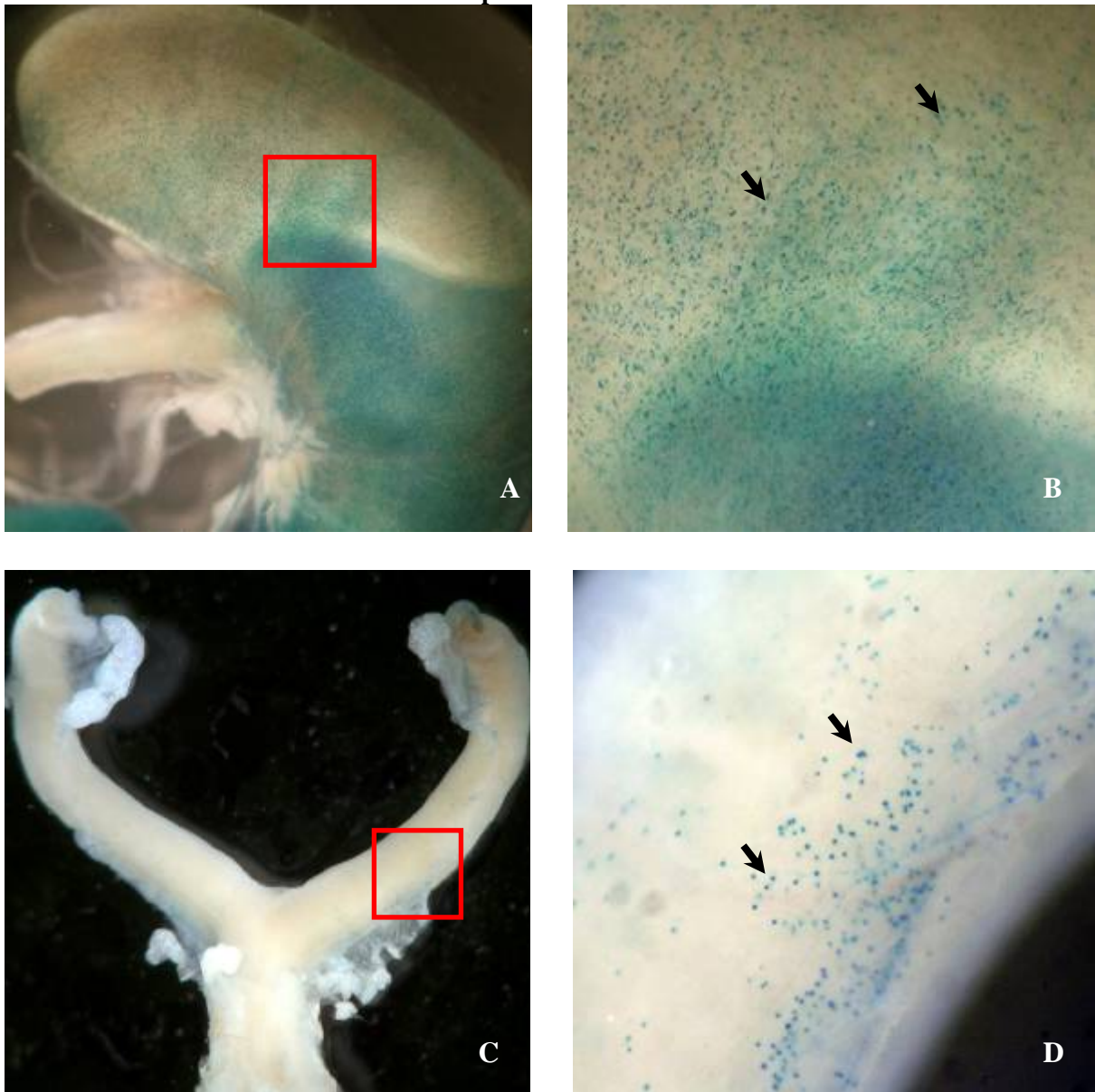
## II - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE *KIT* PAR LE GENE RAPPORTEUR *LACZ*

### A - Observation macroscopique

L'utilisation d'individus hétérozygotes *Kit<sup>W-lacZ/+</sup>* permet d'étudier l'expression tissulaire de *Kit* grâce au gène rapporteur codant la  $\beta$ -galactosidase et donnant, en présence de X-Gal, un marquage nucléaire bleu du noyau des cellules exprimant ce gène. Macroscopiquement, les estomacs témoins *Kit<sup>+/+</sup>* présentaient une absence de marquage à

l'exception de la zone glandulaire de l'estomac qui montrait, par transparence, une coloration bleutée diffuse. Ce marquage était dû à la  $\beta$ -galactosidase exprimée par les bactéries contenues dans le bol alimentaire (résultats non montrés). Chez les individus 129S2 *Kit<sup>W-lacZ/+</sup>*, l'estomac présentait en plus, en surface de la séreuse, un marquage fin, très dense dans la zone glandulaire, plus léger dans la zone malpighienne. Cardia et pylore étaient intensément colorés. Le marquage n'était pas véritablement ponctiforme, les noyaux bleus apparaissant légèrement allongés selon un axe commun (**Figure 36-A et B**).

**Figure 36 : Observation macroscopique d'organes de souris 129S2 *Kit<sup>W-lacZ/+</sup>* après traitement par le X-Gal**



**A-B : Estomac.** **A** : Le marquage soulignait une grande densité de noyaux colorés, notamment dans la zone glandulaire. **B** : Le marquage était ponctiforme à fusiforme (flèches). Il correspondait aux noyaux des ICC gastriques. **C-D : Tractus génital femelle.** **C** : Le marquage était plus discret que celui de l'estomac. **D** : Les noyaux marqués étaient peu nombreux sur la corne et souvent localisés sur le bord mésométrial et le mésométrium (flèches). Les carrés rouges en **A** et **C** indiquent la zone agrandie, respectivement, en **B** et **D**.



Ce marquage correspondait à la distribution des ICC gastriques (SEKI et KOMURO, 2002).

Dans l'utérus, le marquage était moins intense que dans l'estomac. Il s'agissait là d'un marquage véritablement ponctiforme. S'il ne semblait pas y avoir de localisation préférentielle le long de la corne, le marquage semblait cependant plus présent sur le bord mésométrial de la corne utérine. Le nombre de noyaux marqués était plus élevé sur le mésométrium (**Figure 36-C et D**). Les mêmes résultats ont été observés chez les individus PRM *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> (résultats non montrés).

## **B - Observation microscopique**

Chez les souris 129S2 *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup>, l'observation microscopique des estomacs marqués a confirmé un marquage des couches externes de la paroi stomacale, c'est-à-dire des couches musculaires. Les noyaux marqués apparaissaient ovoïdes dans la couche musculaire circulaire, et plus fusiformes dans la couche musculaire longitudinale externe. Ils correspondaient aux noyaux des ICC. Isolés, de rares noyaux marqués apparaissaient dans les autres couches de la paroi (**Figure 37-A et B**).

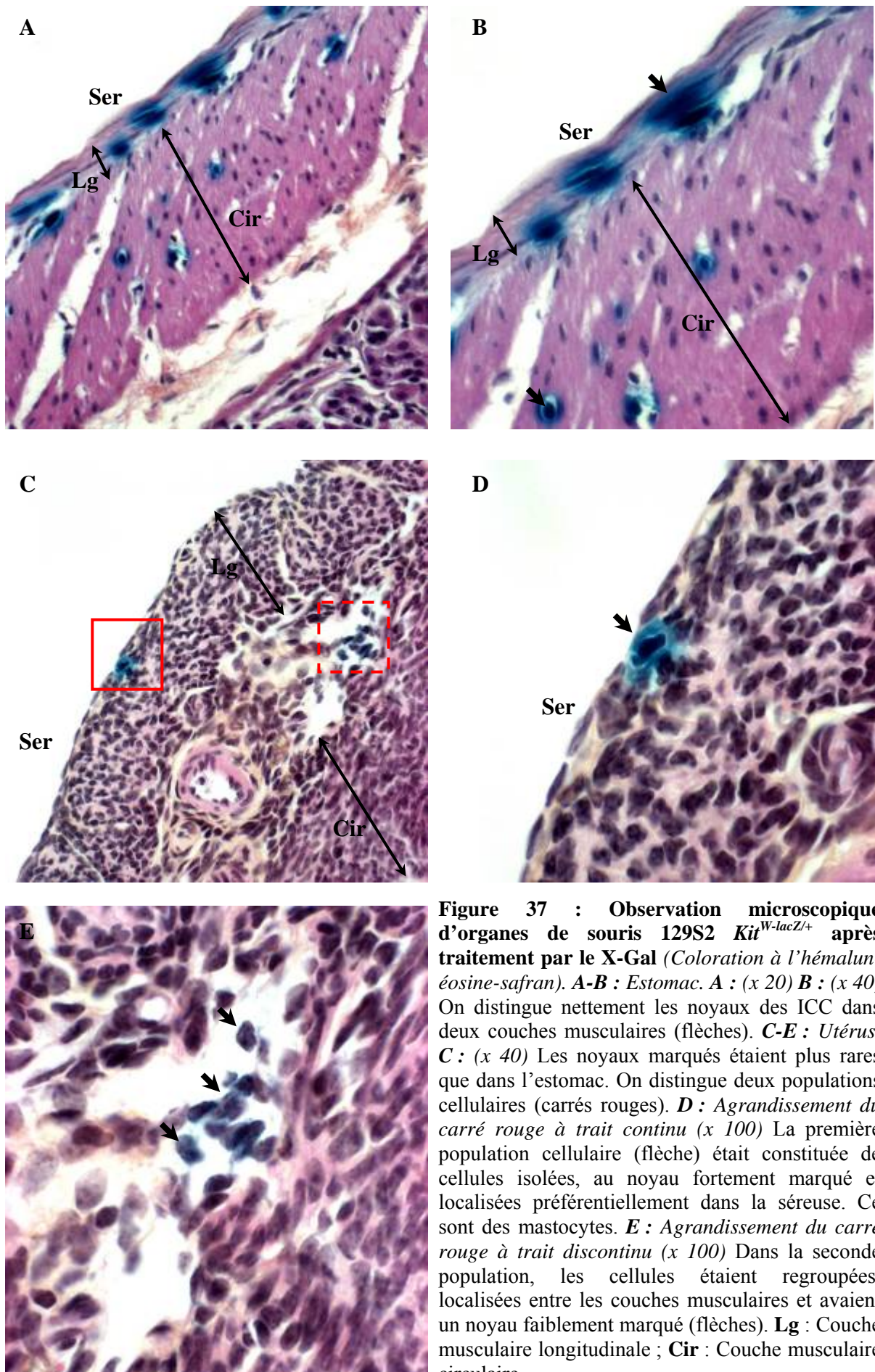
Sur les coupes de cornes utérines de souris 129S2, on distinguait deux populations de cellules marquées (**Figure 37-C à E**). La première population (**Figure 37-D**) était constituée de cellules rondes, au noyau rond intensément marqué.

