HAL
open science

Étude génétique de la chimiosensibilité d'un mélanome malin métastatique greffé sur souris athymiques

Sabrina Vergnaud

To cite this version:

Sabrina Vergnaud. Étude génétique de la chimiosensibilité d'un mélanome malin métastatique greffé sur souris athymiques. Sciences pharmaceutiques. 1994. dumas-02153558

HAL Id: dumas-02153558

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02153558v1

Submitted on 12 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

2e exemplaire

UNIVERSITE Joseph FOURIER - GRENOBLE I - Sciences Technologie Médecine
U.F.R. DE PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1994 N° D'ORDRE 7008

ETUDE GENETIQUE DE LA CHIMIOSENSIBILITE D'UN MELANOME MALIN METASTATIQUE GREFFE SUR SOURIS ATHYMIQUES.

THESE
Presentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par
Mlle Sabrina VERGNAUD
[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 17 Février 1994.
Devant : M. le Professeur J. CALOP, Président du Jury
et : Mme le Docteur M. JACROT, Directeur
Mme le Docteur J. CHROBOCZEK
M. Le Professeur A. FAVIER
Mme le Docteur M. MOUSSEAU

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE GRENOBLE MÉDECINE-PHARMACIE

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Génétique, Histologie et Biologie de la Reproduction du Pr P. JALBERT

UNIVERSITE Joseph FOURIER - GRENOBLE I - Sciences Technologie Médecine
U.F.R. DE PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche

ANNEE : 1994 N° D'ORDRE 7008

ETUDE GENETIQUE DE LA CHIMIOSENSIBILITE D'UN MELANOME MALIN METASTATIQUE GREFFE SUR SOURIS ATHYMIQUES.

THESE
Presentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE I
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE.

Par
Mlle **Sabrina VERGNAUD**
[Données à caractère personnel]

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE GRENOBLE MEDECINE-PHARMACIE

Cette thèse sera soutenue publiquement le 17 Février 1994.
Devant : M. le Professeur J. CALOP, Président du Jury
et : Mme le Docteur M. JACROT, Directeur
Mme le Docteur J. CHROBOCZEK
M. Le Professeur A. FAVIER
Mme le Docteur M. MOUSSEAU

Thèse préparée au sein du **Laboratoire de Génétique, Histologie et Biologie de la Reproduction** du Pr P. JALBERT

Je tiens à remercier :

Mr le Professeur P. JALBERT, pour m'avoir accueilli, au sein de son équipe, dans le laboratoire de Génétique, Histologie et Biologie de la Reproduction, où ce travail a été en partie réalisé.

très chaleureusement, Mme le Docteur M JACROT, sans qui cette thèse n'aurait pu exister. Sa patience, son expérience, ses compétences ainsi que ses qualités humaines, m'ont été extrèmement précieuses à l'accomplissement de ce travail.

Mme le Docteur Dominique LEROUX, pour ses compétences et sa gentillesse, ainsi que toute l'équipe de cytogénétique pour leurs aides diverses.

tout particulièrement, Mme Dominique DESPLANQUES, de sa disponibilité et pour m'avoir apporté une aide, plus que précieuse, tant pour la recherche bibliographique que pour la réalisation de la cytogénétique.

Mme le Docteur J. CHROBOCZEK et son équipe, pour m'avoir accuellie au sein de son laboratoire, pour leur soutien, leur disponibilité et leurs compétences, et pour m'avoir permis la réalisation de toute l'étude de Biologie Moléculaire.

Mme le Docteur M. MOUSSEAU pour son aide, son savoir, ses conseils et sa gentillesse infinie.

Mme A. BRONNE pour le travail photographique, d'une grande qualite, qu'elle a fait.

L'ensemble de ces personnes m'ont permis de réaliser un travail, touchant à des domaines que je ne connaissais pas auparavant. J'ai pu ainsi étendre mes connaissances, et me passionner pour la recherche, je les en remercie

Je remercie les membres de ce jury de leurs aides, ainsi que d'avoir accepté de juger mon travail :

Mr le Professeur J. CALOP, de l'acquis qu'il m'a apporté au cours de mes études en pharmacie et de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mme le Docteur M JACROT et Mme le Docteur J. CHROBOCZEK, d'avoir accepté de diriger cette thèse.

Mr le Professeur A. FAVIER, des connaissances qu'il m'a apportées au cours de mes études en pharmacie et d'avoir accepté de participer à ce jury.

Mme le Docteur M. MOUSSEAU, d'avoir accepté de juger mon travail en tant que clinicienne.

Je remercie particulièrement :

- le laboratoire SERVIER en la personne de Mme Maryse BERLION
- le laboratoire ROGER BELLON

de m'avoir généreusement fourni les médicaments nécessaires à cette étude.

A Jean-Noël;
A ma grand-mère, mes parents, ma soeur;

Envers qui je n'aurai jamais assez de reconnaissance pour l'affection qu'ils m'ont témoignée, les encouragements qu'ils m'ont apportés, et la patience dont ils ont fait preuve en ces moments où j'en avais le plus besoin.

A mes amis/amies;

Dans les moments difficiles, mes amis(es) m'ont entourés, je les remercie du soutien qu'ils m'ont apporté durant la réalisation de ce travail. Je promets d'être là chaque fois qu'ils en ressentiront le besoin.

Et à tous les autres.

SOMMAIRE

INTRODUCTION P.7

ETAT ACTUEL DES DONNEES

I- LE MELANOME MALIN ET SES TRAITEMENTS. P.9

1. LE MELANOME MALIN. P.9

2. LA FREQUENCE DES MELANOMES MALINS. P.10

3. THERAPIES ET MELANOMES MALINS. P.11

3.1. LES TRAITEMENTS DES MELANOMES MALINS. P.11

3.1.1. LES MONOTHERAPIES.

3.1.2. LES POLYCHIMIOTHERAPIES.

3.1.3. CHIMIOTHERAPIES A FORTES DOSES ET AUTOGREFFE DE MOELLE.

3.1.4. CHIMIOTHERAPIE ET IMMUNOTHERAPIE.

3.1.5. CHIMIOTHERAPIE ET HORMONOTHERAPIE.

3.1.6. CONCLUSION.

3.2. CLASSIFICATION DES ANTICANCEREUX EN FONCTION DE LEURS MECANISMES D'ACTIONS. P.16

3.2.1. LES DROGUES AGISSANT PAR INTERFERENCE AVEC LA BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES PROTEINES.

3.2.2. LES DROGUES AGISSANT PAR INTERFERENCE AVEC LA DUPLICATION, LA TRANSCRIPTION ET LA TRADUCTION.

3.2.3. LES DROGUES AGISSANT SUR LE FUSEAU MITOTIQUE.

3.2.4. LES AUTRES SUBSTANCES À MECANISMES D'ACTION COMPLEXE.

3.3. LES CYTOSTATIQUES ALKYLANTS UTILISES DANS L'ETUDE. P.18
3.3.1. DACARBAZINE ou DETICENE[R] (DTIC).
3.3.2. FOTEMUSTINE ou MUPHORAN[R] .

II- LA CHIMIORESISTANCE. P.22

1. SES MECANISMES MOLECULAIRES. P.22

2. LES GENES DE CHIMIORESISTANCE. P.23
2.1. LA RESISTANCE PLEIOTROPIQUE "TYPIQUE" OU MULTIDRUG RESISTANCE (MDR). P.23
2.1.1. LE GENE MDR.
2.1.2. LA P-GLYCOPROTEINE.
2.1.3. EXPRESSION DU GENE MDR1 HUMAIN DANS LES TISSUS NORMAUX ET LES TUMEURS.
2.1.4. REVERSION DE LA RESISTANCE.
2.2. LA RESISTANCE PLEIOTROPIQUE "ATYPIQUE". P.27
2.2.1. LES GLUTATHION-S-TRANSFERASES.
2.2.2. LES TOPOISOMERASES.
2.2.3. INHIBITION DE LA O^6 -ALKYLGUANINE-ALKYLTRANSFERASE.

3. LES MECANISMES MULTIFACTORIELS DE RESISTANCE AUX DROGUES ANTICANCEREUSES. P.33

STRATEGIE ET RESULTATS

III- CHIMIOSENSIBILITE DE LA RECIDIVE D'UN MELANOME MALIN ACHROMIQUE GREFFE SUR SOURIS ATHYMIQUES. P.36

1. LA SOURIS NUDE. P.36

2. LA TRANSPLANTATION SUR SOURIS ATHYMIQUE. P.37
   - 2.1. LA TUMEUR A L'ORIGINE DU MODELE EXPERIMENTAL.
   - 2.2. LA TECHNIQUE DE GREFFE.

3. ETUDE DE LA CHIMIOSENSIBILITE DE LA TUMEUR TRANSPLANTEE. P.38
   - 3.1. DETERMINATION DES DOSES MAXIMALES DE FOTEMUSTINE ET DE DACARBAZINE TOLEREES PAR L'ANIMAL.
   - 3.2. DETERMINATION DE LA DOSE DE FOTEMUSTINE.
   - 3.3. ETUDE DE L'ASSOCIATION : FOTEMUSTINE/DACARBAZINE.

4. RESULTATS. P.41
   - 4.1. DETERMINATION DES DOSES MAXIMALES.
   - 4.2. DETERMINATION DE LA DOSE DE FOTEMUSTINE.
   - 4.3. ASSOCIATION FOTEMUSTINE ET DACARBAZINE.

IV- ETUDE CYTOGENETIQUE. P.45

1. ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES MELANOMES. P.45

2. ANALYSE CYTOGENETIQUE. P.46

3. MATERIEL. P.47

4. RESULTATS. P.47
4.1. ETUDE COMPARATIVE DES ANOMALIES DE NOMBRE.
4.2. ETUDE COMPARATIVE DES ANOMALIES DE STRUCTURE.
4.2.1. CARYOTYPES AVANT TRAITEMENT.
4.2.2. CHROMOSOMES METAPHASIQUES APRES TRAITEMENT PAR LA FOTEMUSTINE.
4.2.3. CARYOTYPE APRES TRAITEMENT PAR L'ASSOCIATION FOTEMUSTINE/DACARBAZINE.

5. CONCLUSION. P.53

V- BIOLOGIE MOLECULAIRE. P.54

1. MATERIEL. P.55

2. METHODES. P.56
2.1. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES. P.56
2.1.1. EXTRACTION DES DNAs.
2.1.2. EXTRACTION DES RNAs.
2.1.3. TRANSFORMATION DES RNAs EN cDNA PAR LA TECHNIQUE DE LA REVERSE TRANSCRIPTASE.
2.2. CONTROLE DE QUALITE DES ACIDES NUCLEIQUES. P.61
2.2.1. DNAs ET cDNA.
2.2.2. RNAs.
2.3. TECHNIQUE DE PCR. P.63
2.3.1. PRINCIPE ET MATERIEL.
2.3.2. DNA MATRICE ET AMORCES.
2.3.3. LA REACTION DE PCR.

3. RESULTATS. P.69
3.1. ETUDE DE L'AMPLIFICATION GENES. P.70
3.1.1. MDR1.
3.1.2. GSTπ.
3.1.3. TOPOII.

3.2. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES. P.73
3.2.1. MDR1.
3.2.2. GSTπ.
3.2.3. TOPOII.
3.3. RECAPITULATIF. P.76
3.4. VERTUES ET LIMITES DE LA METHODE DE PCR. P.77

4. DISCUSSION ET CONCLUSION. P.78

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES. P.82

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. P.84

ANNEXES.

LISTE DES ABRÉVIATIONS. P.94
DEFINITIONS (*). P.95
MARQUEURS. P.96
SEQUENCE DU GENE MDR1 (EMBL data library). P.98
SEQUENCE DU GENE GSTπ (EMBL data library). P.100
SEQUENCE DU GENE TOPOII (EMBL data library). P.102

INTRODUCTION

Pour améliorer les résultats obtenus dans le traitement des cancers, il faut d'abord tenter d'en comprendre les mécanismes, en particulier ceux qui concernent leurs évolutions et leurs résistances aux chimiothérapies. C'est le cas du mélanome malin disséminé, une tumeur réputée peu chimiosensible. Sous sa forme récidivante, c'est un cancer à évolution très rapide et volontiers métastasiant (94). Malgré les progrès apportés en matière de diagnostic, le mélanome malin, une fois disséminé, garde un pronostic péjoratif. Un certain nombre de combinaisons chimiothérapiques, parfois associées à une immunothérapie ou à une hormonothérapie, ont des réponses objectives, mais malheureusement de courte durée (4 à 6 mois) (17, 94).

Le développement d'une résistance à une chimiothérapie antitumorale constitue donc un obstacle majeur au traitement des cancers humains. Dans certains cas, lors de traitements avec des antimitotiques, cette résistance s'avère plurifactorielle : elle associe entre eux non seulement différents mécanismes moléculaires mais aussi des mécanismes métaboliques (115). Trois mécanismes principaux sont impliqués dans la chimiorésistance : la multidrogue résistance ou MDR1, le système du glutathion et plus particulièrement la glutathion-S-transférase π ou GSTπ, et les topoisomérases I et II. Les mécanismes qui entraînent l'apparition d'une chimiorésistance sont donc, le plus souvent, d'une extrême complexité : ainsi deux mécanismes, MDR1 et GSTπ, peuvent expliquer la résistance présentée à la suite d'un traitement avec la Vincristine. Pour d'autres drogues, comme les alkylants, il semble qu'un seul mécanisme soit en cause, GSTπ. De plus, en ce qui concerne les antimitotiques, il peut exister des résistances croisées (82).

L'examen d'une pièce d'exérèse*, obtenue à partir d'une tumeur humaine, ne permet pas d'effectuer des études très poussées, le plus souvent faute de matériel. La greffe sur souris athymiques, réalisable depuis 1969 grâce à RYGAARD et POVLSEN, représente un apport considérable pour ces études (67). **En effet, elle permet d'étudier, *in vivo*, les cancers humains, tout en conservant les principales caractéristiques du tissu humain tumoral qui lui a donné naissance.**

Actuellement, dans le mélanome malin métastasé, l'association de la fotémustine, d'utilisation récente (Laboratoire SERVIER), à la dacarbazine (laboratoire ROGER BELLON) considérée comme le cytostatique de référence, semble apporter les meilleurs résultats, notamment au cours des métastases cérébrales (1, 16, 71). Les associations chimio-immunothérapique apportent

de meilleurs résultats, mais sont beaucoup plus difficiles a tolérées par les malades. Certes, l'activité antitumorale de la fotémustine a été étudiée, *in vitro* et *in vivo*, sur les principaux modèles expérimentaux préconisés par le "National Cancer Institute", en utilisant, entre autres, différentes lignées tumorales d'origine humaine ou animale avant toute utilisation en clinique. Cependant, il n'existe aucune étude concernant l'observation des effets, de cette chimiothérapie, sur le mélanome malin humain greffé sur souris athymiques.

Ceci nous a conduit naturellement à utiliser la technique des xenogreffes, pour tenter d'obtenir une meilleure compréhension de quelques uns de ces phénomènes. Pour ce faire, la récidive d'un mélanome malin métastatique humain a été établie en modèle expérimental, sur des souris athymiques. En effet, l'utilisation de ce mutant a permis, depuis plus de vingt ans, la pérennité d'un grand nombre de tumeurs humaines (12). Ainsi, grâce à cette technique, plusieurs études peuvent être menées simultanément. Le but de ce travail, a donc été de maintenir, après greffe sur souris nudes, une métastase ganglionnaire, d'un mélanome malin humain achromique, afin d'en étudier les modifications génétiques liées à la chimiothérapie. Le premier objectif de ce travail a donc été la recherche de doses uniques ou fractionnées, de fotémustine et de dacarbazine, tolérées par cet animal. Dans un second temps, la chimiosensibilité de la tumeur, à cette association, a été étudiée. Pour ce faire, au sacrifice des animaux, des prélèvements ont été effectués afin de permettre des études comparatives concernant à la fois l'analyse cytogénétique et l'étude de l'amplification et/ou de l'expression des gènes de chimiorésistance les plus couramment rencontrés, bien que seul GSTπ soit à priori concerné. En revanche, cette métastase pouvait présenter une chimiorésistance intrinsèque, où MDR1 et TOPO II pouvaient être impliqués; c'est la raison pour laquelle ces gènes ont été également étudiés. Ainsi des études comparatives peuvent être pratiquées, entre une tumeur non traitée et les effets induits sur le génome par une chimiothérapie, *in vivo*, grâce aux méthodes de cytogénétique et de biologie moléculaire, entre autres.

N.B. : Les abréviations utilisées au cours de ce travail, ainsi que la définition correspondant aux termes marqués par un astérix (*) sont présentées, à la fin de la thèse, dans l'annexe.

ETAT ACTUEL DES DONNEES

I- LE MELANOME MALIN ET SES TRAITEMENTS

I- LE MELANOME MALIN ET SES TRAITEMENTS.

1. LE MELANOME MALIN.

Le mélanome malin est une tumeur solide, rare et grave de la peau, se développant, le plus souvent, à partir d'un *nævus* pigmentaire ou grain de beauté.

C'est un des cancers, à évolution rapide, sous sa forme récidivante (94). Il représente 1% de toutes les tumeurs malignes et 5 à 10% de celles qui affectent la peau. Il atteint environ 5 personnes pour 100.000 habitants par an en France, et malgré sa rareté, il est responsable de 65% des décès par cancers cutanés. Cette incidence est due, essentiellement, à l'exposition accrue au soleil et au changement du style de vie au cours des 50 dernières années (33, 94) et de ce fait a doublé en 10 ans (Registre du Cancer de l'Isère). Toutefois une composante génétique n'est pas à exclure. La plupart des mélanomes malins apparaissent donc au niveau de grains de beauté préexistants, sur des sites d'exposition au soleil, et se disséminent rapidement, par voie sanguine, s'ils ne sont pas detectés et enlevés précocement par chirurgie (94).

Cette tumeur est notoire pour sa grande capacité à métastaser, après quelques mois ou années, n'importe où dans le corps. Le mélanome malin, une fois disséminé, garde un pronostic redoutable. Cependant il existe une grande disparité au niveau de la gravité de la maladie suivant le nombre de métastases et leurs localisations (17). La médiane de survie n'est que de 11 mois en cas de métastases pulmonaires isolées (17, 94). Elle est encore plus faible, de l'ordre de quelques mois, en cas de métastases cérébrales, hépatiques et/ou osseuses avec seulement 10% de survivants à 1 an : d'où l'importance du dépistage précoce. Par conséquent, il est impératif d'effectuer des campagnes de sensibilisation auprès du public. En effet le temps moyen entre la découverte de la première lésion, souvent curable par chirurgie, et la détection des métastases, présentant un taux impressionnant d'échecs aux chimiothérapies, est de 4 ans (94). Le pronostic est également dépendant de l'âge et du sexe du malade (17).

B.I.U. MED. GRENOBLE

2. LA FREQUENCE DES MELANOMES MALINS.

Aux USA, parmi les personnes atteintes d'un mélanome malin, 6.000 décès par an sont constatés. Le suivi de 635 patients, traités par chimiothérapie contre cette maladie, permet d'observer un taux de réponses objectives* de 11% (89). D'autres études américaines montrent, qu'en 1935, 1 personne sur 1.500 développait ce type de tumeur, alors qu'en 2000, 1 personne sur 100 devrait être atteinte (43). De plus, l'augmentation des mélanomes malins est de 4% par an, soit 32.000 nouveaux cas en 1992. En cas de mélanomes malins, en 1930, 75% de décès ont été recensés, alors que de nos jours seulement 15% sont observés (soit 6.700 décès en 1992) : ce phénomène semble être, en partie, dû au dépistage précoce de la maladie, où l'exérèse* de la tumeur permet une éventuelle guerison. Après une chimiothérapie, le taux de survie à 5 ans, est seulement de 2%. Aucune corrélation entre le taux de survie et le traitement chimiothérapique n'a pu être démontré, d'où la nécessité de tester de nouveaux médicaments (33).

De 1973 à 1991, l'Institut Pasteur de Nouméa, a recensé 97 observations de mélanomes malins, et conclut à un pronostic global médiocre démontrant que la population européenne de phototype clair est nettement plus exposée que la population mélanésienne ou polynésienne, relativement protégée comme les noirs américains ou africains (52). Cette constatation est confortée par une étude, sur deux ethnies Israëliennes, concluant que les peaux noires sont moins sujettes aux mélanomes malins, mais, lorsqu'elles sont atteintes, la maladie semble de nature plus virulente (46).

Une étude danoise montre qu'au cours des 30 dernières années, la survie après un mélanome malin s'est remarquablement améliorée dans tous les groupes d'âges pour les deux sexes. Au cours de cette même période une augmentation des diagnostics précoces est constatée (60 nouveaux cas en 1940 contre 650 en 1987). De plus les patients ayant une maladie localisée ont une meilleure espérance de survie que ceux ayant une maladie disséminée au moment du diagnostic. De même l'âge, au moment du diagnostic, a un impact net sur la durée de survie, les patients les plus jeunes ont un meilleur pronostic. Tous groupes d'âges confondus, les femmes ont un taux de survie supérieur à celui des hommes. Aujourd'hui les mélanomes malins ne représentent que 2,5% de l'ensemble des cancers, mais l'attention est particulièrement attirée par l'accroissement rapide chaque année de ce taux (78).

L'ensemble des travaux, concernant le mélanome malin, conduisent aux conclusions suivantes dans le cas des mélanomes malins :

- le diagnostic précoce du mélanome malin est primordial car au stade disséminé la survie est le plus souvent brève;
- les phototypes clairs sont plus fréquemment touchés;
- les femmes ont une survie supérieure à celle des hommes;
- l'âge au moment du diagnostic influence le pronostic et la durée de survie;
- les traitements chimiothérapiques actuels ne sont pas satisfaisants et leurs utilisations sont plus palliatives que curatives.

3. THERAPIES ET MELANOMES MALINS.

Au stade localisé, une exérèse* du mélanome malin, plus ou moins complétée par une immunothérapie (interféron-α pendant 18 mois), peut amener à une guérison. Au stade loco-régional, une exérèse de la peau atteinte et du ganglion le plus proche, suivi d'une radiothérapie au niveau de ce ganglion et d'un traitement par de l'interféron-α durant 3 mois, peut quelques fois, amener à une guérison. Dans le cas où la maladie a progressée jusqu'au stade métastatique, le traitement sera alors la chimiothérapie plus ou moins complétée d'une immuno ou hormonothérapie. Malheureusement, souvent la maladie, à ce stade, présente un pronostic pessimiste.

N.B. : Une liste, des drogues citées dans ce mémoire, avec leurs différentes dénominations, est présentée à la fin de ce chapitre.

3.1. LES TRAITEMENTS DES MELANOMES MALINS.

Les mélanomes malins résistent de façon notoire à la chimiothérapie (24). En effet, cette dernière n'est habituellement utilisée qu'au stade III, c'est-à-dire pour le traitement des métastases dont le nombre ou la localisation ne permet pas l'exérèse* chirurgicale qui, du fait du fort potentiel de diffusion métastatique de cette tumeur, est exceptionnellement le traitement de première intention(78). De plus, la plupart des médicaments cytotoxiques ont fait l'objet d'essais thérapeutiques de phase II, sur les

mélanomes malins disséminés, mais malheureusement les taux de réponses objectives plafonnent à 20%. Actuellement, les antimitotiques considérés comme les plus actifs, sur les mélanomes malins, sont : la dacarbazine, considérée comme la substance de référence; les nitrosourées et tout particulièrement la fotémustine; les sels de platine et, à un moindre degré, les alcaloïdes de la pervenche et les taxanes; plus ou moins associés à des immunothérapies ou à des hormonothérapies.

3.1.1. LES MONOTHERAPIES.

La dacarbazine (DTIC) montre un taux de réponses objectives* de 21% dont 5% de réponses complètes* et une durée de réponse de 5 à 6 mois, soit environ 20 à 25 mois (17).

Les nitrosourées (BCNU, CCNU) apportent approximativement 15% de réponses objectives* avec une durée de réponse plus courte (12 à 16 semaines). La plus récente de cette classe, la fotémustine, de par sa liposolubilité, permet d'espérer un passage de la barrière hématoméningée et semble ainsi plus active sur les métastases cérébrales, avec 28% de réponses objectives* sur ce site (17). Une autre étude utilisant la fotémustine, en monothérapie, sur les mélanomes malins disséminés, permet d'obtenir un taux de réponses objectives* de 24,2% dont un quart sur le site cérébral avec une médiane de survie* des patients répondeurs augmentée comparativement à celle des non répondeurs (85 semaines contre 17) (16).

Le cisplatine, utilisé à des doses supérieures à 100 mg/m^2 de surface corporelle, donne les mêmes résultats que la dacarbazine mais entraîne une plus grande toxicité. Associé, dans certains cas, à un protecteur rénal (WR 2721), la toxicité observée est alors acceptable, le taux de réponses objectives* atteint 35%, mais avec une courte durée de réponse (17).

3.1.2. LES POLYCHIMIOTHERAPIES.

Il n'existe pas encore de consensus sur l'intérêt des associations d'antimitotiques dans les mélanomes malins métastatiques car, si des taux de réponses plus élevés sont enregistrés, les durées de ces réponses restent décevantes et la toxicité élevée (17).

L'association dacarbazine/fotémustine a fait l'objet de plusieurs études. L'une, s'interessant à 103 patients, met en évidence un taux de réponses objectives* de 26,3% dont 11,6% de réponses complètes* et près de 40 % de réponses objectives sur les sites non viscéraux (peau, ganglions), la médiane de survie est de 55 semaines (16). Une autre, plus restreinte, comportant 17 patients avec des métastases cérébrales, révèle un taux de réponses complètes* de 11,7%, 5,8% de réponses partielles* et 17,6% de stabilisations*. De plus une bonne tolérance a été observée (71). D'après les hypothèses suivantes, selon lesquelles : d'une part, le système de réparation du DNA, le O^6-alkylguanine-alkyltransférase, interviendrait dans la résistance envers certains agents alkylants, et d'autre part, la dacarbazine serait susceptible de saturer cette enzyme en 3 à 4 heures, un groupe suggère que l'administration de dacarbazine, 3 heures avant celle de fotémustine, devrait restaurer la sensibilité des cellules aux nitrosourées. Ce protocole a été expérimenté sur 24 patients atteints de mélanomes malins avancés. Le taux de réponses objectives* obtenu est de 33% dont 4 réponses complètes*, 4 réponses partielles* et 4 stabilisations* avec une moyenne de survie de 28 semaines, ce qui n'est pas réellement meilleur que les résultats obtenus dans les autres études. La seule toxicité observée avec la fotémustine est hématologique, elle est reversible (1). Différentes doses de dacarbazine, associées à la fotémustine ont également été testées sur 60 patients. Le taux moyen de réponses* obtenu est de 30% avec une médiane de survie de 15 semaines, sans différence significative entre les doses de dacarbazine testées. Cependant l'augmentation des doses est corrélée avec l'augmentation de la toxicité hématologique (59), mais l'association fotémustine-dacarbazine est tout de même mieux tolérée, sur le plan hématologique, que la fotémustine seule (53bis). Un essai, sur 60 patients, associant fotémustine-vindésine-dacarbazine a permis d'obtenir 43% de réponses objectives* avec une durée de survie de 32 semaines et une toxicité acceptable.

Ces résultats laissent suspecter la supériorité de la fotémustine sur d'autres nitrosourées (26% de réponses dans une association similaire comportant le CCNU) (59). Cependant seule une étude randomisée permettrait de le démontrer (la durée de survie plafonne à 8 mois soit environ 32 semaines). De plus, les variations observées dans les taux de réponses sont probablement dues à la méthode de sélection des patients et/ou aux traitements chimiothérapiques précédemment administrés, comme en témoigne l'abscence d'amélioration de la survie.

3.1.3. CHIMIOTHERAPIES A FORTES DOSES ET AUTO-GREFFE DE MOELLE.

Elles ont constitué un espoir thérapeutique permettant d'obtenir jusqu'à 75% de réponses objectives avec le melphalan et le BCNU. Cependant ces espoirs ont été, le plus souvent, déçu par la courte durée de ces réponses (médiane de 6 mois).

3.1.4. CHIMIOTHERAPIE ET IMMUNOTHERAPIE.

Ces associations médicamenteuses permettent d'espérer à la fois des taux de réponses plus élevés et des allongements de la durée de survie. Mais les multiples modalités d'associations donnent, le plus souvent, des résultats très difficiles à interpréter.

Une étude comportant 32 patients, concernant l'association dacarbazine-cisplatine-interleukine-2, montre un taux de réponse objectives* de 41%, soit 16% de rémissions complètes* et 25% de rémissions partielles*. La médiane de survie est d'une quarantaine de semaines. Quelques néphrotoxicités mineures ont été observées, mais les retards de traitements ont été rares (36).

L'association interféron-α et interleukine-2, a été étudiée selon deux protocoles différents, associant soit l'interféron-α à l'interleukine-2 en continu, soit l'interféron-α à une dose de charge d'interleukine-2, suivie d'une réduction de la dose en administration continue. Ces protocoles apportent respectivement des taux de réponses objectives* de 18% et de 41% et montrent qu'une forte dose, suivie d'un traitement à plus faible dose, ne réduit pas le taux de réponses, tout en améliorant la tolérance du traitement (56). L'association cisplatine-interféron-α-interleukine-2, peut permettre d'obtenir des taux de réponses objectives de l'ordre de 54%, avec des réponses prolongées allant de 12 à 89 semaines (56bis). Malheureusement, la tolérance de ces traitements, contenant des immunothérapies, est assez mauvaise et les protocoles sont très difficiles à supporter par les malades.

3.1.5. CHIMIOTHERAPIES ET HORMONOTHERAPIES.

Partant de l'identification de recepteurs d'oestrogènes sur les cellules tumorales, un groupe a été conduit à utiliser un antioestrogène, le tamoxifène, en complément des chimiothérapies. 117 patients, atteints d'un mélanome malin métastasé, sont randomisés* pour recevoir, soit la dacarbazine seule, soit l'association dacarbazine/tamoxifène. Le taux de réponses objectives* avec la dacarbazine seule est de 12% (10% chez les femmes et 13% chez les hommes) avec une moyenne de survie de 29 semaines (30 pour les femmes contre 27 pour les hommes). L'association dacarbazine/tamoxifène montre un taux de réponses objectives* de 28% (38% chez les femmes et 19% chez les hommes) avec une moyenne de survie de 38 semaines (69 pour les femmes contre 31 pour les hommes) (25). Il existe, dans cette étude, une différence significative, en terme de réponses objectives et de durée de survie, en faveur de l'association dacarbazine/tamoxifène, chez les femmes.

L'association dacarbazine, carmustine, cisplatine, avec tamoxifène montre un taux de réponses objectives* de 50% dont 15% de rémissions complètes* avec une moyenne de survie de 10,8 semaines. La même association sans le tamoxifène, ne donne que 10% de réponses objectives dont 8% de rémissions complètes* avec une moyenne de survie de 9,8 semaines (68, 69).

