

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

ANNEE 2006

N°

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS**

**CHAMPAGNE-ARDENNE**

**MENTION : PHARMACIE**

**Spécialité : Biomolécules et Dynamique Cellulaire**

Soutenue publiquement le 25 avril 2006

par

Gilles BREUZARD

Né le 29 septembre 1978 à la Charité-sur-Loire (58)

**MISE EN EVIDENCE DE L'INTEGRATION MEMBRANAIRE  
DE LA MITOXANTRONE A L'ECHELLE DE LA CELLULE VIVANTE  
PAR SPECTROSCOPIE RAMAN SERS  
ET TRANSFERT D'ENERGIE DE FLUORESCENCE**

Jury

Rapporteurs : Pr. AUBARD J., Professeur des Universités, Paris VII ;  
Pr. MELY Y., Professeur des Universités, Strasbourg.  
Examineurs : Pr. MANFAIT M., Professeur des Universités, Reims ;  
Pr. CHOURPA I., Professeur des Universités, Tours ;  
Pr. JEANNESSON P., Professeur des Universités, Reims.  
Directeur de thèse : Pr. MILLOT J.-M., Professeur des Universités, Reims.

# **TABLE DES MATIERES**

<i>REMERCIEMENTS</i> .....	vi
<i>LISTE DES ABBREVIATIONS</i> .....	x
<i>INTRODUCTION GENERALE</i> .....	1
<i>ASPECT BIBLIOGRAPHIQUE</i> .....	4
1. Rappel historique.....	5
2. Famille des antibiotiques antinéoplasiques .....	5
2.1. Les anthracènediones : la mitoxantrone .....	6
2.2. Posologie et visée chimiothérapeutique de la mitoxantrone .....	6
3. La membrane plasmique, un des sièges de la résistance aux médicaments anticancéreux	7
3.1. Généralités.....	7
3.2. La résistance multiple, une origine protéique .....	8
3.2.1. La P-glycoprotéine .....	8
3.2.2. La Multidrug Resistance Protein 1 .....	9
3.2.3. La Breast Cancer Resistance Protein .....	10
3.2.4. Substrats et modulateurs des protéines à efflux .....	11
3.3. Profil lipidique dans la résistance multiple .....	13
3.3.1. Modification de la composition lipidiques dans les cancers .....	13
3.3.2. Les propriétés biophysiques de la membranes.....	14
3.4. Les protéines à efflux et leur environnement lipidique.....	16
4. La spectroscopie SERS : Surface-Enhanced Raman Scattering .....	17
4.1. Rappel sur la spectroscopie Raman.....	17
4.1.1. Historique .....	17
4.1.2. Principe de diffusion Raman.....	19
4.2. Spectroscopie Raman SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering).....	21
4.2.1. Principe de l'effet SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering).....	22
4.2.2. Electrodes .....	25
4.2.3. Films métalliques .....	26
4.2.4. Colloïdes.....	26

4.3.	Les avantages de la spectroscopie SERS .....	27
5.	La spectroscopie à fluorescence .....	28
5.1.	Principe de l'émission de fluorescence .....	28
5.2.	Spectres d'excitation et d'émission .....	30
5.3.	Le rendement quantique .....	31
5.4.	Fluorescence Resonance Energy Transfer .....	31
5.4.1.	Principe du transfert d'énergie .....	31
5.4.2.	Applications du transfert d'énergie de fluorescence .....	34
5.4.3.	Atténuation de fluorescence .....	36
 <i>MATERIEL ET METHODES</i> .....		 38
1.	Système biologique .....	39
1.1.	Lignées cellulaires .....	39
1.2.	Conditions de culture .....	40
2.	Effecteurs pharmacologiques .....	41
3.	Marqueurs fluorescents de membrane cellulaire .....	42
4.	Test de cytotoxicité .....	42
5.	Mesure de l'accumulation de la mitoxantrone par spectrophotométrie .....	44
6.	La spectroscopie SERS .....	45
6.1.	Préparation du colloïde .....	45
6.2.	Instrumentation .....	46
6.2.1.	La micro-spectroscopie SERS .....	47
6.2.2.	La macro-spectroscopie SERS .....	47
6.3.	Acquisition des spectres SERS .....	47
6.3.1.	Par micro-spectroscopie SERS .....	48
6.3.2.	Par macro-spectroscopie SERS .....	48
7.	La microscopie confocale à épifluorescence .....	49
7.1.	Instrumentation .....	49
7.1.1.	Source lumineuse .....	51
7.1.2.	Le balayage du faisceau laser .....	51
7.1.3.	La détection .....	51
7.1.4.	Les filtres .....	52
7.1.5.	La résolution des images .....	53
7.1.6.	Le rôle de l'iris .....	53

7.2.	Localisation de l'émission de fluorescence de la mitoxantrone.....	54
7.3.	Transfert d'énergie de la sonde vers la mitoxantrone .....	55
8.	La spectrofluorimétrie .....	56
8.1.	Instrumentation.....	56
8.2.	Mesure de l'intégration membranaire de la mitoxantrone par transfert d'énergie...	57
8.2.1.	Protocole expérimental.....	57
8.2.2.	Calcul des efficacités d'atténuation de la fluorescence de la sonde par la mitoxantrone.....	58
8.2.3.	Calcul des temps de décroissance de la fluorescence de la sonde.....	61
9.	La microspectrofluorimétrie confocale par balayage laser .....	61
9.1.	Instrumentation.....	61
9.1.1.	Confocalité .....	62
9.1.2.	Excitation laser .....	64
9.1.3.	Élimination de la raie excitatrice.....	64
9.1.4.	Le système dispersif.....	64
9.1.5.	Le détecteur .....	64
9.1.6.	Mode d'acquisition par point des spectres d'émission de fluorescence.....	65
9.2.	Acquisition des spectres de fluorescence de la mitoxantrone cellulaire .....	65
<i>RESULTATS</i> .....		66
1.	Mise en évidence de l'intégration membranaire de la mitoxantrone .....	67
1.1.	Caractérisation de la mitoxantrone membranaire par la spectroscopie SERS .....	70
1.1.1.	Signature spectrale de la mitoxantrone .....	70
1.1.2.	Analyse semi-quantitative .....	70
1.1.3.	Localisation des grains de colloïde .....	71
1.1.4.	Signature spectrale de la mitoxantrone cellulaire .....	71
1.1.5.	Origine cellulaire du signal .....	73
1.2.	Étude comparée du devenir de la mitoxantrone chez les cellules résistantes .....	75
1.2.1.	Résistance cellulaire à la mitoxantrone.....	75
1.2.2.	Intensité SERS de la mitoxantrone chez la souche résistante .....	79
1.2.3.	Diffusion transmembranaire de la mitoxantrone par l'analyse de l'atténuation de fluorescence de la sonde .....	89
1.3.	Conclusions .....	96
2.	Modulation de l'intégration membranaire de la mitoxantrone.....	97

2.1.	Action de fluidifiants sur l'accumulation du médicament .....	97
2.1.1.	Imagerie cellulaire par microscopie confocale à fluorescence.....	97
2.1.2.	Analyse quantitative du médicament intracellulaire .....	99
2.1.3.	Spectres d'émission de la mitoxantrone dans un environnement membranaire 103	
2.2.	Intensité SERS de la mitoxantrone - conséquence de la fluidité membranaire .....	108
2.3.	Atténuation de fluorescence par la mitoxantrone – conséquence de la fluidité membranaire.....	111
2.3.1.	Mise en évidence.....	111
2.3.2.	Application du FRET à l'étude d'inhibiteurs de l'activité à efflux.....	117
2.4.	Conclusion.....	119
 <i>DISCUSSION</i> .....		121
1.	Origine membranaire de la diffusion SERS .....	122
2.	Une intégration partielle de la mitoxantrone dans la membrane.....	123
3.	Effet de la modulation de la fluidité membranaire.....	126
4.	Influence d'inhibiteurs MDR sur les propriétés biophysiques de la membrane .....	130
 <i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i> .....		132
 <i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> .....		136
 <i>ANNEXES 1 à 3</i> .....		173
 <i>LISTE DES FIGURES</i> .....		190
 <i>LISTE DES TABLEAUX</i> .....		194
 <i>RESUME</i> .....		196

## **REMERCIEMENTS**

**C**e travail a été réalisé au sein de l'Unité MéDIAN CNRS UMR 6142, sous la direction de Monsieur le Professeur Michel Manfait. Je vous remercie de m'avoir accueilli chaleureusement dans votre équipe depuis mon DEA. La confiance que vous m'avez accordée pendant ces quatre années m'a permis de progresser rapidement. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

**A** Monsieur le Professeur Yves Mély, du laboratoire de Photophysique des Interactions Biomoléculaires – CNRS UMR 7034 (Université Louis Pasteur Strasbourg 1 – Illkirch). Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

**M**es remerciements les plus respectueux vont également à Monsieur le Professeur Jean Aubard, du laboratoire ITODYS – CNRS UMR 7086 (Université Denis Diderot – Paris 7) qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

**J**'adresse toute ma gratitude à Messieurs les Professeurs Igor Chourpa, du laboratoire de Chimie Analytique (Université François Rabelais – Tours), et Pierre Jeannesson, de l'Unité MéDIAN – CNRS UMR 6142 (Université de Pharmacie – Reims) pour votre disponibilité et votre sympathie. Je suis particulièrement honorée de votre présence dans ce jury de thèse.

**E**nfin, et surtout, à Monsieur le Professeur Jean-Marc Millot, de l'Unité MéDIAN CNRS UMR 6142 (Université de Pharmacie – Reims), mon directeur de thèse et mon maître de stage de DEA. Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de ton implication dans ce travail de thèse. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide, tes nombreux conseils, ton soutien sans faille, ta disponibilité et ton dynamisme. Sois assuré, Jean-Marc, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A toutes celles et tous ceux, membres du laboratoire  
qui m'ont patiemment soutenu et supporté au cours de ces années.

Cela n'a pas toujours été facile, je vous l'accorde.

Certains sont aujourd'hui des amis, j'en suis heureux.

Papa, Maman,  
Voilà, avec ce mémoire, mes études s'achèvent enfin !  
Mais croyez-moi, cela ne reste qu'un petit sacrifice face au vôtre.  
Aujourd'hui, vous pouvez être fiers de vous.  
Vous m'avez tant donné et appris tant de chose.  
Vous m'avez toujours fait confiance et vous m'avez toujours soutenu et entendu !  
Il est temps de penser maintenant un peu à vous !  
En tout cas, moi, je suis fier de vous  
Et je souhaite à tout le monde d'avoir des parents comme vous

Nelly ou nanette pour les intimes  
Ma p'tite frangine,  
« Tant d'années d'études... et il raconte toujours autant d'âneries ! »  
Faute d'assez de doigts, je ne compte plus le nombre de fois  
que j'ai pu t'entendre me le dire.  
Mais toi aussi, tu m'as toujours soutenu et entendu.

... Ce travail est donc aussi le vôtre.

*Ma Vicky, mon amour,  
Ces derniers mots, je te les consacre.*

*Enfin, nous voilà tous les deux au bout de notre thèse  
Cela n'aura pas été simple tous les jours !*

*Merci de ton aide et de ton soutien au quotidien*

*Mais bien au-delà de la thèse, c'est ton amour qui m'importe le plus,  
Pour toutes les petites mimiques qui me font rire,  
Pour toutes ces petites choses dont tu as le secret,  
Pour tous les petits plats vraiment succulents...  
... Tout simplement pour toi,  
Tu es mon rayon de soleil... du Liban.  
Ce travail t'appartient,*

*Je veux simplement te dire...*

*... Je t'aime*

## ***LISTE DES ABBREVIATIONS***

4Di-10ASP	4-(4-(didécylamino)styril)- <i>N</i> -méthylpyridinium
%	pourcent
°C	degré Celsius
$\lambda_{\text{Exc}}$	Longueur d'onde d'excitation
$\mu\text{g}$	microgramme
$\mu\text{L}$	microlitre
$\mu\text{m}$	micromètre
$\mu\text{M}$	micromolaire
$\mu\text{W}$	microWatt
Å	Angström
AB	Alcool benzylique
ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
$\text{CHCl}_3$	Chloroforme
$\text{CI}_{50}$	Concentration inhibitrice 50
$\text{cm}^{-1}$	par centimètre
$\text{cm}^2$	centimètre carré
CsA	Cyclosporine A
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOX	Doxorubicine
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTC	Fumitremorgine C
h	heure
HBSS	Hanks Buffer Saline Solution
HCT-116 R	HCT-116 résistante
HCT-116 S	HCT-116 sensible
IR	Index de résistance

kDa	kilo Dalton
M	molaire
m <sup>2</sup>	mètre carré
MDR	Multi-Drug Resistance
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
MM	Masse Molaire
MRP	Multidrug Resistance Protein
MTT	3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5 diphényl tétrazolium
MTX	Mitoxantrone
MXR	Mitoxantrone resistance
NBD	Nucleotide-Binding Domaine
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
P	Puissance du laser sur l'échantillon
PBS	Phosphate Buffer Solution
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
Pgp	P-glycoprotein
PI	Phosphatidylinositol
pmol	picomole
PMT	Photomultiplicateur
PS	Phosphatidylsérine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sec	seconde
SERS	Surface-Enhanced Resonance Scattering
SM	Sphingomyéline
VPL	Verapamil
u.a.	Unité arbitraire
W	Watt
mW	milliWatt

Les opinions exprimées dans cette thèse n'engagent que son auteur et en aucun cas la faculté de pharmacie de Reims.

Ce travail a été financé par la région Champagne-Ardenne et a fait l'objet de publications et de communications scientifiques suivantes :

### **Publications**

**BREUZARD G**, MANFAIT M and MILLOT JM.

Modulation of membrane-inserted mitoxantrone in wild and BCRP/MXR-overexpressed cells  
*Article soumis à BBA : Biomembranes en mars 2006.*

**BREUZARD G**, PIOT O, ANGIBOUST JF, MANFAIT M, CANDEIL L, DEL RIO M *et al.*  
Changes in adsorption and permeability of mitoxantrone on plasma membrane of BCRP/MXR resistant cells.

Biochem Biophys Res Commun (2005) ; **329** : 64-70.

**BREUZARD G**, ANGIBOUST JF, JEANNESSON P, MANFAIT M and MILLOT JM.  
Surface-Enhanced Raman Scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells.

Biochem Biophys Res Commun (2004) ; **320** : 615-621.

### **Communications**

**BREUZARD G**, ANGIBOUST JF, MANFAIT M and MILLOT JM.

Does the low intracellular uptake of mitoxantrone in BCRP/MXR resistant cells relate a higher drug adsorption on plasma membrane ?

*Poster présenté au Congrès de la Société Française de Biophysique, Anglet, France (2004).*

**BREUZARD G**, CANDEIL L, MANFAIT M and MILLOT JM.

Adsorption de la mitoxantrone sur la membrane plasmique de cellules vivantes BCRP/MXR.  
Mise en évidence par Surface-Enhanced Raman Scattering.

*Communiqué oral présenté au Congrès de l'Association Française de Cytométrie, Strasbourg, France (2003).*

*« La démarche scientifique n'utilise pas le verbe croire ; la science se contente de proposer des modèles explicatifs provisoires de la réalité ; et elle est prête à les modifier dès qu'une information nouvelle apporte une contradiction [...]. »*

Albert Jacquard (né en 1925).  
*Petite philosophie à l'usage des non-philosophes.*

***INTRODUCTION  
GENERALE***

---

La chimiothérapie est l'une des trois médecines communément pratiquées dans la lutte contre le cancer. Pour décrire les causes de l'échec de ce traitement curatif chez certains patients, le développement d'une résistance cellulaire aux médicaments anticancéreux a été proposé. Une surexpression de protéines à efflux, dont la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), et une modification du profil lipidique sont couramment décrites comme étant responsables de la résistance multiple aux composés anti-néoplasiques (MultiDrug Resistance ou MDR) (Garcia-Segura *et al.*, 1990 ; Gottesman, 2002 ; Hendrich *et al.*, 2003 ; Leonard *et al.*, 2003). L'efficacité des médicaments implique une optimisation de leur incorporation intracellulaire et une limitation de leur efflux au travers de la barrière cellulaire. Par conséquent, les détails de l'interaction de ces composés avec la membrane plasmique paraissent cruciaux pour la compréhension de leur cinétique de diffusion. Deux modèles de transport du médicament au travers de la membrane ont été proposés, à savoir (1) une diffusion *via* des pores transitoires ou des faiblesses au niveau de la bicouche lipidique ou (2) une intrusion dans la phase hydrophobe de la matrice membranaire suivi par une diffusion vers le cytoplasme (Erukova *et al.*, 2000).

Les interactions hydrophobes, la fluidité membranaire et la lipophilicité du médicament sont autant d'éléments décisifs pour une incorporation efficace du composé anticancéreux (Jedrzejczak *et al.*, 1999 ; Lecompte *et al.*, 2002 ; Przybylska *et al.*, 2003 ; Regev *et al.*, 1997 ; Schuldes *et al.*, 2001). L'implication des lipides dans la résistance aux médicaments pourrait reposer sur des modifications des propriétés de diffusion de la membrane. Callaghan *et al.* ont montré qu'une diminution ou une augmentation de la fluidité membranaire pouvait conduire à une accumulation plus importante des molécules anti-néoplasiques dans les cellules résistantes (Callaghan *et al.*, 1993 ; Callaghan *et al.*, 1992). Une modification de l'interaction des médicaments avec les cellules ne s'explique donc pas simplement par des changements de solubilité. Les travaux de Burns permettent d'entrevoir que la présence d'acides gras particuliers dans la membrane peut affecter profondément l'interaction de la mitoxantrone (MTX) avec les cellules (Burns *et al.*, 1988).

Les anthracyclines et MTX sont probablement les exemples les mieux étudiés dans les interactions médicament/membrane (Boon *et al.*, 2001 ; Butler *et al.*, 2002 ; Krylova *et al.*, 2003 ; Wielinga *et al.*, 2000). De nombreux travaux ont porté sur l'incorporation de ces composés *via* des bicouches reconstituées de phospholipides (Boon *et al.*, 2001 ; Butler *et al.*, 2001 ; Krylova *et al.*, 2004 ; Regev *et al.*, 2005), mais très peu d'entre eux ont eu pour support la membrane plasmique de cellules vivantes (Chaloupka *et al.*, 1999 ; Regev *et al.*, 1997). La relation entre le flux transmembranaire et la liaison du médicament avec la bicouche de phospholipides dans un modèle de résistance cellulaire reste donc mal définie.

La concentration intracellulaire du médicament est le résultat d'une compétition entre la diffusion passive, le transport actif et les processus métaboliques. La résistance cellulaire envers des agents anti-néoplasiques semble impliquer la structure de la membrane plasmique qui apparaît alors comme une barrière dynamique régulant les transferts moléculaires. Une perméabilité membranaire différente entre les cellules sensibles et résistantes pourrait être associée à des modifications d'interaction de MTX avec la membrane plasmique. Dans une première partie, nous analyserons l'intégration de MTX sur la membrane de cellules sensibles (HCT-116 S) et résistantes de type BCRP/MXR (HCT-116 R) par la spectroscopie SERS, et étudierons quelques propriétés physiques de cette interaction particulière. Cette méthode se caractérise, entre autre, par sa très grande sensibilité (jusqu'à une concentration de MTX de  $10^{-10}$  M). De plus, la spécificité chimique de la spectroscopie SERS permet d'observer les bandes Raman correspondant uniquement aux vibrations du chromophores. Cette technique est basée sur une amplification de plusieurs ordres de grandeur de l'intensité Raman (avec un gain de  $10^5$  dans le cas des réseaux de particules d'or) de molécules en contact avec la surface métallique « rugueuse » (Félidj *et al.*, 2002). D'autre part, la spectroscopie SERS est une technique optique non destructive particulièrement bien adaptée pour l'étude des interactions de molécules avec la membrane plasmique de cellules vivantes (Abdulaev *et al.*, 1987).

Dans le but de préciser la relation entre l'intégration et la diffusion membranaire de MTX chez les cellules sensibles et résistantes, le transfert d'énergie de la fluorescence (FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre les molécules de MTX et une sonde intégrée dans la membrane déterminera des propriétés de diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique. Cette méthode rend compte de l'interaction entre un composé fluorescent qui transfère son énergie d'excitation vers un autre composé fluorescent accepteur, uniquement lorsque ces deux entités sont à une très faible distance moléculaire (10 à 60 Å). Ce phénomène est un moyen privilégié pour démontrer l'interaction entre deux molécules au-delà d'une simple co-localisation optique dont la résolution ne dépasse pas  $\lambda/2$ .

Une application de cette étude portera sur les modifications de la perméabilité membranaire *via* des fluidifiants et des inhibiteurs de protéines ATP-asiques. Il a été décrit que de tels agents modulent la fluidité de la membrane, ce qui pourrait accélérer l'incorporation du médicament et perturber l'activité des protéines à efflux (Drori *et al.*, 1995 ; Eytan *et al.*, 1996 ; Regev *et al.*, 1999 ; Schuldes *et al.*, 2001). Les deux méthodes développées dans cette étude permettront d'apporter de nombreux éléments pour comprendre la pharmacocinétique trans-membranaire de MTX.

***ASPECT  
BIBLIOGRAPHIQUE***

---

## **1. Rappel historique**

Alors que la description des cancers remontent à la plus haute antiquité, les premières tentatives de traitement médical des tumeurs malignes remontent à un peu plus de 500 ans avec des préparations les plus diverses d'argent, de zinc ou encore de mercure. C'est en 1865 que Lissauer observe pour la première fois un effet anti-tumoral de l'arsénite de potassium (préparation de Fowler) chez un patient atteint de leucémie, mais ce n'est que 80 ans plus tard que naît véritablement la chimiothérapie. Cette naissance est liée à la guerre : on connaissait les gaz de moutarde comme l'Ypérite dès 1917 qui avait des propriétés irritantes sur les yeux, la peau et l'appareil respiratoire. Un peu plus tard, les effets leucopéniant et ulcérant des muqueuses digestives furent mis en évidence chez les militaires. Bien que ces gaz n'aient pas été utilisés au cours de la seconde guerre mondiale, ils ont été à l'origine d'un accident révélateur : le général Eisenhower craignant que les Allemands ne les utilisent avait fait stocké ces gaz à bord du *Liberty Ship John Harvey* dans le port de Bari en Italie en décembre 1943. Ce bateau fut bombardé par les allemands et les rescapés présentèrent de nombreux problèmes infectieux et hémorragiques avec un taux de mortalité de 13 %. C'est ainsi que furent découvertes les propriétés des Moutardes. Parallèlement, en 1942, Alfred Gilman testait chez un patient porteur de lymphosarcome très étendu et symptomatique la Moutarde à l'azote : le résultat obtenu fut spectaculaire avec une aplasie notable et trois cycles de traitement furent effectués avec toutefois une résistance lors du troisième cycle. Cette date marque le début de la chimiothérapie.

## **2. Famille des antibiotiques antinéoplasiques**

Les antibiotiques antinéoplasiques sont des substances qui inhibent ou préviennent le développement de cancers. C'est à Sidney Farber (Farber, 1950) que l'on doit la découverte des molécules anticancéreuses comme l'Actinomycine D puis la Mitomycine, la Mithracine, la Bléomycine et finalement les anthracyclines dont la Daunorubicine, Doxorubicine et suivantes très étudiées en Italie où certaines d'entre elles ont acquis des noms de personnages d'opéra de Puccini : la Marcellomycine, la Musettamycine, la Rudolfomycine. Le mécanisme supposé de ces molécules extraites des fermentations résulte d'une intercalation entre les brins de l'ADN du fait de leur structure plane. Parmi les nombreux membres de molécules intercalantes, trois sous-familles de molécules non liées à l'ADN comprennent les

anthracyclines, les anthracènes bishydrazones, et les anthracènediones, sous-famille d'intérêt dans notre étude.

### **2.1. Les anthracènediones : la mitoxantrone**

La mitoxantrone est un agent antinéoplasique dérivé de l'anthracènedione présentant trois cycles aromatiques et deux longues chaînes basiques latérales. Produit par synthèse, les cibles intracellulaires de cette molécule sont à rapprocher de ceux des anthracyclines. Tout d'abord, la mitoxantrone inhibe la réplication de l'ADN selon vraisemblablement deux mécanismes : (i) une intercalation entre les paires de bases azotées de l'ADN et de l'ARN double brin (Lown *et al.*, 1984 ; Traganos *et al.*, 1980), et (ii) les chaînes basiques latérales de la molécule pourraient se lier de façon électrostatique avec les sites anioniques externes de l'hélice d'ADN (Bowden *et al.*, 1985). D'autre part, ce composé pourrait agir sur l'ARN-polymérase ADN-dépendante bloquant la synthèse de certaines protéines, et ce de façon dose dépendante (Perry *et al.*, 1998). Le troisième mécanisme d'action de la mitoxantrone serait de provoquer une cassure des acides nucléiques par stabilisation du complexe topo-isomérase II/ADN (Nelson *et al.*, 1984 ; Tewey *et al.*, 1984). Enfin, cette molécule semble agir sur toutes les phases du cycle cellulaire, y compris la phase G0 (Durr, 1984).

### **2.2. Posologie et visée chimiothérapeutique de la mitoxantrone**

La mitoxantrone est une molécule connue depuis 25 ans, et commercialisée depuis 20 ans en temps que médicament anticancéreux sous les noms de Novantrone<sup>®</sup> ou Elsep<sup>®</sup>. La mitoxantrone s'administre par voie veineuse à la dose de 12 mg par cycle, répétée toutes les trois à quatre semaines.

Les principales indications thérapeutiques sont le traitement des cancers du sein (Calais, 2004 ; Fields *et al.*, 1998), de la prostate (Osborne *et al.*, 1983), mais aussi pour des leucémies aiguës myéloblastiques (Koc *et al.*, 2004 ; Sternberg *et al.*, 2000) et des lymphomes non hodgkinien (Armitage *et al.*, 2004 ; Hagemester *et al.*, 2005). La mitoxantrone peut être également recommandée pour lutter contre le cancer du naso-pharynx (Dugan *et al.*, 1993 ; Hu *et al.*, 1992). Enfin, l'administration de mitoxantrone (Elsep<sup>®</sup>), seule ou associée à la méthylprednisolone, chez des patients atteints de sclérose en plaque a pu montrer un ralentissement de l'évolution de la maladie et un espacement des rechutes (Jeffery *et al.*, 2004 ; Weinstock-Guttman *et al.*, 2000).

Cependant, il paraît important de rappeler que le profil de sécurité de la mitoxantrone est associé à une cardiotoxicité, une hématotoxicité et la survenue de leucémies chimio-induites (Chaplain *et al.*, 2000 ; Shvidel *et al.*, 2003). De plus, les patients traités souffrent pour la plupart de troubles gastriques (nausées et de vomissements) et d'alopecie (commune à la majorité des chimiothérapies).

### **3. La membrane plasmique, un des sièges de la résistance aux médicaments anticancéreux**

#### **3.1. Généralités**

Les cellules cancéreuses font véritablement preuve d'une multiplicité de procédés pour développer des mécanismes de défense contre les traitements curatifs de la chimiothérapie. Elles peuvent ainsi devenir résistantes non pas à un médicament donné, mais parfois à toute une famille d'agents antinéoplasiques. Cette résistance est appelée résistance multiple, ou plus couramment en anglais multidrug resistance (MDR), et peut être définie comme étant « la capacité des cellules exposées à un médicament de développer une résistance à d'autres molécules structurellement et fonctionnellement différentes » (Ford *et al.*, 1990).

La résistance multiple se manifeste souvent par une surexpression de protéines membranaires de la famille ABC (ATP-binding cassette) telles que la P-glycoprotéine (Pgp) ou la Multidrug Resistance associated Protein (MRP) (Cole *et al.*, 1992 ; Gottesman, 1993 ; Scheper *et al.*, 1993), ou plus récemment la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) (Doyle *et al.*, 1998 ; Ross, 2000 ; Ross *et al.*, 2000 ; Ross *et al.*, 1999). De plus, il peut y avoir une redistribution intracellulaire des médicaments anticancéreux due à des modifications physiologiques comme une acidification de certains organites (Altan *et al.*, 1998 ; Schindler *et al.*, 1996). Une détoxification des agents anticancéreux par le système glutathion et son enzyme glutathion-S-transférase (Zaman *et al.*, 1995), mais également des modifications quantitatives et/ou qualitatives de cibles cellulaires telles que les topo-isomérases (résistance atypique) (Beck *et al.*, 1994 ; Fraser *et al.*, 1995) peuvent avoir lieu. Enfin, une altération des voies de l'apoptose ou encore des modifications du métabolisme de certains lipides comme les sphingolipides peuvent intervenir dans la résistance multiple (Hannun *et al.*, 2000 ; Lavie *et al.*, 1996).

## 3.2. La résistance multiple, une origine protéique

### 3.2.1. La P-glycoprotéine

La première protéine identifiée comme étant responsable de la résistance aux médicaments anticancéreux fut la P-glycoprotéine (Pgp). Identifiée pour la première fois en 1976 (Juliano *et al.*, 1976), cette protéine est essentiellement localisée au niveau membranaire. Elle est responsable de l'efflux des molécules antinéoplasiques et le transport du composé est ATP dépendant puisqu'il s'effectue contre le gradient de concentration des agents anticancéreux (Endicott *et al.*, 1989 ; Gottesman *et al.*, 1993).

La Pgp est une glycoprotéine membranaire de 170 kDa constituée de 1280 acides aminés (Ambudkar *et al.*, 1999). Le gène *MDR1* localisé sur le chromosome 7 code pour cette protéine. Elle est composée de deux sous-unités homologues comportant chacune six domaines hydrophobes transmembranaires suivis par un domaine cytoplasmique de fixation de l'ATP (Nucleotide-binding domaine ou NBD). Les domaines N- et C-terminaux sont cytosoliques (figure 1).

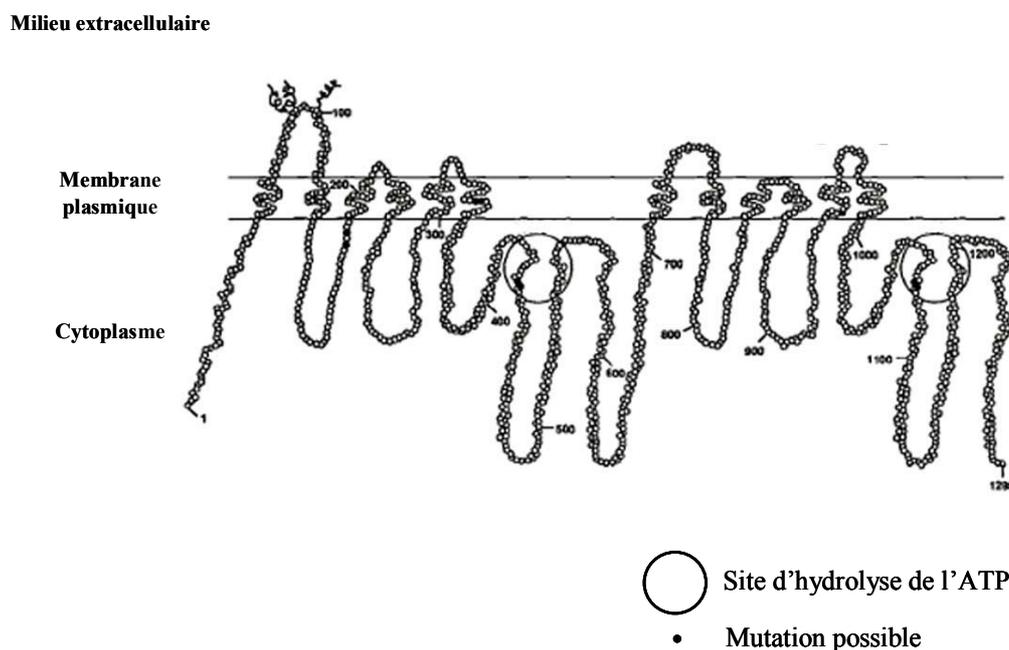


Figure 1. Structure de la P-glycoprotéine humaine présentée par Gottesman *et al.* (Gottesman *et al.*, 1993).

Il est à noter que la localisation de la Pgp n'est pas limitée qu'aux cellules tumorales résistantes, mais également dans des tissus « normaux » tels que le colon, l'intestin, les glandes surrénales, les reins, le foie, la barrière hémato-encéphalique et le placenta.

### 3.2.2. La Multidrug Resistance Protein 1

Lors de la découverte de la MRP1 en 1992, il avait été observé que les molécules antinéoplasiques étaient modifiées au niveau intracellulaire et devenaient solubles dans l'eau (Ishikawa, 1992). L'hypothèse d'une conjugaison de ces composés avec le glutathion, le sulfate ou encore le glucuronate fut émise. La formation d'un complexe plus hydrophile permet ainsi la diffusion de celui-ci hors de la cellule, et a suggéré l'existence d'une pompe appelée en premier lieu GS-X puis multidrug-resistance associated protein (MRP1) (Cole *et al.*, 1992). Depuis, ce n'est pas moins de 9 MRP qui ont été découvertes (Kool *et al.*, 1997 ; Paulusma *et al.*, 1996 ; Tammur *et al.*, 2001).

La MRP1 mature est une phosphoprotéine glycosylée de 190 kDa codée par le gène *MRP1* sur le chromosome 16, et dotée d'une activité d'efflux ATP dépendante. Il existe deux types de structures pour les MRP, une première possédant 17 segments transmembranaires (MRP1, 2, 3, 6) (figure 2) et une seconde avec 12 segments transmembranaires (MRP4, 5, 7, 8). Ces protéines présentent 15 % d'homologie avec la Pgp. Par conséquent, de nombreux substrats de la MRP1 semblent être communs avec la Pgp.

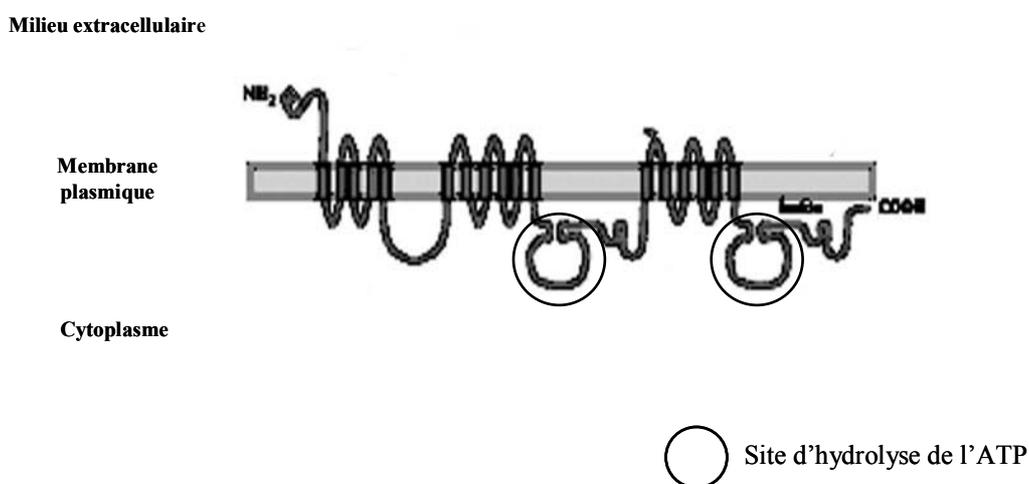


Figure 2. Structure de la P-glycoprotéine humaine selon Konno *et al.* (Konno *et al.*, 2003).

De nombreuses tumeurs expriment la protéine MRP1 comme les leucémies, les fibrosarcomes et le carcinome du poumon. Tout comme dans le cas de la Pgp, on retrouve la MRP1 dans les tissus sains comme le placenta (Maliepaard *et al.*, 2001).

### 3.2.3. La Breast Cancer Resistance Protein

Dans le cas de cancer du sein, il a été observé la mise en place d'une résistance aux agents anticancéreux au cours du traitement chimio-thérapeutique. En 1990, Chen *et al.* développent chez une lignée cellulaire issue d'un carcinome mammaire humain (MCF 7/AdrVp) une résistance en présence de doxorubicine et de verapamil, un inhibiteur des protéines Pgp et MRP1 (Chen *et al.*, 1990). Il s'est révélé plus tard que ces cellules montrent une résistance croisée à la mitoxantrone, la doxorubicine et la daunorubicine sans pour autant sur-exprimer ni la Pgp ni la MRP1 (Lee *et al.*, 1997 ; Ross *et al.*, 1999). Il a été montré que la lignée MCF 7/AdrVp sur-exprime une protéine de la famille des ABC appelée Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) (Doyle *et al.*, 1998).

Rocchi *et al.* ont étudié l'expression de la BCRP par Western blot dans des cellules de carcinome mammaire MCF 7/MX et des cellules de colon S1-M1-3.2, sélectionnées en présence de mitoxantrone, mais également des cellules MCF 7/AdrVp et des cellules MCF 7 sélectionnées en présence de topotécan ou transfectées par le gène BCRP (Rocchi *et al.*, 2000). Ainsi, ils ont pu montrer que le gène codant pour la BCRP est situé sur le chromosome 4q22. Cette protéine est constituée de 655 acides aminés et d'un poids moléculaire de 72,6 kDa. Contrairement à la Pgp ou la MRP1, la BCRP est constituée d'un seul site de liaison à l'ATP, situé du côté N-terminal et de six domaines transmembranaires (Allikmets *et al.*, 1998 ; Mao *et al.*, 2005 ; Ross, 2000 ; Ross *et al.*, 2000) (figure 3). Des homo- ou des hétérodimères semblent devoir se former pour permettre l'efflux des composés anticancéreux.

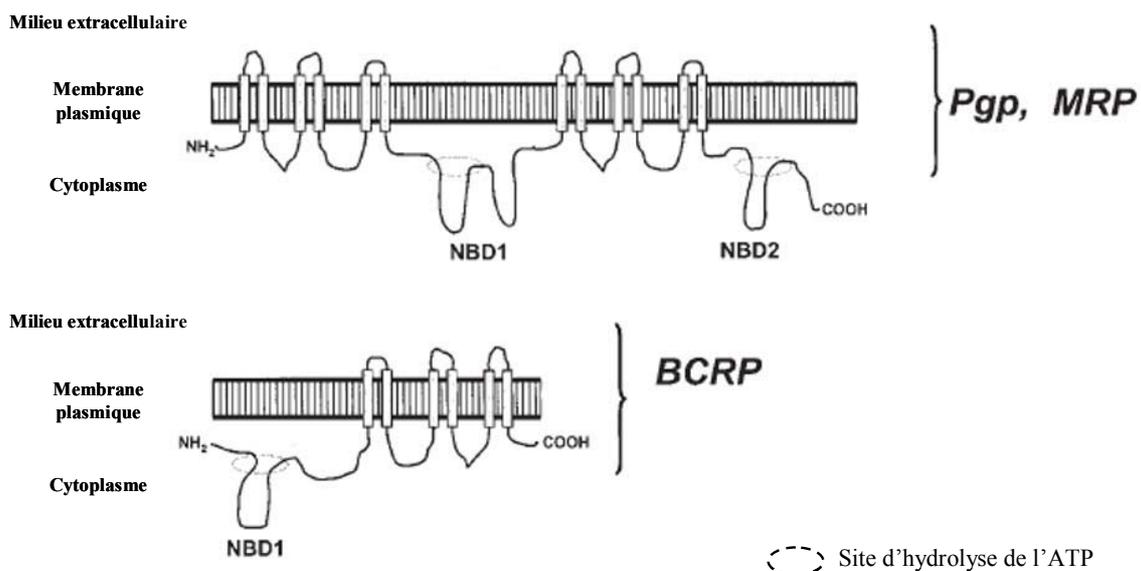
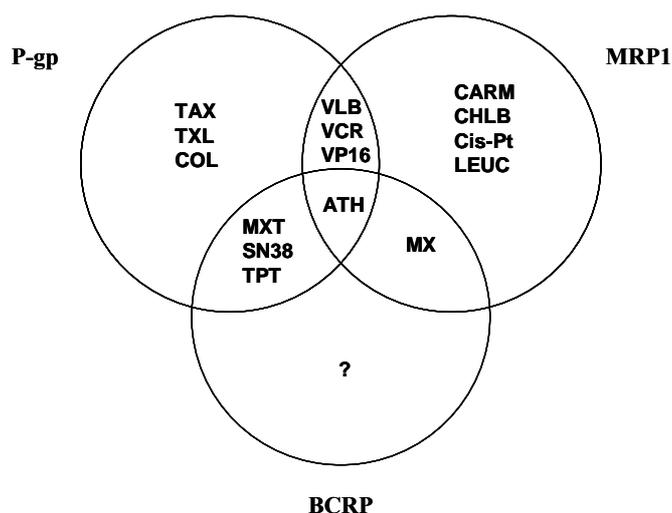


Figure 3. Comparaison des structures de la Breast Cancer Resistant Protein (BCRP), de la P-glycoprotéine (Pgp) et de la Multidrug-Resistance associated Protein (MRP1) selon Ross (Ross, 2000).

La surexpression de la BCRP, appelée également Mitoxantrone Resistance Protein (MXR) ou Placenta ABC Protein (ABC-P) est observée dans plusieurs lignées cellulaires sélectionnées *in vitro* en présence de mitoxantrone ou de topotécan comme le colon, l'estomac, les fibrosarcomes, les myélome ou encore les ovaires (Maliepaard *et al.*, 2001 ; Ross *et al.*, 1999 ; Scheffer *et al.*, 2000).

### 3.2.4. Substrats et modulateurs des protéines à efflux

Les trois protéines majeures responsables du phénotype MDR ont en commun de pouvoir reconnaître et d'effluer un large spectre de molécules, structuralement et fonctionnellement très différentes. De plus, chaque type de protéine a certains substrats spécifiques. La Pgp est capable de transporter aussi bien les composés très hydrophobes que les molécules non chargées ou très faiblement chargées, tandis que la famille des MRP transporte préférentiellement les conjugués anioniques hydrophobes et ne peut qu'expulser que les médicaments hydrophobes non chargés (Diah *et al.*, 2001 ; Greenberger *et al.*, 1988 ; Lalloo *et al.*, 2004 ; Leier *et al.*, 1994). Par ailleurs, faire une liste exhaustive des substrats pris en charge par la BCRP est actuellement très difficile, d'autant plus que de nombreuses BCRP mutées ont été observé dans de récentes études (Allen *et al.*, 2002 ; Mao *et al.*, 2005 ; Rajendra *et al.*, 2003 ; Robey *et al.*, 2003 ; Shiozawa *et al.*, 2004). La figure 4 compare certains substrats pris en charge par les protéines Pgp, MRP1 et BCRP connus à ce jour.



**Figure 4. Agents antinéoplasiques, substrat des protéines à efflux Pgp, MRP1 et BCRP.**

TAX : taxotère ; TXL : taxol ; CARM : carmustine ; CHLB : chlorambucil ; Cis-Pt : *cis*-platine ; LEUC : leucovorine ; COL : colchicine ; VLB : vinblastine ; VCR : vincristine ; VP16 : étoposide ; MXT : mitoxantrone ; SN38 : métabolite actif de l'irrinotécan ; TPT : topotécan ; MX : méthotrexate ; ATH : famille des anthracyclines (Aouali *et al.*, 2005).

Pour inhiber le transport des agents anticancéreux par ces protéines, des modulateurs ont été mis au point. Un des premiers agents à avoir été expérimenté pour inhiber la Pgp est le verapamil (Tsuruo *et al.*, 1981). Cependant, la plupart des essais cliniques sur diverses leucémies ont échoué à cause d'une trop importante cardiotoxicité (Dalton *et al.*, 1995 ; Ozols *et al.*, 1987). L'utilisation du verapamil dans le traitement de tumeurs solides réfractaires n'a également jamais montré de réponse positive, probablement parce que les doses administrées étaient trop faibles, compte tenu des risques de toxicité cardiaque (Cairo *et al.*, 1989 ; Millward *et al.*, 1992). Un autre inhibiteur a été longuement décrit, la cyclosporine A, un immunosuppresseur qui, modulerait l'activité de transport de la Pgp en empêchant une fixation du médicament sur son site (Garrigues *et al.*, 2002). Mais encore une fois, une toxicité trop importante n'a pas permis une libre utilisation de ce modulateur en clinique (Dahl *et al.*, 2000 ; Tallman *et al.*, 1999). De nombreuses études décrivent les effets des modulateurs verapamil et cyclosporine A à l'échelle de la cellule. Une rigidification de la membrane plasmique est observée lorsque ces agents sont ajoutés, ce qui aurait pour conséquence de perturber la résistance acquise (Dolderer *et al.*, 2000 ; Germann *et al.*, 1997 ; Lo *et al.*, 2001 ; Niebylski *et al.*, 1991 ; Schuldes *et al.*, 2001).

De plus, il existe deux mécanismes d'inhibition possibles de la MRP1. Tout d'abord, une inhibition directe consiste à utiliser des modulateurs qui rentrent en compétition avec le médicament. C'est le cas du MK571, un antagoniste du récepteur LTC<sub>4</sub>, et le probénécide (Gekeler *et al.*, 1995 ; Gollapudi *et al.*, 1997). Une inhibition indirecte est également possible. Comme la MRP1 transporte les agents anticancéreux complexés au glutathion (GSH), des inhibiteurs de la synthèse de GSH sont capables d'inhiber la MRP1. Enfin, le sulfinpyrazone inhibe la MRP1 en inhibant la fixation du GSH sur son site (Evers *et al.*, 2000).

Une deuxième génération de nouvelles molécules ont été testées ou sont en cours de test clinique afin d'inhiber l'activité des protéines Pgp et/ou MRP1. Le valsopodar (PSC-833 commercialisé par Novartis) est très certainement le composé le plus étudié. L'activité inhibitrice de cette molécule est dix fois meilleure que son analogue la cyclosporine A. Les tests pré-cliniques ont par ailleurs montré une plus faible toxicité rénale (Boesch *et al.*, 1991). Le VX-710 (Biricodar) ou encore du GF-120918 sont des inhibiteurs de troisième génération toujours en essai clinique pour vérifier leur toxicité (Peck *et al.*, 2001 ; Sparreboom *et al.*, 1999).

Plusieurs inhibiteurs de la BCRP ont été identifiés. Les modulateurs de première et deuxième génération sont par exemple la fumitrimorgine C (sécritée par le champignon *Aspergillus fumigatus*) et son analogue le Ko143. Ces agents sont capables de renverser

complètement la résistance dirigée par la BCRP dans des concentrations comprises entre 1 et 5  $\mu\text{M}$  (Rabindran *et al.*, 1998 ; Rabindran *et al.*, 2000). Ces modulateurs ne semblent pas inhiber la Pgp ni la MRP1 (Allen *et al.*, 2002 ; Rabindran *et al.*, 1998 ; van Loevezijn *et al.*, 2001) suggérant une relative spécificité envers la BCRP. Le mécanisme d'action n'est pas encore clairement défini, même s'il est soupçonné une interaction directe avec la protéine compte tenu de leur structure moléculaire (Bachmeier *et al.*, 2004 ; Rabindran *et al.*, 2000 ; Robey *et al.*, 2001). Cependant, ces composés présentent une toxicité neurologique incontestable empêchant toute utilisation en chimiothérapie de routine (Mao *et al.*, 2005). Une troisième génération de molécules a vu le jour. Le HER TKI, le mesylate imatinib, la novobiocine ou encore le biricodar (VX-710) sont autant d'inhibiteurs potentiels agissant *in vitro* à très faible dose (inférieure à 200 nM) (Houghton *et al.*, 2004 ; Minderman *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2003). Il a été suggéré que le mécanisme d'action de ces agents implique soit une compétition avec le médicament soit une inhibition de l'activité ATP-ase de la protéine. Des essais cliniques restent cependant à être effectués afin de vérifier leur toxicité.

### **3.3. Profil lipidique dans la résistance multiple**

#### **3.3.1. Modification de la composition lipidiques dans les cancers**

Il paraît aujourd'hui évident que la composition en lipides membranaires de cellules tumorales est fortement altérée en comparaison de cellules « normales » selon de nombreuses études portant sur le sujet (Hendrich *et al.*, 2003 ; Leach, 1996 ; Negendank, 1992). Par exemple, Merchant *et al.* ont suggéré qu'il était possible de discerner les différentes phases de différenciation du cancer par la simple analyse du profil lipidique (Merchant *et al.*, 1995). Travaillant sur des cellules du cancer du colon, cette équipe a pu mettre en évidence par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) que le taux de phosphatidylcholine (PC) entre des tumeurs en phase 2 et 3 de la cancérisation d'un tissu semble très différent.

Déterminer les modifications des concentrations membranaires d'espèces lipidiques moins « populaires » ont fait l'objet d'un nombre important d'études afin d'identifier des marqueurs de cancérisation. Le plus intéressant d'entre eux est probablement le phosphatidylinositol (PI), lequel est directement impliqué dans (i) les voies de signalisations intracellulaires et (ii) l'ancrage des protéines à la membrane (de l'anglais *protein anchoring*). Une augmentation du taux de PI a été observée par Merchant *et al.* chez des cellules malignes de cancer de l'œsophage et du sein (Merchant *et al.*, 1992 ; Merchant *et al.*, 1993 ; Merchant

*et al.*, 1991). Mais la relation entre la composition des acides gras et le métabolisme des PI fut la première fois proposée par Awad *et al.* (Awad *et al.*, 1993 ; Awad *et al.*, 1996). Ils ont pu mettre en évidence qu'un milieu de culture enrichi en acides gras insaturés augmentait rapidement le turnover de PI chez des cellules issues de cancer du colon. Une augmentation du taux d'acides gras de type 18 : 3 $\omega$ 6 perturbe une famille de protéine G, directement impliquée dans l'activation de la phospholipase C. Cette enzyme membranaire est par ailleurs responsable de la dégradation de certains phospholipides, en particulier les phosphatidyléthanolamine (PE). De plus, la composition membrane en phospholipides n'est pas la seule à changer dans les cellules cancéreuses. Un certain nombre d'études mettent en évidence des modifications du taux en cholestérol (Raffy *et al.*, 1999 ; Subczynski *et al.*, 2000).

Il est très important de déterminer les conséquences de tels changements. Kido *et al.* sont les premiers à avoir émis l'hypothèse d'une relation entre la fluidité de la membrane et le pouvoir invasif des cellules cancéreuses dans une étude portant sur l'inhibition de la croissance de cancer du foie par des analogues de la méthylthiodéoxyadénosine (Kido *et al.*, 1991). Mais c'est l'équipe de Calderon qui a pu confirmer expérimentalement cette hypothèse (Calderon *et al.*, 1991). En comparant deux lignées cellulaires issues de carcinomes de la prostate avec différents degrés d'agressivités, ils ont mis en évidence que la lignée avec un important pouvoir invasif était caractérisée par un taux élevé en cholestérol et une diminution de la fluidité membranaire. Cette souche se démarquait également par un important taux de PE et un plus faible taux des entités PS et PI en comparaison de la lignée faiblement invasive.

### **3.3.2. Les propriétés biophysiques de la membranes**

Des modifications de la composition lipidique de la membrane accompagnent la mise en place du phénotype MDR. Par conséquent, ces modifications peuvent avoir d'importantes incidences sur les propriétés de la membrane. Dans le cas de cellules leucémique P388, l'équipe de Ramu a pu mettre en évidence par Résonance Paramagnétique Electronique et par spectroscopie de polarisation de fluorescence que la lignée cellulaire résistante à la doxorubicine présentait une modification du rapport des lipides phosphatidylcholine / phosphatidylsérine (Ramu *et al.*, 1984 ; Ramu *et al.*, 1989). Leur étude montre que la fluidité de la membrane des cellules P388 résistantes diminuait significativement en comparaison de la lignée sensible. Des différences du profil lipidique ont également été observées dans des membranes de cellules leucémiques de lymphocytes T résistantes à la vincristine (May *et al.*,

1988). Cependant, une altération de la fluidité membranaire n'est pas toujours la conséquence d'une modification de la composition des lipides. En effet, des profils lipidiques similaires de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) sensibles et résistantes a été déterminé par l'équipe de Callaghan par RMN et par chromatographie gaz-liquide : c'est la diminution de la mobilité des chaînes acyle qui permet de différencier les cellules résistantes des cellules sensibles (Callaghan *et al.*, 1992).

La plus simple des explications concernant le rôle des lipides dans la résistance aux agents antinéoplasiques serait une modification des propriétés de diffusion de la membrane plasmique. En dehors de tout efflux médié par les protéine MDR, la diminution de l'accumulation de composés cytotoxique pourrait être la conséquence d'une plus faible diffusion au travers d'une membrane « moins fluide ». Comme décrit par Blitterswijk *et al.* pour des cellules leucémiques GRS1 de souris, la diminution du niveau de cholestérol dans les cellules cancéreuses s'accompagne d'une augmentation de la fluidité membranaire (Van Blitterswijk *et al.*, 1982). Une relation similaire entre le taux en cholestérol et la fluidité de la membrane a également été mise en évidence par Liebes *et al.* en utilisant la polarisation de fluorescence sur des lymphocytes normaux et leucémiques (Liebes *et al.*, 1981). Il semble cependant que de telles suppositions simplifient le problème. La sensibilité des cellules à un ou plusieurs médicaments n'est pas simplement fonction de la fluidité membranaire. Il a été démontré que la diminution ou l'augmentation de la fluidité de la membrane par différents agents avaient pour résultats une augmentation de l'incorporation du médicament chez les cellules résistantes (Burns *et al.*, 1988 ; Callaghan *et al.*, 1993).

De plus, les sphingolipides et le cholestérol jouent un rôle crucial en temps que constituants principal des cavéoles et des rafts lipidiques (Masserini *et al.*, 2001 ; Moffett *et al.*, 2000 ; Sankaram *et al.*, 1991). Ces entités montrent une tendance à s'isoler des autres constituants phospholipidiques de la membrane pour former des microdomaines (Masserini *et al.*, 2001). Bien que les cavéoles et les rafts lipidiques soient très largement décrits, leurs fonctions au sein de la membrane plasmique restent encore très mal définies (Cai *et al.*, 2004 ; Garrigues *et al.*, 2002 ; Lavie *et al.*, 2000 ; Troost *et al.*, 2004). Cependant, de tels microdomaines semblent être impliqués dans le trafic lipidique et probablement les voies de signalisation (Ikonen, 2001).

### **3.4. Les protéines à efflux et leur environnement lipidique**

Il a été mis en évidence que des protéines Pgp intégrées dans des liposomes de phospholipides augmentent la fluidité de la membrane (Rothnie *et al.*, 2001). C'est cependant l'ajout de cholestérol qui semble augmenter l'activité ATP-asiqne de la Pgp. Selon Sharom *et al.*, une augmentation de l'activité de la Pgp est observée lorsque la membrane est dans un état de gel (Sharom, 1997). Par contre, l'ajout d'alcool benzylique, un fluidifiant membranaire, a pour résultat une diminution du transport de la daunorubicine et de la vinblastine par la Pgp. Ces résultats mettent en avant le rôle inhabituel de la fluidité membranaire sur le maintien de l'activité de la protéine à efflux.

Les fonctions de la protéine Pgp sont souvent assimilées à un « aspirateur » moléculaire. Cette hypothèse est basée sur le fait que la plupart des substrats de cette protéine sont des molécules très lipophiles (Castaing *et al.*, 2000 ; Ford *et al.*, 1990). Le médicament serait reconnu puis pris en charge par la protéine lorsque celui-ci traverse le feuillet interne de la membrane. Eytan a d'ailleurs suggéré qu'une compétition entre la diffusion passive et le transport actif pouvait jouer un rôle essentiel dans la résistance multiple (Eytan, 2005). La diffusion est une étape limitant l'accumulation d'un certain nombre de molécules. Plus le médicament reste longtemps dans la membrane, plus la probabilité de prise en charge par la protéine est importante (Epanand, 1998 ; Pallares-Trujillo *et al.*, 2000). Par conséquent, une modulation de la fluidité membranaire devrait influencer l'activité des protéines à efflux. En effet, Regev *et al.* ont décrit les effets modulateurs de différents fluidifiants, comme l'alcool benzylique, le chloroforme ou encore le tween 20, sur l'accumulation intracellulaire de doxorubicine chez des cellules CHO (Chinese Hamster Ovarian) résistante (Regev *et al.*, 1999 ; Regev *et al.*, 1997). Leurs travaux montrent que la fluidification de la membrane augmente la vitesse de diffusion du médicament (le demi temps de basculement étant de 0,7 min). Ces agents perturbent profondément l'environnement de la Pgp ce qui a pour conséquence une inhibition de l'activité ATP-asiqne de la protéine. Des modifications des propriétés de diffusion de la membrane influence directement l'activité des protéines à efflux.