Ces cellules étaient isolées et majoritairement présentes dans le mésométrium, la séreuse ou plus rarement entre les couches musculaires, et moins fréquemment dans l'endomètre. On dénombrait rarement plus d'une dizaine de ces cellules par coupe à fort grossissement. La coloration au Giemsa a mis en évidence, dans le cytoplasme de ces cellules, des granulations denses pourpres et métachromatiques (**Figure 38**), ce qui nous a permis de les identifier comme étant des mastocytes.

La seconde population cellulaire (**Figure 37-E**) comportait des cellules au marquage nucléaire faible et ponctiforme. Ces cellules avaient un noyau plus allongé, apparaissaient en groupes de 4 à 7 cellules et semblaient exclusivement localisées entre les deux couches musculaires. On en dénombrait également rarement plus d'une dizaine par coupe.

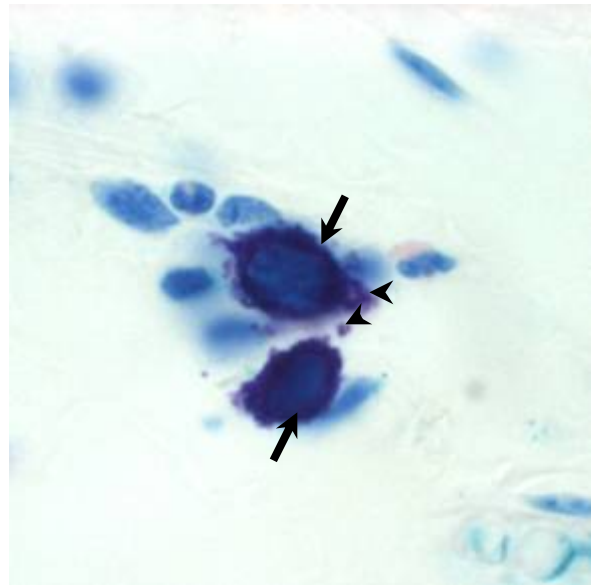
Les coupes longitudinales de l'utérus montraient les deux mêmes populations de cellules et confirmaient leur rareté dans le tissu utérin. Les coupes longitudinales (**Lg**) et les coupes transversales aux trois sites **1**, **2** et **3** semblaient indiquer qu'il n'y avait pas de localisation préférentielle le long de la corne utérine de ces cellules. En revanche, les coupes transversales semblaient confirmer leur présence préférentielle sur le bord mésométrial.

Les mêmes résultats ont été obtenus chez les souris PRM/Alf (résultats non montrés).



**Figure 37 : Observation microscopique d'organes de souris 129S2  $Kit^{W-lacZ/+}$  après traitement par le X-Gal (Coloration à l'hémalun-éosine-safran). A-B : Estomac. A : (x 20) B : (x 40) On distingue nettement les noyaux des ICC dans deux couches musculaires (flèches). C-E : Utérus. C : (x 40) Les noyaux marqués étaient plus rares que dans l'estomac. On distingue deux populations cellulaires (carrés rouges). D : Agrandissement du carré rouge à trait continu (x 100) La première population cellulaire (flèche) était constituée de cellules isolées, au noyau fortement marqué et localisées préférentiellement dans la séreuse. Ce sont des mastocytes. E : Agrandissement du carré rouge à trait discontinu (x 100) Dans la seconde population, les cellules étaient regroupées, localisées entre les couches musculaires et avaient un noyau faiblement marqué (flèches). Lg : Couche musculaire longitudinale ; Cir : Couche musculaire circulaire.**

**Figure 38 : Observation microscopique d'utérus de souris 129S2 *Kit<sup>W-lacZ/+</sup>* après traitement par le X-Gal (Coloration de Giemsa). (x 100)** On observe, essentiellement sur la séreuse, des cellules rondes, non jointives, dont le noyau apparaissait fortement marqué en bleu (flèches) : elles correspondent à la première population décrite précédemment. La coloration de Giemsa a mis en évidence dans leur cytoplasme de nombreuses granulations denses métachromatiques (têtes de flèches). Il s'agissait donc de mastocytes.



### III - IMMUNOMARQUAGE DE KIT

Après avoir utilisé la stratégie du gène rapporteur *lacZ*, nous avons choisi d'avoir recours aux techniques d'immunofluorescence.

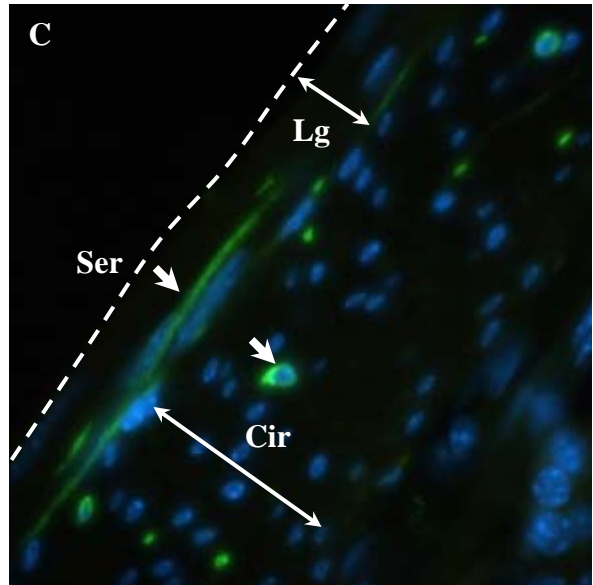
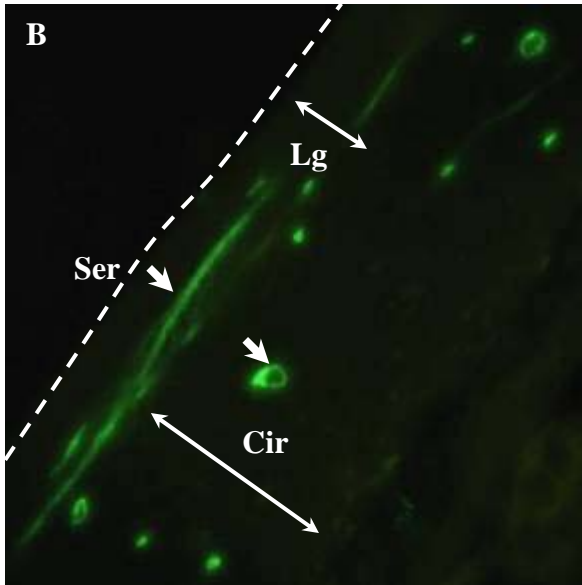
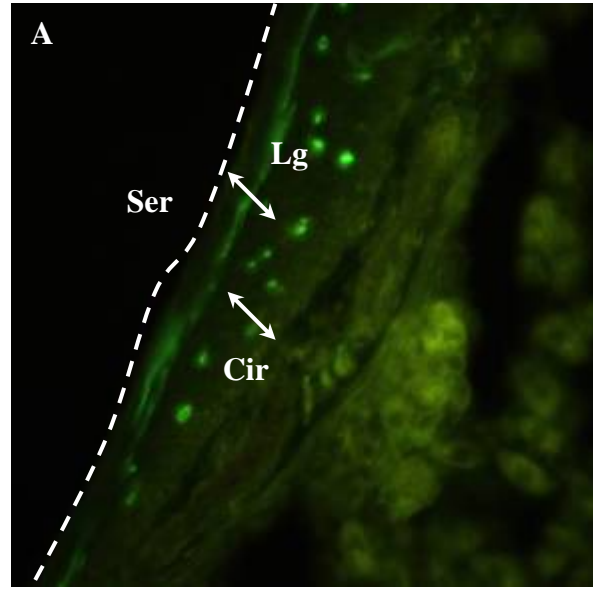
Les coupes d'estomac de souris 129S2 *Kit<sup>+/+</sup>* révélèrent un marquage fluorescent intense, perceptible dès le faible grossissement (x 20), localisé dans les couches musculaires (**Figure 39-A et B**). Les cellules KIT-positives étaient nombreuses. Etant donné la localisation cellulaire de KIT, le marquage était ici membranaire. Dans la couche musculaire circulaire interne, la section des cellules marquées apparaissait circulaire. En revanche, dans la couche musculaire longitudinale externe, les cellules marquées apparaissaient fusiformes. *Kit* était donc exprimé par des cellules dont l'orientation suivait celle des fibres musculaires dans lesquelles elles étaient localisées. Ce marquage correspondait aux ICC gastriques.