3.1.6. CONCLUSION.

Ces résultats, bien qu'encourageants, surtout pour les associations chimio-immunothérapiques, sont tempérés par la lourdeur des protocoles et par leur toxicité importante, dans une situation qui reste palliative. Par conséquent de nombreux patients ne peuvent les recevoir. Ainsi, on observe une tendance à sélectionner, au départ, des patients dont le pronostic est le meilleur (âge, nombre de sites, siège des métastases), ce qui peut améliorer artificiellement les résultats. Un meilleur contrôle de la toxicité permettrait, éventuellement, des indications plus larges de ce type de traitement. A l'heure actuelle, des protocoles de plus en plus complexes, associant le plus souvent chimiothérapie et immunothérapie, apportent maintenant des taux de réponses objectives* allant jusqu'à 50%, alors que les meilleurs

associations chimiothérapiques seules donnent des réponses objectives* de l'ordre de 25%. Effectivement, les antimitotiques "les plus actifs" (15 à 30% de réponses objectives) sont la dacarbazine, la fotémustine et le cisplatine, mais les combinaisons d'antimitotiques ne permettent pas d'améliorer ces résultats (20 à 30% de réponses objectives). En revanche, les taux de réponses objectives dépassent 50% en combinant ces trois drogues avec le tamoxifène (66bis). Il faut noter que les taux de réponses complètes* augmentent (13% pour les meilleures) et par conséquent les durées de survie devraient être prolongées (85 mois pour les plus longues) (56bis).

Donc rien de bien décisif n'apparaît en matière de traitement du mélanome malin disséminé. Cependant, ces données sont à considérer avec précautions, car de nombreux biais peuvent éventuellement influencer les résultats et expliquer cette disparité (choix des patients, traitements précédents...).

Dans cette étude, le choix s'est porté sur l'association de la dacarbazine, considérée comme la substance de référence, à la fotémustine la dernière née des nitrosourées, association qui parait apporter de bons résultats. En effet de par sa liposolubilité, elle peut franchir la barrière hématoméningée et ainsi atteindre les métastases cérébrales, en partie responsables des décès dans les mélanomes malins métastasés.

3.2. CLASSIFICATION DES ANTICANCEREUX EN FONCTION DE LEURS MECANISMES D'ACTIONS.

La présentation des drogues antimitotiques, qui parait la plus claire, est celle qui les classent selon leurs mécanismes d'actions (Figure 1.1., page 21). On peut ainsi distinguer quatre grandes familles :

- les drogues agissant par interférence avec la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines;
- les drogues agissant par interférence avec la duplication, la transcription et la traduction;
- les drogues agissant sur le fuseau mitotique;
- les autres substances à mécanismes d'action complexe.

3.2.1. LES DROGUES AGISSANT PAR INTERFERENCE AVEC LA BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES PROTEINES.

Ces drogues sont encore appelées antagonistes ou ANTIMETABOLITES dans la mesure où leurs formules chimiques présentent une ressemblance plus ou moins étroite avec des coenzymes ou des métabolites nécessaires à la synthèse du DNA, du RNA ou des protéines, mais elles en diffèrent suffisamment pour agir comme des inhibiteurs compétitifs dans ces processus métaboliques. Elles regroupent :

- les antagonistes de l'acide folique (ex. : méthotrexate);
- les analogues des purines (ex. : 6-mercapto-Purine);
- les analogues des pyrimidines (ex. : 5-fluoro-uracile);
- les drogues affectant la biosynthèse des acides nucléiques (ex. : hydroxyurée);
- les inhibiteurs de la synthèse protéique (ex. : L-asparaginase).

3.2.2. LES DROGUES AGISSANT PAR INTERFERENCE AVEC LA DUPLICATION, LA TRANSCRIPTION ET LA TRADUCTION.

Ces drogues agissent au niveau des acides nucléiques eux-mêmes, notamment sur la duplication du DNA, la transcription et la traduction. Les agents appartenant à ce groupe sont :

- les ALKYLANTS qui constituent des ponts stables entre les deux brins de DNA; ceux-ci ne peuvent plus se séparer et jouer ainsi leur rôle dans la division cellulaire (ex. : nitrosourées);

- les agents qui interférent avec la transcription ou INTERCALANTS : une série de composés extraits de micro-organismes, désignés sous le terme "d'antibiotiques" partagent le même mécanisme d'action qui est la liaison sélective au DNA aboutissant au blocage de la transcription, c'est-à-dire de la synthèse de RNAs (ex. : anthracyclines, actinomycine D). La bléomycine est partiellement intercalante en se liant à un brin de DNA.

- les agents altérant la traduction : ces molécules inhibent la synthèse protéique en bloquant la mise en place du système RNA de transfert/acide aminé activé sur le complexe ribosome/RNA messager (ex. : puromycine). La procarbazine, outre son action en tant qu'alkylant, semble également altérer la méthylation du RNA de transfert, et ainsi inhiber la traduction.

3.2.3. LES DROGUES AGISSANT SUR LE FUSEAU MITOTIQUE.

Ces composés sont des POISONS DU FUSEAU entraînant la dislocation des formations microtubulaires de la cellule, empêchant donc la division cellulaire. Ils regroupent les alcaloïdes de la pervenche et les dérivés de la podophyllotoxine (étoposide et téniposide). Ces derniers agissent également en stabilisant les complexes clivables DNA-topoisomérase II.

3.2.4. LES AUTRES SUBSTANCES À MECANISMES D'ACTION COMPLEXE.

Le cisplatine agit à la fois en tant qu'alkylant et intercalant, mais intervient aussi probablement sur les phénomènes de réparations du DNA.

La dacarbazine agit plus en tant qu'alkylant qu'inhibiteur de la biosynthèse des purines.

3.3. LES CYTOSTATIQUES ALKYLANTS UTILISES DANS L'ETUDE.

Ils fixent un radical sur la molécule de DNA interdisant, d'une part, la réplication, par formation d'un pont stable entre les deux chaines de DNAs, d'autre part, la division cellulaire, par cassure de ces molécules de DNAs (68).

3.3.1. DACARBAZINE ou DETICENE[R] (DTIC).

Laboratoire ROGER BELLON.

C'est une molécule alkylante affectant la synthèse du DNA et de ses bases puriques, après une probable activation métabolique. C'est un analogue d'un précurseur des bases puriques entraînant un blocage de la chaine métabolique en se substituant à ces dernières.

Ses principales indications sont les lymphomes malins non Hodgkiniens, la maladie de Hodgkin, les sarcomes, les mélanomes.

La posologie chez l'homme est de 400 à 1000 mg/m^2 de surface corporelle, par cure, par voie intra-veineuse répartie en 1 à 5 jours avec une cure tous les 21 jours environ, ou de 100 mg/j, en 2 cycles de 5 jours, en intra-artérielle avec des cures espacés de 48 heures.

Les principaux effets indésirables, souvent réversibles, sont : digestifs (nausées, vomissements, anorexie, constipation); hématologiques (leucopénie, thrombopénie, anémie); alopécie; photosensibilisation; veinite au point d'injection.

3.3.2. FOTEMUSTINE ou MUPHORAN[R] (S10036).

Laboratoire SERVIER.

C'est un agent de la famille des nitrosourées ayant une activité alkylante et carbamoylante sur les acides nucléiques et les protéines. Son action alkylante se situe sur les groupes nucléophiles des acides nucléiques et des protéines.

Ses principales indications sont le mélanome malin métastatique et les glioblastomes.

La posologie chez l'homme est d'une administration par semaine, pendant 3 semaines, à 100 mg/m^2 de surface corporelle, en traitement d'attaque, suivie d'une administration toutes les 3 semaines à 100 mg/m^2 de surface corporelle, après 4 à 5 semaines d'interruption, en traitement d'entretien par voie intraveineuse.

Les principaux effets indésirables, souvent réversibles, sont : hématologiques (leucopénie, thrombopénie); digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales); hépatique; neurologique; hyperthermie; veinite au point d'injection.

LISTE DES DROGUES CITEES DANS CE CHAPITRE.

DENOMINATION USUELLE (D.C.I.)	DENOMINATION CHIMIQUE	ABREVIATION
ACTINOMYCINE D	$C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$	ACT D
L-ASPARAGINASE		L-ASP
CARMUSTINE	1,3-bis(2chloroéthyl)-1-nitrosourée	BCNU
CISPLATINE	Cis-diamminodichloroplatine	CDDP
DACARBAZINE	Imidazocarboxamide	DTIC
5 FLUOROURACILE	Dihydroxy-2,4 fluoro-5pyrimidine	5 FU
FOTEMUSTINE	{[(Chloro-2-éthyl)-3 nitroso-3 uréido]-1 éthyl} phosphonate de diéthyl	S 100 36
HYDROXYUREE	Hydroxycarbamate	HUR
LOMUSTINE	1-(2-chloroéthyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourée	CCNU
6-MERCAPTOPURINE	$C_5H_4N_4S$, H_2O	6 MP
METHOTREXATE	Acide 4-amino-N_{10}-méthylptéroyl-L-glutamique	MTX
TENEPOSIDE	O-déméthyl-4'O-(O,O-thiényllidène-2)-4,6ß-D-glucopyranosyl)-épipodophyllotoxine	VM 26
VINDESINE	$C_{43}H_{55}N_5O_7$	VDS

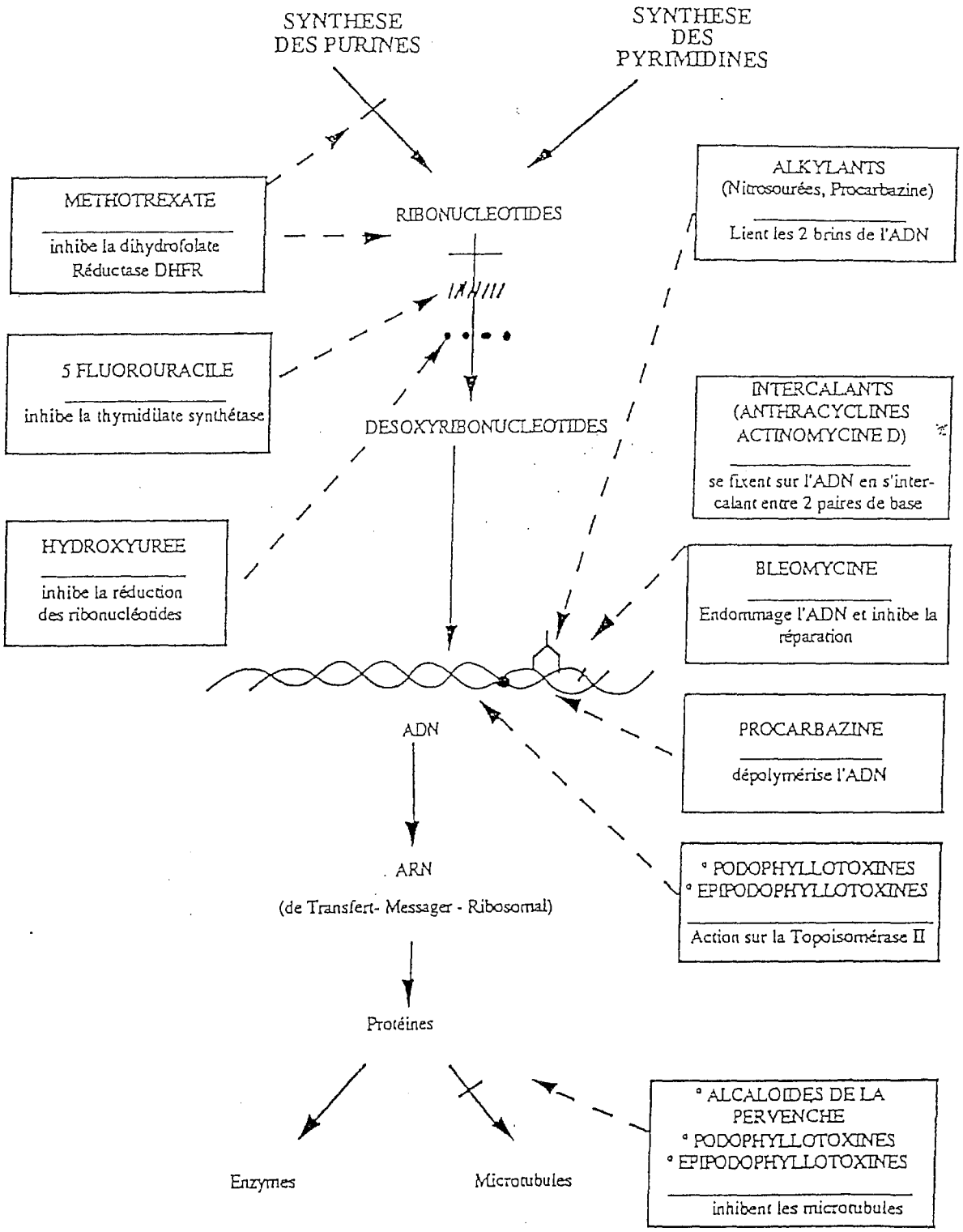


FIGURE 1.1. :
MECANISMES D'ACTIONS DES PRINCIPAUX ANTICANCEREUX (30, 73).

II- LA CHIMIORESISTANCE

II- LA CHIMIORESISTANCE.

1. SES MECANISMES MOLECULAIRES.

La résistance est souvent définie par une absence de réponse thérapeutique. Son développement constitue un obstacle majeur au traitement des cancers (82).

Pour une tumeur donnée, l'émergence d'une chimiorésistance résulte de plusieurs facteurs, qui tiennent à la tumeur elle-même ou à son environnement physiologique (42, 109). On distingue donc :

- la résistance temporaire, liée à des facteurs de cinétique cellulaire ou de biodisponibilité pharmacologique avec notamment des "sanctuaires" rendant inaccessible la pénétration de la drogue;

- la résistance permanente, correspondant au développement, au sein d'une population tumorale, d'une sous-population de cellules résistantes, capables de transmettre cette résistance à leurs descendances.

Elle peut exister d'emblée, c'est la résistance intrinsèque, ou apparaître en cours de traitement, c'est la résistance acquise (82, 106). Ceci ne signifie pas que l'agent induise l'acquisition de cette résistance. En fait, l'agent sélectionne des cellules spontanément résistantes parmi une population majoritaire de cellules sensibles, ces cellules résistantes repeuplent ensuite la tumeur, d'où l'image d'une acquisition de résistance sous traitement. Cette résistance peut être limitée à un seul agent, alors que la tumeur ou les cellules tumorales sont sensibles à d'autres agents. Elle est en règle général d'origine génétique, les deux évènements génétiques majeurs étant la mutation et l'amplification génique.

Pour une drogue donnée, plusieurs mécanismes peuvent concourir à rendre une cellule résistante (30). Ils peuvent intéresser :

- la membrane cellulaire entraînant une diminution de la pénétration des drogues par modification des mécanismes de transport spécifique;

- le cytoplasme par inactivation enzymatique de la drogue;

- le noyau par modification des mécanismes de réparation du DNA.

De plus, il existe des résistances simples (ou spécifiques) du type de la dihydrofolate réductase et des résistances multiples comme celles de type MDR1, GSTπ ou TOPO II.

La chimiorésistance est acquise par une cellule comme conséquence d'une mutation survenue dans son génome et dont la probabilité de survenue n'est pas influencée par le traitement. Dans certains cas de chimiorésistance, l'amplification et/ou la modification de l'expression d'un ou de plusieurs de ces gènes est présente.

2. LES GENES DE CHIMIORESISTANCE.

2.1. LA RESISTANCE PLEIOTROPIQUE "TYPIQUE" OU MULTI DRUG RESISTANCE (MDR).

Les premières observations de résistance pléïotropique* ont été décrites il y a plus de 20 ans (16). Cette résistance MDR est due à l'expulsion active, des drogues, hors de la cellule, par une glycoprotéine membranaire de 170 kDa (P-gp)(13, 19, 54, 65, 82). La P-gp est produite à partir du gène MDR. Il y aurait une corrélation entre la quantité de protéine détectée et la diminution de l'accumulation cellulaire des drogues, reflet de l'index de résistance observé. En effet, la P-gp fonctionne comme une pompe consommatrice d'énergie (ATP); elle est capable de se lier à la drogue pour en réaliser l'efflux actif. Cette résistance se manifeste à l'égard de nombreux composés toxiques d'origine naturelle, de nature hydrophobe et de structures très différentes tels que les alcaloïdes de la pervenche, les anthracyclines, les épipodophyllotoxines ou l'actinomycine D (14, 85, 109). Elle entraîne une résistance croisée vis-à-vis de ces drogues (42, 87).

2.1.1. LE GENE MDR.

Le gène MDR1 est un membre d'une famille multigénique présente chez l'homme et les rongeurs. Alors que 5 gènes ont pu être identifiés chez le hamster, 2 gènes, MDR1 et MDR2, sont connus chez l'homme. Cependant, la fonction du gène MDR2 n'est pas encore connue. Seul le gène MDR1 est capable de conférer le phénotype MDR par transfection dans des cellules sensibles. Enfin, la régulation de l'expression du gène MDR1 pourrait être médiée par des oncogènes viraux tels que v-h-ras et v-h-raf (18). Mais il semble également que le gène MDR1 pourrait être activé, durant la

progression tumorale, par l'intermédiaire de l'oncogène c-Ha-Ras-1 et du gène suppresseur des tumeurs (P53 mutée) (73).

Les deux gènes MDR humains sont localisés sur le chromosome 7q21.1 et ne sont séparés que par 330 kb. Le gène MDR1 s'étend sur plus de 100 kb. Il comporte 29 exons, 28 introns et 2 sites majeurs d'initiation de la transcription qui sont situés environ 140 bases en amont de la séquence ATG (Adénine-Thymine-Guanine) d'initiation de la traduction. Ce gène code pour un RNA messager de 4,5 kb, présent dans les cellules en quantité proportionnelle à leurs degrés de résistance (73). La surexpression du gène MDR1 peut être ou non précèdée de son amplification (11, 38, 87). Dans le mélanome, son taux génique est normalement faible ou indétectable. Une plus grande quantité de protéines peut résulter d'une augmentation du nombre de copies du gène, cette amplification putative est exceptionnellement détectée dans les prélèvements frais de tissu cancéreux humain. Plus fréquement, cette augmentation de la quantité de protéines résulte d'une augmentation du taux de transcription du gène, le RNA correspondant étant détecté en plus grande quantité. La surexpression de la P-gp est relativement fréquente, et dépend en partie de la localisation du cancer. Le produit du gène MDR1 est la P-gp ayant un rôle de pompe membranaire chassant, hors de la cellule, les cytostatiques tel que les anthracyclines, les alcaloïdes de la pervenche, les épipodophyllotoxines, le taxol et l'actinomycine D (85).

2.1.2 LA P-GLYCOPROTEINE.

La P-glycoprotéine (P-gp) appartient à une super famille de protéines de transport de différents substrats d'eucaryotes et de procaryotes (Figure 2.1.). C'est une protéine de 1280 acides aminés, constituée de 2 parties homologues d'égales longueurs. Ces 2 parties sont représentées par 6 domaines hydrophobes trans-membranaires (13, 49, 65). La molécule purifiée de P-gp a une activité ATPase. Sa liaison avec l'ATP et son hydrolyse sont nécessaire à l'efflux des drogues. La mutation de l'un ou l'autre des 2 sites de liaison avec l'ATP est responsable de la disparition de la résistance aux drogues pour les cellules transfectées qui expriment la P-gp mutée. La liaison directe de la drogue sur la P-gp est une étape essentielle de son transport. Le site probable de fixation de la drogue, sur la P-gp, est la glycine

en position 185. Lorsque cet acide aminé est remplacé par une valine, il apparaît une modification de la résistance, qui est accrue pour le VP16 et l'adriamycine mais qui est diminuée pour la vinblastine, la vincristine ou l'Actinomycine D.

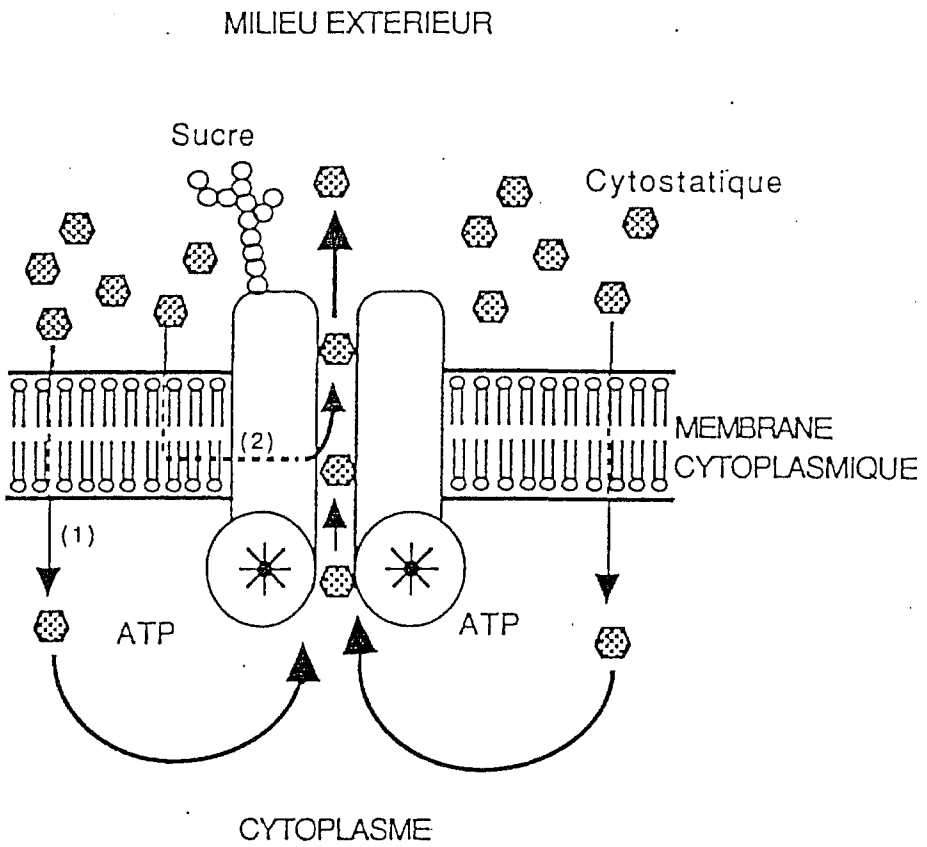


FIGURE 2.1. :
SCHEMA DE LA P-GLYCOPROTEINE (P-gp) (65)

(1) : Le passage intracellulaire du cytostatique est passif, l'efflux par la P-gp est actif (2sites ATP).
(2) : Il est possible que les cytostatiques très lipophiles ne pénètrent pas dans le cytoplasme.

2.1.3. EXPRESSION DU GENE MDR1 HUMAIN DANS LES TISSUS NORMAUX ET LES TUMEURS.

L'expression du gène MDR1 dans les tissus peut-être déterminé en mesurant (10) :

- soit le taux de RNAs par Northern blot, reverse transcriptase PCR...
- soit le taux de P-gp par Western blot, par immunohistochimie par différents anticorps monoclonaux (49, 65)...

Dans les tissus normaux, le gène MDR1 est généralement exprimé à un niveau faible (38,41). Cependant, dans certains tissus comme le colon, le foie, le rein, la surrénale, ce gène présente une expression élevée. Cette variabilité d'expression d'un tissu à l'autre suggère l'existence de phénomènes de régulation au cours de la différenciation cellulaire (49, 65). Le rôle physiologique de la P-gp dans les tissus normaux est mal connu. La localisation de la P-gp à la surface luminale des cellules des tubes contournés proximaux rénaux, des hépatocytes bordant les canalicules biliaires et des cellules iléo-coliques est compatible avec une possible fonction d'excrétion des substances toxiques.

Dans les tumeurs humaines (41, 49, 65), l'expression du gène MDR1 est élevée soit dans les tumeurs dérivant d'un tissu normal surexprimant MDR1, soit dans certaines tumeurs telles que la leucémie myéloïde chronique (LMC) acutisée. Dans le mélanome son taux d'expression est normalement faible (41).

2.1.4. REVERSION DE LA RESISTANCE MDR.

Différents agents peuvent bloquer la P-gp et ainsi rendre réversible le phénotype de résistance (49, 55, 65, 92) :

- les inhibiteurs calciques (vérapamil, diltiazem, nifédipine);
- les antagonistes de la calmoduline (clomipramine);
- certains antiarythmiques (quinidine, amiodarone);
- autres (tamoxifène, certains progestatifs, la ciclosporine A).

Cependant, à l'heure actuelle, les résultats cliniques obtenus avec ces différentes molécules restent peu probants et une toxicité, plus ou moins importante, a été constatée (85).

2.2. LA RESISTANCE PLEIOTROPIQUE "ATYPIQUE".

L'identification de mécanismes de résistance croisée vis-à-vis de divers antimitotiques, sans qu'il y ait expression de la P-gp (8, 15) est à l'origine de l'appelation "résistance pléïotropique atypique". Deux mécanismes principaux ont été décrits. Un mécanisme de détoxification cytoplasmique, comme celui du glutathion, peut être mis en jeu avec l'une des isoenzymes clefs de son métabolisme surexprimée : la glutathion-S-transférase (112). L'autre mécanisme est représenté par l'altération des topoisomérases (8), enzymes régulant la conformation du DNA (49, 65).

2.2.1. LES GLUTATHION-S-TRANSFERASES.

Lorsqu'une substance exogène, telle qu'une drogue anticancéreuse est introduite dans un organisme, elle subit l'action de plusieurs systèmes enzymatiques, hépatiques et/ou extra-hépatiques. On distingue des enzymes dites de phase I, assurant l'hydrolyse, la réduction et l'oxydation de la molécule et les enzymes dites de phase II, inactivant la molécule ou ses métabolites et facilitant son excrétion. Parmi ces enzymes, certaines sont plus particulièrement impliquées dans la détoxification des drogues anticancéreuses. Ainsi, selon la drogue, différentes enzymes sont mises en jeu :
- la thymidilate synthétase pour le 5 Fluoro-Uracile;
- les glutathion-S-transférases pour les Alkylants ou l'Adriamycine.

a- Rappels biochimiques sur les glutathion-S-transférases :

Le glutathion (GSH) est un tripeptide intra-cellulaire, le gamma-glutamyl-cystéine-glycine présent dans un grand nombre de cellules de mammifères. En réagissant avec les radicaux libres ou les ions peroxydes générés par les anticancéreux, il permet la détoxification de la cellule et par là même, l'introduction d'une résistance aux alkylants, aux anthracyclines, aux nitrosourées et au cisplatine. Par conséquent la baisse du taux de GSH restaure une chimiosensibilité des cellules vis-à-vis de ces agents (85, 105). De ce fait, on conçoit l'importance de ces enzymes qui participent à l'activité

détoxifiante du glutathion en catalysant la conjugaison des drogues à la cystéine du glutathion. Elles appartiennent aux systèmes enzymatiques de phase I et II, assurant l'élimination de nombreuses substances étrangères à la cellule. Elles ont également une activité peroxydasique, leur permettant d'éliminer les hypéroxydes et les dérivés oxygénés fabriqués par l'adriamycine, entraînant ainsi une diminution de sa cytotoxicité (Figure 2.2.).

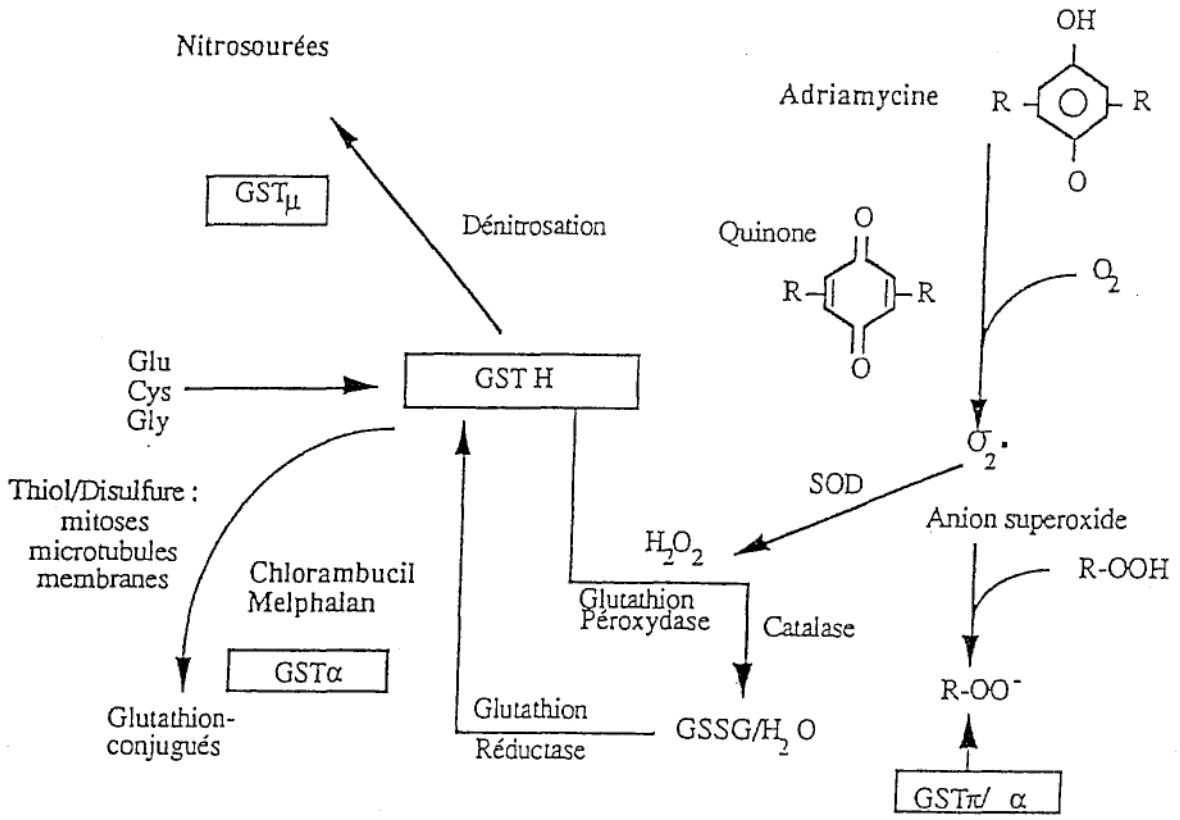


FIGURE 2.2. :
SCHEMA SIMPLIFIE DU ROLE DES GLUTATHION-S-TRANSFERASES
ET DES ENZYMES ASSOCIÉS
AUX MECANISMES DE DETOXIFICATION CELLULAIRE (73, 105).

b- Les glutathion-S-transférases (GSTs) :

Chez l'homme, il existe 3 familles d'enzymes distinctes par leurs propriètés chimiques et leurs structures polypeptidiques (26) et dénommées GSTα, GSTμ et GSTπ. Ces enzymes résident dans le cytosol sous forme d'homo et d'hétérodimères constitués de sous-unités protéiques dont le poids moléculaire varie de 23.000 à 28.000 daltons. Une augmentation de l'activité des GSTs ou du taux de transcrits de l'une de ces familles a été décrite dans différentes lignées cellulaires tumorales (60, 91, 102, 104, 116) et dans diverses tumeurs expérimentales (70, 104, 114).