De plus, riches en sphingolipides et en cholestérol, les rafts lipidiques et les cavéoles peuvent séquestrer préférentiellement certaines protéines. La séquence en acides aminés des segments transmembranaires confère à la Pgp et autres protéines à efflux une affinité plus importante pour ces microdomaines (Bandorowicz-Pikula, 2000 ; Fastenberg *et al.*, 2003 ; Sprong *et al.*, 2001). Par ailleurs, les rafts lipidiques ont la propriété de s'assembler ou de s'écarter rapidement amenant à une ségrégation dynamique des protéines. Troost *et al.* ont pu

mettre en évidence qu'une modification du taux de cholestérol dans une membrane reconstituée inhibe l'activité de la protéine Pgp (Troost *et al.*, 2004). A l'inverse, l'ajout de cholestérol rétablit l'efflux de rhodamine 123 et de vincristine par la Pgp. Ces observations démontrent que des modifications du taux de cholestérol influencent la localisation et la fonction des protéines à efflux. Il semble donc de plus en plus évident que ces microdomaines joueraient un rôle important dans la diffusion passive du médicament et le transport actif dirigé par les protéines à efflux.

## **4. La spectroscopie SERS : Surface-Enhanced Raman Scattering**

### ***4.1. Rappel sur la spectroscopie Raman***

#### **4.1.1. Historique**

La spectroscopie Raman s'est développée rapidement au milieu des années 1920, après sa prédiction (Kramers *et al.*, 1925 ; Smekal, 1923) et sa démonstration (Landsberg *et al.*, 1928 ; Raman *et al.*, 1928). Elle devient alors la principale méthode d'analyse non destructive avant la seconde guerre mondiale. Les premières recherches entre 1880 et 1920 indiquent que des empreintes vibrationnelles spécifiques caractérisent chaque molécule (Jones, 1887). En 1923, Smekal est l'un des premiers à prédire que les molécules pouvaient diffuser la lumière de façon inélastique (Smekal, 1923). Il a aussi suggéré que la polarisabilité moléculaire varie lorsque des vibrations particulières se produisent. Ceci le conduisit à proposer que le déplacement en fréquence entre la lumière incidente et diffusée pourrait caractériser des vibrations moléculaires. L'évidence expérimentale de cet effet est rapportée pour la première fois par les scientifiques indiens Raman et Krishnan en 1928 (Raman *et al.*, 1928).

Dans ses premières expériences, Raman a utilisé une configuration optique simple. Avec un filtre bleu placé sur le trajet d'un faisceau de lumière solaire et un filtre jaune vert sur le chemin d'observation (figure 5), il était capable de montrer que la longueur d'onde d'une partie de la lumière diffusée du faisceau traversant le liquide est plus grande que la lumière incidente. Raman démontra ainsi l'effet prédit par Smekal et la spectroscopie Raman était née.

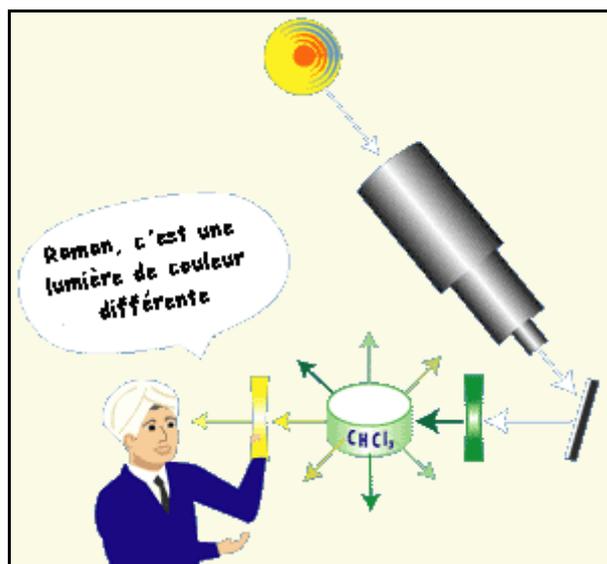


Figure 5. Expérience de Raman et Krishnan (1928).

L'instrumentation nécessaire pour la spectroscopie Raman est simple : une source de lumière monochromatique, l'optique de focalisation et de collection, un monochromateur et un détecteur. Dans le premier spectromètre Raman, une lampe à vapeur de mercure, un prisme ou un monochromateur et une plaque photographique seront utilisés. L'enregistrement des spectres avec ce type d'équipement est très long. Ceci est dû à la faible efficacité du processus de diffusion Raman et au fait que l'intensité de la lumière sur l'échantillon, fournie par la lampe à mercure, est limitée à une valeur de  $1,5 \cdot 10^4 \text{ W/m}^2$  (Long, 1977). Raman avait remarqué que ce nouveau type de diffusion de la lumière exige une illumination très importante pour son observation (Raman *et al.*, 1928).

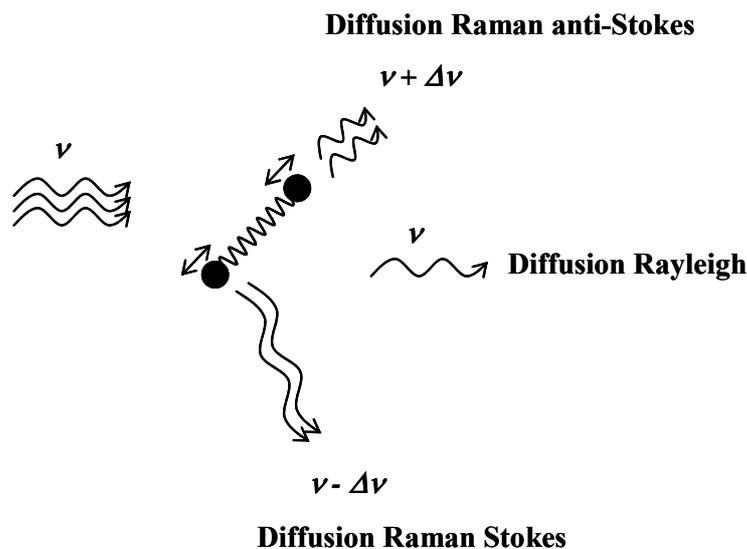
Pendant quelques années, aucun progrès significatif n'ayant été fait, l'intérêt de la spectroscopie Raman a décliné. Parallèlement, la spectroscopie infrarouge s'imposait, grâce entre autre à des développements techniques qui en faisaient une méthode plus facile à appliquer. Au milieu des années 1960, l'arrivée des lasers visibles fournit des sources idéales pour la spectroscopie Raman (Kogelnik *et al.*, 1963). Il apparaît alors que l'étude d'échantillons purs, translucides et incolores reste relativement simple. Cependant, les composés colorés et/ou fluorescents causent de réels problèmes : irradiés avec un laser dans le domaine du visible, ces composés montrent un niveau de fluorescence trop intense pour observer le phénomène Raman, et ce, même après purification.

Malgré le développement des lasers les années 60, la spectroscopie Raman reste largement confinée dans les laboratoires, car nécessitant toujours des scientifiques très qualifiés pour obtenir des spectres très simples. Le système nécessitait d'être constamment surveillé et calibré du fait que les échelles de longueur d'onde utilisées dépendaient largement

des conditions ambiantes, des analyses fiables et des données bibliographiques n'étant pas du tout répandues à l'époque.

#### **4.1.2. Principe de diffusion Raman.**

La spectroscopie Raman est une technique qui utilise la diffusion inélastique de la lumière résultant de l'interaction électromagnétique avec les électrons du substrat.



**Figure 6. Modèle de diffusion de la lumière par une liaison moléculaire dans le phénomène Raman.**

Lorsque la lumière monochromatique passe à travers un milieu transparent (solide, liquide ou gazeux), une grande partie de cette lumière est transmise dans toutes les directions de l'espace sans changement de fréquence (figure 6). Ce processus est appelé diffusion élastique ou Rayleigh. Ce processus est caractérisé par l'absence d'échange d'énergie. Cependant, une petite fraction de la lumière est diffusée à différentes longueurs d'onde, appelée diffusion Raman qui inclut les diffusions Raman Stokes et anti-Stokes. La figure 7 montre l'intensité de la lumière diffusée en fonction de la fréquence.

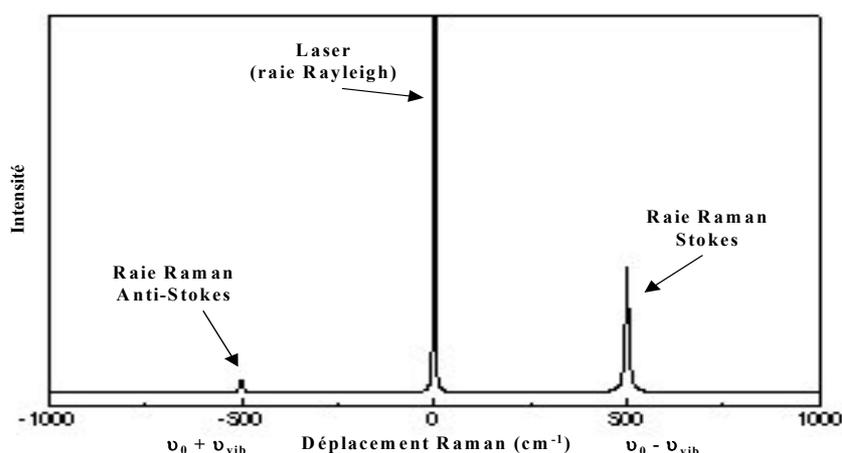


Figure 7. Conséquences spectrales de la diffusion Raman.

Le spectre contient des raies symétriques par rapport à la raie Rayleigh (fréquence relative nulle). Si on considère  $(\nu_0 - \nu_{vib})$ , cette partie du spectre correspond à la lumière diffusée avec une fréquence plus petite que celle de la lumière incidente appelée spectre Raman Stokes. Sinon, si on considère  $(\nu_0 + \nu_{vib})$ , cette autre partie du spectre est appelée spectre Raman anti-Stokes. L'intensité de la diffusion Rayleigh est en général beaucoup plus intense que la diffusion Raman selon 3 à 6 ordres de grandeurs (Long, 1977 ; Tu, 1982). L'intensité de la raie Raman anti-Stokes est plus faible que l'intensité de la raie Raman Stokes. En effet, la probabilité de trouver la molécule dans l'état fondamental est plus grande que celle de l'état vibrationnel excité (distribution de Boltzmann).

L'origine de ces raies dans le spectre Raman est expliquée par le diagramme des niveaux d'énergie (diagramme de Jablonski) dans lequel les processus de diffusion Rayleigh, anti-Stokes et Stokes sont représentés (figure 8). La raie Rayleigh résulte de la diffusion élastique d'une onde électromagnétique avec la molécule, caractérisée par l'absence d'échange d'énergie (absence d'informations sur les vibrations de la molécule). La diffusion Raman Stokes place la molécule à un niveau vibrationnel supérieur que celui de l'état fondamental. La position de chaque raie dans le spectre Raman de la molécule correspond à l'énergie nécessaire pour exciter un mode de vibration.

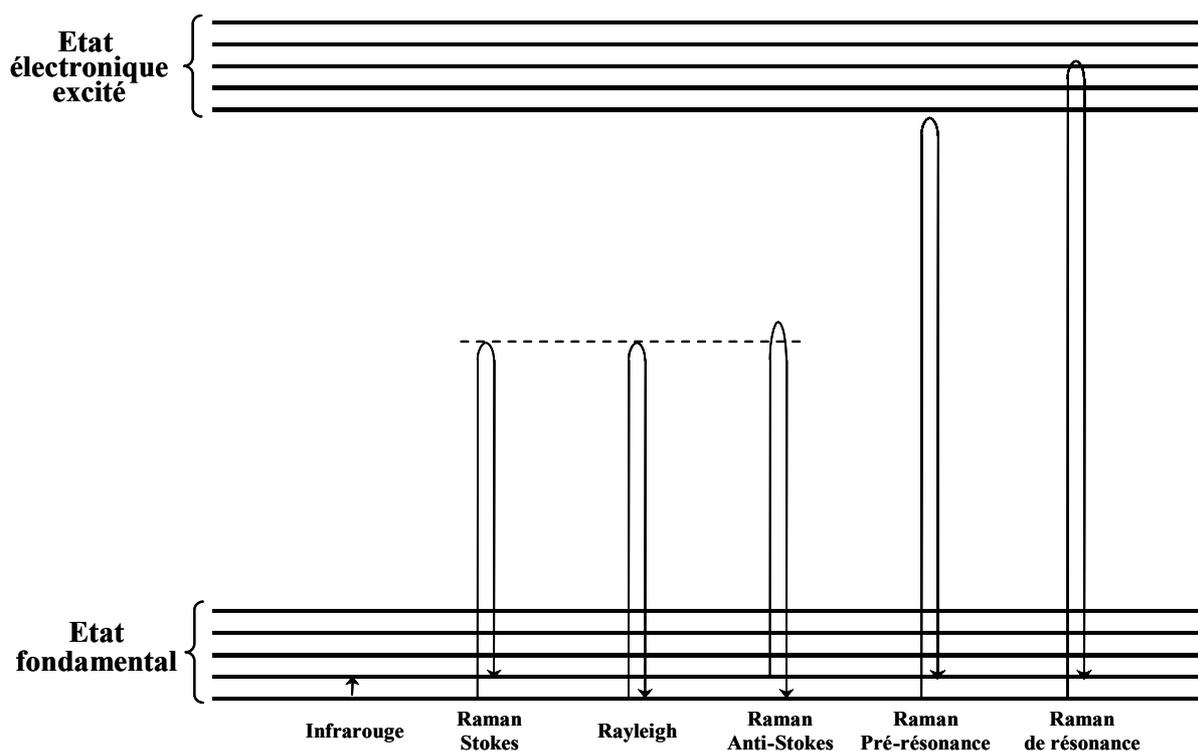


Figure 8. Diagramme de Jablonski.

Lorsque l'énergie des photons incidents est inférieure à celle de la transition électronique, on parle de diffusion Raman conventionnel. Si l'énergie des photons incidents est proche de l'état excité électronique, on parle de diffusion Raman de pré-résonance. Si cette énergie coïncide avec l'énergie de transition électronique, on parle alors de diffusion Raman de résonance. Ce phénomène résulte d'un couplage entre les transitions électroniques et vibrationnelles de la molécule, ce qui a pour effet d'exalter certaines raies Raman. Ce phénomène est lié à la présence d'un chromophore présentant une bande d'absorption dont le maximum est proche de l'excitatrice.

#### 4.2. Spectroscopie Raman SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering).

La spectroscopie Raman est une technique qui permet l'observation des états vibrationnels d'une molécule. L'information traduit non seulement les positions des atomes et leurs liaisons chimiques dans la molécule, mais également ses interactions avec son environnement le plus proche. L'importante difficulté de mise en œuvre de la spectroscopie Raman à l'échelle moléculaire est liée à l'ordre de grandeur de la section efficace de ce processus de diffusion. Elle est typiquement de l'ordre de  $10^{-30}$  à  $10^{-32}$   $\text{cm}^2$  pour une molécule

unique, soit 14 ordres de grandeur plus faible que la section efficace de fluorescence. Il est donc parfois indispensable pour détecter le signal de recourir à des méthodes d'exaltation. Une des voies possibles est d'utiliser l'exaltation du signal Raman des molécules adsorbées au voisinage d'une surface « rugueuse », effet plus connu sous son terme anglais « SERS » (Surface-Enhanced Raman Scattering).

### 4.2.1. Principe de l'effet SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering)

En 1974, Fleischmann, Hendra et McQuillan sont les premiers à observer une exaltation Raman de la pyridine adsorbée sur une électrode d'argent, dans une cellule électrochimique (Fleischmann *et al.*, 1974). Ils attribuent alors ce phénomène à une augmentation de l'exaltation par effet de surface. En 1977, deux équipes, celle de Jean-Maire et Van Duyne (Jean-Maire *et al.*, 1977) d'une part, et Albrecht et Creighton (Albrecht *et al.*, 1977) d'autre part, publient indépendamment des résultats mettant en évidence que le signal Raman provenant de la pyridine sur l'électrode d'argent est exalté de 4 à 6 ordres de grandeur.

Les molécules adsorbées sur la surface métallique présentent une augmentation de la section efficace de diffusion Raman dans ces conditions. Ce phénomène d'exaltation de la diffusion Raman est appelé diffusion Raman exaltée de surface (DRES), ou plus couramment surface-enhanced Raman scattering (SERS). L'augmentation de la section efficace de diffusion Raman dépend de la nature chimique de la molécule adsorbée, du type de la surface métallique et de sa morphologie. L'exaltation la plus importante se produit avec l'argent, l'or et le cuivre. De plus, la surface métallique doit être « rugueuse ».

L'effet SERS peut s'observer dans trois types de systèmes métalliques :

- Electrodes : la surface devient active après un cycle d'oxydoréduction
- Système de particules métalliques en suspension et colloïdes, qui sont de petites tailles comparées à la longueur d'onde de la lumière incidente.
- Films actifs en SERS avec une homogénéité et une régularité contrôlable, préparée par micro lithographie et d'autres techniques.

L'effet SERS possède des propriétés qui le distinguent de la diffusion Raman conventionnelle (Kneipp *et al.*, 2005) :

- ✓ Les sections efficaces de diffusion Raman pour les molécules adsorbées sont plus grandes d'au moins un facteur  $10^2$  à  $10^6$  (chiffres moyennés) par rapport aux molécules non adsorbées.
- ✓ L'exaltation dépend de la fréquence d'excitation, mais aussi de la topologie de rugosité.
- ✓ Parfois le spectre SERS diffère remarquablement des molécules à l'état libre. Ceci se manifeste par exaltation sélective de certaines bandes ainsi que par apparition de nouvelles bandes dans le spectre SERS.

La section efficace de diffusion Raman est déterminée par le moment dipolaire  $\vec{P}$ , induit par l'interaction du champ électrique  $\vec{E}$  de l'onde électromagnétique avec la polarisabilité  $\alpha$  de la molécule :

$$\vec{P} = \alpha \cdot \vec{E}$$

D'après l'expression ci-dessus, l'exaltation de la section efficace de diffusion Raman de la molécule dépend soit de l'augmentation de l'intensité du champ électrique de l'onde électromagnétique, soit de la polarisabilité, ou des deux à la fois. Le mécanisme d'exaltation du spectre Raman de la molécule localisée près de la surface métallique peut se diviser en deux théories : la théorie électromagnétique et la théorie chimique (Creighton, 1982).

La théorie électromagnétique propose une augmentation de l'exaltation du champ électrique par adsorption au voisinage de la surface métallique. Cette théorie classique est obtenue à travers la solution des équations de Maxwell. Les propriétés spectroscopiques de la molécule au voisinage de la surface sont modifiées de trois façons : (i) le champ électromagnétique incident est exalté par le champ produit par la polarisation de la surface ; (ii) lorsque la fréquence de la lumière incidente et/ou de la diffusion Raman est en résonance avec le plasmon de surface du métal, il se produit une augmentation très importante du champ électromagnétique et de la lumière émise.

Ces deux effets donnent une exaltation de l'intensité Raman qui est proportionnelle au carré de l'intensité du champ électrique. Le facteur d'exaltation dépend de plusieurs

paramètres tels que les propriétés diélectriques du métal, la distance et l'orientation de la molécule par rapport à la surface, de la longueur d'onde d'excitation, de la morphologie de la surface, et dans le cas des surfaces rugueuses, de l'échelle et de la géométrie de la rugosité.

Cette première théorie est basée sur le fait qu'au voisinage d'une surface métallique, les radiations incidentes et diffusées seraient très importantes. Le mécanisme électromagnétique s'exerce à longue distance et se caractérise par des distances molécule/métal dépassant considérablement la distance inter-atomique. Cette théorie explique seulement la petite exaltation du signal pour des molécules au voisinage des surfaces lisses (d'un facteur 4 à 30). L'introduction de la rugosité de la surface (électrode, hydrosol ou film) permet d'augmenter considérablement l'exaltation (d'un facteur  $10^4$  à  $10^6$ ). Ce mécanisme ne dépend pas de la nature de l'interaction spécifique molécule/métal et de leurs propriétés d'adsorption. En général, les spectres SERS ne sont pas différents des spectres Raman des molécules libres.

La théorie électromagnétique prédit que seulement les surfaces possédant des propriétés diélectriques appropriées donnent une exaltation importante. L'exaltation électromagnétique exige une rugosité des agrégats de particules (de l'ordre de 40 – 80 nm) pour une augmentation significative de la diffusion Raman pour des molécules adsorbées. Comme la théorie électromagnétique repose sur une mécanique à longue distance, l'intensité du signal décroît rapidement avec la distance entre la molécule et la surface suivant un facteur  $f$ :

$$f = \left(\frac{a}{r}\right)^{12}$$

Où  $a$  est le rayon de courbure de la surface et  $r$  la distance entre la molécule et le centre de la surface.

De plus, une propriété intéressante des métaux à l'échelle nanométrique est la présence de résonances plasmons de surface. Ces résonances sont dues à des oscillations collectives des électrons de conduction créées par une onde électromagnétique. L'excitation du plasmon de surface dans les nanoparticules métalliques est à l'origine d'une augmentation considérable du champ électrique local et de la polarisabilité de la particule. Or, l'intensité de l'onde diffusée dans un processus Raman dépend précisément des variations de la susceptibilité diélectrique du milieu. Le couplage des modes de vibration des nanoparticules avec le

plasmon de surface conduit ainsi à l'exaltation du processus de diffusion de la lumière par ces mêmes modes.

La fréquence de la résonance plasmon dépend de plusieurs facteurs, à savoir de la nature du matériau (fonction diélectrique), de la taille et de la forme des nanoparticules, de leur environnement, mais également de leur état de surface (chimisorption, physisorption). Il apparaît donc important de signaler que tous ces facteurs, qui entraînent une modification des caractéristiques du plasmon, sont susceptibles alors d'avoir une influence notable sur la diffusion Raman.

D'autre part, la théorie chimique prédit une large exaltation de la polarisabilité moléculaire des molécules adsorbées comme résultats de l'interaction avec le métal. Par opposition à la théorie électromagnétique, la théorie chimique ou moléculaire repose donc sur une mécanique à courte distance. Elle existe lorsque la distance entre la molécule et la surface métallique est de l'ordre de la distance inter-atomique. Les propriétés de la surface et la nature chimique de la molécule sont les facteurs majeurs déterminant l'exaltation de la diffusion Raman. Les spectres SERS peuvent être différents de ceux des molécules non adsorbées. Les effets chimiques sont faciles à visualiser mais leurs contributions en exaltation du signal sont difficiles à déterminer.

Toutes les théories chimiques ne limitent pas leurs effets aux métaux, mais ils exigent une interaction spécifique de la molécule avec la surface. L'exaltation par mécanisme chimique a pour conséquence un déplacement de fréquence des modes de vibrations qui sont impliquées dans la liaison avec la surface du métal.

### **4.2.2. Electrodes**

Les premières observations ont été effectuées avec des électrodes d'argent. L'un des principaux avantages de l'utilisation des électrodes est qu'il est possible de contrôler le potentiel de la surface. Cependant, le prétraitement de l'électrode est crucial pour obtenir un maximum d'exaltation du signal. La surface est alors polie mécaniquement en utilisant de l'alumine en poudre. Finalement, l'électrode est soumise à un cycle d'oxydoréduction dans une cellule électrochimique *in situ* ou *ex situ*. Les paramètres d'oxydoréduction et les conditions pour lesquelles le maximum d'exaltation du signal est observé dépendent du type de métal composant l'électrode, et de l'électrolyte employé (Pockrand, 1984). Des spectres

SERS intenses ont été généralement obtenus avec des électrodes métalliques rugueuses en présence de biomolécules (Sequaris *et al.*, 1984).

### 4.2.3. Films métalliques

La deuxième catégorie des surfaces actives en SERS sont les substrats préparés par évaporation sous vide du métal, sur des lames de verre ou de quartz. Ces substrats sont décrits plus stables que les colloïdes. Il a été démontré que les contributions des mécanismes chimique et électromagnétique dépendent fortement de la nature chimique des molécules (Sokolov *et al.*, 1993). Ainsi, le mécanisme chimique contribue principalement à l'exaltation de la diffusion Raman pour des molécules possédant un faible coefficient d'extinction dans le visible tandis que le mécanisme électromagnétique domine pour des chromophores ayant un coefficient d'extinction dans le visible (Sokolov *et al.*, 1993).

### 4.2.4. Colloïdes

Le troisième système fréquemment utilisé est l'hydrosol métallique. La réduction chimique des sels d'argent, de cuivre et d'or a été utilisée pour produire un état colloïdal en pré-aggrégat par un agent réducteur. Différents agents réducteurs peuvent être utilisés tels que le citrate, les ions oxalates et le borohydrure de sodium. Ce système est facile à préparer. L'avantage le plus important de la spectroscopie SERS avec les colloïdes par rapport aux électrodes est la simplicité de préparation de l'hydrosol ainsi que la possibilité de contrôler la taille et la forme des particules, en faisant varier les concentrations relatives du sel métallique et de l'agent réducteur (Siiman *et al.*, 1983 ; Creighton, 1982).

L'hydrosol d'or contient des particules de tailles uniformes (de l'ordre de 20-30 nm) et possèdent une forme sphérique régulière. L'hydrosol d'argent est préparé par réduction de l'AgNO<sub>3</sub> par le citrate de sodium (Lee *et al.*, 1982) (figure 9). Il est très stable pour quelques semaines et fournit une grande exaltation de la diffusion Raman pour les biomolécules.

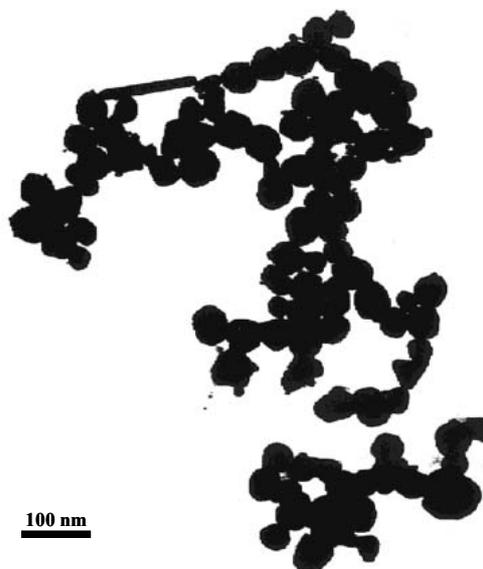


Figure 9. Micrographie électronique d'agrégat d'argent utilisé en spectroscopie SERS (extrait de l'article de Kneipp *et al.* (Kneipp *et al.*, 1999)).

### 4.3. Les avantages de la spectroscopie SERS

La spectroscopie SERS est une méthode qui combine la sensibilité de la fluorescence et la spécificité moléculaire de la spectroscopie Raman. L'équipe de Kneipp a établi récemment que le facteur d'exaltation pourrait atteindre  $10^{11}$  à  $10^{14}$  sur les points de contact de certains composés analysés avec la surface métallique (Kneipp *et al.*, 2005). Ceci permettrait au signal Raman d'une molécule unique d'atteindre une intensité comparable à celle de sa fluorescence. La spectroscopie SERS est une méthode optique non destructive particulièrement bien adaptée pour l'étude des interactions entre un ligand et sa cible (Breuzard *et al.*, 2003 ; Kneipp *et al.*, 2002 ; Nabiev *et al.*, 1995).

Pour des applications biochimiques et biomédicales en spectroscopie SERS, le système de particules colloïdales utilisé pour cette étude présente des avantages importants par rapport aux deux substrats précédents comme la simplicité de préparation et ce, dans différents solvants et milieux (surtout dans les tampons aqueux de pH fixe). De plus, il est possible de faire varier la taille et la forme des particules afin de moduler leur accessibilité à des surfaces spécifiques définies par la topologie des systèmes moléculaires, en particulier concernant des complexes supramoléculaires biologiques.

## 5. La spectroscopie à fluorescence

### 5.1. Principe de l'émission de fluorescence

Le phénomène de fluorescence a été décrit pour la première fois par Brewster en 1838, mais le terme de « fluorescence » n'a été inventé qu'en 1852 par Stokes. Certains composés appelés chromophores ou fluorophores (possédant des systèmes aromatiques, double/triple liaisons conjuguées carbone-carbone), en solution ou à l'état solide, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par les photons UV ou visibles. L'émission d'un rayonnement électromagnétique par un corps après l'absorption d'un photon correspond au transfert d'une certaine quantité d'énergie de ce corps vers le milieu extérieur. La fluorescence est un phénomène physique très rapide ( $10^{-9}$  à  $10^{-8}$  sec) dans lequel une molécule absorbe de l'énergie provenant d'une source lumineuse (laser, lampe à vapeur de mercure...). L'absorption et l'émission de lumière sont couramment illustrées par le diagramme des niveaux d'énergie de Jablonski (figure 10).

Lorsque la lumière réagit avec la matière, des photons sont absorbés. La transition électronique se déroule du niveau fondamental  $S_0$  vers les niveaux d'énergie supérieure  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_n$ . Plus l'énergie absorbée est importante, plus les niveaux électroniques supérieurs sont atteints. Le retour à l'état  $S_1$  se réalisera suivant deux étapes (figure 10), à savoir un retour au niveau électronique  $S_1V_n$  par conversion interne (CI), puis un passage du niveau  $V_n$  au niveau  $V_0$  au sein du niveau  $S_1$  sous l'effet d'interactions entre les molécules de fluorophore et les molécules de solvant. Il faut noter que la différence d'énergie correspondant à l'émission fluorescente d'un composé est toujours plus faible que celle correspondant à l'absorption, à cause des phénomènes de relaxation vibrationnelle (RV) dans les états excités et fondamentaux. Par conséquent,  $\lambda_{\text{fluorescence}}$  est toujours supérieure à  $\lambda_{\text{absorption}}$ .

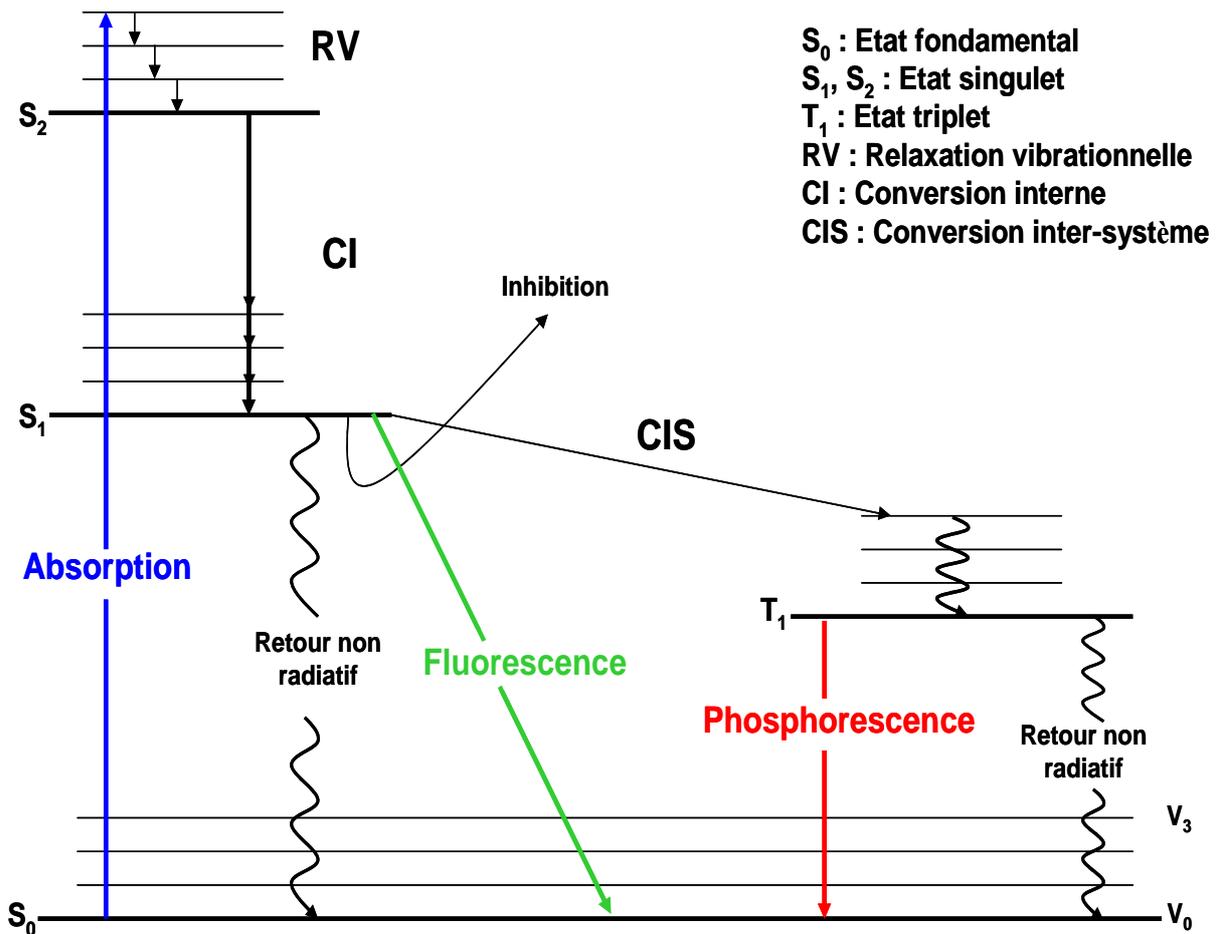


Figure 10. Diagramme de conversion d'énergie selon Jablonski.

Différents processus compétitifs vont désexciter l'état  $S_1$  :

- il y a émission de photons, c'est la fluorescence ;
- l'énergie absorbée par la transition est dissipée dans le milieu sous forme d'énergie non radiative ;
- les molécules excitées peuvent céder leur énergie à d'autres molécules situées à proximité (inhibition);
- il y a passage transitoire à un niveau excité triplet  $T_1$  situé entre  $S_1$  et  $S_0$ , et cette conversion est appelée conversion intersystème (CIS). A partir de cet état triplet, les molécules retournent à l'état fondamental soit par une émission de photons (c'est la phosphorescence), soit par dissipation non radiative de l'énergie restante, enfin soit par transfert d'énergie à distance ou par collision.

La fluorescence est donc l'émission de photons à partir de l'état singulet  $S_1$ . L'intensité du spectre de fluorescence dépend entre autres de la population de molécules se

trouvant à l'état excité  $S_1V_1$ . Tous les processus qui entrent en compétition avec la fluorescence diminuent la population de molécules à l'état  $S_1$ , induisant ainsi une chute de l'intensité de fluorescence. Pour le phénomène de phosphorescence, le retour à un état singulet est un phénomène relativement lent ( $10^{-3}$  sec à 1 sec) de part le fait que la transition des électrons de l'état  $T_1$  à un état fondamental est impossible. De plus, le maximum de la longueur d'onde d'émission est généralement décalée vers des longueurs d'ondes plus importante (de moindre énergie) que la fluorescence.

### 5.2. Spectres d'excitation et d'émission

Le spectre d'excitation traduit, pour une transition d'émission fixée, la variation de l'intensité de rayonnement de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du rayonnement d'excitation.

A l'intérieur du domaine d'émission radiative, l'intensité de fluorescence varie en fonction de la probabilité des transitions ramenant la particule du niveau excité vers des niveaux de plus faible énergie. On détermine le spectre d'émission en enregistrant la variation de l'intensité du rayonnement de fluorescence en fonction de la longueur d'onde de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation fixée.

Chaque molécule fluorescente est caractérisée par un domaine spectral d'excitation et un domaine spectral d'émission. Un spectre d'émission de fluorescence est défini par une longueur d'onde d'intensité maximale et plus précisément par son profil spectral. L'analyse du profil d'un spectre permet d'identifier le chromophore dans son environnement moléculaire. Cet environnement induit des effets sur l'émission de fluorescence plus importants que sur les phénomènes d'absorption en UV et en visible. Le profil et l'intensité du spectre d'émission de la plupart des fluorophores sont donc sensibles au(x) solvant(s).

Un spectre d'émission de fluorescence peut être décrit par différents paramètres tels que :

- l'intensité d'émission totale
- l'intensité d'émission dans une fenêtre spectrale
- le rapport d'intensité de deux longueurs d'onde

En raison de sa sensibilité, la fluorimétrie a fait l'objet de nombreuses applications biologiques. L'intérêt de cette méthode est la possibilité de détecter et d'étudier *in situ* les

fluorophores (agents anticancéreux, marqueurs fluorescents, etc...) dans une cellule vivante isolée.

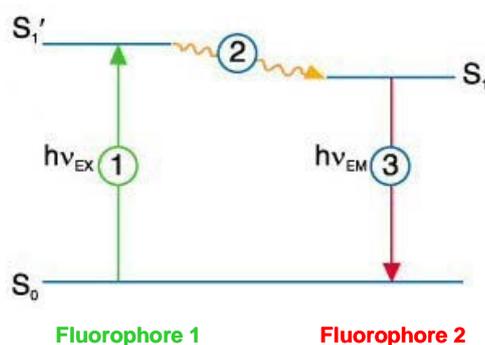
### **5.3. Le rendement quantique**

Le rapport  $\phi$  = nombre de photons absorbés / nombre de photons émis correspond au rendement quantique de fluorescence. Ce rapport est compris entre 0,1 et 1. Le rendement quantique est la résultante des constantes de temps des processus de désexcitations radiatifs et non-radiatifs. Pour des fluorophores les plus efficaces, les processus non radiatifs sont lents et  $\phi$  est proche de 1. Au contraire, les processus accélérant la désexcitation non radiative montrent un rendement quantique proche de 0. Le nombre de photons absorbés est proportionnel à l'absorbance pour une solution diluée. Dans ces conditions, l'intensité de fluorescence varie linéairement avec la concentration en fluorophore. Par contre pour des concentrations élevées, l'intensité de fluorescence n'est plus proportionnelle à la concentration, car  $\phi$  décroît en raison de l'auto-absorption (transfert d'énergie intermoléculaire) et du quenching. La spectroscopie de fluorescence peut se révéler très sensible (jusqu'à  $10^{-6}$  –  $10^{-7}$  M) pour des molécules ayant un rendement quantique élevé.

### **5.4. Fluorescence Resonance Energy Transfer**

#### **5.4.1. Principe du transfert d'énergie**

Le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes est un processus physique, connu et exploité depuis de nombreuses années (Förster, 1948 ; Herman, 1989 ; Stryer *et al.*, 1967 ; Uster *et al.*, 1986). Le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) exploite le transfert d'énergie de l'état excité d'un fluorochrome 1 (donneur) vers un autre fluorochrome 2 (accepteur). L'énergie associée à l'état excité du fluorochrome 1 est en effet transférée par résonance sur l'orbitale moléculaire excitée du fluorochrome 2 (figure 11).



- ① Excitation du fluorophore donneur
- ② Transfert d'énergie
- ③ Emission du fluorophore accepteur

Figure 11. Principe du transfert d'énergie d'après le diagramme de Jablonski.

Considérons un donneur (D) et un accepteur (A) d'énergie séparés par une distance fixe  $R$ . L'efficacité du transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur est donnée par la relation proposée par Förster :

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + R^6)}$$

Où  $R_0$  est la distance à laquelle l'efficacité est de 50 %, et  $R$  la distance actuelle entre le donneur et l'accepteur d'énergie.

Sur un plan expérimental, on peut déterminer l'efficacité du transfert d'énergie en mesurant l'atténuation de l'émission du donneur en présence ou en absence de l'accepteur à partir de la fluorescence  $f$  du donneur à sa longueur d'onde d'excitation. Il suffit de mesurer également l'aire sous le spectre d'émission en présence ( $f_{D,A}$ ) ou en absence de l'accepteur ( $f_0$ ).

L'efficacité  $E$  du transfert est définie par la relation :

$$E = 1 - \frac{f_{D,A}}{f_0}$$

Le rendement du transfert d'énergie est dépendant du chevauchement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur et de l'orientation des moments de transition des deux fluorophores. Stryer et Haugland ont montré qu'avec le composé Dansyl-(L-prolyl)<sub>n</sub>-NH-NH-CO-NH-naphtyl dont ils ont fait varier le nombre de résidus L-proline ( $1 < n < 12$ ), l'efficacité du transfert ne dépend que de la distance

intramoléculaire entre le donneur (naphtyl) et l'accepteur (dansyl), et non de la concentration en donneur et accepteur (Stryer *et al.*, 1967).

De plus, un important facteur dans l'analyse des efficacités de transfert d'énergie est l'orientation des dipôles des deux fluorophores. La relation suivante définit cette orientation :

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2$$

Où  $\theta_T$  est l'angle entre les dipôles du donneur et de l'accepteur,  $\theta_D$  et  $\theta_A$  sont les angles entre les dipôles et les vecteurs directionnels du donneur et de l'accepteur. Selon l'orientation du donneur et de l'accepteur, le facteur  $\kappa^2$  prend une valeur comprise entre 0 et 4. Pour des dipôles alignés et parallèles,  $\kappa^2 = 4$  ; pour des dipôles de directions opposées mais parallèles,  $\kappa^2 = 1$ . Si  $\kappa^2$  varie entre 1 et 4, l'erreur sur le calcul de la distance entre D et A n'est que de 26 %. Par contre, si les dipôles sont orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre ( $\kappa^2 = 0$ ), une importante erreur du calcul de  $R$  est possible (> 50 %).

Le transfert d'énergie de fluorescence offre plusieurs avantages à savoir qu'il est sensible à de faibles variations de distances entre le donneur et l'accepteur, une importante résolution temporelle, une importante sensibilité et une application dans des systèmes complexes. Les informations d'ordre spatiales sont limitées par la taille du donneur et de l'accepteur d'énergie mais également par l'orientation des moments de transition des deux fluorophores. Des expériences ont pu mettre en évidence qu'en introduisant la notion d'orientation, l'erreur sur la distance séparant les deux fluorophores pouvait aller jusqu'à 20 % (Stryer, 1978). De plus, une deuxième caractéristique du transfert d'énergie est une importante résolution temporelle, de l'ordre de la milliseconde, parfois même de la microseconde. Il devrait être alors possible de déterminer les modifications des distances entre deux fluorophores, par exemple au cours de processus enzymatiques, de la contraction musculaires, de la transduction du signal ou encore du transport actifs de soluté. Un avantage supplémentaire du transfert d'énergie est une importante sensibilité, de l'ordre de la nanomole. La sensibilité des méthodes basées sur la fluorescence peut être encore améliorée selon le matériel instrumental utilisé, comme par exemple avec un fluorimètre compteur à photons ou avec une radiation très puissante issue d'un synchrotron (Wouters *et al.*, 2001).

### 5.4.2. Applications du transfert d'énergie de fluorescence

Les applications du FRET sont nombreuses et concernent aussi bien des études des interactions intermoléculaires (récepteur/ligand) que des interactions intramoléculaires (repliement de l'ADN, structure quaternaire d'une protéine) (Maier *et al.*, 2002 ; Truong *et al.*, 2001). De manière générale, il est possible de quantifier le transfert d'énergie à partir de mesures de l'intensité de fluorescence du couple donneur/accepteur ou à partir des cinétiques de déclin de fluorescence des deux entités (Wouters *et al.*, 2001). Le tableau 1 présente quelques approches pour les mesures par transfert d'énergie de fluorescence.

**Tableau 1. Différentes approches pour mesurer le FRET<sup>§</sup>**

Mesure d'intensité	Bibliographie	Cinétiques de déclin de fluorescence	Bibliographie
<b>Intensité du donneur avec photoblanchiment de l'accepteur</b>	(Bastiaens <i>et al.</i> , 1998 ; Llopis <i>et al.</i> , 2000 ; Mas <i>et al.</i> , 2000 ; Siegel <i>et al.</i> , 2000 ; Wouters <i>et al.</i> , 2001 ; Zaccolo <i>et al.</i> , 1999)	<b>Photoblanchiment du donneur</b>	(Bastiaens <i>et al.</i> , 1999 ; Gadella <i>et al.</i> , 1995 ; Jovin <i>et al.</i> , 1989 ; Schmid <i>et al.</i> , 2001)
<b>Intensité du donneur</b>	(Sokol <i>et al.</i> , 1998 ; Tung <i>et al.</i> , 2000)	<b>Demi-vie de la fluorescence du donneur</b>	(Bastiaens <i>et al.</i> , 1996 ; Gadella <i>et al.</i> , 1999 ; Murata <i>et al.</i> , 2000)
<b>Emission « sensibilisé »</b>	(Kraynov <i>et al.</i> , 2000 ; Sorkin <i>et al.</i> , 2000)	<b>Demi-vie de l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur</b>	(Harpur <i>et al.</i> , 2001)
<b>Rapport d'intensité donneur/accepteur</b>	(Miyawaki <i>et al.</i> , 1999 ; Miyawaki <i>et al.</i> , 1997)		

<sup>§</sup> Abréviation : FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfer.

En FRET, l'excitation du fluorophore donneur d'énergie conduit à une atténuation de l'émission du donneur qui s'accompagne d'une apparition de l'émission du fluorophore accepteur d'énergie. Une comparaison des intensités de fluorescence du donneur avant et après photoblanchiment du fluorophore accepteur permet de s'affranchir d'une éventuelle contamination par une émission de l'accepteur (Bastiaens *et al.*, 1998 ; Wouters *et al.*, 2001). La détection de l'atténuation du donneur est relativement simple à mettre en place expérimentalement de part la spécificité intrinsèque de la fluorescence du donneur et de la photo-destruction de l'accepteur. Cependant, cette méthode a ses limites d'application chez la cellule vivante puisque le photoblanchiment requiert une irradiation prolongée pendant laquelle la relocalisation des molécules du donneur peut avoir lieu.

Les mesures de l'émission dite « sensibilisée » de l'accepteur se déterminent de façon plus complexe que la quantification de l'intensité de fluorescence uniquement du donneur. En effet, une contamination par une émission résiduelle du donneur ou une excitation directe de l'accepteur peut se présenter. Le rendement quantique du donneur et/ou de l'accepteur peut varier au sein d'un même échantillon à cause de facteurs environnementaux comme le pH. De plus, cette approche ne peut s'appliquer dans le cas où la stoechiométrie du couple

donneur/accepteur n'est pas respectée, ainsi que pour des constructions chimériques où le donneur et l'accepteur sont attachés à la même molécule dans l'étude des changements de conformation (ex : protéine caméléon) (Miyawaki *et al.*, 1999).

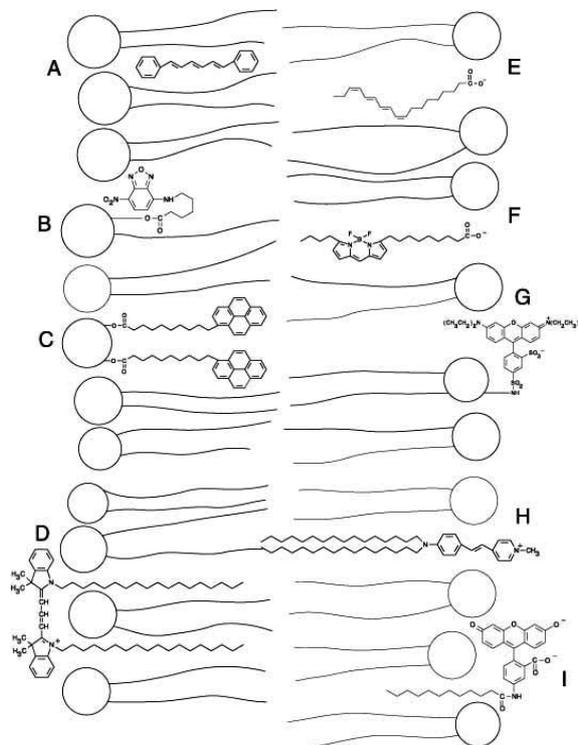
D'autre part, pour mesurer un transfert d'énergie, les cinétiques de déclin de fluorescence du donneur ou de l'accepteur peuvent être déterminées. Cette approche fait intervenir la microscopie par imagerie de durée de vie de la fluorescence (de l'anglais *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* ou *FLIM*) (Bastiaens *et al.*, 1999 ; Gadella *et al.*, 1995), permettant par exemple de suivre l'interaction d'une protéine avec sa cible chez la cellule vivante. La diminution de la durée de vie de la fluorescence du donneur varie en présence de l'accepteur ce qui rend compte d'un transfert d'énergie. Il est à noter qu'en chacun des points de l'image enregistrée, l'intensité totale de la fluorescence du donneur est la somme des intensités des composantes liées et non liées avec l'accepteur d'énergie. Une approche quantitative du transfert d'énergie de fluorescence est cependant rendue possible par FLIM puisque le fluorophore donneur a une cinétique de fluorescence différente selon son état lié ou non à l'accepteur. Une récente étude déterminant le transfert d'énergie de fluorescence *via* le FLIM a pu montrer qu'il était ainsi possible de déterminer en même temps les cinétiques de déclin de fluorescence du donneur et de l'accepteur (Harpur *et al.*, 2001). Toutefois, une variation des durées de vie de la fluorescence des deux fluorophores peut avoir lieu, et ce en raison de facteurs environnementaux, ce qui nécessite de travailler sur des systèmes contrôlés.

Il est également possible de déterminer les cinétiques de photoblanchiment du donneur d'énergie (Jovin *et al.*, 1989). L'intensité constante du donneur décline de façon proportionnelle à sa durée de vie de fluorescence. Par contre, cette mesure du transfert d'énergie nécessite de travailler sur des échantillons préalablement fixés compte tenu de la longue exposition à la source lumineuse.

Le transfert d'énergie de fluorescence apparaît comme un moyen privilégié pour étudier par exemple la protéomique, soit pour identifier des motifs de liaisons soit pour établir une interaction entre différentes protéines. Quelque soit l'approche choisie, la principale difficulté est le choix des couples de fluorophores puisque les spectres d'émission et d'excitation, respectivement des fluorochromes donneurs et accepteurs doivent se superposer. Ce choix constitue le plus souvent une limite à l'application expérimentale du FRET.

Dans une étude initiatrice à ce travail de thèse, le transfert d'énergie d'une sonde NBD-phosphatidyléthanolamine (NBD-PE) vers une molécule anticancéreuse (anthracyclines ou MTX) a permis de déterminer la diffusion du xénobiotique au travers d'une membrane synthétique (Regev *et al.*, 2005). Dans cette étude, il apparaît que les variations de l'atténuation de la fluorescence de la sonde suivent une cinétique biexponentielle après l'ajout de composés antinéoplasiques (anthracyclines ou MTX). Ces cinétiques mettent en évidence une rapide intégration des anticancéreux dans le feuillet externe des membranes de liposomes, suivi d'un basculement plus lent (< 0,7 min pour les anthracyclines mais de 6 min pour MTX) vers le feuillet interne avant une libération des composés vers le cytoplasme. A partir de l'atténuation d'une sonde membranaire, les mesures de transfert d'énergie de fluorescence ont donc permis d'étudier la distribution et les vitesses de diffusion d'un composé anticancéreux au travers d'une membrane. Notre travail visera à suivre une approche similaire sur un système cellulaire vivant. Afin de répondre à la problématique, l'étude du transfert d'énergie sera menée grâce à une sonde membranaire fluorescente (4-(4-(didécylamino)styril)-N-méthylpyridinium ou 4Di-10ASP) vers MTX.

### 5.4.3. Atténuation de fluorescence



**Figure 12. Localisation et orientation des sondes fluorescentes membranaires dans la bicouche phospholipidique.**  
**A : DPH ; B : NBD-C<sub>6</sub>-HPC ; C : bis-pyrene-phosphatidylcholine ; D : DiI ; E : acide *cis*-parinarique ; F : C<sub>4</sub>-BODIPY 500/510 ; G : N-rhodamine-phosphatidyléthanolamine ; H : DiA ; I : C<sub>12</sub>-fluorescéine.**

La nature chimique d'une sonde fluorescente détermine sa localisation dans une bicouche lipidique où chaque lipide est une entité amphiphile composée d'une longue chaîne acyle hydrophobe et d'une région hydrophile en contact avec les milieux extracellulaires et cytosoliques. La figure 12 compare la localisation des sondes fluorescentes les plus couramment utilisées dans des études cellulaires.

Le rendement quantique et les propriétés spectrales de fluorescence d'une sonde sont donc sensibles à leur environnement. Une des conséquences d'une modification des propriétés membranaires peut être une modification du rendement quantique de la sonde qui se traduit par une atténuation de la fluorescence. Cette atténuation peut être causée par différents mécanismes comme (i) un transfert d'énergie de la sonde vers un composé (lipide(s) environnant(s), molécule anticancéreuse...), (ii) une influence d'un facteur exogène (pH...) ou (iii) une interaction avec d'autres molécules de la même espèce si la densité du fluorophore est trop importante.

# ***MATERIEL ET METHODES***

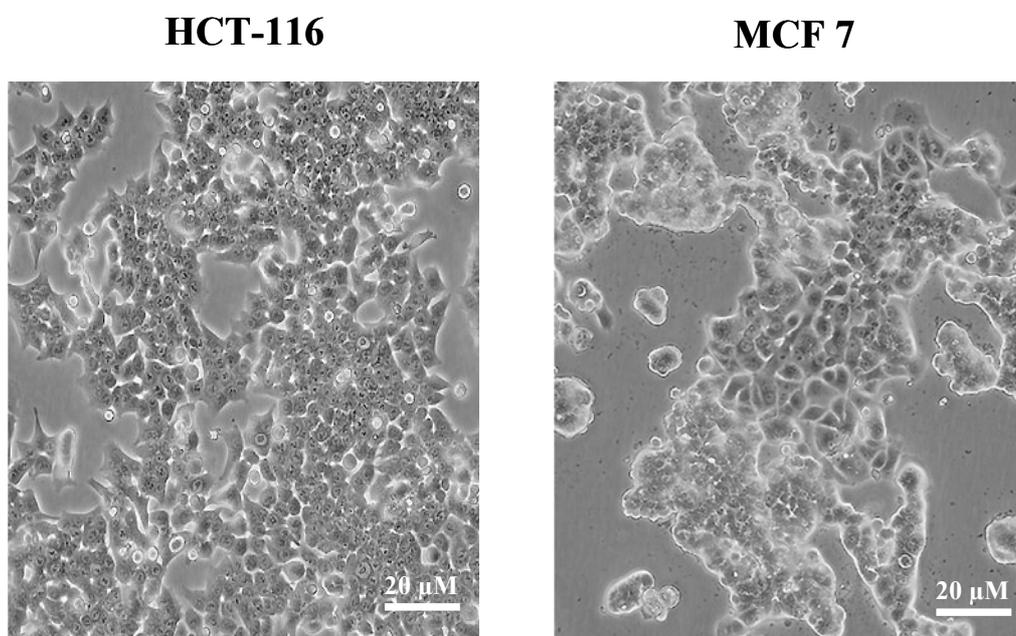
---

## **1. Système biologique**

### **1.1. Lignées cellulaires**

La souche HCT-116 est issue d'un adénocarcinome de colon humain et a été obtenue de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) (n° ATCC : CCL-247, Manassas, VA, USA). A partir de la lignée parentale, un premier lot constitue la lignée sensible au composé cytotoxique SN-38, référencée par HCT-116 S. Un deuxième lot est traité en continu par des concentrations croissantes de SN-38 de 1 nM à 15 nM pendant une période de 8 mois. La population cellulaire ayant poussée dans 15 nM SN-38 a généré les clones résistants HCT-116 R. Les clones résistants sont continuellement cultivés dans 15 nM SN-38 jusqu'à 5 jours avant toute manipulation.