Sur les coupes d'utérus de 129S2 *Kit<sup>+/+</sup>*, le marquage était discret et ne devenait perceptible qu'à partir d'un plus fort grossissement (x 40) (**Figure 39-C à E**). Il concernait deux populations de cellules :

- des cellules rondes avec un noyau ovoïde central, souvent isolées et localisées essentiellement dans la séreuse, entre les couches musculaires ou dans le mésométrium, très rarement dans l'endomètre (**Figure 39-D**) ;
- des cellules rondes à ovales, avec un noyau ovale central, souvent en groupe de 4 à 7 cellules et localisées exclusivement entre les couches musculaires (**Figure 39-E**).

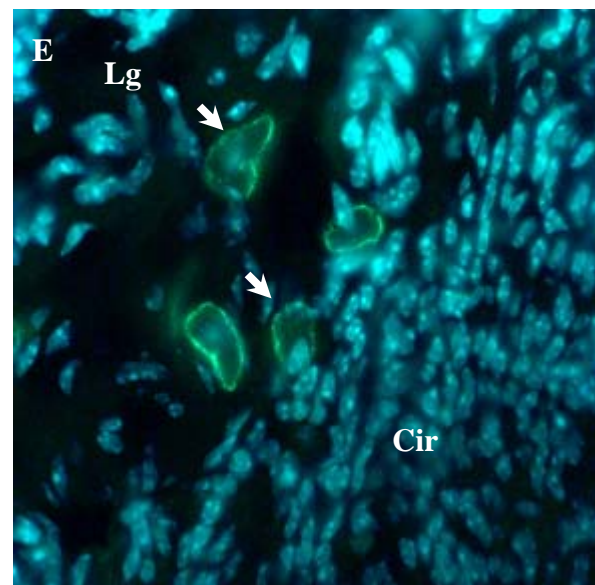
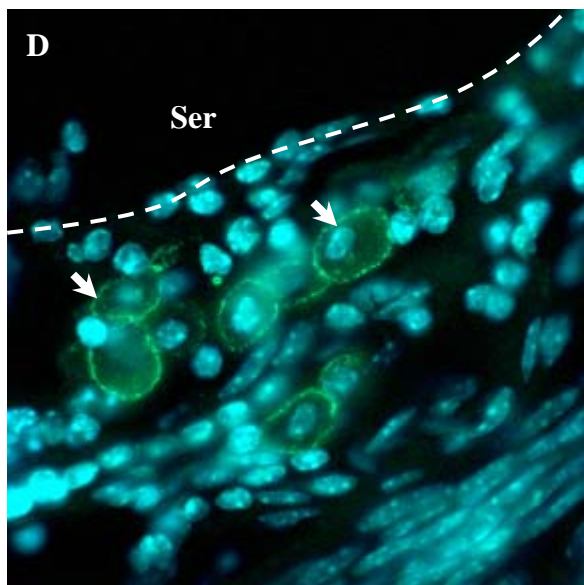
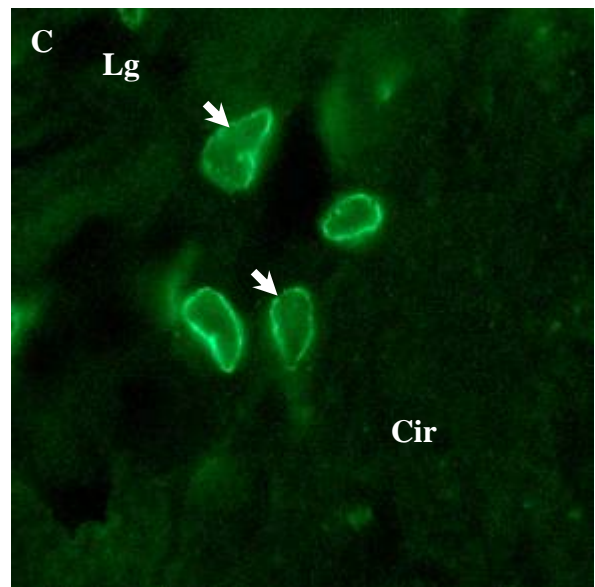
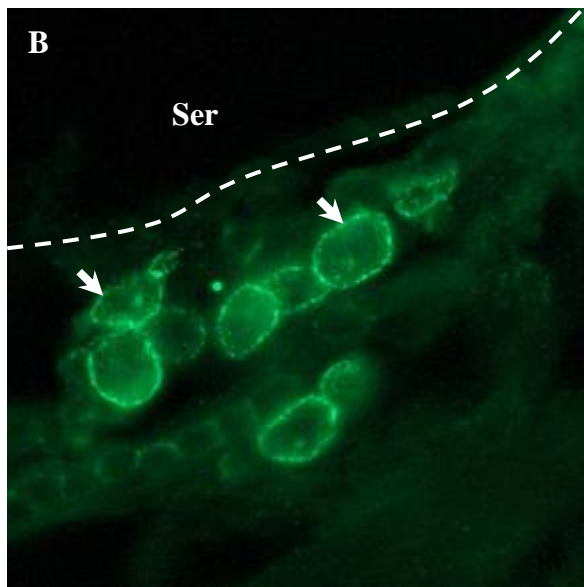
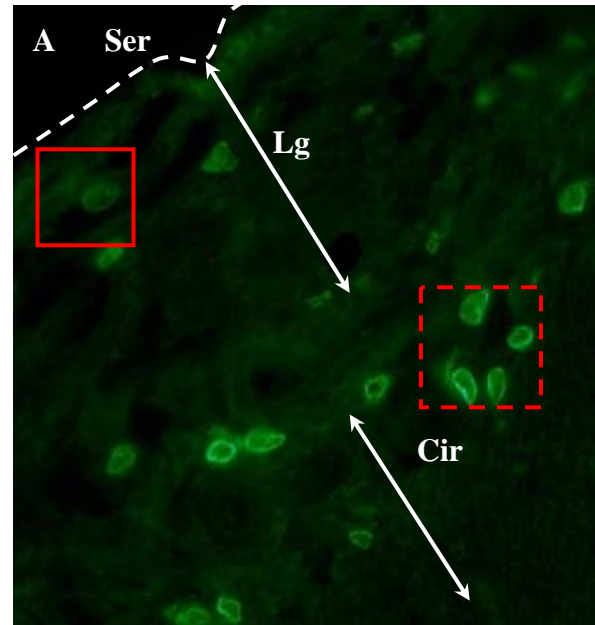
Aucune différence n'a été constatée chez les souris PRM/Alf (résultats non montrés).

**Figure 39 : Immunofluorescence anti-KIT sur estomacs de souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup>.** Les cellules qui exprimaient *Kit* présentaient un marquage membranaire fluorescent vert (FITC). **A :** (*x* 20) **B :** (*x* 40). On distingue les contours cellulaires des ICC (flèches) dans les couches musculaires longitudinales et circulaires. **C :** (*x* 40) Superposition du marquage nucléaire au DAPI. **Ser :** Séreuse (représentée par une ligne discontinue) ; **Lg :** Couche musculaire longitudinale ; **Cir :** Couches musculaires circulaires.





**Figure 40 : Immunofluorescence anti-KIT sur utérus de souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup>.** Les cellules exprimant *Kit* présentaient un marquage membranaire fluorescent vert (FITC). **A :** (*x 40*) On distingue deux populations cellulaires (carrés rouges). **B :** Agrandissement du carré rouge à trait continu (*x 100*) La première population était constituée de cellules rondes, souvent isolées, et localisées préférentiellement sur la séreuse (flèches). **C :** Agrandissement du carré rouge à trait discontinu (*x 100*) La seconde population était constituée de cellules regroupées, fusiformes et localisées entre les couches musculaires (flèches). **D-E :** (*x 100*) Superposition du marquage nucléaire au DAPI. **Ser :** Séreuse (représentée par une ligne discontinue); **Lg :** Couche musculaire longitudinale; **Cir :** Couche musculaire circulaire.

