

Année Universitaire 1993-1994

n° d'ordre:

## THESE

présentée devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse (Sciences) en vue de  
l'obtention du diplôme de

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

Spécialité: PHARMACOLOGIE HEMATOLOGIE

par

**Daniel SCHLAIFER**

*Chef de Clinique-Assistant des Hôpitaux*



### ETUDE DES MECANISMES DE RESISTANCE AUX ALCALOIDES DE CATHARANTHUS ROSEUS (G Don) PERVENCHE DE MADAGASCAR

Soutenue le **10 mars 1994** devant la Commission d'Examen:

Président: **Jean Cros**, Professeur de Pharmacologie, UPS, Toulouse  
Rapporteurs: **Dominique Maraninchi**, Professeur d'Hématologie, Marseille  
**Félix Reyes**, Professeur d'Hématologie, Créteil  
Membres: **Guy Laurent**, Professeur d'Hématologie, UPS, Toulouse  
**Jean-Luc Harousseau**, Professeur d'Hématologie, Nantes



*Préparée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Fondamentales, Toulouse, et  
à la Clinical Pharmacology Branch, NCI, NIH, Bethesda, MD, USA.*

# PLAN

RESUME	11
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	14
1. Alcaloïdes de la <i>vinca</i>	15
1.1. Historique	
1.2. Structure	
1.3. Mécanisme d'action	
1.4. Diffusion intracellulaire	
1.5. Pharmacocinétique et métabolisme	
1.6. Importance en chimiothérapie anti-cancéreuse	
2. Mécanismes de résistance aux alcaloïdes de la <i>vinca</i>	19
2.1. Phénotype MDR: la P-170 glycoprotéine	
2.2. Autres mécanismes connus	
Altération de la sous unité b de la tubuline	
Autres pompes	
3. Mécanismes de résistance à la VCR des leucémies aiguës	21
3.1. LAL	
3.2. LAM	
4. Inactivation des alcaloïdes de la <i>vinca</i> par les peroxydases	23
5. Rappel sur les peroxydases	26
5.1. Les différentes peroxydases	
5.2. La myéloperoxydase	
5.2.1. Stabilité	
5.2.2. Localisation cellulaire	
5.2.3. Structure	
5.2.4. Synthèse	
5.2.5. Gène humain	

5.2.6. Fonctions	
Mécanisme d'action	
Fonction antimicrobienne	
5.2.7. Inhibiteurs	
6. Le peroxyde d'hydrogène	38
7. But de ce travail	39
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	40
1. Matériels	40
2. Méthodes	40
2.1. Mise en évidence de la MPO par cytochimie	
2.2. Culture cellulaire	
2.3. Caractérisation du sous-clone HL-60(JC114) déficient en MPO	
2.3.1. Activité MPO mesurée par le test au guaiacol	
2.3.2. Mise en évidence de la MPO par microscopie électronique	
2.3.3. Immunoprécipitation et gel de polyacrylamide	
2.3.4. Sonde pour le gène de la MPO	
2.3.5. Préparation du RNA et analyse par Northern blot	
2.3.6. Préparation du DNA et analyse par Southern blot	
2.3.7. Phénotype membranaire et détection de la P170-glycoprotéine par cytométrie en flux	
2.3.8. Caryotype	
2.4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de la VCR	
2.5. Dégradation de la VCR par la MPO en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
2.6. Dégradation de la VCR par les lignées cellulaires	
2.7. Expériences de cytotoxicité	
2.8. Cytotoxicité en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
2.9. Dégradation de la VCR par des cellules de patients porteurs de LAM	
2.10. Dégradation de la VCR par du sérum de patients porteurs de LAM	
2.10.1. Caractéristique des patients	