Les glutathion-S-transférases constituent une famille d'enzymes qui catalysent l'attaque nucléophile d'un sulfure du glutathion dans le centre électrophile de nombreux composés chimiques. Les GSTs diffèrent d'un tissu à l'autre et sont supposées jouer un rôle important dans la protection de macromolécules cellulaires attaquées par des réactifs électrophiles, d'où leurs fonctions de détoxifiants cellulaires. De plus elles auraient un rôle de transporteurs pour des protéines intracellulaires telles que l'héme, la bilirubine, les hormones.... Un taux augmenté de GSTs a été observé dans de nombreuses cellules tumorales chimiorésistantes, d'où un rôle possible de ces enzymes dans le développement de la résistance au cours des chimiothérapies (112).

Grâce aux lignées cellulaires cancéreuses, sélectionnées pour leurs résistances aux drogues, il a été mis en évidence l'existence d'une relative spécificité des GSTs :

- la surexpression de GSTα est associée à la résistance aux alkylants (cyclophosphamide) et à une résistance collatérale à d'autres drogues de ce type (melphalan, chlorambucil);
- la surexpression de GSTμ a été observée après exposition d'une lignée cellulaire aux nitrosourées comme le BCNU (81);
- la surexpression de GSTπ est responsable de la résistance à de nombreuses drogues, dont les nitrosourées, le cisplatine et l'adriamycine.

c- Les gènes GSTs :

Trois familles de gènes codent pour ces 3 groupes d'enzymes chez l'homme (53). La GSTα, de nature basique, est à l'origine des sous-unités 1, 2, 8

et 10. Ce gène appartient au chromosome 6p12 et sa séquence humaine n'est pas encore totalement identifiée mais, à priori, comparable à celles observées chez le rat et chez la souris. La GSTμ, de nature neutre, donne naissance aux sous-unités 3, 4, 6, 9 et 11. Ce gène est portée par le chromosome 1p31 et il existe une corrélation entre la séquence du gène chez le rat, en partie connue, et celle de l'humain (112). Le gène correspondant à GSTπ , enzyme de nature acide, appartient au chromosome 11q13 et produisant un mRNA de 0,7 kb, permettant la production de la protéine constituée d'une seule sous-unité, la 7. Il est à noter que cette région du bras long du chromosome 11 s'avère être amplifiée dans un grand nombre de cancers humains, et plus particulièrement dans les tumeurs mammaires (58). La régulation de l'expression de GSTπ pourrait être médiée par les oncogènes viraux v-h-ras et v-h-raf (18) et par les oncogènes cellulaires c-fos et c-jun (72). De plus, elle pourrait être commune à celle de la MDR1 dans la mesure où une augmentation de l'activité GST est souvent associée à un niveau de transcrits élevés pour MDR1 dans différentes lignées cellulaires tumorales (116).

d- Expression des GSTs dans les tissus normaux et les tumeurs :

La fonction majeure de détoxification, assurée par les GST et la diversité des molécules sur lesquelles elles peuvent agir, explique l'hétérogénéité de leurs distributions et les variations importantes de leurs taux (10). Dans les tissus normaux de rat, les GSTs, sont présentes dans presque tous les tissus (105). Chez l'homme, le taux de transcrits de GSTπ est élévé dans le placenta et le poumon, mais bas dans le foie (74).

Comparées aux tissus normaux, dont elles dérivent, un grand nombre de tumeurs humaines (cérébrales, gynécologiques, digestives, urinaires, pulmonaires, hématologiques) présentent une augmentation de l'activité glutathion-S-transférase (76). Dans ces tumeurs, la GSTπ est souvent prédominante (49, 96). Elle semble donc associée au processus de transformation et peut être considérée comme un marqueur tumoral (105). Dans certains cas, comme les cancers du sein, l'expression de GSTπ varie de manière inverse à celle des récepteurs hormonaux et constitue par conséquent un facteur pronostic péjoratif (107). Dans les mélanomes non traités, son taux est souvent bas. Ce système de défense faisant intervenir la

GSTπ, est plus fréquemment observé que l'augmentation de l'efflux des drogues, c'est-à-dire le phénotype MDR classique, dans les tumeurs humaines, (28, 38, 74).

e- Réversion de la résistance aux GSTs :

La buthionine sulfoximine, un inhibiteur irréversible de la gamma-glutamyl-cystéine synthétase, entraîne une réduction significative du taux de GSH. Cet effet peut rendre chimiosensible des cellules devenues résistantes aux alkylants. L'utilisation de ces réversants, fait l'objet d'études préliminaires actuellement, afin de définir si leurs utilisations en thérapeutique serait bénéfique. Il semble ainsi que l'efficacité du melphalan puisse être accrue sans majoration de sa toxicité. En revanche, des toxicités rénales ont été observées avec les nitrosourées. L'estermonoéthyl de GSH, un réversant, pourrait être utile en association avec le cyclophosphamide ou le BCNU.

2.2.2. LES TOPOISOMERASES (62, 88).

Ce sont des enzymes nucléaires, impliquées dans la division et la croissance cellulaire (113), tout particulièrement au niveau des processus de réplication, de transcription et de recombinaison, en contrôlant la superhélicité du DNA. Il existe deux types de topoisomérases selon qu'elles entraînent la cassure d'un seul brin d'ADN (type I) ou des deux brins d'ADN (type II). Ces enzymes coupent de manière transitoire le DNA; pendant ce temps, un brin de DNA complémentaire dans le cas de la Topo I et deux brins dans le cas de la Topo II, sont synthétisés puis réinsérés au niveau de la lésion crée auparavant (82).

a- Les gènes (23, 101, 118).

La TOPO I est codée par une seule copie du gène porté par le chromosome 20q12-13. Les 2 isoenzymes de la TOPO II sont codées par 2 gènes

différents, ayant 75% d'homologie, et portées par le chromosome 17q21-22. Leurs transcrits (mRNA) sont de taille identique : 6,5 kb.

b- Les topoisomérases.

La TOPO I isolée des eucaryotes permet la relaxation, *in vitro*, du DNA surenroulé (113). C'est une protéine monomérique dont le poids moléculaire varie de 67 à 110 kDa, selon l'origine du système cellulaire.

Les TOPO II des eucaryotes sont des dimères dont chaque sous-unité a un poids moléculaire compris entre 170 et 180 kb (23). Elles catalysent, *in vitro*, les réactions de topoisomérisation de molécules circulaires bicaténaires telle que la relaxation de supertours négatifs, la caténation et la décanation, le nouage et le dénouage (49).

c- Expression dans les tissus.

L'activité de la TOPO II est corrélée avec la croissance cellulaire (10). Elle est élevée lorsque les cellules sont en phase de croissance logarithmique et plus basse lorsque la croissance cellulaire est en phase de plateau (99). De même, l'activité TOPO II est élevée en période de haute activité mitotique, comme au cours de la régénération hépatique après hépatectomie partielle (32), durant l'embryogénèse précoce (34) ou pendant le développement cérébral (110) chez le rat. C'est la cible de plusieurs antinéoplasiques dont l'adriamycine, le téniposide, l'étoposide, les anthracyclines, les épipodophyllotoxines... Une résistance multidrogue atypique est possible grâce à une diminution de synthèse de ces enzymes ou à une modification (mutation) de leur structure moléculaire, la reconnaissance de la cible par l'agent chimiothérapique est alors altérée. Son taux est inversement corrélé avec le taux de chimiorésistance.

d- Réversion de cette résistance.

Les nouvelles approches, pour contourner cette résistance médiée par la TOPO II, viennent d'une meilleure compréhension des mécanismes d'action

des drogues, qui ont pour cible cette enzyme, et de la meilleure connaissance des aspects biochimiques de cette forme de résistance. Actuellement, deux types d'agents laissent espérer que ce mécanisme de résistance pourra être contourné : les inhibiteurs des mécanismes de réparation tels que le 3-amino benzamide se sont avérés efficaces dans les lignées cellulaires CEM/VM1, au phénotype "at-MDR" ou toporésistant (9); les différents analogues des aminoacridines, des épipodophyllotoxines, des anthracyclines (le N-benzyladriamycine-14-valérate, méthoxymorpholinodoxorubicine) ne reconnaissent pas cette lésion de chimiorésistance et peuvent ainsi être cytotoxiques sur des cellules au phénotype toporésistant. De plus, une résistance à un inhibiteur de la TOPO I peut conférer une sensibilité relative à un inhibiteur de la TOPO II et *vice versa* (45, 100).

2.3. INHIBITION DE LA O^6-ALKYLGUANINE-ALKYL-TRANSFERASE (AT).

Une mention spéciale doit être apportée aux nitrosourées qui sont capables de méthyler une guanine du DNA, sur l'oxygène en position 6 (85). Cette lésion peut être réversée par "l'enzyme suicide", la AT, qui serait absente dans certains modèles tumoraux, entraînant une extrème sensibilité, de ces cellules, aux nitrosourées. La corrélation entre le taux de AT et la résistance aux nitrosourées est encore à l'étude. De plus l'activité du O^6-methylguanine ou du O^6-benzylguanine en tant qu'inhibiteur de cette détoxification enzymatique est actuellement à l'étude en clinique. Ces deux composants sont des pseudo-substrats de l'enzyme qui ne peut, ainsi, plus oter le groupe alkyl du DNA. Il pourrait être intéressant de l'étudier dans notre modèle expérimental de mélanome malin.

3. LES MECANISMES MULTIFACTORIELS DE RESISTANCE AUX DROGUES ANTICANCEREUSES.

La résistance aux antimitotiques s'avère souvent être plurifactorielle : elle associe non seulement des mécanismes métaboliques et moléculaires mais aussi les mécanismes moléculaires entre eux (Tableau 2.1.). Chaque mécanisme de résistance est associé à une ou plusieurs drogues

antinéoplasiques, d'où l'extrême complexité des mécanismes de chimiorésistance. Les interrelations entre ces mécanismes sont encore mal établies; certains ont suggéré, par exemple, que les conjugués glutathions formés sous l'action de la GST pourraient être le substrat de la P-gp (115).

Trois mécanismes impliquant MDR1, GSTπ, TOPO II sont rencontrés dans la résistance vis-à-vis de deux familles de drogues : les épipodophyllotoxines (ex. VP16) et les anthracyclines (ex. doxorubicine). Deux mécanismes, impliquant ces gènes, peuvent expliquer la résistance pour les drogues suivantes : MDR1 et GSTπ pour la Vincristine; MDR1 et TOPO II pour le VM26 et l'actinomycine D; GSTπ et TOPO II pour la mitoxantrone. Pour les autres drogues, comme les nitrosourées, il semble qu'un seul mécanisme moléculaire de résistance soit en cause, dans ce cas GSTπ.

Cette résistance peut être croisée : les cellules résistantes sélectionnées après traitement par un agent (doxorubicine), sont résistantes à de nombreux autres agents, non apparentés (vinblastine, taxol, taxotère) (82). Cette résistance croisée peut être liée à la sélection de cellules possédant plusieurs mécanismes de résistance ou bien à un seul mécanisme de défense qui reconnaît plusieurs agents. De plus en plus fréquemment, on constate que ces résistances cohabitent, donnant une image d'ensemble particulièrement complexe.

TABLEAU 2.1. :
CARACTERISTIQUES DES MECANISMES MOLECULAIRES
DE CHIMIORESISTANCE ETUDIES (73).

	MECANISMES DE CHIMIORESISTANCE			
GENE localisation chromosomique	amplification génique	surexpression génique	traduction du gène : protéine induite	FONCTION PHARMACOLOGIQUE DE LA PROTEINE
MDR1 7q21.11	+/-	+	P-gp	efflux des drogues hors de la cellule Touche : alcaloïdes de la pervenche, epipodophillotoxines, actinomycine D, anthracyclines
GSTπ 11q13	+/-	+	GSTπ	détoxification cellulaire marqueur de résistance associé au processus de cancérogénèse Touche : alkylants, 5-FU, antibiotiques, cisplatine
TOPO II 17q21.22	-	-	- défaut qualitatitatif ou quantitatif de TOPO II	associé à la croissance cellulaire son altération entraine une résistance envers certaines drogues Touche : anthracyclines, actinomycine D, épipodophyllotoxines

STRATEGIE ET RESULTATS

III- CHIMIOSENSIBILITE DE LA RECIDIVE D'UN MELANOME MALIN ACHROMIQUE GREFFE SUR SOURIS ATHYMIQUES

III- CHIMIOSENSIBILITE DE LA RECIDIVE D'UN MELANOME MALIN ACHROMIQUE GREFFE SUR SOURIS ATHYMIQUES.

La découverte, chez la souris, d'un mutant privé de thymus, dont le déficit immunitaire est sévère, a fourni aux immunologistes un modèle idéal. Elle est aussi un instrument de choix en cancérologie, ce qui explique son utilisation pour tester, entre autres, de nouvelles thérapeutiques.

1. LA SOURIS NUDE.

En 1962, une souris mutante a été découverte, par GRIST, dans un élevage de l'hôpital à Glasgow, et examinée à l'institut de génétique animale d'Edimbourg. FLANAGAN l'a décrite avec précision et l'a appelée Nude (nu/nu) (37). Deux ans plus tard, PANTELOURIS mit en évidence l'athymie (79). Ainsi toutes les anomalies la concernant s'expliquent par un déficit immunitaire.

La souris nude, en effet, n'a pas de thymus mais possède cependant deux rudiments épithéliaux dépourvus de lymphocytes et composés de conduits anastomosés où les produits s'accumulent. Cette structure se modifie en fonction de l'âge. Dès la quatrième semaine de vie, les rudiments sont envahis de kystes au contenu visqueux, qui deviennent volumineux et se remplissent de débris cellulaires chez la souris âgée. Quelques lymphocytes de type B, peuvent-être rencontrés dans le tissu conjonctif entre les kystes. On a d'abord cru à l'absence totale de lymphocytes T, mais, l'utilisation d'antisérums a permis de caractériser, chez la souris nude, une population de lymphocytes possédant peu d'antigène Thy_1 et dont la membrane est dépourvue d'immunoglobuline. Ces cellules s'accumulent dans la rate où elles représentent 20 à 22% des cellules nucléées (64). Elles pourraient être des préthymocytes déterminés pour la lignée T mais qui ont besoin du micro-environnement thymique pour se développer.

En dépit de ce statut immunitaire la souris nude présente une résistance normale au développement de tumeurs spontanées ou induites. En effet, l'activité des cellules tueuses non induites (Natural Killer Cells) est plus importante chez la souris nude, quelque soit sa race, que chez la souris normale de même souche (50). Ces cellules lysent spontanément des cellules tumorales, certaines cellules normales en provenance de la moëlle osseuse et une partie des très jeunes thymocytes (47). Elles dérivent de la moëlle osseuse et leur degré d'activité varie en fonction de la race. Abondantes dans la rate et le sang, ces cellules ont l'aspect de petits lymphocytes, mais ne sont ni des cellules B, ni des macrophages, ni des cellules T (51), quoique l'on puisse détecter une faible quantité d'antigène Thy_1 sur leur membrane et donc les assimiler à des préthymocytes. L'activité importante de ces cellules NK expliquerait pourquoi les tumeurs se développent de façon particulière chez la souris nude : certaines se développent mal parce qu'elles y sont sensibles; d'autres croissent bien parce qu'elles leur résistent (50).

En 1969 RYGAARD et POVLSEN ont montré que des tumeurs humaines pouvaient être greffées chez la souris nude. Depuis la variété de tumeurs transplantées avec succès est impressionnante (12, 40, 117). Après avoir été regreffées à intervalles réguliers pendant plusieurs années, elles conservent leurs principales caractéristiques histologiques et leur caryotype (humain) reste stable. La souris nude peut donc servir pour tester de nouvelles thérapeutiques adaptées spécifiquement aux différents cancers humains (40, 67, 83, 98). Ceci explique une partie de son succès de par le monde.

2. LA TRANSPLANTATION SUR SOURIS ATHYMIQUES.

2.1. LA TUMEUR A L'ORIGINE DU MODELE EXPERIMENTAL

Le malade était atteint d'un mélanome malin, cutané et achromique, de type SSM de 1,61 mm d'épaisseur selon BRESLOW et de niveau IV selon CLARK, de la paroi thoracique antérieure droite. Ce mélanome a bénéficié immédiatement d'une exérèse et, un an après d'un curage suivi d'un traitement à l'interféron-α et d'irradiations. La tumeur transplantée correspond à la récidive ganglionnaire, de ce mélanome malin, au niveau de

la région axillaire, découverte un mois après les derniers traitements. Le bilan d'extension montrait l'existance concomittente d'une métastase pulmonaire, de multiples localisations hépatiques, et des lésions osseuses diffuses. Le malade a été traité par de l'interleukine-2 et de la dacarbazine, suivi d'une corticothérapie. Un traitement à la fotémustine avait été envisagé, mais le malade est décèdé rapidement, un mois après le début des traitements. Le ganglion prélevé a été transplanté sur souris athymiques, permettant d'étudier les effets des chimiothérapies sur ce tissu tumoral, qui n'avait pas été en contact avec la chimiothérapie car l'exérèse avait eu lieu avant l'administration de celle-ci. Sur le plan histologique, le tissu tumoral prélevé montre une prolifération mélanocytaire maligne faite de cellules arrondies, globuleuses, très irrégulièrement pigmentées avec des noyaux fortement nucléolés mais pauvres en figures mitotiques. Les marqueurs déterminés (CD45-; protéine S100+; KL1+) confirment le diagnostic. Ces caractéristiques morphologiques se trouvent conservées dans la xénogreffe au cours des passages successifs.

2.2. LA TECHNIQUE DE GREFFE.

Après une légère anesthésie à l'éther, le fragment tumoral a été greffé par voie sous-cutanée, dans la région sous-scapulaire, sur des femelles âgées de 6 semaines.

Des mesures tridimentionnelles permettent de calculer le volume ($V = \pi/6 \times$ Longueur x largeur x hauteur) et de suivre la croissance. Au sacrifice des animaux les tumeurs sont à la fois mesurées et pesées. Ceci permet de vérifier la validité des mesures effectuées pour calculer le volume. La différence entre le volume calculé et le poids tumoral n'excède généralement pas 5%.

3. ETUDE DE LA CHIMIOSENSIBILITE DE LA TUMEUR TRANSPLANTEE.

Le traitement choisi correspond à un de ceux utilisés en thérapeutique humaine. Il s'agit de la fotémustine à 100 mg/kg, J_1 et J_8 (MUPHORAN) associé à la dacarbazine à 250 mg/kg, J_{15}, J_{16}, J_{17} et J_{18} (DETICENE), qui

semble être l'un des plus efficaces sur le mélanome malin récidivant (1, 24, 71).

3.1. DETERMINATION DES DOSES MAXIMALES DE FOTEMUSTINE ET DE DACARBAZINE TOLEREES PAR L'ANIMAL.

Dans une première expérimentation, les doses maximales de fotémustine et de dacarbazine tolérées par les animaux et les meilleurs schémas d'administration ont été étudiés séparément. Les doses utilisées et les schémas d'administration pour chaque cytostatique utilisé sont répertoriées dans le tableau 3.1..

La croissance de la tumeur étant rapide (21 jours en moyenne entre deux passages, avec un temps de latence de 5 jours et un temps de doublement du volume tumoral de 4 à 5 jours). Les traitements ont tous débutés 6 jours après la greffe. Tous les animaux ont été sacrifiés 3 semaines après la transplantation.

TABLEAU 3.1. : SCHEMA D'ADMINISTRATION DES DOSES MAXIMALES, DE FOTEMUSTINE ET DE DACARBAZINE, TOLERÉES PAR L'ANIMAL.

LOTS	CYTOSTATIQUE	TRAITEMENT	JOURS
A	Témoins	Solvant : eau pour préparations injectables	J6/J7/J8/J9
B	Dose unique de fotémustine	50 mg/kg	J6
C	Doses fractionnées de fotémustine	12,5 mg/kg/j	J6/J7/J8/J9
D	Dose unique de dacarbazine	80 mg/kg	J6
E	Doses fractionnées de dacarbazine	20 mg/kg/j	J6/J7/J8/J9

3.2. DETERMINATION DE LA DOSE DE FOTEMUSTINE.

La dose unique de fotémustine (50 mg/kg) s'étant montrée toxique, une seconde expérimentation a été programmée pour mieux déterminer les doses compatibles avec la survie des animaux et l'association médicamenteuse. La durée de l'expérimentation a été de 21 jours.

TABLEAU 3.2. :
DETERMINATION DE LA DOSE DE FOTEMUSTINE.

LOTS	CYTOSTATIQUE	TRAITEMENT	JOURS
F	**Témoins**	Solvant : eau pour préparations injectables.	J6/J14
G	Fotémustine	20 mg/kg/j	J6/J14
H	Fotémustine	35 mg/kg	J6
I	**Fotémustine**	35 mg/kg 20 mg/kg	J6 J14

3.3. ETUDE DE L'ASSOCIATION : FOTEMUSTINE/DACABAZINE.

Compte-tenu de l'évolution rapide de la tumeur transplantée le schéma d'administration adopté ne peut suivre aveuglement celui pratiqué en clinique humaine, néanmoins le nombre d'injections pour chaque cytostatique est le même. Tous les animaux ont été suivis 25 jours après la greffe puis sacrifiés.

TABLEAU 3.3. :
ETUDE DE L'ASSOCIATION : FOTEMUSTINE ET DACARBAZINE.

LOTS	CYTOSTATIQUE	TRAITEMENT	JOURS
J	**Témoins**	Solvant : eau pour préparations injectables	J6/J10/J14/ J15/J16/J17
K	Fotémustine Dacarbazine	20 mg/kg/j 20 mg/kg/j	J6/J10 J14/J15/J16/J17

4. RESULTATS.

La chimiosensibilité du mélanome malin récidivant a été étudiée au travers de l'association fotémustine-dacarbazine. Trois étapes ont été nécessaires. Les résultats présentés ci-dessous correspondent, à l'analyse des prélèvements tumoraux, au moment du sacrifice des animaux, soit 3 semaines après la greffe.

4.1. DETERMINATION DES DOSES MAXIMALES.

LOTS	CYTOSTATIQUES	ANIMAUX VIVANTS/ TRAITES	TRAITEMENTS	POIDS TUMORAL MOYEN en g	TEST DE STUDENT
A	témoins : eau pour préparations injectables	9/9	$J_6/J_7/J_8/J_9$	8,04 ± 0,9	
B	Dose unique de fotémustine	1/9	50 mg/kg à J_6	0,32	
C	Doses fractionnées de fotémustine	7/7	12,5 mg/kg/j à $J_6/J_7/J_8/J_9$	5,7 ±1,05	0,2>P>0,1
D	Dose unique de dacarbazine	8/8	80 mg/kg à J_6	6,85 ±0,8	0,3>P>0,2
E	Doses fractionnées de dacarbazine	7/7	20 mg/kg/j à $J_6/J_7/J_8/J_9$	6,05 ±1,3	0,3>P>0,2

Dans le lot B (fotémustine en dose unique à 50 mg/kg) une toxicité retardée, entrainant une perte de poids rapide, a été observée. Les decès ont commencé 4 jours après l'administration du médicament. Dans ce lot, 21 jours après la greffe, on ne trouvait qu'un seul survivant. Une fonte importante du tissu tumoral, avant la mort, a pu être néanmoins constatée pour tous les

animaux traités. La fotémustine, employée à cette dose, semble correspondre au seuil de toxicité pour les souris nudes. De plus, la lyse tumorale rapide, peut être à l'origine du décès des animaux, en provoquant des désordres métaboliques importants.

Aucune différence significative de réduction du poids tumoral, entre les témoins (lot A) et les lots traités à des doses fractionnées de fotémustine (lot C) ainsi qu'à des doses uniques de dacarbazine (lots D et E), n'a été observée.

4.2. DETERMINATION DE LA DOSE DE FOTEMUSTINE.

LOTS	CYTOSTATIQUES	ANIMAUX VIVANTS/ TRAITES	TRAITEMENTS	POIDS TUMORAL MOYEN en g	TEST DE STUDENT
F	**témoins** : eau pour préparations injectables	13/13	à J_6 et J_{14}	12,95 ±0,7	
G	**fotémustine**	10/10	20 mg/kg/j à J_6 et J_{14}	8,41 ±1,05	0,001<P P< 0,01
H	**fotémustine**	6/7	35 mg/kg à J_6	4,62 ±1,6	P<0,001
I	**fotémustine**	5/6	35 mg/kg à J_6 20 mg/kg à J_{14}	7,58 ±1,4	0,001<P P<0,01

Deux injections de fotémustine à 20 mg/kg (G) à 8 jours d'intervalle sont bien supportées; l'état général est bon, la perte de poids peu importante (en moyenne 2 g) et l'inhibition de la croissance tumorale par rapport au groupe témoin (F) est significative (0,001<P<0,01).

En revanche, avec l'utilisation d'une première dose plus élevée (35 mg/kg), on retrouve la toxicité retardée, effet observé au cours de la première expérimentation (fotémustine en dose unique à 50 mg/kg). En effet, 2 animaux (1 dans le lot H et 1 dans le lot I) meurent 5 jours après la première injection. Ce groupe est alors scindé en deux. Les 6 animaux sur lesquels a lieu la plus grosse fonte tumorale (H) ne reçoivent pas de traitement complémentaire. Les 5 autres dont les tumeurs semblent moins touchées reçoivent une seconde injection à concentration plus faible.

Au sacrifice, l'inhibition de la croissance tumorale est significative par rapport au groupe de témoins. Ceci permet de souligner la nécèssité d'utiliser une première dose d'attaque la plus élevée possible. Cette observation peut également être faite en clinique humaine.

4.3. ASSOCIATION FOTEMUSTINE ET DACARBAZINE.

LOTS	CYTOSTATIQUES	ANIMAUX VIVANTS/ TRAITES	TRAITEMENTS	POIDS TUMORAL MOYEN en g	TEST DE STUDENT
J	**témoins :** eau pour préparations injectables	10/10	J6/J10/J14/ J15/J16/J17	13,07 ± 1,0	
K	**fotémustine** **dacarbazine**	11/11	20 mg/kg/j à J6/J10 20 mg/kg/j à J14/J15/J16/J17	7,97 ± 1,0	0,01>P> 0,001

On retrouve une inhibition tumorale voisine de celle obtenue avec la même dose de fotémustine employée seule. Ce modèle expérimental semble donc peu répondre à la dacarbazine.

Bien que la réduction du poids tumoral moyen obtenu soit significatif, il faut cependant noter qu'elle reste, bien évidement, transitoire. En effet du tissu tumoral, résiduel, prélevé à la suite de cette association, a été regreffé sur souris athymiques. Après une latence, d'une quinzaine de jours, la croissance tumorale a peu à peu repris. Néanmoins plusieurs passages ont été nécessaires avant de pouvoir effectuer une analyse cytogénétique, c'est-à-dire d'avoir des métaphases interprétables.

Pour réaliser une telle étude, nous avons eu besoin d'une centaine de souris athymiques. Ceci rend bien compte du travail nécessaire à la réalisation de telles études. Elles apportent des résultats très interessants, notamment sur les effets de drogues sur une tumeur humaine et, elles permettant également des études plus poussées, de ces tissus avant et après divers traitements, par des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire, entre autres.

IV- ETUDE CYTOGENETIQUE

IV- ETUDE CYTOGENETIQUE.

Comme pour beaucoup de tumeurs solides, les premières analyses cytogénétiques concernant le mélanome malin furent d'abord faites à partir de quelques lignées cellulaires. Ce n'est que depuis une dizaine d'années que la mise au point de techniques plus performantes a permis d'étudier ce type de tumeurs soit directement à partir de pièces d'exérèse* soit après quelques jours de culture cellulaire de ce tissu tumoral.

1. ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES MELANOMES.

Les anomalies, les plus souvent répertoriées, parmi plus de cent cas de mélanomes malins analysés, concernent à la fois le nombre et la structure de nombreux chromosomes, sont celles touchant les chromosomes 1, 6, 7 et 9. Par contre, les chromosomes 2, 3, 10 et 11 paraissent moins impliqués (2, 6, 7, 29, 61, 97).

Les réarrangements portant sur le chromosome 1 sont détectés dans approximativement 82% des cas. La délétion totale ou partielle du bras court (1p) est rencontrée dans 60% des mélanomes métastasés (31).

Les réarrangements du chromosome 6 touchent l'ensemble de la structure. En ce qui concerne le bras long (6q), les délétions peuvent être partielles (6q21-23 ou 6q11-13), voire totales aboutissant alors à la formation d'un isochromosome du bras court (i(6)p). Ceci permet d'envisager la présence, sur le bras long, d'un éventuel gène impliqué dans la régulation négative de la croissance tumorale (108). En effet, TRENT *et coll.* ont montré que l'introduction d'un chromosome 6 normal dans des cellules de mélanome malin, portant une délétion du bras long, entraine la disparition du phenotype malin (107), témoignant de la présence d'un facteur de suppression tumorale sur ce chromosome.

Au niveau du chromosome 7, la polyploïdie et/ou la perte totale du bras court entrainant l'apparition d'un isochromosome du bras long (i(7)q), ont été observés dans presque 50% des cas. L'augmentation du nombre de copies du chromosome 7 est souvent liée à une éventuelle surexpression d'un oncogène contrôlant le récepteur de l'E.G.F. (Epidermal Growth Factor) (57).

Il existe une corrélation inverse entre la survie clinique et la présence d'altérations structurales sur le chromosome 7 (108bis).

Enfin des remaniements du chromosome 9 sont notés dans environ 46% des mélanomes analysés. Ils peuvent être localisés dans la région 9p24-q12. Des délétions du bras court pourraient être considérées comme des évènements précoces dans l'évolution tumorale vers la dissémination métastatique (2). La région 9p21 est localisée à proximité du gène codant pour l'interféron-α. La même hypothèse a été émise à propos des anomalies moins fréquentes (26%), observées au niveau du bras long du chromosome 10 (10q11-q26). Enfin, il existe également une corrélation inverse entre la survie clinique et la présence d'altérations structurales sur le chromosome 11. De plus, la détermination de marqueurs génétiques des syndrômes de *nævi* dysplasiques laisse suspecter que les gènes candidats, à cette susceptibilité, seraient localisés sur les chromosomes 1 et 9 (12bis).

2. ANALYSE CYTOGENETIQUE.

Le tissu tumoral coupé en fragments a été dilacéré à la toile à bluter, filtré sur gaze stérile, lavé au RPMI et centrifugé trois fois à 1.500 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot cellulaire obtenu a été mis en culture dans un milieu utilisé pour les cellules des liquides amniotiques (RPMI; Sérum de Veau Foetal; ultroser G; antibiotiques; glutamine). Deux jours plus tard, une solution de colchicine (concentration 0,01 µg/ml) a été ajoutée au milieu, pendant 14 heures environ pour bloquer les cellules en métaphase.