Les cellules MCF7 sont issues d'un adénocarcinome mammaire d'une femme d'origine caucasienne âgée de 69 ans (Fairchild *et al.*, 1987). La souche sensible est référencée par MCF7 S. Les cellules résistantes MCF7 R sont sélectionnées à partir d'une exposition continue à des concentrations croissantes de doxorubicine. La figure 13 compare la morphologie des lignées cellulaires HCT-116 et MCF 7.



**Figure 13. Observation par microscopie à contraste de phase des lignées cellulaires HCT-116 et MCF 7 (Objectif × 10).**

### 1.2. Conditions de culture

Toutes les cellules sont cultivées *in vitro* dans du milieu de culture liquide RPMI 1640 Glutamax-1 (Gibco, UK). Ce milieu nutritif est tamponné par du bicarbonate de sodium à un pH 7 et supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Gibco, UK) préalablement décomplémenté 30 min à 56°C, et 1 % d'un mélange d'antibiotiques/antimycotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL streptomycine et 2,5 µg/mL de fungizone) (Gibco, UK). Ce milieu constitue un milieu complet.

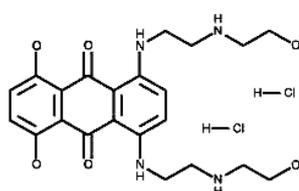
Les cellules sont cultivées en monocouche dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5 % CO<sub>2</sub>. Chaque lignée est repiquée pendant la phase exponentielle de leur croissance (3-4 jours) dans du milieu complet et dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical (ESI Flufrance, France). Après le retrait du milieu de culture usagé, les cellules sont lavées dans un volume d'une solution tampon phosphate (Phosphate Buffer Solution ou PBS ; Gibco, UK) puis 500 µL de trypsine (Trypsine/EDTA (1×) dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> ; Gibco, UK) sont ajoutés. Cette enzyme digère l'extrémité des protéines d'adhésion et permet le décollement du tapis cellulaire. Les cellules sont incubées dans l'étuve pendant 5 min afin de favoriser le décollement, puis elles sont diluées dans 3 mL de milieu complet. Chaque lignée est ensemencée à la densité de 10<sup>5</sup> cellules / mL dans un volume de 6 mL dans des boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc, Danemark). Les numérations sont réalisées à l'aide de l'hématimètre de Malassez. La viabilité des cellules est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan 0,4 % (Sigma, France). Ce colorant vital traverse facilement la membrane plasmique des cellules mortes et colore ainsi le cytoplasme en bleu, alors que les cellules vivantes gardent leur aspect translucide (Boyse *et al.*, 1964).

Il faut noter que pour toutes les études, les cellules sont utilisées du passage 6 au passage 40 au maximum. Le passage 6 correspond à la sixième dilution après réception des cellules de l'ATCC. La limitation du nombre d'entretiens à partir d'une même ampoule de cellules congelées permet d'éviter une dérive et une différenciation de la lignée qui pourrait nuire à l'homogénéité de la population cellulaire et rendrait difficile l'interprétation et la comparaison des résultats dans le temps.

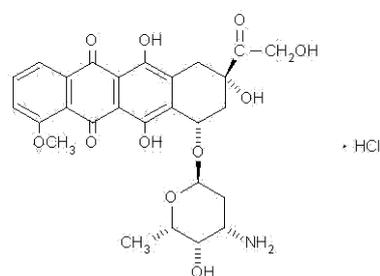
## 2. Effecteurs pharmacologiques

La mitoxantrone (MTX), la doxorubicine (DOX), les anesthésiants alcool benzylique (AB) et chloroforme (CHCl<sub>3</sub>), et les modulateurs protéiques verapamil (VPL) ou cyclosporine A (CsA) sont obtenus chez Sigma (USA ; MM<sub>MTX</sub> = 517,4 ; MM<sub>DOX</sub> = 579,98 ; MM<sub>AB</sub> = 108 ; MM<sub>VPL</sub> = 491,06 ; MM<sub>CsA</sub> = 1202,61). L'inhibiteur fumitrémorgine C (FTC) est obtenu chez Alexis Biochemicals (Axxora Platform, UK ; MM = 379,5). La figure 14 illustre leur structure chimique semi développée.

### MOLECULES ANTICANCEREUSES

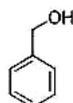


Mitoxantrone

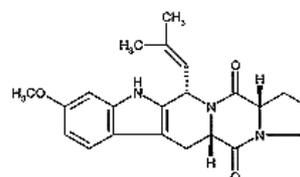


Doxorubicine

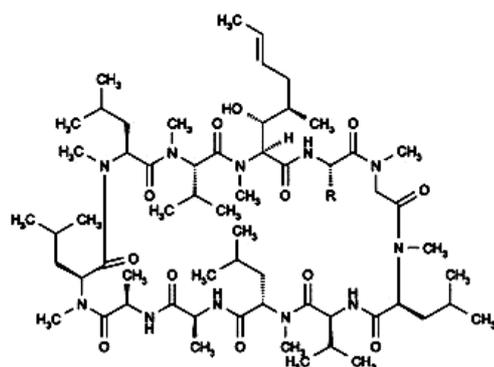
### MODULATEURS



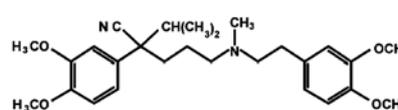
Alcool benzylique



Fumitrémorgine C



Cyclosporine A



Vérapamil

Figure 14. Structure moléculaire des molécules anticancéreuses (mitoxantrone, doxorubicine) et des agents modulateurs de protéines à efflux utilisés (alcool benzylique, fumitrémorgine C, cyclosporine A et verapamil).

### 3. Marqueurs fluorescents de membrane cellulaire

Le marqueur 4-(4-(didécylamino)styryl)-N-méthylpyridinium ou 4Di-10ASP (Molecular probe/invitrogen, France, MM = 618,73) est utilisé pour marquer la membrane plasmique des cellules HCT-116 R et S (figure 15). Cette sonde ne présente aucune fluorescence dans l'eau ou dans un solvant polaire. Le 4Di-10ASP est donc fortement sensible à la polarité ambiante. L'émission de fluorescence est décalée vers les faibles longueurs d'onde (bleu) dans un environnement polaire, et vers les longueurs d'onde supérieures (rouge) pour un environnement moins polaire (Thanos *et al.*, 2000). La sonde est préparée à 5 mM dans du DMSO est stockée à -20°C dans le noir.

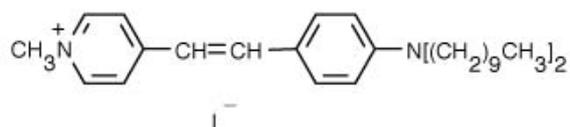


Figure 15. Structure moléculaire de la sonde 4-(4-(didécylamino)styryl)-N-méthylpyridinium.

### 4. Test de cytotoxicité

Les concentrations inhibitrices de croissance de MTX pour les souches sensibles (HCT-116 S et MCF7 S) et résistantes (HCT-116 R et MCF7 R) sont déterminées par un test de prolifération cellulaire. Dans le test MTT, les sels de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5diphényl Tétrazolium (MTT) sont réduits en cristaux de formazan insoluble dans l'eau uniquement par les cellules viables. Ce test rend compte d'une activité métabolique mitochondriale, impliquant l'enzyme succinate-tétrazolium réductase (figure 16).

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 96 puits à la concentration de 25000 cellules/mL pendant 24 h. Celles-ci sont traitées selon une gamme de concentrations croissantes de MTX pour la lignée HCT-116 ou de DOX pour la lignée MCF 7 pendant 72 h. Ensuite, 20 µL d'une solution MTT à 5 mg.mL<sup>-1</sup> sont ajoutés aux cellules pendant 4 h à 37°C. Le milieu usagé est retiré puis les cristaux de formazan formés sont solubilisés avec 200 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) avant une lecture de l'absorbance à 540 nm de chaque lot cellulaire sur un lecteur de microplaques ELISA (Cambridge Technology, USA) (figure 17).

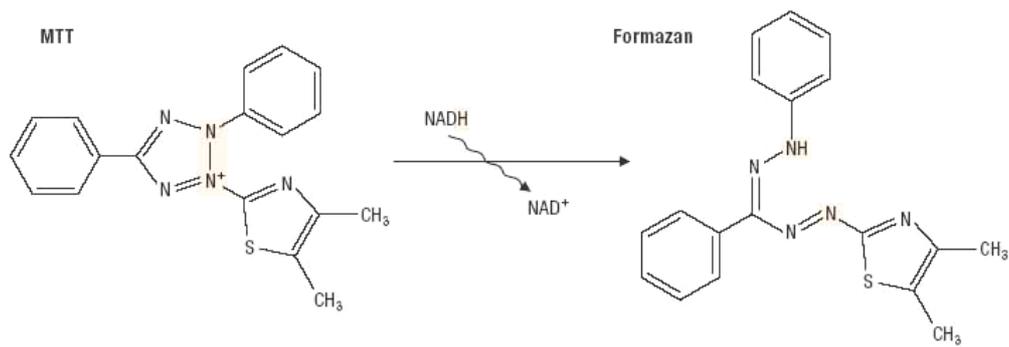


Figure 16. Structure moléculaire de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5diphényl Tétrazolium (MTT) et le produit de la réduction de ces sels (formazan) par la succinate-tétrazolium réductase.

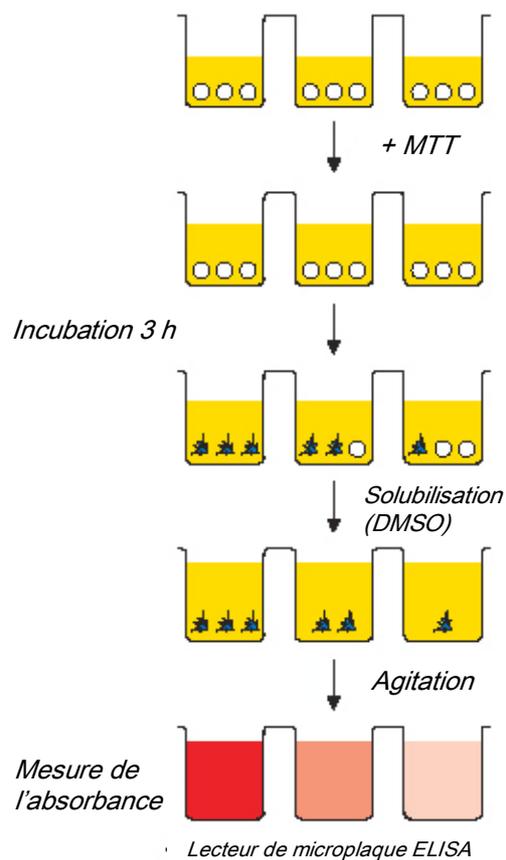


Figure 17. Mesure par la lecture de l'absorbance de l'activité métabolique selon la réduction des sels MTT.

Le pourcentage de survie cellulaire est calculé selon la relation suivante :

$$\frac{\text{Moyenne des absorbances des cellules traitées}}{\text{Moyenne des absorbances des cellules non traitées}} \times 100$$

Les concentrations inhibitrices (CI<sub>50</sub>) de croissance de MTX et DOX pour les souches sensibles et résistantes sont déterminées à partir des pourcentage de survie cellulaire, et correspondent aux concentrations en médicament induisant 50 % d'inhibition de croissance de chaque lignée. L'index de résistance (IR) est évalué comme suit :

$$IR = \frac{CI50 \text{ lignée résistante}}{CI50 \text{ lignée sensible}}$$

## **5. Mesure de l'accumulation de la mitoxantrone par spectrophotométrie**

Les mesures de l'accumulation intracellulaire de MTX sont effectuées chez les deux souches cellulaires par la spectrophotométrie utilisant un spectrophotomètre UVIKON (Kontron Instruments, Italie). 500 µL d'un lysat cellulaire sont analysés entre 550 nm et 680 nm avec une vitesse de balayage du spectre d'absorbance de 50 nm/min. Une gamme étalon de MTX en solution est mesurée entre les concentrations 10<sup>-7</sup> - 10<sup>-5</sup> M afin de valider cette méthode. Après la soustraction de la ligne de base, la concentration intracellulaire de MTX est calculée à partir de la valeur maximale de l'absorbance à 622 nm du spectre du médicament. Cette valeur est comparée à la gamme étalon puis ramenée à 10<sup>6</sup> cellules.

Une quantification de MTX intracellulaire est effectuée chez les deux types cellulaires afin de déterminer l'influence de fluidifiants comme l'alcool benzylique (AB) et le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) sur l'influx de MTX. Les cellules HCT-116 R et S sont pré-incubées ou non avec 10 mM AB ou 10 mM CHCl<sub>3</sub> pendant 10 min à 37°C, puis traitées par 5 µM MTX pendant 1 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub>.

Afin de déterminer les effets des agents AB et CHCl<sub>3</sub> sur l'efflux de MTX par la protéine BCRP, une seconde partie de l'étude a porté sur les variations de la concentration intracellulaire de MTX au cours du temps. Les cellules HCT-116 R sont incubées avec 5 µM MTX pendant 1 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub>, lavées puis mises en

contact avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  à 37°C de 0 à 120 min. La souche HCT-116 S est incubée à la concentration plus faible de 2  $\mu\text{M}$  MTX.

Pour les deux points de l'étude, les deux types cellulaires sont trypsinés (Trypsine/EDTA (1×) dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  ; Gibco, UK) puis lavées deux fois dans du PBS (Gibco, UK). Les cellules traitées sont lysées dans une solution aqueuse de Triton X-100 1 % (Sigma, USA) pendant 5 min à température ambiante avant la lecture de leur absorbance.

## 6. La spectroscopie SERS

### 6.1. Préparation du colloïde

L'hydrosol d'argent, ou colloïde, est préparé selon la méthode de Lee et Meisel (Lee *et al.*, 1982). 90 mg de nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) (ALFA, MM = 169,87) sont dissous dans 500 mL d'eau distillée (sur colonne à quartz et sous pression d'azote gazeux). La solution est chauffée à 100°C. 10 mL d'une solution de citrate de sodium 1 % (Sigma, USA, MM = 258,1) sont ajoutés sous agitation vigoureuse à la solution de  $\text{AgNO}_3$ . Le mélange est maintenu à 100°C pendant 60 à 90 min, puis conservé à 4°C après préparation. L'absorption spectrale de la suspension brunâtre montre un maximum vers 415 nm (figure 18).

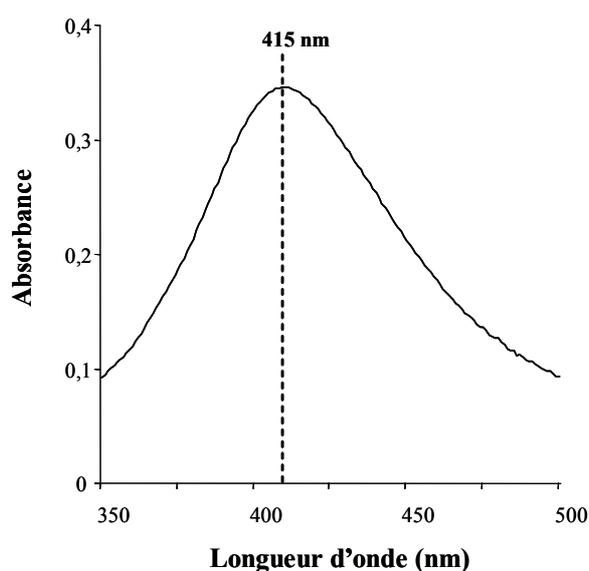


Figure 18. Spectre d'absorbance du colloïde d'argent préparé selon la méthode de Lee et Meisel (Lee *et al.*, 1982).

## 6.2. Instrumentation

L'instrumentation utilisée pour enregistrer des spectres SERS est la même que pour la spectroscopie Raman classique (Figure 19). En général, dans un spectromètre Raman, on focalise sur l'échantillon ou à l'intérieur de celui-ci une radiation monochromatique de forte densité d'énergie dont la source est un laser. Une partie de la radiation diffusée par un condensateur optique vers le système dispersif, habituellement un double monochromateur. Dans ce dernier, la lumière diffusée est diffractée en fonction des fréquences avec éjection des photons Rayleigh. Il faut noter que la capacité dispersive du monochromateur doit être élevée pour mieux résoudre les bandes fines présentes dans le spectre Raman. Par ailleurs, elle peut être moins importante pour contenir la totalité d'une bande large du spectre de fluorescence. A la sortie du monochromateur se forme l'image du spectre qui est détecté à l'aide d'un détecteur multi canal (une barrette de photodiodes ou capteur CCD).

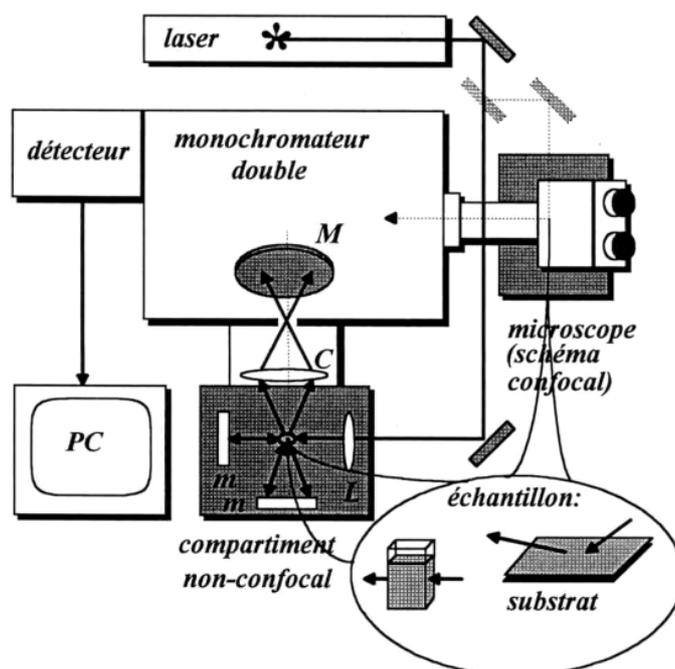


Figure 19. Schéma du dispositif expérimental pour la spectroscopie SERS. *L* : lentille ; *M*, *m* : miroirs ; *C* : condensateur.

Le spectromètre est relié à un ordinateur qui permet l'acquisition et le traitement mathématique des spectres (normalisation, juxtaposition...) par l'intermédiaire d'un logiciel conçu au laboratoire (Labspec).

### **6.2.1. La micro-spectroscopie SERS**

Les manipulations par micro-spectroscopie SERS (micro-SERS) sont menées avec un microspectromètre LabRam (Horiba Jobin Yvon), ayant pour source lumineuse (785 nm) un laser Titane/Saphir (Stabilite 2017, Spectra Physics Inc., USA). Le microspectromètre est équipé d'un microscope optique (Olympus, Japon) et les mesures sont enregistrés avec un objectif  $\times 100$  (N.A. = 0,9) compatible avec une source lumineuse dans le proche infrarouge. Afin d'irradier un seul grain de colloïde, un filtre d'atténuation d'ordre  $10^4$  est inséré sur le trajet optique. Dans ces conditions, la puissance du laser sur l'échantillon est de  $20 \mu\text{W}$ , et le diamètre de l'impact du laser observé est proche du micron. Comme élément dispersif, le microspectromètre LabRam est équipé d'une grille holographique de 950 lignes/mm avec une résolution de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Les spectres SERS sont enregistrés de  $200$  à  $1800 \text{ cm}^{-1}$  avec un temps d'acquisition de 10 secondes.

### **6.2.2. La macro-spectroscopie SERS**

Les manipulations par macro-spectroscopie SERS (macro-SERS) sont menées grâce à un spectromètre OMARS 89 (Dilor, France). Ce spectromètre comprend deux étages dispersifs. Le premier est constitué d'un double monochromateur à réseau holographique plan. Le système dispersif est un spectrographe stigmatique. La dispersion est assurée par un réseau de 1800 traits/mm qui permet l'analyse d'un domaine spectral d'environ  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Le système de détection est constituée d'une barrette de photodiodes (512 photodiodes au silicium refroidies par effet Peltier) couplée à un amplificateur de lumière. La source d'excitation ( $514,5 \text{ nm}$ ) est assurée par un laser à Argon ionisé (Beamloc modèle 2020-03, Spectra Physics Inc., USA).

## **6.3. Acquisition des spectres SERS**

Une première série de tests a permis de déterminer les conditions d'agrégation du colloïde d'argent. Plusieurs lots de colloïde isotonique (la solution mère est diluée au 1/3 dans l'eau distillée) à pH 7,2 sont agrégés par les sels  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , ou  $\text{NaCl}$  ( $[\text{sel}]_{\text{final}} = 0,06 \text{ M}$ ) et mélangé à  $10^{-8} \text{ M}$  MTX.  $\text{NaCl}$  permet d'obtenir la meilleure amplification Raman de MTX, et montre des conditions d'agrégation du colloïde plus reproductibles. Pour la suite des expériences, l'agrégation de l'hydrosol d'argent se fera avec ce sel.

### **6.3.1. Par micro-spectroscopie SERS**

Pour les manipulations en micro-SERS, les souches cellulaire sont incubées avec 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ , puis lavées deux fois par du milieu RPMI 1640 (Gibco, UK) sans MTX et non-fluorescent. Chaque lignée est mélangée avec 500  $\mu\text{L}$  de colloïde d'argent isotonique pré-agrégés (pH 7,2) pour l'analyse par micro-SERS. Les particules de colloïde agrégées et les cellules sont visualisées grâce à une caméra vidéo noir et blanc. Des agrégats stables au niveau de la surface des cellules sont irradiés un à un avec le faisceau lumineux. Chaque spectre de MTX est obtenu en focalisant l'impact du laser sur un grain de colloïde en contact avec la membrane cellulaire. Les spectres présentés sont représentatifs d'une série de cinq spectres reproductibles de cellules traitées par MTX. Dans chaque condition expérimentale, les cellules seules ne montrent aucune contribution spectrale. Un contrôle avec  $10^{-9}$  M MTX en solution est effectué en focalisant l'impact du laser sur un grain de colloïde en contact avec le fond de la boîte de pétri.

### **6.3.2. Par macro-spectroscopie SERS**

Chaque type cellulaire est traité avec 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ . Puis les cellules sont trypsinées (100  $\mu\text{L}$  de trypsine ; Trypsine/EDTA (1 $\times$ ) dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  ; Gibco, UK) et lavées deux fois par du milieu RPMI 1640 (Gibco, UK) sans MTX et non-fluorescent (3 min à 1000 tours/min). Chaque population de cellules est reprise dans 50  $\mu\text{L}$  de colloïde isotonique pré-agrégés (pH 7,2) pour l'analyse par macro-SERS. Après chaque manipulation, la viabilité des cellules analysées avec l'hydrosol d'argent est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan 0,4 % (Sigma, France). La mort cellulaire est estimée à moins de 0,5 %.

Pour déterminer l'effet de fluidifiants, chaque type cellulaire est incubé avec 10 mM AB ou 10 mM  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ . Puis les cellules sont traitées par 2 $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ , trypsinées (Trypsine/EDTA (1 $\times$ ) dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  ; Gibco, UK) et lavées deux fois dans du milieu RPMI 1640 à 4°C (Gibco, UK) sans MTX non fluorescent. Pour chaque étape de l'analyse, un contrôle avec  $10^{-9}$  M MTX permet de vérifier le fonctionnement correct de

l'appareillage et la réactivité optimale du colloïde agrégé. Chaque spectre présenté est le spectre moyen de  $10^6$  cellules traitées par MTX, acquis selon 20 accumulations de 3 secondes chacune et chaque spectre est représentatif d'une série de trois spectres reproductibles de trois lots cellulaires différents. Pour les figures 35, 36 et 39, chaque valeur reportée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée des spectres SERS entre  $1250\text{ cm}^{-1}$  et  $1350\text{ cm}^{-1}$ . La significativité de chaque résultat est déterminée selon un test t de Student avec  $p < 0,01$ .

## **7. La microscopie confocale à épifluorescence**

### ***7.1. Instrumentation***

Un microscope MRC-1024 (BioRad, Hemel hemsyead, Royaume-Uni) est utilisé pour l'acquisition d'images selon des segments optiques donnés. Les détails du trajet optique sont présentés sur la figure 20. Le principe de confocalité sur lequel repose le gain en résolution sera plus détaillé avec les spectromètres confocaux.

Le microscope confocal possède de nombreux avantages par rapport à la microscopie conventionnelle. Tout d'abord la faible profondeur de champ du microscope permet d'obtenir une image d'un plan focal (coupe optique) avec une définition bien supérieure au microscope conventionnel et par conséquent le bruit de fluorescence continu est pratiquement éliminé. Il en résulte une très bonne sensibilité de détection, une augmentation du contraste et une clarté des images. Un autre avantage du microscope confocal est l'obtention de coupes optiques dans les plans X, Y mais également suivant un plan parallèle à l'axe optique (plan X, Z) qui peuvent faire l'objet de reconstructions tridimensionnelles. Ces coupes optiques n'affectent en rien l'intégrité de l'échantillon biologique contrairement aux coupes physiques nécessaires en microscopie photonique et électronique. En outre, l'acquisition numérisée des images permet d'accroître les possibilités d'analyse et de quantification sur une station de traitement d'images.

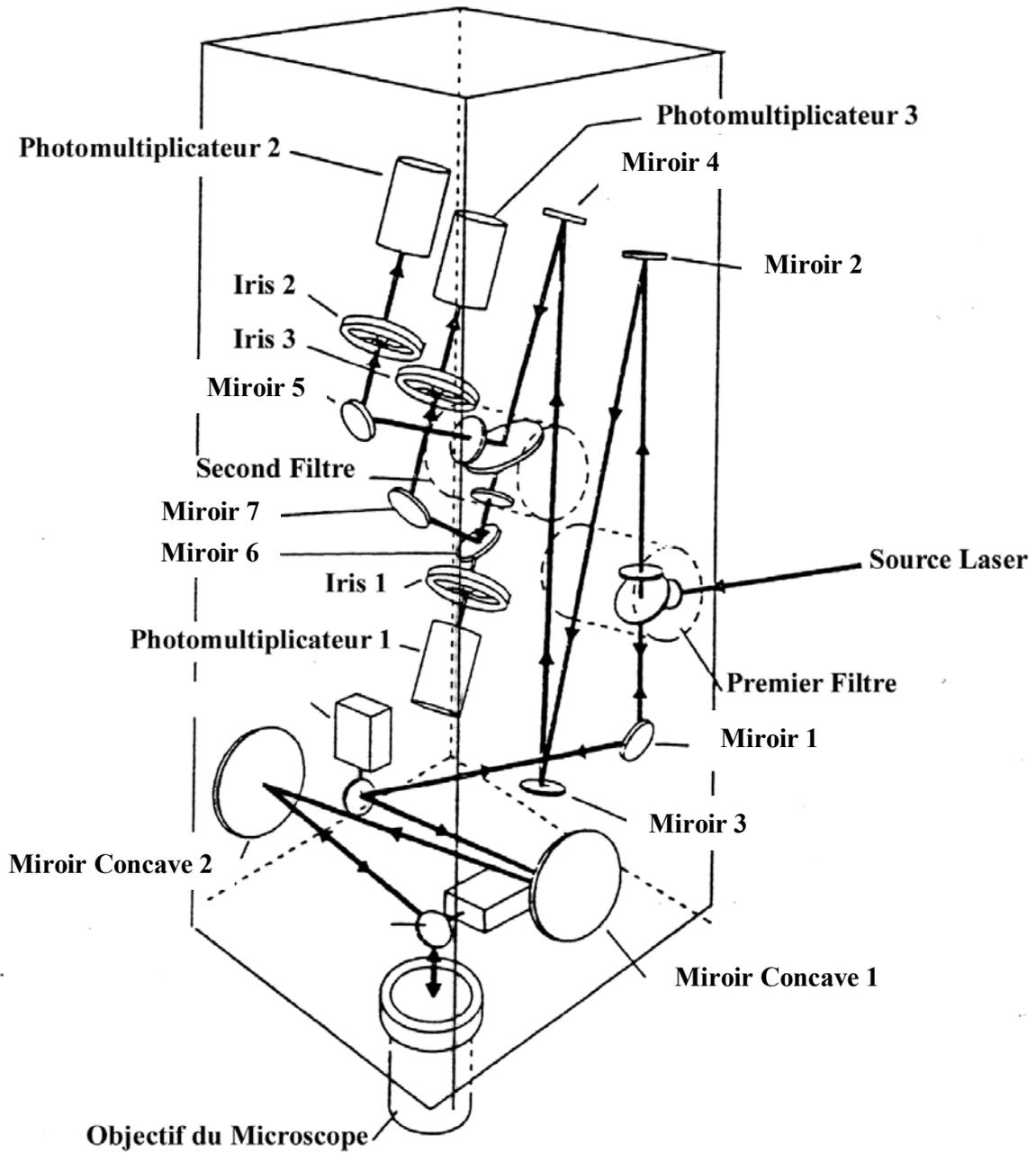


Figure 20. Détails du trajet optique du microscope MRC-1024 (BioRad, Hemel hemsyead, UK).

### **7.1.1. Source lumineuse**

L'un des principes de base du microscope confocal est d'illuminer l'échantillon avec une source monochromatique fortement convergente, ce qui permet d'avoir une meilleure focalisation et une irradiation plus efficace. Le microscope confocal MRC-1024 est équipé de deux lasers : un laser Argon ionisé d'une puissance totale de 100 mW générant les raies 488 nm et 514 nm (36,6 mW et 24,5 mW respectivement) et la raie 457 nm (5,4 mW) ; un laser Krypton/Argon d'une puissance totale de 15 mW produisant les raies 488 nm et 568 nm (2,2 mW chacune) et une raie à 647 nm (3,2 mW). Le faisceau laser est focalisé en un point d'environ 0,3  $\mu\text{m}$  de diamètre (en fonction de l'objectif) dans le plan de mise au point.

### **7.1.2. Le balayage du faisceau laser**

Le déplacement du faisceau laser sur l'échantillon est généré par un système de balayage à l'aide de deux miroirs galvanométriques disposés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. La conjugaison des oscillations en X et Y amène le faisceau laser à balayer l'objet selon une ligne en X puis, après un déplacement d'une certaine valeur en Y, à balayer une nouvelle ligne en X. Dans le microscope MRX-1024, une image peut être constituée jusqu'à 1024 lignes et de 1024 colonnes.

### **7.1.3. La détection**

Le détecteur est composé de 3 photomultiplicateurs (PMT). Un PMT transforme un flux de photons en courant électrique. Le voltage est fonction de ce flux de photons. Dans ce système, les photons sont captés par une cathode dont ils éjectent des électrons lors de leur impact. Ces électrons sont ensuite attirés en cascade par plusieurs anodes. Le gain final est de  $10^6$ .

Les photons sont comptés et cumulés durant le temps d'acquisition. Lors de la numérisation d'une image, il y a alternance régulière de périodes d'acquisition et de non acquisition. La valeur du voltage est numérisée puis classée dans l'un des 256 niveaux de gris que peut présenter l'image. Chaque point de l'image caractérisé par son intensité de fluorescence est un pixel. La juxtaposition de toutes les valeurs numérisées pour chaque pixel permet de reconstituer une image. Ces images seront gérées par le logiciel LaserSharp Version 2.1T (BioRad software, UK) puis traitées ensuite par le logiciel Confocal Assistant.

### 7.1.4. Les filtres

Le choix des filtres est crucial pour obtenir un signal de fluorescence. On conjugue un filtre d'excitation et un autre d'émission de façon à visualiser jusqu'à trois fluorescences simultanément. Analogues dans leurs propriétés à ceux utilisés en spectroscopie, ces filtres peuvent être des passe-bandes, des passe-hauts, des passe-bas, ou des filtres dichroïques (figure 21 et tableau 2).

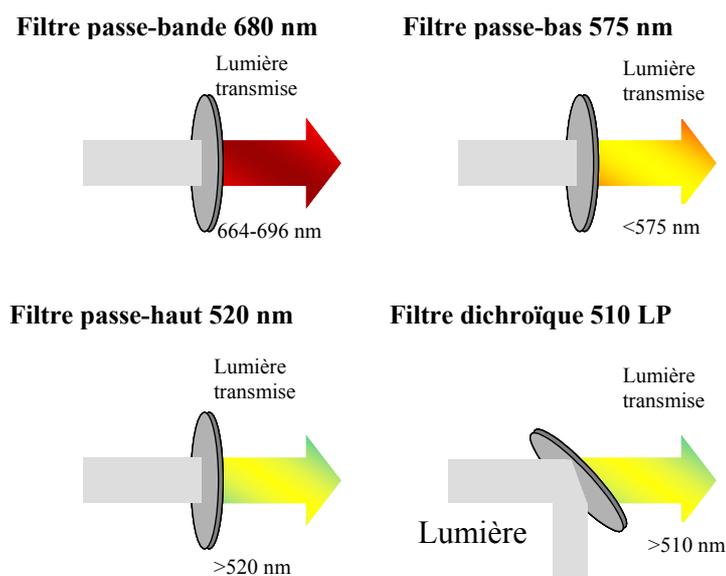


Figure 21. Exemple de filtres utilisés en microscopie et spectroscopie de fluorescence.

Tableau 2. Récapitulatif des différents filtres d'excitation et d'émission disponibles pour le microscope confocal MRC-1024.

Filtres d'excitation			Filtre d'émission
Nom	Type	Caractéristiques	
A1	527 LP	Réfléchit 488 et 514 nm	A2
T1	Trichroïques	Réfléchit 488, 568 et 647 nm	T2
VHS	510 LP	Réfléchit 457 et 488 nm	A2
B1		Réfléchit tout à 20 %	B2

Lors de marquages multiples, les filtres d'émission ne permettent pas toujours de bien séparer des fluorescences proches, aussi chaque PMT est précédé de filtres dont les bandes passantes sont également plus restreintes (tableau 3).

**Tableau 3. Filtres caractéristiques de chaque photomultiplicateur.**

Filtres caractéristiques de chaque photomultiplicateur		
Photomultiplicateurs	Type	Bandes passantes
PMT 1	680 DF 32	664 – 696 nm
PMT 2	522 DF 35	505 – 539 nm
PMT 3	OG 515 ou 515 LP	664 – 696 nm
	525 EFLP	525 – 640 nm
	605 DF 32	599 – 621 nm

### 7.1.5. La résolution des images

La résolution théorique d'un microscope confocal est supérieure à celle d'un microscope conventionnel, soit  $r = 0,46 \lambda / N.A$  au lieu de  $r = 0,61 \lambda / N.A$ . Ceci représente un gain de 25 % (pour  $\lambda = 550$  nm et  $N.A = 1,4$  ; la résolution théorique passe de  $0,23 \mu\text{m}$  à  $0,18 \mu\text{m}$ ). De même, la résolution axiale selon l'axe z est améliorée.

### 7.1.6. Le rôle de l'iris

Un microscope confocal utilise un détecteur ponctuel. Devant ce détecteur se trouve un diaphragme (iris) de diamètre ajustable (7 à 0,6 mm). Son degré d'ouverture permet d'optimiser :

- ✓ La profondeur de champ :  $0,7 \mu\text{m}$ ,  $0,35 \mu\text{m}$  et  $0,3 \mu\text{m}$  pour les diamètres d'iris respectifs de 3 mm, 1 mm et 0,6 mm
- ✓ L'intensité du signal : plus l'iris est petit, plus la quantité de lumière parvenant au détecteur est faible
- ✓ Le rapport signal/bruit : le bruit de fond lié à la diffusion de la lumière diminue plus le diaphragme est fermé.

## **7.2. Localisation de l'émission de fluorescence de la mitoxantrone**

Pour la localisation des grains de colloïde, les expériences sont effectuées avec un laser Kr<sup>+</sup>/Ar<sup>+</sup> dont la longueur d'onde d'excitation est soit 568 nm pour les images de MTX en fluorescence soit 488 nm pour les images du colloïde en réflexion. L'émission de la fluorescence de MTX est enregistrée au travers d'un filtre passe-bande à 680 nm, et la réflexion des grains de colloïde au travers d'un filtre bleu en position réflexion. Chaque image de 512 × 512 pixels de 0,1 μm<sup>2</sup> chacun est acquise selon un filtrage de type Kalman afin de réduire le bruit de fond (3 accumulations). Une première image est enregistrée en mode fluorescence pour localiser l'émission de fluorescence de MTX (les grains de colloïde sont également visibles en raison d'une diffusion importante du rayonnement du laser sur les particules). Une seconde image est enregistrée en mode réflexion pour localiser exclusivement les grains de colloïde. La superposition de ces deux images est réalisée grâce au logiciel Confocal Assistant.

Pour observer l'effet de fluidifiants sur la distribution de MTX, les cellules HCT-116 R et S sont pré-incubées avec 10 mM AB ou 10 mM CHCl<sub>3</sub> pendant 10 min à 37°C, puis traitées par 5 μM MTX pendant 1 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie de 5 % CO<sub>2</sub>. Pour les modulateurs des ABC transporteurs VPL et CsA, les lignées cellulaires sont traitées par 5 μM MTX et 3 μM VPL ou CsA pendant 1 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie de 5 % CO<sub>2</sub>. Pour l'inhibiteur FTC, les cellules sont incubées avec 5 μM FTC pendant 2 h à 37°C sous atmosphère humide enrichie de 5 % CO<sub>2</sub> et 5 μM MTX sont ajoutés la dernière heure d'incubation. Les cellules sont observées après leur lavage dans un milieu RPMI (Gibco, UK) à 4°C sans MTX et non fluorescent. Pour chaque expérience, la longueur d'onde de la source lumineuse (laser Kr<sup>+</sup>/Ar<sup>+</sup>) est de 568 nm. L'émission de la fluorescence de MTX est enregistrée au travers d'un filtre passe-bande à 680 nm. Chaque image de 512 × 512 pixels de 0,1 μm<sup>2</sup> chacun est acquise selon un filtrage de type Kalman afin de réduire le bruit de fond (3 balayages laser).

### **7.3. Transfert d'énergie de la sonde vers la mitoxantrone**

La diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique est observée indirectement par l'atténuation de la fluorescence de la sonde 4Di-10ASP. La longueur d'onde d'excitation de la sonde (laser Ar<sup>+</sup>) est de 488 nm et l'émission de la fluorescence est enregistrée au travers d'un filtre passe-haut à 515 nm. Chaque type cellulaire est incubée avec 4 µM 4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C sous atmosphère humide enrichie de 5 % CO<sub>2</sub>, puis lavé deux fois dans du milieu RPMI 1640 (Sigma, USA) avant leur observation dans une chambre thermostatée à 37°C. Une première image est enregistrée au temps initial permettant de localiser l'émission de fluorescence de la sonde. 10 µM MTX sont ajoutés et une seconde image est enregistrée après 15 secondes.

Il est possible de mesurer le transfert d'énergie de 4Di-10ASP (donneur d'énergie) vers MTX (accepteur d'énergie) en comparant l'atténuation de la fluorescence avec l'émission initiale de la sonde. Grâce au logiciel LabSpec, l'efficacité d'atténuation de la fluorescence de la sonde par MTX ( $E_A$ ) est calculée en chacun des points de l'image, et correspond à l'équation suivante :

Equation :

$$E_A = 1 - \frac{F'(i)}{F(i)}$$

Où  $F(i)$  correspond à l'intensité de fluorescence de la sonde au point  $i$  de l'image avant l'ajout de MTX, et  $F'(i)$  l'intensité de fluorescence de la sonde après le transfert d'énergie vers MTX au point  $i$  correspondant. Cette équation suppose que la sonde est distribuée de manière homogène et que cette distribution reste identique après l'ajout de MTX. De plus, la localisation du transfert d'énergie de la sonde vers le médicament suppose également que les cellules soient parfaitement immobiles avant et après l'ajout de MTX. Plusieurs ajouts d'un volume de tampon phosphate (PBS) ont montré d'une part un photoblanchiment négligeable et d'autre part aucun changement de position des cellules entre  $t = 0$  et 15 sec.

## 8. La spectrofluorimétrie

### 8.1. Instrumentation

Un spectrofluorimètre Shimadzu RF5000 (Shimadzu, Japon) a permis de réaliser des études macroscopiques (solution et cellules en suspension marquées par une sonde fluorescente). Le principe du Shimadzu RF5000 est détaillé sur la figure 22.

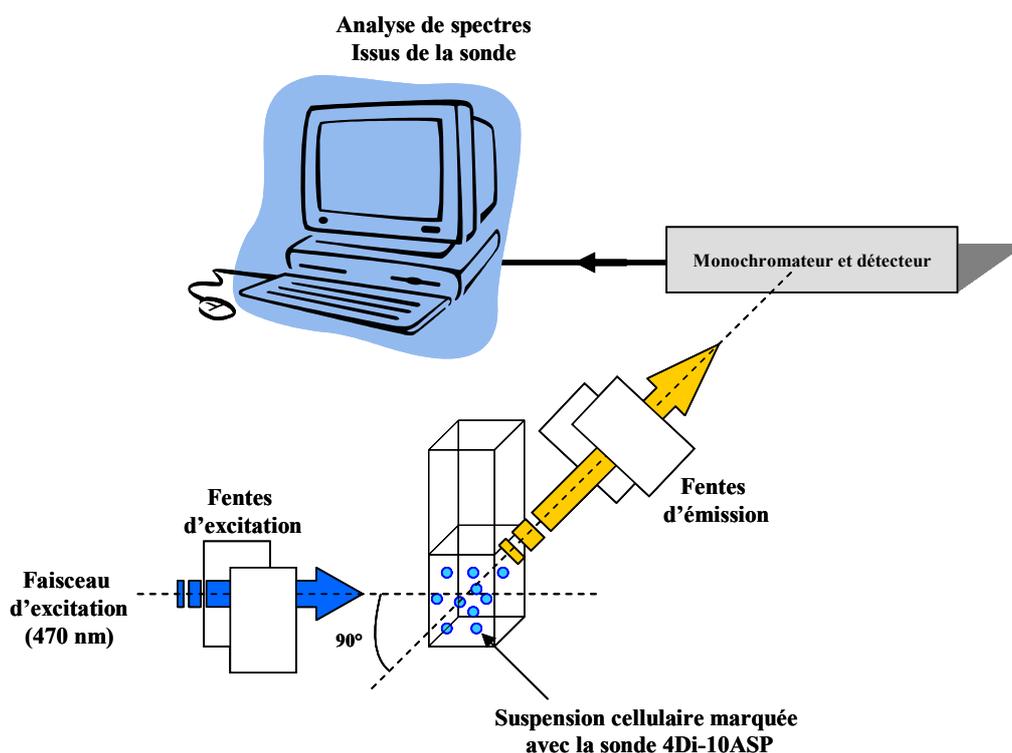


Figure 22. Principe du spectrofluorimètre Shimadzu RF5000.

Les échantillons (500  $\mu$ L) sont placés dans une cuve profilée en quartz sur le trajet d'un faisceau d'excitation (lampe au Xénon). L'émission de fluorescence est collectée à 90° du faisceau incident. La résolution spectrale dépend alors de l'ouverture des fentes d'entrée (excitation) et de sortie (émission) : celle-ci varient de 1,5 à 20 nm. Si les fentes sont moins ouvertes, la résolution spectrale sera meilleure mais l'intensité de la fluorescence collectée sera faible. Il convient donc de trouver un compromis en tenant compte du rendement quantique de la sonde et du photoblanchiment.

## **8.2. Mesure de l'intégration membranaire de la mitoxantrone par transfert d'énergie**

### **8.2.1. Protocole expérimental**

La diffusion de MTX (accepteur d'énergie) au travers de la membrane plasmique des cellules HCT-116 R et S est mesurée à partir de l'atténuation de la fluorescence de la sonde membranaire 4Di-10ASP (donneur d'énergie). Une première série de manipulations a déterminé un marquage optimal des cellules par 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP afin d'observer une intensité constante de la fluorescence de la sonde au cours du temps.

Chaque type cellulaire est incubé avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ . Pour déterminer l'effet de fluidifiants, les lignées sont pré-incubées avec 10 mM AB pendant 10 min à 37°C, puis les cellules sont incubées avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ . Les cellules sont trypsinées (100  $\mu\text{L}$  de trypsine, Trypsine/EDTA (1 $\times$ ) dans une solution saline équilibrées de Hanks (HBSS) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  ; Gibco, UK) et lavées deux fois dans du PBS (Gibco, UK) à 37°C. La longueur d'onde d'excitation de 4Di-10ASP est de 470 nm et l'émission de la fluorescence est continuellement enregistrée à 550 nm à 37°C avec un échantillonnage de la fluorescence émise toutes les 0,5 secondes. 10  $\mu\text{M}$  MTX sont ajoutés aux cellules en suspension dans du PBS (Gibco, UK) (temps  $t = 0$ ) pendant l'enregistrement de l'intensité de fluorescence de la sonde. Pour évaluer l'influence de la température, les cellules sont incubées avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ , puis les cellules sont trypsinées (100  $\mu\text{L}$  trypsine, Trypsine/EDTA (1 $\times$ ) dans une solution saline équilibrées de Hanks (HBSS) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  ; Gibco, UK), lavées deux fois dans du PBS (Gibco, UK). L'émission de la fluorescence est continuellement enregistrée à 550 nm à 4°C dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour déterminer l'effet de modulateurs protéiques, les deux souches cellulaires sont incubées avec 3  $\mu\text{M}$  VPL ou 3  $\mu\text{M}$  CsA pendant 1 h, ou 5  $\mu\text{M}$  FTC pendant 2 h à 37°C, et 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP sont ajoutés pendant la dernière demi-heure d'incubation à 37°C sous atmosphère humide enrichie avec 5 %  $\text{CO}_2$ . Les cellules sont trypsinées (100  $\mu\text{L}$  de trypsine, Trypsine/EDTA (1 $\times$ ) dans une solution saline équilibrées de Hanks (HBSS) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  ; Gibco, UK) et lavées deux fois dans du PBS (Gibco, UK) à 37°C. L'émission de la fluorescence est continuellement enregistrée à 550 nm à 37°C dans les mêmes conditions

expérimentales. 10  $\mu\text{M}$  MTX sont ajoutés aux cellules en suspension dans du PBS (Gibco, UK) au temps 0 pendant l'enregistrement de l'intensité de fluorescence de la sonde.

### 8.2.2. Calcul des efficacités d'atténuation de la fluorescence de la sonde par la mitoxantrone

Si on considère un donneur (D) et un accepteur (A) d'énergie, séparés par une distance fixe  $R$ , le taux de transfert d'énergie entre les deux composés respecte l'équation suivante :

$$k_T = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\phi_D}{128\pi^5 n^4 N R^6 \tau_D} \int_0^\infty \frac{F_D(\bar{\nu})\varepsilon_A(\bar{\nu})}{\bar{\nu}^4} d\bar{\nu}$$

soit  $k_T = (R^{-6} \cdot J \cdot \kappa^2 n^{-4} \lambda_D) \times 8,71 \times 10^{23} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$

Où  $\phi_D$  est le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur,  $n$  est la viscosité du milieu,  $N$  est le nombre d'Avogadro,  $R$  la distance entre le donneur et l'accepteur,  $\tau_D$  est la durée de vie du donneur en absence de l'accepteur,  $F_D(\bar{\nu})$  est l'intensité de fluorescence corrigée du donneur en nombre d'onde entre  $\bar{\nu}$  et  $\bar{\nu} + d\bar{\nu}$  avec  $F_D$  qui a une intensité totale normalisée à une unité,  $\varepsilon_A(\bar{\nu})$  est le coefficient d'extinction de l'accepteur à  $\nu$ , et  $\lambda_D$  le taux d'émission du donneur.  $\kappa^2$  est le facteur décrivant l'orientation relative des dipôles de transition du donneur et de l'accepteur, et on assume généralement que la valeur de  $\kappa^2$  vaut 2/3.

$J$  est l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption l'accepteur, et défini par l'équation (1.1) :

Equation 1.1 : 
$$J = \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \text{ [M}^{-1}\cdot\text{cm}^3\text{]}$$

L'efficacité du transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur est donnée par la relation proposée par Förster :

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + R^6)}$$

Où  $R_0$  est la distance à laquelle l'efficacité est de 50 %, et  $R$  la distance actuelle entre le donneur et l'accepteur d'énergie.

La distance  $R_0$  est définie par l'équation suivante (1.2) :

Equation 1.2 : 
$$R_0 = 9,79 \times 10^3 (\kappa^2 n^{-4} \phi_D J)^{1/6} \text{ [Å]}$$

Avec :  $n = 1,33$  et  $\phi_D = 0,22$

L'émission de fluorescence de la sonde 4Di-10ASP incorporée dans la membrane plasmique est atténuée par l'ajout de MTX de manière dose dépendante. Le calcul de l'efficacité totale de transfert d'énergie de la sonde vers MTX par spectrofluorimétrie est obtenu selon l'équation (2) :

Equation (2) 
$$E = 1 - \frac{F}{F_0}$$

Où  $F_0$  correspond à l'intensité de fluorescence de la sonde avant l'ajout de MTX, et  $F$  l'intensité de fluorescence de la sonde après le transfert d'énergie vers MTX.

La diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique peut être décrit comme une phase rapide de l'atténuation de fluorescence de la sonde correspondant à une intégration instantanée de la molécule anticancéreuse dans le feuillet externe, suivie par une phase lente correspondant à un basculement de MTX dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Une phase stationnaire montre qu'un équilibre des échanges avec le cytoplasme est atteint. Une cinétique biexponentielle décrit les étapes de la diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique selon l'équation suivante :

Equation (3.1) 
$$F(t) = F_a \cdot e^{-at} + F_b \cdot e^{-bt} + F_c$$

Où  $t$  est le temps,  $F(t)$  l'intensité de fluorescence de 4Di-10ASP au temps  $t$ ,  $F_a$ ,  $F_b$  et  $F_c$  l'intensité de fluorescence de 4Di-10ASP à l'instant initial des phases rapides, lentes et stationnaire, et  $(a, b)$  des constantes respectivement pour les phases rapides et lentes de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP.

Si  $t$  tend vers l'infini :

Equation (3.2) 
$$F(t) = F_c$$

Si  $t$  élevé, le membre  $F_a \cdot e^{-at}$  tend vers 0. On a alors :

Equation (3.3) 
$$(F(t) - F_c) = F_b \cdot e^{-bt}$$

La fonction logarithmique permet de déterminer graphiquement  $F_b$  :

$$\begin{aligned} \text{Equation (3.4)} \quad & \ln (F(t) - F_c) = \ln (F_b \cdot e^{-bt}) \\ & \Rightarrow \ln (F(t) - F_c) = -bt + \ln F_b \end{aligned}$$

Où  $b$  représente la pente de la droite de régression au cours de la phase lente de l'atténuation et  $\ln F_b$  l'ordonné à l'origine de la droite de régression.  $F_b$  est alors déterminé graphiquement.

Une décomposition du transport de MTX a permis de calculer les variations des atténuations de fluorescence de la sonde au cours des phases rapides et lentes :

$$\begin{aligned} \text{Equation (4)} : \quad & \Delta IF_T = \Delta IF_R + \Delta IF_L \\ & \text{avec } \Delta IF_T = F_0 - F_c \quad \text{et} \quad \Delta IF_L = F_b - F_c \end{aligned}$$

Où  $\Delta IF_T$  représente la variation totale de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP après l'ajout de MTX,  $\Delta IF_R$  et  $\Delta IF_L$  la variation de l'intensité de fluorescence respectivement au cours des cinétiques rapides et lentes, et  $F_0$  correspond à l'intensité initiale de la sonde avant l'ajout de MTX. A partir de l'équation (3.4), la variation de l'intensité de fluorescence de la sonde au cours de la cinétique rapide est calculée :

$$\text{Equation (5)} : \quad \Delta IF_R = \Delta IF_T - \Delta IF_L$$

D'où les efficacités d'atténuation respectives des cinétiques rapides et lentes :

$$\text{Equation (6)} : \quad E_R = \frac{\Delta IF_R}{F_0} \quad \text{et} \quad E_L = \frac{\Delta IF_L}{F_0}$$

### **8.2.3. Calcul des temps de décroissance de la fluorescence de la sonde**

A partir de l'équation (4), les temps de décroissance de la fluorescence de la sonde au cours des cinétiques rapides et lentes ont été déterminés selon l'équation suivante :

Equation (8) :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Où le temps de décroissance  $t_{1/2}$  correspond au temps nécessaire pour atteindre la moitié de l'intensité de fluorescence de référence de la sonde, et  $k$  la pente de la droite de régression de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP au cours des phases rapides (dans ce cas  $k = a$ ) et lentes (dans ce cas  $k = b$ ) de l'atténuation.

## **9. La microspectrofluorimétrie confocale par balayage laser**

### **9.1. Instrumentation**

Les techniques de spectroscopies optiques permettent d'obtenir des informations spectrochimiques sur des échantillons à l'état solide, liquide ou gazeux. Elles reposent sur l'étude des interactions photons/matières. Lors d'études sur la cellule vivante, les méthodes d'analyses et d'imageries dynamiques font toutes appel à des techniques de visualisation qui mettent en œuvre le phénomène d'émission de fluorescence.

Le microspectrofluorimètre M51 (Dilor/Jobin-Yvon/Horriba, Lille, France) est basé sur le couplage optique entre un microscope et un spectromètre dont le principe est détaillé dans la figure 23.