2.10.2. Dégradation de la (<sup>3</sup>H)VCR par les sérums des patients

2.10.3. Dosage sérique de la MPO

2.10.4. Coloration MPO de la moelle osseuse des patients

## 2.11. Modulation de la MPO

2.11.1. Transfection d'un vecteur codant pour le gène de la MPO

2.11.2. Utilisation d'anti-sens

Oligonucléotides anti-sens

Transfection par une construction codant pour un anti-sens de la MPO

2.11.3. Inhibiteurs chimiques de la MPO

Inhibition de la dégradation de la VCR par la MPO

Effet sur les courbes de cytotoxicité

Effet sur la réaction de MPO

## 2.12. Etude de la capacité de la MPO de dégrader d'autres produits

VBL

Navelbine

Etoposide

Amsacrine

Daunorubicine

<b>RESULTATS</b>	<b>56</b>
<b>1. Caractérisation d'un sous-clone de HL-60 déficient en MPO</b>	<b>56</b>
1.1. Analyse de la MPO par microscopie électronique	
1.2. Test au guaiacol	
1.3. Immunoprécipitation de la MPO	
1.4. Phénotype cellulaire	
1.5. Northern blot	
1.6. Southern blot	
1.7. Caryotype	
<b>2. Dégradation de la VCR par la MPO et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>64</b>

3. Dégradation de la VCR par les lignées cellulaires MPO + et MPO -	66
4. Expériences de cytotoxicité de la VCR sur les lignées MPO-positives et MPO-négatives	70
5. Expression de la P170-glycoprotéine	72
6. Effet de l'addition d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur la cytotoxicité de la VCR	73
7. Dégradation de la VCR par les cellules de patients	75
8. Dégradation de la VCR par le sérum de patients	76
8.1. Dégradation de la ( <sup>3</sup> H)VCR par le sérum des patients	
8.2. Corrélation avec la concentration sérique de MPO	
8.3. Autres corrélations	
9. Modulation de la MPO	81
9.1. Transfection d'un vecteur codant pour la MPO	
9.2. Utilisation d'anti-sens	
Oligonucléotides anti-sens	
Transfection d'une construction anti-sens	
9.3. Inhibiteurs chimiques	
9.3.1. Effet sur la dégradation de la VCR par la MPO	
9.3.2. Effet sur la cytotoxicité de la VCR	
9.3.3. Effet sur la réaction de coloration de la MPO	
10. Etude de la dégradation d'autres produits chimiothérapeutiques par la MPO	91
DISCUSSION	93
CONCLUSION	98
REFERENCES	99
PUBLICATIONS	123

## Résumé:

Une des différences entre les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) est leur sensibilité pour la vincristine (VCR). La VCR est une drogue majeure dans le traitement des LAL alors qu'elle a une activité anti-tumorale faible pour les LAM. Il a été montré que la peroxydase du raifort (en anglais horseradish peroxidase), une peroxydase héminique, oxyde et dégrade des alcaloïdes de la *vinca*, conduisant à une moindre efficacité thérapeutique. Ceci suggère que la myéloperoxydase (MPO), une autre peroxydase héminique trouvée de façon caractéristique dans les LAM mais pas dans les LAL, pourrait également dégrader la VCR. Nous avons d'abord étudié les effets de la MPO sur la VCR dans un système acellulaire et avons observés que la MPO est capable de catalyser l'oxydation et la dégradation de la VCR. Nous avons également observé que la VCR est dégradée plus rapidement par la lignée MPO-positif HL-60 que par un sous-clone de HL-60 MPO-déficient. Le degré d'activité MPO de ces lignées cellulaires est proportionnel au degré de résistance des cellules à la VCR. De plus, la différence de résistance observée entre ces lignées cellulaires a pu être augmentée en élevant la concentration d'eau oxygénée dans le milieu cellulaire. Des cellules et du sérum provenant de patients atteints de LAM est également capable de dégrader la VCR. Ces données sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'oxydation et la dégradation de la VCR par la MPO est responsable, au moins en partie, du manque d'efficacité de la VCR dans les LAM. Nous avons ensuite modulé l'activité de la MPO en transfectant une construction anti-sens dans la lignée HL-60. De façon intéressante, la lignée transfectée est significativement plus sensible à la VCR que la lignée parentale. Ceci pourrait avoir des implications thérapeutiques dans le traitement des tumeurs MPO-positives. Enfin, nous avons étudié la possibilité pour la MPO d'oxyder d'autres médicaments utilisés dans le traitement des LAM.