Après lavage avec du RPMI seul, les cellules ont été détachées par addition de trypsine (0,025%), puis centrifugées. Elles ont été remises en suspension dans un milieu hypotonique (chlorure de potassium 0,075M) pendant 30 minutes. Une série de 3 centrifugations suivies de 3 fixations (méthanol 3 volumes/acide acétique 1 volume) ont été pratiquées. Des étalements sur lames sèches ou humides ont été traités par dénaturation thermique, colorés au Giemsa puis observés au microscope. La technique de dénaturation thermique ménagée dans un bain de dihydrogénophosphate de sodium monohydraté met en évidence les bandes "R" des chromosomes (95).

En final, les métaphases rencontrées sur les préparations, ont été photographiées au microscope, à immersion, pour permettre l'analyse des caryotypes.

3. MATERIEL.

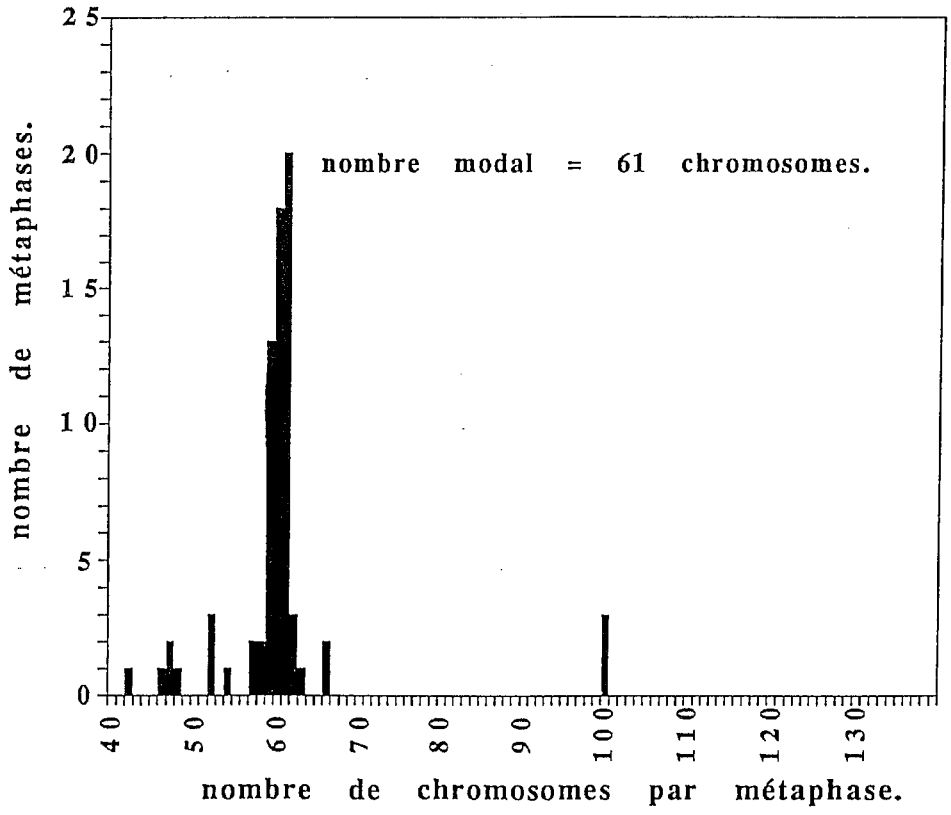
L'analyse cytogénétique a porté tout d'abord sur le modèle expérimental avant tout traitement (lot A). Puis, l'obtention de caryotypes immédiatement après traitements s'étant avérée difficile, seuls les lots G (fotémustine à 20 mg/kg x2) et K (association de la fotémustine à 20 mg/kg x2 avec la dacarbazine à 20 mg/kg x4) ont été étudiés. De plus, le tissu tumoral obtenu, après l'association médicamenteuse, était trop abimé pour obtenir des métaphases analysables. Il a donc été nécessaire de tenter une transplantation, d'attendre une reprise de la croissance puis de faire cinq passages supplémentaires avant de pouvoir étudier le caryotype.

4. RESULTATS.

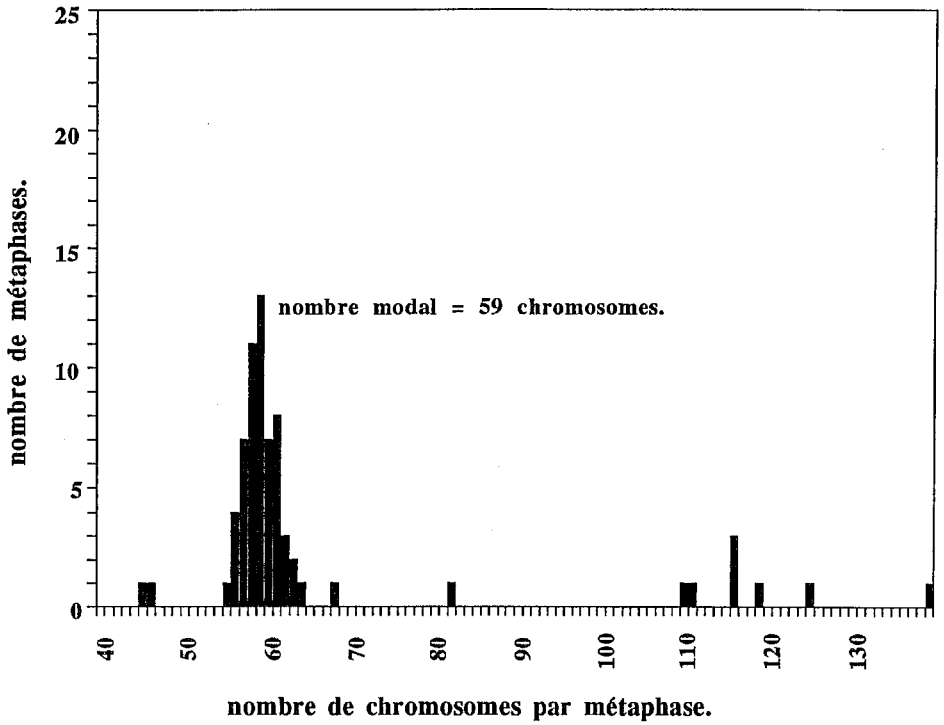
4.1. ETUDE COMPARATIVE DES ANOMALIES DE NOMBRE.

L'analyse du nombre modal, représentant le plus grand nombre de métaphases possédant le même nombre de chromosomes, dans les différents lots choisis (lots A, G et K) a donné les résultats suivants :

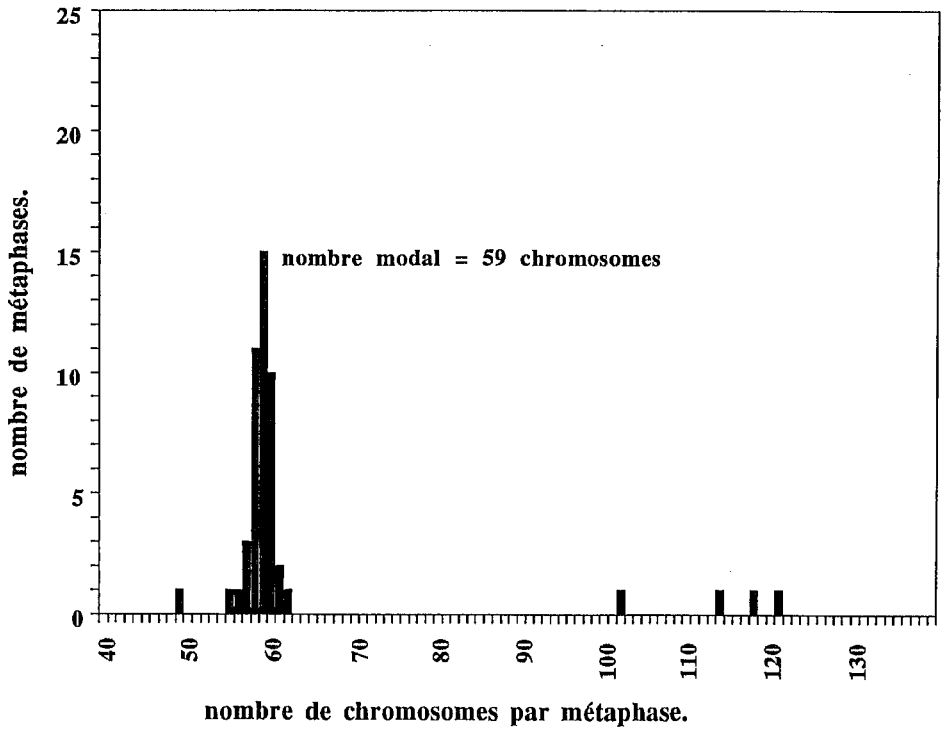
Détermination du nombre modal avant traitement (73 métaphases).



Détermination du nombre modal après traitement à la fotémustine (20 mg/kg x2) (69 métaphases).



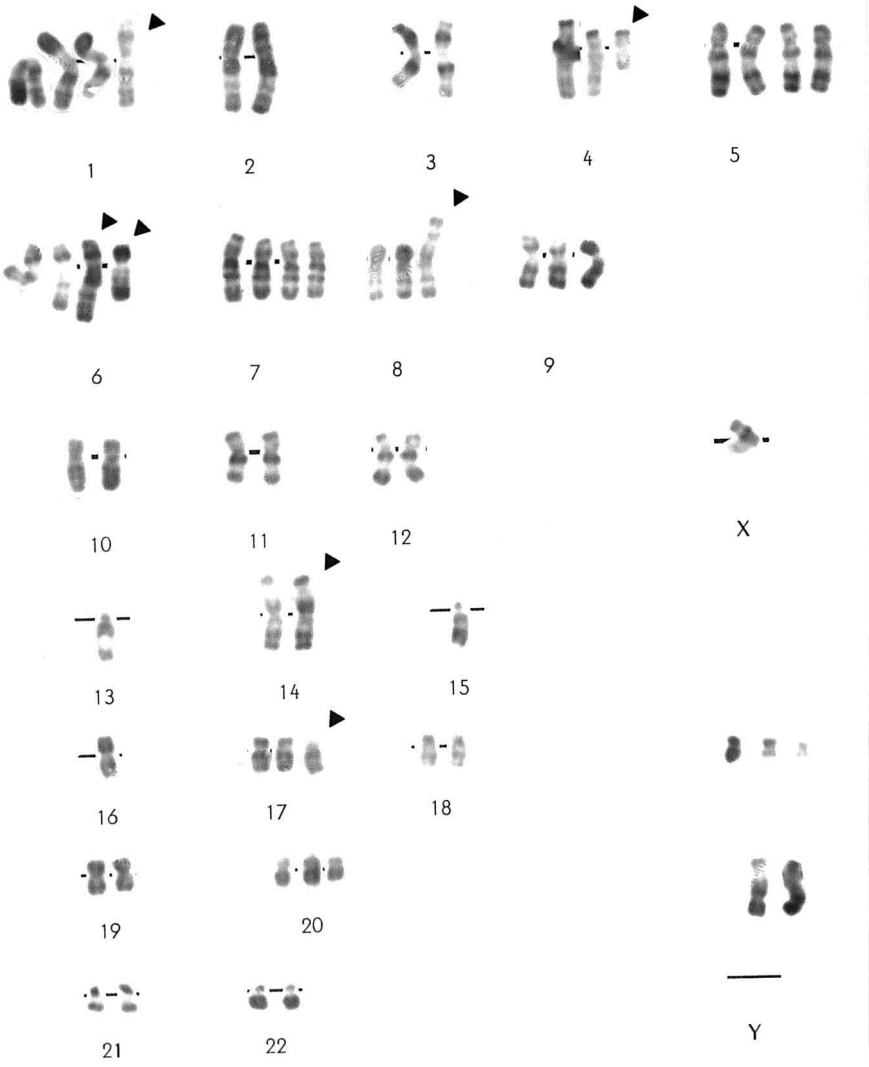
Détermination du nombre modal après traitement à la fotémustine (20 mg/kg x2) et à la dacarbazine (20 mg/kg x4) (49 métaphases).



Les 3 histogrammes présentés n'appellent que peu de commentaires. En effet ils mettent en évidence une grande stabilité avec, dans les lots traités, une légère tendance à la polyploïdisation.

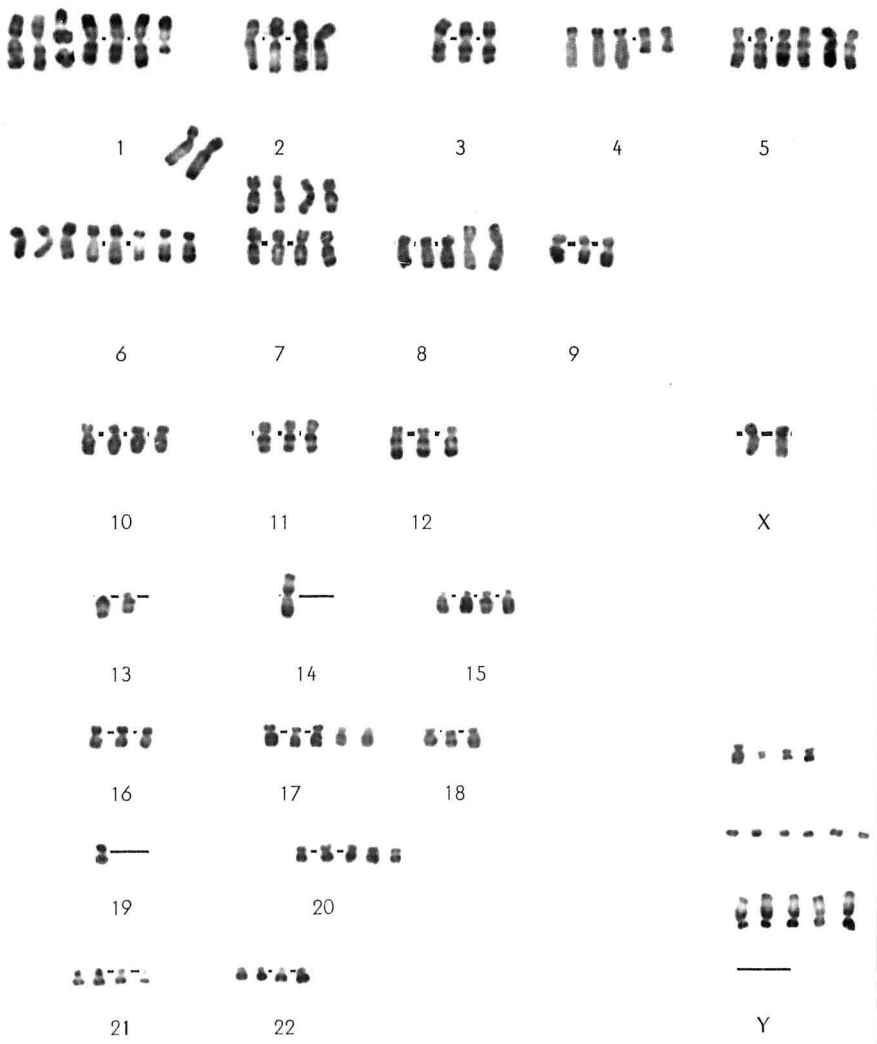
4.2. ETUDE COMPARATIVE DES ANOMALIES DE STRUCTURE

4.2.1. CARYOTYPE AVANT TRAITEMENT.



Le caryotype présenté est le suivant : 60, X, -Y, +del(1)(q42), +der(1)t(1;?)(p13;?), +4, i(4)p, +5, +5, +der(6)t(2;6)(q10;p10), +der(6), +7, +7, +8, i(8)q, +9, -13, -14, -14, +t(13;14)(p10;p10)x2, -15, -16, +17, del(17)p, +20, +5marqueurs {del : délétion; der : dérivé; i : isochromosome; t : translocation; p : bras court; q : bras long}

4.2.2. CHROMOSOMES METAPHASIQUES APRES TRAITEMENT PAR LA FOTEMUSTINE.

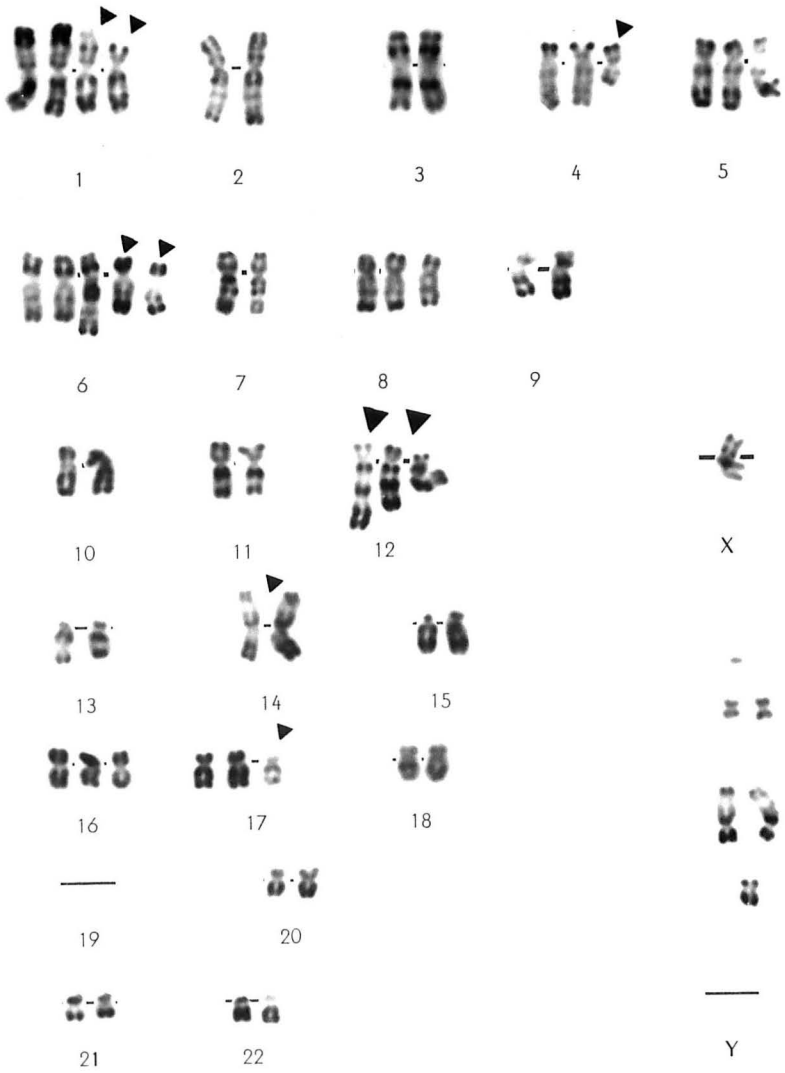


Ce caryotype correspond à un exemple de polyploïdisation rencontré dans l'analyse de ce lot (G). Les anomalies fondamentales du modèle expérimental avant traitement (lot A) se retrouvent conservées.

Cependant l'action particulière du cytostatique se trouve mise en évidence par la présence de nombreux fragments chromosomiques (double-minutes).

Exemple de double-minutes.

4.2.3. CARYOTYPE APRES TRAITEMENT PAR L'ASSOCIATION FOTEMUSTINE/DACARBAZINE



Comme pour le lot G traité à la fotémustine seule, on retrouve, cinq passages après l'association médicamenteuse, les principales anomalies rencontrées dans le caryotype initial avant tout traitement (délétions et translocations du chromosome 1, i(4)p, délétions du chromosome 6, t(13;14)x2, del(13)q, del(17)p, et quelques marqueurs). Cependant des évènements cytogénétiques particuliers à ce tissu tumoral et liés à l'association sont observés. On retrouve, ci et là, également des fragments chromosomiques sous la forme de double-minutes.

5. CONCLUSION.

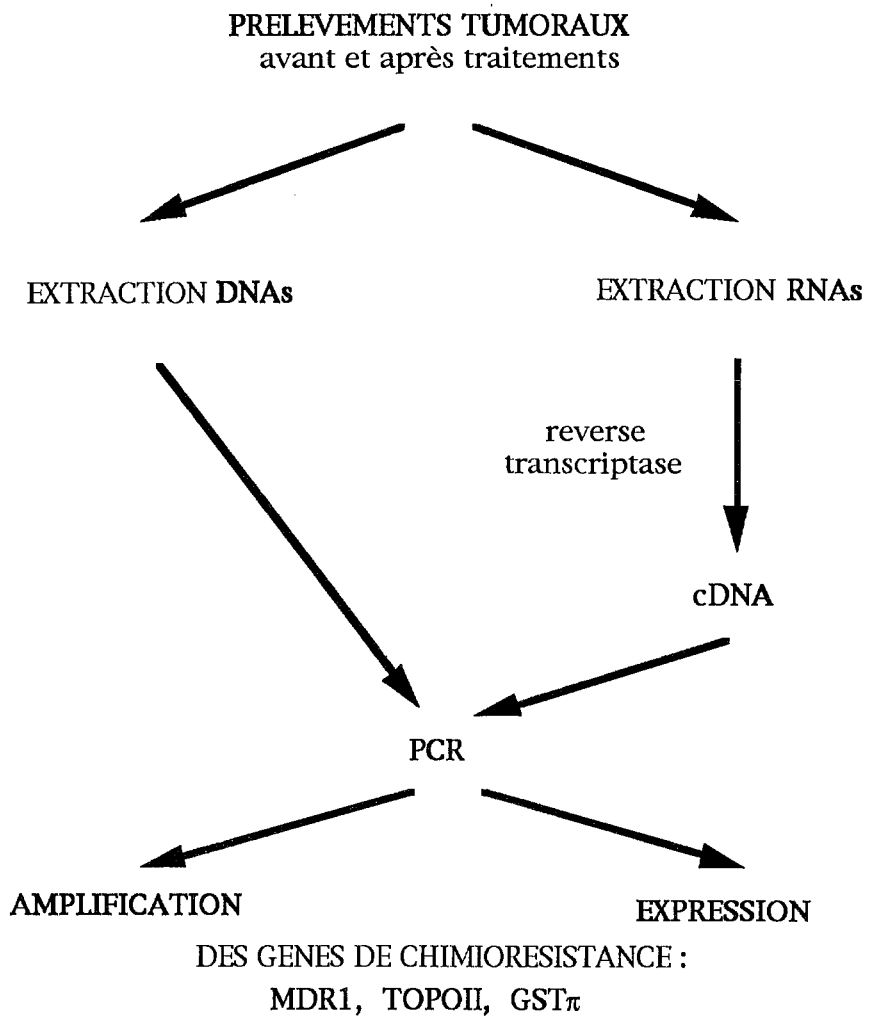
Après l'analyse de plus de 200 métaphases, nous pouvons constater que le caryotype du modèle expérimental présente bien quelques unes des anomalies rencontrées lors d'analyses cytogénétiques de mélanomes malins disséminés (translocations et délétions des chromosomes 1 et 6). La perte de l'Y est un évènement fréquent dans les tumeurs solides. Quoiqu'il en soit, l'analyse cytogénétique de ce modèle, montre un caryotype profondément remanié par une longue suite d'altérations génomiques. Celles-ci entrainent des activations de gènes promoteurs de la croissance tumorale et, après délétions ou mutations ponctuelles, des pertes de la fonction suppressive des "antioncogènes". Dans le cas du mélanome malin non traité, deux délétions de ce type sont présentes. Il s'agit de la délétion du bras court d'un chromosome 17, porteur du gène codant pour la P53 et de la délétion partielle du bras long d'un chromosome 13, porteur du gène codant pour le rétinoblastome. Ces deux altérations sont d'ailleurs considérées comme des évènements tardifs dans l'évolution tumorale.

Quel que soit le type de traitements utilisés (fotémustine seule ou en association), on observe une relative stabilité du nombre modal et une bonne conservation des principales anomalies caractérisant le modèle expérimental. Mais l'effet clastique* des médicaments se fait néammoins sentir. Des cassures chromosomiques sont, en effet, visibles ça et là dans les métaphases, et la présence plus ou moins importante, de double-minutes marque bien le phénomène.

V- BIOLOGIE MOLECULAIRE

V- BIOLOGIE MOLECULAIRE.

Différents échantillons du mélanome malin humain ont été prélévés, avant ou après traitements chimiothérapiques, afin de permettre l'étude de quelques gènes de chimiorésistance : MDR1, TOPO II, GSTπ. Les méthodes de Biologie Moléculaire utilisées, présentées dans le Schéma 5.1., nous permettrons de mettre en évidence une éventuelle amplification et/ou expression génique.



SCHEMA 5.1: RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETAPES DE L'ETUDE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. MATERIEL.

Des échantillons, de la récidive d'un mélanome malin humain, prélevés, avant et après les différents traitements, chez la souris nude (Tableau 5.1.), ont permis d'étudier les effets de la chimiothérapie sur l'amplification et/ou l'expression de trois gènes de chimiorésistance.

TABLEAU 5.1:
PRELEVEMENTS OBTENUS SUITE AUX DIFFÉRENTS TRAITEMENTS

N°	TRAITEMENTS	DNA	RNA
	DETERMINATION DES DOSES MAXIMALES TOLEREES		
A	Solvant : eau pour préparations injectables à J_6, J_7, J_8, J_9	+	-
B	Dose unique de fotémustine : 50 mg/kg à J_6	-	-
C	Doses fractionnées de fotémustine : 12,5 mg/kg/j à J_6, J_7, J_8, J_9	+	-
D	Dose unique de dacarbazine : 80 mg/kg à J_6	+	-
E	Doses fractionnées de dacarbazine : 20 mg/kg/j à J_6, J_7, J_8, J_9	+	-
	DETERMINATION DE LA DOSE DE FOTEMUSTINE		
F	Solvant: eau pour préparations injectables à J_6, J_{14}	+	+
G	fotémustine : 20 mg/kg à J_6, J_{14}	+	+
H	fotémustine : 35 mg/kg à J_6	+	+
I	fotémustine : 35 mg/kg à J_6 et 20 mg/kg à J_{14}	+	+
	ASSOCIATION FOTEMUSTINE/DACARBAZINE		
K	fotémustine: 20 mg/kg/j à J_6, J_{10} dacarbazine: 20 mg/kg/j à J_{14}, J_{15}, J_{16}, J_{17}	+	+

J_6 jusqu'à J_{17} : correspondent aux jours d'injection des différents traitements par rapport à J_0 le jour de la greffe.

(+) : extraction du DNA ou du RNA possible.
(-) : impossibilité d'extraire le DNA ou le RNA par manque de matériel.

N.B. : Pour l'échantillon B (dose unique de fotémustine à 50 mg/kg), une toxicité retardée, entrainant une fonte importante du tissu tumoral, suivie par la mort de 8 animaux sur 9, ont été observées. Cette dose semble donc correspondre au seuil de toxicité de la fotémustine et par conséquent ni le DNA, ni le RNA n'ont pu être extraits car la masse tumorale, correspondant au seul survivant, était insuffisante.

Ce travail s'est limité à l'étude des trois gènes de chimiorésistance les plus couramment rencontrés : MDR1, GSTπ et TOPO II. Il est à rappeler que dans le cadre de la chimiorésistance acquise avec la dacarbazine et la fotémustine, utilisés pour traité le mélanome, seul GSTπ devrait être concerné. Les prélévements obtenus ont été conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation pour les extractions.

2. METHODES.

2.1. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES.

2.1.1. EXTRACTION DES DNAs (3).

L'échantillon de tissu tumoral est d'abord mis en contact avec une solution contenant de la protéinase K et du SDS, puis incubé jusqu'à ce que la majorité des protéines cellulaires soient hydrolysées et dénaturées. Une déprotéinisation est obtenue grâce à des extractions successives par un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Le culot de DNAs, précipité par de l'éthanol, est séché et resuspendu dans un tampon.

a- Lyse et digestion du tissu :

Le tissu tumoral, préalablement conservé en aliquots dans de l'azote liquide, est immédiatement plongé dans le tampon de digestion, à raison de 1,25 ml pour 100 mg de tissus, homogénéisé doucement et incubé pendant 12 à 18 heures, sous agitation continue, à 50°C, afin d'obtenir la lyse cellulaire et l'hydrolyse des protéines.

Le tampon de digestion est constitué de : EDTA 25 mM, pH 8; SDS 0,5%; NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8; protéinase K 0,1 mg/ml.

b- Extraction des acides nucléiques :

La solution, précédemment obtenue, est extraite par un volume égal du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1), afin d'éliminer les protéines. La phase aqueuse est récupérée après une centrifugation de 10 minutes à 1.700 g à température ambiante dans un rotor à "nacelles mobiles".

c- Purification des DNAs :

Les DNAs de la phase aqueuse, sont précipités par 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et 2 volume d'éthanol absolu à -20°C et récupérés par une centrifugation à 4°C de 30 minutes à 10.000 g. La "pelote" de DNAs est rincée par de l'éthanol à 70%, centrifugée à 4°C pendant 15 minutes à 10.000 g, séchée et solubilisée dans un tampon TE pH 8 à 65°C pendant plusieurs heures. Les traces de RNAs sont éliminées par un traitement des échantillons à la RNase (SDS 0,1%; 1 µg/ml de RNase dépourvue de DNase; 1 heure à 37°C) suivie d'une extraction organique et d'une précipitation à l'éthanol, comme précédemment. Les préparations de DNAs sont aliquotées et conservées dans de l'éthanol à -20°C.

Le TE pH8 est constitué de : Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH8.

d- Préparation des DNAs avant PCR :

Les DNAs sont précipités par 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et 2 volume d'éthanol absolu à -20°C, puis récupérés par une centrifugation à 4°C de 30 minutes à 10.000 g. La "pelote" de DNAs est rincée par de l'éthanol à 70% centrifugée à 4°C de 15 minutes à 10.000 g (ceci deux fois afin d'éliminer toutes trâces de sels), séchée et solubilisée dans de l'eau stérile pour obtenir une concentration de 1 mg/ml.

2.1.2. EXTRACTION DES RNAs.

Tout travail avec des RNAs nécessite un matériel dépourvu de RNases. Donc, le matériel et les produits, pouvant le supporter, sont autoclavés à 120°C pendant 30 minutes, les solutions sont traitées par du DEPC (inhibiteur de RNases) à raison de 1 ml par litre, le port de gants est obligatoire, etc....

Ce protocole (22) est utilisé pour isoler les RNAs provenant de tissus ou de cultures cellulaires et correspond à 100 mg de tissus tumoral au départ.

a- lyse et digestion du tissu :

L'échantillon, préalablement conservé dans l'azote liquide, est broyé avec 1 ml de solution D, jusqu'à obtention d'un mélange visqueux.