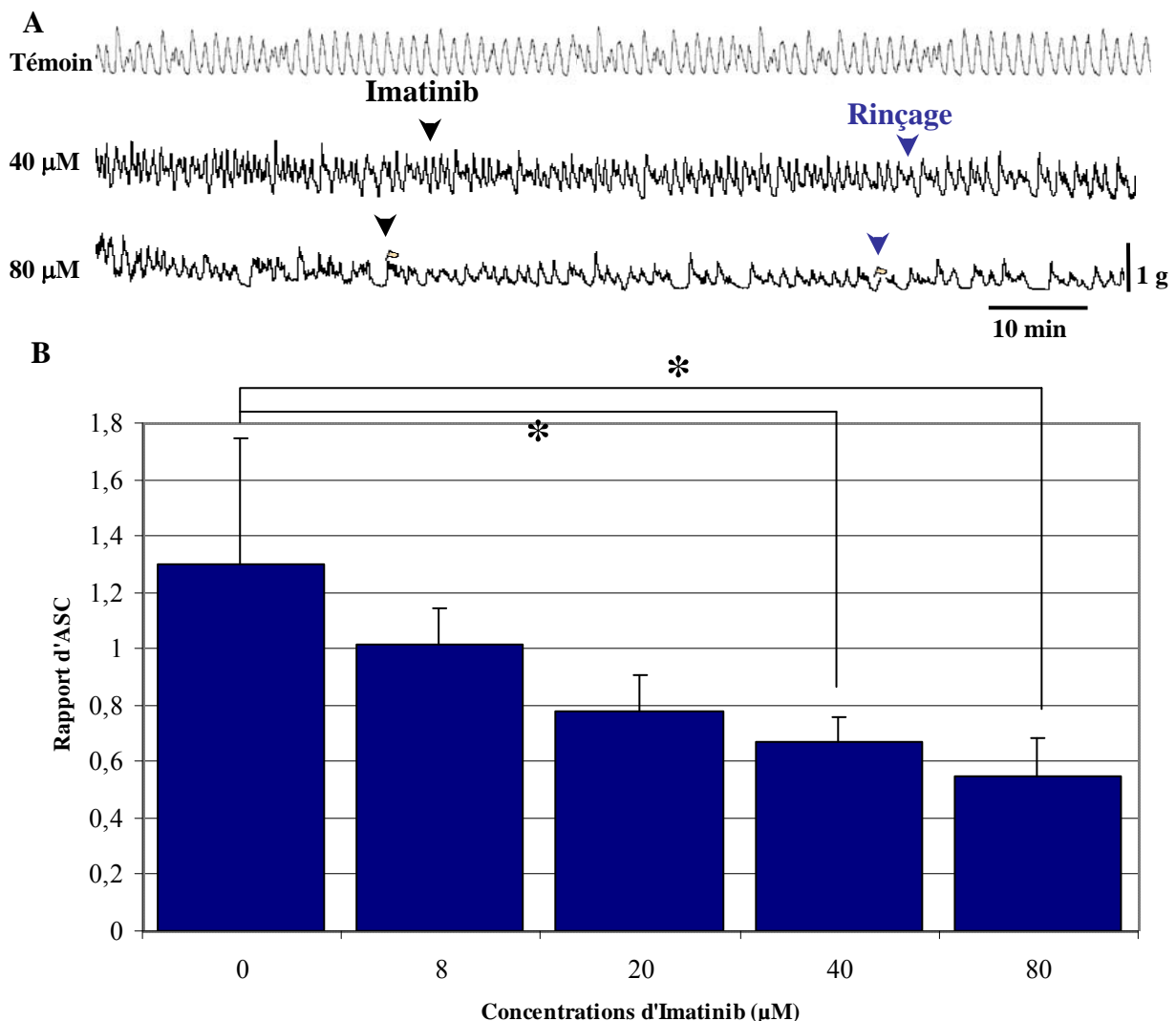


## IV - EFFET DE L'IMATINIB SUR LES CONTRACTIONS UTERINES

L'effet de l'Imatinib a été testé à 4 concentrations : 8, 20, 40 et 80  $\mu\text{M}$ .

Sur les contractions circulaires, les doses de 8 et 20  $\mu\text{M}$  ne montraient pas d'effet significatif (résultats non montrés). Les tracés correspondant aux doses de 40 et 80  $\mu\text{M}$  indiquaient un effet inhibiteur de l'Imatinib sur l'amplitude et la fréquence des contractions (**Figure 41-A**). De plus, la comparaison des rapports  $R_1$ , par un test de Fisher, n'était significative qu'entre les témoins et les doses de 40  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,0433$ ) et de 80  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,0192$ ) (**Figure 41-B**). A noter que le rinçage restaurait une activité normale des échantillons.

**Figure 41 : Etude ex vivo de l'effet de l'Imatinib sur les contractions utérines circulaires chez les souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup>**

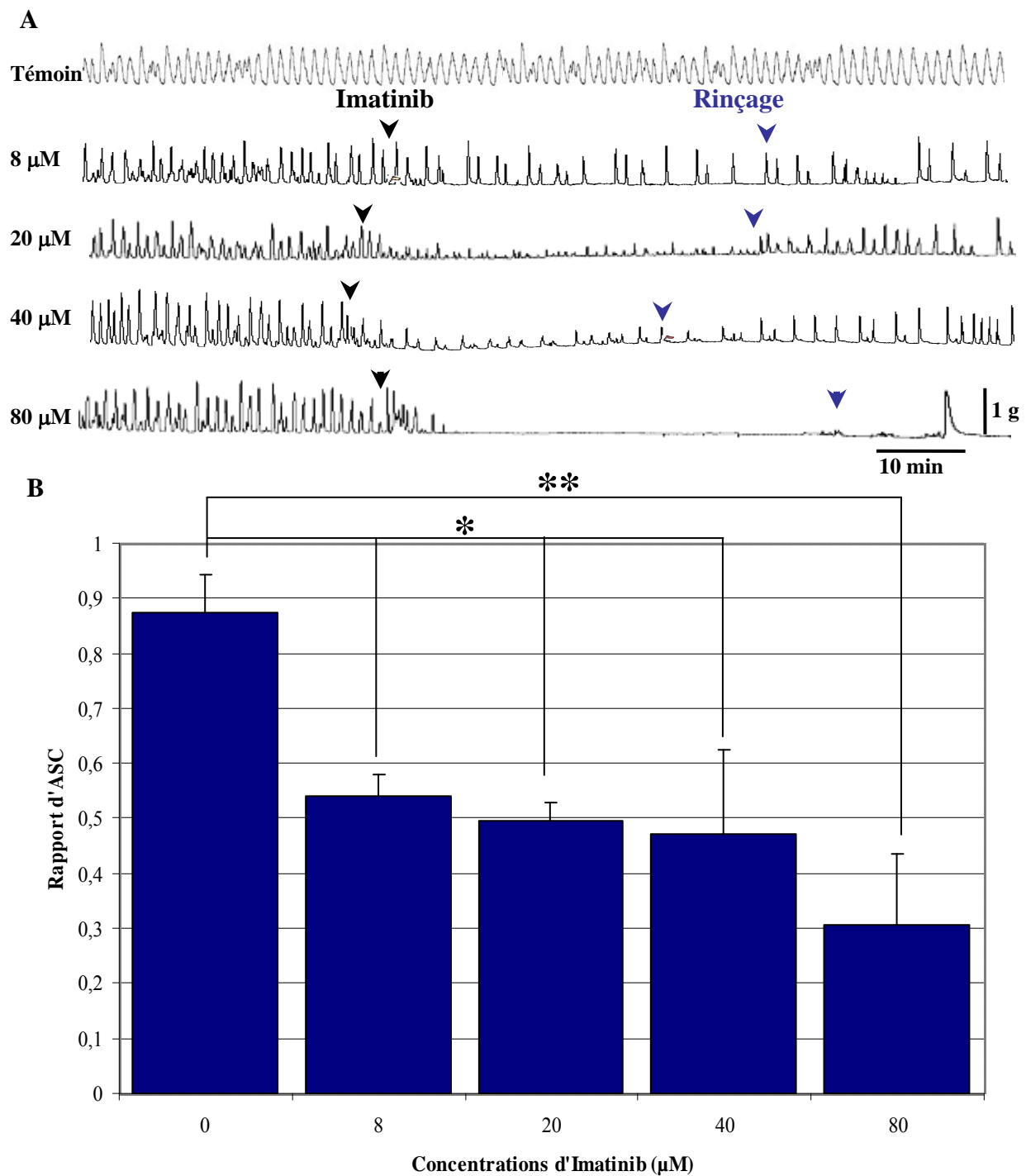


**A :** Tracés des enregistrements des contractions utérines circulaires en l'absence d'Imatinib (Témoin) ou en présence d'Imatinib (40 et 80  $\mu\text{M}$ ). **B :** Représentation graphique du rapport  $R_1$  d'aires sous la courbe (ASC) après et avant l'apport d'Imatinib dans le milieu. Les effectifs étaient : témoins ( $n = 3$ ) ; 8  $\mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) ; 20  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) ; 40  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) ; 80  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ). Il existait un effet significatif de l'Imatinib pour les doses de 40  $\mu\text{M}$  et 80  $\mu\text{M}$ . Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  SE. Seuls les écarts significatifs sont indiqués. Les astérisques indiquent la significativité statistique du test de Fisher :  $*0,01 < P < 0,05$ .

Sur les contractions longitudinales, les tracés indiquaient un effet inhibiteur de l'Imatinib sur leur amplitude et leur fréquence dès la dose de 8  $\mu\text{M}$  (**Figure 42**). En comparant les rapports  $R_1$  par un test de Fischer, ceux-ci s'avèrent significativement différents entre la dose témoin et les doses de 8  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,021$ ), de 20  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,159$ ), de 40  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,114$ ) et 80  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,0013$ ). Le rinçage permettait de rétablir l'activité initiale.

Les études pharmacologiques ont donc montré un effet inhibiteur de l'Imatinib sur les contractions utérines. Une dose de 80  $\mu\text{M}$  n'abolissait pas les contractions circulaires, mais semblait abolir les contractions longitudinales.