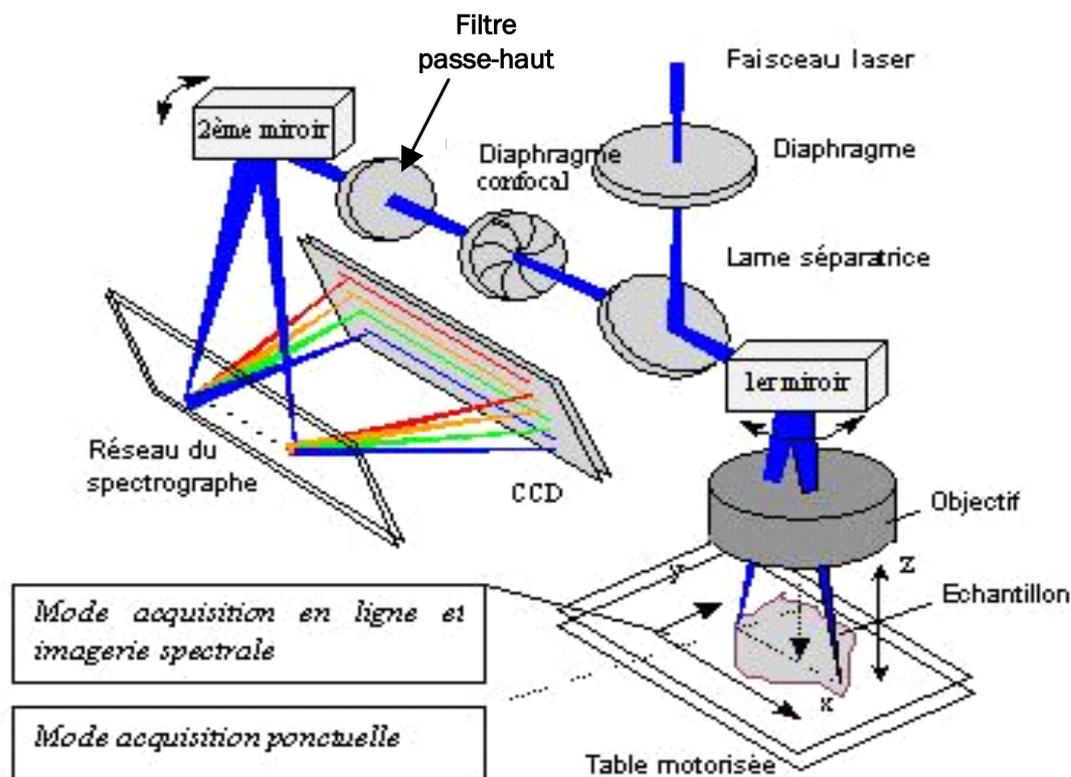
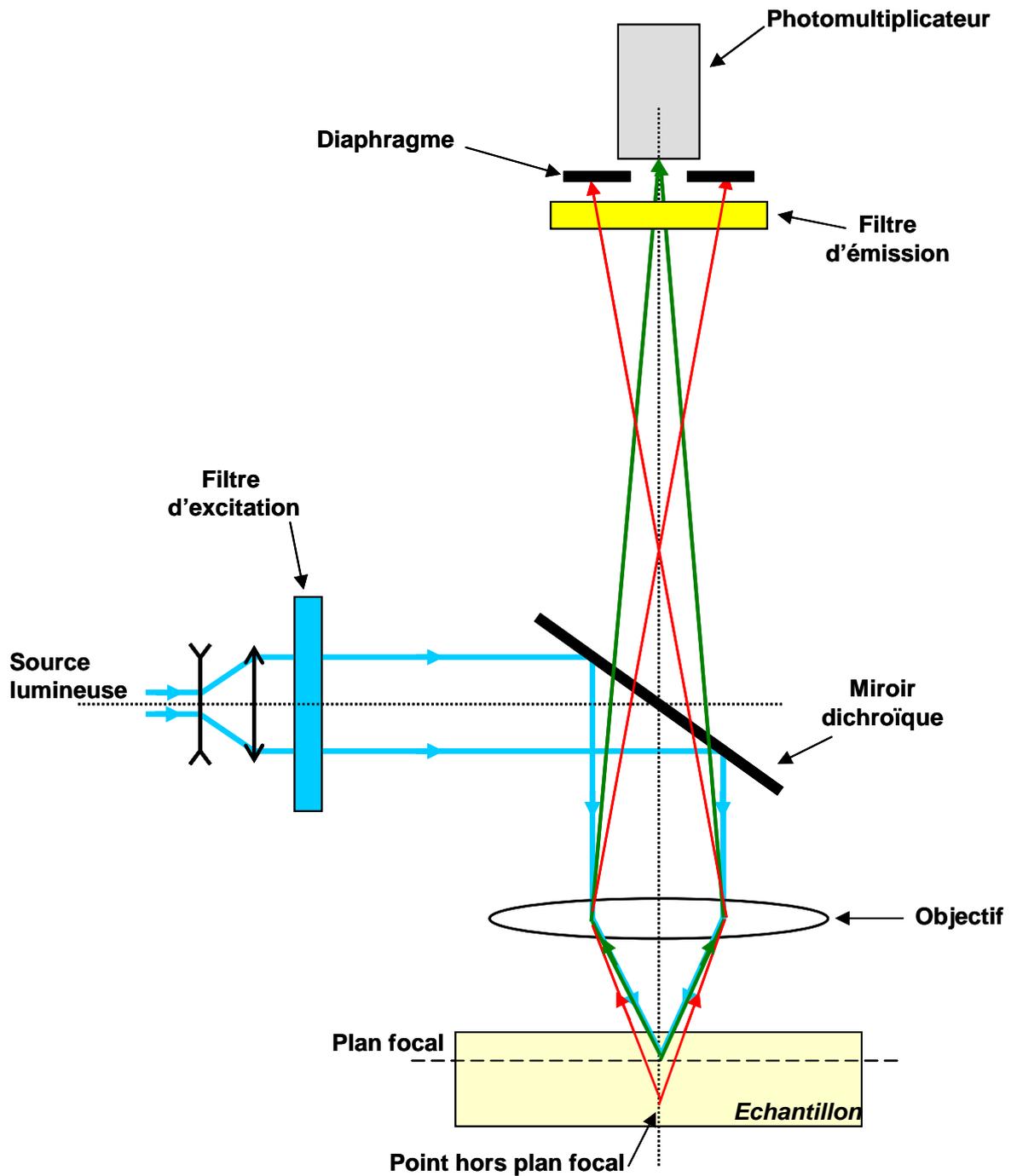


Figure 23. Principe du microspectrofluorimètre.

Ce système permet d'obtenir des spectres d'émission de fluorescence issus de micro volumes (solutions, cellules vivantes). L'objectif focalise le faisceau laser sur l'échantillon et collecte la fluorescence émise. Une optique de couplage permet de projeter l'émission de fluorescence sur la fente d'entrée du spectrographe stigmatique. Puis la lumière émise est dispersée par le réseau de 300 traits/mm suivi de l'analyse du signal par un détecteur CCD. Remarquons qu'avant toute utilisation, on vérifie le bon étalonnage et le fonctionnement du microspectrofluorimètre à partir d'une solution de fluorescéine 1 mM de référence.

### 9.1.1. Confocalité

Un des avantages de cet appareillage réside dans sa confocalité, permettant ainsi la mesure sélective de signaux de fluorescence émanant de micro-volumes dans un plan XY. La discrimination entre les sections optiques est assurée par un diaphragme à ouverture variable (ou trou focal) de 50 à 1000  $\mu\text{m}$ , placé dans le plan focal image de l'objet (figure 24).



- Lumière d'excitation
- Lumière émise par un point situé sur l'axe de l'objectif et dans le plan focal
- Lumière émise par un point situé sur l'axe mais hors plan focal

Figure 24. Principe de la confocalité.

### 9.1.2. Excitation laser

Un laser argon ionisé (Series 2000, Spectra-Physics, UK) génère une principale raie monochromatique vers 514 nm (3 W en sortie laser). Bien que la radiation de sortie du laser soit monochromatique, il persiste des petites raies parasites proches de l'excitatrice, c'est pourquoi on ajoute un filtre interférentiel avant l'entrée du faisceau dans le spectrofluorimètre.

### 9.1.3. Elimination de la raie excitatrice

La superposition des trajets optiques du rayon excitateur et de l'émission de fluorescence a pour conséquence de collecter une quantité très importante de lumière réfléchie et diffusée par l'échantillon (diffusion Rayleigh). C'est pourquoi un filtre passe-haut ( $\lambda/2 = 525$  nm) est positionné sur le trajet de l'émission de fluorescence pour diminuer l'intensité du rayonnement de l'excitatrice d'un facteur de  $10^{12}$ .

### 9.1.4. Le système dispersif

Le système dispersif est un spectrographe stigmatique. La dispersion est assurée par un réseau de 300 traits/mm qui permet l'analyse d'un domaine spectral de 250 nm.

### 9.1.5. Le détecteur

L'émission de fluorescence est analysée par un détecteur CCD bi-dimensionnel (Wright, Stonehouse, Royaume-Uni) de  $1200 \times 300$  pixels. Il est refroidit par effet Peltier. L'acquisition des spectres de fluorescence s'effectue de la façon suivante : le signal mesuré en absence de l'excitation laser est déduit du signal mesuré pendant l'irradiation de l'échantillon. Afin d'augmenter le rapport signal/bruit d'un facteur  $\sqrt{n}$ , la séquence d'excitation/absence d'excitation est répétée  $n$  fois.

### **9.1.6. Mode d'acquisition par point des spectres d'émission de fluorescence**

Le mode d'acquisition effectué dans cette étude est l'acquisition ponctuelle qui consiste à analyser un ou plusieurs points d'une solution, d'une même cellule ou de plusieurs cellules de façon manuelle ou automatisée. Pour ce dernier cas, une platine micrométrique (Märzhäuser, modèle MCL-2, pas de 0,1  $\mu\text{m}$ ) contrôlée par ordinateur, assure le déplacement de l'échantillon selon les points préprogrammés dans le champs optique de l'objectif, permettant ainsi une acquisition rapide. Lorsque chaque point sélectionné a été analysé, le système a effectué un cycle d'acquisition et peut recommencer ce cycle automatiquement le nombre de fois désiré. Cette répétition d'acquisition en chaque point permet aussi de réaliser des cinétiques temporelles.

## **9.2. Acquisition des spectres de fluorescence de la mitoxantrone cellulaire**

Chaque type cellulaire est incubé avec 10  $\mu\text{M}$  MTX de 10 sec à 60 min à 37°C sous atmosphère humide enrichie en  $\text{CO}_2$ . Pour déterminer l'effet de fluidifiants, les cellules sont pré-incubées avec 10 mM AB pendant 10 min à 37°C puis traitées par 10  $\mu\text{M}$  MTX de 10 sec à 60 min à 37°C. Pour déterminer l'effet de la température, chaque type cellulaire est traité par 10  $\mu\text{M}$  MTX de 10 sec à 60 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois par du PBS (Gibco, UK) à 4°C avant leur observation. Pour chaque préparation, 15 différents spectres de MTX sont enregistrés au niveau de jonctions membranaires selon un mode d'acquisition par point (1 accumulation d'une seconde, 150 mW sur l'échantillon). Pour la figure 51, chaque valeur reportée correspond à la surface intégrée entre 665 nm et 725 nm de l'intensité des 15 spectres de fluorescence. Les profils des spectres de MTX cellulaire ont également été comparés à des spectres de 10  $\mu\text{M}$  MTX dans un solvant aqueux (eau distillée) ou dans le méthanol (Sigma, USA,  $\text{MM}_{\text{CH}_3\text{OH}} = 32,04$ ).

# ***RESULTATS***

---

## **1. Mise en évidence de l'intégration membranaire de la mitoxantrone**

La spectroscopie SERS et le transfert d'énergie permettront une étude des modes d'intégration de la mitoxantrone (MTX) dans la membrane plasmique de cellules sensibles (HCT-116 S) et résistantes de type BCRP/MXR (HCT-116 R). Le développement d'une résistance cellulaire envers des molécules anticancéreuses semble impliquer une perméabilité membranaire différente entre les cellules sensibles et résistantes, suggérant des modifications de la structure de la membrane. Une des conséquences pourrait être une interaction différente de MTX avec la membrane plasmique qui apparaît comme une barrière dynamique régulant les transferts moléculaires.

On peut rappeler que la spectroscopie SERS permet une analyse d'un composé avec une sélectivité spatiale restreinte à la surface de la membrane plasmique. En effet, l'exaltation de l'effet Raman de la molécule analysée n'est possible qu'au contact de particules colloïdales. Par conséquent, la spectroscopie SERS semble bien adaptée pour étudier le(s) mode(s) d'interaction mais également l'accessibilité de MTX au niveau du microenvironnement membranaire.

D'autre part, les détails de l'interaction de MTX avec la membrane plasmique sont cruciaux pour la compréhension de sa cinétique de diffusion. Le transfert d'énergie constitue une méthode privilégiée pour étudier la diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique. Les cinétiques de diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique seront déterminées selon l'atténuation de la fluorescence de la sonde 4Di-10ASP (donneur d'énergie) par la molécule anticancéreuse.

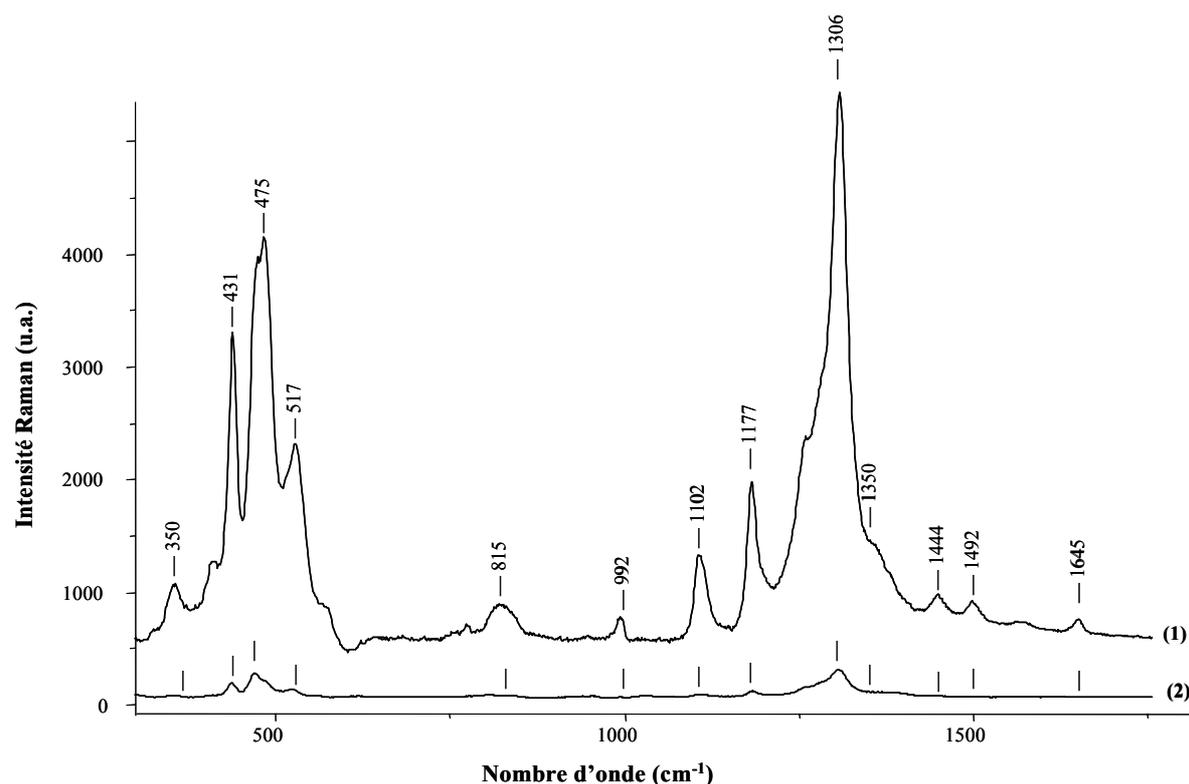


Figure 25. Spectres SERS de la mitoxantrone (MTX) en solution.

(1) agrégation du colloïde avec NaCl ; (2) agrégation du colloïde avec NaClO<sub>4</sub>.

Conditions expérimentales : [MTX] = 10<sup>-9</sup> M ; la suspension mère du colloïde est diluée à 70 % dans de l'eau distillée puis agrégé par un sel ([sel]<sub>final</sub> = 0,1 M) ; puissance laser (785 nm) P = 20 mW ; moyenne de 3 spectres d'1 seconde chacun.

Tableau 4. Positions des principales bandes de MTX et leur attribution au type de liaisons caractérisé par leur mode de vibration.  $\nu$ : élongation ;  $\delta$ : déformation ;  $\theta$ : rotation.

Position des bandes (cm <sup>-1</sup> )	Attribution du type de liaison
350	$\delta$ (C-C)
431	Dilatation C-C-C
475	$\delta$ (C-C)
517	$\delta$ (C-C)
815	« respiration » du noyau
992	« respiration » du noyau
1102	$\nu$ (C-C)
1177	$\theta$ (CH <sub>2</sub> )
1306	$\nu$ (C-C) et $\theta$ (CH <sub>2</sub> )
1350	$\delta$ (C-H)
1444	étirement du noyau
1492	étirement du noyau
1645	$\nu$ (C=C)

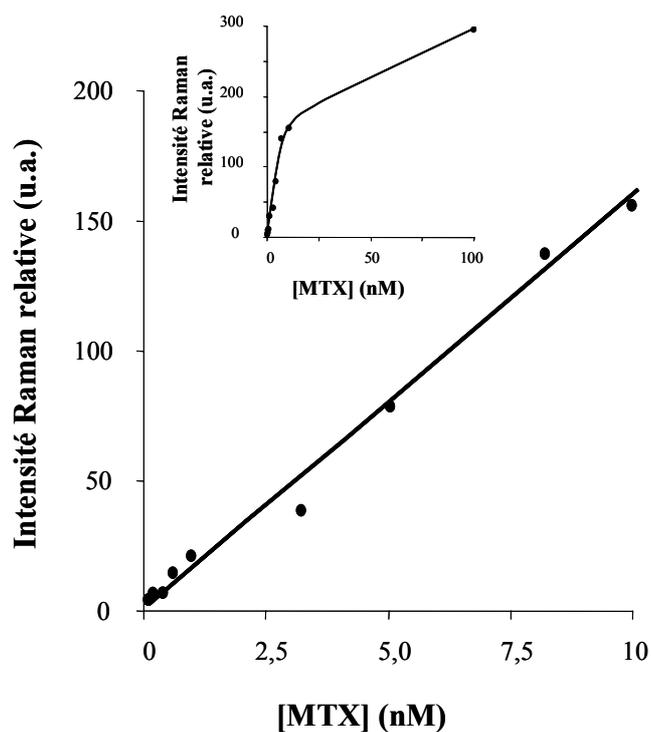


Figure 26. Analyse de MTX en solution par spectroscopie SERS.

*Insert* : gamme étalon de  $10^{-10}$  M à  $10^{-7}$  M MTX révélant une saturation des sites d'adsorption du colloïde pour une concentration de MTX supérieure à  $10^{-8}$  M.

Conditions expérimentales : [MTX] = de  $10^{-10}$  M à  $10^{-8}$  M ; colloïde agrégé par NaCl (0,1 M) ;

$\lambda_{Exc} = 514$  nm ; P = 180 mW ; chaque valeur reportée correspond à l'intensité SERS intégrée entre  $1250$   $cm^{-1}$  et  $1350$   $cm^{-1}$  de 3 spectres de 20 accumulations d'1 seconde chacune.

## 1.1. Caractérisation de la mitoxantrone membranaire par la spectroscopie SERS

### 1.1.1. Signature spectrale de la mitoxantrone

Une première série de manipulations a été de mettre au point les conditions d'agrégation du colloïde. MTX est analysée à la concentration finale de  $10^{-9}$  M en présence d'hydrosol d'argent isotonique (la solution mère est diluée au 1/3 dans l'eau distillée) à pH 7,2. Le colloïde est agrégé soit par NaCl soit par NaClO<sub>4</sub> ou soit MgSO<sub>4</sub> tel que la concentration finale du sel soit de 0,1 M. La figure 25 présente le profil spectral de MTX. L'obtention des spectres est réalisée à 785 nm avec un laser titane/saphir. La meilleure exaltation de la diffusion SERS de MTX est observée avec NaCl. Pour la suite des expériences, l'agrégation de l'hydrosol d'argent se fera avec ce sel. Notons qu'aucune diffusion SERS de MTX n'a été obtenue avec un colloïde agrégé par le sel MgSO<sub>4</sub>.

L'analyse du spectre SERS de MTX révèle que les principales bandes correspondent essentiellement au noyau 9,10-anthracènedione de la molécule en raison de ses propriétés de résonance. Les attributions des bandes de la molécule sont illustrées par le tableau 4. Il apparaît que la bande principale à  $1306\text{ cm}^{-1}$  correspond à des élongations des liaisons C-C et des rotations des groupements H<sub>2</sub>C-CH<sub>2</sub>.

### 1.1.2. Analyse semi-quantitative

Une gamme de concentrations de MTX en solution aqueuse de  $10^{-10}$  M à  $10^{-7}$  M a été analysée afin d'établir une relation entre l'intensité SERS et la concentration de la molécule. Chaque mesure reportée correspond à l'intensité SERS intégrée (u.a.) entre  $1250\text{ cm}^{-1}$  et  $1350\text{ cm}^{-1}$  (figure 26). Une forte corrélation entre l'intensité SERS et la concentration de MTX entre  $10^{-10}$  M et  $10^{-8}$  M a été calculée ( $r = 0,91$ ). Cependant, des écarts importants ont été remarqués entre la droite de régression théorique et les données expérimentales. Pour exemple, l'intensité SERS intégrée expérimentale est de 11,2 u.a. pour  $6.10^{-10}$  M MTX ; or selon la droite de régression, cette intensité SERS correspond à une concentration théorique de  $4,2.10^{-10}$  M MTX, soit une erreur de 30 %.

Par conséquent, la spectroscopie SERS peut être considérée comme une méthode semi-quantitative. Notons que pour des concentrations supérieures à  $10^{-8}$  M MTX, la linéarité de la relation intensité SERS/concentration n'est plus respectée, ce qui est interprété comme

une saturation des sites d'adsorption des particules d'argent par MTX (insert dans la figure 26).

### **1.1.3. Localisation des grains de colloïde**

La localisation des grains de colloïde par rapport au contour membranaire a été réalisée par la microscopie confocale. Des cellules HCT-116 sont incubées avec 5  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C puis lavées par du milieu RPMI non fluorescent. Le colloïde d'argent pré-agrégé isotonique est ajouté aux cellules avant leur observation. Une première image est enregistrée en mode fluorescence sur laquelle une importante émission de fluorescence de MTX permet de localiser le contour membranaire (figure 27 A). Notons que les grains de colloïde sont également visibles en raison d'une diffusion importante du rayonnement du laser par les particules (figure 27 A, flèches blanches). Une seconde image est enregistrée en mode réflexion sur laquelle la diffusion de la lumière permet de localiser les grains de colloïde (figure 27 B). La superposition de ces deux images permet de montrer que les grains d'argent sont exclusivement localisés à une très grande proximité de la membrane plasmique (figure 27 C). Cette proximité des particules colloïdales avec la bicouche phospholipidique pourrait permettre une amplification de la diffusion SERS de MTX au niveau des zones de contact entre les grains d'argent et la membrane plasmique des cellules.

### **1.1.4. Signature spectrale de la mitoxantrone cellulaire**

Une analyse membranaire de MTX a été réalisée par micro-spectroscopie SERS (micro-SERS) en focalisant le faisceau laser sur un grain de colloïde en contact avec la membrane plasmique de cellules traitées. Les cellules HCT-116 S sont incubées avec 2  $\mu\text{M}$  de MTX pendant 1 h à 37°C, lavées deux fois par du milieu RPMI à 4°C dépourvu de MTX. Le colloïde d'argent isotonique pré-agrégé est ajouté aux cellules avant leur analyse. Les spectres ont été normalisés sur la bande à 431  $\text{cm}^{-1}$ . Cette bande a été choisie puisque son profil reste invariable.

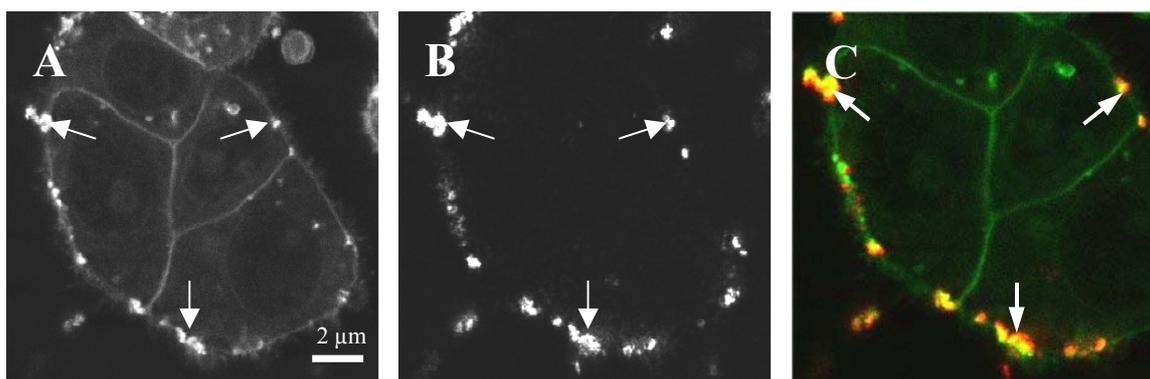


Figure 27. Imagerie confocale de cellules traitées par MTX en présence de grains de colloïde. L'image (C) est le résultat de deux images superposées : (A) émission de fluorescence de MTX ; (B) réflexion des grains de colloïde. Conditions expérimentales : les cellules HCT-116 sont traitées avec 5  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C avant l'ajout du colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}}$  = 568 nm et 488 nm respectivement pour les images (A) et (B).

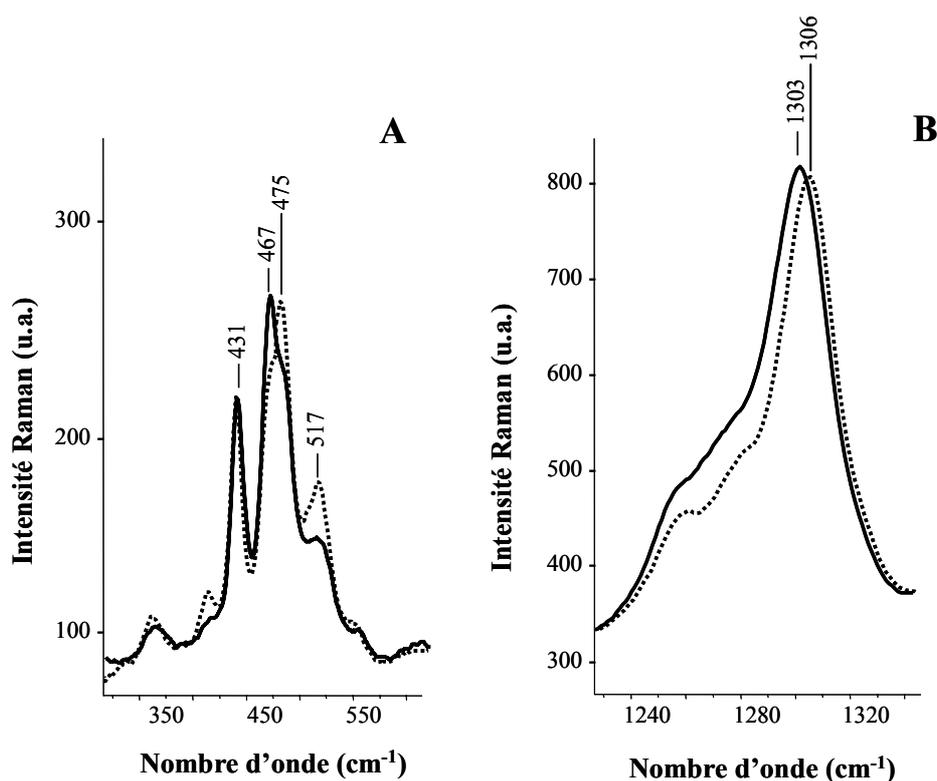


Figure 28. Signature spectrale spécifique de MTX cellulaire. (A) et (B) présentent les deux zones du spectre SERS montrant des différences. Les spectres SERS de MTX adsorbé à la membrane (ligne continue) et de MTX en solution (ligne pointillée) sont normalisés sur la bande 431  $\text{cm}^{-1}$ . Conditions expérimentales : les cellules HCT-116 sensibles sont traitées par 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C ;  $\lambda_{\text{Exc}}$  = 785 nm ; P = 20  $\mu\text{W}$  ; moyenne de 3 spectres d'1 accumulation d'1 seconde ; pour les cellules, le rayonnement laser est focalisé sur un grain de colloïde en contact avec la membrane plasmique.

Des modifications significatives des bandes  $467\text{ cm}^{-1}$ ,  $475\text{ cm}^{-1}$  et  $517\text{ cm}^{-1}$  sont remarquées sur le spectre de cellules incubées avec MTX (figure 28 A, ligne continue) en comparaison avec celui de MTX en solution (figure 28 A, ligne pointillée). De plus, un décalage spectral significatif de la bande  $1306\text{ cm}^{-1}$  vers  $1303\text{ cm}^{-1}$  a été déterminé pour le spectre membranaire de MTX (figure 28 B). Il est à noter que le profil spectral de cellules non traitées par MTX ne montre aucune contribution SERS des cellules (spectre non présenté). Cette méthode a permis de caractériser une signature spectrale différente de MTX membranaire par rapport à MTX en solution.

L'analyse SERS d'une molécule repose sur un contact du composé avec la surface métallique « rugueuse ». La spectroscopie SERS rend alors compte d'une accessibilité de MTX par le colloïde d'argent. Une signature spectrale spécifique de MTX au contact de la membrane est interprétée comme une adsorption, ou une intégration partielle, du médicament avec la membrane plasmique.

#### **1.1.5. Origine cellulaire du signal**

L'analyse d'un système cellulaire par micro-SERS a révélé une importante variabilité des intensités SERS de MTX. Les profils des spectres sont très reproductibles. De plus, il a été observé que l'intensité SERS de MTX est d'autant plus importante que la taille des grains d'argent irradiés est grande. Dans le but d'éviter cette variabilité d'intensité, les expériences suivantes ont été réalisées par macro-spectroscopie SERS (macro-SERS) sur  $10^6$  cellules dans un micro-volume final de  $50\text{ }\mu\text{L}$  de colloïde pré-agrégé. Ce spectromètre Raman est équipé d'un laser argon émettant à  $514,9\text{ nm}$ . Les profils des spectres de HCT-116 S traitées par MTX obtenus par macro- et micro-SERS ont été comparés. Les positions des principales bandes sont identiques. Cependant, un changement de la longueur d'onde d'excitation induit une modification des rapports d'intensité de certaines bandes, ce qui est interprété par des conditions de résonance différentes selon la longueur d'onde d'excitation.

Afin d'identifier l'origine intracellulaire ou membranaire du signal SERS issue d'un système cellulaire, un micro-volume d'ADN double brin a été ajouté au milieu extracellulaire pour déplacer MTX de son environnement. Il a été décrit que la grande affinité de MTX pour l'ADN double brin aboutit à la formation d'un complexe. Dans ce complexe, la perte d'accessibilité de MTX par le colloïde a pour conséquence une atténuation (ou *quenching*) immédiate et total de la diffusion SERS du médicament (Nabiev *et al.*, 1995).

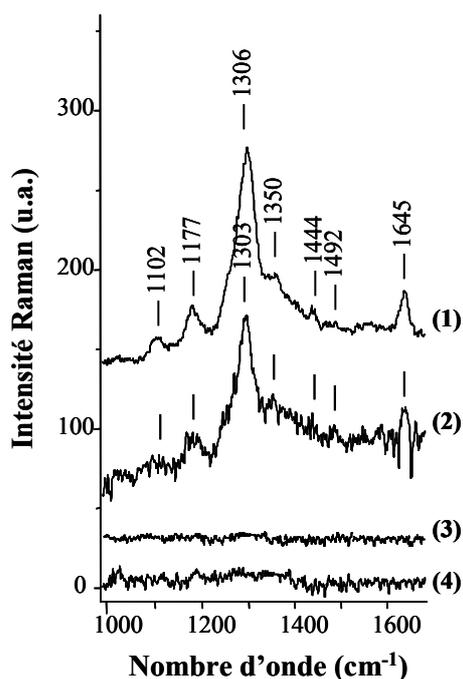


Figure 29. Analyse SERS de MTX adsorbée à la membrane cellulaire. Spectres SERS de :

- (1) 5 nM MTX en solution ;
- (2) cellules traitées par 0,5  $\mu\text{M}$  MTX ;
- (3) 5 nM MTX / 1  $\mu\text{M}$  ADN double brin ;
- (4) cellules traitées par 0,5  $\mu\text{M}$  MTX et ajout de 1  $\mu\text{M}$  ADN extracellulaire.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules sont traitées par 0,5  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C ; 1  $\mu\text{M}$  du duplex ADN est ajouté avant le contact des cellules ou de MTX en solution avec le colloïde d'argent pré-agrégé par NaCl (0,1 M) ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; moyenne de 3 spectres de 20 accumulations de 3 secondes chacune.

Une première étape a été de vérifier cette extinction. 1  $\mu$ M ADN double brin est ajouté à 5 nM MTX avant le contact avec le colloïde pré-agrégé (figure 29, spectres 1 et 3). Dans ces conditions, aucune diffusion SERS du complexe MTX/ADN est observée, caractéristique d'une intercalation de MTX dans la double hélice. Ces résultats permettent de valider que la perte de l'accessibilité du médicament par le colloïde a pour conséquence directe une extinction SERS de MTX.

Pour l'analyse SERS de MTX cellulaire,  $10^6$  cellules HCT-116 S sont incubées avec 2  $\mu$ M MTX pendant 1 h à 37°C, lavées deux fois dans du milieu RPMI à 4°C. 1  $\mu$ M d'ADN double brin est ajouté aux cellules avant le contact avec le colloïde pré-agrégé (figure 29, spectres 2 et 4). Une totale extinction de la diffusion SERS est observée lorsque l'ADN est ajouté aux cellules traitées par MTX. Ce résultat montre que le duplex ADN extracellulaire a déplacé MTX qui était partiellement intégrée sur la membrane. En conclusion, dans un système cellulaire, l'ensemble du signal SERS de MTX est d'origine exclusivement membranaire.

En conclusion, la spectroscopie SERS se caractérise par sa très haute sensibilité d'analyse (jusqu'à  $10^{-10}$  M en MTX) et sa très grande spécificité ce qui permet l'observation de bandes spectrales correspondant uniquement aux vibrations du chromophore. Basée sur une accessibilité de la molécule par le colloïde d'argent, cette technique apparaît comme une méthode sélective et bien adaptée à l'étude du médicament à l'échelle cellulaire. La remarquable exaltation SERS de MTX font de cette molécule un excellent modèle d'étude des interactions possibles entre le ligand et la membrane plasmique.

## **1.2. Etude comparée du devenir de la mitoxantrone chez les cellules résistantes**

### **1.2.1. Résistance cellulaire à la mitoxantrone**

#### **Effet cytostatique de la mitoxantrone chez les cellules HCT-116**

Les concentrations inhibitrices ( $CI_{50}$ ) de croissance de MTX pour les souches sensibles (HCT-116 S) et résistantes BCRP/MXR (HCT-116 R) ont été déterminées par un test de prolifération cellulaire. Basé sur la réduction des sels 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5diphényl Tétrazolium (MTT) en cristaux de formazan, ce test rend compte d'une activité métabolique mitochondriale.

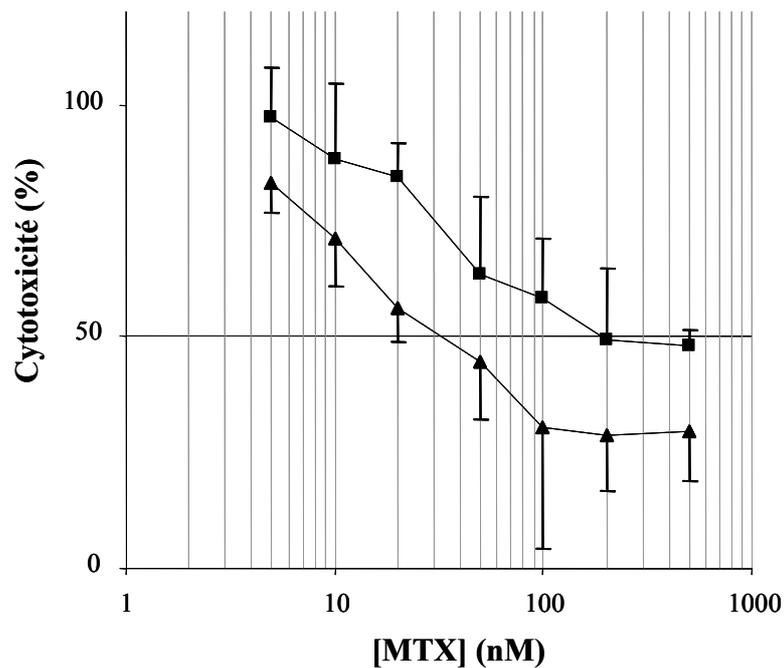


Figure 30. Activité cytostatique de MTX sur les cellules HCT-116 résistante R (courbe ■) et sensible S (courbe ▲).

$CI_{50} = 37$  nM et 195 nM MTX respectivement pour HCT-116 S et R, soit un indice de résistance des HCT-116 R de 5,3.

Conditions expérimentales : 72 h de traitement par des concentrations croissantes de MTX ; réduction pendant 4 h à 37°C des sels MTT en cristaux de formazan ; solubilisation des cristaux de formazan dans du DMSO et lecture de l'absorbance à 540 nm ; moyenne de 8 mesures reproductibles.

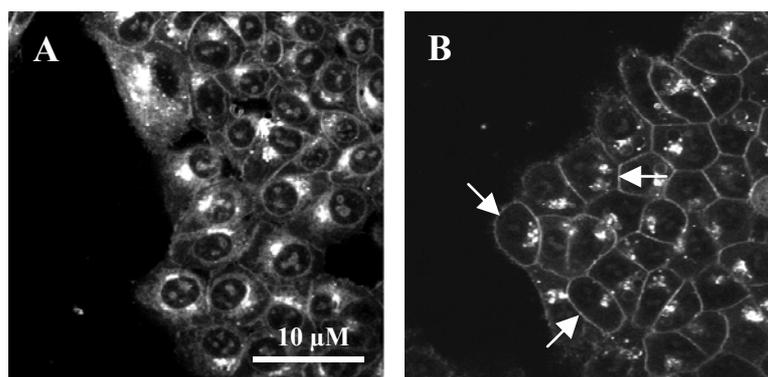


Figure 31. Microscopie confocale de MTX chez HCT-116 S (A) et HCT-116 R (B).

Une émission de MTX exclusivement autour de la membrane plasmique est observée chez les cellules résistantes (flèches blanches) tandis qu'une localisation cytoplasmique et nucléaire du médicament est observée chez les cellules sensibles.

Conditions expérimentales : chaque type cellulaire est incubé avec 5 µM MTX pendant 1 h à 37°C ;  $\lambda_{Exc} = 568$  nm.

Les deux souches ont été traitées selon une gamme de concentrations de MTX pendant 72 h, puis 20  $\mu\text{L}$  d'une solution MTT à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  sont ajoutés aux cellules pendant 4 h à  $37^\circ\text{C}$ . Les cristaux de formazan formés sont solubilisés avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) avant une lecture de l'absorbance à 540 nm de chaque lot cellulaire. Le pourcentage de survie cellulaire est calculé pour chaque dose de MTX ce qui permet de construire une courbe de réponse pour chaque souche (figure 30). Chaque valeur reportée est la moyenne de 8 mesures indépendantes. Les résultats montrent des  $\text{CI}_{50}$  de 37 nM et 195 nM respectivement pour HCT-116 S et R. Ce test de prolifération a permis de mettre en évidence un indice de résistance des HCT-116 R de 5,3 par rapport aux HCT-116 S.

### **Fluorescence intracellulaire de la mitoxantrone**

La localisation intracellulaire de l'émission de la fluorescence de MTX a été réalisée par microscopie confocale à épifluorescence. HCT-116 S et R sont incubées avec 5  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  puis lavées deux fois par du milieu RPMI à  $4^\circ\text{C}$  non fluorescent avant leur observation (figure 31). Une forte émission de fluorescence de MTX est observée au niveau du cytoplasme et du/des nucléole(s) chez HCT-116 S. Par contre, la distribution de la fluorescence de MTX chez HCT-116 R est essentiellement localisée au niveau de la membrane plasmique (flèches blanches). De plus, quelques organites intracellulaires montrent également une accumulation intracellulaire du médicament. Les cellules résistantes se caractérisent par une distribution intracellulaire très différente de MTX et par une plus faible accumulation du médicament.

### **Analyse intracellulaire de la mitoxantrone**

Une quantification de MTX intracellulaire a été menée par la lecture de l'absorbance de la molécule issue de lysats cellulaires afin de caractériser des différences d'accumulation de MTX entre les deux lignées. Les cellules HCT-116 S et R sont traitées par 5  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$ , lavées dans du milieu RPMI à  $4^\circ\text{C}$  puis lysées dans un tampon Triton X-100 1 %. Le lysat est ensuite analysé par lecture d'absorbance à 622 nm et les concentrations intracellulaires de MTX déduites à partir d'une gamme étalon (figure 32). Les cellules HCT-116 S traitées se caractérisent par une accumulation intracellulaire de MTX plus importante d'un facteur 2,5 (soit  $447 \pm 67 \text{ pmol} / 10^6 \text{ cellules}$ ) comparée à HCT-116 R (soit  $191 \pm 28 \text{ pmol} / 10^6 \text{ cellules}$ ).

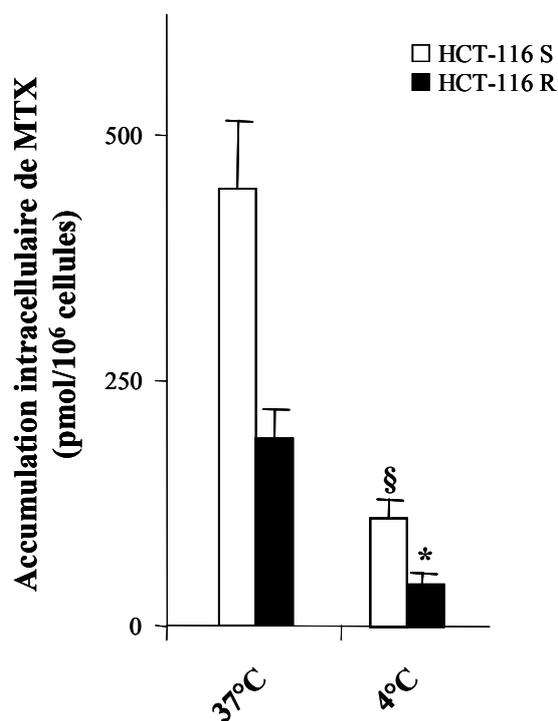


Figure 32. Quantification de MTX intracellulaire chez HCT-116 R et S à 37°C ou à 4°C par la lecture de l'absorbance.

Conditions expérimentales : chaque lignée est incubée avec 5 µM MTX pendant 1 h à 37°C ou à 4°C puis lysée dans un tampon Triton X-100 1 % ;  $\lambda_{\text{Abs}} = 622 \text{ nm}$  ; la concentration intracellulaire de MTX est calculée à partir d'une gamme étalon.

(§, \*)  $p < 0,01$  par rapport à HCT-116 traitées à 37°C.

Une incubation des deux souches cellulaires avec MTX dans les mêmes conditions a été menée à 4°C afin d'inhiber les protéines à efflux BCRP et de rigidifier la bicouche phospholipidique. A 4°C, un même facteur de 2,5 de l'accumulation intracellulaire de MTX a été calculée entre les cellules résistantes ( $42 \pm 6$  pmol /  $10^6$  cellules) et sensibles ( $115 \pm 17$  pmol /  $10^6$  cellules). Ces résultats suggèrent que la différence d'accumulation de MTX entre ces deux lignées cellulaires n'est pas exclusivement dépendante de la surexpression des protéines à efflux.

### **1.2.2. Intensité SERS de la mitoxantrone chez la souche résistante**

La signature spectrale de MTX est caractéristique d'une intégration du médicament avec la membrane plasmique de cellules vivantes. L'étude comparative de souches cellulaires sensibles et résistantes par spectroscopie SERS pourrait apporter des éléments de réponse concernant le mode d'interaction du médicament avec la membrane plasmique de ces cellules.

#### **Mise en évidence**

Les intensités des spectres SERS de cellules HCT-116 S et R incubées avec MTX ont été comparées. Environ  $10^6$  cellules de chaque lignée ont été incubées avec 2  $\mu$ M MTX pendant 1 h à 37°C, puis lavées deux fois dans du milieu RPMI à 4°C avant leur analyse (figure 33, spectres 1 et 2). Lorsque les profils spectraux sont comparés, aucune différence spectrale n'est observée. Par contre, les résultats révèlent une intensité SERS membranaire de MTX trois fois plus importante chez HCT-116 R en comparaison avec HCT-116 S. Le coefficient de variabilité de l'intensité SERS de la bande 1250-1350  $\text{cm}^{-1}$  est de 30 % pour la souche sensible et de 17 % pour la souche résistante ( $n = 3$ ). Ce résultat permet de conclure que la différence de diffusion SERS de MTX entre les cellules résistantes et sensibles est significative (test t de Student,  $p < 0,01$ ). De plus, des mesures réalisées avec d'autres lots de colloïdes ont également montré des résultats équivalents entre les deux lignées cellulaires.

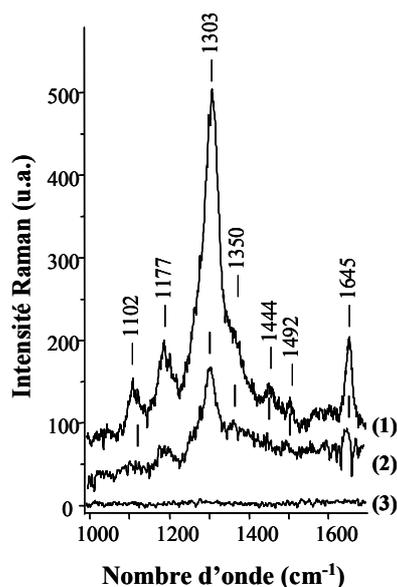


Figure 33. Analyse SERS de MTX adsorbé à la membrane plasmique de HCT-116 R et S.

Spectres SERS de : (1) HCT-116 R traitées par MTX ;

(2) HCT-116 S traitées par MTX ;

(3) HCT-116 R traitées par MTX puis ajout d'ADN double brin extracellulaire.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules sont traitées par  $0,5 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  ;  $1 \mu\text{M}$  du duplex ADN est ajouté avant le contact des cellules avec le colloïde d'argent isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; moyenne de 3 spectres de 20 accumulations de 3 secondes chacune.

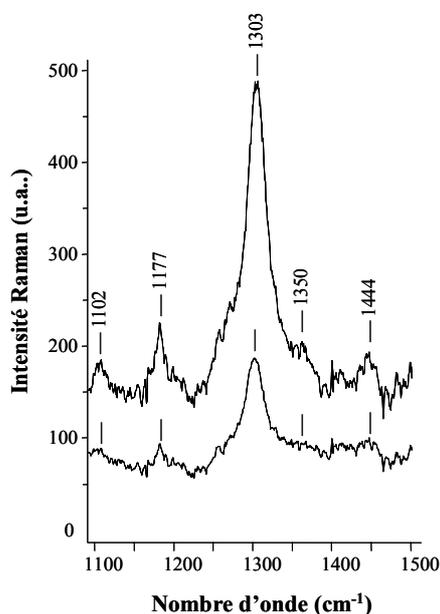


Figure 34. Analyse SERS de MTX adsorbé à la membrane plasmique de MCF7 R et S.

Spectres SERS de : (1) MCF7 R traitées par MTX ;

(2) MCF7 S traitées par MTX.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules sont traitées par  $2 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; moyenne de 3 spectres de 20 accumulations de 3 secondes chacune.

Un micro-volume d'ADN double brin a été ajouté au milieu extracellulaire des cellules HCT-116 R traitées afin de vérifier que l'analyse SERS de MTX dans ces cellules est exclusivement d'origine membranaire (figure 33, spectre 3). De même que pour les cellules HCT-116 S, une extinction complète de la diffusion SERS a été observée lors de l'ajout d'ADN aux HCT-116 R. Ces résultats montrent que l'intensité SERS de MTX chez HCT-116 R correspond également à une adsorption de MTX sur la membrane plasmique.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec d'autres souches cellulaires résistantes et sensibles (MCF 7) afin de déterminer si les différences d'adsorption de MTX à la membrane sont liées à la résistance cellulaire. Après un traitement par 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C, les cellules sont mises en contact du colloïde pré-agrégé (figure 34). Aucune modification spectrale n'est observée lorsque les profils spectraux sont comparés. De plus, les résultats montrent que MCF7 R présentent une intensité SERS de MTX quatre fois plus importante en comparaison avec les MCF7 S. Ces résultats confirment une différence en terme d'adsorption de MTX sur la membrane plasmique des souches résistantes.

### **Modulation de l'intensité SERS du médicament**

Différentes conditions ont été testées afin de préciser la nature de l'interaction de MTX sur la membrane plasmique de cellules. Chaque valeur reportée correspond à l'intensité SERS intégrée (u.a.) entre 1250  $\text{cm}^{-1}$  et 1350  $\text{cm}^{-1}$  de la moyenne de trois spectres reproductibles. L'influence du temps d'incubation des cellules avec MTX a été testée. Les deux types cellulaires sont incubés à 37°C avec 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant des temps de contact différents (de 0 à 60 min) (figure 35). Après 15 min d'incubation, l'intensité de la diffusion SERS de MTX adsorbé à la membrane des HCT-116 R (courbe ■) est 2 fois plus importante en comparaison avec HCT-116 S traitées (courbe ▲). Cette intensité SERS plus importante de MTX chez les cellules résistantes persiste au cours du temps de contact et atteint un facteur 3 après 60 min d'incubation. La différence d'adsorption de MTX sur la membrane des cellules résistantes apparaît à partir de brefs temps de contact.

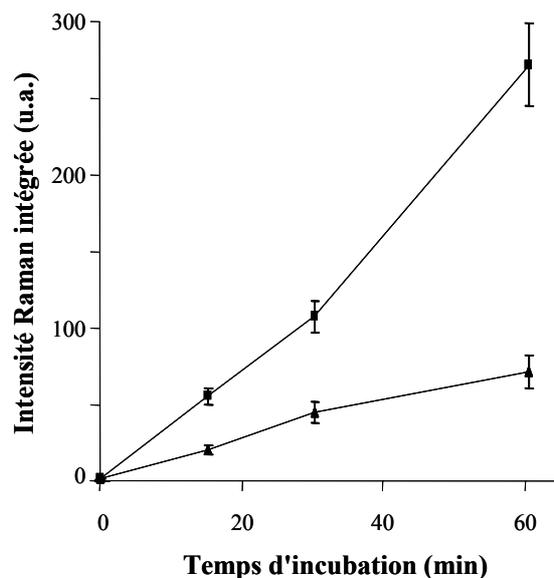


Figure 35. Effet du temps d'incubation sur les intensités SERS de HCT-116 R (courbe ■) et HCT-116 S (courbe ▲) traitées par MTX.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules des deux lignées sont incubées avec  $2 \mu\text{M}$  MTX de 0 à 60 min à  $37^\circ\text{C}$  avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; chaque valeur reportée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée des spectres SERS entre  $1250 \text{ cm}^{-1}$  et  $1350 \text{ cm}^{-1}$ .

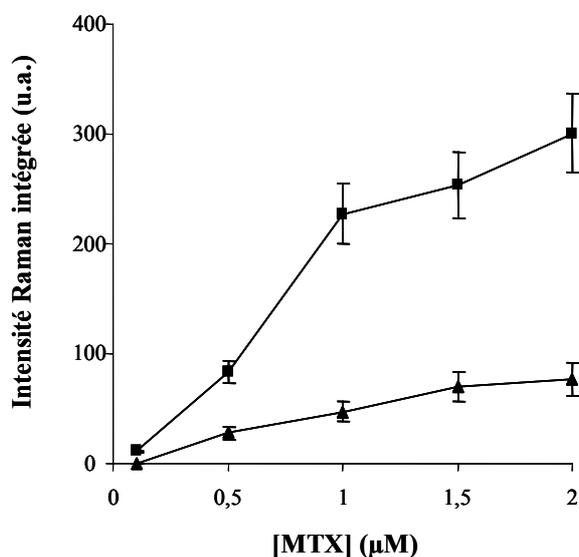


Figure 36. Effet de la concentration de MTX sur les intensités SERS de HCT-116 R (courbe ■) et S (courbe ▲) traitées par MTX.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules des deux lignées sont incubées avec  $0,1$  à  $2 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; chaque valeur reportée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée des spectres SERS entre  $1250 \text{ cm}^{-1}$  et  $1350 \text{ cm}^{-1}$ .

Différentes concentrations de MTX ont également été testées. Plusieurs lots de chaque type cellulaire sont traités selon une gamme de concentrations de MTX (de 0,1 à 2  $\mu$ M) pendant 1 h à 37°C (figure 36). Une intensité SERS de MTX 3 à 4 fois plus importante a été observée à partir de faibles concentrations en MTX pour les cellules HCT-116 R traitées (courbe ■) en comparaison avec la souche sensible (courbe ▲).

Une comparaison des spectres SERS de cellules traitées par MTX à 37°C ou à 4°C a permis de vérifier si la température influence l'intégration membranaire du médicament. Deux lots de HCT-116 S et R sont incubés avec 2  $\mu$ M MTX à 37°C ou à 4°C pendant 1 h. Puis les cellules sont lavées deux fois dans du milieu RPMI à 4°C avant leur analyse par macro-SERS. Comparé au spectre de HCT-116 R incubées à 37°C (figure 37, spectre 1), le spectre SERS des cellules résistantes traitées à 4°C présente une intensité 6 à 7 fois plus faible (figure 37, spectre 2). Plus intéressant, l'intensité du spectre SERS de HCT-116 S incubée à 4°C est plus faible d'un facteur 3 comparée à celle des HCT-116 R dans les mêmes conditions (figure 37, spectre 3). Cette différence d'intensité SERS de MTX est donc comparable à celle obtenue à 37°C. Lors de l'incubation des cellules avec le médicament, la température module l'adsorption de MTX à la membrane plasmique dans les mêmes proportions chez les deux lignées cellulaires.

Une étude de la libération de MTX membranaire a permis de déterminer la stabilité de l'interaction membranaire du médicament. Les cellules HCT-116 R sont incubées avec 2  $\mu$ M MTX pendant 1 h à 37°C, lavées deux fois dans du milieu RPMI à 4°C et analysées par macro-SERS. Les cellules sont ensuite récupérées et incubées pendant 1 h à 4°C afin de bloquer la protéine BCRP (figure 38). Comparé au spectre des HCT-116 R après 1 h d'incubation à 37°C (figure 38, spectre 1), une intensité SERS trois fois moins importante de MTX est observée après 1 h à 4°C (figure 38, spectre 2). Ces résultats mettent en évidence une libération partielle de MTX membranaire dans le milieu extracellulaire. Une fraction de l'adsorption membranaire du composé cytotoxique est donc réversible chez HCT-116 R.

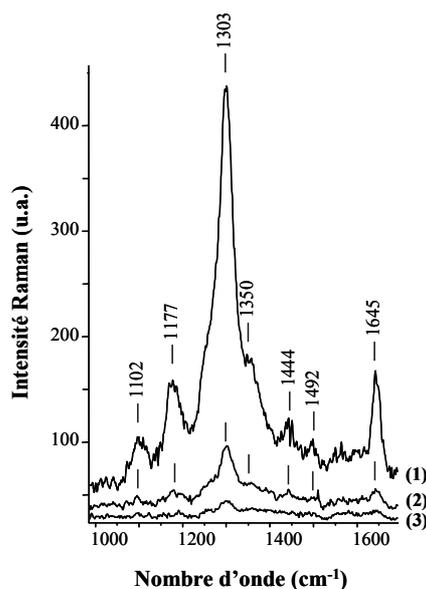


Figure 37. Effet de la température lors de l'incubation des cellules avec MTX.

Spectres SERS de : (1) HCT-116 R traitées par MTX à 37°C ;

(2) HCT-116 R traitées par MTX à 4°C ;

(3) HCT-116 S traitées par MTX à 4°C.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules des deux lignées sont incubées avec  $2 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; moyenne de 3 spectres de 20 accumulations de 3 secondes chacune.

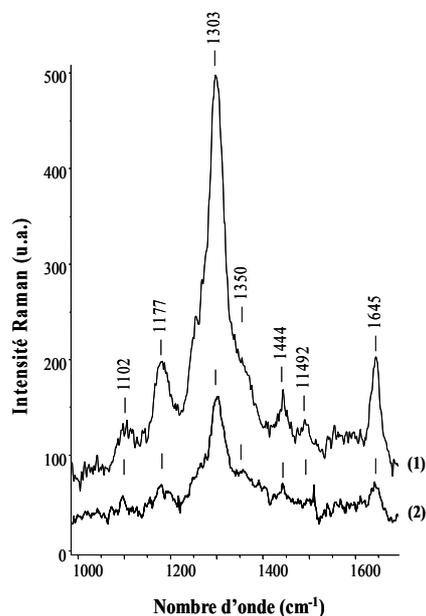


Figure 38. Stabilité de l'adsorption de MTX à la membrane plasmique de HCT-116 R.

Spectres SERS de : (1) HCT-116 R traitées par MTX à 37°C ;

(2) HCT-116 R traitées par MTX à 37°C puis incubées dans milieu à 4°C.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules sont incubées avec  $2 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé (1) puis incubées dans milieu RPMI à 4°C pendant 1 h (2) ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; moyenne de 3 spectres de 20 accumulations de 3 secondes chacune.