La solution dénaturante (solution D) contient : thiocyanate de guanidium 4 M; citrate de sodium 25 mM, pH 7; sarcosyl 0,5%; 2-mercapto-éthanol 0,1 M. Afin de minimiser les manipulations du thiocyanate de guadinium, une solution mère est préparée en mélangeant et en dissolvant à 65°C : 250 g de thiocyanate de guanidium; 17,6 ml de citrate de sodium 0,75 M, pH 7; 26,4 ml de sarcosyl à 10%; 293 ml d'eau. Cette solution se conserve 3 mois à température ambiante. La solution D est obtenue en ajoutant 0,36 ml de 2-mercaptoéthanol à 50 ml de solution mère et se conserve 1 mois à température ambiante.

b- extraction des acides nucléiques :

A la préparation, obtenue précédemment, est ajouté, en mélangeant soigneusement par inversion entre chaque adjonction de réactifs : 0,1 ml d'acétate de sodium 0,2 M, pH 4; 1 ml de phénol; 0,2 ml du mélange chloroforme/alcool isoamylique (49:1). La suspension finale est mélangée vigoureusement pendant 10 secondes et refroidie dans la glace pendant 15 minutes. Après une centrifugation à 10.000 g pendant 20 minutes à 4°C, les RNAs sont présents dans la phase aqueuse, les DNAs et les protéines sont à l'interphase et dans la phase phénolique.

c- purification des RNAs :

La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube, mélangée avec 1 ml d'isopropanol et mise à -20°C pendant au moins 1 heure afin de précipiter les RNAs. Après une centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes à 4°C, la pelote de RNAs obtenue est dissoute dans 0,3 ml de la solution D et précipitée par 1 volume d'isopropanol à -20°C pendant 1 heure. Une autre centrifugation de 10 minutes à 4°C est effectuée, puis la pelote de RNAs est resuspendue dans de l'éthanol à 70%, sédimentée, séchée sous vide pendant 15 minutes et dissoute dans 50 µl de SDS 0.5% à 65°C pendant 10 minutes, dans de l'eau ou dans de l'EDTA 1mM, pH8, traité avec du DEPC. Les RNAs sont ensuite précipités par du sodium acétate 3M (pH 5,2) pour une concentration finale de 0,3 M et par 2,5 volumes d'éthanol absolu froid pendant 30 minutes dans la glace, centrifugés 15 minutes à 10.000 g à 4°C, lavés par de l'éthanol 70%, recentrifugés brièvement et enfin séchés à l'air, puis stockés à -80°C dans 3 volumes d'éthanol.

d- préparation des RNAs avant RT-PCR :

Pour pratiquer la technique de reverse transcriptase sur les RNAs et la PCR sur les cDNA ainsi obtenus, les RNAs devront être à nouveau précipités par la méthode décrite ci-dessus et dissouts dans de l'eau stérile sans DEPC car il inhiberait la PCR. Les RNAs sont aliquotés en fractions de 20 µl, à une concentration de 0,25 µg/µl, afin de minimiser les séries de congélations/décongélations des échantillons, qui seraient néfastes à leur intégrité.

2.1.3. TRANSFORMATION DES RNAs EN cDNA PAR LA TECHNIQUE DE LA REVERSE TRANSCRIPTASE (RT).

Cette technique (44), à partir des RNAs obtenus précédemment, permet d'obtenir les DNAs complémentaires ou cDNA correspondant, plus faciles à manipuler, moins fragiles, servant de matrice pour la technique de PCR, afin de mettre en évidence l'expression des gènes étudiés (21, 103).

a- Synthèse du premier brin :

Un aliquot de RNAs, correspondant à 5 µg, est chauffé dans de l'eau bouillante pendant 30 secondes afin de les dénaturer et de désorganiser leurs structures secondaires, puis refroidi dans la glace. Le volume est ajusté à 70 µl avec de l'eau stérile et ensuite sont ajoutés : 20 µl de tampon RT1; 2 µl d'inhibiteur de RNase à 36 U/µl; 1 µl d'oligo-dT à 5 µg/µl; 2,5 µl de dNTPs à 20 mM; 1 µl de DTT 1 M; 3 à 4 µl de reverse transcriptase à 33 U/µl ou RT. Le mélange est incubé à 42°C pendant 40 minutes, puis chauffé à 70°C pendant 10 minutes pour inactiver la réaction.

Le tampon RT1 est composé de : Tris 0,25 M, pH 8; $MgCl_2$ 30 mM;
KCl 0,25 M.

b-Synthèse du second brin :

Au mélange obtenu précédemment, est ajouté : 320 µl d'eau; 5 µl de DNA polymerase 1 à 5 U/µl; 2 µl de RNase H à 2 U/µl; 80 µl de tampon RT2 et mis à incuber à 15°C pendant 1 heure et à 22°C pendant 1 heure. Puis sont ajoutés 20 µl d'EDTA 0,5M, pH 8, suivie d'une extraction par du phénol, d'une précipitation par de l'éthanol et de l'adjonction de NaCl à 0,5 M, d'acrylamide linéaire à 20 µg/ml et 1 ml d'éthanol absolu, avant de les mettre 10 minutes à -80°C. Une centrifugation de 2 à 3 minutes est effectuée, avant de laver la pelote par de l'éthanol à 70% et de resuspendre les cDNA dans 45 µ l de TE pH 8.

Un aliquot de 3 µl est utilisé pour faire une migration sur un gel à 1% d'agarose dans du TBE afin d'analyser la qualité des cDNA.

Le tampon RT2 est composé de: Tris 0,1 M, pH 7,5; $MgCl_2$ 25 mM;
KCl 0,5 M; BSA 0,25 mg/ml; DTT 50 mM.

2.2. CONTROLE DE QUALITE DES ACIDES NUCLEIQUES.

2.2.1. DNAs ET cDNA.

a- La spectrométrie UV :

Cette technique permet de doser les DNAs : une D.O. à 260 nm égale à 1, correspond à 50 µg de DNAs bicaténaires par ml, pour un trajet optique de 1 cm. Elle renseigne sur le degré de pureté des DNAs grâce à la comparaison des D.O. à 260 et 280 nm. En effet si ceux-ci sont exempts de protéines résiduelles, le rapport $D.O._{260}/D.O._{280}$ doit être voisin de 1,8.

b- L'électrophorèse :

Cette méthode (93) permet d'analyser tant des fragments de DNAs génomiques que des cDNA obtenus à partir des RNAs.

Des aliquots de 5 µl de DNAs, alourdis par 1µl de tampon de dépôt, sont préparés, de même que le gel d'agarose à 1%. Les échantillons sont déposés sur le gel simultanément avec les marqueurs de poids moléculaire, contenant le même tampon de dépôt, afin de déterminer la taille des DNAs analysés (Bst E^R d'APPLIGENE ou 1Kb ladder^R de GIBCO BRL) et sont mis à migrer dans du tampon TBE 1X, à 50 volts pendant 1 heure. Après la migration, le gel est coloré par du bromure d'éthidium à raison de 1 mg/ml pendant 1 minute, puis observé sur un transilluminateur UV (302 nm) et photographié par un film Polaroid^R Type 667.

Un DNA intact migre en une seule bande de haut poids moléculaire, alors qu'un DNA dégradé forme une trainée le long de son trajet de migration.

Le tampon de dépôt est composé de : glycérol 30%; bleu bromophénol 0,25%; xylène cyanol FF 0,25%. La solution stock TBE 10X (tampon de migration) est constituée de : 108 g de Tris base; 35 g d'acide borique; 20 ml d'EDTA 0,5 M, pH8; eau QSP 1 litre. Le gel d'agarose à 1% est préparé en mélangeant : 1 g d'agarose; 10 ml de TBE 10X; eau QSP 100 ml. Chauffer à 60°C, couler le gel et laisser solidifier pendant 30 minutes.

2.2.2. RNAs.

Pour toutes méthodes d'analyses et de quantifications des RNAs les mêmes précautions doivent être prises que lors de leur extraction.

a- La spectrométrie UV :

Cette méthode permet de doser les RNAs : une D.O. à 260 nm égale à 1, correspond à 40 µg de RNA par ml, pour un trajet optique de 1 cm. Elle renseigne sur le degré de pureté des RNAs grâce à la comparaison des D.O. à 260 et 280 nm. En effet si ceux-ci sont exempts de protéines résiduelles, le rapport $D.O._{260}/D.O._{280}$ est voisin de 2.

b- L'électrophorèse (5) :

Les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à 65°C, puis refroidis dans la glace. Après une brève centrifugation pendant 5 secondes, sont ajoutés 2 µl de tampon de dépôt et 1 µl d'une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/ml dilué dans de l'eau traité par du DEPC.

Le gel est soumis à une prémigration de 5 minutes à 5 volts par cm. Les échantillons sont déposés, et la migration du gel se fait dans du tampon de migration 1X à 3 ou 4 volts par cm. Une recirculation constante du tampon est effectuée grâce à une pompe. La fin de l'électrophorèse est obtenue lorsque le bleu de bromophénol atteint 8 cm de migration. Le gel est observé sur un transilluminateur UV (302nm) et photographié par un film Polaroid^R Type 667.

La qualité de la préparation de RNAs totaux est vérifiée grâce à la présence de deux populations de RNAs ribosomaux de 16 et 23 S (Boehringer Mannheim) dans un rapport RNAr 16S/RNAr 23S proche de 2.

Le tampon de migration 5X formaldéhyde est obtenu en dissolvant 20,6 g de MOPS dans 800 ml d'acétate de sodium 50 mM traité par du DEPC. Le pH est ajusté à 7,0 par du NaOH 2 N et 10 ml d'EDTA 0,5 M pH8 traité par du DEPC sont ajoutés.Le volume est ajusté à 1 litre avec de l'eau traitée par du DEPC. La solution est stérilisée en la filtrant sur un filtre Millipore 0,2 micron et elle se conserve à température ambiante à l'abri de la lumière. Le gel est préparé

en mélangeant : 1 g d'agarose; eau qsp 100 ml. Après avoir chauffé le mélange à 60°C, y ajouter 20 ml de tampon de migration 5X et 19 ml de formaldéhyde . Le gel est coulé sous une hotte, et laissé à solidifier pendant au moins 30 minutes. Les échantillons sont préparés en mélangeant dans un tube stérile : 4,5 µl de RNAs (> à 30 µg); 2 µl de tampon 5X; 3,5 µl de formaldéhyde; 10,0 µl de formamide; 2 µl de tampon de dépôt. Le tampon de dépôt est composé de : glycérol 50%; EDTA 1 mM, pH 8,0; bleu de bromophénol 0,25%; cyanol xylène FF 0,25, 2%.

2.3. TECHNIQUE DE PCR (Polymerase Chain Reaction).

2.3.1 PRINCIPE.

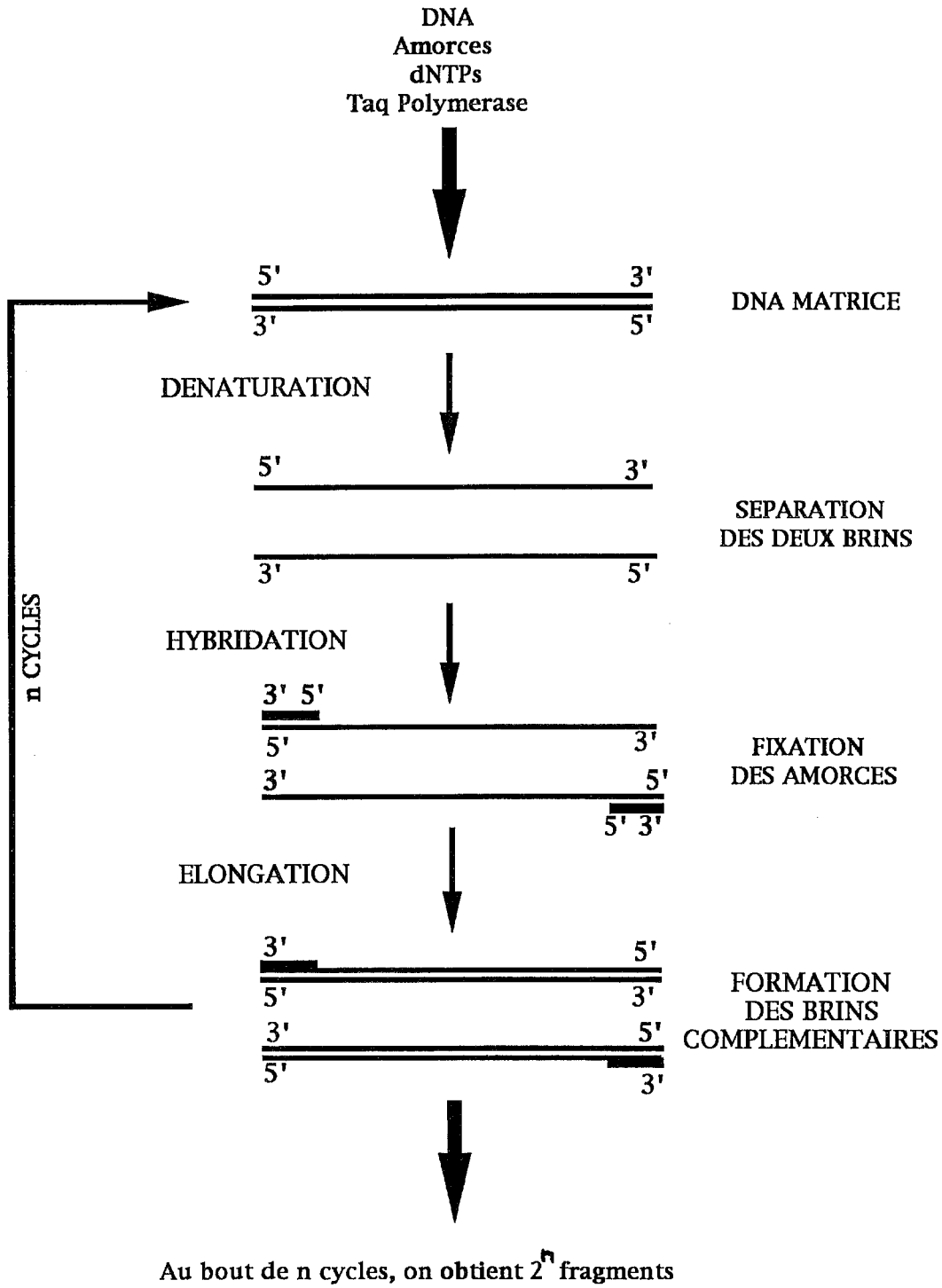
Cette technique permet de synthétiser un nouveau brin de DNA le long d'un autre brin (ou matrice), à partir d'une amorce oligonucléotidique , fixé sur une région complémentaire (Schéma 5.2). La réaction est effectuée plusieurs fois de suite, de manière à amplifier la quantité de matériel. La cléf de cette technique est l'utilisation de la DNA polymérase, qui est thermostable et peut survivre à de nombreux cycles thermiques en ne perdant qu'une partie négligeable de son activité. L'utilisation de cette DNA polymérase de *Thermus aquaticus* ou Taq polymérase (90), et d'un incubateur thermique programmable, nous permet d'éviter les manipulations d'échantillons entre chaque cycles.

2.3.2. DNA MATRICE ET AMORCES.

Les échantillons de DNAs servant de matrice sont, d'une part, les DNAs extraits de nos divers échantillons tumoraux, avant et après traitements, d'autre part, les cDNA obtenus, par la reverse transcriptase, à partir des RNAs extraits de ces mêmes échantillons (Tableau 5.1.) (103).

Nous avons eu a définir la séquence de nos amorces. Pour cela nous avons obtenu, les séquences complètes correspondant à nos gènes, grâce à "l'EMBL data library" (11, 84). Les séquences de ces gènes sont présentées dans l'annexe. En partant de ces séquences connues tant pour le gène (séquence du DNA) que pour ses transcrits (séquence du RNA messager),

nous avons déterminé les séquences à synthétiser qui constitueront nos amorces.



SCHEMA 5.2.: PRINCIPE DE LA PCR

Pour les gènes MDR1 (75, 77) et GSTπ (36, 72) cela a été relativement aisé car les séquences, tant des DNAs que des RNAs, sont parfaitement connues. Les séquences choisies sont présentées dans le Tableau 5.2. Les amorces ont été synthétisés par la firme EUROGENTEC.

Pour le gène TOPO II, nous n'avions que la séquence de DNAs et sa traduction en protéine (80). Grâce à l'utilisation d'un logiciel informatique (Gene Jockey^{R}), nous avons obtenu plusieurs séquences possibles des RNAs messagers (le code génétique étant dégénéré) et, en les comparant à la séquence génétique, nous avons pu déterminer nos amorces qui sont présentées dans le Tableau 5.2.

TABLEAU 5.2.
SEQUENCES UTILISEES COMME AMORCES ET FRAGMENTS OBTENUS APRES PCR.

GENE	SEQUENCE DES PRIMERS	FRAGMENT APRES PCR SUR L'ADN en pb	FRAGMENT APRES PCR SUR L'ADNc en pb
MDR1	5'CTCATTCGAGTAGCGGCTCT3' 3'TTTGACTTGTTATTTTCC5'	771	206
GSTΠ	5'TGCCGCCCTACACCGTGGTC3' 3'TTCTTTCCCCGAAGAACACG5'	1107	331
TOPOII	5'TCACCATGGAAGTGTCACCA3' 3'CGTCTGTACAACTAATACAT5'	989	989
ß-GLOB	5'ACACAACTGTGTTCACTAGC3' 'CAACTTCATCCACGTTCACC5'	110	110

pb : paires de bases

Nous avons également utilisé un contrôle interne (39, 77) correspondant au gène de la ß-globine (ß-GLOB) dont les amorces correspondantes sont représentés dans le Tableau 5.2.

2.3.3. LA REACTION DE PCR.

Nous avons choisi d'utiliser la méthode de double amplification par PCR (20, 35, 36, 63, 77, 103). Cette technique consiste à amplifier, le fragment correspondant au gène étudié, simultanément avec celui d'un gène servant de référence, la ß-globine. L'amplification du gène de la ß-globine nous permet de vérifier si les fragments, des gènes étudiés, ont bien été amplifiés, et d'autre part, d'effectuer une évaluation semi-quantitative des fragments géniques étudiés par rapport à celui de la ß-globine, utilisée comme sonde interne.

La réaction contient : un mélange de 4 nucléotides (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) en quantités égales (APPLIGENE); un mélange des deux couples d'amorces encadrant les régions de DNAs à amplifier (EUROGENTEC); la Taq Polymérase et son tampon (APPLIGENE).

Nous avons testé expérimentalement différentes conditions, afin de les optimiser, pour chaque gène : la durée de chaque étape (dénaturation, hybridation, élongation); le nombre de cycles maximum avant d'avoir des amplifications aspécifiques; les concentrations de Taq Polymérase, de dNTPs, d'amorces et de DNAs matrice optimum a employer (103); les températures d'hybridations.

Les températures moyennes d'hybridations peuvent être définies théoriquement d'après la formule suivante : Tm = 4(GC) + 2(AT)°C. La température d'hybridation théorique pour un oligonucléotide, d'environ 20 pb, est normalement de : Tth = Tm - 5°C.

Mais ces températures donnent une valeur approximative qu'il faut affiner en effectuant plusieurs PCR à des températures voisines afin d'obtenir les qualités et les quantités maximums des produits de PCR désirés.

GENES	Tm °C Température moyenne	Tth °C Température théorique	Tex °C Température expérimentale
MDR1	54 °C	49 °C	50 °C
GSTπ	64 °C	59 °C	55 °C
TOPOII	57 °C	52 °C	50 °C
ß-GLOB	59 °C	54 °C	50 à 55 °C

Nous avons pu ainsi définir le protocole suivant : les différents réactifs sont mélangés dans les proportions décrites dans le tableau ci-dessous:

REACTIFS	CONDITIONS
DNA 0,5 µg	1 µl
Amorces du gène étudié à 20 mM	2 x 2,5 µl
Amorces de la ß-globine à 20 mM	2 x 2,5 µl
Tampon 10X	2 µl
dNTPs 4 mM	2,5 µl
Eau	QSP 45 µl

L'échantillon est recouvert de 100 µl d'huile minérale afin d'éviter toute évaporation. Les préparations sont placées dans l'appareil à PCR et sont soumises à un cycle de 5 minutes à 95°C, correspondant à un cycle de dénaturation des doubles brins de DNAs. Puis sont ajoutées dans chaque échantillon :

Taq Polymerase 5U/µ 1	0,2 µl
Tampon 10X	3 µl
Eau	QSP 5 µl

Ensuite les cycles suivants sont effectués :

	GSTπ et MDR1	TOPO II
1 CYCLE		
DENATURATION	95°C pendant 5 minutes	
30 CYCLES		
DENATURATION	95°C pendant 1 minute	
FIXATION DES PRIMERS	55°C pendant 1 minute	50°C pendant 1 minute
ELONGATION	72°C pendant 2 minutes	
1 CYCLE		
ELONGATION	72°C pendant 10 minutes	

Les produits de PCR obtenus à partir des DNAs pour les trois gènes étudiés et les produits de PCR obtenu à partir des RNAs pour l'étude de l'expression de la TOPO II, et dont la taille est voisine de 1000 pb, sont analysés par électrophorèse (93) sur un gel d'agarose "Sea Plaque^{R}" (TEBU) à 1%. La migration s'effectue à 50 volts pendant 40 minutes dans du tampon TBE (pour le protocole se référer au chapitre V-2.2.1.b.). Ces conditions permettent de séparer des fragments de 100 à 3000 pb. Un marqueur de poids moléculaire, le 1 Kb Ladder^{R} (GIBCO BRL) est déposé en parallèle afin de contrôler la taille des fragments obtenus (48).

Les produits de PCR obtenus à partir des RNAs, pour l'étude de l'expression des gènes MDR1 et GSTπ, dont les tailles sont de l'ordre de 200 et 330 pb, sont analysés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide, respectivement à 12 % ou à 8 % (4, 93). La migration s'effectue à 100 volts pendant 4 heures dans du tampon TBE. Ces conditions permettent de séparer des fragments de 40 à 200 pb pour le gel à 12 % ou de 60 à 400 pb pour le gel à 8 % (48).

Les gels sont colorés par du bromure d'éthidium à raison de 1 mg/ml pendant 1 minutes pour les gels d'agarose et pendant 15 minutes pour les gels d'acrylamide. Ils sont rincés dans de l'eau et enfin ils sont observés grâce à un transilluminateur UV à 302 nm et photographiés avec film Polaroid^{R} Type 667.

3. RESULTATS.

Le but de cette étude était la mise en évidence d'une éventuelle amplification et/ou expression de quelques gènes de chimiorésistance : MDR1, GSTπ, TOPO II; dans le cas d'un mélanome malin greffé sur souris athymiques et traité par l'association fotémustine-dacarbazine.

Dans un premier temps l'intégrité et la qualité des différents échantillons de DNAs, après leur extraction, ont été contrôlées par :

- la détermination de leurs D.O. à 260 nm, qui a permis de définir leurs concentrations;
- la détermination du rapport D.O. 260/D.O. 280, lesquels étant proche de 1,8, a montré leurs puretés;
- leurs migrations électrophorétiques, en une bande de haut poids moléculaire, garant de leurs intégrités.

La première méthode d'extraction des RNAs basée sur l'utilisation d'un gradient de chlorure de césium, ne nous a pas apporté de résultats satisfaisants. Ceci nous a conduit à recommencer les extractions par celles qui sont à l'origine de ce travail et basée sur une extraction par le thiocyanate de guanidium suivie d'une extraction au phénol/chloroforme.

L'intégrité et la qualité des différents échantillons de RNAs, après leur extraction, ont été également contrôlées par :

- la détermination de leurs D.O. à 260 nm, qui a permis de définir leurs concentrations;
- la détermination du rapport D.O. 260/D.O. 280, lesquels étant proche de 2, a montré leurs puretés;
- leurs migrations électrophorétiques, en présence deux populations majoritaires de 16S et 23S, démontre la qualité des produits obtenus.

N.B. : Les échantillons, leurs dénominations et les traitements correspondants sont présentés dans le tableau 5.1. page 55. L'ensemble des résultats obtenus est consigné dans le tableau 5.3. page 76.

3.1. ETUDE DE L'AMPLIFICATION DES GENES.

Les éventuelles amplifications des gènes de chimiorésistance ont été tout d'abord étudiées dans les différents prélèvements. Pour cela nous avons amplifié, à partir des DNAs et par PCR, simultanément les gènes concernés et notre gène de référence la ß-globine. Pour chaque échantillon, 5 µl de produit de PCR ont été déposés.

3.1.1. MDR1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

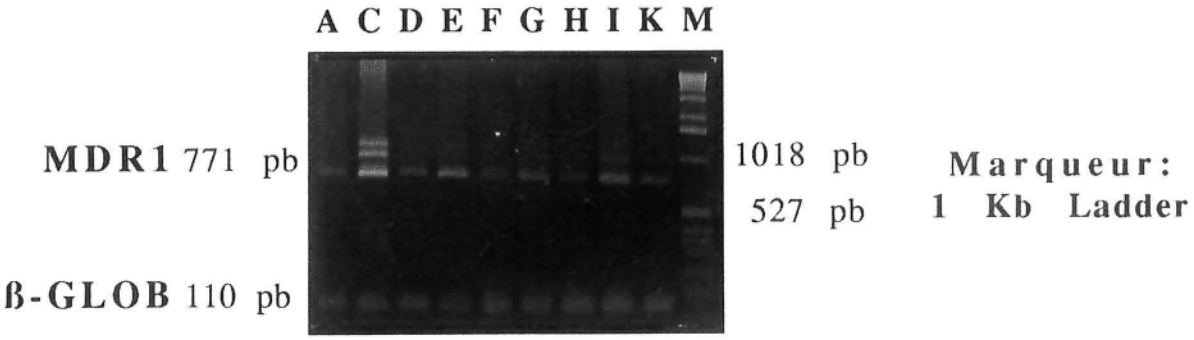


Figure 5.1. :
Amplification des gènes MDR1 et ß-GLOB après PCR.
Ligne M : marqueur de poids moléculaire 0,5 µg de 1kb ladder.
Lignes C, D, E, G, H, I, K : les échantillons de DNAs tumoraux après traitements.
Lignes A, F : les échantillons de DNAs avant traitement et servant de témoins.

Dans les lots où des doses fractionnées ont été administrées (C, E, I), une amplification du gène MDR1 peut être notée, par rapport aux témoins (A, F). De plus dans le cas de l'échantillon C deux bandes supplémentaires sont observées, pouvant provenir, éventuellement, de la liaison entre deux fragments de PCR. En ce qui concerne l'association médicamenteuse (K) aucune amplification n'est observée.

3.1.2. GSTπ.

Les résultats obtenus sont les suivants :

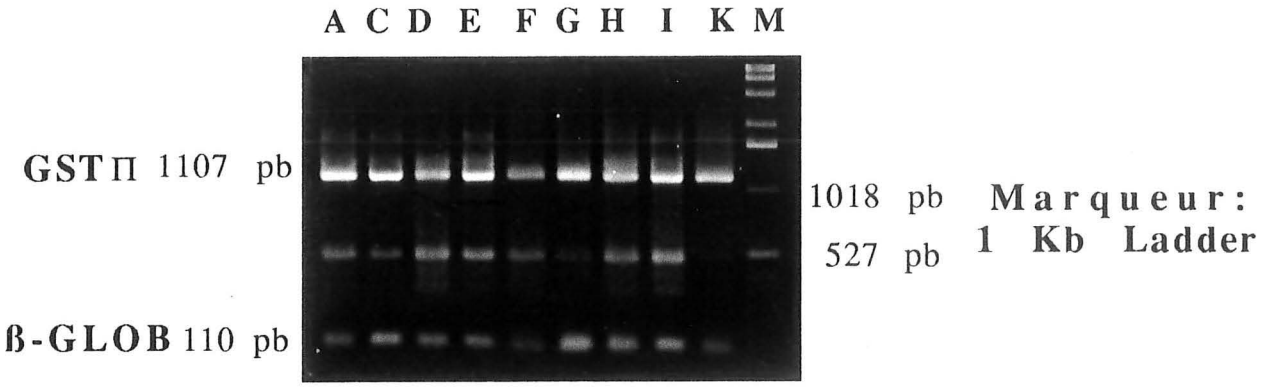


Figure 5.2. :
Amplification des gènes GSTπ et ß-GLOB après PCR.
Ligne M : marqueur de poids moléculaire 0,5 µg de 1kb ladder.
Lignes C, D, E, G, H, I, K : les échantillons de DNAs tumoraux après traitements.
Lignes A, F : les échantillons de DNAs avant traitement et servant de témoins.

Les résultats obtenus pour les échantillons traités (C, D, E, G, H, I, K) sont comparables à ceux obtenus pour les témoins (A, F). Aucune amplification caractéristique n'est observée. Pour l'ensemble des échantillons une seconde bande est observée, ayant une taille équivalente à la moitié de celle correspondant au gène GSTπ. Son origine nous est inconnue, nous pouvons seulement émettre l'hypothèse que cette bande correspondrait au même fragment de DNAs mais sous une forme simple brin?

3.1.3. TOPO II.

Les résultats obtenus sont les suivants :

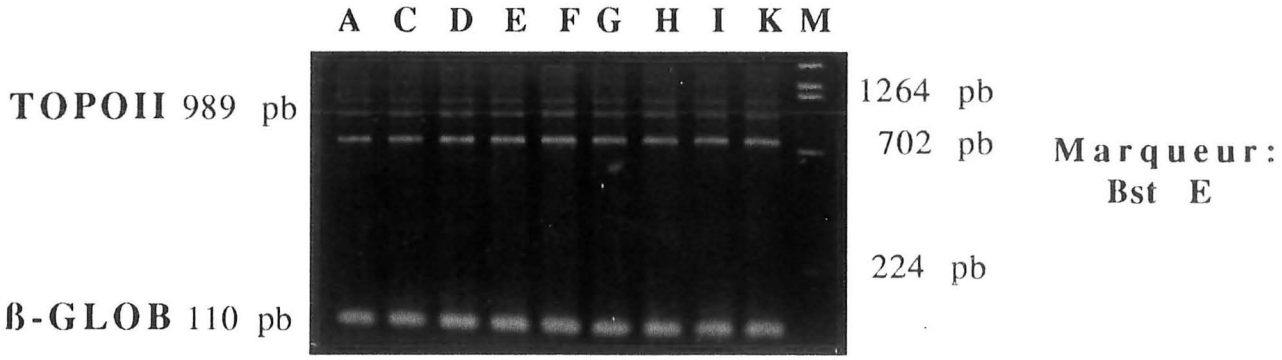


Figure 5.3. :
Amplification des gènes TOPO II et ß-GLOB après PCR.
Ligne M : marqueur de poids moléculaire 0,5 µg de 1kb ladder.
Lignes C, D, E, G, H, I, K : les échantillons de DNAs tumoraux après traitements.
Lignes A, F : les échantillons de DNAs avant traitement et servant de témoins.