**Figure 42 : Etude *ex vivo* de l'effet de l'Imatinib sur les contractions utérines longitudinales chez les souris 129S2 *Kit*<sup>+/+</sup>**

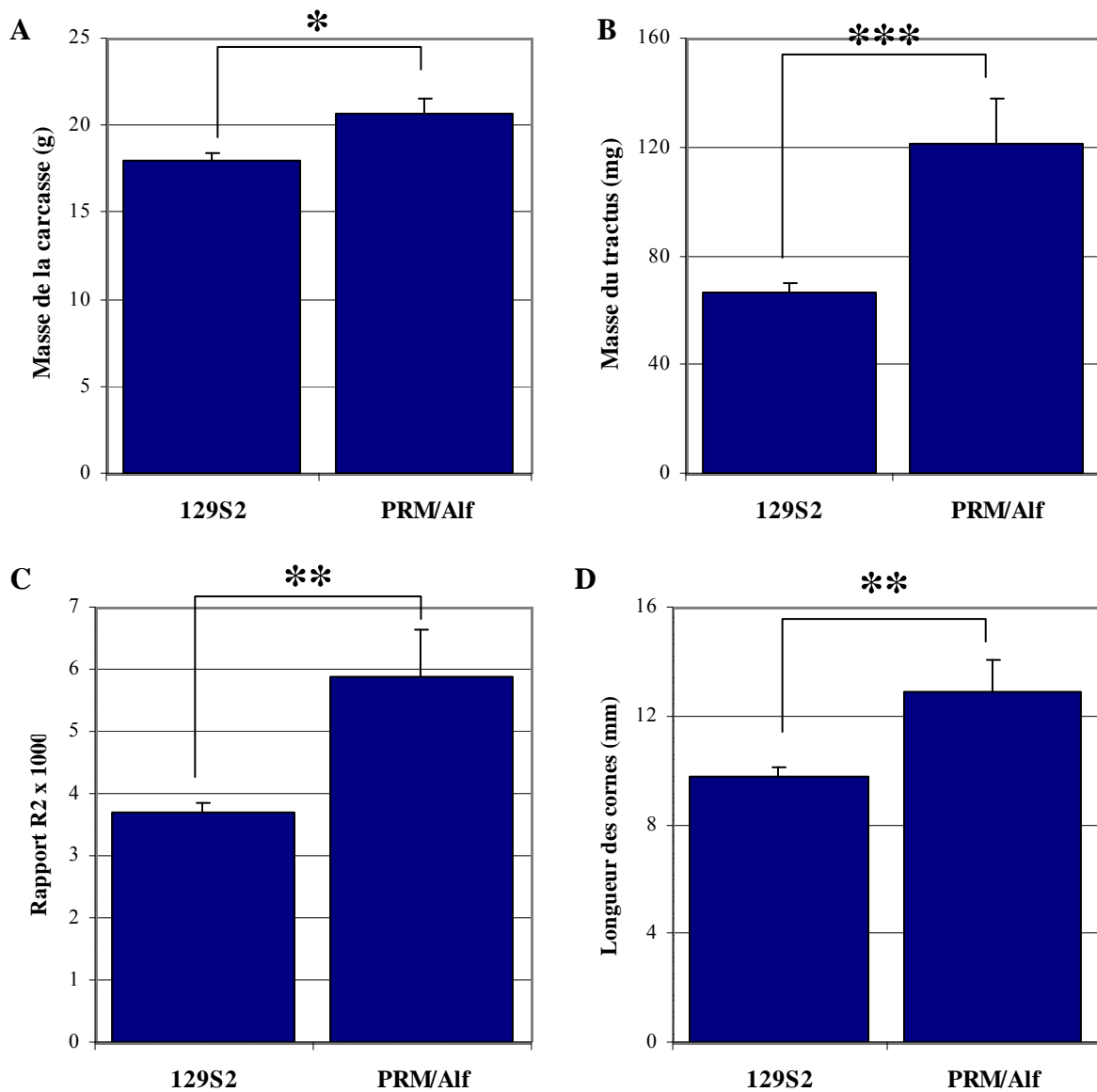


**A :** Tracés des enregistrements des contractions utérines longitudinales en l'absence d'Imatinib (Témoin) ou en présence d'Imatinib (8, 20, 40 et 80 µM). **B :** Représentation graphique du rapport R1 d'aires sous la courbe (ASC) après et avant l'apport d'Imatinib dans le milieu. Les effectifs étaient : témoins ( $n = 3$ ) ; 8 µM ( $n = 4$ ) ; 20 µM ( $n = 3$ ) ; 40 µM ( $n = 3$ ) ; 80 µM ( $n = 3$ ). Il existait un effet significatif de l'Imatinib pour toutes les doses utilisées. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  SE. Seuls les écarts significatifs sont indiqués. Les astérisques indiquent la significativité statistique du test de Fisher : \* $0,01 < P < 0,05$  ; \*\* $0,001 < P < 0,01$ .



## V - ETUDE MORPHOLOGIQUE COMPAREE DES UTERUS

**Figure 43 : Etude morphologique comparée des utérus de souris 129S2 et PRM/Alf**



**A :** Comparaison de la masse (g) de la carcasse (masse corporelle sans les organes abdominaux).  $P = 0,0141$  **B :** Comparaison de la masse (mg) du tractus génital femelle (vagin et cornes utérines).  $P = 0,0009$  **C :** Comparaison du rapport entre la masse de l'utérus (mg) et celle de la carcasse (g). Le rapport a été multiplié par 1000.  $P = 0,0025$  **D :** Comparaison de la longueur (mm) des cornes utérines.  $P = 0,0064$ . Les effectifs étaient : 129S2 ( $n = 10$ ) ; PRM/Alf ( $n = 6$ ). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  SE. Les astérisques indiquent la significativité statistique du test-t non apparié (ou du test de Fisher pour C) : \* $0,01 < P < 0,05$  ; \*\* $0,001 < P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Les tractus génitaux femelles des souris 129S2 ( $n = 10$ ) ont été comparés à ceux des souris PRM/Alf ( $n = 6$ ) (**Figure 43**). Les mesures de masse indiquaient une différence significative ( $P = 0,0141$ ) entre la masse de la carcasse des souris 129S2 ( $17,9 \pm 0,5$  g) et des souris PRM/Alf ( $20,6 \pm 0,9$  g) (**Figure 43-A**). Le tractus génital femelle des souris 129S2

( $66,4 \pm 3,9$  mg) était significativement plus léger ( $P = 0,0009$ ) que celui des souris PRM/Alf ( $121,5 \pm 16,1$  mg) (**Figure 43-B**). De plus, le rapport entre ces deux masses était significativement plus élevé ( $P = 0,0025$ ) dans la lignée PRM/Alf ( $5,9 \pm 0,7$ ) que dans la lignée 129S2 ( $3,7 \pm 0,2$ ) (**Figure 43-C**). Enfin, l'analyse statistique indiquait que les cornes utérines étaient plus longues ( $P = 0,0064$ ) chez les souris PRM/Alf ( $12,9 \pm 1,2$  mm) que chez les souris 129S2 ( $9,8 \pm 0,3$  mm) (**Figure 43-D**).

# Discussion

---

## I - CONTRACTILITE UTERINE ET ICC

L'identification des ICC dans le tube digestif repose sur plusieurs critères morphologiques et fonctionnels :

- Ces cellules possèdent de fins prolongements cytoplasmiques reliant les ICC entre elles et assurant la formation d'un réseau ;
- Elles présentent des oscillations de leur potentiel de membrane (ondes lentes) et génèrent les contractions des fibres musculaires auxquelles elles sont liées ;
- Elles expriment le gène *Kit* ;
- Leur activité, inhibée par un anticorps dirigé contre KIT, ACK2, et par l'Imatinib, est KIT-dépendante.

Dans la recherche de cellules « ICC-like » dans l'utérus, les résultats de nos études *ex vivo* chez les souris 129S2 ont révélé une activité contractile spontanée des fibres musculaires circulaires (**Figure 34**) et longitudinales (**Figure 35**). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés chez la souris CD-1 (MATTHEW et coll., 2004)<sup>48</sup>, la lapine (HUTCHINGS et coll., 2006)<sup>49</sup>, la jument (HIRSBRUNNER et coll., 2006)<sup>50</sup>, la ratte et la femme (VEDERNIKOV et coll., 2003)<sup>51</sup>.

Par ailleurs, ces contractions présentaient un profil sinusoïdal régulier démontrant une organisation et une coordination de l'activité contractile, et cela, en dehors de toute innervation et imprégnation hormonale. Il existe donc un système intrinsèque à l'utérus qui génère et coordonne les contractions musculaires utérines. L'hypothèse de la présence d'ICC implique que nous démontrions la genèse d'ondes lentes. Nous envisageons d'étudier ce phénomène par mesure de l'activité électrique du myomètre.

Dans la recherche des cellules exprimant *Kit* dans l'utérus, les résultats des immunofluorescences anti-KIT et du profil d'expression de la  $\beta$ -galactosidase chez les souris

---

<sup>48</sup> Observations sur des contractions longitudinales.

<sup>49</sup> Pas de précision sur la nature des contractions étudiées.

<sup>50</sup> Observations sur des contractions longitudinales et circulaires.

<sup>51</sup> Observations sur des contractions circulaires.

129S2 *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> sont concordants et montrent la présence de deux types cellulaires (**Figure 37, figure 38, figure 39 et figure 40**) :

- Des cellules isolées, intensément marquées par le X-Gal, au noyau et au contour cellulaire ovoïde à rond, identifiées comme étant des mastocytes utérins par les granulations intracytoplasmiques. Ces cellules sont connues pour moduler les contractions utérines par l'intermédiaire des médiateurs qu'elles libèrent (RUDOLPH et coll., 1997) ;
- Des cellules regroupées au noyau ovale et faiblement marqué, et exclusivement localisées entre les couches musculaires, constituent un type cellulaire non identifié.

Dans la recherche de cellules « ICC-like », ces dernières cellules sont de bonnes candidates même si plusieurs éléments les distinguent des ICC du tractus gastro-intestinal visualisées sur les coupes témoins d'estomac : elles ne sont pas réparties de façon homogène dans les couches musculaires, n'ont pas une orientation parallèle à celles des fibres musculaires auxquelles elles sont liées et ont un noyau faiblement marqué par le X-Gal. Une étude morphométrique est à prévoir afin d'étudier la répartition de ces cellules le long de l'utérus. De plus, il nous sera indispensable de recourir à la microscopie électronique afin d'étudier si ces cellules présentent les mêmes caractéristiques ultra-structurales que les ICC.

Quoiqu'il en soit, ces résultats indiquent clairement la présence de cellules KIT-positives dans le myomètre, confirmant les résultats de CIONTEA et coll. (2005). Cette équipe a isolé, à partir de cultures cellulaires issues de myomètres humains, des cellules présentant une activité contractile spontanée *in vitro* et des caractéristiques ultrastructurales proches des ICC.