La libération de MTX intégrée à la membrane a été suivie au cours du temps à 4°C. Les deux types cellulaires ont été incubés avec 2 µM MTX pendant 1 h à 37°C, puis incubées dans du milieu RPMI sans la molécule à 4°C de 0 à 240 min avant leur analyse (figure 39). Pour les HCT-116 S, de faibles modifications de l'intensité SERS sont observées de 15 à 240 min en comparaison des spectres obtenus à  $t = 0$  min (courbe ▲). Par contre, pour HCT-116 R, une diminution rapide de l'intensité SERS de MTX adsorbé est observée après 15 min à 4°C (courbe ■) jusqu'à atteindre une diffusion SERS résiduelle similaire à celle observée pour HCT-116 S. La faible diffusion de MTX observée après 1 h à 4°C révèle une fraction de MTX résiduelle qui pourrait être adsorbée de façon plus stable à la membrane des HCT-116 R, et ce comme pour les cellules sensibles. Une diminution de l'intensité SERS de MTX chez les cellules résistantes correspond à une libération de la molécule du microenvironnement membranaire. La fraction de MTX libérée semble relativement instable et caractérise uniquement les cellules résistantes.

Pour confirmer cette conclusion, la microscopie confocale a permis de vérifier la stabilité de l'émission membranaire de la fluorescence de MTX. Une première image de HCT-116 R et S traitées par 5 µM MTX pendant 1 h à 37°C est enregistrée. Après 1 h à 4°C, la seconde image correspond aux mêmes cellules (figure 40). Après 60 min à 4°C, aucune modification significative de la localisation de MTX n'a été observée HCT-116 S. L'émission de fluorescence de MTX reste essentiellement localisée au niveau du cytoplasme et des nucléoles, et pas ou peu d'émission du médicament est localisée au niveau de la membrane plasmique. Pour les cellules HCT-116 R, des liserés membranaires moins marqués par MTX sont observés après 60 min à 4°C, voire parfois complètement atténués comparés à leur contrôle (figure 40, flèches blanches). Ces résultats mettent en évidence une diminution importante de l'émission membranaire de la fluorescence de MTX chez HCT-116 R et vont dans le sens des résultats obtenus par spectroscopie SERS.

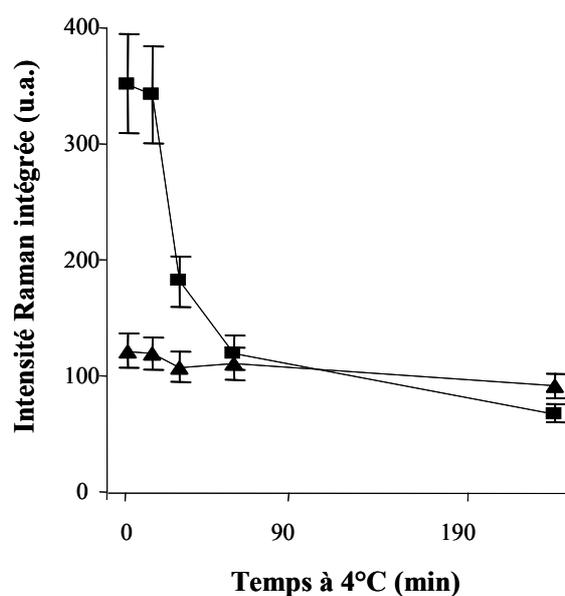


Figure 39. Libération de MTX adsorbé à la membrane de HCT-116 R (courbe ■) et S (courbe ▲). Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules des deux lignées sont incubées avec  $2 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$ , lavées puis incubées à  $4^\circ\text{C}$  dans du milieu RPMI sans médicament de 0 à 240 min avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; chaque valeur reportée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée des spectres SERS entre  $1250 \text{ cm}^{-1}$  et  $1350 \text{ cm}^{-1}$ .

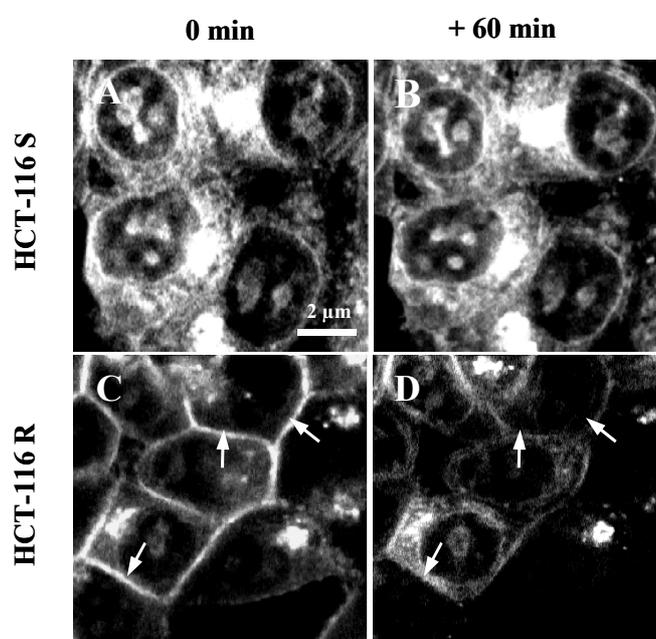


Figure 40. Microscopie confocale de la stabilité de l'émission membranaire de MTX chez HCT-116 S (A, B) et HCT-116 R (C, D). Conditions expérimentales : chaque type cellulaire est incubé avec  $5 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  (A, C) puis incubées dans le milieu RPMI à  $4^\circ\text{C}$  pendant 60 min (B, D) (flèches blanches) ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 568 \text{ nm}$ .

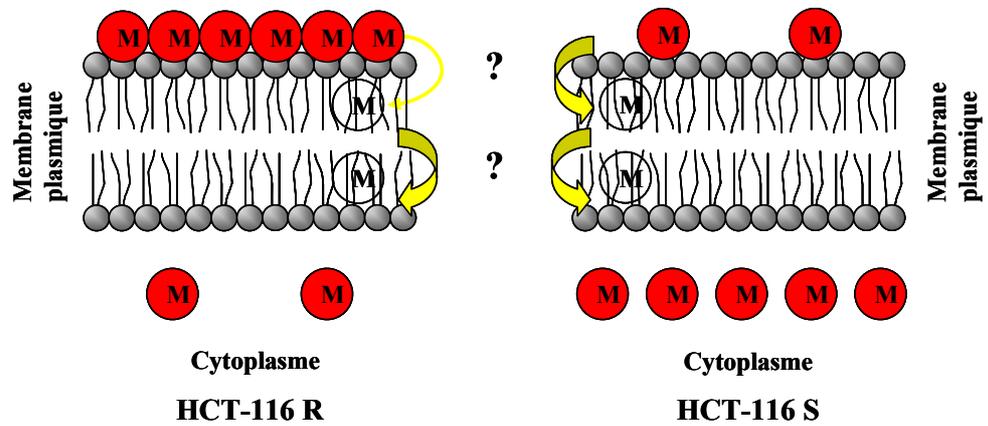
**Conclusions**

Les résultats montrent une différence significative de l'intensité des spectres SERS de MTX entre les types HCT-116 R et S. Cependant, aucune modification spectrale du profil n'est remarquée. Le signal SERS pourrait correspondre à des différences d'accessibilité de MTX par le colloïde entre les deux lignées. Cette adsorption plus importante chez les cellules résistantes ne semble pas être exclusivement réservée à ce type cellulaire puisque les résultats obtenus avec les souches MCF7 R et S montrent la même différence d'un facteur 4 de l'exaltation de MTX.

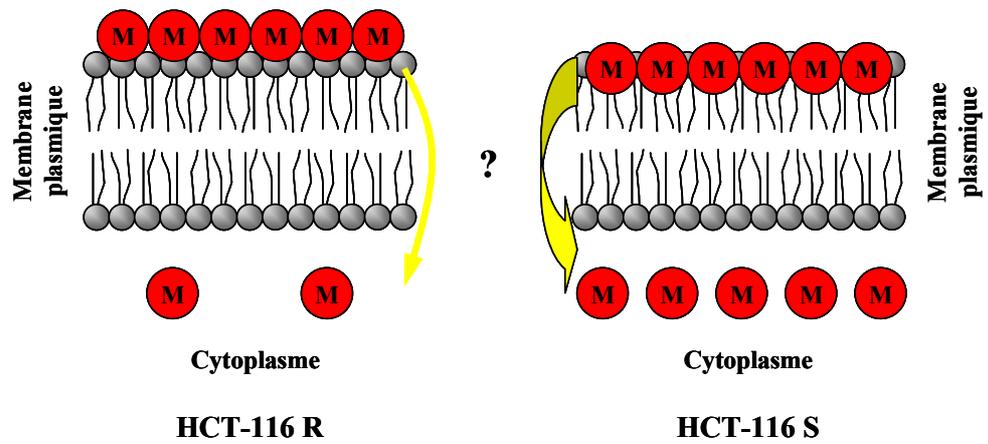
La différence d'intégration partielle de MTX dans la membrane des cellules HCT-116 R et S apparaît pour de courtes incubations et avec des concentrations très faibles en médicament, et ce même à basse température. Ces résultats pourraient dépendre d'une différence de structure et/ou de la nature de la bicouche de phospholipides entre les deux souches. Afin de mettre en évidence des différences d'affinité du médicament avec la membrane plasmique, une étude de stabilité de l'intégration de MTX a été menée à 4°C. La rapide diminution de la diffusion SERS chez les cellules résistantes correspond à une libération de la MTX à partir du microenvironnement membranaire. Par contre, la fraction de MTX exaltée après 1 h à 4°C pourrait avoir pour origine une adsorption résiduelle correspondant à une adsorption plus stable, et commune aux HCT-116 S.

Au terme de ces résultats, deux hypothèses peuvent être évoquées. Tout d'abord, les cellules HCT-116 S comporteraient moins de molécules de MTX intégrées à la surface de la membrane plasmique en comparaison des HCT-116 R. La deuxième hypothèse serait que l'accessibilité de MTX pour le colloïde serait plus réduite chez HCT-116 S, ce qui pourrait correspondre à un degré d'enfouissement dans la membrane plus important. De plus, la répartition de la molécule dans les deux feuillets de la membrane pourrait être différente chez les deux types cellulaires. La figure 41 illustre ces deux hypothèses.

La spectroscopie SERS a donc permis de mettre en évidence une différence en terme de caractéristiques d'adsorption entre les cellules sensibles et résistantes. L'intégration membranaire du médicament pourrait être étroitement liée à des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique entre les deux lignées.



*Hypothèse 1*



*Hypothèse 2*

Figure 41. Deux hypothèses d'intégration de MTX dans la membrane plasmique des cellules résistantes et sensibles. Les étapes de la diffusion de la molécule au travers de la bicouche de phospholipide restent mal définies (notées par le symbole « ? »).

### **1.2.3. Diffusion transmembranaire de la mitoxantrone par l'analyse de l'atténuation de fluorescence de la sonde**

#### **Caractéristiques donneur/accepteur d'énergie**

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de 0,5  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP et de 10  $\mu\text{M}$  MTX ont été obtenus par spectrofluorimétrie. Le rendement quantique de fluorescence de MTX est près de 100 fois inférieur à celui de 4Di-10ASP. Par conséquent, les intensités des spectres des deux entités ont été normalisées afin de mieux apprécier les différences spectrales (figure 42). L'émission de fluorescence de 4Di-10ASP a un maximum vers 550 nm tandis que MTX présente un large spectre d'excitation dont les maxima sont à 612 nm et 656 nm. Le calcul du recouvrement spectral entre le spectre d'émission de fluorescence de 4Di-10ASP et le spectre d'excitation de MTX a été déterminé ( $J = 1,22 \times 10^{-13} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^3$ ) (figure 42, zone hachurée, et tableau 8 en Annexe 1). De plus,  $R_0$  a également été déterminé ( $R_0 = 41,3 \text{ \AA}$ ), et correspond à la distance entre les deux fluorophores permettant un transfert d'énergie avec une efficacité de 50 %. Ces données numériques indiquent un transfert d'énergie possible entre les deux fluorophores.

#### **Mise en évidence de l'atténuation de fluorescence de la sonde 4Di-10ASP**

La diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique est déterminée uniquement par l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par les molécules de MTX. Après un transfert d'énergie de la sonde fluorescente vers MTX, la restitution d'énergie par la molécule anticancéreuse sera essentiellement sous forme d'énergie non radiative (chaleur).

La microscopie confocale permet de localiser l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX. En effet, les cellules HCT-116 S sont incubées avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C et lavées deux fois par PBS. Une première image des cellules est enregistrée au temps 0 localisant l'émission de fluorescence du donneur d'énergie. Une émission de fluorescence de 4Di-10ASP au niveau de la membrane plasmique est clairement observée mais également dans des vésicules intracellulaires (figure 43 A). Une diffusion de la sonde vers le cytoplasme subsiste compte tenu de ses propriétés lipophiles. Une seconde image 15 secondes après l'ajout de 10  $\mu\text{M}$  MTX est enregistrée. L'observation directe des images d'émission de fluorescence de 4Di-10ASP permet très difficilement de localiser l'atténuation de la sonde après l'ajout de MTX (figure 43 B).

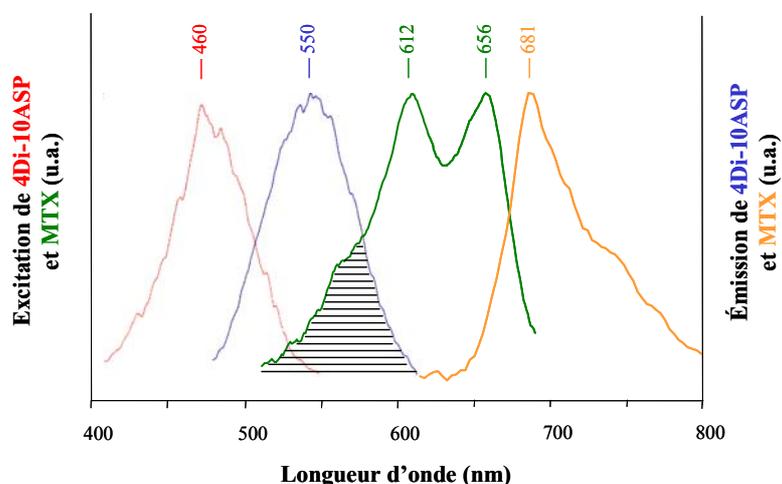


Figure 42. Spectres normalisés d'excitation et d'émission de fluorescence de 4Di-10ASP et de MTX. Conditions expérimentales : [4Di-10ASP] = 0,5  $\mu$ M dans Triton X-100 1 % à pH 7,2 ; [MTX] = 10  $\mu$ M dans un tampon phosphate (pH 7,2) ; (zone hachurée) : recouvrement spectral entre le spectre d'émission de 4Di-10ASP et le spectre d'excitation de MTX.

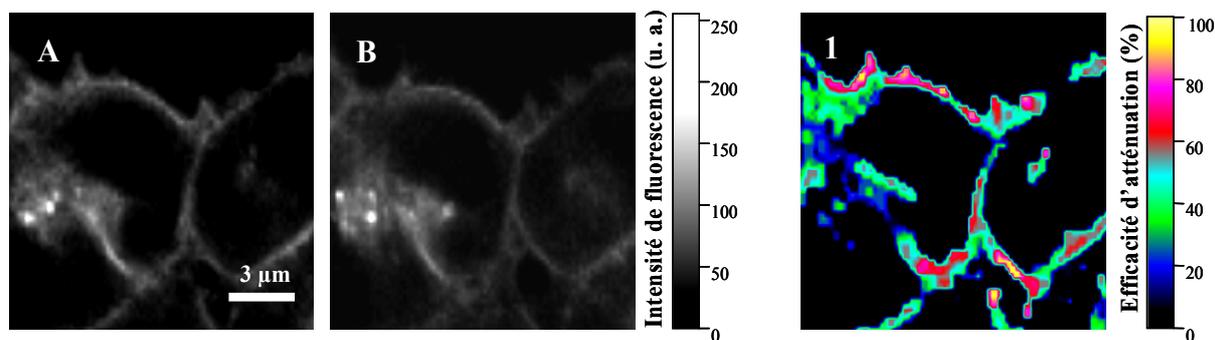


Figure 43. Microscopie confocale de l'atténuation de fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez HCT-116. (A) distribution de 4Di-10ASP ;

(B) ajout de MTX ;

(1) efficacité d'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX.

Conditions expérimentales : les cellules HCT-116 S sont incubées avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C puis incubées dans un tampon phosphate (A) ; 10  $\mu$ M MTX sont ajoutés aux cellules et une deuxième image est enregistrée après 15 sec ;  $\lambda_{Exc} = 488$  nm.

Un traitement des images a permis de déterminer la répartition de l'efficacité d'atténuation du donneur (voir la section *MATERIEL ET METHODES* pour plus d'informations). Les images en fausses couleurs montrent une importante diminution de la fluorescence de 4Di-10ASP exclusivement au niveau de la membrane plasmique des cellules (figure 43, images 1). Ces résultats confirment une rapide atténuation de 4Di-10ASP par MTX. De plus, il existe une importante variabilité de l'amplitude d'atténuation entre les zones de la membrane plasmique d'une même cellule. Il faut noter qu'un contrôle avec uniquement l'ajout de PBS n'a révélé aucune variation de la fluorescence de 4Di-10ASP.

### **Comparaison des atténuations de fluorescence entre les cellules sensibles et résistantes**

L'analyse des cellules par la microscopie confocale a révélé une importante variabilité de l'efficacité d'atténuation de 4Di-10ASP au niveau de différents sites de la membrane plasmique. L'étude suivante a donc été menée sur une population cellulaire par spectrofluorimétrie avec 3 millions de cellules dans un micro volume final de 500  $\mu$ L de tampon PBS.

Les étapes de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP sont définies après l'ajout de MTX aux cellules marquées. Les cellules HCT-116 S sont incubées avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C. Après deux lavages dans le tampon phosphate PBS à 37°C, l'excitation de 4Di-10ASP est fixée à 470 nm et l'émission de fluorescence de la sonde est continuellement enregistrée à 550 nm. L'ajout de 10  $\mu$ M MTX a pour conséquence une atténuation instantanée de l'émission de fluorescence de 4Di-10ASP membranaire (figure 44, tracé a). Après cette phase rapide, une faible atténuation supplémentaire de la fluorescence est observée pendant 90 sec, suivie par une phase stationnaire. Un contrôle négatif a permis de vérifier que cette atténuation a pour origine l'ajout de MTX. La rapide atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP (phase 1) révèle un important transfert d'énergie du donneur vers MTX qui est interprété comme une intégration de MTX dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Eytan, 2005). L'atténuation supplémentaire (phase 2) est interprété comme un basculement (ou *flip-flop*) de MTX du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane, ce qui provoquerait une atténuation plus progressive des molécules de 4Di-10ASP intégrées dans le feuillet interne de la membrane.

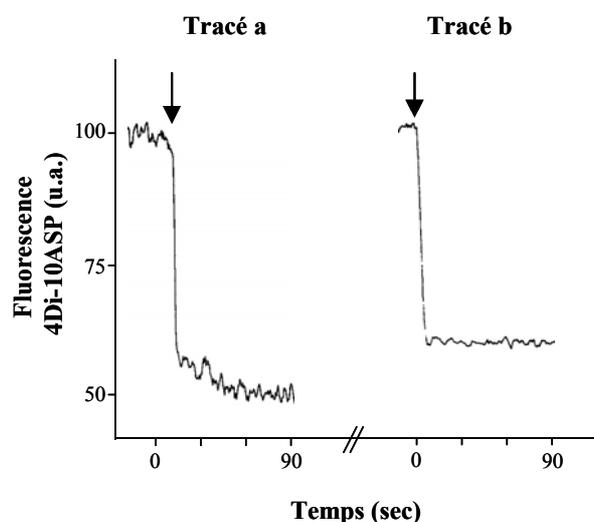


Figure 44. Atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP membranaire par MTX chez HCT-116 S.  
 tracé a : cinétique d'atténuation enregistrée à 37°C ;  
 tracé b : cinétique d'atténuation enregistrée à 4°C.

Conditions expérimentales : 3 millions de cellules sont incubées avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 470 \text{ nm}$  ; les variations de l'émission de fluorescence de la sonde sont continuellement enregistrées à 550 nm ; 10  $\mu\text{M}$  MTX (50  $\mu\text{L}$ ) sont ajoutés ( $\blacktriangledown$ ) ; les photons sont collectés toutes les 0,5 sec.

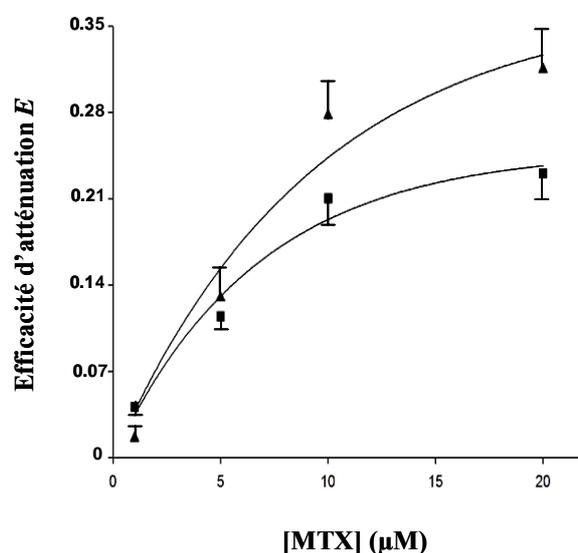


Figure 45. Efficacité d'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez HCT-116 R ( $\blacksquare$ ) et HCT-116 S ( $\blacktriangle$ ).

Conditions expérimentales : plusieurs lots de 3 millions de cellules sont incubés avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 470 \text{ nm}$  ; les variations de l'émission de fluorescence de la sonde sont continuellement enregistrées à 550 nm ; de 1 à 20  $\mu\text{M}$  MTX (50  $\mu\text{L}$ ) sont ajoutées ; les photons sont collectés toutes les 0,5 sec.

Pour vérifier cette hypothèse, l'influence de basses températures sur l'atténuation de 4Di-10ASP a été déterminée. Les cellules HCT-116 S sont incubées avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C. Ensuite, l'émission de fluorescence du donneur est continuellement collectée à 4°C (figure 44, tracé b). L'ajout de 10  $\mu\text{M}$  MTX a pour conséquence une atténuation instantanée de la fluorescence de 4Di-10ASP membranaire. Cette atténuation est immédiatement suivie par la phase stationnaire. La phase 2 n'existe plus. Ces résultats sont en accord avec un modèle où l'atténuation progressive correspondrait à un basculement de MTX dans le feuillet interne de la membrane.

Une comparaison de l'efficacité d'atténuation entre les deux types cellulaires a été réalisée après l'ajout de concentrations croissantes de MTX. Les cellules HCT-116 S et R sont incubées avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C. De 1  $\mu\text{M}$  à 20  $\mu\text{M}$  MTX sont ajoutées aux cellules en suspension (figure 45). Les résultats montrent que pour des concentrations de MTX supérieures à 5  $\mu\text{M}$ , une efficacité d'atténuation plus importante (jusqu'à 30 %) est mesurée pour les cellules sensibles par rapport aux HCT-116 R. Cette meilleure efficacité d'atténuation de la sonde par MTX chez les cellules sensibles est interprétée comme la conséquence d'une intégration plus importante de molécules de MTX dans la membrane plasmique.

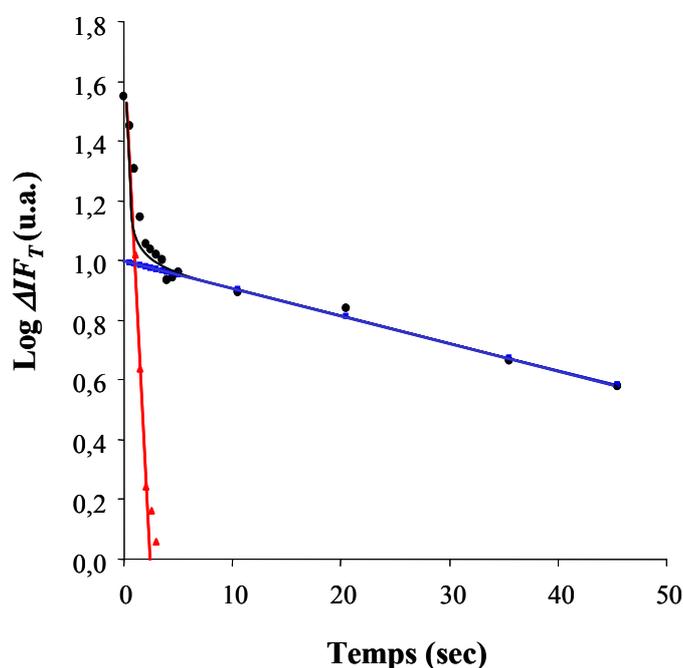


Figure 46. Modélisation de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX suivant une cinétique biexponentielle chez les cellules HCT-116.

- (●) cinétique de l'atténuation de fluorescence ;
- (—) droite de régression de l'atténuation pendant la phase 1 ;
- (—) droite de régression de l'atténuation pendant la phase 2.

Conditions expérimentales : 3 millions de cellules HCT-116 S sont incubées avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant 30 min ;  $\lambda_{exc} = 470$  nm ; les variations de l'émission de fluorescence de la sonde sont continuellement enregistrées à 550 nm ; 10  $\mu$ M MTX (50  $\mu$ L) sont ajoutées ; les photons sont collectés toutes les 0,5 sec.

Tableau 5. Paramètres de l'atténuation de fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez les HCT-116.

	HCT-116 S	HCT-116 R
$E_{total}$	$27,6 \pm 1,2$ % <sup>(§)</sup>	$23,4 \pm 1,7$ % <sup>(§)</sup>
$E_{phase 1}$	$20,6 \pm 1,6$ % <sup>(*)</sup>	$16,6 \pm 1,8$ % <sup>(*)</sup>
$E_{phase 2}$	$7,0 \pm 1,7$ %	$6,8 \pm 1,2$ %
$t_{1/2}$ de phase 1	$0,5 \pm 0,1$ sec	$0,4 \pm 0,1$ sec
$t_{1/2}$ de phase 2	$32 \pm 8$ sec	$28 \pm 6$ sec

$E$  : efficacité d'atténuation de fluorescence de la sonde par MTX ; *phase 1* : phase rapide de l'atténuation de fluorescence de la sonde ; *phase 2* : phase lente de l'atténuation de fluorescence de la sonde ;  $t_{1/2}$  : temps de décroissance correspond au temps nécessaire pour atteindre la moitié de l'intensité de fluorescence de référence de la sonde.

<sup>(§, \*)</sup>  $p < 0,01$ .

**Paramètre de l'atténuation de fluorescence de la sonde par la mitoxantrone**

Une décomposition du transfert de MTX au travers de la membrane plasmique a permis de déterminer les efficacités d'atténuation de la sonde pendant les phases successives de diffusion rapide (phase 1) et lente (phase 2) (voir la section *MATERIELS ET METHODES* pour plus d'informations) selon l'équation suivante :

$$\begin{aligned} \text{Equation :} \quad \Delta IF_T &= \Delta IF_R + \Delta IF_L \\ \Rightarrow E_{total} &= \Delta IF_T / IF_0 \\ E_{phase 1} &= \Delta IF_R / IF_0 \\ E_{phase 2} &= \Delta IF_L / IF_0 \end{aligned}$$

Où  $\Delta IF_T$  représente la variation totale de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP après l'ajout de MTX,  $\Delta IF_R$  et  $\Delta IF_L$  les variations des atténuations respectivement des phases 1 et 2 ;  $E_{total}$ ,  $E_{phase 1}$ , et  $E_{phase 2}$  correspondent aux efficacités d'atténuation totale, de la phase 1 et de la phase 2 respectivement. Les cellules HCT-116 S sont incubées avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C. Après deux lavages dans le tampon phosphate PBS à 37°C, l'excitation de 4Di-10ASP est fixée à 470 nm et l'émission de fluorescence de la sonde est continuellement enregistrée à 550 nm. 10  $\mu$ M MTX sont ajoutés aux cellules en suspension au cours de l'enregistrement. La figure 46 modélise la cinétique biexponentielle de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez les cellules HCT-116 S.

Les efficacités d'atténuation de 4Di-10ASP des phases 1 et 2 pour les deux types cellulaires ont été comparées (tableau 5). Les cellules HCT-116 S et R présentent des efficacités totales d'atténuation respectivement de 27,6 % et 23,4 %. L'efficacité d'atténuation de la sonde est plus importante pendant la phase 1 chez HCT-116 S par rapport aux cellules résistantes (respectivement  $E_{phase 1} = 20.6$  % et 16.6 %). Une atténuation rapide de la sonde révèle une intégration instantanée de MTX dans le feuillet externe. Ces différences sont statistiquement significatives et pourraient suggérer une intégration plus importante de MTX dans le feuillet externe des cellules sensibles. Cependant, ces efficacités d'atténuation de la sonde sont relativement proches.

Les temps de décroissance de la fluorescence de la sonde ont été déterminés pour les phases rapides et lentes de l'atténuation de fluorescence de la sonde à partir de l'équation suivante :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Où le temps de décroissance  $t_{1/2}$  correspond au temps nécessaire pour atteindre la moitié de l'intensité de fluorescence de référence de la sonde, et  $k$  la pente de la dérivée de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP pour chaque phase. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

Au cours de la phase rapide, la faible résolution de l'appareillage ne permet pas de déterminer des temps de décroissance différents entre les deux types cellulaires. De plus, au cours de la phase lente, le temps de décroissance de fluorescence de la sonde est équivalente chez les cellules sensibles et résistantes (respectivement  $t_{1/2}$  phase 2 = 32 sec et 28 sec). Ces résultats suggèrent que la vitesse de basculement de MTX du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane semble être identique chez les deux souches cellulaires.

### **1.3. Conclusions**

L'ajout de MTX à des cellules HCT-116 S marquées par la sonde membranaire 4Di-10ASP a pour résultat une atténuation partielle de la fluorescence du fluorophore selon une cinétique en deux étapes. Une rapide atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP (phase 1) révèle un important transfert d'énergie du donneur vers MTX qui est interprété comme une intégration de MTX dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Eytan, 2005). L'atténuation supplémentaire (phase 2) pourrait correspondre à un basculement de MTX du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane, ce qui provoquerait une atténuation plus progressive des molécules de 4Di-10ASP intégrées dans le feuillet interne de la membrane. Ensuite, la phase stationnaire montre un équilibre des échanges feuillet interne/cytoplasme de MTX.

La comparaison des efficacités d'atténuation de la sonde membranaire par MTX a révélé une atténuation plus importante de 4Di-10ASP pour le feuillet externe des cellules HCT-116 S par rapport aux cellules résistantes. Cependant, même si cette différence est statistiquement significative, ces efficacités d'atténuation de la sonde sont relativement proches. Ces derniers résultats ne permettent pas d'expliquer que chez les cellules résistantes, l'intensité SERS de MTX trois fois plus importante a pour origine une quantité plus

importante de MTX intégrée à la surface de la membrane. De plus, le temps de décroissance de fluorescence de la sonde est équivalent chez les deux types cellulaires suggérant une vitesse identique de basculement de MTX du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane. L'hypothèse d'un turn-over plus lent de MTX membranaire vers le cytoplasme des cellules résistantes ne peut donc être retenue. D'après ces observations, des accessibilités différentes de MTX par le colloïde semble être l'hypothèse interprétant le mieux les différences d'intensité SERS de MTX. Une affinité moins importante de MTX pour la membrane des cellules résistantes pourrait être à l'origine des différences d'intégration et d'accumulation de MTX entre les deux types cellulaires.

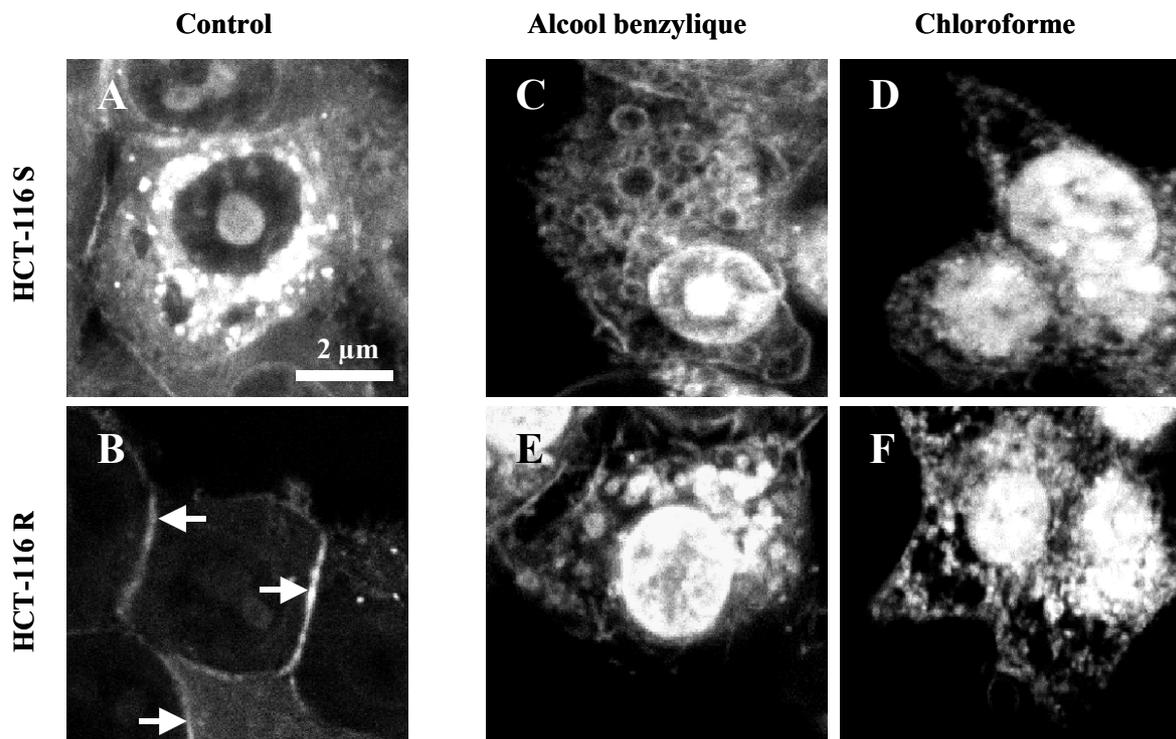
## **2. Modulation de l'intégration membranaire de la mitoxantrone**

Il a été décrit que des fluidifiants membranaires comme l'alcool benzylique ou le chloroforme abolissent l'activité ATP-asiqne de la protéine à efflux (Pgp) selon un mécanisme d'inhibition peu classique (Regev *et al.*, 1999). En effet, il a été suggéré que ces agents pourraient accélérer l'incorporation du médicament et inhibe l'activité de la protéine en perturbant son environnement moléculaire. Il est vraisemblable que de tels agents puissent inhiber d'autres protéines à efflux puisque le mode d'inhibition de la protéine par un fluidifiant membranaire est non spécifique. Une modulation de l'homéostasie membranaire devrait préciser la relation entre l'intégration partielle de MTX et une diminution possible de la perméabilité membranaire chez HCT-116 R.

### **2.1. Action de fluidifiants sur l'accumulation du médicament**

#### **2.1.1. Imagerie cellulaire par microscopie confocale à fluorescence**

L'effet de fluidifiants synthétiques sur la distribution de MTX a été mis en évidence par la microscopie confocale. Les cellules HCT-116 S et R sont pré-incubées avec 10 mM alcool benzylique (AB) ou chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) pendant 10 min puis traitées par 5 µM MTX pendant 1 h à 37°C. Les cellules sont observées après deux lavages dans du milieu RPMI à 4°C non fluorescent. Les cellules HCT-116 S, pré-incubées avec AB ou CHCl<sub>3</sub> (figure 47A, C, D), montrent une émission de fluorescence de MTX plus importante au niveau du noyau.



**Figure 47. Microscopie confocale de MTX chez les cellules HCT-116 traitées par un fluidifiant.**  
 Une émission de MTX exclusivement autour de la membrane plasmique est observée chez les cellules résistantes (flèches blanches) tandis qu'une importante augmentation de l'accumulation intracellulaire de MTX est remarquée chez les deux types cellulaires traités par les fluidifiants.  
 Conditions expérimentales : HCT-116 S (A, C, D) et HCT-116 R (B, E, F) sont pré-incubées avec 10 mM alcool benzylique (C, E) ou chloroforme (D, F) pendant 10 min à 37°C puis incubée avec 5 μM MTX pendant 1 h à 37°C ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 568 \text{ nm}$ .

D'autre part, les cellules résistantes traitées par AB ou  $\text{CHCl}_3$  montrent clairement une accumulation de MTX extrêmement plus importante au niveau du cytoplasme et du noyau en comparaison de cellules non traitées (figure 47B, E, F). D'après ces observations, un traitement des cellules par AB ou  $\text{CHCl}_3$  augmente de manière très significative l'accumulation intracellulaire de MTX.

### **2.1.2. Analyse quantitative du médicament intracellulaire**

Les modifications de l'accumulation de MTX par AB ou  $\text{CHCl}_3$  ont été déterminées par une quantification de MTX intracellulaire. Les deux souches sont pré-incubées avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$  puis incubées avec  $5 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$ . Les cellules sont lavées dans du milieu RPMI à  $4^\circ\text{C}$  puis lysées par un tampon Triton X-100 1 %. Les lysats sont ensuite analysés par la lecture de l'absorbance à 622 nm et les concentrations intracellulaires de MTX sont déduites à partir d'une gamme étalon (figure 48 A). Une incubation des cellules HCT-116 S avec AB ou  $\text{CHCl}_3$  montre une importante augmentation de la concentration intracellulaire de MTX selon un facteur 1,9 ( $831 \pm 124 \text{ pmol} / 10^6$  cellules traitées par AB) et d'un facteur 1,6 ( $712 \pm 106 \text{ pmol} / 10^6$  cellules traitées par  $\text{CHCl}_3$ ) par rapport à leur contrôle. Pour les HCT-116 R, un traitement par AB ou  $\text{CHCl}_3$  induit une augmentation très significative de la concentration de MTX selon respectivement un facteur 4,3 ( $823 \pm 123 \text{ pmol} / 10^6$  cellules) et d'un facteur 2,6 ( $501 \pm 75 \text{ pmol} / 10^6$  cellules). D'après ces mesures, des incubations des cellules avec AB ou  $\text{CHCl}_3$  ont pour conséquence une importante augmentation de l'accumulation intracellulaire de MTX.

L'efficacité des agents AB et  $\text{CHCl}_3$  pour augmenter l'accumulation de MTX a été déterminée à  $4^\circ\text{C}$ . HCT-116 S et R sont pré-incubées avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$  puis traitées par  $5 \mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $4^\circ\text{C}$  avant l'analyse des lysats (figure 48 B). Les cellules HCT-116 S traitées par AB présentent une augmentation d'un facteur 5,2 de la concentration intracellulaire de MTX par rapport aux cellules non traitées à  $4^\circ\text{C}$ . De même, un traitement des cellules sensibles avec  $\text{CHCl}_3$  a pour conséquence une augmentation d'un facteur 4,9 de l'accumulation de la molécule. Pour les cellules HCT-116 R traitées par AB ou  $\text{CHCl}_3$ , une augmentation significative de l'accumulation de MTX est observée, respectivement selon un facteur 8,1 ( $342,5 \pm 51,4 \text{ pmol} / 10^6$  cellules) et 9 ( $377,0 \pm 56,6 \text{ pmol} / 10^6$  cellules).

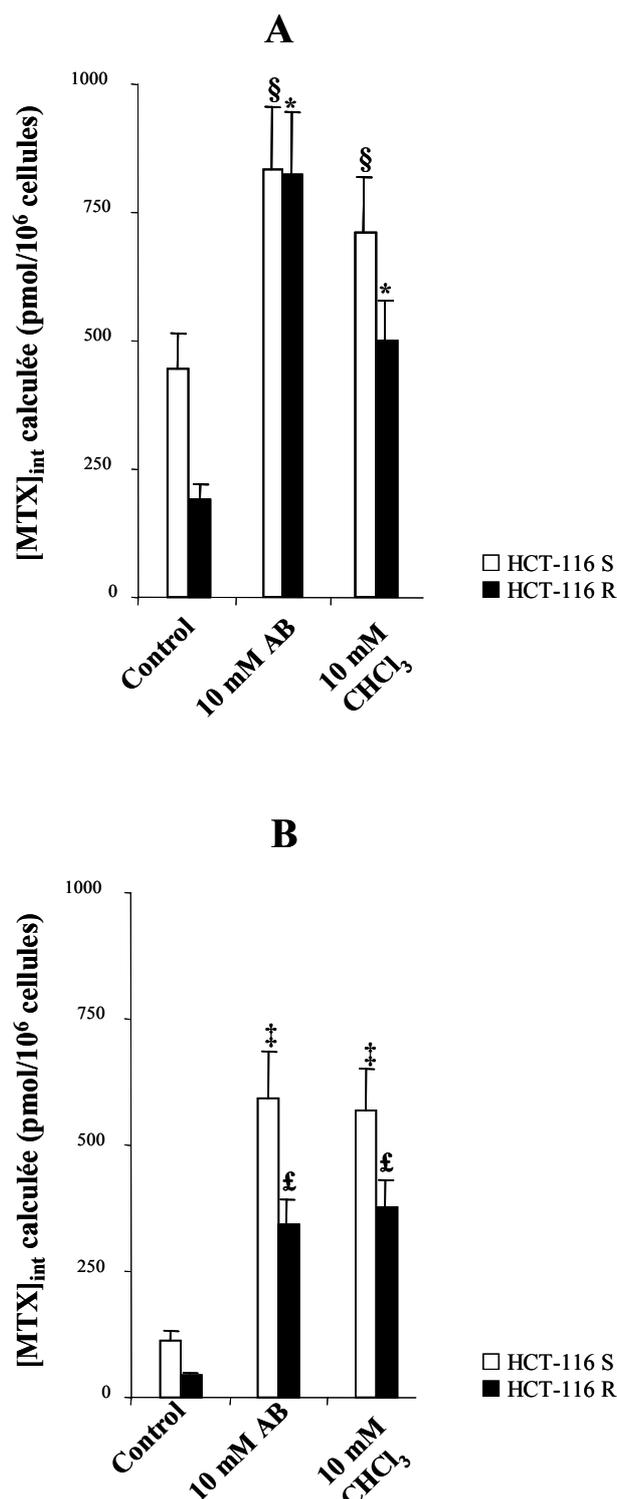


Figure 48. Effets de fluidifiants sur l'accumulation de MTX intracellulaire chez HCT-116 R et S. (A) effets de fluidifiants déterminés à 37°C ; (§,\*) p < 0,01 par rapport à leur contrôle non traités ; (B) effets de fluidifiants déterminés à 4°C ; (‡,£) p < 0,01 par rapport à leur contrôle non traités.

Conditions expérimentales : chaque type cellulaire est pré-incubé avec 10 mM alcool benzylique (AB) ou chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) pendant 10 min à 37°C, traité par 5 µM MTX pendant 1 h, puis lysée dans un tampon Triton X-100 1 % ; λ<sub>Abs</sub> = 622 nm ; moyennes de 3 expériences indépendantes (calcul significatif selon un test t de Student avec p<0,01) ; la concentration intracellulaire de MTX est calculée à partir d'une gamme étalon.

D'après ces résultats, une plus faible accumulation de MTX est observée à 4°C pour les deux souches cellulaires, mettant en évidence qu'une rigidification de la bicouche phospholipidique diminue fortement l'incorporation de la molécule. D'autre part, un traitement des cellules avec les agents AB ou CHCl<sub>3</sub> améliore efficacement l'accumulation de MTX. L'effet de ces fluidifiants persiste à 4°C chez les deux lignées. En augmentant la fluidité membranaire, ces agents augmentent également la perméabilité de la membrane plasmique pour MTX.

Les cinétiques des concentrations intracellulaires de MTX de cellules traitées par AB ou CHCl<sub>3</sub> ont été réalisées afin de déterminer les effets de tels agents sur l'efflux de la molécule. Les cellules HCT-116 R sont incubées avec 5 µM MTX pendant 1 h à 37°C, lavées puis mises en contact avec 10 mM AB ou CHCl<sub>3</sub> à 37°C de 0 à 120 min avant leurs lyses. Par contre, la souche HCT-116 S est incubée à la concentration plus faible de 2 µM MTX afin d'obtenir une quantité de MTX intracellulaire équivalente pour les deux souches (figure 49).

Pour le contrôle HCT-116 S, peu de variations de la quantité de MTX intracellulaire sont observées au cours du temps. L'ajout de AB ou CHCl<sub>3</sub> n'a pas d'effet sur cette vitesse de libération de MTX intracellulaire. Contrairement à l'incorporation de MTX, ces fluidifiants ne modulent pas l'efflux du composé par diffusion passive au travers de la membrane. Pour le contrôle HCT-116 R, une diminution de 52 % de la concentration intracellulaire de MTX est observée après 15 min dans le milieu (soit  $165 \pm 25$  pmol /  $10^6$  cellules à  $t = 0$  min puis  $86 \pm 13$  pmol /  $10^6$  cellules à  $t = 15$  min). Chez HCT-116 R, l'activité de la protéine BCRP est responsable de la rapide diminution de la concentration intracellulaire de MTX. L'ajout d'un fluidifiant a pour résultat une inhibition de ces protéines à efflux puisque dans ces conditions, aucune variation de la concentration de MTX n'est observée. Une modulation des propriétés biophysiques de la membrane plasmique semble donc avoir des conséquences directes sur les flux trans-membranaires de MTX chez les deux souches cellulaires.

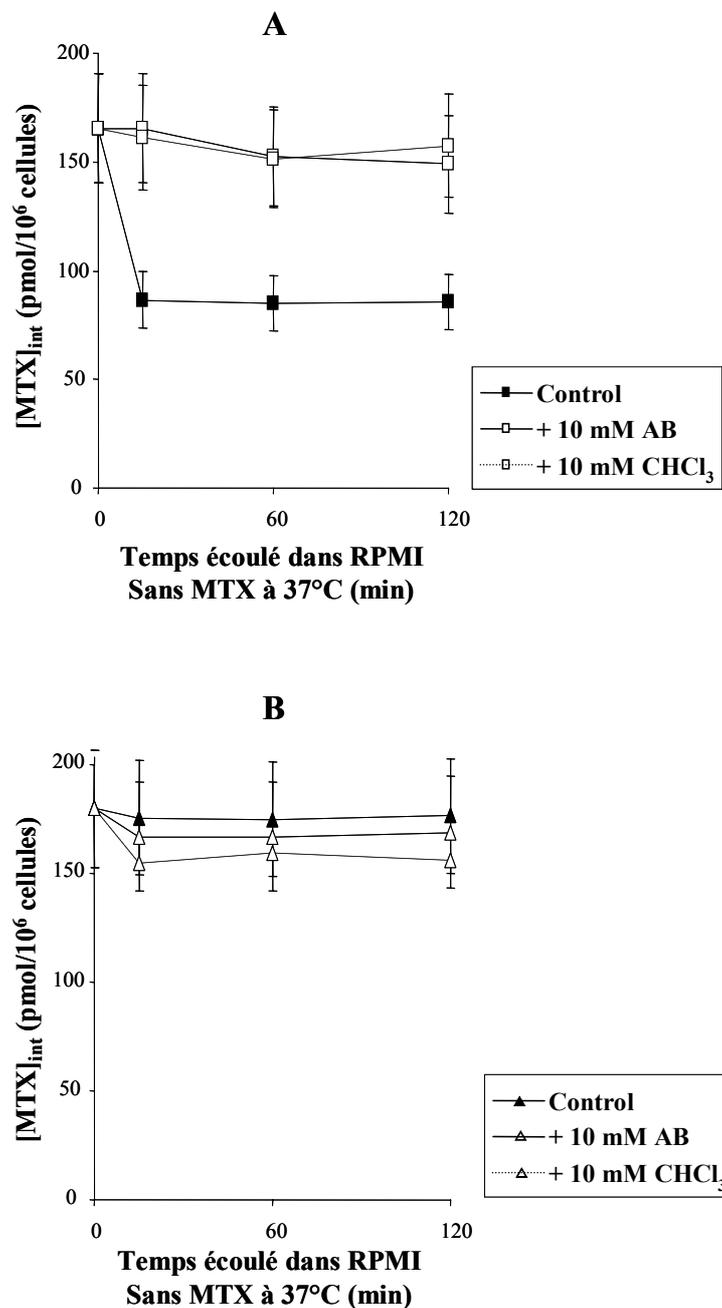


Figure 49. Effet de fluidifiants sur l'efflux de MTX chez HCT-116.

(A) chez les cellules HCT-116 R ;

(B) chez les cellules HCT-116 S.

Conditions expérimentales : HCT-116 R et S sont traitées respectivement avec 5  $\mu$ M et 2  $\mu$ M MTX pendant 1 h à 37°C, incubées avec 10 mM AB ou CHCl<sub>3</sub> à 37°C de 0 à 120 min, puis lysées dans un tampon Triton X-100 1 % ;  $\lambda_{Abs} = 622$  nm ; la concentration intracellulaire de MTX est calculée à partir d'une gamme étalon.

### **2.1.3. Spectres d'émission de la mitoxantrone dans un environnement membranaire**

Une étude spectrale de MTX à l'échelle cellulaire a été dirigée par la microspectrofluorimétrie confocale à laser (514 nm). Cette technique permet de collecter l'émission de fluorescence et de générer des spectres d'émission de fluorescence issus des cellules vivantes. Chaque spectre est obtenu après la focalisation du faisceau laser sur une jonction membranaire (figure 50). Ces mesures seront comparées à la quantification de MTX intracellulaire par la lecture d'absorbance.

Les cellules HCT-116 R et S sont incubées avec 10  $\mu$ M MTX à 37°C pendant des durées de 10 sec à 60 min, et lavées par une solution tampon phosphate (PBS) non fluorescent à 4°C avant leur observation. Une quantification de l'intensité de fluorescence des spectres cellulaires de la molécule a été réalisée. Les valeurs reportées correspondent à l'intensité de fluorescence intégrée entre 665 nm et 725 nm ( $n = 15$ ) (figure 51 A). Jusqu'à 15 min de contact, les intensités de fluorescence sont équivalentes pour les deux lignées cellulaires. Après 60 min, une intensité de fluorescence 2,5 fois moins importante est observée pour HCT-116 R (soit 490 u.a. et 1260 u.a. respectivement pour HCT-116 R et S). Un efflux de MTX dirigé par la protéine BCRP chez HCT-116 R pourrait être responsable de la plus faible intensité de fluorescence du composé anticancéreux. D'autre part, à 4°C, une très faible augmentation de l'intensité de fluorescence de MTX est observée (soit 42 u.a. à  $t = 10$  sec et 120 u.a. à  $t = 60$  min) (figure 51 A, courbe ●). Ces observations vont dans le même sens que les résultats obtenus par la lecture de l'absorbance de MTX intracellulaire.

L'effet de AB sur l'accumulation de MTX chez les cellules HCT-116 S et R est déterminé à partir de cellules traitées par 10 mM AB pendant 10 min avant une incubation avec 10  $\mu$ M MTX (figure 51 B). De 10 sec à 60 min de contact avec MTX, une intensité de fluorescence 2 à 3 fois plus importante de la molécule est observée chez les deux types cellulaires par rapport à leurs contrôles non traités. L'ajout de AB augmente donc de façon très significative l'accumulation de MTX à partir de temps de contact très courts.

En conclusion, après 60 min de contact des cellules avec MTX, les résultats obtenus par microspectrofluorimétrie confirment les mesures de quantification du composé anticancéreux réalisées par la mesure de son absorbance.

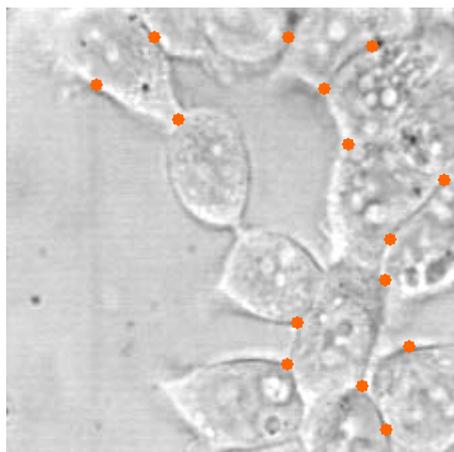


Figure 50. Exemples de focalisation du rayonnement laser sur des jonctions membranaires. Conditions expérimentales : (●) : points de focalisation sur les cellules HCT-116 S ;  $\lambda_{Exc} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 1,5 \text{ mW}$ .

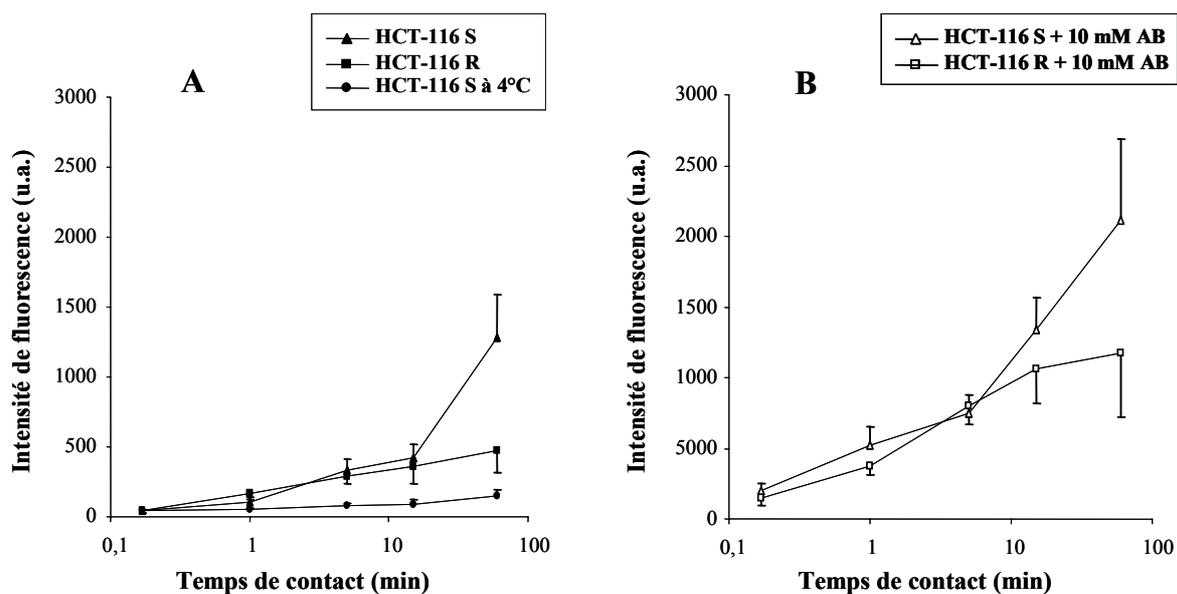


Figure 51. Quantification par la microspectrofluorimétrie de l'intensité de fluorescence de MTX chez les cellules HCT-116 R et S. Les cellules sont incubées avec MTX de 10 sec à 60 min :

- (A) : (■) HCT-116 R traitées par 10  $\mu\text{M}$  MTX à 37°C ;  
 (▲) HCT-116 S traitées par 10  $\mu\text{M}$  MTX à 37°C ;  
 (●) HCT-116 S traitées par 10  $\mu\text{M}$  MTX à 4°C ;  
 (B) : (□) HCT-116 R pré-incubées avec 10 mM AB puis traitées par 10  $\mu\text{M}$  MTX à 37°C ;  
 (△) HCT-116 S pré-incubées avec 10 mM AB puis traitées par 10  $\mu\text{M}$  MTX à 37°C.