Aucune amplification spécifique n'est à noter par rapport aux témoins (A, F). Par contre pour tous les échantillons, témoins compris, trois bandes distinctes sont à observées, celle correspondant au gène de la TOPO II (989 kb) n'est pas la bande majoritaire. La raison de ce résultats nous est inconnue. Serait-t-on en présence d'une mutation au niveau de ce gène, produisant ainsi un fragment plus petit ?

3.2. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES.

Dans un second temps, l'expression des gènes de chimiorésistance a été étudiée, dans les différents prélèvements. Pour cela nous avons amplifié, simultanément, à partir des DNAs complémentaire provenant des RNAs et par PCR, les gènes concernés et notre gène de référence, la ß-globine. Les PCR, obtenues à partir des cDNAs, ont été analysées par electrophorèse.

3.2.1. MDR1.

Les résultats obtenus sont les suivants :

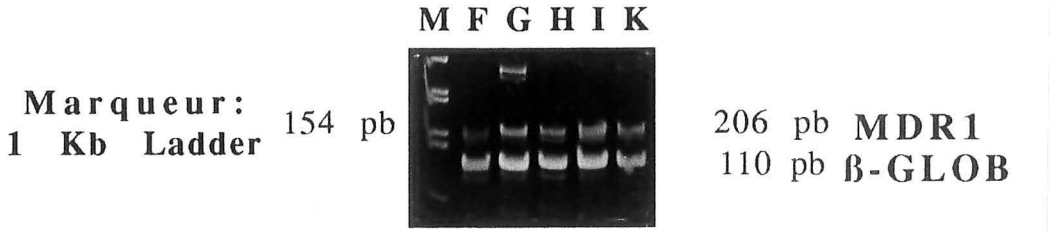


Figure 5.4. :
Expression des gènes MDR1 et ß-GLOB après PCR.
Ligne M : marqueur de poids moléculaire à 0,5 µg de 1Kb Ladder.
Lignes G, H, I, K : les échantillons de cDNA tumoraux après traitements.
Ligne F : l'échantillon de cDNA avant traitement et servant de témoin.

Dans tous les cas (G, H, I, K) une surexpression est observée par rapport au témoin (F). Ces surexpressions sont proportionnelles aux taux d'amplification observées précédemment. Dans le cas de l'association (K), une surexpression est observée, alors que nous n'avions pas d'amplification.

3.2.2. GSTπ.

Les résultats obtenus sont les suivants :

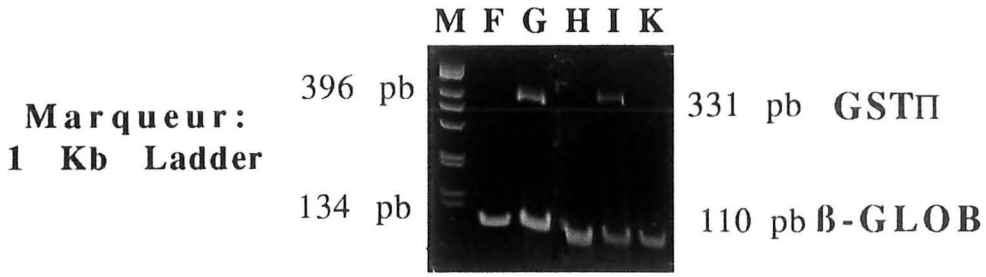


Figure 5.5.:
Expression des gènes GSTπ et ß-GLOB après PCR.
Ligne M : marqueur de poids moléculaire à 0,5 µg de 1Kb Ladder .
Lignes G, H, I, K : les échantillons de cDNA tumoraux après traitements.
Ligne F : l'échantillon de cDNA avant traitement et servant de témoin.

Dans le témoin (F), dans l'échantillon H, correspondant à une dose unique ainsi que dans l'association (K) aucune expression n'est observée. dans les échantillons G et I, correspondant à des doses fractionnées, une expression est observée. De plus, normalement dans le mélanome malin, GSTπ est indectectable au niveau de son expression, ceci est vérifié pour certains de ces résultats.

3.2.3. TOPO II.

Les résultats obtenus sont les suivants :

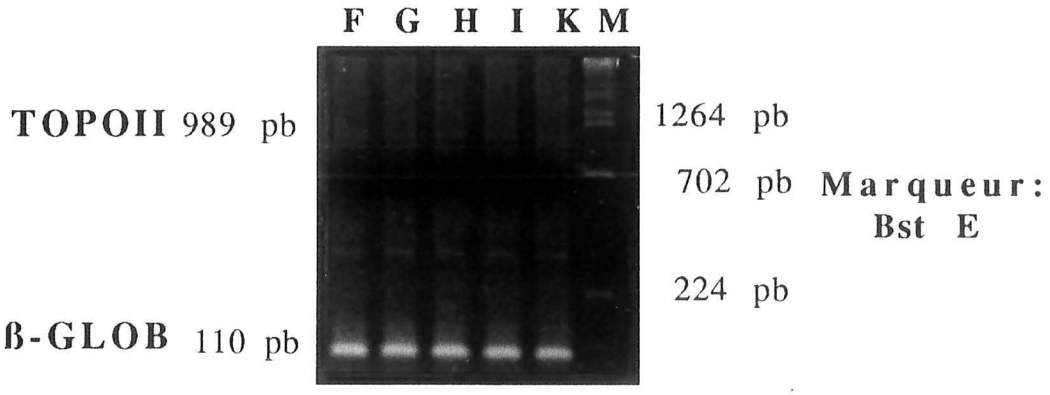


Figure 5.6. :
Expression des gènes TOPO II et ß-GLOB après PCR.
Ligne M : marqueur de poids moléculaire à 0,5 µg de 1Kb Ladder .
Lignes G, H, I, K : les échantillons de cDNA tumoraux après traitements.
Ligne F : l'échantillon de cDNA avant traitement et servant de témoin.

Une absence totale d'expression est observée pour l'ensemble des échantillons, témoins y compris (échantillons non traités A et F).

TABLEAU 5.3. : RESULTATS OBTENUS AU NIVEAU DE L'AMPLIFICATION ET/OU DE L'EXPRESSION DES GENES MDR1, GSTπ ET TOPOII.

		MDR1		GSTπ		TOPOII	
N°	TRAITEMENTS	A	E	A	E	A	E
A	Solvant : eau pour préparations injectables à J_6, J_7, J_8, J_9	+	///	+	///	+	///
C	Doses fractionnées de fotémustine :12,5 mg/kg/j à J_6, J_7, J_8, J_9	+++	///	+	///	+	///
D	Dose unique de dacarbazine : 80 mg/kg à J_6	+	///	+	///	+	///
E	Doses fractionnées de dacarbazine : 20 mg/kg/j à J_6, J_7, J_8, J_9	++	///	+	///	+	///
F	Solvant : eau pour préparations injectables à J_6, J_{14}	+	+	+	0	+	0
G	fotémustine : 20 mg/kg à J_6, J_{14}	+	++	+	+	+	0
H	fotémustine : 35 mg/kg à J_6	+	+ ou ++	+	0	+	0
I	fotémustine : 35 mg/kg à J_6 et 20 mg/kg à J_{14}	++	+++	+	+	+	0
K	fotémustine : 20 mg/kg/j à J_6, J_{10} dacarbazine : 20 mg/kg/j à J_{14}, J_{15}, J_{16}, J_{17}	+	+ ou ++	+	0	+	0

A : Amplification génique.

E : Expression génique.

/// : pas d'étude effectuée par manque de matériel.

O : absence d'amplification ou d'expression.

+ : légère amplification ou expression.

++ : moyenne amplification ou expression.

+++ : forte amplification ou expression.

3.4. VERTUES ET LIMITES DE LA METHODE DE PCR.

La technique de PCR présente de nombreux avantages :

- c'est une méthode très sensible si les conditions d'amplification sont bien déterminées, les amorces choisies judicieusement et les manipulations effectuées avec le maximum de minutie;
- l'utilisation de standards internes, comme la ß-globine, ne permet qu'une évaluation semi-quantitative des quantités de fragments obtenus;
- la détection des produits de PCR peut se faire, simplement, par l'intercalation du bromure d'éthidium, dans les acides nucléiques.
- elle permet la production de quantités considérables de matériel pouvant servir, par la suite, dans des méthodes de clonage, à la production de sondes...
- de par le choix judicieux des amorces, cette méthode démontre une certaine spécificité et additionnellement ceci peut être confirmer par un séquençage des fragments amplifiés;
- plusieurs amplifications simultanées peuvent être réalisées.

Mais certains inconvénients ne sont pas à négliger :

- les quantités de réactifs manipulés sont très petites, donc les risques d'erreur sont d'autant plus grands;
- c'est une méthode d'utilisation facile en tant que semi-quantitative, mais beaucoup plus difficile si l'on veut qu'elle soit quantitative;
- la reproductibilité est l'un des points faible de la PCR, ceci est du aux nombreux facteurs intervenant au cours de sa réalisation;
- certains fragments ne peuvent pas être amplifiées si leur séquence n'est pas connue;
- la mise au point des conditions optimums de la réaction représente un temps considérable;
- la qualité des DNAs matrices de départ influence sur la qualité, la spécificité, la précision et l'exactitude des fragments obtenus.

Cette méthode est donc à utiliser avec précautions, en gardant toujours à l'esprit ses limites, d'ou l'idéal est de la controler et la complémenter par d'autres techniques. Au niveau de MDR1, on peut étudier la protéine par les techniques de Western Blot et d'immunohistochimie (avec l'anticorps C219,

par exemple). Pour GSTπ, on peut doser l'enzyme dans la tumeur non traité et traité... Les résultats obtenus, pour ces 3 gènes, mériteraient d'être confirmés, par les techniques de Southern Blot et de Northern Blot, de manière à valider cette technique de PCR encore bien discutée (35, 83, 111).

4. DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les prélèvements de mélanomes malins, correspondant aux différents lots de souris traités, et ayant reçu des doses fractionnées de cytostatiques (C, E, I) présentent, dans le cas de MDR1, une amplification génique et une surexpression de ce gène. Pour le gène GSTπ , aucune amplification n'est observée, et seuls les lots correspondant aux doses fractionnées (G, I) l'expriment. Enfin, le gène TOPO II, ne présente aucune amplification spécifique et une absence totale d'expression. Dans le cas de l'étude de l'amplification de la TOPO II plusieurs bandes ont été observées sur le gel de migration. Or la bande de 989 Kb, correspondant au fragment étudié de la TOPO II, n'est pas le fragment majoritairement observé. Ici nous pouvons nous poser la question de savoir si nous ne serions pas en présence d'une mutation génique? Pour pouvoir y répondre, le séquençage, des DNAs, des bandes sumpplémentaires obtenues serait nécessaire.

Dans la littérature, le gène MDR1 est présent à des taux faibles, voire indétectables, dans le mélanome malin (41). Des quantités augmentées de P-gp, dans une tumeur, résultent le plus souvent de l'augmentation du taux de transcrit génique, d'où le RNA correspondant est détecté en plus grande quantité (73). L'amplification et/ou la surexpression du gène MDR1 est corrélée au taux de résistance (41, 49, 65). En effet, une amplification et/ou une surexpression peut entraîner une augmentation de la quantité de P-gp produite, cette P-gp constitue une pompe transmembranaire capable d'expulser, hors de la cellule, des composés divers dont certains cytostatiques. Donc un plus grand nombre de "pompes" pourront expulser les cytoatatiques hors de la cellule et ainsi les empêcher d'agir. Les résultats obtenus, dans cette étude, montrent une amplification du gène MDR1 pour des lots traités par des doses fractionnées (C, E, F) et une surexpression pour l'ensemble des lots traités (lots G, H, I, K). D'après les observations faites en clinique humaine, un certain nombre de remarques ou d'hypothèses peuvent être

émises. L'amplification et la surexpression MDR1 pourrait signifier que les drogues dont le mécanisme de résistance passe par MDR (anthracyclines, alcaloïdes de la pervenche) ont peu de chance d'agir en première ligne de traitement, comme les associations eldésine-dacarbazine-cisplatine. Ceci encore moins après un traitement par l'association fotémustine-dacarbazine qui induit l'expression du gène. Si cette expression était très labile, par contre, la chimiorésistance observée après le traitement, diminuerait et permettrait aux traitements d'être à nouveau actifs. Or pour le lot K traité par l'association, le tissu qui a permis les extractions correspondait au cinquième passage après le double traitement, on peut donc raisonnablement penser que l'amplification et/ou l'expression du gène MDR1 ont pu être modifiées par le traitement néanmoins, ces effets n'ont été que transitoires. En effet, après cinq passages, l'amplification et l'expression sont pratiquement revenus à la normale.

En ce qui concerne la GSTπ, dans le mélanome malin non traité, son taux est bas (105, 76). Les mécanismes faisant intervenir ce gène, dans la chimiorésistance, sont responsable notamment de la résistance envers les nitrosourées et les alkylants (112). Dans ce cas, nos résultats concordent tout à fait avec ce que l'on obtient en clinique puisque pour les drogues actives, la dacarbazine et la fotémustine, leur chimiorésistance passe par GSTπ. Dans le modèle étudié, aucune amplification de ce gène n'est observée, et seules les doses fractionnées apportent une légère expression de GSTπ. Donc dans ce cas nous n'avons pas de chimiorésistance faisant intervenir ce gène. Mais en clinique, nous n'avons que 20 à 30% d'efficacité pour cette association médicamenteuse, comment expliquer les 70% d'échecs? Cette chimiorésistance observée en clinique passerait-elle par les isoformes de GST qui sont GSTα et GST μ (dont la localisation chromosomique est en 1p31, chromosome atteint fréquemment dans les mélanome et notamment dans notre modèle), ou par l'alkylguanine-alkyltransférase.

Pour la TOPO II, deux hypothèses ont été émises en ce qui concerne la diminution de l'expression de ce gène au cours de la chimiorésistance : soit un ralentissement du cycle cellulaire et de la croissance à la suite des traitements entraîne une diminution voire une disparition de l'expression; soit la survenue d'une mutation au niveau du gène, entraîne l'impossibilité d'exprimer ce gène et de produire la protéine fonctionnelle (10). Nos

résultats montrent l'absence totale d'expression de cette enzyme, avant et après les divers traitements sur notre modèle. Ceci rejoint ce qui est observé en clinique, où les épipodophyllotoxines et les anthracyclines sont inactives dans le mélanomes. Il serait également interessant de tester l'effet induit par des inhibiteurs de la TOPO I qui ont la propriété d'inhiber l'expression de la TOPO I et parallèlement de permettre celle de la TOPO II (45, 100).

Dans notre modèle, le tissu tumoral, avant traitement, exprime faiblement les gènes étudiés (cas A et F). Ce faible taux d'expression serait suffisant pour induire une éventuelle chimiorésistance intrinsèque à ces tumeurs. Ce travail montre que les traitements induisent l'apparition d'une chimiorésistance due à l'amplification et à la surexpression de MDR1. De plus la réitération des doses semble accentuer les modifications au niveau de l'amplification et/ou de l'expression lorsque celle-ci existe.

Il est à noter que, par manque de matériel, l'expression des trois gènes choisis n'a pu être étudiée dans les lots C, D et E. D'ou, nous ne pouvons pas nous prononcer en ce qui concerne le retentissement éventuel d'une dose unique de dacarbazine (80 mg/kg) et surtout fractionnée (20 mg/kg x4), sur l'expression génomique. De plus, alors que pour tous les lots analysés le tissu prélevé était toujours celui qui avait subi le traitement, il n'en a pas été de même au niveau de l'association (lot K). En effet, dans ce dernier lot, et comme pour l'étude cytogénétique, le tissu qui a permis les extractions correspondait au cinquième passage après le double traitement. On peut donc raisonnablement penser que l'amplification et/ou l'expression du gène MDR1 ont pu être modifiées par les traitements surtout fractionnés. Néanmoins, ces effets n'ont été que transitoires. Après cinq passages, l'amplification et l'expression sont pratiquement revenus à la normale. Une contribution de cellules non tumorales peut éventuellement exister, mais dans le cas de tumeur humaines obtenues après des greffes sur les souris athymiques, seul le tissu tumoral humain est prélevé. En effet, le tissu murin n'étant représenté, au niveau de la tumeur, que par les capillaires sanguins, il est aisément séparé du tissu humain. De plus l'étude les caryotypes ne démontrent aucune présence de tissu murin. C'est la raison pour laquelle, bien souvent, les résultats obtenus à partir des xenogreffes sont plus faciles à analyser.

En perspective, il serait interessant de valider, les résultats obtenus par la technique de PCR, dans ce travail, par une autre méthode, notamment les techniques de Southern Blot et Nothern Blot. Il est à noter que dans ces études, nous avons suivi trois des gènes impliquées dans la chimiorésistance sur le modèle choisi, une extension à l'étude des protéines, produites à partir des gènes étudiés, pourrait compléter ce travail.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Bien que le mélanome malin ne représente que 1% de l'ensemble des tumeurs, il est, cependant, responsable de 65% des décès par cancers cutanés. En effet, sous sa forme récidivante, son pronostic est d'autant plus redoutable qu'il devient très vite chimiorésistant. C'est la raison pour laquelle les associations médicamenteuses ne sont utilisées que pour le traitement des métastases. A ce stade, la dacarbazine, souvent considérée comme la substance de référence et la fotémustine, nitrosourée de création plus récente, sont associées.

Pour évaluer les retentissements génétiques de cette association, la récidive d'un mélanome malin achromique a été transplantée sur des souris athymiques. Ceci permet, en effet, d'étudier, *in vivo*, la chimiosensibilité du tissu tumoral humain, tout en conservant les principales caractéristiques phénotypiques et génotypiques du néoplasme qui lui a donné naissance.

L'association fotémustine-dacarbazine a mis en évidence une chimiosensibilité significative de la tumeur greffée mais voisine de celle observée avec la fotémustine seule. Ce modèle semble donc peu répondre à la dacarbazine utilisée en monothérapie. Bien que l'effet obtenu par la polychimiothérapie soit important (fonte d'environ 40% du tissu tumoral) il reste cependant transitoire. En effet, le tissu traité ayant été regreffé, une reprise de la croissance tumorale a, peu à peu, été observée. Les effets induits sur le génome par la chimiothérapie ont été alors étudiés à deux niveaux : l'analyse cytogénétique et l'étude de l'amplification et/ou l'expression de quelques gènes de chimiorésistance (MDR1, GSTπ, TOPO II).

Le caryotype du modèle expérimental est révélateur d'une longue suite d'altérations génomiques primaires et secondaires. La perte, souvent précoce, du chromosome Y sur toutes les métaphases a été notée. Des translocations et des délétions des chromosomes 1 et 6 considérées comme caractéristiques des mélanomes malins disséminés ont également été observées. Enfin, les délétions partielles du bras court d'un chromosome 17 et du bras long d'un chromosome 13 permettent d'envisager la perte de la fonction "suppressive" de deux "antioncogènes" (gène codant pour la P53 et gène du rétinoblastome). Ces deux dernières altérations sont d'ailleurs presque toujours considérées comme des évènements tardifs dans l'évolution tumorale. Quelque soit le type de traitements utilisés une apparente stabilité du nombre modal, une bonne conservation des principales anomalies et des marqueurs ont été notées. Cependant, l'effet "clastique" des médicaments

employés est souligné par la présence de cassures chromosomiques et de double-minutes dans les métaphases.

En ce qui concerne l'analyse des mécanismes moléculaires de la chimiorésistance, les résultats présentés sont déconcertants. Ils montrent, en effet, une amplification et/ou une surexpression transitoire de l'efflux des drogues (MDR1) surtout après l'utilisation de doses fractionnées. Or les données de la littérature laissaient préssentir plutôt une surexpression du gène de la glutathion-S-transférase après traitement. Les GSTs assurent une fonction de détoxification cellulaire. Un grand nombre de tumeurs humaines présentent une augmentation de l'activité GSTπ souvent associé au processus de transformation et considérée comme un marqueur de mauvais pronostic (cancer du sein). Par contre dans le mélanome malin non traité, le taux de la GSTπ est souvent bas. Quoiqu'il en soit, les interrelations complexes entre les mécanismes métaboliques et moléculaires de résistance aux drogues sont encore mal comprises. Cette étude ne représente donc que l'amorce d'un travail plus approfondi.

La création de modèles expérimentaux par la greffe de prélèvements tumoraux humains, de volumes souvent réduits, sur des souris athymiques permet de multiplier les investigations indispensables à la compréhension des modifications génétiques liées à la chimiothérapie. De tels modèles établis à partir d'un même type de tumeurs devraient faciliter des études comparatives reflètant mieux la pathologie humaine. Les résultats apportés par l'analyse cytogénétique conventionnelle pourraient être considérablement enrichis grâce aux techniques d'hybridation in situ en sondes froides (FISH) et d'hybridation génomique comparative (CGH). Enfin l'analyse des mécanismes moléculaires devrait être complétée par de l'immunohistochimie et par des dosages biochimiques. Tout ceci permettrait, peut-être, de vérifier un certain nombre d'hypothèses : ne suggère-t-on pas, en effet, que les conjugués glutathions formés sous l'action de la glutathion-S-transférase seraient le substrat de la P-glycoprotéine?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) AAMDAL S., GERARD B., BOHMAN T., D'INCALCI M. 1992. Sequential administration of dacarbazine and fotemustine in patients with disseminated malignant melanoma - an effective combination with unexpected toxicity. Eur. J. Cancer, 28:447-450.

(2) ALBINO A. P., FOUNTAIN J. W. 1993. Molecular genetics of human malignant melanoma. Cancer Treat. Res., 65:201-255.

(3) AUSUBEL *et al.* 1991. "Current Protocols in Molecular Biology". Eds Frederick M., vol.1:unit 2.2.

(4) AUSUBEL *et al.* 1991. "Current Protocols in Molecular Biology". Eds Frederick M., vol.1:unit 2.7.1.

(5) AUSUBEL *et al.* 1991. "Current Protocols in Molecular Biology". Eds Frederick M., vol.1:unit 7.43.

(6) BALABAN G. B., HERLYN M., CLARK W. H. JR, NOWELL P. C. 1986. Karyotypic evolution in human malignant melanoma. Cancer Genet. Cytogenet., 19:113-122.

(7) BECHER R., GIBAS Z., KARAKOURIS C., SANDBERG A. A. 1983. Nonrandom chromosome changes in malignant melanoma. Cancer Res., 43:5010-5016.

(8) BECK W.T. 1989. Unknotting the complexities of multidrug resistance : the involvement of DNA topoisomerase in drug action and resistance. J. Natl Cancer Inst., 81:1683-1685.

(9) BECK W.T. 1990. Strategies to circumvent multidrug resistance due to P-glycoprotein or to altered DNA topoisomerase II. Bull. Cancer, 77:1131-1141.

(10) BENARD J., BOURHIS J., RIOU G. 1990. Clinical significance of multi drug resistance in human cancer. Anticancer Reasearch, 10:1297-1302.

(11) BENSON D., LIPMAN D. J., OSTELL J. 1993. GenBank. Nucl. Acids Research, 21:2963-2965.

(12) BEPPINO C., GIOVANELLA B. C., FOGHT J. The nude mouse in cancer reasearch. Advances in Cancer Reasearch, 44:69-120.

(12bis) BERGMAN W., GRUIS N., FRANTS R. 1993. Clinical and genetic patterns in dutch FAMM families. Symposium on the third International conference on melanoma. Venice, 31 mars-3avril.

(13) BIEDLER J.L. 1992. Genetic aspects of multidrug resistance. Cancer suppl., 70:1799-1809.

(14) BIEDLER J.L., RIEHM H. 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro :* cross resistance radioautographic and cytogenetic studies. Cancer Res., 30:1174-1184.

(15) BLACK S.M., WOLF R. 1991. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. Pharmacol. Ther., 51:139-154.

(16) BOAZIZ C. 1992. Apport d'une nouvelle nitrosourée : la fotémustine. Path. Biol., 40:964-968.

(17) BRUNET A. 1992. Traitement du mélanome malin disséminé. Path. Biol., 40: 960-963.

(18) BURT R.K., GARFIELD D., JOHNSON K., THORGEIRSSON S. 1988. Transformation of rat liver epithelial cells with V-H-ras or V-H-raf causes expression of MDR1, glutathione-S-transferase-P and increased resistance to cytotoxic chemicals. Carcinogenesis, 9:2329-2332.

(19) CALVO F., DE CREMOUX P. 1989. Gène de la résistance multidrogue MDR1. Bull. Cancer, 76:973-977.

(20) CHAUDHARY P. M., RONINSON I. B. 1993. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. Journal of the National Cancer Institute, 85:632-639.

(21) CHEN D., MAGNUSON V. L., STEFFENSEN B., KLEBE R. J. 1993. Use of stock solutions to simplify mRNA quantitation by reverse transcription-PCR assays. PCR Methods and applications, 2:351:353.

(22) CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., 162:156-159.

(23) CHUNG T., DRAKE F., COHN S., PER S., CROOKE S., MIRABELLI C. 1989. Characterisation and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isoenzymes. Proc. Natl Acad. Sci., 86:9431-9435.

(24) COATES A. S. 1992. Systemic chemotherapy for malignant melanoma. World J. Surg., 16:277-281.

(25) COCCONI G. *et al.* 1992. Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus tamoxifen. The New Engl. J. of Med., 327:516:523.

(26) COLES B., KETTERER B. 1990. The role of glutathione and Glutathione Transferases in chemical carcinogenesis. Biochem. Mol. Biol., 25:47-70.

(27) COSOLO W. C., CHRISTOPHIDIS N. 1989. An Example of the Role of the Animal Model in Investigating New Techniques. Eur. J. Clin. Oncol, 25:1511-1512.

(28) COWAN K.H., BASTIT G., TULPULE A., SINHA B.K., MYERS C.E. 1986. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9328-9332.

(29) DELLA PORTA G. 1992. Cellular and molecular biology of melanoma. Seminars in surgical Oncology, 8:353-357.

(30) DE VITA V.T. 1989. Principles of chemotherapy. In : DE VITA V.T., HELLMAN S., ROSENBERG S.A. Cancer : Principles and practice of oncology, 3rd edition. Philadelphia: Lippincott, 276-300.

(31) DRACOPOLI N.C., HARNETT P., BALE S. J., *et al.* 1989. Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:4614:4618.

(32) DUGUET M., LAVENOT C., HARPER F., MIRAMBEAU G., DERECONDO A.M. 1983. DNA Topo-isomerases from rat liver : physiological variations. Nucleic Acids Res., 11:1059-1075.

(33) DU PONT G., SCHUCHTER L. M. 1992. Disseminated melanoma - Is there a new standard therapy ? The New Engl. J. of Med., 327:560-561.

(34) FAIRMAN R., BRUTLAG D.L. 1988. Expression of the Drosophila type II topoisomerase is developmentally regulated. Biochemistry, 27:560-565.

(35) FERRE F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR : reality versus myth. PCR Methods and Applications, 2:1-9.

(36) FLAHERTY L. E., ROBINSON W., REDMAN B. G., GONZALES R., MARTINO S., KRAUT M., VALDIVIESO M., RUDOLPH A. R. 1993. A phase II study of dacarbazine and cisplatin in combination with outpatients administred interleukine-2 in metastatic malignant melanoma. Cancer, 71:3520-3525.

(37) FLANAGAN S. P. 1966. "Nude" a new hair less gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet. Res., 8:295-301.

(38) FOJO A.T., UEDA K., SLAMON D.J., POPLACK D.G., GOTTESMAN M.M., PASTAN I. 1987. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 84:265-269.

(39) FRYER A. A., ZHAO L, ALLDERSEA J., BOGGLD M. D., PERRETT W., CLAYTON R. N., JONES P. W., STRANGE R. C. 1993. The glutathione S-transferases : polymerase chain reaction studies on the frequency of the GSRM1 0 genotype in patients with pituitary adenomas. Carcinogenesis, 14:563-566.

(40) GIOVANELLA B. C., STEHLIN J.S., SHEPARD R.C., WILLIAMS L. J. 1983. Correlation Between Reponse to Chemotherapy of Human Tumors in Patients and in Nude Mice. Cancer, 52:1146-1152.

(41) GOLDSTEIN L.J., GALSKI H., WILLINGHAM M., LAI S.L., GAZDAR A., PIRKER R., GREEN A., CRIST W., BRODEUR G.M., LIEBER M., COSSMAN J., GOTTESMAN M.M., PASTAN I. 1989. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. J. Natl Cancer Inst., 81:116-124.

(42) GOLDSTEIN L.J., PASTAN I., GOTTESMAN M.M. 1992. Multidrug resistance in human cancer. Critical Rewiews in Oncology/Hematology, 12:243-253.

(43) GOTTESMAN M. M., PASTAN I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annu. Rev. Biochem, 62:385-427.

(44) D'après GUBLER et HOFFMAN en 1983, avec des modifications de SEED B., ARUFFO A. 1987. Molecular cloning of the CD2 antigen. The T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3365-3369.

(45) GUPTA R.S., GUPTA R., ENG B. 1988. Camptothecin-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells containing a resistant form of Topoisomerase II. Cancer Res., 48:6404-6410.

(46) GUTMAN M., INBAR M., KLAUSNER J. M., CHAITCHIK S. 1993. Malignant melanoma in different ethnic groups in Israël. Cancer, 71:2746-2750.

(47) HANSSON M., KÄRRE K., KIESLING R., RODER J., ANDERSSON B., HÄYRY P. 1979. Natural NK-cell targets in the mouse thymus : characteristics of the sensitive cell population. J. Immunol., 123:765-771.

(48) HARLEY J. L., DONELSON J. E. 1980. Nature, 286:860.

(49) HARRIS A.L., HOCHHAUSER D. 1992. Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. Acta Oncologica, 31:205-213.

(50) HERBERMAN R. B. 1978. Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice. In : the nude mouse in experimental and clinical research. cds FOGH J., GIOVANELLA B. C. Academic Press. Inc. New-York, 135-141.

(51) HERBERMAN R. B., NUNN M. E., LAVRIN D. H. 1975. Natural cytotoxicity reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer, 16:216-225.

(52) HEURRE M., DUBOURDIEU D., RAVISSE P., Mc CARTHY S. W., FLOCH J. J., MICHEL G., MONCHY D., BAUDIN R., HERRMANN M., FALCOZ G., CROUZAT M., BACH F. 1993. Le mélanome malin cutané en Nouvelle-Calédonie 1973-1991. Etude de 97 observations. Bull. Cancer, 80:235-247.

(53) ISLAM M.Q., PLATZ A., SZPIRER C., LEVAN G., MANNERVIK B. 1989. Chromosomal localization of human glutathione genes of classes alpha, mu and pi. Hum. Genet., 82:338-342.

(53bis) JACQUILLAT C., KHAYAT D., BANZET P., WEIL M., AVRIL M. F., FUMOLEAU P., NAMER M., BONNETERRE J., KERBRAT P., BONERANDI J. J. *et al.* 1990. Chemotherapy by fotemustine in cerebral metastases of disseminated malignant melanoma. Cancer Chemother. Pharmacol.,25:263-266.