Ceci nous a amenés à nous interroger sur la présence d'un pacemaker utérin KIT-dépendant. Tout d'abord, pour les contractions circulaires, la différence non significative entre la fréquence des contractions utérines des souris sauvages *Kit*<sup>+/+</sup> et des hétérozygotes *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> au sein d'un même fonds génétique indique qu'il n'y a pas d'haplo-insuffisance de *Kit* pour ce paramètre, contrairement à ce que l'on observe pour les mélanocytes. Cependant, nous n'avons pas trouvé de données bibliographiques décrivant si, dans le tube digestif, l'inactivation d'un allèle de *Kit* a un effet sur la fréquence des contractions intestinales. Ce résultat doit donc être interprété avec prudence.

L'étude pharmacologique de l'Imatinib (**Figure 41 et figure 42**) a montré un effet inhibiteur sur les contractions utérines circulaires et longitudinales. Cet effet était notable dès 40 µM sur les contractions circulaires, et dès 8 µM sur les contractions longitudinales. Des résultats similaires ont été observés sur les utérus de lapines (HUTCHINGS et coll., 2006)

mais seulement à partir de 100  $\mu\text{M}$ . Nos résultats, notamment sur les contractions longitudinales, ne permettent cependant pas d'affirmer, d'après nos données statistiques, que l'effet est dose-dépendant si l'on s'appuie sur la significativité des écarts entre les effets de doses successives. Dans l'intestin grêle, l'effet rapporté de l'Imatinib est plus sévère : observable dès 9  $\mu\text{M}$ , il est dose-dépendant avec abolition des contractions à partir de 81  $\mu\text{M}$  (SHIMOJIMA et coll., 2005). Le paramètre que nous avons choisi pour décrire l'effet de l'Imatinib est l'aire sous la courbe, car il est calculé par le logiciel ACKNOWLEDGE et est donc objectif et reproductible. Cependant, il intègre à la fois l'amplitude et la fréquence des contractions. Un effet dose-dépendant pourrait être plus marqué en étudiant isolement ces deux paramètres, mais leur détermination est plus subjective et non calculée par ACKNOWLEDGE.

Malgré cet effet inhibiteur de l'Imatinib sur les contractions utérines, celles-ci ne peuvent pas être qualifiées de KIT-dépendantes. En effet, l'Imatinib bloque deux autres récepteurs à activité tyrosine kinase : le récepteur PDGF-R, exprimé notamment par les cellules musculaires lisses du myomètre humain (ROSSI, CHEGINI et MASTERSON, 1992) et la protéine ABL. L'effet de l'Imatinib ne peut donc pas être interprété de façon certaine comme un blocage spécifique de l'activité tyrosine kinase de KIT. Cependant, l'expression du ligand de KIT, le SCF, dans le muscle lisse utérin humain (LAMMIE et coll., 1994) est un élément supplémentaire pour impliquer le gène *Kit* dans le mécanisme des contractions utérines.

Nous avons souhaité étudier les profils de contractions utérines de souris *Kit*<sup>W-lacZ/W-v</sup> afin de voir s'ils présentent des similitudes avec les profils rapportés dans le tube digestif (WARD et coll., 1994). Nous ne sommes cependant pas parvenus à obtenir d'animaux viables et supposons que notre fonds génétique (129S2) n'est pas compatible avec leur survie. Nous avons donc choisi d'étudier des souris 129S2 *Kit*<sup>W-v/W-v</sup>. Malheureusement, ces animaux présentant un retard de croissance et une anémie, ils ne survivent pas à l'ovariectomie, contrairement aux individus *Kit*<sup>+/+</sup> et *Kit*<sup>W-lacZ/+</sup> chez lesquels on n'a observé aucun décès post-opératoire. Nous envisageons donc à l'avenir de travailler sur des individus pré-pubères.

## II - ETUDE DE LA SOURIS PRM/ALF

La comparaison des profils de contractions a révélé chez les souris PRM/Alf un profil significativement différent de celui obtenu chez les souris 129S2 et caractérisé par de longues pauses entre les phases de contractions (**Figure 34**). Ce profil était associé à une diminution significative de la fréquence moyenne de contractions. Le fonds génétique semble donc avoir

un effet chez ces souris, effet cependant inverse à celui observé sur l'intestin (BELLIER et coll., 2005). L'enregistrement des ondes lentes utérines chez les PRM/Alf devrait permettre de comparer l'activité électrique avec celles de souris témoins et peut-être d'expliquer ce profil atypique. De plus, une mesure quantitative comparative des cellules exprimant *Kit* entre 129S2 et PRM/Alf pourrait apporter d'autres éléments de réponse.

Par ailleurs, les souris PRM/Alf possèdent une carcasse et un tractus génital femelle plus lourds que ceux des souris 129S2. Le rapport entre ces deux données a permis d'apprécier si cette augmentation était proportionnelle. Or, il s'avère que ce rapport était également significativement plus élevé chez les souris PRM/Alf et donc que celles-ci possèdent un tractus génital significativement plus lourd que celui des 129S2. D'autre part, les cornes utérines des souris PRM/Alf sont significativement plus longues que celles de souris 129S2 (**Figure 43**). Nous pensons donc que ces animaux présentent également une dolichomégalie utérine.

D'après une étude préliminaire, ces animaux présenteraient également un allongement significatif de la durée de gestation<sup>52</sup>. Compte-tenu du profil atypique et de la fréquence réduite des contractions chez ses souris, nous soumettons l'hypothèse que les deux sont liés. Nous proposons donc une étude avec suivi de la gestation chez les souris PRM/Alf.

---

<sup>52</sup> 20 jours au lieu de 19 jours chez les souris 129S2.

## Conclusion

---

Nous avons mis en évidence, dans l'utérus de souris, des contractions organisées KIT-dépendantes potentiellement générées par des cellules exprimant KIT localisées entre les couches musculaires. De nombreuses investigations sont encore nécessaires pour affirmer qu'il s'agit là de véritables cellules interstitielles de Cajal.

Les perspectives consécutives à la découverte de cellules « ICC-like » dans l'utérus seraient multiples. L'augmentation des contractions utérines est en partie à l'origine des douleurs (dysménorrhées) ressenties par certaines femmes lors des menstruations (ROSENWAKS et SEEGAR-JONES, 1980) et l'action sur les cellules directement à l'origine de celles-ci constituerait une approche thérapeutique intéressante. Par ailleurs, l'identification des ICC dans la paroi intestinale a permis de réévaluer histologiquement certaines tumeurs, considérées auparavant comme des tumeurs d'origine musculaire lisse (leiomyosarcomes) alors qu'elles dérivent en fait de ces mêmes ICC (FOSTER et coll., 2005). Outre l'intérêt étiologique, la distinction histologique de ces tumeurs stromales gastro-intestinales, fortement agressives et caractérisées par des mutations gain-de-fonction de *Kit* (HIROTA S. et coll., 1998), a orienté vers une nouvelle voie thérapeutique : l'Imatinib, inhibitant de l'activité tyrosine kinase médiée par KIT, est alors devenu une molécule de choix, à la fois efficace et sûre (DEMETRI et coll., 2002). Il pourrait en être de même pour certains sarcomes utérins.

Les sarcomes utérins représentent 2 à 6% des tumeurs utérines. Ils peuvent être divisés en trois catégories : sarcomes mixtes müllériens et mésodermiques (50%), leiomyosarcomes (40%) et sarcomes du stroma endométrial (10%). Le taux de survie général varie de 25 à 30% à 10 ans. Le traitement de première intention des patientes est l'exploration chirurgicale, suivie ou non d'une exérèse. Une radiothérapie adjuvante diminue le taux de récurrence locale mais n'a pas de réel impact sur la survie à long terme. La chimiothérapie adjuvante est préconisée pour les stades avancés et les récurrences. Le cisplatine et l'ifosfamide pour le traitement des sarcomes mixtes müllériens et mésodermiques entraînent le meilleur taux de réponse anti-tumorale. La combinaison de plusieurs agents de chimiothérapie entraîne une meilleure réponse mais le taux de survie n'est pas amélioré. Ces données montrent donc la nécessité du développement de nouvelles thérapies (DUSHKIN et SCHILDER, 2005).

De plus, WANG et coll. (2003) ont mis en évidence l'expression de *Kit* dans des « leiomyosarcomes » utérins et dans des sarcomes du stroma endométrial. LEATH et coll. (2004) ont eux noté l'expression du récepteur KIT dans les sarcomes utérins de cinq patientes.

La mise en évidence de « leiomyosarcomes » utérins exprimant *Kit* laisse donc penser qu'un élargissement des indications thérapeutiques de l'Imatinib à cette indication est

envisageable. Le GOG est actuellement en cours d'évaluation de l'Imatinib, en essais de phase II, dans le traitement des sarcomes utérins récidivants ou persistants (DUSHKIN et SCHILDER, 2005).