Conditions expérimentales :  $\lambda_{Exc} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 1,5 \text{ mW}$  ; le faisceau laser est focalisé sur des jonctions membranaires ; chaque valeur reportée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée entre 665 nm et 725 nm des spectres de fluorescence de MTX ( $n = 15$ ).

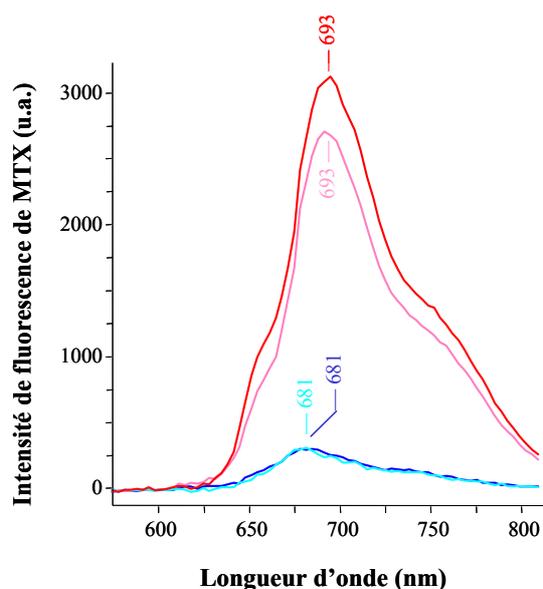


Figure 52. Comparaison des profils des spectres de MTX des cellules HCT-116 R et S à 37°C.

- (—) HCT-116 R traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 10 sec ;
- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 10 sec ;
- (—) HCT-116 R traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 15 min ;
- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 15 min.

Conditions expérimentales :  $\lambda_{Exc} = 514$  nm ; P = 1,5 mW ; le faisceau laser est focalisé sur des jonctions membranaires ; chaque spectre de fluorescence de MTX présenté est un spectre moyen (n = 15).

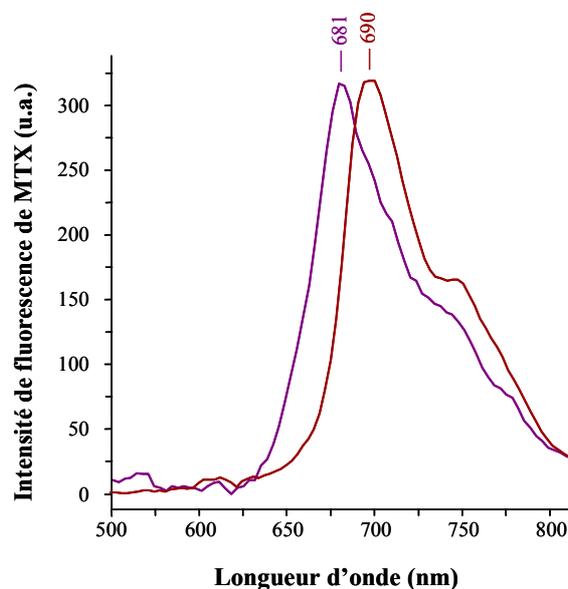


Figure 53. Profils de spectres de MTX dans différents solvants.

- (—) 10  $\mu$ M MTX en solution aqueuse ;
- (—) 10  $\mu$ M MTX dans  $CH_3OH$ .

Conditions expérimentales :  $\lambda_{Exc} = 514$  nm ; P = 1,5 mW ; chaque spectre de fluorescence de MTX présenté est un spectre moyen (n = 5).

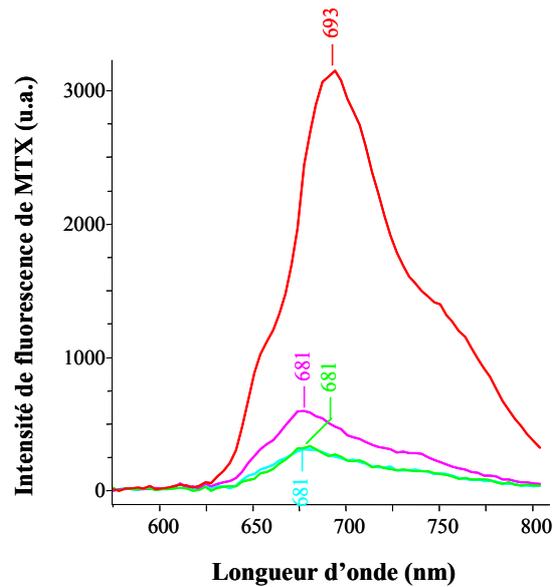


Figure 54. Effet de la température sur les profils des spectres de MTX des cellules HCT-116 S.

- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 10 sec à 37°C ;
- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 15 min à 37°C ;
- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 10 à 4°C ;
- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 15 min à 4°C.

Conditions expérimentales :  $\lambda_{Exc} = 514$  nm ; P = 1,5 mW ; le faisceau laser est focalisé sur des jonctions membranaires ; chaque spectre de fluorescence de MTX présenté est un spectre moyen (n = 15).

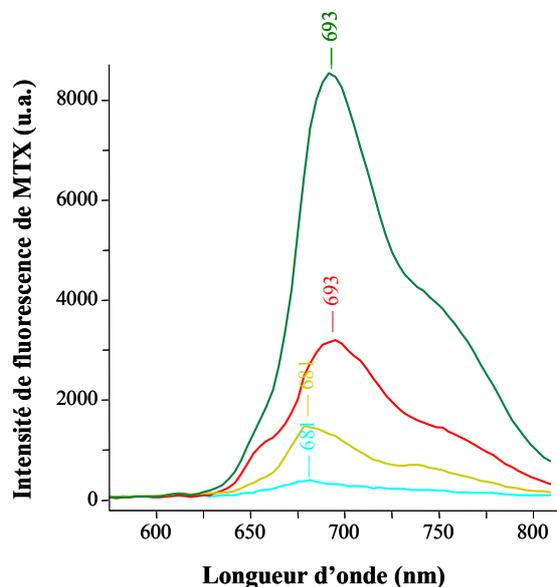


Figure 55. Effet de AB sur les profils des spectres de MTX des cellules HCT-116 S à 37°C.

- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 10 sec ;
- (—) HCT-116 S traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 15 min ;
- (—) HCT-116 S pré-incubées avec 10 mM AB puis traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 10 sec ;
- (—) HCT-116 S pré-incubées avec 10 mM AB puis traitées par 10  $\mu$ M MTX pendant 15 min.

Conditions expérimentales :  $\lambda_{Exc} = 514$  nm ; P = 1,5 mW ; le faisceau laser est focalisé sur des jonctions membranaires ; chaque spectre de fluorescence de MTX présenté est un spectre moyen (n = 15).

Les profils de ces différents spectres issus du microenvironnement membranaires ont été ensuite comparés entre eux pour identifier l'influence éventuelle (i) de la lignée cellulaire, (ii) du temps d'incubation, (iii) de la température ou (iv) du fluidifiant.

Les profils des spectres de HCT-116 S et R traitées par MTX sont comparés afin de déterminer d'éventuelles modifications spectrales entre les deux souches (figure 52). Les résultats montrent que de 10 sec à 5 min de contact, HCT-116 S et R présentent un maximum de l'émission de fluorescence ( $Em_{Max}$ ) de MTX à 681 nm. A partir de 15 min de contact, un décalage spectral de 12 nm est remarqué ( $Em_{Max} = 693$  nm) pour les deux lignées cellulaires. Pour chaque temps d'incubation, les spectres des cellules résistantes et sensibles sont toujours équivalents.

Les profils de ces spectres cellulaires ont été comparés à des spectres de MTX dans différents solvants afin de mieux comprendre l'origine de ce décalage spectral (figure 53). Le spectre de 10  $\mu$ M MTX en solution aqueuse présente un maximum d'émission de fluorescence vers 681 nm tandis qu'un décalage spectral du maximum d'émission vers 690 nm caractérise le spectre de MTX dans  $CH_3OH$ , un milieu moins polaire. Ces résultats révèlent que les profils des spectres cellulaires pourraient être fonction de la polarité de l'environnement de la molécule. Lors des temps de contact brefs, le maximum à 681 nm de MTX est interprété selon une intégration de la molécule dans le feuillet externe de la membrane et demeurerait en contact avec le milieu extracellulaire. Par contre, après 15 min d'incubation, le maximum à 693 nm est interprété selon une intégration de MTX dans un environnement moins polaire, par exemple le feuillet interne et en contact du milieu cytoplasmique.

Pour valider cette hypothèse, l'influence de la température d'incubation sur les profils des spectres de HCT-116 S a été déterminée (figure 54). Après une incubation à 4°C, les spectres de MTX des deux types cellulaires présentent aux différents temps de contact un maximum de leur émission vers 681 nm. Ce spectre de MTX suggère que le chromophore de la molécule reste dans un environnement polaire en contact avec le milieu extracellulaire. Dans ces conditions à 4°C, MTX serait incapables de s'intégrer plus profondément vers le feuillet interne de la membrane plasmique.

L'effet de AB a été déterminé à partir des profils des spectres cellulaires de MTX (figure 55). Un même maximum à 681 nm est observé après 10 sec d'incubation avec MTX

chez les deux souches, et un même décalage vers 693 nm est remarqué après 15 min de contact. En conclusion, une incubation des cellules avec un fluidifiant a pour conséquence une augmentation de l'accumulation intracellulaire de MTX, mais ne semble pas perturber l'environnement moléculaire de MTX membranaire.

## **2.2. Intensité SERS de la mitoxantrone - conséquence de la fluidité membranaire**

La relation entre l'intégration membranaire de MTX et son incorporation intracellulaire reste mal définie. Nous avons vu qu'une augmentation de la fluidité de la membrane a pour conséquence l'incorporation plus importante de la molécule et l'inhibition partielle de l'activité d'efflux. L'ajout des agents AB ou  $\text{CHCl}_3$  pourrait permettre de moduler l'intégration de MTX sur la membrane chez les cellules résistantes et sensibles. Nous verrons dans quelles mesures les spectres SERS de MTX membranaires sont sensibles à la fluidité de la bicouche lipidique.

Les spectres SERS de cellules HCT-116 S et R traitées par AB ou  $\text{CHCl}_3$  ont été comparés afin de déterminer le rôle de la fluidité sur l'intégration de MTX à la membrane plasmique.  $10^6$  cellules HCT-116 S et R sont pré-incubées avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min à 37°C puis traitées par 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C avant leur contact avec le colloïde pré-agrégé. Les spectres de HCT-116 R traitées par AB ou  $\text{CHCl}_3$  montrent une diminution d'un facteur 3 de l'intensité SERS de MTX par rapport au contrôle (figure 56 A). Aucune modification du profil des spectres n'est remarquée. Pour les cellules HCT-116 S traitées par AB ou  $\text{CHCl}_3$ , aucune différence de l'intensité SERS ou du profil des spectres de MTX n'est notée (figure 56 B). Une augmentation de la fluidité membranaire par les agents AB ou  $\text{CHCl}_3$  affecte uniquement l'intégration partielle membranaire de MTX des HCT-116 R.

L'effet de AB et  $\text{CHCl}_3$  sur l'intégration de MTX chez HCT-116 R a été déterminé avec de plus faibles concentrations du composé cytotoxique. Plusieurs lots de chaque type cellulaire sont pré-incubés avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min puis traités selon une gamme de concentrations de MTX (de 0,1 à 2  $\mu\text{M}$ ) pendant 1 h à 37°C. Les cellules sont analysées après deux lavages dans du milieu RPMI à 4°C. Chaque valeur reportée correspond à l'intensité SERS intégrée (u.a.) entre 1250  $\text{cm}^{-1}$  et 1350  $\text{cm}^{-1}$  issue de la moyenne de trois spectres reproductibles (figure 57).

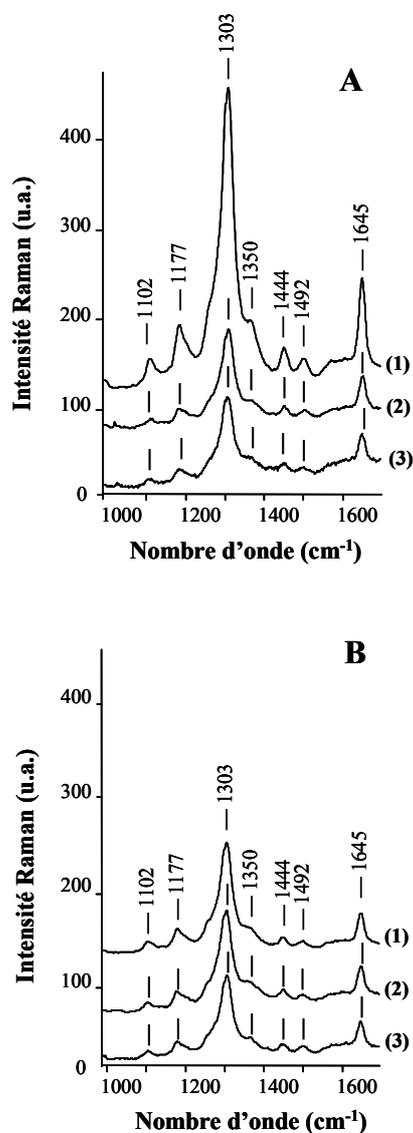


Figure 56. Effet de AB ou  $\text{CHCl}_3$  sur les intensités SERS de MTX chez les cellules HCT-116 R (A) et HCT-116 S (B).

Spectres SERS de : (1) cellules traitées par MTX ;  
 (2) cellules pré-incubées avec AB puis traitées par MTX ;  
 (3) cellules pré-incubées avec  $\text{CHCl}_3$  puis traitées par MTX.

Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules des deux lignées sont pré-incubées avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min puis traitées par 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; moyenne de 3 spectres de 20 accumulations de 3 secondes chacune.

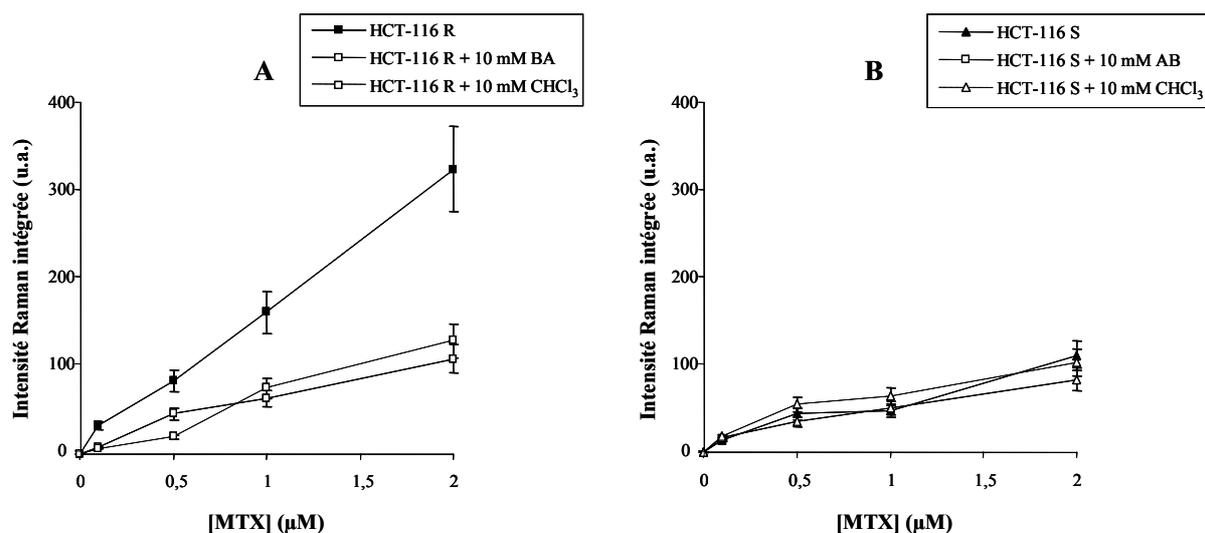


Figure 57. Effet de la concentration de MTX sur les intensités SERS de HCT-116 R (A) et HCT-116 S (B) pré-incubées avec AB ou  $\text{CHCl}_3$ .  
 Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules sont pré-incubées avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min puis traitées par 0,1 à 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$  avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; chaque valeur reportée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée des spectres SERS entre  $1250 \text{ cm}^{-1}$  et  $1350 \text{ cm}^{-1}$ .

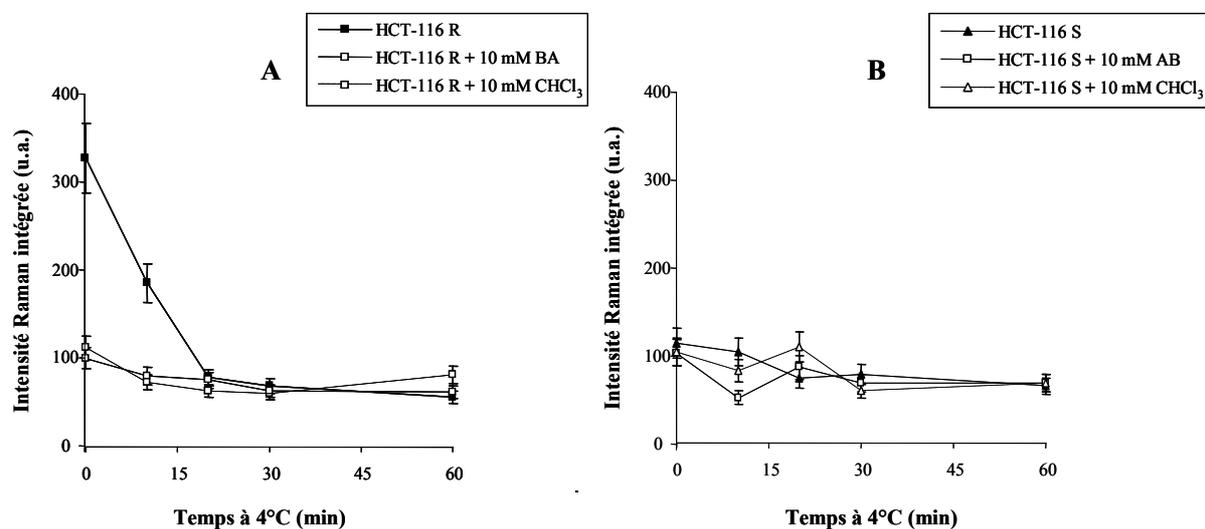


Figure 58. Libération de MTX adsorbé à la membrane de HCT-116 R (A) et S (B) pré-incubées avec AB ou  $\text{CHCl}_3$ .  
 Conditions expérimentales :  $10^6$  cellules sont incubées avec 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à  $37^\circ\text{C}$ , lavées puis incubées à  $4^\circ\text{C}$  dans du milieu RPMI sans médicament de 0 à 60 min avant leur contact avec le colloïde isotonique pré-agrégé ;  $\lambda_{\text{Exc}} = 514 \text{ nm}$  ;  $P = 180 \text{ mW}$  ; chaque valeur reportée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée des spectres SERS entre  $1250 \text{ cm}^{-1}$  et  $1350 \text{ cm}^{-1}$ .

Les résultats montrent une diminution significative (un facteur 3) de la diffusion SERS de MTX uniquement chez HCT-116 R traitées avec AB ou  $\text{CHCl}_3$  (figure 57 A, spectres  $\square$ ). De plus, la diffusion SERS résiduelle de MTX observée chez HCT-116 R est de même intensité que celle chez HCT-116 S traitées ou non par un fluidifiant (figure 57 B). Une fraction de l'intégration partielle membranaire de MTX reste accessible par le colloïde.

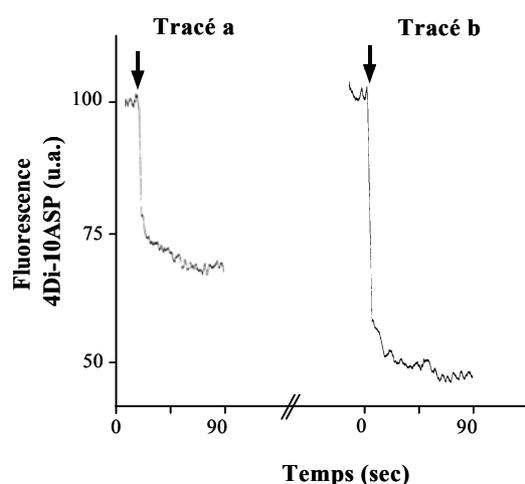
Une étude de la libération à 37°C de MTX membranaire en présence de AB ou  $\text{CHCl}_3$  a permis de préciser la stabilité de l'intégration partielle de MTX. Chaque lignée est pré-incubée avec 10 mM AB ou  $\text{CHCl}_3$  pendant 10 min à 37°C, puis avec 2  $\mu\text{M}$  MTX pendant 1 h à 37°C. Les cellules sont lavées et incubées dans du milieu RPMI pendant des durées de 0 à 60 min avant leur analyse. Pour HCT-116 R pré-incubées avec AB ou  $\text{CHCl}_3$  (figure 58 A, spectres  $\square$ ), peu ou pas de modification de la faible intensité SERS de MTX est observée au cours du temps en comparaison de leur contrôle non traité qui montre une rapide libération de MTX membranaire après 10 min d'incubation dans le milieu RPMI (figure 58 A, spectre  $\blacksquare$ ). De plus, aucun changement spectral n'est remarqué pour HCT-116 S pré-incubées ou non avec ces agents (figure 58, spectres  $\blacktriangle$  et  $\triangle$ ). En présence de fluidifiants, une fraction de l'intégration partielle de MTX reste stable.

En conclusion, les agents AB ou  $\text{CHCl}_3$  perturbent les propriétés biophysiques de la membrane plasmique. Une plus faible diffusion SERS de MTX est observée chez les cellules résistantes traitées par ces agents.

### **2.3. Atténuation de fluorescence par la mitoxantrone – conséquence de la fluidité membranaire**

#### **2.3.1. Mise en évidence**

L'amplitude d'atténuation de la sonde 4Di-10ASP est dépendante de la quantité de MTX qui s'intègre dans la matrice membranaire. Il serait intéressant de déterminer les effets de AB sur l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP afin de préciser le rôle de la fluidité membranaire dans l'intégration de MTX. Les cellules HCT-116 S sont pré-incubées avec 10 mM AB pendant 10 min puis incubées avec 4  $\mu\text{M}$  4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C. 10  $\mu\text{M}$  MTX sont ajoutés aux cellules en suspension et l'émission de fluorescence de 4Di-10ASP est continuellement suivie à 37°C (figure 59).



**Figure 59.** Effet de AB sur l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez HCT-116 S.  
**tracé a :** contrôle HCT-116 S ;  
**tracé b :** HCT-116 S pré-incubées avec AB.  
**Conditions expérimentales :** 3 millions de cellules sont incubées avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant 30 min ;  $\lambda_{Exc} = 470$  nm ; les variations de l'émission de fluorescence de la sonde sont continuellement enregistrées à 550 nm ; 10  $\mu$ M MTX (50  $\mu$ L) sont ajoutés ( $\blacktriangledown$ ) ; les photons sont collectés toutes les 0,5 sec.

**Tableau 6.** Comparaison des efficacités d'atténuation de 4Di-10ASP avec la quantification de l'intensité de fluorescence de MTX chez les cellules HCT-116.

	Efficacité d'atténuation (%) <sup>§</sup>	Quantification de l'intensité de fluorescence de MTX (après 1 min de traitement en u.a.) <sup>#</sup>
<b>HCT-116 S</b>	27,6 $\pm$ 1,2	135 $\pm$ 18
<b>HCT-116 R</b>	23,4 $\pm$ 1,7	111 $\pm$ 14
<b>HCT-116 S + 10 mM AB</b>	44,4 $\pm$ 1,0 (*)	546 $\pm$ 46 (*)
<b>HCT-116 R + 10 mM AB</b>	41,2 $\pm$ 1,7 (*)	392 $\pm$ 49 (*)
<b>HCT-116 S à 4°C</b>	20,3 $\pm$ 0,9	52 $\pm$ 7

Conditions expérimentales :

<sup>§</sup> 3 millions de cellules sont incubées avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant 30 min ;  $\lambda_{Exc} = 470$  nm ; les variations de l'émission de fluorescence de la sonde sont continuellement enregistrées à 550 nm ; 10  $\mu$ M MTX (50  $\mu$ L) sont ajoutés.

<sup>#</sup> Les deux lignées cellulaires sont incubées avec 10  $\mu$ M MTX pendant 1 min à 37°C ; le rayonnement laser est focalisé sur des jonctions membranaires ;  $\lambda_{Exc} = 514$  nm ; P = 180 mW ; chaque valeur figurée (u.a.) correspond à l'intensité intégrée entre 665 nm et 725 nm des spectres de fluorescence de MTX (n = 15).

(\*) différence significative par rapport à leur contrôle non traité par AB (p<0,001)

Pour les cellules HCT-116 S traitées avec AB (tracé b), une atténuation plus importante de la fluorescence du donneur est observée par rapport aux cellules contrôles (tracé a). L'amplitude de l'atténuation de la fluorescence pendant la phase 1 est plus importante. Par contre, la phase 2 de l'atténuation reste équivalente.

Les efficacités totales d'atténuation de 4Di-10ASP par MTX et les intensités de fluorescence de la molécule anticancéreuse ont été comparées (tableau 6). Après un traitement par AB, les efficacités d'atténuation de HCT-116 S et R sont respectivement  $44,4 \pm 1,0$  % et de  $41,2 \pm 1,7$  % par rapport à leurs contrôles non traités (respectivement  $27,6 \pm 1,2$  % et  $23,4 \pm 1,7$  %). De plus, après 1 minute de contact, une augmentation quatre fois plus importante de l'intensité de fluorescence de MTX est observée pour les deux souches cellulaires par rapport aux contrôles HCT-116 S et R (respectivement 135 u.a. et 111 u.a.). Ces résultats montrent que AB augmente clairement l'incorporation intra-membranaire de MTX. D'autre part, une incubation des cellules à 4°C a révélé une efficacité d'atténuation de 20,3 %. Une quantification de l'intensité de fluorescence de MTX montre également une plus faible accumulation de la molécule après 1 min de contact (soit 52 u.a. pour HCT-116 S). L'incorporation de MTX dans la membrane plasmique semble être ralentie.

En conclusion, pour chaque condition expérimentale, les efficacités d'atténuation de la sonde par MTX sont relativement bien corrélées aux intensités de fluorescence de la molécule anticancéreuse chez les deux lignées cellulaires. L'ajout de AB a pour conséquence une importante augmentation à la fois de l'efficacité d'atténuation de la sonde et de l'intensité de fluorescence de MTX chez les cellules résistantes et sensibles.

Après l'ajout de AB, l'intégration plus importante de MTX dans la membrane plasmique pourrait alors correspondre à une augmentation de la perméabilité membranaire pour le composé anticancéreux. Ces observations suggèrent l'hypothèse suivante. L'agent AB pourrait induire des modifications au sein de la matrice membranaire, ce qui aurait pour conséquence une modulation de la diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique (figure 60).

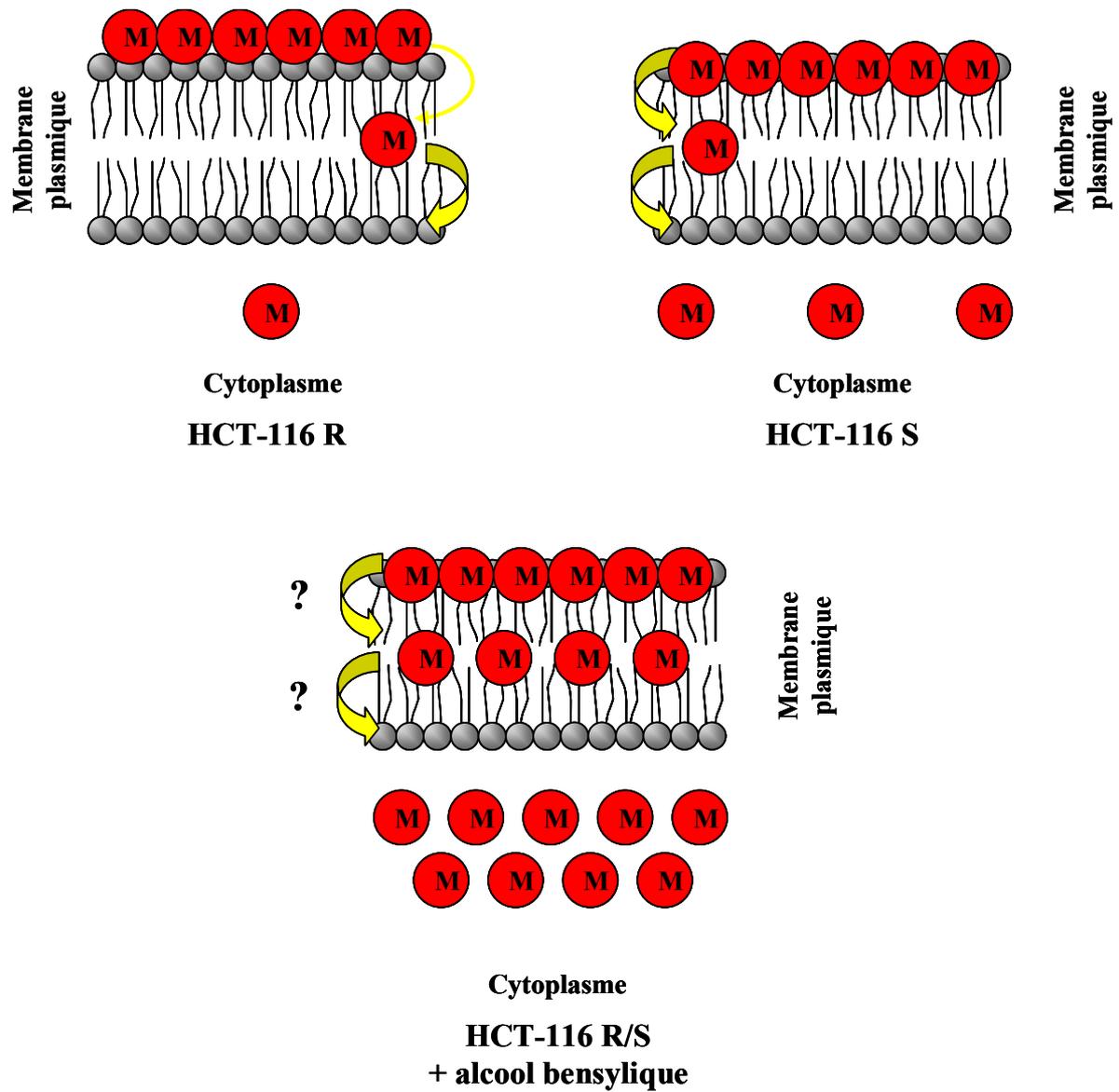


Figure 60. Hypothétique effet de AB sur l'intégration de MTX dans la membrane des cellules HCT-116. Les étapes de la diffusion de la molécule au travers de la bicouche de phospholipide traitée par l'alcool benzylique restent mal définies (notées par le symbole « ? »).

Pour valider cette hypothèse, une décomposition de la diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique a permis de déterminer les efficacités d'atténuation de la sonde pendant les phases successives de diffusion rapide (phase 1) et lente (phase 2) après un traitement des deux lignées cellulaires par AB. Les efficacités d'atténuation de 4Di-10ASP pendant les phases 1 et 2 des deux types cellulaires ont été comparées (figure 61).

Après un traitement des cellules par le fluidifiant AB, les rapports  $\Delta IF_R/IF_0$  pour les cellules HCT-116 S et R montrent clairement une importante augmentation de l'efficacité d'atténuation de  $36,3 \pm 1,5 \%$  et  $31,8 \pm 3,3 \%$  au cours de la phase 1 en comparaison des cellules contrôles sensibles et résistantes (respectivement de  $20,6 \pm 1,6 \%$  et  $16,6 \pm 1,8 \%$ ). Par contre, peu de modifications de l'efficacité d'atténuation sont observées pendant la phase 2 chez les deux souches cellulaires. Ces résultats suggèrent que le fluidifiant AB augmente nettement l'incorporation de MTX dans le feuillet externe de la membrane plasmique.

De plus, l'effet de AB sur le temps de décroissance de la fluorescence de la sonde a été déterminé pour les phases rapides et lentes de l'atténuation de fluorescence de la sonde. La faible résolution de l'appareillage ne permet pas de déterminer au cours de la phase rapide un effet d'un traitement préalable des cellules par AB sur le temps de décroissance chez les deux types cellulaires. De même, au cours de la phase lente, le temps de décroissance de fluorescence de la sonde est également équivalent chez les cellules sensibles et résistantes en comparaison de leurs contrôles non traités (données non montrées). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de la fluidité membranaire par l'agent AB ne modifie pas la vitesse de basculement de MTX du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane. Le turn-over membranaire de MTX n'est pas perturbé par cet agent.

En conclusion, une efficacité d'atténuation plus importante de la fluorescence de 4Di-10ASP pendant la phase 1 a été attribuée à une incorporation massive de MTX dans le feuillet externe de la membrane plasmique. En effet, une perturbation de la perméabilité membranaire par un fluidifiant augmente significativement l'intégration de MTX dans le feuillet externe de la membrane uniquement. Ces résultats suggèrent des modifications fondamentales au sein de la matrice membranaire entre les cellules sensibles et résistantes. Chez les cellules sensibles, l'affinité plus importante de MTX pour la bicouche phospholipidique pourrait indirectement rendre compte d'une structure différente de la membrane entre les deux types cellulaires.

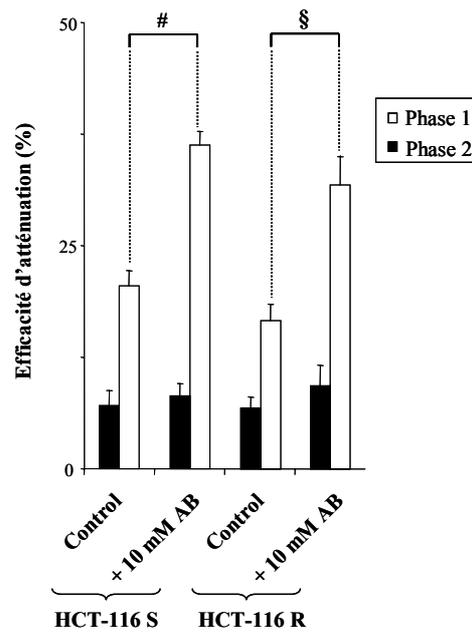


Figure 61. Effet de AB sur l'efficacité d'atténuation de 4Di-10ASP des phases 1 et 2 chez HCT-116. Conditions expérimentales : 3 millions de cellules HCT-116 R et S sont pré-incubées avec 10 mM AB pendant 10 min puis incubés avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant 30 min à 37°C ;  $\lambda_{Exc} = 470$  nm ; les variations de l'émission de fluorescence de la sonde sont continuellement enregistrées à 550 nm ; 10  $\mu$ M MTX (50  $\mu$ L) sont ajoutés.  
# §  $p < 0,01$ .

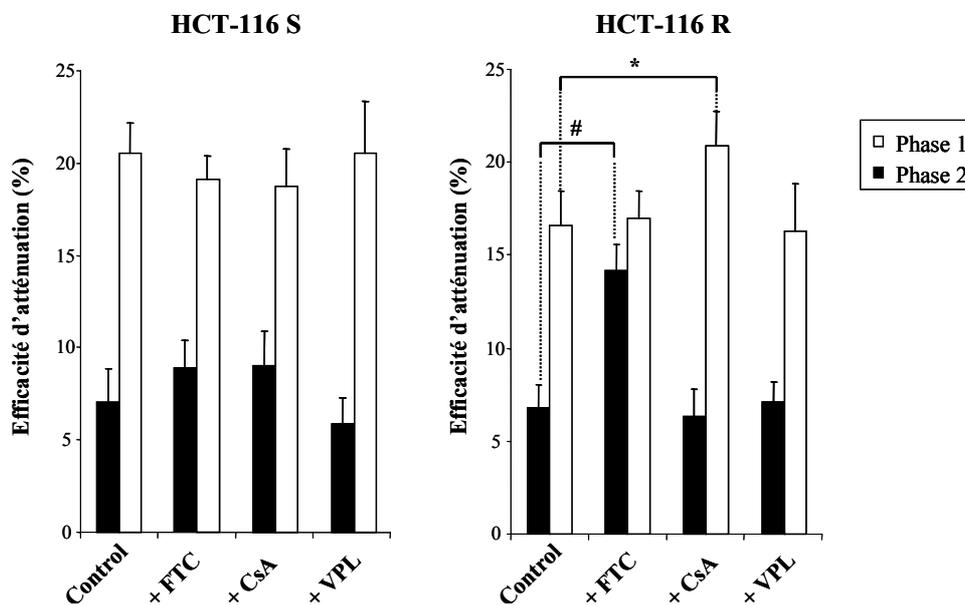


Figure 62. Effet de la fumitrémorgine C (FTC), du verapamil (VPL) et de la cyclosporine A (CsA) sur les efficacités d'atténuation de 4Di-10ASP des phases 1 et 2 chez HCT-116. Conditions expérimentales : [FTC] = 5  $\mu$ M pendant 2 h, et [VPL] = 3  $\mu$ M ou [CsA] = 3  $\mu$ M pendant 1 h à 37°C et les cellules sont incubées avec 4  $\mu$ M 4Di-10ASP pendant les 30 dernières minutes à 37°C ;  $\lambda_{Exc} = 470$  nm ; les variations de l'émission de fluorescence de la sonde sont continuellement enregistrées à 550 nm ; 10  $\mu$ M MTX (50  $\mu$ L) sont ajoutés.  
\*, #  $p < 0,01$ .

### **2.3.2. Application du FRET à l'étude d'inhibiteurs de l'activité à efflux**

Le mode d'action de certains inhibiteurs de protéines à efflux comme la fumitrimorgine C reste relativement mal décrit. Une des hypothèses avancée est que de tels agents pourraient perturber l'homéostasie de la membrane plasmique ce qui favoriserait l'incorporation des composés anticancéreux. Le FRET pourrait apporter des informations complémentaires concernant les effets de tels agents sur l'interaction de MTX avec la membrane plasmique des cellules résistantes.

Cette étude porte sur les inhibiteurs fumitrimorgine C (FTC), verapamil (VPL), et cyclosporine A (CsA). Les effets de ces différents agents sur le transfert de MTX au travers de la membrane plasmique ont été comparés. A partir de protocoles déjà établis (Qadir *et al.*, 2005 ; Rabindran *et al.*, 2000 ; Schuldes *et al.*, 2001), les cellules HCT-116 S et R sont incubées avec 5  $\mu$ M FTC (2 h), ou 3  $\mu$ M VPL (1 h) ou 3  $\mu$ M CsA (1 h). 4  $\mu$ M 4Di-10ASP sont ajoutés pendant la dernière demi-heure d'incubation. Après deux lavages, 10  $\mu$ M MTX sont ajoutés aux cellules en suspension et l'émission de fluorescence de la sonde est enregistrée à 37°C de façon concomitante.

Après un traitement par FTC, les cellules HCT-116 R présentent une efficacité totale d'atténuation de  $31,1 \pm 1,2$  % (figure 62). Une efficacité d'atténuation plus importante pendant la phase 2 contribue à cette augmentation ( $\Delta IF_R/IF_0 = 14,1 \pm 1,5$  %). De plus, les cellules HCT-116 S traitées par FTC ne présentent aucune modification significative des efficacités d'atténuation des phases 1 ou 2. Ces résultats suggèrent un basculement plus important de MTX dans le feuillet interne des cellules résistantes après l'ajout de FTC.

D'autre part, après une incubation avec CsA, une efficacité totale d'atténuation de  $27,1 \pm 1,6$  % est calculée pour les cellules HCT-116 R (figure 62). Contrairement à FTC, une efficacité d'atténuation plus importante de la phase 1 est à l'origine de cette augmentation ( $\Delta IF_R/IF_0 = 20,9 \pm 1,5$  %). Aucune modification du rapport  $\Delta IF_L/IF_0$  n'est observée ce qui suggère que CsA semble augmenter uniquement l'intégration de MTX avec le feuillet externe des HCT-116 R.

Concernant les résultats obtenus avec un traitement par VPL, aucune modification de l'efficacité pendant les phases 1 et 2 n'a été observée pour les deux souches cellulaires dans ces conditions expérimentales (figure 62).

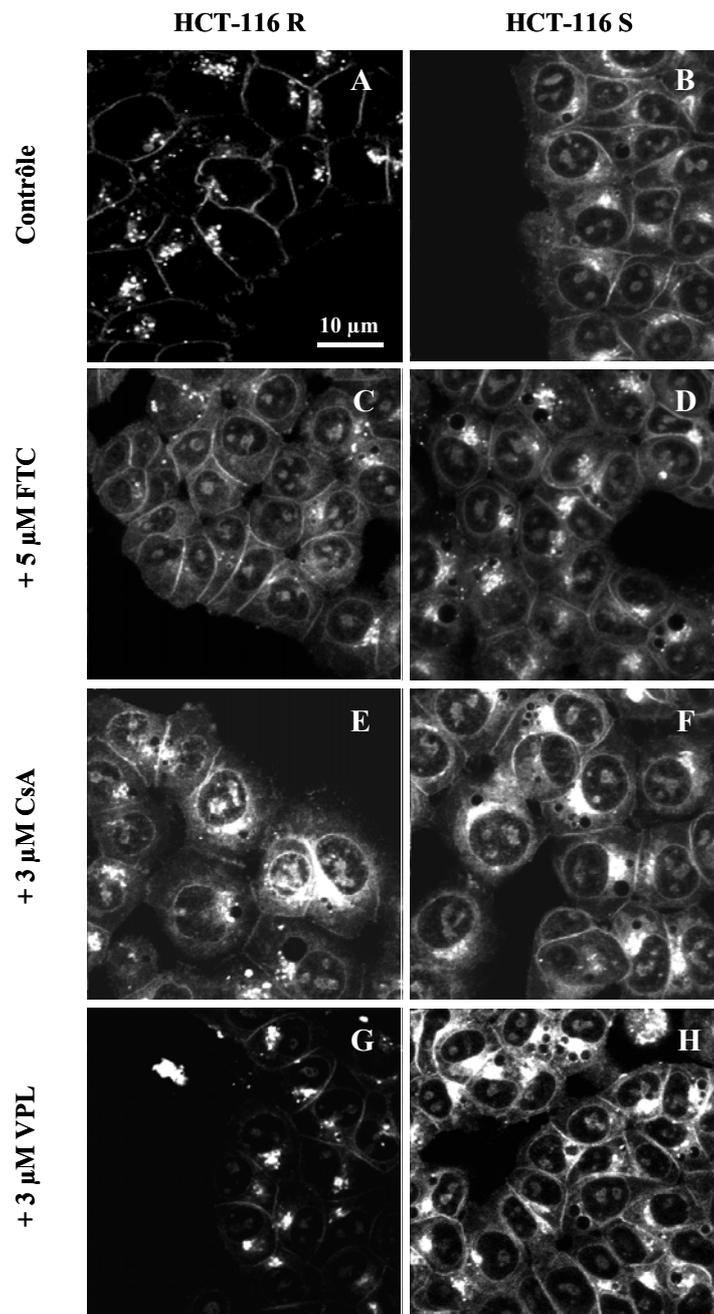


Figure 63. Microscopie confocale de MTX chez les cellules HCT-116 R (A, C, E, G) et S (B, D, F, H) traitées par FTC (C, D), CsA (E, F) ou VPL (G, H).

Conditions expérimentales : Les deux souches cellulaires sont traitées par 5 µM FTC (2 h) ou par 3 µM CsA (1 h) ou par 3 µM VPL (1 h) à 37°C, et 5 µM MTX sont ajoutés pendant les 60 dernières minutes ;  $\lambda_{Exc} = 568 \text{ nm}$ .

De plus, l'effet des modulateurs FTC, CsA et VPL sur le temps de décroissance de la fluorescence de la sonde a été déterminé pour les phases rapides et lentes de l'atténuation de fluorescence de la sonde. Les temps de décroissance de fluorescence de la sonde sont équivalents chez les cellules sensibles et résistantes en comparaison de leurs contrôles non traités au cours des phases rapides et lentes de l'atténuation (données non montrées). Ces résultats suggèrent que de tels agents ne modifient pas la vitesse de basculement de MTX du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane.

D'après ces résultats, les agents FTC et CsA augmentent l'incorporation de MTX dans la membrane plasmique. Cependant, les effets de CsA sont différents de ceux de FTC. Après un traitement par CsA des cellules résistantes, l'intégration de MTX dans le feuillet externe augmente. En revanche, il apparaît que FTC accroît l'amplitude de basculement du composé anticancéreux vers le feuillet interne de la membrane plasmique.

Une augmentation de la perméabilité membranaire par de tels agents pourrait avoir comme conséquence une augmentation de l'accumulation intracellulaire de MTX. La microscopie confocale a permis de localiser l'émission de fluorescence de MTX chez HCT-116 R et S après un traitement par les inhibiteurs FTC, VPL ou CsA (figure 63). Les deux souches cellulaires sont traitées par 5  $\mu$ M FTC (2 h) ou par 3  $\mu$ M VPL (1 h) ou 3  $\mu$ M CsA (1 h). 5  $\mu$ M MTX sont ajoutés pendant les 60 dernières minutes à 37°C puis observées. Pour les cellules HCT-116 R traitées par FTC et CsA, une importante augmentation de l'émission de MTX est remarquée au niveau du cytoplasme et du noyau par rapport au contrôle (figure 63 A, C, E). Par contre, peu ou pas de modifications de la localisation ou de l'intensité de l'émission de fluorescence sont observées chez HCT-116 S traitées par ces mêmes agents (figure 63 B, D, F). D'autre part, un traitement par VPL des cellules sensibles et résistantes ne semble pas modifier la localisation de l'émission de fluorescence de MTX dans ces conditions expérimentales (figure 63 G et H). Ces résultats révèlent que FTC et CsA augmentent l'accumulation intracellulaire de MTX.

## **2.4. Conclusion**

Il est décrit que des molécules telles que les agents AB ou  $\text{CHCl}_3$  augmentent significativement la fluidité de la membrane (Regev *et al.*, 1999). Dans notre étude, après une incubation avec ces agents, une diminution importante de la diffusion SERS de MTX est

observée chez HCT-116 R. Ces observations suggèrent que la diminution SERS de MTX chez HCT-116 R pourrait être attribuée à une intégration plus profonde dans la bicouche phospholipidique. Le FRET a pu mettre en évidence que l'ajout de AB augmente clairement l'incorporation de MTX dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Par conséquent, une augmentation de la perméabilité membranaire par ces agents serait à l'origine de l'accumulation plus importante de MTX vers le cytoplasme.

Une perturbation de l'homéostasie de la membrane plasmique ne semble pas être réservée aux agents fluidifiants. En effet, le FRET a pu mettre en évidence que les inhibiteurs FTC et CsA augmentent l'incorporation de MTX dans la membrane plasmique. Après un traitement par CsA des cellules HCT-116 R, l'incorporation de MTX dans le feuillet externe augmente tandis que FTC pourrait accroître l'amplitude de basculement du MTX vers le feuillet interne de la membrane plasmique.

# ***DISCUSSION***

---

## 1. Origine membranaire de la diffusion SERS

### Sensibilité de la spectroscopie SERS

La spectroscopie SERS est une méthode qui combine la sensibilité de la fluorescence et la spécificité moléculaire de la spectroscopie Raman. Il a été récemment suggéré avec une forte probabilité que le facteur d'exaltation pourrait atteindre  $10^{11}$  à  $10^{14}$  sur les points de contact de certains composés analysés avec la surface métallique (Kneipp *et al.*, 1999 ; Kneipp *et al.*, 1996). Alors, ceci permettrait au signal Raman d'une molécule unique d'atteindre une intensité comparable à celle de sa fluorescence. D'après nos résultats, l'étude de MTX en solution a révélé une importante sensibilité de détection jusqu'à  $10^{-10}$  M. Il a été également observé que les principales bandes du spectres SERS de MTX correspondent essentiellement aux vibrations inter-atomiques du chromophore. La spectroscopie SERS rend donc accessible une analyse chimique de MTX à l'échelle moléculaire. Comme il a été décrit, les spectres SERS de MTX montrent à différentes longueurs d'onde d'excitation des profils similaires (McLaughlin *et al.*, 2002 ; Nabiev *et al.*, 1995). Cependant, des modifications du rapport d'intensité de certaines bandes sont observées et sont assimilées à des conditions de résonance différentes selon la longueur d'onde d'excitation.

### Rôle de l'accessibilité moléculaire

La spectroscopie SERS rend compte d'une accessibilité de la molécule analysée par la surface métallique. A partir de cette propriété, de nombreuses études présentent la spectroscopie SERS comme une méthode d'analyse très informative concernant les interactions de ligands avec leurs cibles (Breuzard *et al.*, 2003 ; Graham *et al.*, 2002 ; Kneipp *et al.*, 2002 ; Murza *et al.*, 2000 ; Nabiev *et al.*, 1995). En 1987, Abdulaev *et al.* ont pu déterminer par cette méthode l'organisation structurale de la rhodopsine, molécule photo-réactive, au contact de la membrane plasmique de cellules rétinienne (Abdulaev *et al.*, 1987).

Une analyse membranaire de MTX a été réalisée par la micro-spectroscopie SERS en focalisant le faisceau laser sur un grain de colloïde en contact avec la membrane plasmique de cellules traitées. Comparé au spectre de MTX en solution, des modifications significatives de certaines bandes ont permis de caractériser une signature spectrale spécifique de MTX au niveau de la membrane. De plus, l'ajout d'ADN double brin dans le milieu extracellulaire a montré une extinction totale de l'intensité SERS de MTX chez les cellules traitées. Il a été démontré par différentes techniques spectroscopiques et biochimiques que la forte affinité de MTX pour l'ADN conduit à une intercalation de la molécule anti-néoplasique dans la double

hélice (Fox *et al.*, 1986 ; Lown *et al.*, 1985 ; Lown *et al.*, 1984). La formation d'un complexe MTX/ADN double brin a pour conséquence une diminution de l'accessibilité du xénobiotique par le colloïde. Cette diminution d'accessibilité se traduit par une extinction totale de la diffusion SERS de la molécule (Nabiev *et al.*, 1995 ; Breuzard *et al.*, 2003). La totale extinction SERS du signal de MTX révèle un déplacement de MTX du microenvironnement membranaire vers la double hélice extracellulaire.

La spectroscopie SERS permet une analyse de MTX sur la membrane puisque l'amplification Raman de la molécule n'est possible qu'au contact d'une surface métallique rugueuse. Cette méthode rend compte d'une accessibilité de la molécule au niveau du microenvironnement membranaire. Ces observations confirment alors une origine exclusivement membranaire du signal SERS de MTX chez les cellules. La spectroscopie SERS apparaît comme une technique optique non destructive particulièrement bien adaptée pour l'étude de interactions de médicaments avec la membrane plasmique. Il serait intéressant de compléter cette étude par spectroscopie SERS avec des films actifs (Félidj *et al.*, 2002 ; Félidj *et al.*, 2003). En effet, l'équipe de Félidj a réussi à mettre au point des réseaux organisés de particules d'or dont elle contrôle la résonance localisée du plasmon. Ces réseaux ont montré un effet SERS très prometteur, avec un gain par molécule analysée de l'ordre de  $10^5$ . Ce gain semble être entre autre dépendant de la surface de contact entre la molécule analysée et le réseau de particule, et de la bande Raman considérée. L'utilisation de tels surfaces métalliques permettrait d'une part de limiter la variabilité des intensité SERS de MTX provenant du colloïde même. D'autre part, une cartographie de la distribution de MTX à la surface de la membrane pourrait être réalisé.

## **2. Une intégration partielle de la mitoxantrone dans la membrane**

Les interactions d'un composé anticancéreux comme la doxorubicine (DOX) ou MTX avec la membrane plasmique ont été considérablement étudiées, entre autre par des techniques spectroscopiques (Eytan *et al.*, 1997 ; Gallois *et al.*, 1998 ; Heywang *et al.*, 1998 ; Marczak *et al.*, 2003 ; Regev *et al.*, 2005). Mieux comprendre ces interactions paraît fondamental pour discerner les mécanismes de diffusion des médicaments.

Dans notre étude, une comparaison des spectres SERS de cellules HCT-116 R et S traitées par MTX a montré une intensité SERS de la molécule anticancéreuse trois plus

importante chez les cellules résistantes. Aucune modification des profils spectraux n'a été remarquée. De plus, la différence d'intensité SERS de MTX entre les cellules résistantes et sensibles apparaît après de brèves incubations et pour des concentrations très faibles en médicaments, et ce même à faible température. D'autre part, une étude de la stabilité de l'adsorption de MTX sur la membrane a mis en évidence chez les cellules HCT-116 R une rapide diminution de la diffusion SERS, suivie d'une diminution plus lente et équivalente aux cellules sensibles (figure 39). La diminution du signal SERS est interprétée comme une libération de MTX de la membrane vers le milieu extracellulaire, et suggère des différences d'affinité de MTX avec la membrane plasmique chez cette lignée. Cette différence de diffusion SERS entre les deux lignées suscite alors deux hypothèses.

### **Adsorption membranaire plus importante de la mitoxantrone ?**

L'intensité SERS de MTX membranaire trois fois supérieure chez les cellules HCT-116 R suggère en premier lieu un nombre plus important de molécule de MTX sur la membrane des cellules résistantes en comparaison des cellules HCT-116 S. De plus, chez les cellules résistantes, une libération du médicament selon deux phases suggère deux sites d'adsorption de MTX, à savoir (i) un site relativement instable à l'origine de la libération rapide du médicament dans le milieu extracellulaire, et (ii) un site plus stable responsable de la libération prolongée de MTX, et commun aux cellules sensibles.

### **Accessibilité plus importante de la mitoxantrone par le colloïde ?**

Une seconde hypothèse serait que l'intensité SERS de MTX plus importante chez les cellules HCT-116 R pourrait avoir pour origine une accessibilité différente de la molécule par le colloïde extracellulaire. Ainsi, la libération du médicament selon deux phases pourrait mettre en évidence un premier site d'adsorption de MTX sur la membrane très accessible par le colloïde (à l'origine de la diffusion SERS trois fois plus importante), et un second site d'adsorption moins accessible par le colloïde et commun avec les cellules sensibles.

### **Modifications de la structure membranaire**

Un certain nombre de travaux ont montré l'incidence d'une résistance de type MDR sur la morphologie de la membrane plasmique (Arsenault *et al.*, 1988 ; Garcia-Segura *et al.*, 1990 ; Garcia-Segura *et al.*, 1992 ; Wright *et al.*, 1985). L'équipe de Dietel a pu comparer par microscopie électronique et immunocytochimie le phénotype de cellules EPG85-257P (cancer gastrique) sensibles et résistantes à MTX (Dietel *et al.*, 1990). Leurs observations suggèrent

un mécanisme cellulaire complexe à l'origine de la résistance cellulaire à MTX, lequel inclurait la formation de vésicules membranaires en surface, une liaison des molécules de MTX avec ces vésicules et une compartimentation du médicament. Par ailleurs, certains types cellulaires montreraient des structures membranaires particulières, appelées cavéoles, se présentant comme de petites invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètres (Parton, 1996 ; Rothberg *et al.*, 1992 ; Severs, 1988). Les cavéoles sont une variété de microdomaine caractérisée par la présence d'une protéine particulière, la cavéoline (22 kDa), et qui interviennent dans la transcytose et l'endocytose. Plus récemment, il a été mis en évidence que des cellules de type MDR pouvaient présenter d'abondantes structures cavéolaires, tandis que leur lignée sensible respective en était parfaitement dépourvue (Lavie *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1998).