(54) JARANKA P., ZASTANWNY R., LING V. 1989. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane associated transport proteins. The Faseb J., 3:2583-2592.

(55) KANE S.E., PASTAN I., GOTTESMAN M.M. 1990. Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. J. Bioenerg. Biomembr., 22:593-618.

(56) KEIHOLZ U., SCHEIBENBOGEN C., TILGEN W., BERGMANN L., WEIDMANN E., SEITHER E., RICHTER M., BRADO B., MITROU P. S., HUNSTEIN W. 1993. Interferon-α and interleukine-2 in the treatment of metastatic melanoma. Cancer, 72:607-614.

(56bis) KHAYAT. 1993. Sequential chemoimmunotherapy with cisplatin, interleukine-2, and interferon-α2a for metastatic melanoma. J. Clin. Onc., 11:2173-2180.

(57) KOPROWSKI H., HERLYN M., BALABAN G., PARMITER A., ROSS A., NOWELL P. 1985. Expression of the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma. Somat. Cell Mol. Genet., 11:297-302.

(58) LAMMIE G.A., PETERS G. 1991. Chromosome 11q13: abnormalities in human cancer. Cancer Cells, 3:413-420.

(59) LEE S. M., MARGISON G. P., WOODCOCK A. A., THATCHER N. 1993. Sequential administration of varying doses of dacarbazine and fotemustine in advanced malignant melanoma. Br. J. Cancer, 67:1356-1360.

(60) LEWIS A.D., HAYES J.D., WOLF C.R. 1988. Glutathione and Glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. Carcinogenesis, 9:1283-1287.

(61) LIMON J., DAL CIN P., SAIT S. N. J., *et al.* 1988. Chromosome changes in metastatic human melanoma. Cancer Genet. cytogenet., 30:201-211.

(62) LIU L.F. 1990. Topoisomerase poisons in cell killing and drug resistance. In : MIHICH E. Drug resistance : mechanisms and reversal. Rome : John Libbey CIC:251-263.

(63) LONN U., LONN S., NYLEN U., STENKVIST B. 1992. Appearance and detection of multiple copies of the MDR-1 gene in clinical samples of mammary carcinoma. Int. J. Cancer, 51:682-686.

(64) LOOR F., ROELANTS G. E. 1975. Immunofluorescence studies of a possible prethymic T-cell differentiation in congenitally athymic (nude) mice. Ann. N.Y. Acad. Sci. **254**:226-230.

(65) MARIE J.P. 1992. Les gènes de résistance à la chimiothérapie. La Presse Médicale, **22**:1033-1037.

(66) MARTY M.,CRAUSTE-MANCIET S., FAURE P., MADELAINE I., SAULNIER J.L. 1992. Anticancereux: utilisation pratique. Dossier du centre national d'information sur le médicament hospitalier, hors série.

(66bis) MASTRANGELO M. J., BELLET R. E., KANE M. J., BERD D. Chemotherapy of melanoma. The Chemotherapy source book. Ed. PERRY M. C. 886-907.

(67) MATTERN J., BAK M., HAHN E.W., VOLM M. 1988. Human tumor xenografts as model for drug testing. Cancer and Metastasis Reviews, **7**:263-284.

(68) McCLAY E. F., ALBRIGHT K., JONES J. A.,CHRISTEN R. D., HOWELL S. 1993. Tamoxifen modulation of cisplatin sensitivity in human malignant melanoma Cells, **53**:1571-1576.

(69) McCLAY E. F., MASTRANGELO M. J., BERD D., BELLET E. 1992. Effective combination chemo/hormonal therapy for malignant melanoma : exprience with three consecutive trials, **50**:553-556.

(70) MC GOWN A.T., FOX B.W. 1986. A proposed mechanism of resistance to cyclophosphamide and phosphoramide mustard in a Yoshida cell line *in vitro*. Cancer Chemother. Clin. Pharmacol., **17**:223-226.

(71) MERIMSKY O., INBAR M., CHAITCHIK S. 1992. Fotemustine and DTIC combination in patients with disseminated malignant melanoma, **15**:84-86.

(72) MORROW C.S., COWAN K.H., GOLDSMITH M.E. 1989. Structure of the human genomic Glutathione-S-Transferase π gene. Gene, **75**:3-11.

(73) MOUSSEAU M. 1992. Etude des mécanismes moléculaires de chimiorésistance intrinsèque des tumeurs cérébrales humaines. Thèse de doctorat soutenue à Grenoble I.

(74) MOSCOW J.A., FAIRCHILD C.R., MADDEN M.J., RANSOM D.T., WIEAND H.S., O'BRIEN E.E., POPLACK D.G., COSSMAN J., MYERS C.E., COWAN K.H. 1989. Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. Cancer Res., 49:1422-1428.

(75) MURPHY L. D., HERZOG C. E., RUDICK J. B., FOJO A. T., BATES S. E. 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of MDR 1 gene expression. Biochemistry, **29**:10351-10356.

(76) NIETHAMMER D., DIDDENS H., GEKELER V., FRESE G., HANDGRETINGER R., HENZE G., SCHMIDT H., PROBST H. 1989. Resistance to Methotrexate and multidrug resistance in chilhood malignancies. Adv. Enzyme Regul., 29:231-245.

(77) NOONAN K. E., BECK C., HOLZMAYER T. A., CHIN J. E., WUNDER J. S., ANDRULIS I. L., GAZDAR A. F., WILLMAN C. L., GRIFFITH B., VON HOFF D. D., RONINSON I. B. 1990. Quantitative analysis of MDR 1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:7160-7164.

(78) OSTERLIND A., KJEMS E. 1993. Malignant melanoma of the skin. APMIS, 33:149-155.

(79) PANTELOURIS E. M. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature, 217:370-372.

(80) PARK S. H., YOON J. H., KWON Y. D., PARK S. D. 1993. Nucleotide sequence analysis of the cDNA for rat DNA Topoisomerase II. Biochem. and Biophysical Research Communications, 193:787:793.

(81) PEARSON W. R., VORACHEK W. R., XU S., BERGER R. , HART I., VANNAIS D., PATTERSON D. 1993. Identification of class-mu glutathione transferase gene GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. Am. j. Hum. Genet., 53:220-233.

(82) POUPON M. F. 1992. Comment les cancers échappent-ils à la chimiothérapie ? Path. Biol., 40:923-927.

(83) POUPON M.F., ARVELO F., GOGUEL A. F., BOURGEOIS Y., JACROT M., HANANIA N., ARRIAGADA R., Le CHEVALIER T. 1993. Response of small-cell lung cancer xenografts to chemotherapy : multidrug resistance and direct clinical correlates. Journal of the National Cancer Institute, 85:2023-2029.

(84) RICE C. M., FUCHS R., HIGGINS D. G., STOEHR P. J., CAMERON G. N. 1993. The EMBL data library. Nucl. Acids Research, 21:2967-2971.

(85) ROBERT J. 1993. Clinical and therapeutic applications of our knoledge on drug resistance to anticancer compounds. Symposium XII, Thursday April 29th, 67:274-276.

(86) RONINSON I.B. 1990. Molecular genetics and diagnotics of multidrug resistance. In : MIHICH E. Drug resistance : mechanisms and reversal. Rome : John Libbey:145-158.

(87) RONINSON I.B. 1992. The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. Biochem. Pharmacol., 43:95-102.

(88) ROSS W.E., SULLIVAN D.M., CHOW K.C. 1989. Altered function of DNA Topoisomerase as a basis for antineoplastic drug action. In : DE VITA V.T., HELLMAN S., ROSENBERG S.A. Cancer : Principles and practice of oncology, 3rd edition. Philadelphia, lippincott:65-81.

(89) RYAN L., KRAMAR A.,BORDEN E. 1993. Pronostic factors in metastatic melanoma. Cancer, 71:2995-3005.

(90) SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B.,ERLICH H. A. 1989. Primer-directed enzymatic amplification of DAN with a thermostable DNA polymerase. Science, 239:487-491.

(91) SAITO Y., NAKADA Y., HOTTA T., MIKAMI T., KURISU K., YAMADA K., KIYA K., KAWAMOTO K., UOZUMI T. 1991. Glutathione and cellular response of ACNU-resistant rat glioma sublines to drugs and radiation. Int. J. Cancer, 48:861-865.

(92) SALMON S.E., GROGAN T.M., MILLER T.P., LEHNERT M., DALTON W.S. 1992. Clinical detection of multidrug resistance and reversal with chemosensitizing agents. In: TSURUO T., OGAWA M. Drug resistance as a biochemical target in cancer chemotherapy. San Diego: Academic Press, 257-269 (Bristol Myers Squibb Cancer Symposia)

(93) Eds SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989. D'après la méthode de Edmonds *et al.* 1971, Aviv and Leder 1972. Molecular Cloning, **vol.1**, chap.6.9. et 6.36.

(94) SANCHEZ J. A., ROBINSON W. A. 1993. Malignant melanoma. Annu. Rev. Med. 44:335-342.

(95) SEHESTED J. 1974. A simple method for R banding of human chromosomes, showing a pH-dependent connection between R and G bands. Humangenetik, 21:55-58.

(96) SHEA T.C., KELLEY S.L., HENNER W.D. 1988. Identification of an anionic form of Glutathione Transferase present in many human tumors and cell lines. Cancer Res., 48:527-533.

(97) SOZZI G., MIOZZO M., CALDERONE C. *et al.* 1990. Chromosome abnormalities and fragile sites in human melanoma. Cancer Genet. Cytogenet., 44:61-67.

(98) STEEL G.G., COURTENAY V.D., PECKHAM M. J. 1983. The reponse to chemotherapy of a variety of human tumour xenografts. Br. J. Cancer, 47:001-013.

(99) SULLIVAN D.M., GLISSON BB.S., HODGES P.K., SMALLWOOD-KENTRO S., ROSS W.E. 1986. Proliferation dependance of Topoisomerase II mediated drug action. Biochemistry, **25**:2248-2256.

(100) SUZUKAKE K., PETRO B.J., VISTICA D.T. 1982. Reduction in glutathione content of L-PAM resistant L1210 cell confers drug sensitivity. Biochem. Pharmacol., **31**:121-124.

(101) TAN K.B., DORMAN T.E., FALLS K.M., CHUNG T.D.Y., MIRABELLI C.K., CROOKE S.T. MAO J. 1992. Topoisomerase IIα and Topoisomerase IIβ genes : characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively. Cancer Res., **52**:231-234.

(102) TAN K.B., MATTERN M.R., ENG W.K., MC CABE F.L., JOHNSON R.K. 1989. Nonproductive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors. J. Natl Cancer Inst., **81**:1732-1735.

(103) TAN S. S., WEIS J. H. 1992. Development of a sensitive reverse transcriptase PCR assay, RT-PCR, utilizing rapid cycle times. PCR Methods and Applications, **2**:137-143.

(104) TEICHER B.A., HOLDEN S.A., KELLEY M.J., SHEA T.C., CUCCHI C.A., ROSOWSKY A., HENNER W.D., FREI E. 1987. Characterisation of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum. Cancer Res., **47**:388-393.

(105) TEW K.D. 1990. The role of Glutathions S Transferase in anticancer drug resistance. In : MIHICH E. Drug resistance : mechanisms and reversal. Rome : John Libbey CIC, 109-119.

(106) TOWNSEND A.J., COWAN K.H. 1989. Glutathione-S-Transferase and antineoplastic drug resistance. Cancer Bull., **41**:31-37.

(107) TRENT J. M., STANBRIDGE F. J., Mc BRIDE H. L., *et al.* 1990. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. Science, **247**:568-571.

(108) TRENT J. M., THOMPSON F. H., MEYSKENS F. L. JR. 1989. Identification of a recurring translocation site involving chromosome 6 in human malignant melanoma. Cancer Res., **49**:420-423.

(108bis) TRENT J., MEYSKENS F. L., SALMON S. E. *et al.* 1980. Relation of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. New Engl. J. Med., **322**:1508-1513.

(109) TUBIANA M. 1989. Chimiorésistance des tumeurs. Facteurs liés à la cinétique tumorale et à l'apparition des cellules résistantes. Bull. Cancer, 76:959-965.

(110) TSUTSUI K., SAKURAI H., SHOMMORI T., ODA T. 1986. Levels of Topoisomerase II and DNA polymerase are regulated independently in developing neuronal nuclei. Bioch. Biophys. Res. Commun., 138:1116-1122.

(111) TWENTYMAN P. R. 1992. MDR1 (P-glycoprotein) gene expression-implications for resistance modifier trials. Journal of the National Cancer Institute, 84:1458-1460.

(112) VIOLET D. 1993. Glutathion S-transferase: gene structure and regulation of expression. Crit. Rev. in Biochem. and Molecular Biology, 28:173-207.

(113) WANG J.C. 1985. DNA topoisomerases. Ann. Rev. Biochem., 54:665-697.

(114) WANG A.L., TEW K.D. 1985. Increased Glutathione-S-Transferase activity in a cell line with acquired resistance to nitrogen mustards. Cancer Treat. Rep., 69: 677-682.

(115) WEST I.C. 1990. What determine the substrate of the multidrug resistance pump, TIBS, 15:42-46.

(116) WHELAN R.D., HOSKING L.K., TOWNSED A.J., COWAN K.H., HILL B.T. 1989. Differential increases in Glutathione-S-Transferase activities in a range of multidrug-resistant human tumor cell lines. Cancer Communications, 1:359-365.

(117) WINOGRAD B., PECKHAM M., PINEDO H. M. 1989. Human tumor xenografts in anticancer drug development, European School of Oncology Monograph. Journal of National Cancer Institute, 81:166-167.

(118) ZHANG H., D'ARPA P., LIU L.F. 1990. A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons. Cancer cells, 2:23-27.

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS.

BSA :	bovine serum albumine
cDNA :	acide déoxyribonucléique complémentaire
DNA :	acide déoxyribonucléique
DEPC :	diéthyl pyrocarbamate
DMSO :	diméthyl sulfoxide
DNase :	déoxyribonucléase
dNTP :	déoxynucléotide
D.O. :	densité optique
DTT :	dithiothréitol
EDTA :	acide tetracétique éthylène diamine
g :	gravity
kb :	kilobases
kDa :	kilo daltons
MOPS :	3-(N-morpholino)propane sulfonate
nm :	nanomètres
pb :	paire de bases
PCR :	polymerase chain reaction
PM :	poids moléculaire
QSP :	quantité suffisante pour
RNA :	acide ribonucléique
RNase :	ribonucléase
RT :	reverse transcriptase
S :	Svelberg
SDS :	sodium dodécyl sulfate
TBE :	Tris-Borate-EDTA
TE :	tris-EDTA
Tris :	(hydroxyméthyl)aminométhane
U :	unités
UV :	ultra-violets

DEFINITIONS.

LES GENES DE CHIMIORESISTANCE :

- MDR1 : Multidrug resistance ou résistance multidrogue.
- GSTπ : Glutathion-S-transférase π.
- TOPOII : Topoisomérase II.

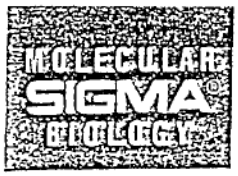
QUANTIFICATION DES REPONSES AUX CHIMIOTHÉRAPIES :

- **Réponses objectives :** Réponses complètes + Réponses partielles;
- **Rémissions complètes :** Disparition de tous les signes de tumeur pendant un minimum de quatre semaines;
- **Rémissions partielles :** Diminution de plus de 50% des lésions tumorales (produit de deux diamètres de lésions mesurables), sans progression des autres lésions ni apparition de nouvelles lésions, pendant une durée de quatre semaines minimum;
- **Stabilisations :** Diminution de moins de 50% ou augmentation d'une ou plusieurs lésions mesurables;

DEFINITIONS:

- **Randomisé :** Sélection aléatoire des patients;
- **Exérèse :** Ablation d'une partie de l'organisme, d'un organe, d'une partie d'organe;
- **Pléiotropique :** Résistance multiple vis à vis de plusieurs drogues;
- **Clastique :** qui entraîne de nombreuses cassures;

MARQUEURS : Bst E[R]



D-9793 Lot 23H6749

Lambda BstE II Digest

Store below 0° C

PRODUCT SUMMARY

Suitable for use as a molecular weight marker for agarose gel electrohoresis.

A_{260}/A_{280} Ratio: 1.9

Concentration: 400 μg/ml

COMMENTS

For laboratory use only.
Not for drug, household or other uses.

Ethidium bromide background can be reduced by destaining 30-45 minutes in 1X electrophoresis buffer.

Storage Buffer
10 mM Tris-HCl, pH 8.0
0.1 mM EDTA

SUITABILITY ASSAY
5 μl Lambda BstEII Digest
diluted to 0.05-0.1 μg/μl in water
2 μl gel loading solution (G-2526)
(0.05% w/v bromophenol blue,
40% w/v sucrose, 0.1 M EDTA pH 8.0)

The above solution was heated to 65° C for 5 minutes and quick cooled on ice. 0.25 ug and 0.5 μg were loaded on a 0.7% agarose (A-9539) submarine-type minigel. Agarose gel electrophoresis was performed in 1X TBE (0.89 M Tris borate, pH approx. 8.3, containing 2 mM EDTA). Lambda BstE II Digest was run with appropriate DNA fragment size standards at 50-80 volts until the tracking dye reached the bottom of the gel. After staining 15-20 minutes in 1 μg/ml ethidium bromide 12 of 14 bands (702-8,454 bp) were clearly resolved and the pattern was consistent with the indicated fragment sizes.

Fragment Sizes: base pairs (bp)

8,454
7,242
6,369
5,686
4,822
4,324
3,675
2,323
1,929
1,371
1,264
702
224
117

Ref: Daniels, D.L., et al., Appendix II: Complete Annotated Lambda Sequence in Lambda-II, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1983) eds. Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Stahl, F.W. and Weisberg, R.A.

MARQUEURS : 1Kb Ladder[R]

GIBCO BRL

LIFE TECHNOLOGIES, I

This product is distributed for research use only. It has r been approved for diagnostic or drug purposes nor for : ministration to humans or animals.

Product: 1 Kb DNA Ladder

Cat. No.: 5615SA/SB

Lot No.: CNJ104

Size: 250 µg/1000 µg; 1.00 µg/µl

Storage Conditions: -20°C

Patent: 440306

DESCRIPTION:

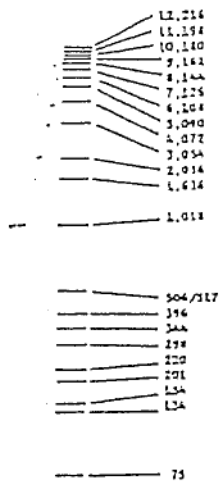
The 1 Kb DNA Ladder has been qualified as an ethidium bromide-stainable marker for gel electrophoresis. The fragments can also be radioactively labeled by one of the following methods*: (i) Labeling the 5'ends with T4 polynucleotide kinase; (ii) Filling in the 3' recessed ends with *E. coli* DNA polymerase I or the large fragment of DNA Polymerase I; (iii) Partial exonucleolytic degradation and resynthesis with T4 DNA polymerase. The last method is most efficient. Separation of the labeled fragments from other radioactive material is recommended after the labeling reaction, using BRL's NACS™ - 32 PREPAC™ (Cat. No. 1525NP or 1526NP).

*The following corresponding enzymes and nucleic acid labeling systems are available from BRL: T4 Polynucleotide Kinase (Cat. No. 5004SA/SB); 3' DNA Terminus Labeling System (Cat. No. 8060SA); DNA Polymerase I (Cat. No. 8005SA/SB); T4 DNA Polymerase Labeling System (Cat. No. 8140SA).

COMPONENTS:

5615SA/SB 1 Kb DNA Ladder Lot No. CNJ104

FRAGMENT SIZE
(base pairs)



STORAGE BUFFER:
10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
50 mM NaCl
0.1 mM EDTA

NOTES:

1. During agarose gel electrophoresis (1.2% agarose) with tris-acetate (pH 7.6) as running buffer, bromphenol blue migrates together with the 506/517 bp double band.
2. For best results combine 5 µg 1 Kb DNA ladder fragments with 2 µl of a solution containing 1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) bromphenol blue, 0.1 M EDTA, 50% (v/v) glycerol. Heat at 65°C for 5 min. and load the entire sample onto the gel. If the ionic strength of the sample is too low this can cause blurring of the bands.
3. The 1636 bp band and all bands less than 1000 bp are generated from pBR322.
4. Handle aseptically.

QUALITY CONTROL DATA:

1. Upon electrophoresis of 5µg 1 Kb DNA Ladder on a 1.2% agarose gel for 9.5 cm (bromphenol blue front) under BRL's standard conditions and after staining with ethidium bromide, all bands larger than 600 bp must be distinguishable.
2. Upon labeling of the DNA with ^{32}P by any one of the three methods mentioned above and subsequent gel electrophoresis of the labeled DNA, the autoradiograph of the gel must show bands with a clear background.
3. The A_{260}/A_{280} ratio is routinely observed to be in the range of 1.8 - 2.0.

STRUCTURE OF FRAGMENT[1]

```
5'-TCGGG_______________C
      C_______________GAGCC-5'
      |_______________|
          1014 bp
```

Reference: [1]Hartley, J. L. and Donelson, J. E. (1980) *Nature*, Vol. 286, 860.

The BRL Technical Services Department welcomes all questions concerning the use of this product. Please call the number for your area listed below.

Gaithersburg, MD 20884-9940 U.S.A. "Gibco TECHNLINE" 1-800-828-6686
D-4000 Ratingen Germany "Gibco TECHNLINE" 49 44 73 43 11
1214 Segrinstein Germany "Gibco TECHNLINE" 0721 710 42
4024 AD Breda The Netherlands "Gibco TECHNLINE" 076 41 69 44
Prinsen Park 3 & 5 Glasgow "Gibco TECHNLINE" 0800 358 8 80
AAL TECHNLINE 0500 83 83 80
1800 Vilvoorde Belgium "Gibco TECHNLINE" 031 32 28 40
13673 Cedex Aix-en-Provence France "Gibco TECHNLINE" 11 24 94 94 40
Tsuen Wan, New Territories Hong Kong "Gibco TECHNLINE" 0414157
Penrose Auckland & New Zealand "Gibco TECHNLINE" 0800-187593
4019 Basel Switzerland "Gibco TECHNLINE" 061 45 22 22
Bulleen, Victoria Canada "Gibco TECHNLINE" 416 335-1235
1000 Berlin 33 Germany "Gibco TECHNLINE" 030 402 7059
Chuo-ku, Tokyo 103 Japan "Gibco TECHNLINE" 03 663 8241
Chiyoda-ku, Tokyo Japan "Gibco TECHNLINE" 03 35 34 55
"Gibco TECHNLINE" is a service mark of Life Technologies, Inc.
Printed on Recycled Paper

SEQUENCE DU GENE MDR1 (EMBL data library).

ID HSMDR1 standard; RNA; PRI; 4646 BP.
DE Human P-glycoprotein (MDR1) mRNA, complete cds.

REF 1 : Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B."Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells". Cell,47:381-389(1986).

REF 2 : Ueda K., Clark D.P., Chen C.J., Roninson I.B., Gottseman M.M., Pastan I. "The human multidrug resistance (mdr1) gene: cDNA cloning and transcription initiation". J. Biol. Chem. 262:505-508(1987).

REF 3 : Kioka N., Tsubota J., Kakehi Y., Komano T., Gottesman M.M., Pastan I., Ueda K. "P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal : Normal P-glycoprotein carries 185-Gly with an altered pattern of multidrug resistance". Biochem. Biophys. Res. Commun., 162:224-231(1989).

289..4646 = "MDR1 mRNA
425..4267 = "P-glycoprotein"
1075..1094 = amorce 1
1829..1846 = amorce 2

Sequence 4646 BP; 1371 A; 892 C; 1129 G; 1254 T; 0 other.

```
   1    CCTACTCTAT TCAGATATTC TCCAGATTCC TAAAGATTAG AGATCATTTC
  51    TCATTCTCCT AGGAGTACTC ACTTCAGGAA GCAACCAGAT AAAAGAGAGG
 101    TGCAACGGAA GCCAGAACAT TCCTCCTGGA AATTCAACCT GTTTCGCAGT
 151    TTCTCGAGGA ATCAGCATTC AGTCAATCCG GGCCGGGAGC AGTCATCTGT
 201    GGTGAGGCTG ATTGGCTGGG CAGGAACAGC GCCGGGGCGT GGGCTGAGCA
 251    CAGCGCTTCG CTCTCTTTGC CACAGGAAGC CTGAGCTCAT TCGAGTAGCG
 301    GCTCTTCCAA GCTCAAAGAA GCAGAGGCCG CTGTTCGTTT CCTTTAGGTC
 351    TTTCCACTAA AGTCGGAGTA TCTTCTTCCA AGATTTCACG TCTTGGTGGC
 401    CGTTCCAAGG AGCGCGAGGT CGGGATGGAT CTTGAAGGGG ACCGCAATGG
 451    AGGAGCAAAG AAGAAGAACT TTTTTAAACT GAACAATAAA AGTGAAAAAG
 501    ATAAGAAGGA AAAGAAACCA ACTGTCAGTG TATTTTCAAT GTTTCGCTAT
 551    TCAAATTGGC TTGACAAGTT GTATATGGTG GTGGGAACTT TGGCTGCCAT
 601    CATCCATGGG GCTGGACTTC CTCTCATGAT GCTGGTGTTT GGAGAAATGA
 651    CAGATATCTT TGCAAATGCA GGAAATTTAG AAGATCTGAT GTCAAACATC
 701    ACTAATAGAA GTGATATCAA TGATACAGGG TTCTTCATGA ATCTGGAGGA
 751    AGACATGACC AGGTATGCCT ATTATTACAG TGGAATTGGT GCTGGGGTGC
 801    TGGTTGCTGC TTACATTCAG GTTTCATTTT GGTGCCTGGC AGCTGGAAGA
 851    CAAATACACA AAATTAGAAA ACAGTTTTTT CATGCTATAA TGCGACAGGA
 901    GATAGGCTGG TTTGATGTGC ACGATGTTGG GGAGCTTAAC ACCCGACTTA
 951    CAGATGATGT CTCTAAGATT AATGAAGTTA TTGGTGACAA AATTGGAATG
1001    TTCTTTCAGT CAATGGCAAC ATTTTTCACT GGGTTTATAG TAGGATTTAC
1051    ACGTGGTTGG AAGCTAACCC TTGTGATTTT GGCCATCAGT CCTGTTCTTG
1101    GACTGTCAGC TGCTGTCTGG GCAAAGATAC TATCTTCATT TACTGATAAA
1151    GAACTCTTAG CGTATGCAAA AGCTGGAGCA GTAGCTGAAG AGGTCTTGGC
1201    AGCAATTAGA ACTGTGATTG CATTTGGAGG ACAAAAGAAA GAACTTGAAA
1251    GGTACAACAA AAATTTAGAA GAAGCTAAAA GAATTGGGAT AAAGAAAGCT
1301    ATTACAGCCA ATATTTCTAT AGGTGCTGCT TTCCTGCTGA TCTATGCATC
1351    TTATGCTCTG GCCTTCTGGT ATGGGACCAC CTTGGTCCTC TCAGGGGAAT
1401    ATTCTATTGG ACAAGTACTC ACTGTATTCT TTTCTGTATT AATTGGGGCT
1451    TTTAGTGTTG GACAGGCATC TCCAAGCATT GAAGCATTTG CAAATGCAAG
1501    AGGAGCAGCT TATGAAATCT TCAAGATAAT TGATAATAAG CCAAGTATTG
1551    ACAGCTATTC GAAGAGTGGG CACAAACCAG ATAATATTAA GGGAAATTTG
1601    GAATTCAGAA ATGTTCACTT CAGTTACCCA TCTCGAAAAG AAGTTAAGAT
1651    CTTGAAGGGC CTGAACCTGA AGGTGCAGAG TGGGCAGACG GTGGCCCTGG
1701    TTGGAAACAG TGGCTGTGGG AAGAGCACAA CAGTCCAGCT GATGCAGAGG
1751    CTCTATGACC CCACAGAGGG GATGGTCAGT GTTGATGGAC AGGATATTAG
1801    GACCATAAAT GTAAGGTTTC TACGGGAAAT CATTGGTGTG GTGAGTCAGG
1851    AACCTGTATT GTTTGCCACC ACGATAGCTG AAAACATTCG CTATGGCCGT
1901    GAAAATGTCA CCATGGATGA GATTGAGAAA GCTGTCAAGG AAGCCAATGC
1951    CTATGACTTT ATCATGAAAC TGCCTCATAA ATTTGACACC CTGGTTGGAG
2001    AGAGAGGGGC CCAGTTGAGT GGTGGGCAGA AGCAGAGGAT CGCCATTGCA
2051    CGTGCCCTGG TTCGCAACCC CAAGATCCTC CTGCTGGATG AGGCCACGTC
2101    AGCCTTGGAC ACAGAAAGCG AAGCAGTGGT TCAGGTGGCT CTGGATAAGG
2151    CCAGAAAAGG TCGGACCACC ATTGTGATAG CTCATCGTTT GTCTACAGTT
```

2201 CGTAATGCTG ACGTCATCGC TGGTTTCGAT GATGGAGTCA TTGTGGAGAA
2251 AGGAAATCAT GATGAACTCA TGAAAGAGAA AGGCATTTAC TTCAAACTTG
2301 TCACAATGCA GACAGCAGGA AATGAAGTTG AATTAGAAAA TGCAGCTGAT
2351 GAATCCAAAA GTGAAATTGA TGCCTTGGAA ATGTCTTCAA ATGATTCAAG
2401 ATCCAGTCTA ATAAGAAAAA GATCAACTCG TAGGAGTGTC CGTGGATCAC
2451 AAGCCCAAGA CAGAAAGCTT AGTACCAAAG AGGCTCTGGA TGAAAGTATA
2501 CCTCCAGTTT CCTTTTGGAG GATTATGAAG CTAAATTTAA CTGAATGGCC
2551 TTATTTTGTT GTTGGTGTAT TTTGTGCCAT TATAAATGGA GGCCTGCAAC
2601 CAGCATTTGC AATAATATTT TCAAAGATTA TAGGGGTTTT TACAAGAATT
2651 GATGATCCTG AAACAAAACG ACAGAATAGT AACTTGTTTT CACTATTGTT
2701 TCTAGCCCTT GGAATTATTT CTTTTATTAC ATTTTTCCTT CAGGGTTTCA
2751 CATTTGGCAA AGCTGGAGAG ATCCTCACCA AGCGGCTCCG ATACATGGTT
2801 TTCCGATCCA TGCTCAGACA GGATGTGAGT TGGTTTGATG ACCCTAAAAA
2851 CACCACTGGA GCATTGACTA CCAGGCTCGC CAATGATGCT GCTCAAGTTA
2901 AAGGGGCTAT AGGTTCCAGG CTTGCTGTAA TTACCCAGAA TATAGCAAAT
2951 CTTGGGACAG GAATAATTAT ATCCTTCATC TATGGTTGGC AACTAACACT
3001 GTTACTCTTA GCAATTGTAC CCATCATTGC AATAGCAGGA GTTGTTGAAA
3051 TGAAAATGTT GTCTGGACAA GCACTGAAAG ATAAGAAAGA ACTAGAAGGT
3101 GCTGGGAAGA TCGCTACTGA AGCAATAGAA AACTTCCGAA CCGTTGTTTC
3151 TTTGACTCAG GAGCAGAAGT TTGAACATAT GTATGCTCAG AGTTTGCAGG
3201 TACCATACAG AAACTCTTTG AGGAAAGCAC ACATCTTTGG AATTACATTT
3251 TCCTTCACCC AGGCAATGAT GTATTTTTCC TATGCTGGAT GTTTCCGGTT
3301 TGGAGCCTAC TTGGTGGCAC ATAAACTCAT GAGCTTTGAG GATGTTCTGT
3351 TAGTATTTTC AGCTGTTGTC TTTGGTGCCA TGGCCGTGGG GCAAGTCAGT
3401 TCATTTGCTC CTGACTATGC CAAAGCCAAA ATATCAGCAG CCCACATCAT
3451 CATGATCATT GAAAAAACCC CTTTGATTGA CAGCTACAGC ACGGAAGGCC
3501 TAATGCCGAA CACATTGGAA GGAAATGTCA CATTTGGTGA AGTTGTATTC
3551 AACTATCCCA CCCGACCGGA CATCCCAGTG CTTCAGGGAC TGAGCCTGGA
3601 GGTGAAGAAG GGCCAGACGC TGGCTCTGGT GGGCAGCAGT GGCTGTGGGA
3651 AGAGCACAGT GGTCCAGCTC CTGGAGCGGT TCTACGACCC CTTGGCAGGG
3701 AAAGTGCTGC TTGATGGCAA AGAAATAAAG CGACTGAATG TTCAGTGGCT
3751 CCGAGCACAC CTGGGCATCG TGTCCCAGGA GCCCATCCTG TTTGACTGCA
3801 GCATTGCTGA GAACATTGCC TATGGAGACA ACAGCCGGGT GGTGTCACAG
3851 GAAGAGATCG TGAGGGCAGC AAAGGAGGCC AACATACATG CCTTCATCGA
3901 GTCACTGCCT AATAAATATA GCACTAAAGT AGGAGACAAA GGAACTCAGC
3951 TCTCTGGTGG CCAGAAACAA CGCATTGCCA TAGCTCGTGC CCTTGTTAGA
4001 CAGCCTCATA TTTTGCTTTT GGATGAAGCC ACGTCAGCTC TGGATACAGA
4051 AAGTGAAAAG GTTGTCCAAG AAGCCCTGGA CAAAGCCAGA GAAGGCCGCA
4101 CCTGCATTGT GATTGCTCAC CGCCTGTCCA CCATCCAGAA TGCAGACTTA
4151 ATAGTGGTGT TTCAGAATGG CAGAGTCAAG GAGCATGGCA CGCATCAGCA
4201 GCTGCTGGCA CAGAAAGGCA TCTATTTTTC AATGGTCAGT GTCCAGGCTG
4251 GAACAAAGCG CCAGTGAACT CTGACTGTAT GAGATGTTAA ATACTTTTTA
4301 ATATTTGTTT AGATATGACA TTTATTCAAA GTTAAAAGCA AACACTTACA
4351 GAATTATGAA GAGGTATCTG TTTAACATTT CCTCAGTCAA GTTCAGAGTC
4401 TTCAGAGACT TCGTAATTAA AGGAACAGAG TGAGAGACAT CATCAAGTGG
4451 AGAGAAATCA TAGTTTAAAC TGCATTATAA ATTTTATAAC AGAATTAAAG
4501 TAGATTTTAA AAGATAAAAT GTGTAATTTT GTTTATATTT TCCCATTTGG
4551 ACTGTAACTG ACTGCCTTGC TAAAAGATTA TAGAAGTAGC AAAAAGTATT
4601 GAAATGTTTG CATAAAGTGT CTATAATAAA ACTAAACTTT CATGTG

SEQUENCE DU GENE GSTπ (EMBL data library).