## Bibliographie

---

- AKERLUND M. (1997) Contractility in the non pregnant uterus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **828**, 213-222.
- ANAFI M., GAZIT A., ZEHAVI A., BEN-NERIAH Y., LEVITZKI A. (1993) Tyrphostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. *Blood*, **82**, 3524-3529.
- AUBIN-HOUZELSTEIN G., DA SILVA N., BELLIER S., SALAUN P., MONTAGUTELLI X., PANTHIER JJ. (2003) Genetic interaction between a maternal factor and the zygotic genome controls the intestine length in PRM/Alf mice. *Physiol. Genomics*, **16**, 82-89.
- BAGUET F. (2006) Muscles lisses. In : GILLES R. *Physiologie animale*. Bruxelles : De Boeck et Larcier SA, 334-338.
- BANKS WJ. (1993) Female reproductive system. In : *Applied veterinary histology*. 3<sup>rd</sup> ed. St Louis: Mosby-Year book, Inc, 452-457.
- BARST R. (2005) PDGF signalling in pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.*, **15**, 2691-2694.
- BELLIER S., DA SILVA N., AUBIN-HOUZELSTEIN G., ELBAZ C., VANDERWINDEN JM., PANTHIER JJ. (2005) Accelerated intestinal transit in inbred mice with an increased number of interstitial cells of Cajal. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**, G151-G158.
- BERNE RM., LEVY MN. (1993) Smooth muscle. In : *International Student Edition Physiology*. 3<sup>rd</sup> ed. St Louis : Mosby-Year book, Inc, 309-324.
- BERNEX F. (1996) *Etude fonctionnelle de c-Kit, le gène codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase du facteur SCF, chez la souris*. Thèse Doct. Univ., Université de Paris VI, Paris.
- BERNEX F., DE SEPULVEDA P., KRESS C., ELBAZ C., DELOUIS C., PANTHIER JJ. (1996) Spatial and temporal patterns of c-kit expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development*, **122**, 3023-3033.
- BESMER P., MANOVA K., DUTTLINGER R., HUANG EJ., PACKER A., GYSSLER C. et coll. (1993) The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W : pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev. Suppl.*, 125-137.
- BESMER P., MURPHY J., GOERGE P., QJU F., BERGOL P., LEDERMAN L. et coll. (1986) A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, **122**, 3023-3033.

- BUCHDUNGER E., ZIMMERMANN J., METT H., MEYER T., MULLER M., DRUKER B. et coll. (1996) Inhibition of the ABL protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.*, **56**, 100-104.
- BUCHDUNGER E., ZIMMERMANN J., METT H., MEYER T., MULLER M., REGENAS U. et coll. (1995) Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 2558-2562.
- BULLETTI C., DE ZIEGLER D., SETTI P., CICINELLI E., POLLI V., FLAMIGNI C. (2004) The patterns of uterine contractility in normal menstruating women : from physiology to pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1034**, 64-80.
- CARBONNE B., GERMAIN G., CABROL D. (2002) Physiologie de la contraction utérine. *In : Encycl. Méd. Chir., Obstétrique*. Paris : Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, 5-049-D-25, 19 p.
- CIONTEA S., RADU E., REGALIA T., CEAFALAN L., CRETOIU D., GHERGHICEANU M. et coll. (2005) C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium. *J. Cell. Mol. Med.*, **9**, 407-420.
- CLARK M., FISHER C., JUDSON I., MERION T. (2005) Soft tissue sarcomas in adults. *N. Engl. J. Med.*, **353**, 701-771.
- COOLS J., DE ANGELO D., GOTLIB J., STOYER E., LEGARE R., CORTES J. et coll. (2003) A tyrosine kinase created by the fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of Imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1201-1214.
- CSAPO A. (1960) Molecular structure and function of smooth muscle. *In: BOURNE GH. The structure and function of muscle. Volume II : Biochemistry and physiology*. New York and London, Academic Press, 229-262.
- DEININGER MW., DRUKER BJ. (2003) Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukaemia with Imatinib. *Pharmacol. Rev.*, **55**, 401-423.
- DEININGER MW., GOLDMAN JM., LYDON N., MELO JV. (1997) The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*, **90**, 3691-3698.
- DEMETRI G., VON MEHREN M., BLANKE C., VAN DEN ABBEELE A., EISENBERG B., ROBERTS P. et coll. (2002) Efficacy and safety of Imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.*, **347**, 472-480.

- DRUKER B., TAMURA S., BUCHDUNGER E., OHNO S., SEGAL G., FANNING S. et coll. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.*, **2**, 561-566.
- DUQUETTE R., SHMYGOL A., VAILLANT C., MOBASHERI A., POPE M., BURDYGA T. et coll. (2005) Vimentin-positive, c-KIT-negative interstitial cells in human and rat uterus : A Role in Pacemaking ? *Biol. Reprod.*, **72**, 276-283.
- DUSHKIN H., SCHILDER R. (2005) Imatinib mesylate and its potential implications for gynecologic cancers. *Curr. Treat. Options Oncol.*, **6**, 115-120.
- FANCHIN R., PICONE O., AYOUBI J., MARCADET-FREDET S., KADOCH J., FRYDMAN R. (2002) Contractilité utérine et reproduction humaine : nouvelles perspectives. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, **31**, 325-332.
- FOSTER R., SOLANO S., MAHONEY J., FULLER A., OLIVA E., SEIDEN M. (2005) Reclassification of a tubal leiomyosarcoma as an eGIST by molecular evaluation of c-KIT. *Gynec. Oncol.*, **101**, 363-366.
- GOKKEL E., GROSSMAN Z., RAMOT B., YARDEN Y., RECHAVI G., GIVOL D. (1992) Structural organization of the murine c-kit proto-oncogene. *Oncogene*, **7**, 1423-1429.
- GORDON MS. (1982) Smooth muscle. In : *Animal Physiology, principles and adaptations*. 4<sup>th</sup> ed. New York : Macmillan Publishing Co, Inc, 125-127.
- GOSS G., MERRIAM P., MANOLA J. (2000) Clinical and pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **19**, 559.
- GOTLIB J., COOLS J., MALON J., SCRIER S., GILLILAND D., COUTRE S. (2004) The FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic leukaemia : implications for diagnosis, classification and management. *Blood*, **103**, 2879-2891.
- GUILOHT F. (2004) Indications for Imatinib Mesylate therapy and clinical management. *The Oncologist*, **9**, 271-281.
- HEINRICH M., CORLESS C., DEMETRI G., BLANKE C., VON MEHREN M., JOENSUU H. et coll. (2003) Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.*, **21**, 4342-4349.
- HENRISKEN R., FUNA K., WILANDER E., BACKSTROM T., RIDDERHEIM M., OBERG K. (1993) Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptor in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res.*, **53**, 4550-4554.
- HIROTA S., ISOZAKI K., MORIYAMA Y., HASHIMOTO K., NISHIDA T., ISHIGURO S. et coll. (1998) Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, **279**, 577-580.

- HIRSBRUNNER G., REIST M., COUTO SS., STEINER A., SNYDER J., VANLEEUVEN E. et coll. (2006) An *in vitro* study on spontaneous myometrial contractility in the mare during estrus and diestrus. *Theriogenology*, **65**, 517-527.
- HORIGUCHI K., SANDERS K., WARD S. (2003) Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum. *Cell Tiss. Res.*, **311**, 299–313.
- HUIZINGA J. D., FAUSSONE-PELLEGRINI M.-S. (2005) About the presence of interstitial cells of Cajal outside the musculature of the gastrointestinal tract. *J. Cell. Mol. Med.*, **9**, 468-473.
- HUIZINGA J. D., THUNEBERG L., KLUPPEL M., MALYSZ J., MIKKELSEN H. B., BERNSTEIN A. (1995) W/Kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, **373**, 347-349.
- HUMBERT M., MONTI G., FARTOUKH M., MAGNAN A., BRENOT F., RAIN B. et coll. (1998) Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur. Respir. J.*, **11**, 554–559.
- HUTCHINGS G., DEPREST J., NILIUS B., ROSKAMS T., DE RIDDER D. (2006) The effect of Imatinib mesylate on the contractility of isolated rabbit myometrial strips. *Gynecol. Obstet. Invest.*, **62**, 79-83.
- IJLAND MM., EVERS JL., DUNSELMAN GA., HOOGLAND HJ. (1996) Subendometrial contractions in the nonpregnant uterus : an ultrasound study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **70**, 23-24.
- JAIN R. (1987) Transport of molecules in the tumours interstitium : a review. *Cancer Res.*, **47**, 3039-3051.
- KAUR G., GAZIT A., LEVITZKI A., STOWE E., COONEY D., SAUSVILLE E. (1994) Tyrphostion induced growth inhibition : correlation with effect on p210bcr-abl autokinase activity in K562 chronic myelogenous leukaemia. *Anticancer Drugs*, **5**, 213-222.
- KAWAI T., HIROI S., TORIKATA C. (1997) Expression in lung carcinomas of platelet-derived growth factor and its receptor. *Lab. Invest.*, **77**, 431-436.
- KIM D., LEE M., PARK T., BAE H. Expression and mutational analysis of c-kit in ovarian surface epithelial tumors. (2006) *J. Korean Med. Sci.*, **21**, 81-85.
- KIM S., UEHARA H., YACZICI S., LANGLEY R., HE J., TSAN R., FAN D. et coll. (2004) Simultaneous blockade of platelet-derived growth factor-receptor and epidermal growth factor-receptor signaling and systemic administration of Paclitaxel as therapy for human prostate cancer metastasis in bone of nude mice. *Cancer Res.*, **64**, 4201-4208.