### **Modifications de la composition membranaire**

De nombreux travaux décrivent de profondes modifications au sein de la membrane de cellules cancéreuses (Aouali *et al.*, 2005 ; Burns *et al.*, 1988 ; Callaghan *et al.*, 1993 ; Dolderer *et al.*, 2000 ; Lavie *et al.*, 2000 ; Romsicki *et al.*, 1999 ; Vrignaud *et al.*, 1986). Par exemple, l'équipe de Merchant a pu montrer par la spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) que la membrane de cellules cancéreuses du colon humain présente une diminution des entités phosphatidyléthanolamine (PE) et des sphingomyélines (SM), mais une augmentation des phosphatidylcholine (PC) en comparaison des cellules normales (Merchant *et al.*, 1991). Aujourd'hui, ces changements sont associés en majeure partie à un phénotype MDR. Les lipides peuvent avoir des fonctions variées et complexes dans la résistance multiple comme influencer le transport du médicament au travers de la membrane plasmique ou encore moduler l'activité des protéines à efflux. Par exemple, l'activité de la protéine Pgp est d'autant meilleure que l'environnement lipidique l'entourant comporte les entités PC, PE et phosphatidylsérine (PS) (Doige *et al.*, 1992 ; Doige *et al.*, 1993).

### **Vers une quantification de la mitoxantrone membranaire**

Afin de valider une des deux hypothèses émises précédemment, le FRET a permis de comparer les efficacités de transfert d'énergie de fluorescence d'une sonde membranaire vers MTX. En effet, l'amplitude d'atténuation de fluorescence de la sonde est fonction de la quantité de MTX co-localisé. Dans notre étude, l'addition de MTX à des cellules marquée par le fluorophore 4Di-10ASP au niveau de la membrane plasmique a pour résultat une atténuation partielle de la fluorescence de la sonde en deux étapes. Une phase rapide

d'atténuation de l'ordre de la seconde correspondrait à une intégration massive de MTX dans le feuillet externe de la membrane. Une atténuation supplémentaire et plus lente (environ 90 secondes) suit cette première phase et est attribuée à un basculement de MTX dans le feuillet interne de la membrane.

Une plus faible atténuation de 18 % de 4Di-10ASP dans le feuillet externe pour les cellules HCT-116 R a été déterminée en comparaison des cellules sensibles. Cette différence d'efficacité d'atténuation du donneur est statistiquement significative, et suggère un nombre plus important de molécules de MTX dans le feuillet externe de la membrane sensible. Ces observations ne permettent pas de valider la première hypothèse selon laquelle l'intensité SERS de MTX trois fois supérieure chez les cellules HCT-116 R interprètent une quantité de MTX plus importante au niveau du feuillet externe de la membrane. Pour expliquer ces différences d'intensité SERS entre les deux lignées, les cellules sensibles pourraient présenter un enfouissement de MTX plus important dans la membrane plasmique en comparaison des cellules résistantes. Ceci aurait pour conséquence une perte d'accessibilité de la molécule par le colloïde.

L'équipe de Regev ont étudié l'incorporation de MTX et d'autres anthracyclines dans des membranes synthétiques enrichies en 1, 2 – dioléoyl – *sn* – glycéro – 3 - phosphatidylcholine, 1, 2 – dioléoyl – *sn* – glycéro – 3 – phosphoglycérol et cholestérol (DOPC : DOPG : cholesterol) (Regev *et al.*, 2005). Ils ont estimé que le temps du basculement de DOX et MTX dans la lumière du liposome est respectivement de 0,1 et 6 min. Le coefficient de partage de ces composés entre la membrane et le milieu aqueux serait de 8600 pour DOX mais de 230000 pour MTX. Ces résultats suggèrent une très grande affinité de MTX pour la membrane mais aussi une très faible diffusion trans-membranaire de ce composé.

### **3. Effet de la modulation de la fluidité membranaire**

#### **Fluidité membranaire et intégration membranaire de la mitoxantrone**

Dans notre étude, nous avons vu qu'une pré-incubation des cellules avec les fluidifiants alcool benzylique (AB) et chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) a pour résultat une importante diminution de l'intensité SERS de MTX, uniquement chez les cellules résistantes. Après l'ajout de ces agents, une augmentation de la fluidité membranaire pourrait avoir pour conséquence une perte d'accessibilité par le colloïde de MTX adsorbée sur le site propre aux cellules résistantes. De plus, une intensité SERS de MTX équivalente subsiste chez les deux

souches cellulaires. Seul le site d'adsorption de MTX commun aux deux lignées resterait accessible par le colloïde.

D'après nos observations par FRET, l'ajout de AB augmente significativement l'efficacité d'atténuation de la sonde par MTX dans le feuillet externe de la membrane, ce qui peut être interprété comme une augmentation de l'intégration de MTX dans ce feuillet. Une augmentation de la fluidité semble améliorer la perméabilité de la membrane. Seule l'intégration partielle de MTX chez les cellules résistantes est perturbée par AB et  $\text{CHCl}_3$ . Il est donc probable que ces agents déstabilisent des structures membranaires particulières, et permettrait un enfouissement plus important de MTX dans le feuillet externe. L'intégration partielle de MTX chez les cellules résistantes pourrait alors avoir pour origine un plus faible turn-over du médicament au niveau d'ultrastructures membranaires.

Une des hypothèses qui peut être évoquée serait un turn-over plus rapide de MTX chez les cellules résistantes traitées par ces agents. Regev *et al.* ont décrit les effets modulateurs de différents fluidifiants, comme AB et  $\text{CHCl}_3$ , sur l'accumulation intracellulaire de DOX (Regev *et al.*, 1999). Leurs travaux montrent que le basculement intracellulaire du médicament augmente significativement en présence de tels agents.

### **Fluidité membranaire et accumulation de MTX**

La plupart des composés cytotoxiques ont une cible intracellulaire. Par conséquent, la diminution de leur accumulation pourrait être la conséquence d'une plus lente diffusion au travers d'une membrane « moins fluide » (Hendrich *et al.*, 2003). Dans notre étude, une diminution de la fluidité de la membrane à 4°C a pour conséquence une importante réduction de l'accumulation intracellulaire de MTX. De plus, un traitement des cellules avec les agents AB ou  $\text{CHCl}_3$  améliore efficacement l'accumulation de MTX, et il a été observé que l'effet de ces fluidifiants persiste à 4°C chez les deux lignées. Une étude par la microspectrofluorimétrie a pu mettre en évidence qu'un traitement par AB des cellules sensibles et résistantes augmente significativement l'accumulation de MTX au niveau de la bicouche phospholipidique et du microenvironnement sous-membranaire. Ces observations suggèrent que l'accumulation intracellulaire de MTX pourrait être directement affectée par les propriétés biophysiques de la membrane plasmique. L'implication des lipides dans la résistance aux médicaments semble reposer sur des modifications des propriétés de diffusion de la membrane.

**Tableau 7. Effet de la modulation de la fluidité membranaire par AB sur la localisation de MTX chez les cellules HCT-116 R et S.**

	Intensité SERS Intégration partielle <sup>(§)</sup>	Atténuation FRET Intégration totale <sup>(§)</sup>	Accumulation Intracellulaire <sup>(#)</sup>
HCT-116 R	+++	+	+
HCT-116 R + AB	+	+++	+++
HCT-116 S	+	+	++
HCT-116 S + AB	+	+++	+++

Le nombre de (+) correspond à : (§) l'intensité SERS de MTX, (§) l'efficacité d'atténuation de la fluorescence de la sonde par MTX, (#) l'intensité de fluorescence de MTX.

Il a été très souvent décrit que le développement de la résistance cellulaire aux composés anticancéreux s'accompagne d'une altération de la composition lipidique et/ou des propriétés de la membrane (Jedrzejszak *et al.*, 1999 ; Lavie *et al.*, 2000 ; Veldman *et al.*, 2004). La bicouche phospholipidique de la membrane plasmique ne compte pas moins d'une douzaine d'espèces lipidiques différentes dont des sphingolipides qui s'organisent spontanément avec le cholestérol en microdomaine, comme par exemple les rafts lipidiques (Simons *et al.*, 2002 ; Sprong *et al.*, 2001). Le feuillet externe de la membrane plasmique peut être alors considéré comme une mosaïque de microdomaines indépendants (Gruenberg, 2001), impliquant des différences localisées de la lipophilicité et de la fluidité membranaire. Par la présence de cholestérol, ces microdomaines se caractérisent entre autre par une rigidité relative en comparaison de la membrane environnante (London *et al.*, 2000). De plus, les rafts lipidiques ont la particularité de pouvoir séquestrer des protéines, comme la Pgp, qui présentent une affinité pour ces structures lipidiques (Lavie *et al.*, 1998 ; Liscovitch *et al.*, 2000 ; Troost *et al.*, 2004).

Il est probable que la propriété qu'ont ces microdomaines à retenir la Pgp ne soit pas exclusive à cette protéine. Veldman *et al.* ont pu montrer qu'un enrichissement de la membrane plasmique de cellules BAEC (*bovine aortic endothelial cell*) sur-exprimant MRP1 par des sphingomyélines (SM) comportant des chaînes acyles plus courtes (*N*-hexanoyl-SM) augmentait l'accumulation intracellulaire de DOX et potentialisait *in vitro* la cytotoxicité du médicament (Veldman *et al.*, 2004). Il est vraisemblable que l'ajout de *N*-hexanoyl-SM induise la formation de rafts lipidiques « plus fluide » sur le feuillet externe de la membrane permettant une meilleure diffusion du médicament anticancéreux, et/ou une inhibition de la protéine à efflux.

Nos observations suggèrent des modifications fondamentales de la structure membranaire entre les cellules sensibles et résistantes. La nature des phospholipides semble jouer un rôle important dans l'intégration et la diffusion trans-membranaire de MTX (Ferrer-

Montiel *et al.*, 1992 ; Frezard *et al.*, 1991 ; Lecompte *et al.*, 2002 ; Przybylska *et al.*, 2003). Burns *et al.* ont pu montrer qu'un enrichissement de la membrane des cellules L1210 avec l'acide docosahexaénoïque (22 : 6) augmentait significativement l'interaction de MTX avec la membrane (Burns *et al.*, 1988). Par ailleurs, MTX pourrait perturber la fluidité de la membrane et finalement perturber sa propre diffusion trans-membranaire (Jedrzejczak *et al.*, 1999 ; Marczak *et al.*, 2003 ; Regev *et al.*, 2005). La quantité de médicament qui traverse la membrane plasmique semble être dépendante à la fois de l'état d'intégration de MTX dans la membrane et du turn-over de la molécule vers le cytoplasme. Une affinité particulière de MTX avec un ou plusieurs composants de la membrane reste donc hypothétique.

### **Fluidité membranaire et activité des protéines de transport**

Le rôle de la fluidité membranaire est certainement plus complexe, et les effets d'une modification de la fluidité membranaire sur l'incorporation du médicament dans les cellules résistantes restent très controversés (Burns *et al.*, 1988 ; Callaghan *et al.*, 1993 ; Jedrzejczak *et al.*, 1999 ; Regev *et al.*, 1997). L'effet d'une fluidification de la membrane par des agents AB ou  $\text{CHCl}_3$  sur l'efflux de la molécule par la protéine BCRP a été déterminé. Il en résulte que ces agents provoquent une inhibition de l'efflux de MTX chez les cellules HCT-116 R traitées. L'hypothèse la plus vraisemblable serait une inhibition de la protéine par une fluidification de son microenvironnement membranaire. Une fluidification de la membrane a montré une inhibition de la protéine Pgp dans des membranes d'hépatocytes de rat (Sinicrope *et al.*, 1992). De plus, Regev *et al.* ont pu mettre en évidence que la fluidification de la membrane de cellules CHO par de tels agents inhibe indirectement l'activité ATP-asiqque de la Pgp selon un mécanisme d'inhibition aspécifique (Regev *et al.*, 1999). Il est alors possible que de tels agents puissent inhiber d'autres protéines à efflux. La compétition entre la diffusion passive et le transport actif du médicament pourrait donc jouer un rôle essentiel dans la résistance multiple et sa modulation (Eytan, 2005 ; Wielinga *et al.*, 2000). Une autre hypothèse peut être évoquée. Une compétition entre AB et MTX sur la protéine BCRP pourrait avoir lieu puisque cet agent possède un cycle aromatique comme la plupart des inhibiteurs des protéines à efflux (Regev *et al.*, 1999).

## 4. Influence d'inhibiteurs MDR sur les propriétés biophysiques de la membrane

### Conséquence sur l'intégration membranaire et l'accumulation de la mitoxantrone

Le développement d'agents pharmacologiques capable d'inhiber l'activité des protéines à efflux est devenu l'un des principaux objectifs depuis 20 ans (Avendano *et al.*, 2002 ; Ford *et al.*, 1990 ; Gottesman, 2002 ; Robert, 1999 ; Sikic *et al.*, 1997 ; Wiese *et al.*, 2001). La fumitremorgine C (FTC) a été identifiée comme un nouvel agent qui inhibe la résistance aux médicaments MTX ou SN38 chez des cellules surexprimant la protéine à efflux BCRP (Garimella *et al.*, 2005 ; Rabindran *et al.*, 2000 ; Sugimoto *et al.*, 2003). Bien que le modulateur FTC semble inhiber cette protéine, des éléments manquent pour conclure à une interaction directe avec la protéine. D'après notre étude, FTC augmente de près de 107 % l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX dans le feuillet interne de la membrane des cellules résistantes. Ces observations suggèrent que l'ajout de FTC pourrait augmenter la perméabilité de la membrane et conduire à une accumulation intracellulaire plus importante de MTX. Les résultats obtenus par la microscopie confocale sur des cellules traitées par FTC ont révélé une augmentation de la rétention de MTX uniquement chez les cellules HCT-116 R.

La cyclosporine A (CsA) est connue pour ses activités modulatrices des protéines à efflux MRP-1 et Pgp, même si ses mécanismes d'action restent controversés (Aouali *et al.*, 2005 ; Dolderer *et al.*, 2000 ; Marian *et al.*, 2005 ; Marian *et al.*, 2005 ; Niebylski *et al.*, 1991). D'après nos résultats, CsA augmente l'intégration de MTX dans le feuillet externe des cellules HCT-116 R. Nos observations pourraient aller dans le sens de Lambros *et al.* qui ont pu montrer par diffraction aux rayons X et par la calorimétrie que CsA perturbe la mobilité des chaînes acyles des phospholipides dimyristoyl-PC (DMPC) dans des membranes reconstituées (Lambros *et al.*, 2004). De plus, la microscopie confocale a permis de caractériser une augmentation de l'accumulation intracellulaire de MTX chez des cellules résistantes traitées par CsA. L'équipe de Qadir a pu mettre en évidence que CsA augmente la cytotoxicité de MTX selon un facteur 3 chez des cellules sur-exprimant la protéine BCRP (Qadir *et al.*, 2005). CsA semble donc un inhibiteur aspécifique.

**Conséquence sur l'activité des protéines de transport**

Les modulateurs FTC et CsA présentent des structures chimiques très différentes. Une des hypothèses évoquées serait une compétition de ces modulateurs avec MTX sur la protéine BCRP. En effet, l'équipe de Pascaud a pu caractériser deux sites de liaison sur la protéine, le premier attribué pour CsA et le second pour le médicament vinblastine (Pascaud *et al.*, 1998). Cependant, ces deux agents semblent avoir en commun une lipophilicité leur permettant de traverser facilement la bicouche lipidique. Un autre mécanisme d'inhibition pourrait également intervenir, à savoir une modification des propriétés biophysiques de la membrane (Hendrich *et al.*, 2003 ; Robert *et al.*, 2003).

La diffusion passive du médicament au travers de la membrane chez les cellules de phénotype MDR est directement en compétition avec le transport actif dirigé par les protéines à efflux. Il a été suggéré que la protéine Pgp, localisée dans la membrane plasmique, prend en charge le composé anticancéreux du feuillet interne de la membrane et le transporte soit vers le feuillet externe soit vers le milieu extracellulaire (Ambudkar *et al.*, 1999 ; Higgins *et al.*, 1992). Les résultats de Shapiro *et al.* semblent confirmer ce modèle à partir de Pgp intégrées dans des liposomes (Shapiro *et al.*, 1997 ; Shapiro *et al.*, 1998). De ce fait, la protéine Pgp pourrait être assimilée à une « flippase » effluant les phospholipides de la bile par un basculement au travers de la membrane plasmique (Schinkel, 1999). Il est alors possible que la protéine BCRP puisse avoir le même mécanisme d'efflux que la Pgp. L'ajout de modulateurs comme FTC ou CsA perturberait l'homéostasie de la membrane ce qui aurait indirectement pour conséquence d'inhiber les fonctions de la protéine BCRP.

# ***CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

---

La spectroscopie SERS a permis de mettre en évidence une intensité SERS de MTX trois fois plus importante chez les cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles. Parmi les hypothèses, il avait été proposé une meilleure accessibilité de MTX par le colloïde chez les cellules HCT-116 R par rapport aux cellules sensibles. Par transfert d'énergie de fluorescence, la comparaison des efficacités d'atténuation de la sonde membranaire par MTX a permis de mettre en évidence une quantité équivalente de molécules de MTX intégrées dans la membrane entre les deux types cellulaires. Des accessibilités différentes de MTX par le colloïde semble être l'hypothèse interprétant le mieux les différences d'intensité SERS de MTX entre les deux lignées.

Il serait intéressant de compléter cette étude par une approche SERS avec des films actifs afin de réaliser une cartographie de la répartition de MTX sur la surface membranaire. De plus, l'utilisation de tels surfaces métalliques permettrait de diminuer la variabilité des intensités SERS de MTX, ayant pour origine le calibre et la forme des grains de colloïde. Il serait également intéressant d'étendre ces analyses membranaires à d'autres molécules antitumorales par spectroscopie SERS et par transfert d'énergie de fluorescence afin de comparer les mécanismes de diffusion de ces différentes molécules avec ceux de MTX. De plus, la spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS) pourrait offrir la possibilité d'analyser en temps réel les interactions moléculaires de MTX et sa mobilité au sein de la membrane. Cette méthode utilise un montage de microscopie confocale collectant la luminescence de fluorophores se déplaçant dans un volume d'analyse très faible ( $\pm 1 \mu\text{m}^3$ ). L'analyse de ces fluctuations de l'intensité de fluorescence de MTX permettra d'extraire des informations sur la vitesse de diffusion, la concentration et d'éventuelles associations moléculaires.

Une affinité moins importante de MTX pour la membrane des cellules résistantes pourrait être à l'origine des différences d'intégration et d'accumulation de MTX entre les deux types cellulaires. La bicouche lipidique de la membrane cellulaire joue un rôle important dans les phénomènes de résistance aux médicaments anticancéreux. Des modifications de la nature et/ou de la structure de la membrane peuvent influencer les propriétés de transport de la membrane et l'activité des protéines ABC.

Dans cette étude, il a été montré que l'ajout de fluidifiants avait pour conséquence une diminution importante de la diffusion SERS de MTX uniquement chez les cellules HCT-116 R. Le transfert d'énergie a pu mettre en évidence qu'un traitement des cellules avec de tels agents augmente clairement l'incorporation de MTX dans le feuillet externe de la membrane

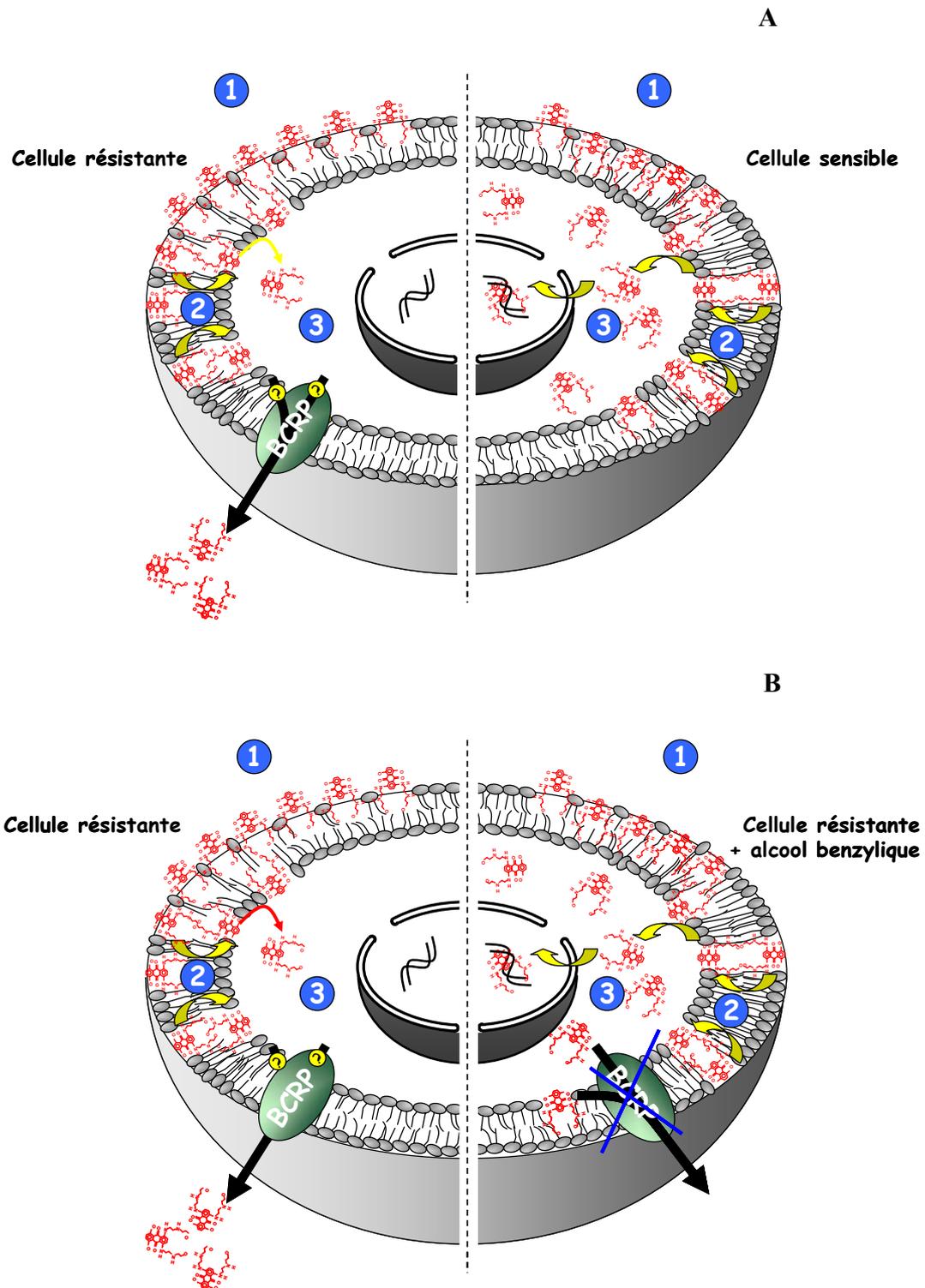


Figure 64. Modèles d'intégration et de diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique. (A) comparaison des modèles cellulaires résistants de type BCRP/MXR et sensibles ; (B) comparaison des modèles cellulaires résistants traités ou non par le fluidifiant alcool benzylique. (① intégration partielle de MTX dans le feuillet externe de la membrane ; ② flux trans-membranaire de MTX ; ③ concentration intracellulaire de MTX)

plasmique des deux types cellulaires. Une augmentation de la fluidité membranaire a pour conséquence directe une intégration plus importante de MTX dans la bicouche phospholipidique, ce qui pourrait être à l'origine de l'accumulation plus importante de MTX vers le cytoplasme, mais également de l'inhibition de l'efflux médié par BCRP. La figure 64 propose d'une part un modèle d'intégration et de diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique, et d'autre part l'effet de fluidifiant sur cette intégration membranaire.

La polarisation de fluorescence permettrait de déterminer également des paramètres importants concernant les effets de molécules anticancéreuses sur la dynamique des chaînes acyles. Basée sur l'analyse de déplacement de plus faibles amplitudes d'entités fluorescentes, cette méthode permettrait d'apporter des éléments complémentaires à la FCS concernant les interactions entre les molécules anti-néoplasiques intégrées et les lipides membranaires.

En conclusion, la spectroscopie SERS et le transfert d'énergie de fluorescence sont deux méthodes permettant une analyse de la molécule anticancéreuse avec une sélectivité spatiale restreinte à la membrane plasmique. Des applications biologiques innovantes ont été développées afin d'aborder l'étude de l'intégration du médicament dans le compartiment membranaire. La connaissance du comportement des médicaments et de leur transport transmembranaires reste un enjeu essentiel pour comprendre la pharmacodynamique à l'échelle de la cellule vivante.

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

---

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---

ABDULAEV NG, NABIEV IR, EFREMOV RG, CHUMANOV GD.

Retinal Schiff base position relative to the surfaces of photoreceptor disk.

FEBS Lett 1987; 213 (1): 113-118.

ALBRECHT MG, CREIGHTON JA.

Anormally intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode.

J Am Chem Soc 1977; 99: 5215-5219.

ALLEN JD, SCHINKEL AH.

Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).

Mol Cancer Ther 2002; 1 (6): 427-434.

ALLIKMETS R, SCHRIML LM, HUTCHINSON A, ROMANO-SPICA V, DEAN M.

A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance.

Cancer Res 1998; 58 (23): 5337-5339.

ALTAN N, CHEN Y, SCHINDLER M, SIMON SM.

Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy.

J Exp Med 1998; 187 (10): 1583-1598.

AMBUDKAR SV, DEY S, HRYCYNA CA, RAMACHANDRA M, PASTAN I, GOTTESMAN MM.

Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 361-398.

AOUALI N, EDDABRA L, MACADRE J, MORJANI H.

Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance.

Crit Rev Oncol Hematol 2005; 56 (1): 61-70.

ARMITAGE JO, TOBINAI K, HOELZER D, RUMMEL MJ.

Treatment of indolent non-Hodgkin's lymphoma with cladribine as single-agent therapy and in combination with mitoxantrone.

Int J Hematol 2004; 79 (4): 311-321.

ARSENAULT AL, LING V, KARTNER N.

Altered plasma membrane ultrastructure in multidrug-resistant cells.

Biochim Biophys Acta 1988; 938 (2): 315-321.

AVENDANO C, MENENDEZ JC.

Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR).

Curr Med Chem 2002; 9 (2): 159-193.

AWAD AB, FINK CS, HORVATH PJ.

Alteration of membrane fatty acid composition and inositol phosphate metabolism in HT-29 human colon cancer cells.

Nutr Cancer 1993; 19 (2): 181-190.

AWAD AB, NTANIOS FY, FINK CS, HORVATH PJ.

Effect of membrane lipid alteration on the growth, phospholipase C activity and G protein of HT-29 tumor cells.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1996; 55 (5): 293-302.

BACHMEIER CJ, TRICKLER WJ, MILLER DW.

Drug efflux transport properties of 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) and its fluorescent free acid, BCECF.

J Pharm Sci 2004; 93 (4): 932-942.

BANDOROWICZ-PIKULA J.

Lipid-binding proteins as stabilizers of membrane microdomains--possible physiological significance.

Acta Biochim Pol 2000; 47 (3): 553-556.

BASTIAENS P, JOVIN T.

FRET microscopy.

New-York: Celis, JE; 1998, 136-146.

(Cell biology: a laboratory handbook; 3).

BASTIAENS PI, JOVIN TM.

Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I.

Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93 (16): 8407-8412.

BASTIAENS PI, SQUIRE A.

Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell.

Trends Cell Biol 1999; 9 (2): 48-52.

BECK WT, DANKS MK, WOLVERTON JS, CHEN M, GRANZEN B, KIM R *et al.*

Resistance of mammalian tumor cells to inhibitors of DNA topoisomerase II.

Adv Pharmacol 1994; 29B: 145-169.

BOESCH D, GAVERIAUX C, JACHEZ B, POURTIER-MANZANEDO A, BOLLINGER P, LOOR F.

In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833.

Cancer Res 1991; 51 (16): 4226-4233.

BOON JM, SMITH BD.

Facilitated phosphatidylcholine flip-flop across erythrocyte membranes using low molecular weight synthetic translocases.

J Am Chem Soc 2001; 123 (26): 6221-6226.

BOWDEN GT, ROBERTS R, ALBERTS DS, PENG YM, GARCIA D.

Comparative molecular pharmacology in leukemic L1210 cells of the anthracene anticancer drugs mitoxantrone and bisantrene.

Cancer Res 1985; 45 (10): 4915-4920.

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---

BOYSE EA, OLD LJ, CHOUROULINKOV I.

Cytotoxic Test for Demonstration of Mouse Antibody.

Methods Med Res 1964; 10: 39-47.

BREUZARD G, MILLOT JM, RIOU JF, MANFAIT M.

Selective interactions of ethidiums with G-quadruplex DNA revealed by Surface-Enhanced Raman Scattering.

Anal Chem 2003; 75 (16): 4305-4311.

BURNS CP, HAUGSTAD BN, MOSSMAN CJ, NORTH JA, INGRAHAM LM.

Membrane lipid alteration: effect on cellular uptake of mitoxantrone.

Lipids 1988; 23 (5): 393-397.

BUTLER PJ, NORWICH G, WEINBAUM S, CHIEN S.

Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity.

Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280 (4): C962-C969.

BUTLER PJ, TSOU TC, LI JY, USAMI S, CHIEN S.

Rate sensitivity of shear-induced changes in the lateral diffusion of endothelial cell membrane lipids: a role for membrane perturbation in shear-induced MAPK activation.

Faseb J 2002; 16 (2): 216-218.

CAI C, ZHU H, CHEN J.

Overexpression of caveolin-1 increases plasma membrane fluidity and reduces P-glycoprotein function in Hs578T/Dox.

Biochem Biophys Res Commun 2004; 320 (3): 868-874.

CAIRO MS, SIEGEL S, ANAS N, SENDER L.

Clinical trial of continuous infusion verapamil, bolus vinblastine, and continuous infusion VP-16 in drug-resistant pediatric tumors.

Cancer Res 1989; 49 (4): 1063-1066.

CALAIS G.

[Radiation and concomitant chemotherapy after surgery for breast cancer].

Cancer Radiother 2004; 8 (1): 39-47.

CALDERON RO, GROGAN WM, COLLINS JM.

Membrane structural dynamics of plasma membranes of living human prostatic carcinoma cells differing in metastatic potential.

Exp Cell Res 1991; 196 (2): 192-197.

CALLAGHAN R, STAFFORD A, EPAND RM.

Increased accumulation of drugs in a multidrug resistant cell line by alteration of membrane biophysical properties.

Biochim Biophys Acta 1993; 1175 (3): 277-282.

CALLAGHAN R, VAN GORKOM LC, EPAND RM.

A comparison of membrane properties and composition between cell lines selected and transfected for multi-drug resistance.

Br J Cancer 1992; 66 (5): 781-786.

CASTAING M, BROUANT P, LOISEAU A, SANTELLI-ROUVIER C, SANTELLI M, ALIBERT-FRANCO S *et al.*

Membrane permeation by multidrug-resistance-modulators and non-modulators: effects of hydrophobicity and electric charge.

J Pharm Pharmacol 2000; 52 (3): 289-296.

CHALOUPKA R, OBSIL T, PLASEK J, SUREAU F.

The effect of hypericin and hypocrellin-A on lipid membranes and membrane potential of 3T3 fibroblasts.

Biochim Biophys Acta 1999; 1418 (1): 39-47.

CHAPLAIN G, MILAN C, SGRO C, CARLI PM, BONITHON-KOPP C.

Increased risk of acute leukemia after adjuvant chemotherapy for breast cancer: a population-based study.

J Clin Oncol 2000; 18 (15): 2836-2842.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

CHEN YN, MICKLEY LA, SCHWARTZ AM, ACTON EM, HWANG JL, FOJO AT.  
Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein.  
J Biol Chem 1990; 265 (17): 10073-10080.

COLE SP, BHARDWAJ G, GERLACH JH, MACKIE JE, GRANT CE, ALMQUIST KC *et al.*  
Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.  
Science 1992; 258 (5088): 1650-1654.

CREIGHTON, JA.  
Surface-enhanced Raman-scattering.  
New York: RK Chang et TA Furtak; Plenum, 1982: 315.

DAHL GV, LACAYO NJ, BROPHY N, DUNUSSI-JOANNOPOULOS K, WEINSTEIN HJ, CHANG M *et al.*  
Mitoxantrone, etoposide, and cyclosporine therapy in pediatric patients with recurrent or refractory acute myeloid leukemia.  
J Clin Oncol 2000; 18 (9): 1867-1875.

DALTON WS, CROWLEY JJ, SALMON SS, GROGAN TM, LAUFMAN LR, WEISS GR *et al.*  
A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study.  
Cancer 1995; 75 (3): 815-820.

DIAH SK, SMITHERMAN PK, ALDRIDGE J, VOLK EL, SCHNEIDER E, TOWNSEND AJ *et al.*  
Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins.  
Cancer Res 2001; 61 (14): 5461-5467.

DIETEL M, ARPS H, LAGE H, NIENDORF A.

Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257.

Cancer Res 1990; 50 (18): 6100-6106.

DOIGE CA, YU X, SHAROM FJ.

ATPase activity of partially purified P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells.

Biochim Biophys Acta 1992; 1109 (2): 149-160.

DOIGE CA, YU X, SHAROM FJ.

The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein.

Biochim Biophys Acta 1993; 1146 (1): 65-72.

DOLDERER JH, ZIMMER G, WOODCOCK BG, BOCKHORN H, BICKEBOLLER R, SCHULDES H.

Resistance modulation in CHO cells by R-verapamil and bile salts is associated with physical and chemical changes in the cell membrane.

Int J Clin Pharmacol Ther 2000; 38 (4): 196-203.

DOYLE LA, YANG W, ABRUZZO LV, KROGMANN T, GAO Y, RISHI AK *et al.*

A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (26): 15665-15670.

DRORI S, EYTAN GD, ASSARAF YG.

Potential of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability.

Eur J Biochem 1995; 228 (3): 1020-1029.

DUGAN M, CHOY D, NGAI A, SHAM J, CHOI P, SHIU W *et al.*

Multicenter phase II trial of mitoxantrone in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma in Southeast Asia: an Asian-Oceanian Clinical Oncology Association Group study.

J Clin Oncol 1993; 11 (1): 70-76.

DURR FE.

Biologic and biochemical effects of mitoxantrone.

Semin Oncol 1984; 11 (3 Suppl 1): 3-10.

ENDICOTT JA, LING V.

The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.

Annu Rev Biochem 1989; 58: 137-171.

EPAND RM.

Lipid polymorphism and protein-lipid interactions.

Biochim Biophys Acta 1998; 1376 (3): 353-368.

ERUKOVA VY, KRYLOVA OO, ANTONENKO YN, MELIK-NUBAROV NS.

Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin.

Biochim Biophys Acta 2000; 1468 (1-2): 73-86.

EVERS R, DE HAAS M, SPARIDANS R, BEIJNEN J, WIELINGA PR, LANKELMA J *et al.*

Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export.

Br J Cancer 2000; 83 (3): 375-383.

EYTAN GD.

Mechanism of multidrug resistance in relation to passive membrane permeation.

Biomed Pharmacother 2005; 59 (3): 90-97.

EYTAN GD, REGEV R, OREN G, ASSARAF YG.

The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation.

J Biol Chem 1996; 271 (22): 12897-12902.

EYTAN GD, REGEV R, OREN G, HURWITZ CD, ASSARAF YG.

Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate.

Eur J Biochem 1997; 248 (1): 104-112.

FAIRCHILD CR, IVY SP, KAO-SHAN CS, WHANG-PENG J, ROSEN N, ISRAEL MA *et al.*

Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells.

Cancer Res 1987; 47 (19): 5141-5148.

FARBER S.

Chemotherapeutic studies of tumors, including leukemia, in children.

Am J Dis Child 1950; 79 (5): 961-962.

FASTENBERG ME, SHOGOMORI H, XU X, BROWN DA, LONDON E.

Exclusion of a transmembrane-type peptide from ordered-lipid domains (rafts) detected by fluorescence quenching: extension of quenching analysis to account for the effects of domain size and domain boundaries.

Biochemistry 2003; 42 (42): 12376-12390.

FELIDJ N, AUBARD J, LEVI G, KRENN JR, HOHENAU A, SCHIDER G *et al.*

Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays.

App Phys Lett 2003; 82 (18): 3095-3097.

FELIDJ N, AUBARD J, LEVI G, KRENN JR, HOHENAU A, SALERNO M *et al.*

Controlling the optical response of regular arrays of gold particles for surface-enhanced Raman scattering.

Phys Rev B 2002; 65: 075419-1 - 075419-9.

FERRER-MONTIEL AV, GONZALEZ-ROS JM, FERRAGUT JA.

Different distribution of daunomycin in plasma membranes from drug-sensitive and drug-resistant P388 leukemia cells.

Biochim Biophys Acta 1992; 1104 (1): 111-116.

FIELDS KK, ELFENBEIN GJ, PERKINS JB, BALLESTER OF, GOLDSTEIN SC, HEIMENZ JW *et al.*

Defining the role of novel high-dose chemotherapy regimens for the treatment of high-risk breast cancer.

Semin Oncol 1998; 25 (2 Suppl 4): 1-6; discussion 45-48.

FLEISCHMANN M, HENDRA PJ, MCQUILLAN AJ.

Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode.

Chem Phys Lett 1974; 26: 123-166.

FORD JM, HAIT WN.

Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer.

Pharmacol Rev 1990; 42 (3): 155-199.

FÖRSTER T.

Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz.

Ann Phys 1948; 2: 57-75.

FOX KR, WARING MJ, BROWN JR, NEIDLE S.

DNA sequence preferences for the anti-cancer drug mitoxantrone and related anthraquinones revealed by DNase I footprinting.

FEBS Lett 1986; 202 (2): 289-294.

FRASER DJ, BRANDT TL, KROLL DJ.

Topoisomerase II alpha promoter trans-activation early in monocytic differentiation of HL-60 human leukemia cells.

Mol Pharmacol 1995; 47 (4): 696-706.

FREZARD F, GARNIER-SUILLEROT A.

Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells.

Eur J Biochem 1991; 196 (2): 483-491.

GADELLA TW, JR., JOVIN TM.

Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation.

J Cell Biol 1995; 129 (6): 1543-1558.

GADELLA TW, JR., VAN DER KROGT GN, BISSELING T.

GFP-based FRET microscopy in living plant cells.

Trends Plant Sci 1999; 4 (7): 287-291.

GALLOIS L, FIALLO M, GARNIER-SUILLEROT A.

Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles. Circular dichroism study.

Biochim Biophys Acta 1998; 1370 (1): 31-40.

GARCIA-SEGURA LM, FERRAGUT JA, FERRER-MONTIEL AV, ESCRIBA PV, GONZALEZ-ROS JM.

Ultrastructural alterations in plasma membranes from drug-resistant P388 murine leukemia cells.

Biochim Biophys Acta 1990; 1029 (1): 191-195.

GARCIA-SEGURA LM, SOTO F, PLANELLS-CASES R, GONZALEZ-ROS JM, FERRAGUT JA.

Verapamil reverses the ultrastructural alterations in the plasma membrane induced by drug resistance.

FEBS Lett 1992; 314 (3): 404-408.

GARIMELLA TS, ROSS DD, EISEMAN JL, MONDICK JT, JOSEPH E, NAKANISHI T *et al.*

Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) inhibitor fumitremorgin C in SCID mice bearing T8 tumors.

Cancer Chemother Pharmacol 2005; 55 (2): 101-109.

GARRIGUES A, ESCARGUEIL AE, ORLOWSKI S.

The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane.

Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (16): 10347-10352.

GEKELER V, BOER R, ISE W, SANDERS KH, SCHACHTELE C, BECK J.

The specific bisindolylmaleimide PKC-inhibitor GF 109203X efficiently modulates MRP-associated multiple drug resistance.

Biochem Biophys Res Commun 1995; 206 (1): 119-126.

GERMANN UA, FORD PJ, SHLYAKHTER D, MASON VS, HARDING MW.

Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP.

Anticancer Drugs 1997; 8 (2): 141-155.

GOLLAPUDI S, KIM CH, TRAN BN, SANGHA S, GUPTA S.

Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells.

Cancer Chemother Pharmacol 1997; 40 (2): 150-158.

GOTTESMAN MM.

How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture.

Cancer Res 1993; 53 (4): 747-754.

GOTTESMAN MM.

Mechanisms of cancer drug resistance.

Annu Rev Med 2002; 53: 615-627.

GOTTESMAN MM, PASTAN I.

Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.

Annu Rev Biochem 1993; 62: 385-427.

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---

GRAHAM D, MALLINDER BJ, WHITCOMBE D, WATSON ND, SMITH WE.

Simple multiplex genotyping by surface-enhanced resonance Raman scattering.

Anal Chem 2002; 74 (5): 1069-1074.

GREENBERGER LM, LOTHSTEIN L, WILLIAMS SS, HORWITZ SB.

Distinct P-glycoprotein precursors are overproduced in independently isolated drug-resistant cell lines.

Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85 (11): 3762-3766.

GRUENBERG J.

The endocytic pathway: a mosaic of domains.

Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2 (10): 721-730.

HAGEMEISTER F, CABANILLAS F, COLEMAN M, GREGORY SA, ZINZANI PL.

The role of mitoxantrone in the treatment of indolent lymphomas.

Oncologist 2005; 10 (2): 150-159.

HANNUN YA, LUBERTO C.

Ceramide in the eukaryotic stress response.

Trends Cell Biol 2000; 10 (2): 73-80.

HARPUR AG, WOUTERS FS, BASTIAENS PI.

Imaging FRET between spectrally similar GFP molecules in single cells.

Nat Biotechnol 2001; 19 (2): 167-169.

HENDRICH AB, MICHALAK K.

Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells.

Curr Drug Targets 2003; 4 (1): 23-30.

HERMAN B.

Resonance energy transfer microscopy.

Methods Cell Biol 1989; 30: 219-243.

HEYWANG C, SAINT-PIERRE CHAZALET M, MASSON CM, BOLARD J.

Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers: a surface-enhanced resonance Raman scattering study.

Biophys J 1998; 75 (5): 2368-2381.

HIGGINS CF, GOTTESMAN MM.

Is the multidrug transporter a flippase?

Trends Biochem Sci 1992; 17 (1): 18-21.

HOUGHTON PJ, GERMAIN GS, HARWOOD FC, SCHUETZ JD, STEWART CF, BUCHDUNGER E *et al.*

Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro.

Cancer Res 2004; 64 (7): 2333-2337.

HU OY, CHANG SP, LAW CK, JIAN JM, CHEN KY.

Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies with mitoxantrone in the treatment of patients with nasopharyngeal carcinoma.

Cancer 1992; 69 (4): 847-853.

IKONEN E.

Roles of lipid rafts in membrane transport.

Curr Opin Cell Biol 2001; 13 (4): 470-477.

ISHIKAWA T.

The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump.

Trends Biochem Sci 1992; 17 (11): 463-468.

JEAN-MAIRE DJ, VAN DUYNE RP.

Surface Raman electrochemistry. Part I : Heterocyclic, aromatic and aliphatic amine adsorbed on the anodized electrode.

J Electroanal Chem 1977; 84: 1-9.

JEDRZEJCZAK M, KOCEVA-CHYLA A, GWOZDZINSKI K, JOZWIAK Z.

Changes in plasma membrane fluidity of immortal rodent cells induced by anticancer drugs doxorubicin, aclarubicin and mitoxantrone.

Cell Biol Int 1999; 23 (7): 497-506.

JEFFERY DR, HERNDON R.

Review of mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis.

Neurology 2004; 63 (12 Suppl 6): S19-S24.

JONES RN.

Analytical application of vibrational spectroscopy. A historical review.

Eur Spec News 1887; 70: 10-20.

JOVIN T, ARNDT-JOVIN D.

FRET microscopy : digital imaging of fluorescence resonance energy transfer.

New-york: Kohen E & Hirschberg JG; 1989, 99-115.

(Cell structure and function by microspectrofluorometry; 1).

JULIANO RL, LING V.

A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.

Biochim Biophys Acta 1976; 455 (1): 152-162.

KIDO J, ASHIDA Y, SHINKAI K, AKEDO H, ISOAI A, KUMAGAI H *et al.*

Effects of methylthioadenosine and its analogs on in vitro invasion of rat ascites hepatoma cells and methylation of their phospholipids.

Jpn J Cancer Res 1991; 82 (10): 1104-1111.

KNEIPP J, KNEIPP H, RICE WL, KNEIPP K.

Optical probes for biological applications based on surface-enhanced Raman scattering from indocyanine green on gold nanoparticles.

Anal Chem 2005; 77 (8): 2381-2385.

KNEIPP K, KNEIPP H, ITZKAN I, DASARI RR, FELD MS.

Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy.

Chem Rev 1999; 99 (10): 2957-2976.

KNEIPP K, KNEIPP H, ITZKAN I, RAMACHANDRA, DASARI R, FELD MS.

Surface-enhanced Raman scattering and biophysics.

J. Phys.: Condens. Matter 2002; 14: R597–R624.

KNEIPP K, WANG Y, KNEIPP H, ITZKAN II, DASARI RR, FELD MS.

Population pumping of excited vibrational states by spontaneous surface-enhanced Raman scattering.

Physical Review Letters 1996; 76 (14): 2444-2447.

KOC Y, OYAN B, KARS A, TEKUZMAN G, CANPINAR H, KANSU E.

A randomized trial of continuous infusion versus bolus mitoxantrone in combination with cytarabine in newly diagnosed patients with acute myeloblastic leukemia.

Hematol Oncol 2004; 22 (2): 43-53.

KOGELNIK H, PORTO SPS.

Continuous Helium-Neon red laser as a Raman source.

J Opt Soc Am 1963; 53: 1446-1451.

KONNO T, EBIHARA T, HISAEDA K, UCHIUMI T, NAKAMURA T, SHIRAKUSA T *et al.*

Identification of domains participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2.

J Biol Chem 2003; 278 (25): 22908-22917.

KOOL M, DE HAAS M, SCHEFFER GL, SCHEPER RJ, VAN EIJK MJ, JUIJN JA *et al.*

Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines.

Cancer Res 1997; 57 (16): 3537-3547.

KRAMERS KA, HEISENBERG W.

Über die streuung von strahlung durch atome.

Z. Phys. 1925; 31 681-700.

KRAYNOV VS, CHAMBERLAIN C, BOKOCH GM, SCHWARTZ MA, SLABAUGH S, HAHN KM.

Localized Rac activation dynamics visualized in living cells.

Science 2000; 290 (5490): 333-337.

KRYLOVA OO, MELIK-NUBAROV NS, BADUN GA, KSENOFONTOV AL, MENGER FM, YAROSLAVOV AA.

Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation.

Chemistry 2003; 9 (16): 3930-3936.

KRYLOVA OO, POHL P.

Ionophoric activity of pluronic block copolymers.

Biochemistry 2004; 43 (12): 3696-3703.

LALLOO AK, LUO FR, GUO A, PARANJPE PV, LEE SH, VYAS V *et al.*

Membrane transport of camptothecin: facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2).

BMC Med 2004; 2: 16.

LAMBROS MP, RAHMAN YE.

Effects of cyclosporin A on model lipid membranes.

Chem Phys Lipids 2004; 131 (1): 63-69.

LANDSBERG G, MANDELSTAM L.

Eine neue erscheinung bei des lichtzerstreuung in krystallen.

Naturwissenschaften 1928; 16: 557-558.

LAVIE Y, CAO H, BURSTEN SL, GIULIANO AE, CABOT MC.

Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells.

J Biol Chem 1996; 271 (32): 19530-19536.

LAVIE Y, FIUCCI G, LISCOVITCH M.

Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells.

J Biol Chem 1998; 273 (49): 32380-32383.

LAVIE Y, LISCOVITCH M.

Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences.

Glycoconj J 2000; 17 (3 -4): 253-259.

LEACH MO.

Introduction to in vivo MRS of cancer: new perspectives and open problems.

Anticancer Res 1996; 16 (3B): 1503-1514.

LECOMPTE MF, LAURENT G, JAFFREZOU JP.

Sphingomyelin content conditions insertion of daunorubicin within phosphatidylcholine monolayers.

FEBS Lett 2002; 525 (1-3): 141-144.

LEE JS, SCALA S, MATSUMOTO Y, DICKSTEIN B, ROBEY R, ZHAN Z *et al.*

Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression.

J Cell Biochem 1997; 65 (4): 513-526.

LEE PC, MEISEL D.

Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols.

J. Phys. Chem 1982; 86: 3391-3397.

LEIER I, JEDLITSCHKY G, BUCHHOLZ U, COLE SP, DEELEY RG, KEPPLER D.

The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates.

J Biol Chem 1994; 269 (45): 27807-27810.

LEONARD GD, FOJO T, BATES SE.

The role of ABC transporters in clinical practice.

Oncologist 2003; 8 (5): 411-424.

LIEBES LF, PELLE E, ZUCKER-FRANKLIN D, SILBER R.

Comparison of lipid composition and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence polarization measurements of hairy cells with monocytes and lymphocytes from normal subjects and patients with chronic lymphocytic leukemia.

Cancer Res 1981; 41 (10): 4050-4056.

LISCOVITCH M, LAVIE Y.

Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways?

Trends Biochem Sci 2000; 25 (11): 530-534.

LLOPIS J, WESTIN S, RICOTE M, WANG Z, CHO CY, KUROKAWA R *et al.*

Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (8): 4363-4368.

LO YL, LIU FI, YANG JM, CHERNG JY.

Reversal of multidrug resistance to epirubicin by cyclosporin A in liposomes or intralipid.

Anticancer Res 2001; 21 (1A): 445-450.

LONDON E, BROWN DA.

Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts).

Biochim Biophys Acta 2000; 1508 (1-2): 182-195.

LONG DA.

Raman spectroscopy.

New-York : McGraw-Hill ; 1977.

LOWN JW, HANSTOCK CC.

High field <sup>1</sup>H-NMR analysis of the 1:1 intercalation complex of the antitumor agent mitoxantrone and the DNA duplex [d(CpGpCpG)].

J Biomol Struct Dyn 1985; 2 (6): 1097-1106.

LOWN JW, HANSTOCK CC, BRADLEY RD, SCRABA DG.

Interactions of the antitumor agents mitoxantrone and bisantrene with deoxyribonucleic acids studied by electron microscopy.

Mol Pharmacol 1984; 25 (1): 178-184.

MAIER O, OBERLE V, HOEKSTRA D.

Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review).

Chem Phys Lipids 2002; 116 (1-2): 3-18.

MALIEPAARD M, SCHEFFER GL, FANEYTE IF, VAN GASTELEN MA, PIJNENBORG AC, SCHINKEL AH *et al.*

Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues.

Cancer Res 2001; 61 (8): 3458-3464.

MAO Q, UNADKAT J.

Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Drug Transport.

AAPS J. 2005; 7 (1): E118-E133.

MARCZAK A, WRZESIEN-KUS A, KRYKOWSKI E, ROBAK T, JUZWIAK Z.

The interaction of daunorubicin and mitoxantrone with the red blood cells of acute myeloid leukemia patients.

Cell Mol Biol Lett 2003; 8 (4): 885-890.

MARIAN T, BALKAY L, SZABO G, KRASZNAI ZT, HERNADI Z, GALUSKA L *et al.*

Biphasic accumulation kinetics of [<sup>99m</sup>Tc]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile in tumour cells and its modulation by lipophilic P-glycoprotein ligands.

Eur J Pharm Sci 2005; 25 (2-3): 201-209.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

MARIAN T, BALKAY L, TRON L, KRASZNAI ZT, SZABO-PELI J, KRASZNAI Z.  
Effects of miltefosine on membrane permeability and accumulation of [99mTc]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile, 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose, daunorubicin and rhodamine123 in multidrug-resistant and sensitive cells.

Eur J Pharm Sci 2005; 24 (5): 495-501.

MAS P, DEVLIN PF, PANDA S, KAY SA.

Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2.

Nature 2000; 408 (6809): 207-211.

MASSERINI M, RAVASI D.

Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains.

Biochim Biophys Acta 2001; 1532 (3): 149-161.

MAY GL, WRIGHT LC, DYNE M, MACKINNON WB, FOX RM, MOUNTFORD CE.

Plasma membrane lipid composition of vinblastine sensitive and resistant human leukaemic lymphoblasts.

Int J Cancer 1988; 42 (5): 728-733.

MCLAUGHLIN C, MACMILLAN D, MCCARDLE C, SMITH WE.

Quantitative analysis of mitoxantrone by surface-enhanced resonance Raman scattering.

Anal Chem 2002; 74 (13): 3160-3167.

MERCHANT TE, CHARACIEJUS D, KASIMOS JN, DEN OTTER W, GIERKE LW, GLONEK T.

Phosphodiesterases in saponified extracts of human breast and colon tumors using 31P magnetic resonance spectroscopy.

Magn Reson Med 1992; 26 (1): 132-140.

MERCHANT TE, DE GRAAF PW, MINSKY BD, OBERTOP H, GLONEK T.

Esophageal cancer phospholipid characterization by 31P NMR.

NMR Biomed 1993; 6 (3): 187-193.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

MERCHANT TE, DIAMANTIS PM, LAUWERS G, HAIDA T, KASIMOS JN, GUILLEM J  
*et al.*

Characterization of malignant colon tumors with <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance phospholipid and phosphatic metabolite profiles.

Cancer 1995; 76 (10): 1715-1723.

MERCHANT TE, MENESES P, GIERKE LW, DEN OTTER W, GLONEK T.

<sup>31</sup>P magnetic resonance phospholipid profiles of neoplastic human breast tissues.

Br J Cancer 1991; 63 (5): 693-698.

MILLWARD MJ, CANTWELL BM, LIEN EA, CARMICHAEL J, HARRIS AL.

Intermittent high-dose tamoxifen as a potential modifier of multidrug resistance.

Eur J Cancer 1992; 28A (4-5): 805-810.

MINDERMAN H, O'LOUGHLIN KL, PENDYALA L, BAER MR.

VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein.

Clin Cancer Res 2004; 10 (5): 1826-1834.

MIYAWAKI A, GRIESBECK O, HEIM R, TSIEN RY.

Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons.

Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96 (5): 2135-2140.

MIYAWAKI A, LLOPIS J, HEIM R, MCCAFFERY JM, ADAMS JA, IKURA M *et al.*

Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin.

Nature 1997; 388 (6645): 882-887.

MOFFETT S, BROWN DA, LINDER ME.

Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts.

J Biol Chem 2000; 275 (3): 2191-2198.

MURATA S, HERMAN P, LIN HJ, LAKOWICZ JR.

Fluorescence lifetime imaging of nuclear DNA: effect of fluorescence resonance energy transfer.

Cytometry 2000; 41 (3): 178-185.

MURZA A, SANCHEZ-CORTES S, GARCIA-RAMOS JV, GUISAN JM, ALFONSO C, RIVAS G.

Interaction of the antitumor drug 9-aminoacridine with guanidinobenzoate studied by spectroscopic methods: a possible tumor marker probe based on the fluorescence exciplex emission.

Biochemistry 2000; 39 (34): 10557-10565.

NABIEV I, BARANOV AV, CHOURPA I, BELJEBBAR A, SOCKALINGUM GD, MANFAIT M.

Does adsorption on the surface of a silver colloid perturb drug/DNA interactions ? Comparative SERS, FT-SERS, and resonance Raman study of mitoxantrone and its derivatives.

J Phys Chem 1995; 99: 1608-1613.

NEGENDANK W.

Studies of human tumors by MRS: a review.

NMR Biomed 1992; 5 (5): 303-324.

NELSON EM, TEWEY KM, LIU LF.

Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide.

Proc Natl Acad Sci U S A 1984; 81 (5): 1361-1365.

NIEBYLSKI CD, PETTY HR.

Cyclosporine A induces an early and transient rigidification of lymphocyte membranes.

J Leukoc Biol 1991; 49 (4): 407-415.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

OSBORNE CK, DRELICHMAN A, VON HOFF DD, CRAWFORD ED.

Mitoxantrone: modest activity in a phase II trial in advanced prostate cancer.

Cancer Treat Rep 1983; 67 (12): 1133-1135.

OZOLS RF, CUNNION RE, KLECKER RW, JR., HAMILTON TC, OSTCHEGA Y, PARRILLO JE *et al.*

Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients.