ID HSGSTPIG standard; DNA; PRI; 4261 B.
DE Human glutathione S-transferase pi gene

REF 1 : Morrow C.S., Medicine Branch, National Cancer Institute, National. Institutes of Health, Building 10, RM6N119, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, USA.

REF 2 : Morrow C.S., Cowan K.H., Goldsmith M.E. "Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene". Gene 75:3-11(1989).

"chromosome 11q13"
mRNA : 1225..1254, 1543..1578, 1873..1979, 2094..2181, 2547..2650, 3513..3620, 3798..4061.
TATA-signal : 1194..1198
exons : 1225..1254;1543..1578; 1873..1979; 2094..2181; 2547..2650; 3513..3620; 3798..4061
introns: 1255..1542; 1579..1872; 1980..2093; 2182..2546; 2651..3512; 3621..3797
polyA-signal : 4041..4046
amorce 1 : 1543..1562.
amorce 2 : 2691..2710.

Sequence 4261 BP; 924 A; 1229 C; 1298 G; 810 T; 0 other.

```
   1    AACAAGAGAT CAATATCTAG AATAAATGGA GATCTGCAAA TCAACAGAAA
  51    GTAGGCAGCA AAGCCAAAGA AAATAGCCTA AGGCACAGCC ACTAAAAGGA
 101    ACGTGATCAT GTCCTTTGCA GGGACATGGG TGGAGCTGGA AGCCGTTAGC
 151    CTCAGCAAAC TCACACAGGA ACAGAAAACC AGCGAGACCG CATGGTCTCA
 201    CTTATAAGTG GGAGCTGAAC AATGAGAACA CATGGTCACA TGGCGGCGAT
 251    CAACACACAC TGGTGCCTGT TGAGCGGGGT GCTGGGGAGG GAGAGTACCA
 301    GGAAGAATAG CTAAGGGATA CTGGGCTTAA TACCTGGGTG ATGGGATGAT
 351    CTGTACAGCA AACCATCATG GCGCACACAC CTATGTAACA AACCTGCACA
 401    TCCTGCACAT GTACCCCAGA ACTTCAAATA AAAGTTGGAC GGCCAGGCGT
 451    GGTGGCTCAC GCCTGTAATC CCAGCACTTT GGGAAGCCGA GGCGTGCAGA
 501    TCACCTAAGG TCAGGAGTTC GAGACCAGCC CGGCCAACAT GGTGAAACCC
 551    CGTCTCTACT AAAAATACAA AAATCAGCCA GATGTGGCAC GCACCTATAA
 601    TTCCACCTAC TCGGGAGGCT GAAGCAGAAT TGCTTGAACC CGAGAGGCGG
 651    AGGTTGCAGT GAGCCGCCGA GATCGCGCCA CTGCACTCCA GCCTGGGCCA
 701    CAGCGTGAGA CTACGTCATA AAATAAAATA AAATAACACA AAATAAAATA
 751    AAATAAAATA AAATAAAATA AAATAATAAA ATAAAATAAA ATAAAATAAA
 801    ATAAAATAAA ATAAAGCAAT TTCCTTTCCT CTAAGCGGCC TCCACCCCTC
 851    TCCCCTGCCC TGTGAAGCGG GTGTGCAAGC TCCGGGATCG CAGCGGTCTT
 901    AGGGAATTTC CCCCCGCGAT GTCCCGGCGC GCCAGTTCGC TGCGCACACT
 951    TCGCTGCGGT CCTCTTCCTG CTGTCTGTTT ACTCCCTAGG CCCCGCTGGG
1001    GACCTGGGAA AGAGGGAAAG GCTTCCCCGG CCAGCTGCGC GGCGACTCCG
1051    GGGACTCCAG GGCGCCCCTC TGCGGCCGAC GCCCGGGGTG CAGCGGCCGC
1101    CGGGGCTGGG GCCGGCGGGA GTCCGCGGGA CCCTCCAGAA GAGCGGCCGG
1151    CGCCGTGACT CAGCACTGGG GCGGAGCGGG GCGGGACCAC CCTTATAAGG
1201    CTCGGAGGCC GCGAGGCCTT CGCTGGAGTT TCGCCGCCGC AGTCTTCGCC
1251    ACCAGTGAGT ACGCGCGGCC CGCTCCCCGG GGATGGGGCT CAGAGCTCCC
1301    AGCATGGGGC CAACCCGCAG CATCAGGCCC GGGCTCCCGG CAGGGCTCCT
1351    CGCCCACCTC GAGACCCGGG ACGGGGGCCT AGGGGACCCA GGACGTCCCC
1401    AGTGCCGTTA GCGGCTTTCA GGGGGCCCGG AGCGCCTCGG GGAGGGATGG
1451    GACCCCGGGG GCGGGGAGGG GGGGCAGGCT GCGCTCACCG CGCCTTGGCA
1501    TCCTCCCCCG GGCTCCAGCA AACTTTTCTT TGTTCGCTGC AGTGCCGCCC
1551    TACACCGTGG TCTATTTCCC AGTTCGAGGT AGGAGCATGT GTCTGGCAGG
1601    GAAGGGAGGC AGGGGCTGGG GCTGCAGCCC ACAGCCCCTC GCCCACCCGG
1651    AGAGATCCGA ACCCCCTTAT CCCTCCGTCG TGTGGCTTTT ACCCCGGGCC
1701    TCCTTCCTGT TCCCCGCCTC TCCCGCCATG CCTGCTCCCC GCCCCAGTGT
1751    TGTGTGAAAT CTTCGGAGGA ACCTGTTTAC CTGTTCCCTC CCTGCACTCC
1801    TGACCCCTCC CCGGGTTGCT GCGAGGCGGA GTCGGCCCGG TCCCCACATC
1851    TCGTACTTCT CCCTCCCCGC AGGCCGCTGC GCGGCCCTGC GCATGCTGCT
1901    GGCAGATCAG GGCCAGAGCT GGAAGGAGGA GGTGGTGACC GTGGAGACGT
1951    GGCAGGAGGG CTCACTCAAA GCCTCCTGCG TAAGTGACCA TGCCCGGGCA
2001    AGGGGAGGGG GTGCTGGGCC TTAGGGGGCT GTGACTAGGA TCGGGGGACG
2051    CCCAAGCTCA GTGCCCCTCC CTGAGCCATG CCTCCCCCAA CAGCTATACG
2101    GGCAGCTCCC CAAGTTCCAG GACGGAGACC TCACCCTGTA CCAGTCCAAT
2151    ACCATCCTGC GTCACCTGGG CCGCACCCTT GGTGAGTCTT GAACCTCCAA
2201    GTCCAGGGCA GGCATGGGCA AGCCTCTGCC CCCGGAGCCC TTTTGTTTAA
2251    ATCAGCTGCC CCGCAGCCCT CTGGAGTGGA GGAAACTGAG ACCCACTGAG
```

```
2301    GTTACGTAGT TTGCCCAAGG TCAAGCCTGG GTGCCTGCAA TCCTTGCCCT
2351    GTGCCAGGCT GCCTCCCAGG TGTCAGGTGA GCTCTGAGCA CCTGCTGTGT
2401    GGCAGTCTCT CATCCTTCCA CGCACATCCT CTTCCCCTCC TCCCAGGCTG
2451    GGGCTCACAG ACAGCCCCCT GGTTGGCCCA TCCCCAGTGA CTGTGTGTTG
2501    ATCAGGCGCC CAGTCACGCG GCCTGCTCCC CTCCACCCAA CCCCAGGGCT
2551    CTATGGGAAG GACCAGCAGG AGGCAGCCCT GGTGGACATG GTGAATGACG
2601    GCGTGGAGGA CCTCCGCTGC AAATACATCT CCCTCATCTA CACCAACTAT
2651    GTGAGCATCT GCACCAGGGT TGGGCACTGG GGGCTGAACA AAGAAAGGGG
2701    CTTCTTGTGC CCTCACCCCC CTTACCCCTC AGGTGGCTTG GGCTGACCCC
2751    TTCTTGGGTC AGGGTGCAGG GGCTGGGTCA GCTCTGGGCC AGGGGCCCAG
2801    GGGCCTGGGA CAAGACACAA CCTGCACCCT TATTGCCTGG GACATCAACC
2851    AGCCAAGTAA CGGGTCATGG GGGCGAGTGC AAGGACAGAG ACCTCCAGCA
2901    ACTGGTGGTT TCTGATCTCC TGGGGTGGCG AGGGCTTCCT GGAGTAGCCA
2951    GAGGTGGAGG AGGATTTGTC GCCAGTTTCT GGATGGAGGT GCTGGCACTT
3001    TTAGCTGAGG AAAATATGCA GACACAGAGC ACATTTGGGG ACCTGGGACC
3051    AGTTCAGCAG AGGCAGCGTG TGTGCGCGTG CGTGTGCGTG TGTGTGCGTG
3101    TGTGTGTGTA CGCTTGCATT TGTGTCGGGT GGGTAAGGAG ATAGAGATGG
3151    GCGGGCAGTA GGCCCAGGTC CCGAAGGCCT TGAACCCACT GGTTTGGAGT
3201    CTCCTAAGGG CAATGGGGGC CATTGAGAAG TCTGAACAGG GCTGTGTCTG
3251    AATGTGAGGT CTAGAAGGAT CCTCCAGAGA AGCCAGCTCT AAAGCTTTTG
3301    CAATCATCTG GTGAGAGAAC CCAGCAAGGA TGGACAGGCA GAATGGAATA
3351    GAGATGAGTT GGCAGCTGAA GTGGACAGGA TTTGGTACTA GCCTGGTTGT
3401    GGGGAGCAAG CAGAGGAGAA TCTGGGACTC TGGTGTCTGG CCTGGGGCAG
3451    ACGGGGGTGT CTCAGGGGCT GGGAGGGATG AGAGTAGGAT GATACATGGT
3501    GGTGTCTGGC AGGAGGCGGG CAAGGATGAC TATGTGAAGG CACTGCCCGG
3551    GCAACTGAAG CCTTTTGAGA CCCTGCTGTC CCAGAACCAG GGAGGCAAGA
3601    CCTTCATTGT GGGAGACCAG GTGAGCATCT GGCCCCATGC TGTTCCTTCC
3651    TCGCCACCCT CTGCTTCCAG ATGGACACAG GTGTGAGCCA TTTGTTTAGC
3701    AAAGCAGAGC AGACCTAGGG GATGGGCTTA GGCCCTCTGC CCCCAATTCC
3751    TCCAGCCTGC TCCCGCTGGC TGAGTCCCTA GCCCCCCTGC CCTGCAGATC
3801    TCCTTCGCTG ACTACAACCT GCTGGACTTG CTGCTGATCC ATGAGGTCCT
3851    AGCCCCTGGC TGCCTGGATG CGTTCCCCCT GCTCTCAGCA TATGTGGGGC
3901    GCCTCAGTGC CCGGCCCAAG CTCAAGGCCT TCCTGGCCTC CCCTGAGTAC
3951    GTGAACCTCC CCATCAATGG CAACGGGAAA CAGTGAGGGT TGGGGGGACT
4001    CTGAGCGGGA GGCAGAGTTT GCCTTCCTTT CTCCAGGACC AATAAAATTT
4051    CTAAGAGAGC TACTATGAGC ACTGTGTTTC CTGGGACGGG GCTTAGGGGT
4101    TCTCAGCCTC GAGGTCGGTG GGAGGGCAGA GCAGAGGACT AGAAAACAGC
4151    TCCTCCAGCA CAGTCAGTGG CTTCCTGGAG CCCTCAGCCT GGCTGTGTTT
4201    ACTGAACCTC ACAAACTAGA AGAGGAAGAA AAAAAAAGAG AGAGAGAAAC
4251    AAAGAGAAAT A
```

SEQUENCE DU GENE TOPO II (EMBL data library).

```
ID  HSTOPII    standard; RNA; PRI; 4792 BP.
DE  Human DNA topoisomerase II (top2) mRNA, complete cds.

REF 1 : Tsai-Pflugfelder,M., Liu,L.-F.F., Liu,A.A., Tewey,K.M., Whang-Peng,J.,
Knutsen,T., Huebner,K., Croce,C.M. and Wang,J.C. Cloning and sequencing of cDNA encoding
human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:7177-7181 (1988)

chromosome 17q21-22.
amorce 1 : 22..41.
amorce 2 : 1001..1020.

SEQUENCE 1682 a    857 c   1038 g   1215 t

   1    GGACCACCCA GTACCGATCC CTTCACGACC GTCACCATGG AAGTGTCACC
  51    ATTGCAGCCT GTAAATGAAA ATATGCAAGT CAACAAAATA AAGAAAAATG
 101    AAGATGCTAA GAAAAGACTG TCTGTTGAAA GAATCTATCA AAAGAAAACA
 151    CAATTGGAAC ATATTTTGCT CCGCCCAGAC ACCTACATTG GTTCTGTGGA
 201    ATTAGTGACC CAGCAAATGT GGGTTTACGA TGAAGATGTT GGCATTAACT
 251    ATAGGGAAGT CACTTTTGTT CCTGGTTTGT ACAAAATCTT TGATGAGATT
 301    CTAGTTAATG CTGCGGACAA CAAACAAAGG GACCCAAAAA TGTCTTGTAT
 351    TAGAGTCACA ATTGATCCGG AAAACAATTT AATTAGTATA TGGAATAATG
 401    GAAAAGGTAT TCCTGTTGTT GAACACAAAG TTGAAAAGAT GTATGTCCCA
 451    GCTCTCATAT TTGGACAGCT CCTAACTTCT AGTAACTATG ATGATGATGA
 501    AAAGAAAGTG ACAGGTGGTC GAAATGGCTA TGGAGCCAAA TTGTGTAACA
 551    TATTCAGTAC CAAATTTACT GTGGAAACAG CCAGTAGAGA ATACAAGAAA
 601    ATGTTCAAAC AGACATGGAT GGATAATATG GGAAGAGCTG GTGAGATGGA
 651    ACTCAAGCCC TTCAATGGAG AAGATTATAC ATGTATCACC TTTCAGCCTG
 701    ATTTGTCTAA GTTTAAAATG CAAAGCCTGG ACAAAGATAT TGTTGCACTA
 751    ATGGTCAGAA GAGCATATGA TATTGCTGGA TCCACCAAAG ATGTCAAAGT
 801    CTTTCTTAAT GGAAATAAAC TGCCAGTAAA AGGATTTCGT AGTTATGTGG
 851    ACATGTATTT GAAGGACAAG TTGGATGAAA CTGGTAACTC CTTGAAAGTA
 901    ATACATGAAC AAGTAAACCA CAGGTGGGAA GTGTGTTTAA CTATGAGTGA
 951    AAAAGGCTTT CAGCAAATTA GCTTTGTCAA CAGCATTGCT ACATCCAAGG
1001    GTGGCAGACA TGTTGATTAT GTAGCTGATC AGATTGTGAC TAAACTTGTT
1051    GATGTTGTGA AGAAGAAGAA CAAGGGTGGT GTTGCAGTAA AAGCACATCA
1101    GGTGAAAAAT CACATGTGGA TTTTTGTAAA TGCCTTAATT GAAAACCCAA
1151    CCTTTGACTC TCAGACAAAA GAAAACATGA CTTTACAACC CAAGAGCTTT
1201    GGATCAACAT GCCAATTGAG TGAAAAATTT ATCAAAGCTG CCATTGGCTG
1251    TGGTATTGTA GAAAGCATAC TAAACTGGGT GAAGTTTAAG GCCCAAGTCC
1301    AGTTAAACAA GAAGTGTTCA GCTGTAAAAC ATAATAGAAT CAAGGGAATT
1351    CCCAAACTCG ATGATGCCAA TGATGCAGGG GGCCGAAACT CCACTGAGTG
1401    TACGCTTATC CTGACTGAGG GAGATTCAGC CAAAACTTTG GCTGTTTCAG
1451    GCCTTGGTGT GGTTGGGAGA GACAAATATG GGGTTTTCCC TCTTAGAGGA
1501    AAAATACTCA ATGTTCGAGA AGCTTCTCAT AAGCAGATCA TGGAAAATGC
1551    TGAGATTAAC AATATCATCA AGATTGTGGG TCTTCAGTAC AAGAAAAACT
1601    ATGAAGATGA AGATTCATTG AAGACGCTTC GTTATGGGAA GATAATGATT
1651    ATGACAGATC AGGACCAAGA TGGTTCCCAC ATCAAAGGCT TGCTGATTAA
1701    TTTTATCCAT CACAACTGGC CCTCTCTTCT GCGACATCGT TTTCTGGAGG
1751    AATTTATCAC TCCCATTGTA AAGGTATCTA AAAACAAGCA AGAAATGGCA
1801    TTTTACAGCC TTCCTGAATT TGAAGAGTGG AAGAGTTCTA CTCCAAATCA
1851    TAAAAAATGG AAAGTCAAAT ATTACAAAGG TTTGGGCACC AGCACATCAA
1901    AGGAAGCTAA AGAATACTTT GCAGATATGA AAAGACATCG TATCCAGTTC
1951    AAATATTCTG GTCCTGAAGA TGATGCTGCT ATCAGCCTGG CCTTTAGCAA
2001    AAAACAGATA GATGATCGAA AGGAATGGTT AACTAATTTC ATGGAGGATA
2051    GAAGACAACG AAAGTTACTT GGGCTTCCTG AGGATTACTT GTATGGACAA
2101    ACTACCACAT ATCTGACATA TAATGACTTC ATCAACAAGG AACTTATCTT
2151    GTTCTCAAAT TCTGATAACG AGAGATCTAT CCCTTCTATG GTGGATGGTT
2201    TGAAACCAGG TCAGAGAAAG GTTTTGTTTA CTTGCTTCAA ACGGAATGAC
2251    AAGCGAGAAG TAAAGGTTGC CCAATTAGCT GGATCAGTGG CTGAAATGTC
2301    TTCTTATCAT CATGGTGAGA TGTCACTAAT GATGACCATT ATCAATTTGG
2351    CTCAGAATTT TGTGGGTAGC AATAATCTAA ACCTCTTGCA GCCCATTGGT
2401    CAGTTTGGTA CCAGGCTACA TGGTGGCAAG GATTCTGCTA GTCCACGATA
2451    CATCTTTACA ATGCTCAGCT CTTTGGCTCG ATTGTTATTT CCACCAAAAG
2501    ATGATCACAC GTTGAAGTTT TTATATGATG ACAACCAGCG TGTTGAGCCT
2551    GAATGGTACA TTCCTATTAT TCCCATGGTG CTGATAAATG GTGCTGAAGG
2601    AATCGGTACT GGGTGGTCCT GCAAAATCCC CAACTTTGAT GTGCGTGAAA
```

```
2651    TTGTAAATAA CATCAGGCGT TTGATGGATG GAGAAGAACC TTTGCCAATG
2701    CTTCCAAGTT ACAAGAACTT CAAGGGTACT ATTGAAGAAC TGGCTCCAAA
2751    TCAATATGTG ATTAGTGGTG AAGTAGCTAT TCTTAATTCT ACAACCATTG
2801    AAATCTCAGA GCTTCCCGTC AGAACATGGA CCCAGACATA CAAAGAACAA
2851    GTTCTAGAAC CCATGTTGAA TGGCACCGAG AAGACACCTC CTCTCATAAC
2901    AGACTATAGG GAATACCATA CAGATACCAC TGTGAAATTT GTTGTGAAGA
2951    TGACTGAAGA AAAACTGGCA GAGGCAGAGA GAGTTGGACT ACACAAAGTC
3001    TTCAAACTCC AAACTAGTCT CACATGCAAC TCTATGGTGC TTTTTGACCA
3051    CGTAGGCTGT TTAAAGAAAT ATGACACGGT GTTGGATATT CTAAGAGACT
3101    TTTTTGAACT CAGACTTAAA TATTATGGAT TAAGAAAAGA ATGGCTCCTA
3151    GGAATGCTTG GTGCTGAATC TGCTAAACTG AATAATCAGG CTCGCTTTAT
3201    CTTAGAGAAA ATAGATGGCA AAATAATCAT TGAAAATAAG CCTAAGAAAG
3251    AATTAATTAA AGTTCTGATT CAGAGGGGAT ATGATTCGGA TCCTGTGAAG
3301    GCCTGGAAAG AAGCCCAGCA AAAGGTTCCA GATGAAGAAG AAAATGAAGA
3351    GAGTGACAAC GAAAAGGAAA CTGAAAAGAG TGACTCCGTA ACAGATTCTG
3401    GACCAACCTT CAACTATCTT CTTGATATGC CCCTTTGGTA TTTAACCAAG
3451    GAAAAGAAAG ATGAACTCTG CAGGCTAAGA AATGAAAAAG AACAAGAGCT
3501    GGACACATTA AAAAGAAAGA GTCCATCAGA TTTGTGGAAA GAAGACTTGG
3551    CTACATTTAT TGAAGAATTG GAGGCTGTTG AAGCCAAGGA AAAACAAGAT
3601    GAACAAGTCG GACTTCCTGG GAAAGGGGGG AAGGCCAAGG GGAAAAAAAC
3651    ACAAATGGCT GAAGTTTTGC CTTCTCCGCG TGGTCAAAGA GTCATTCCAC
3701    GAATAACCAT AGAAATGAAA GCAGAGGCAG AAAAGAAAAA TAAAAAGAAA
3751    ATTAAGAATG AAAATACTGA AGGAAGCCCT CAAGAAGATG GTGTGGAACT
3801    AGAAGGCCTA AAACAAAGAT TAGAAAAGAA ACAGAAAAGA GAACCAGGTA
3851    CAAAGACAAA GAAACAAACT ACATTGGCAT TTAAGCCAAT CAAAAAAGGA
3901    AAGAAGAGAA ATCCCTGGCC TGATTCAGAA TCAGATAGGA GCAGTGACGA
3951    AAGTAATTTT GATGTCCCTC CACGAGAAAC AGAGCCACGG AGAGCAGCAA
4001    CAAAAACAAA ATTCACAATG GATTTGGATT CAGATGAAGA TTTCTCAGAT
4051    TTTGATGAAA AAACTGATGA TGAAGATTTT GTCCCATCAG ATGCTAGTCC
4101    ACCTAAGACC AAAACTTCCC CAAAACTTAG TAACAAAGAA CTGAAACCAC
4151    AGAAAAGTGT CGTGTCAGAC CTTGAAGCTG ATGATGTTAA GGGCAGTGTA
4201    CCACTGTCTT CAAGCCCTCC TGCTACACAT TTCCCAGATG AAACTGAAAT
4251    TACAAACCCA GTTCCTAAAA AGAATGTGAC AGTGAAGAAG ACAGCAGCAA
4301    AAAGTCAGTC TTCCACCTCC ACTACCGGTG CCAAAAAAAG GGCTGCCCCA
4351    AAAGGAACTA AAAGGGATCC AGCTTTGAAT TCTGGTGTCT CTCAAAAGCC
4401    TGATCCTGCC AAAACCAAGA ATCGCCGCAA AAGGAAGCCA TCCACTTCTG
4451    ATGATTCTGA CTCTAATTTT GAGAAAATTG TTTCGAAAGC AGTCACAAGC
4501    AAGAAATCCA AGGGGGAGAG TGATGACTTC CATATGGACT TTGACTCAGC
4551    TGTGGCTCCT CGGGCAAAAT CTGTACGGGC AAAGAAACCT ATAAAGTACC
4601    TGGAAGAGTC AGATGAAGAT GATCTGTTTT AAAATGTGAG GCGATTATTT
4651    TAAGTAATTA TCTTACCAAG CCCAAGACTG GTTTTAAAGT TACCTGAAGC
4701    TCTTAACTTC CTCCCCTCTG AATTTAGTTT GGGGAAGGTG TTTTTAGTAC
4751    AAGACATCAA AGTGAAGTAA AGCCCAAGTG TTCTTTAGCT TT
```

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE-PHARMACIE

AUTORISATION D'IMPRESSION

De la Thèse dont l'intitulé est : Etude génétique de la chimiosensibilité d'un mélanome malin métastatique greffé sur souris athymiques

CANDIDAT : Mlle VERGNAUD SABRINA

VU

GRENOBLE, le 7 février 1994

Le Président du Jury

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE-PHARMACIE

VU

P/Le Président de l'Université
Joseph FOURIER GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine

GRENOBLE, le 7 février 1994

Le Directeur de l'UFR de Pharmacie

J. ROCHAT

RESUME :
ETUDE GENETIQUE DE LA CHIMIOSENSIBILITE D'UN MELANOME MALIN METASTATIQUE GREFFE SUR SOURIS ATHYMIQUES.

Pour évaluer les retentissements génétiques de l'association fotémustine (Muphoran) - dacarbazine (Déticène) utilisée en clinique, la récidive ganglionnaire, d'un mélanome achromique a été transplantée, par voie sous cutanée, sur des souris athymiques âgées de six semaines. Le premier objectif de cette étude a été la recherche de doses uniques ou fractionnées tolérées par l'animal par voie intra-péritonéale. Dans un second temps, la chimiosensibilité de l'association (fotémustine 20 mg/kg x 2; 6 et 10 jours après la greffe - dacarbazine 20 mg/kg x 4; 14, 15, 16 et17 jours après la greffe) a été étudiée. Au sacrifice des animaux (25 jours après la greffe) une inhibition tumorale significative (témoins poids moyen tumoral : 13,07 ± 1 g - association 8 ± 1 g - 0,001<P<0,01) voisine de celle obtenue avec la fotémustine seule (8,41 ± 1 g - 0,001<P<0,01). Ce modèle expérimental semble donc peu répondre à la dacarbazine. L'analyse cytogénétique du mélanome non traité (nombre modal : 61 chromosomes, anomalies du 1, 4, du 6 dont t(2;6), t(13;14), del(17)p + marqueurs) du mélanome traité à la fotémustine seule (nombre modal : 59 chromosomes - appariton de double-minutes - tendance à la polyploïdisation) et du mélanome traité par l'association (nombre modal : 59 chromosomes - quelques double-minutes - perte de l'i(8)q mais apparition de plusieurs der(12)) montre une apparente stabilité. Les expériences de biologie moléculaire effectuées sur les différents prélèvements ont montré que la fotémustine, utilisée seule (doses uniques et surtout fractionnées), pourrait favoriser, d'une façon transitoire l'amplification et/ou la surexpression du gène de chimiorésistance pléïotropique MDR1 alors que le gène de la glutathion-S- transférase π ne semble pas impliqué et le gène de la topoisomérase II absent ce qui laisse supposer que des traitements comportant le VP16 seraient un échec.

Les résultats rapportés dans ce travail confirme l'intérêt des greffes sur souris athymiques. Celles-ci donnent, en effet, la possibilité de mener à bien des études complémentaires, multiples, indispensables à la compréhension des modifications génétiques liées à la chimiothérapie.

Mots clefs : mélanome malin; souris athymiques; chimiothérapies; cytogénétique; chimiorésistance.