- KOVALENKO M., RONNSTRAND L., HELDIN C., LOUBTCHENKOV M., GAZIT A., LEVITZKI A. et coll. (1997) Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor beta-receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrophostin AG1296. *Biochemistry*, **36**, 6260-6269.
- KRYSTAL G., HONSAWEK S., LITZ J., BUCHDUNGER E. (2000) The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cells lung cancer growth. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 3319-2226.
- KUBOTA Y., KAJIOKA S., BIERS S. M., YOKOTA E., KOHRI K., BRADING AF. (2004) Investigation of the effect of the c-kit inhibitor Glivec on isolated guinea-pig detrusor preparations. *Auton. Neurosci.*, **115**, 64-73.
- LAMMIE A., DROBNJAK M., GERALD W., SAAD A., COTE R., CORDON-CARDO C. (1994) Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **42**, 1417-1425.
- LE COUTRE P., MOLOGIN L., MARCHESI E., BUCHDUNGER E., GIARDINI R., FORMELLI F. et coll. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, **91**, 163-8.
- LEATH C., STRAUGHN J., CONNER M., BARNES M. , ALVAREZ R., PARTRIDGE E. et coll. (2004) Immunohistochemical evaluation of the c-kit proto-oncogene in sarcomas of the uterus: a case series. *J. Reprod. Med.*, **49**, 71-75.
- LECOIN L., GABELLA G., LE DOUARIN N. (1996) Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel. *Development*, **122**, 725-733.
- LOUGHREY M., MITCHEL C., MANN G., MICHAEL M., WARING P. (2005) Gastrointestinal stromal tumour treated with neoadjuvant imatinib. *J. Clin. Pathol.*, **58**, 779-781.
- MATEI D., CHANG D., JENG M. (2004) Imatinib Mesylate (Glivec) inhibits ovarian cancer cell growth through a mechanism dependant on platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  and Akt inactivation. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 681-690.
- MATTHEW A., KUPITTAYANANT S., BURDYGA T., WRAY S. (2004) Characterization of contractile activity and intracellular  $Ca^{2+}$  signalling in mouse myometrium. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, **11**, 207-212.
- MCCLOSKEY KD., GURNEY AM. (2002) Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J. Urol.*, **168**, 832-836.
- NAGAR B., BORNMANN W., PELLICENA P., SCHINDLER T., VEACH D., MILLER W. et coll. (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.*, **62**, 4236-4243.

- ÖRDÖG T., REDELMAN D., HORVATH VJ., MILLER LJ., HOROWITZ B., SANDERS KM. (2004) Quantitative analysis by flow cytometry of interstitial cells of Cajal, pacemakers, and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Cytometry A*, **62**, 139-149.
- PARROTT JA., KIM G., SKINNER MK. (2000) Expression and action of kit ligand stem cell factor in normal human and bovine ovarian cancer. *Biol. Reprod.*, **62**, 1600-1609.
- PEAR W., MILLER J., XU L., PUI J., OUACKENBUSH R., PENDERGAST A. et coll. (1998) Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood*, **92**, 3780-3792.
- PEZZONE M., WATKINS S., ALBER S., KING W., DE GROAT W., CHANCELLOR M. et coll. (2003) Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter : the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **284**, 925-929.
- PIETRAS K., OSTMAN A., SJOQUIST M., BUCHDUNGER E., REED R., HELDIN C. et coll. (2001) Inhibition of platelet derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increase transcapillary transport in tumors. *Cancer Res.*, **61**, 2929-2934.
- PIETRAS K., RUBIN K., SJOBLUM T., BUCHDUNGER E., SJOQUIST M., HELDIN C. et coll. (2002) Inhibition of PDGFR signalling in tumour stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res.*, **62**, 5476-5484.
- POPESKO P., RAJTOVA V., HORAK J. (1992) A colour atlas of small laboratory animals. Volume 2 : rat, mouse, hamster. London : Wolfe Publishing Ltd, 253p.
- PRIEDKALNS J., LEISER R. (1998) Female reproductive system. In : DELLMANN H., EURELL J. *Textbook of veterinary histology*. Baltimore, Williams and Wilkins, 247-269.
- ROSENWAKS Z., SEEGAR-JONES G. (1980) Menstrual pain : its origin and pathogenesis. *J. Reprod. Med.*, **25**, 207-212.
- ROSSI M., CHEGINI N., MASTERSON B. (1992) Presence of Epidermal Growth Factor, Platelet-Derived Growth Factor, and their Receptors in human myometrial tissue and smooth muscle cells: their action in smooth muscle cells *in vitro*. *Endocrinology*, **130**, 1716-1727.
- ROUSSEAU JP., MENEZO Y. (1991) Rôle du tractus génital femelle dans les déplacements et la survie des gamètes et de l'oeuf fécondé. In : THIBAUT C, LEVASSEUR MC, coordonnateurs. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris : Editeur des préparations grandes écoles de médecine, 359-376.

- RUDOLPH M., CABANILLAS A., GOMEZ P., GARCIA M., VILLAN L. (1997) On the mechanism of action of ethodolol in inducing myometrium contractions. *Gen. Pharmacol.*, **28**, 381-385.
- RUGH R. (1968) Reproductive systems. *In: The mouse its reproductive and development.* Minneapolis: Burgess Publishing Co., 37-41.
- SANDERS K., KOH S., WARD S. (2006) Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Physiol.*, **68**, 307–343.
- SAWYERS C. (2001) Research on resistance to cancer drug Gleevec. *Science*, **294**, 1834.
- SCHERMULY R., DONY E., GHOFrani H., PULLAMSETTI S., SAVAI R., ROTH M. et coll. (2005) Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.*, **115**, 2811-2821.
- SCHINDLER T., BORNEMANN W., PELLICENA P., MILLER W., CLARKSON B., KURIYAN J. (2000) Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*, **289**, 1938-1942.
- SCHLESSINGER J., ULLRICH A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron.*, **9**, 383-391.
- SCHMANDT R., BROADDUS R., LU K., SHYARTSAMN H., THORTON A., MALPICA A. et coll. (2003) Expression of c-abl, c-kit and platelet-derived growth factor receptor beta in ovarian serous carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer*, **98**, 758-764.
- SEKI K., KOMURO T. (2002) Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/W-v mutant mice. *Anat Embryol (Berl.)*, **206**, 57-65.
- SHAFIK A., EL-SIBAI O., SHAFIK A. A., SHAFIK I. (2004) Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder : concept of vesical pacemaker. *Urology*, **64**, 809-813.
- SHAFIK A., EL-SIBAI O., SHAFIK I. (2004) Identification of c-kit-positive cells in the uterus. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, **87**, 254-255.
- SHENNAN A., JONES B. (2004) The cervix prematurity : aetiology, prediction and prevention. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, **9**, 471-479.
- SHIMOJIMA N., NAKAKI T., MORIKAWA Y., HOSHINO K., KITAJIMA M. (2005) Imatinib blocks spontaneous mechanical activities in the adult mouse small intestine : possible inhibition of c-kit signalling. *Pharmacology*, **74**, 95-99.
- SHIOTSU Y., SOGA S., AKINAGA S. (2002) Heat shock protein 90-antagonist destabilizes Bcr-Abl/HSP90 chaperone complex. *Leuk. Lymphoma*, **43**, 961-968.

- SJÖBLOM T., SHIMIZU A., O'BRIEN K., PIETRAS K., DAL CIN P., BUCHDUNGER E. et coll. (2001) Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 through induction of apoptosis. *Cancer Res.*, **61**, 5778-5783.
- TONARY A., MACDONALD E., FAUGHT W., SENTERMAN M., VANDERHYDEN B. (2000) Lack of expression of c-kit in ovarian cancer is associated with poor prognosis. *Int. J. Cancer*, **89**, 242-250.
- TORIHASHI S., HORISAWA M., WATANABE Y. (1999) C-kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **75**, 38-50.
- TYSON-CAPPER A., EUROPE-FINNER G. (2006) Novel targeting of cyclooxygenase-2 (COX-2) pre-mRNA using antisense morpholino oligonucleotides directed to the 3' acceptor and 5' donor splice sites of exon 4 : suppression of COX-2 activity in human amnion-derived WISH and myometrial cells. *Mol. Pharmacol.*, **69**, 796-804.
- UEHARA H., KIM S., KARASHIMA T., SHEPHERD D., FAN D., TSAN R. et coll. (2003) Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signalling in mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 458-470.
- UEHARA Y., MURAKAMI Y., MIZUNO S., KAWAI S. (1988) Inhibition of transforming activity of tyrosine kinase oncogenes by herbimycin A. *Virology*, **8**, 2097-2104.
- VAISSAIRE JP. (1977) Appareil génital femelle. In : *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire*. Paris : Maloine S.A. Editeur, 206-245.
- VAN GESTEL I., IJLAND MM., HOOGLAND HJ., EVERS JL. (2003) Endometrial wave-like activity in the non-pregnant uterus. *Hum. Reprod. Update*, 2003, **9**, 131-138.
- VAN OOSTEROM A., JUDSON I., VERWEIJ J., STROOBANTS S., DONATO D. PAOLA E., DIMITRIJEVIC S. et coll. (2001) Safety and efficacy of Imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours : a phase I study. *Lancet.*, **358**, 1421-1423.
- VEDERNIKOV YP., HARTKE JR., DE LONG MA., SAADE GR., GARFIELD RE. (2003) Sex hormone effects in non-pregnant rat and human myometrium. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **108**, 59-66.
- VLAHOVIC G., CRAWFORD J. (2003) Activation of tyrosine kinases in cancer. *The oncologist*, **8**, 531-538.
- WANG L., FELIX J., LEE J., TAN P., TOURGEMAN D., O'MERA A. et coll. (2003) The proto-oncogene c-Kit is expressed in leiomyosarcomas of the uterus. *Gynecol. Oncol.*, **90**, 402-406.



- WARD S., BURNS A., TORIHASHI S., SANDERS K. (1994) Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J. Physiol.*, **480**, 91-97.
- WEISBERG E., GRIFFIN J. (2001) Mechanism of resistance Imatinib (STI571) in preclinical models and in leukaemia patients. *Drug Resist. Updat.*, **4**, 22-28.
- WOLFF NC., ILARIA RL. Jr. (2001) Establishment of a murine model for therapy-treated chronic myelogenous leukemia using the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Blood*, **98**, 2808-2816.
- YEH C., CHEN T., WU T., SWEI H., JAN Y. (2006) Treatment of patients with advanced gastrointestinal stromal tumor of small bowel : implications of Imatinib Mesylate. *World J. Gastroenterol.*, **12**, 3761-3765.