J Clin Oncol 1987; 5 (4): 641-647.

PALLARES-TRUJILLO J, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILES JM.

Lipids: A key role in multidrug resistance? (Review).

Int J Oncol 2000; 16 (4): 783-798.

PARTON RG.

Caveolae and caveolins.

Curr Opin Cell Biol 1996; 8 (4): 542-548.

PASCAUD C, GARRIGOS M, ORLOWSKI S.

Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents.

Biochem J 1998; 333 (Pt 2) 351-358.

PAULUSMA CC, BOSMA PJ, ZAMAN GJ, BAKKER CT, OTTER M, SCHEFFER GL *et al.*

Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene.

Science 1996; 271 (5252): 1126-1128.

PECK RA, HEWETT J, HARDING MW, WANG YM, CHATURVEDI PR, BHATNAGAR A *et al.*

Phase I and pharmacokinetic study of the novel MDR1 and MRP1 inhibitor biricodar administered alone and in combination with doxorubicin.

J Clin Oncol 2001; 19 (12): 3130-3141.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

PERRY PJ, GOWAN SM, RESZKA AP, POLUCCI P, JENKINS TC, KELLAND LR *et al.*  
1,4- and 2,6-disubstituted amidoanthracene-9,10-dione derivatives as inhibitors of human telomerase.

J Med Chem 1998; 41 (17): 3253-3260.

POCKRAND I.

Surface Enhanced Raman vibrational studies at solid/glass interface, Springer tracts in modern physics.

Berlin: Pockrand; 1984; 104.

PRZYBYLSKA M, JOZWIAK Z.

Relevance of drug uptake, cellular distribution and cell membrane fluidity to the enhanced sensitivity of Down's syndrome fibroblasts to anticancer antibiotic-mitoxantrone.

Biochim Biophys Acta 2003; 1611 (1-2): 161-170.

QADIR M, O'LOUGHLIN KL, FRICKE SM, WILLIAMSON NA, GRECO WR, MINDERMAN H *et al.*

Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator.

Clin Cancer Res 2005; 11 (6): 2320-2326.

RABINDRAN SK, HE H, SINGH M, BROWN E, COLLINS KI, ANNABLE T *et al.*

Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C.

Cancer Res 1998; 58 (24): 5850-5858.

RABINDRAN SK, ROSS DD, DOYLE LA, YANG W, GREENBERGER LM.

Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein.

Cancer Res 2000; 60 (1): 47-50.

RAFFY S, TEISSIE J.

Control of lipid membrane stability by cholesterol content.

Biophys J 1999; 76 (4): 2072-2080.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

RAJENDRA R, GOUNDER MK, SALEEM A, SCHELLENS JH, ROSS DD, BATES SE *et al.*

Differential effects of the breast cancer resistance protein on the cellular accumulation and cytotoxicity of 9-aminocamptothecin and 9-nitrocamptothecin.

Cancer Res 2003; 63 (12): 3228-3233.

RAMAN CV, KRISHNAN KSA.

New type of secondary radiation.

Nature 1928; 121: 501-502.

RAMU A, GLAUBIGER D, WEINTRAUB H.

Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and -resistant P388 cells.

Cancer Treat Rep 1984; 68 (4): 637-641.

RAMU A, POLLARD HB, ROSARIO LM.

Doxorubicin resistance in P388 leukemia--evidence for reduced drug influx.

Int J Cancer 1989; 44 (3): 539-547.

REGEV R, ASSARAF YG, EYTAN GD.

Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells.

Eur J Biochem 1999; 259 (1-2): 18-24.

REGEV R, EYTAN GD.

Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes.

Biochem Pharmacol 1997; 54 (10): 1151-1158.

REGEV R, YEHESEKELY-HAYON D, KATZIR H, EYTAN GD.

Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism.

Biochem Pharmacol 2005; 70 (1): 161-169.

ROBERT J.

Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches.

Eur J Clin Invest 1999; 29 (6): 536-545.

ROBERT J, JARRY C.

Multidrug resistance reversal agents.

J Med Chem 2003; 46 (23): 4805-4817.

ROBEY RW, HONJO Y, MORISAKI K, NADJEM TA, RUNGE S, RISBOOD M *et al.*

Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity.

Br J Cancer 2003; 89 (10): 1971-1978.

ROBEY RW, HONJO Y, VAN DE LAAR A, MIYAKE K, REGIS JT, LITMAN T *et al.*

A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2).

Biochim Biophys Acta 2001; 1512 (2): 171-182.

ROCCHI E, KHODJAKOV A, VOLK EL, YANG CH, LITMAN T, BATES SE *et al.*

The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane.

Biochem Biophys Res Commun 2000; 271 (1): 42-46.

ROMSICKI Y, SHAROM FJ.

The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter.

Biochemistry 1999; 38 (21): 6887-6896.

ROSS DD.

Novel mechanisms of drug resistance in leukemia.

Leukemia 2000; 14 (3): 467-473.

ROSS DD, KARP JE, CHEN TT, DOYLE LA.

Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia.

Blood 2000; 96 (1): 365-368.

ROSS DD, YANG W, ABRUZZO LV, DALTON WS, SCHNEIDER E, LAGE H *et al.*

Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines.

J Natl Cancer Inst 1999; 91 (5): 429-433.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ROTHBERG KG, HEUSER JE, DONZELL WC, YING YS, GLENNEY JR, ANDERSON RG.

Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.

Cell 1992; 68 (4): 673-682.

ROTHNIE A, THERON D, SOCENEANTU L, MARTIN C, TRAIKIA M, BERRIDGE G *et al.*

The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence.

Eur Biophys J 2001; 30 (6): 430-442.

SANKARAM MB, THOMPSON TE.

Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes.

Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (19): 8686-8690.

SCHEFFER GL, MALIEPAARD M, PIJNENBORG AC, VAN GASTELEN MA, DE JONG MC, SCHROEIJERS AB *et al.*

Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines.

Cancer Res 2000; 60 (10): 2589-2593.

SCHEPER RJ, BROXTERMAN HJ, SCHEFFER GL, KAAIJK P, DALTON WS, VAN HEIJNINGEN TH *et al.*

Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.

Cancer Res 1993; 53 (7): 1475-1479.

SCHINDLER M, GRABSKI S, HOFF E, SIMON SM.

Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr).

Biochemistry 1996; 35 (9): 2811-2817.

SCHINKEL AH.

P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.

Adv Drug Deliv Rev 1999; 36 (2-3): 179-194.

SCHMID JA, SCHOLZE P, KUDLACEK O, FREISSMUTH M, SINGER EA, SITTE HH.

Oligomerization of the human serotonin transporter and of the rat GABA transporter 1 visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living cells.

J Biol Chem 2001; 276 (6): 3805-3810.

SCHULDES H, DOLDERER JH, ZIMMER G, KNOBLOCH J, BICKEBOLLER R, JONAS D *et al.*

Reversal of multidrug resistance and increase in plasma membrane fluidity in CHO cells with R-verapamil and bile salts.

Eur J Cancer 2001; 37 (5): 660-667.

SEQUARIS JM, KOGLIN E, MALFOY B.

Inner and outer complexes of Pt-coordination compounds with DNA probed by SERS spectroscopy.

FEBS Lett 1984; 173 (1): 95-98.

SEVERS NJ.

Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact?

J Cell Sci 1988; 90 (Pt 3) 341-348.

SHAPIRO AB, LING V.

Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities.

Eur J Biochem 1997; 250 (1): 130-137.

SHAPIRO AB, LING V.

The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein.

Acta Physiol Scand Suppl 1998; 643: 227-234.

SHAROM FJ.

The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and their modulation of activity.

Biochem Soc Trans 1997; 25 (3): 1088-1096.

SHIOZAWA K, OKA M, SODA H, YOSHIKAWA M, IKEGAMI Y, TSURUTANI J *et al.*

Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic.

Int J Cancer 2004; 108 (1): 146-151.

SHVIDEL L, SHTALRID M, BAIREY O, RAHIMI-LEVENE N, LUGASSY G, SHPILBERG O *et al.*

Conventional dose fludarabine-based regimens are effective but have excessive toxicity in elderly patients with refractory chronic lymphocytic leukemia.

Leuk Lymphoma 2003; 44 (11): 1947-1950.

SIEGEL RM, FREDERIKSEN JK, ZACHARIAS DA, CHAN FK, JOHNSON M, LYNCH D *et al.*

Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations.

Science 2000; 288 (5475): 2354-2357.

SIIMAN O, BUMM LA, CAALAGHAN R, BLATCHFORD CG, KERKER M.

Surface enhanced Raman scattering by citrate on colloidal silver.

J Phys Chem 1983; 87: 1014-1021.

SIKIC BI, FISHER GA, LUM BL, HALSEY J, BEKETIC-ORESKOVIC L, CHEN G.

Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein.

Cancer Chemother Pharmacol 1997; 40 Suppl S13-9.

SIMONS K, EHEHALT R.

Cholesterol, lipid rafts, and disease.

J Clin Invest 2002; 110 (5): 597-603.

SINICROPE FA, DUDEJA PK, BISSONNETTE BM, SAFA AR, BRASITUS TA.  
Modulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by alterations in lipid fluidity of rat liver canalicular membrane vesicles.

J Biol Chem 1992; 267 (35): 24995-5002.

SMEKAL A.

Zur Quantentheorie der Dispersion.

Berlin : Springer; 1923, 873–875.

(Die Naturwissenschaften; 11)

SOKOL DL, ZHANG X, LU P, GEWIRTZ AM.

Real time detection of DNA.RNA hybridization in living cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (20): 11538-11543.

SOKOLOV KV, KHODORCHENKO P, PETUKHOV A, NABIEV I, CHUMANOV GD,  
KIM JH *et al.*

Contributions of short-range and classical electromagnetic mechanisms to surface enhanced Raman scattering from several types of biomolecules adsorbed on cold-deposited island films.  
Appl Spectrosc 1993; 47: 515-522.

SORKIN A, MCCLURE M, HUANG F, CARTER R.

Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy.

Curr Biol 2000; 10 (21): 1395-1398.

SPARREBOOM A, PLANTING AS, JEWELL RC, VAN DER BURG ME, VAN DER  
GAAST A, DE BRUIJN P *et al.*

Clinical pharmacokinetics of doxorubicin in combination with GF120918, a potent inhibitor of MDR1 P-glycoprotein.

Anticancer Drugs 1999; 10 (8): 719-728.

SPRONG H, VAN DER SLUIJS P, VAN MEER G.

How proteins move lipids and lipids move proteins.

Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2 (7): 504-513.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

STERNBERG DW, AIRD W, NEUBERG D, THOMPSON L, MACNEILL K, AMREIN P *et al.*

Treatment of patients with recurrent and primary refractory acute myelogenous leukemia using mitoxantrone and intermediate-dose cytarabine: a pharmacologically based regimen.

Cancer 2000; 88 (9): 2037-2041.

STRYER L.

Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler.

Annu Rev Biochem 1978; 47: 819-846.

STRYER L, HAUGLAND RP.

Energy transfer: a spectroscopic ruler.

Proc Natl Acad Sci U S A 1967; 58 (2): 719-726.

SUBCZYNSKI WK, WISNIEWSKA A.

Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions.

Acta Biochim Pol 2000; 47 (3): 613-625.

SUGIMOTO Y, TSUKAHARA S, IMAI Y, UEDA K, TSURUO T.

Reversal of Breast Cancer Resistance Protein-mediated Drug Resistance by Estrogen Antagonists and Agonists.

Mol Cancer Ther 2003; 2 (1): 105-112.

TALLMAN MS, LEE S, SIKIC BI, PAIETTA E, WIERNIK PH, BENNETT JM *et al.*

Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine plus cyclosporine for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: an Eastern Cooperative Oncology Group pilot study.

Cancer 1999; 85 (2): 358-367.

TAMMUR J, PRADES C, ARNOULD I, RZHETSKY A, HUTCHINSON A, ADACHI M *et al.*

Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12.

Gene 2001; 273 (1): 89-96.

## *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---

TEWEY KM, ROWE TC, YANG L, HALLIGAN BD, LIU LF.

Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II.

Science 1984; 226 (4673): 466-468.

THANOS S, FISCHER D, PAVLIDIS M, HEIDUSCHKA P, BODEUTSCH N.

Glioanatomy assessed by cell-cell interactions and phagocytotic labelling.

J Neurosci Methods 2000; 103 (1): 39-50.

TRAGANOS F, EVENSON DP, STAIANO-COICO L, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR.

Action of dihydroxyanthraquinone on cell cycle progression and survival of a variety of cultured mammalian cells.

Cancer Res 1980; 40 (3): 671-681.

TROOST J, LINDENMAIER H, HAEFELI WE, WEISS J.

Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells.

Mol Pharmacol 2004; 66 (5): 1332-1339.

TRUONG K, IKURA M.

The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo.

Curr Opin Struct Biol 2001; 11 (5): 573-578.

TSURUO T, IIDA H, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y.

Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil.

Cancer Res 1981; 41 (5): 1967-1972.

TU AT.

Raman spectroscopy in biology : principle and applications.

New-York ; McGraw-Hill ; 1982.

TUNG CH, MAHMOOD U, BREDOW S, WEISSLEDER R.

In vivo imaging of proteolytic enzyme activity using a novel molecular reporter.

Cancer Res 2000; 60 (17): 4953-4958.

USTER PS, PAGANO RE.

Resonance energy transfer microscopy: observations of membrane-bound fluorescent probes in model membranes and in living cells.

J Cell Biol 1986; 103 (4): 1221-1234.

VAN BLITTERSWIJK WJ, DE VEER G, KROL JH, EMMELLOT P.

Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells.

Biochim Biophys Acta 1982; 688 (2): 495-504.

VAN LOEVEZIJN A, ALLEN JD, SCHINKEL AH, KOOMEN GJ.

Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines.

Bioorg Med Chem Lett 2001; 11 (1): 29-32.

VELDMAN RJ, ZERP S, VAN BLITTERSWIJK WJ, VERHEIJ M.

N-hexanoyl-sphingomyelin potentiates in vitro doxorubicin cytotoxicity by enhancing its cellular influx.

Br J Cancer 2004; 90 (4): 917-925.

VRIGNAUD P, MONTAUDON D, LONDOS-GAGLIARDI D, ROBERT J.

Fatty acid composition transport and metabolism in doxorubicin-sensitive and-resistant rat glioblastoma cells.

Cancer Res 1986; 46 (7): 3258-3261.

WEINSTOCK-GUTTMAN B, JACOBS LD.

What is new in the treatment of multiple sclerosis?

Drugs 2000; 59 (3): 401-410.

WIELINGA PR, WESTERHOFF HV, LANKELMA J.

The relative importance of passive and P-glycoprotein mediated anthracycline efflux from multidrug-resistant cells.

Eur J Biochem 2000; 267 (3): 649-957.

WIESE M, PAJEVA IK.

Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers.

Curr Med Chem 2001; 8 (6): 685-713.

WOUTERS FS, VERVEER PJ, BASTIAENS PI.

Imaging biochemistry inside cells.

Trends Cell Biol 2001; 11 (5): 203-211.

WRIGHT LC, DYNE M, HOLMES KT, MOUNTFORD CE.

Phospholipid and ether linked phospholipid content alter with cellular resistance to vinblastine.

Biochem Biophys Res Commun 1985; 133 (2): 539-545.

YANG CP, GALBIATI F, VOLONTE D, HORWITZ SB, LISANTI MP.

Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in Taxol-resistant A549 cells.

FEBS Lett 1998; 439 (3): 368-372.

YANG HT, WANG GJ.

Transport and uptake characteristics of a new derivative of berberine (CPU-86017) by human intestinal epithelial cell line: Caco-2.

Acta Pharmacol Sin 2003; 24 (12): 1185-1191.

ZACCOLO M, DE GIORGI F, CHO C, FENG L, KNAPP T, NEGULESCU P *et al.*

A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells.

Nat Cell Biol 1999; 2 (1): 25-29.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

ZAMAN GJ, LANKELMA J, VAN TELLINGEN O, BEIJNEN J, DEKKER H, PAULUSMA C *et al.*

Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein.

Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92 (17): 7690-7694.

## ***ANNEXES 1 à 3***

---

Tableau 8. Valeurs numériques pour le calcul de l'intégrale  $J$  de recouvrement spectral entre le donneur (sonde 4Di-10ASP) et l'accepteur d'énergie (MTX).

$\lambda$ (nm)	$I_{\text{exp}}$ (sonde) (unité arbitraire)	$I_{\text{corr}}$ (sonde) (unité normalisée)	$\varepsilon$ (MTX) ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	$\lambda^4$ ( $cm^4$ )	$J$ ( $M^{-1} \cdot cm^3$ )
500	0	0	2100	6,25E-18	0
501	-0,2	-4,47477E-05	1880	6,30015E-18	-5,30005E-19
502	-0,1	-2,23739E-05	2940	6,3506E-18	-4,17737E-19
503	0	0	1940	6,40136E-18	0
504	0,9	0,000201365	1740	6,45241E-18	2,26076E-18
505	2,3	0,000514599	2360	6,50378E-18	7,89853E-18
506	3,1	0,00069359	2980	6,55544E-18	1,35494E-17
507	4,6	0,001029198	3440	6,60742E-18	2,33932E-17
508	5,7	0,00127531	3020	6,6597E-18	2,56494E-17
509	7,2	0,001610918	3260	6,7123E-18	3,52503E-17
510	8,1	0,001812283	2760	6,7652E-18	3,38389E-17
511	9,6	0,002147891	2420	6,81842E-18	3,54414E-17
512	10,6	0,00237163	2480	6,87195E-18	4,04183E-17
513	12,1	0,002707238	3140	6,92579E-18	5,88743E-17
514	13	0,002908603	4220	6,97995E-18	8,56741E-17
515	14,4	0,003221837	2100	7,03443E-18	4,7594E-17
516	15,4	0,003445576	2080	7,08923E-18	5,0807E-17
517	17,4	0,003893053	3140	7,14434E-18	8,73338E-17
518	18,6	0,004161539	3920	7,19978E-18	1,17452E-16
519	20,6	0,004609017	3700	7,25553E-18	1,23731E-16
520	22,2	0,004966999	4140	7,31162E-18	1,50351E-16
521	24,8	0,005548719	4200	7,36802E-18	1,71709E-16
522	26,3	0,005884327	3820	7,42475E-18	1,66895E-16
523	28,2	0,006309431	4520	7,48181E-18	2,13371E-16
524	29,6	0,006622665	3760	7,5392E-18	1,87735E-16
525	31,5	0,007047768	5320	7,59691E-18	2,8484E-16
526	32,6	0,007293881	5580	7,65496E-18	3,11556E-16
527	33,9	0,007584741	4700	7,71334E-18	2,74967E-16
528	35	0,007830854	3120	7,77205E-18	1,89889E-16
529	36,4	0,008144088	4920	7,8311E-18	3,13784E-16
530	37,3	0,008345453	4300	7,89048E-18	2,83153E-16
531	38,8	0,008681061	4240	7,9502E-18	2,92629E-16
532	40	0,008949547	5580	8,01026E-18	4,0002E-16
533	42,3	0,009464146	3500	8,07066E-18	2,67337E-16
534	43,7	0,00977738	6000	8,13139E-18	4,77022E-16
535	45,8	0,010247231	5380	8,19248E-18	4,51652E-16
536	47,2	0,010560465	6000	8,2539E-18	5,2299E-16
537	49,6	0,011097438	7000	8,31567E-18	6,45978E-16
538	50,7	0,011343551	4680	8,37778E-18	4,44758E-16
539	52,4	0,011723906	6920	8,44025E-18	6,84752E-16
540	53,3	0,011925271	8620	8,50306E-18	8,74079E-16
541	54,9	0,012283253	5740	8,56622E-18	6,03969E-16
542	56	0,012529366	7000	8,62973E-18	7,56875E-16
543	57,3	0,012820226	6000	8,69359E-18	6,68723E-16
544	57,9	0,012954469	7600	8,75781E-18	8,62241E-16
545	58,8	0,013155834	7500	8,82239E-18	8,70494E-16
546	59,6	0,013334825	7740	8,88731E-18	9,17274E-16
547	61,3	0,013715181	7980	8,9526E-18	9,79837E-16
548	62,7	0,014028415	7780	9,01825E-18	9,84261E-16
549	64,2	0,014364023	7420	9,08426E-18	9,6821E-16
550	65	0,014543014	9900	9,15063E-18	1,31747E-15
551	66,1	0,014789126	8760	9,21736E-18	1,19413E-15
552	66,7	0,01492337	10080	9,28445E-18	1,39664E-15
553	68,1	0,015236604	11280	9,35191E-18	1,6073E-15
554	69,2	0,015482716	9980	9,41974E-18	1,45552E-15
555	70,1	0,015684081	10540	9,48794E-18	1,56845E-15
556	70,1	0,015684081	11240	9,55651E-18	1,68471E-15
557	70	0,015661707	11840	9,62544E-18	1,78489E-15
558	69,9	0,015639333	10480	9,69475E-18	1,58897E-15
559	70	0,015661707	11560	9,76444E-18	1,76784E-15
560	70,1	0,015684081	11220	9,8345E-18	1,73063E-15

561	69,9	0,015639333	10540	9,90493E-18	1,63271E-15
562	69,7	0,015594586	11640	9,97574E-18	1,81081E-15
563	69,6	0,015572212	12000	1,00469E-17	1,87744E-15
564	69,2	0,015482716	11720	1,01185E-17	1,83608E-15
565	69,1	0,015460342	11280	1,01905E-17	1,77714E-15
566	69,1	0,015460342	12360	1,02628E-17	1,96112E-15
567	68,8	0,015393221	12360	1,03355E-17	1,96644E-15
568	68,6	0,015348473	11340	1,04086E-17	1,81164E-15
569	68,3	0,015281351	11820	1,04821E-17	1,89334E-15
570	67,9	0,015191856	13900	1,0556E-17	2,22908E-15
571	66,4	0,014856248	14120	1,06303E-17	2,22991E-15
572	65	0,014543014	13400	1,07049E-17	2,08614E-15
573	63,2	0,014140284	13120	1,078E-17	1,99991E-15
574	62	0,013871798	12940	1,08554E-17	1,94856E-15
575	60,2	0,013469068	12560	1,09313E-17	1,84926E-15
576	59	0,013200582	12740	1,10075E-17	1,8512E-15
577	57,4	0,0128426	14820	1,10842E-17	2,10962E-15
578	56,6	0,012663609	14360	1,11612E-17	2,02966E-15
579	55,2	0,012350375	14360	1,12387E-17	1,99319E-15
580	54,4	0,012171384	14280	1,13165E-17	1,96689E-15
581	53,4	0,011947645	15440	1,13947E-17	2,10201E-15
582	52,5	0,01174628	14820	1,14734E-17	1,99729E-15
583	50,9	0,011388298	15580	1,15525E-17	2,04975E-15
584	49,6	0,011097438	15780	1,16319E-17	2,03695E-15
585	47	0,010515718	17000	1,17118E-17	2,09368E-15
586	45,4	0,010157736	17060	1,17921E-17	2,04346E-15
587	43,3	0,009687885	17140	1,18728E-17	1,97148E-15
588	41,7	0,009329903	17860	1,19539E-17	1,9919E-15
589	39,6	0,008860051	18080	1,20354E-17	1,92795E-15
590	38,4	0,008591565	19060	1,21174E-17	1,98428E-15
591	36,8	0,008233583	18600	1,21997E-17	1,86832E-15
592	35,7	0,007987471	19180	1,22825E-17	1,88168E-15
593	33,9	0,007584741	19440	1,23657E-17	1,82329E-15
594	32,6	0,007293881	19360	1,24493E-17	1,75796E-15
595	30,9	0,006913525	20280	1,25334E-17	1,75726E-15
596	29,7	0,006645039	21140	1,26178E-17	1,77251E-15
597	27,3	0,006108066	21240	1,27027E-17	1,64799E-15
598	25,4	0,005682962	22400	1,27881E-17	1,6279E-15
599	23,3	0,005213111	22460	1,28738E-17	1,50735E-15
600	21,7	0,004855129	23640	1,296E-17	1,48749E-15
601	19,1	0,004273409	23580	1,30466E-17	1,31467E-15
602	18	0,004027296	24440	1,31337E-17	1,29271E-15
603	16,5	0,003691688	25020	1,32212E-17	1,22119E-15
604	15,6	0,003490323	24400	1,33091E-17	1,13345E-15
605	17,2	0,003848305	24580	1,33974E-17	1,26728E-15
606	13,2	0,00295335	25800	1,34862E-17	1,0276E-15
607	11,7	0,002617742	26000	1,35755E-17	9,23964E-16
608	11	0,002461125	24980	1,36651E-17	8,40118E-16
609	9,5	0,002125517	25720	1,37553E-17	7,51977E-16
610	8,4	0,001879405	25380	1,38458E-17	6,60437E-16
611	6,6	0,001476675	25740	1,39369E-17	5,29735E-16
612	5,7	0,00127531	25900	1,40283E-17	4,63363E-16
613	4,4	0,00098445	25200	1,41202E-17	3,50297E-16
614	3,6	0,000805459	24480	1,42126E-17	2,80239E-16
615	2,6	0,000581721	23420	1,43054E-17	1,94895E-16
616	2,1	0,000469851	23900	1,43987E-17	1,61689E-16
617	1,3	0,00029086	23100	1,44924E-17	9,73727E-17
618	1	0,000223739	22220	1,45866E-17	7,25169E-17
619	0,4	8,94955E-05	23480	1,46812E-17	3,08505E-17
620	0	0	22900	1,47763E-17	0

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Biochemical and Biophysical Research Communications 320 (2004) 615–621

BBRC

[www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Surface-enhanced Raman scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells

G. Breuzard, J.-F. Angiboust, P. Jeannesson, M. Manfait, and J.-M. Millot\*

*Unité MéDIAN CNRS UMR 6142, IFR53, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France*

Received 17 March 2004

### Abstract

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy was applied to analyze mitoxantrone (MTX) adsorption on the plasma membrane microenvironment of sensitive (HCT-116 S) or BCRP/MXR-type resistant (HCT-116 R) cells. The addition of silver colloid to MTX-treated cells revealed an enhanced Raman scattering of MTX. Addition of extracellular DNA induced a total extinction of MTX Raman intensity for both cell lines, which revealed an adsorption of MTX on plasma membrane. A threefold higher MTX Raman intensity was observed for HCT-116 R, suggesting a tight MTX adsorption in the plasma membrane microenvironment. Fluorescence confocal microscopy confirmed a relative MTX emission around plasma membrane for HCT-116 R. After 30 min at 4 °C, a threefold decrease of the MTX Raman scattering was observed for HCT-116 R, contrary to HCT-116 S. Permeation with benzyl alcohol revealed a threefold decrease of membrane MTX adsorption on HCT-116 R, exclusively. This additional MTX adsorption should correspond to the drug bound to an unstable site on the HCT-116 R membrane. This study showed that SERS spectroscopy could be a direct method to reveal drug adsorption to the membrane environment of living cells. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Mitoxantrone; Plasma membrane; Raman; BCRP; Resistance

Transfer of anticancer agents across membrane bilayer is highly influenced by structure and composition of the plasma membrane [1]. Drug uptake has been mainly studied using reconstituted phospholipidic bilayers [2–4], but not as often on plasma membrane of living cells [5]. We reported the selective analysis of the antitumor drug mitoxantrone (MTX) in the plasma membrane microenvironment of living cells by surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy. This method was characterized by a high sensitivity ( $10^{-10}$  M drug), and allowed the observation of Raman bands corresponding to chromophore vibrations. SERS was based on the enhancement by several orders of magnitude (up to  $10^9$  [6]) of the Raman intensity of molecules in the vicinity of a roughened metallic surface. Different complexes of DNA-antitumor drugs had been previously analyzed using SERS spectroscopy [7]. Besides, this method was also applied to study drug–membrane

interactions [8] in which experimental conditions did not disrupt molecular structures.

Cell resistance towards antineoplastic drugs directly implicated the structure of plasma membrane, which appeared as a real dynamic barrier regulating molecular transfers. The multi-drug resistance (MDR) phenotype was determined with a protein and a lipid origin. Pgp and MRP1 are efflux proteins that characterized mainly the ATPase binding cassette (ABC) superfamily [9,10]. A recent cellular resistance established with SN-38 and MTX demonstrated an overexpression of breast cancer resistant protein (BCRP) independently to Pgp and MRP1 proteins [11]. In addition to efflux mechanisms, the decrease of intracellular accumulation of cytotoxic drugs could imply a slower drug uptake across plasma membrane [12]. Changes of the nature or charges of phospholipids could affect electrostatic interactions of anthracyclines or MTX with plasma membrane. These anticancer drugs possess an amphipathic nature that favors location at the membrane surface and interferes with their transbilayer movements [13,14]. Changes of

\* Corresponding author. Fax: +33-3-26-91-35-50.

E-mail address: [jm.millot@univ-reims.fr](mailto:jm.millot@univ-reims.fr) (J.-M. Millot).

membrane permeability between sensitive and resistant cells should be associated with modifications of different MTX adsorption sites on plasma membrane. In this study, we described MTX adsorption on sensitive (HCT-116 S) and BCRP/MXR-type resistant (HCT-116 R) plasma membrane of living cells by SERS spectroscopy.

## Materials and methods

**Cell lines.** HCT-116 colon adenocarcinoma cell line was purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were grown in complete medium, i.e., RPMI 1640 medium with Glutamax-1 (Gibco, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, UK) at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, and passaged by trypsinization. Trypsin (Trypsin EDTA (1×) in HBSS W/O CA & MGW/EDTA, 4NA, Gibco, UK) was stored at –20 °C. The parental cell line was first cloned to obtain a reference SN38 sensitive clone, referred to as HCT-116 S. This sensitive clone was then subjected to a continuous exposure to SN38 with stepwise increased concentrations ranging from 1 to 15 nM over a period of approximately 8 months. The cell population growing in 15 nM SN38 generated the HCT-116 R clone. Drug-selected clones were maintained in the appropriate concentration of SN38. All the cell lines were cultured in drug-free medium at least 5 days prior to any experiment. A sulforhodamine test determined after a 72 h treatment with MTX, and an IC<sub>50</sub> of 2.8 and 11.1 nM was measured, respectively, for HCT-116 S and HCT-116 R.

**Drug, chemicals, and methods in SERS spectroscopy.** Mitoxantrone and the synthetic fluidizer benzyl alcohol (BA) were purchased from Sigma (St. Louis, USA, MW<sub>MTX</sub> = 517.4, MW<sub>BA</sub> = 108). For SERS experiments, each cell type was treated with 2 μM MTX for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, trypsinated, and washed twice in MTX-free RPMI medium (Sigma) (3 min at 1000 rpm). About 10<sup>6</sup> cells were mixed with isotonic aggregated colloid preceding SERS spectroscopy observation. To study the permeability influence of MTX adsorption on the plasma membrane, each cell type was pre-incubated in 30 mM BA for 10 min as described previously [15], preceding treatment with 2 μM MTX.

**Preparation of silver colloid and acquisition of SERS spectra.** Ag sols were prepared as described by Lee and Meisel [16]. A 90 mg sample of AgNO<sub>3</sub> (ALFA, MW = 169.87) was suspended in 500 mL of quartz-distilled water, purged with pure N<sub>2</sub>, and heated to 100 °C. Ten microliters of a 1% solution of sodium citrate (Sigma, St. Louis, USA, MW = 258.1), purged with N<sub>2</sub>, was added dropwise to the boiling solution under vigorous stirring. The solution was kept boiling for 60–90 min. The absorption curve of the brownish suspension showed a maximum at 415 nm. 0.6 M solutions of NaClO<sub>4</sub> (Sigma, St. Louis, USA, MW = 122.4), MgSO<sub>4</sub> (Sigma, St. Louis, USA, MW = 120), or NaCl (Prolabo, MW = 58.44) were used to aggregate Ag sols.

A first series of tests determined aggregation conditions of silver colloid. Drug and cells were analyzed with isotonic Ag sols (diluted at V/V 30%, pH 7), aggregated by NaClO<sub>4</sub> salts, or MgSO<sub>4</sub>, or finally NaCl ([salt]<sub>final</sub> = 0.06 M). NaClO<sub>4</sub> salts allowed the highest Raman scattering. Different colloidal batches were tested with 10<sup>–8</sup> M MTX and showed a reproducible drug Raman enhancement, validating a homogeneous colloidal preparation. About 10<sup>6</sup> cells were selected for SERS analyses. For each analysis series, a standard test with 10<sup>–8</sup> M MTX validated the correct feature of the aggregated colloid. Each presented spectrum was a medium spectrum of 10<sup>6</sup> MTX-treated cells resulting from 20 accumulations of 3 s each and was representative of a series of three reproducible spectra of three different cell batches. For different graphs (Figs. 3 and 4) each reported measurement corresponded to the band (1250 and 1350 cm<sup>–1</sup>) area of SERS average

spectrum. Significance of results was determined by Student's *t* test. The level of significance was *p* < 0.01.

**Raman spectrometer.** SERS spectra were obtained with an OMARS 89 spectrometer (DILOR, France). The diffraction was assured by a 1800 line/mm grating that allowed the analysis of a spectral window of about 400 cm<sup>–1</sup> at a time. The detection system was constituted of 512 photodiodes coupled with a light amplifier. The excitation used for SERS experiments was the 514.6 nm line of an Ar<sup>+</sup> laser (Spectra Physics 2020-03 model). The theoretical spectral resolution was determined at 0.83 cm<sup>–1</sup>. The spectrometer was linked to a computer, which allowed acquisition and mathematical processing of spectra with homemade software. The laser power was about 300 mW. In these conditions no contribution of Raman scattering from cells was observed. A reference range of MTX was made between 1.10<sup>–10</sup> and 1.10<sup>–7</sup> M concentration by SERS spectroscopy.

**Confocal fluorescence microscopy.** Cell types were treated with 5 μM MTX during 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and washed in MTX-free RPMI medium for 60 min to locate drug fluorescence emission. Pre-aggregated silver colloid was added to cells 45 min after the beginning of MTX cell incubation to scan colloid grains around plasma membrane. Fluorescence microscopy was performed using a MRC-1024 confocal system (Bio-Rad, Microscience, Hemel Hempstead, UK). The scanning confocal system was coupled with an optiphot epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan), equipped with a 60× magnification water immersion objective of numerical aperture, NA = 1.4. Experiments were performed with a Kr<sup>+</sup>/Ar<sup>+</sup> laser at 568 nm for MTX fluorescence images and at 488 nm for colloid reflection images. MTX emission was collected through a 680 nm band-pass filter and through a blue reflection filter for colloid reflection. Images were recorded with LaserSharp Version 2.1 T (BioRad software) and were calculated with Confocal Assistant (Bio-Rad software). Each image was represented with 512 × 512 pixels of 0.1 × 0.1 μm each and acquired with a Kalman filter to reduce background noise (average on three scanning images). Two merged images were taken with a drug emission and a silver colloid reflection from MTX-treated HCT-116 R. In order to locate silver colloid grains around plasma membrane: the first was obtained from collected fluorescence locating MTX emission and partial reflection of silver colloid grains (colored in green with Confocal Assistant software), and the second was obtained from exclusive reflection of silver colloid (colored in red).

## Results

### SERS spectroscopy of MTX-treated HCT-116 S

The main bands of MTX are presented on the drug SERS spectrum (Fig. 1A, spectrum 1). The analysis of MTX SERS spectrum displayed that main bands corresponded to the 9,10-anthracenedione core of the molecule.

HCT-116 S cells were treated with 0.5 μM MTX for 1 h at 37 °C, in a hydrated atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, trypsinated, and washed twice in MTX-free RPMI at 4 °C. About 10<sup>6</sup> cells were mixed with isotonic pre-aggregated colloid (Fig. 1A, spectra 2). After each spectrum acquisition a trypan blue test confirmed a cellular death percentage less than 0.5%. Raman diffusion of the drug was observed for MTX-incubated HCT-116 S, but not for MTX-free HCT-116 S or for the last supernatant of MTX-treated cells. Therefore, the MTX Raman in-

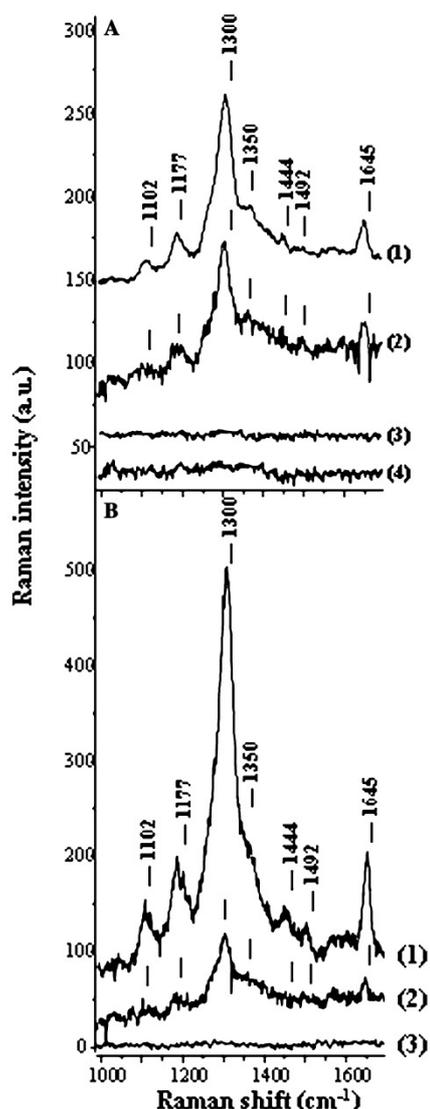


Fig. 1. SERS spectra of MTX. (A) SERS spectrum of 5 nM MTX (1) and 5 nM MTX/1  $\mu$ M double-stranded DNA (3) in aqueous solution, and 0.5  $\mu$ M MTX-treated (2) and 0.5  $\mu$ M MTX-treated/1  $\mu$ M extracellular DNA (4) sensitive cells. (B) SERS spectra of MTX-treated resistant (1) and sensitive cells (2), and spectrum of MTX-treated resistant cells with added DNA (3). Experimental conditions, about  $10^6$  cells were treated with 0.5  $\mu$ M MTX for 1 h at 37  $^{\circ}$ C in hydrated atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ , and 1  $\mu$ M duplex DNA was added before the contact of cells with silver colloid; for each spectrum; 180 mW laser power (514 nm of  $\text{Ar}^+$  line) at sample and 20 accumulations of 3 s each.

tensity of MTX-treated cells did not originate from the extracellular medium. However, both MTX spectra from a  $10^{-7}$  M MTX aqueous solution and from MTX-treated cells exhibited a similar profile.

As a first step towards characterization of MTX-membrane adsorption, double-stranded DNA was added to the extracellular medium. DNA duplex

allowed a rapid and efficient quenching of the MTX SERS diffusion, suggesting the high affinity of MTX with DNA [1,17]. Indeed, the MTX/DNA complex did not demonstrate any SERS scattering (Fig. 1A, spectrum 3). When 1  $\mu$ M double-stranded DNA was added to about 0.5  $\mu$ M MTX-treated cells (Fig. 1A, spectrum 4), a complete extinction of the SERS diffusion was observed due to the drug intercalation in double-stranded DNA. This result clearly demonstrated that MTX spectra from MTX-treated cells came from the membrane.

The location of silver colloid grains was analyzed by confocal microscopy in reflection mode to confirm the exclusive MTX/membrane analysis in SERS spectroscopy (Fig. 2). By merging fluorescence and reflection images we could notice that silver colloids were exclusively located around the plasma membrane. The affinity of the colloid with phospholipidic bilayer was sufficient to enhance the MTX SERS diffusion around the plasma membrane.

#### SERS spectra of MTX-treated HCT-116 S and R

MTX SERS intensities of MTX-treated HCT-116 S and HCT-116 R were compared. The variation coefficient (VC) of MTX Raman enhancement was calculated on the 1250–1350  $\text{cm}^{-1}$  area band on three different cell batches and was estimated to be about 30% for MTX-treated sensitive cells and 17% for resistant cells, concluding that the difference of MTX Raman diffusion between resistant and sensitive cells was significant ( $p < 0.01$ ). Moreover, tests with other colloidal batches demonstrated a reproducible VC between both cell lines. Each cell type was treated with 0.5  $\mu$ M MTX for 1 h at 37  $^{\circ}$ C, trypsinated, and washed twice in MTX-free RPMI at 4  $^{\circ}$ C (Fig. 1B, spectra 1 and 2). For HCT-116 R, the SERS intensity was threefold higher than for HCT-116 S. Both cell lines showed no spectral modification in comparison with free MTX spectrum and a complete extinction of the SERS diffusion in presence of extracellular DNA was observed (Fig. 1B, spectrum 3).

The influence of drug concentration during treatment was studied as well. The two cell types were incubated in increased MTX concentrations (0.1–2  $\mu$ M) for 1 h at 37  $^{\circ}$ C (Fig. 3, graph 1). Each reported measurement corresponded to SERS integrated intensity (a.u.) between 1250 and 1350  $\text{cm}^{-1}$ . For HCT-116 R (curve ■), the MTX SERS intensity increased as a function of the concentration, up to a maximum around 1.5  $\mu$ M, and was threefold higher than that for HCT-116 S (curve ▲). The inset figure (logarithmic curve ●) in Fig. 3 showed the relation between SERS intensity and the MTX concentration in aqueous solution.

The incubation time influence of MTX-treated cells was studied. Both cellular types were treated with 2  $\mu$ M

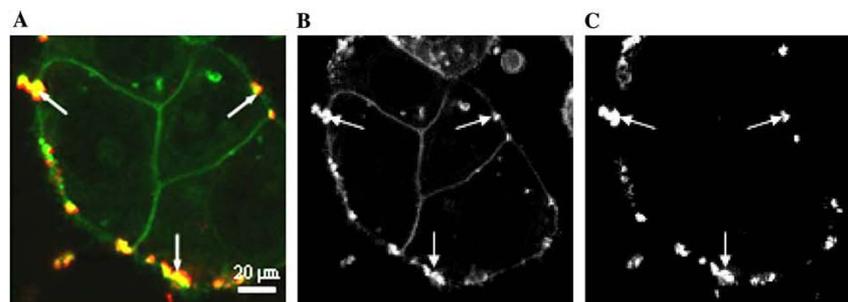


Fig. 2. Confocal microscopy images showing silver colloid in contact with MTX-treated resistant cells (yellow spots). The image is the result of two merged images: the first obtained by collecting MTX fluorescence emission (a partial reflection of silver colloid particles was also displayed) (in green color), and the second from exclusive reflection of silver colloidal particles (in red color). Experimental conditions, resistant cells were treated with 5  $\mu\text{M}$  MTX for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  before addition of pre-aggregated colloid. Laser excitation was fixed at 568 nm for fluorescence collection and at 488 nm for light reflection. MTX emission and colloidal reflection were collected through a 680 nm band-pass filter. Each image corresponds to  $512 \times 512$  pixels, each of  $0.1 \times 0.1 \mu\text{m}^2$  size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

MTX during variable times (0–60 min) at 37  $^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3, graph 2). For HCT-116 R (curve ■), an increase of the drug SERS diffusion was observed and followed a line function with a threefold superior slope to HCT-116 S (curve ▲). This significant difference of SERS intensity between both cell lines was already observed after 15 min incubation.

#### Modulation of MTX-membrane adsorption

The MTX release from the membrane microenvironment was carried out at 4  $^{\circ}\text{C}$  to block the BCRP efflux pump to reveal differences of drug affinity with membrane bilayer. Both cell types were incubated in 2  $\mu\text{M}$  MTX for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  and washed before addition of MTX-free RPMI at 4  $^{\circ}\text{C}$  (Fig. 4). After 15 min at 4  $^{\circ}\text{C}$  in MTX-free RPMI, a rapid decrease of the SERS intensity was observed for HCT-116 R (curve ■). In contrast, a limited modification of the SERS intensity occurred after washing for HCT-116 S (curve ▲). The observed decrease of SERS diffusion in resistant cells corresponded to a MTX release out of the membrane microenvironment. The threefold higher Raman enhancement in HCT-116 R was interpreted as an unstable MTX-bound site on plasma membrane of resistant cells. After 1 h in MTX-free RPMI, no significant difference in SERS intensity was observed for both cell types. The observed enhanced fraction of MTX could originate from a residual MTX on a stable site common in both sensitive and resistant cells.

To compromise the drug affinity with plasma membrane, the effect of BA, a membrane fluidizer, was compared on both cellular types. Cells were pre-treated in 30 mM BA for 10 min before incubating in 2  $\mu\text{M}$  MTX for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  (Fig. 5). HCT-116 R spectra showed a threefold decrease of MTX SERS diffusion when cells were pre-treated with BA (Fig. 5A). A pre-

incubation in BA did not affect the MTX SERS intensity for HCT-116 S (Fig. 5B). Finally, addition of BA induced the disappearance of the unstable MTX-bound site in resistant cells, whereas the residual MTX SERS diffusion may have been dependent on another common site in sensitive and resistant cells.

#### Fluorescence confocal microscopy

Fluorescence confocal microscopy was performed in HCT-116 cells to validate the hypothesis demonstrating a membrane location of the drug. Both cell types were treated with 5  $\mu\text{M}$  MTX for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After washing in MTX-free RPMI at 4  $^{\circ}\text{C}$ , cells were observed with confocal microscopy (Fig. 6), and images of each cell type were recorded before (Figs. 6A and C) and 60 min (Figs. 6B and D) after an incubation in MTX-free medium at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Regarding HCT-116 S (Fig. 6A), drug fluorescence emission in cytoplasm and nucleoli was high and no emission of MTX in the membrane microenvironment was noted. Neither modification of intensity nor location of fluorescence was observed after 60 min at 4  $^{\circ}\text{C}$  (Fig. 6B). The drug fluorescence from MTX-treated HCT-116 R was clearly located around the plasma membrane (white arrows) (Fig. 6C). After 60 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ , resistant cells (Fig. 6D) displayed less marked membrane borders and partially disappeared. The observed fluorescent MTX borders confirmed differences of the drug adsorption around the plasma membrane of resistant cells, as previously presented by SERS spectroscopy.

#### Discussion

Membrane lipid changes between sensitive and resistant cells have been described to be associated with

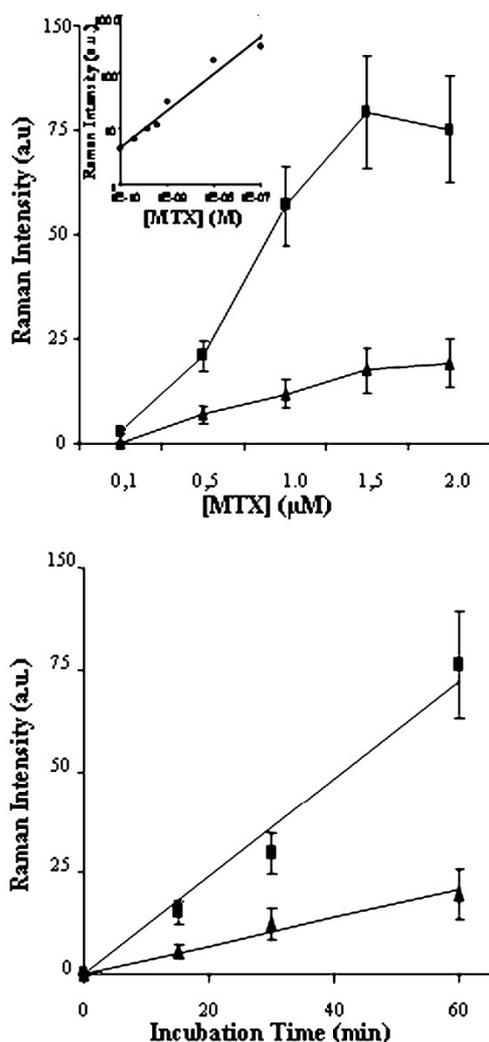


Fig. 3. Comparison of SERS intensities of resistant (■) or sensitive (▲) cells in respect to, (1) influence of the MTX concentration (0.1–2.0  $\mu\text{M}$  MTX for 1 h at 37°C); (2) influence of incubation time (2  $\mu\text{M}$  MTX for 0–60 min at 37°C). Each reported value (a.u.) corresponds to the integrated intensity of SERS spectra between 1250 and 1350  $\text{cm}^{-1}$ . Experimental conditions, about  $10^6$  cells were used, for each spectrum; 180 mW laser power (514 nm of  $\text{Ar}^+$  line) at sample and 20 accumulations of 3 s each. Results are the mean values of three experiments,  $\pm\text{SD}$ ,  $p < 0.01$ . (Inset) Standard range of MTX obtained by SERS spectroscopy (logarithmic scale). Conditions are the same as above.

MDR phenotype [12,18]. Unsaturated phosphatidylcholine and phosphatidylserine are crucial to restore Pgp ATPase activity, while saturated phosphatidylethanolamine is most effective in activating the ATPase [19]. Intriguingly, changes in cholesterol and glucosylceramide rates seem to depend on the considered MDR cell line [12,19]. Most studies have reported that drug-resistant cells exhibit an increase in membrane fluidity. Other studies have suggested the opposite (see [19] and

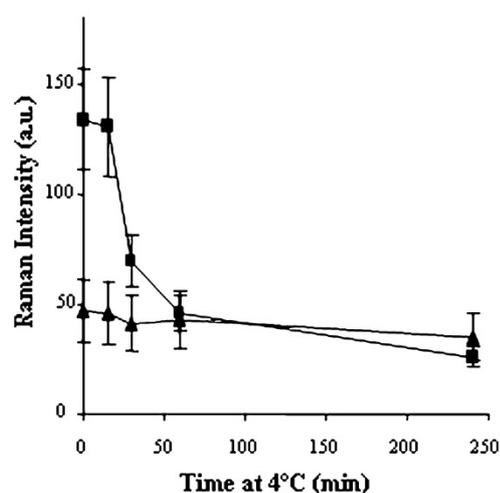


Fig. 4. Modification of MTX adsorption on membrane in a 4°C medium for resistant (■) or sensitive (▲) cells, by SERS spectroscopy. Each reported value (a.u.) corresponded to the integrated intensity of SERS spectra between 1250 and 1350  $\text{cm}^{-1}$ . Experimental conditions, about  $10^6$  cells were incubated in 2  $\mu\text{M}$  MTX for 1 h at 37°C and washed in MTX-free RPMI at 4°C for different times (0–240 min); in each case, 180 mW laser power on sample and 20 accumulations of 1 s each. Results are the mean values of three experiments  $\pm\text{SD}$ ,  $p < 0.01$ .

quotes therein): studies of fluorescence anisotropy, using the dye 1-[4-trimethylammonium-phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH), have revealed a reduced mobility of acyl chains of membrane for resistant CHO cells compared to parental lines [12]. Furthermore, it has been shown by Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy that changes of membrane fluidity could lead to an accumulation of hydrophobic chromophores or antitumor drugs on the phospholipidic bilayers [20,21]. Regev et al. have described the uptake of doxorubicin via erythrocyte ghosts and studied many features of the plasma membrane [22,23]. The addition of DNA to erythrocyte ghosts has induced a quenching of the doxorubicin fluorescence emission. Movements of doxorubicin across the phospholipidic bilayer have been described as being a massive binding to plasma membrane, a long adsorption on the membrane associated with acid phospholipids, a flip-flop across the two leaflets, and a quick balance with the aqueous medium. They suggested membrane-bound doxorubicin was bound to acid groups of phospholipids according to the amphipathic nature and to the electrostatic attraction of the drug amino groups. Moreover, Eytan et al. [13] have calculated with reconstituted lipid bilayers that the binding coefficient, representing the lipid bilayer/aqueous medium ratio of the drug concentration, was about 450 for MTX, against 155 and 112 for doxorubicin and rhodamine 123, respectively. The intracellular accumulation decrease of a cytotoxic compound could be

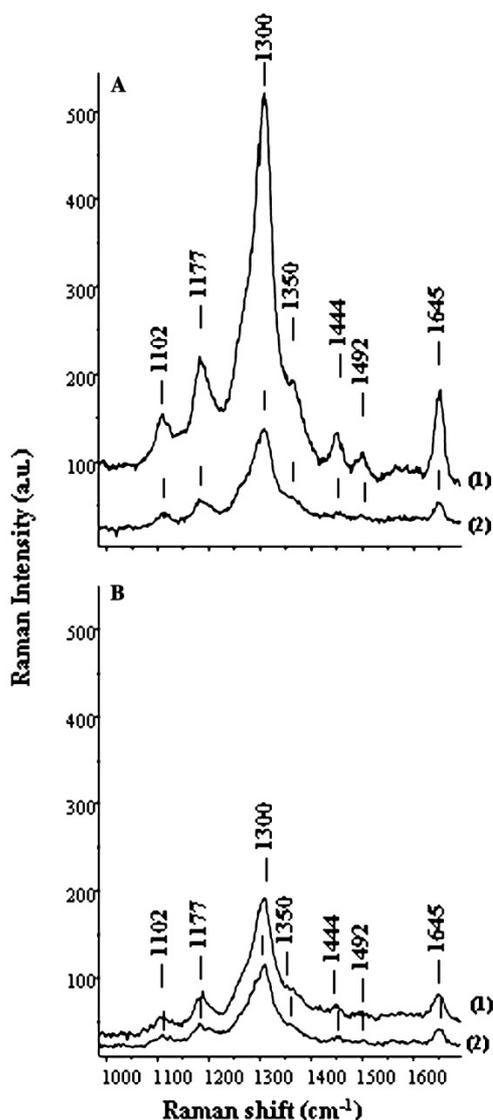


Fig. 5. Effect of BA, a membrane fluidizer, on SERS spectra of  $2 \mu\text{M}$  MTX-treated resistant (A) and sensitive (B) cells: pre-incubated (2) or not (1) with  $30 \mu\text{M}$  BA for 10 min at  $37^\circ\text{C}$ . Experimental conditions, about  $10^6$  cells were used; in each case, 180 mW laser power on sample and 20 accumulations of 1 s each.

due to a slower drug diffusion across the membrane, independently of the active transport mediated by efflux pumps.

In our study, MTX-treated HCT-116 S displayed drug SERS intensity after washing. In order to determine the SERS diffusion origin, addition of duplex DNA in the extracellular medium showed a total extinction of MTX Raman intensity for sensitive and for resistant cells. This quenching of SERS intensity in drug/DNA complexes was interpreted as the consequence of the high affinity of MTX with DNA duplex

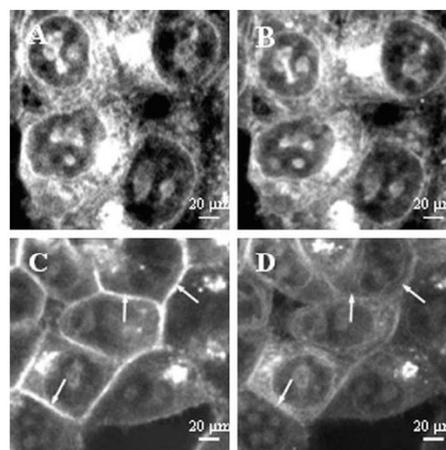


Fig. 6. Confocal fluorescence microscopy images of MTX emission in sensitive (A,B) and resistant (C,D) cells. After MTX incubation (A,C) cells were washed in MTX-free medium, and observed after 60 min at  $4^\circ\text{C}$  (B,D). An exclusive MTX emission around plasma membrane of resistant cells (white arrows) disappeared after 60 min in MTX-free RPMI at  $4^\circ\text{C}$ . Experimental conditions, each cell type was treated with  $5 \mu\text{M}$  MTX for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , and washed in MTX-free RPMI for 60 min. Laser excitation was fixed at 568 nm and MTX emission was collected through a 680 nm band-pass filter. Each image corresponds to  $512 \times 512$  pixels, each of  $0.1 \times 0.1 \mu\text{m}^2$  size.

and of a decrease of the drug accessibility by the silver colloid in this complex [8]. In our study, the addition of DNA duplex to living cells induced a SERS quenching and revealed a movement of MTX from the membrane microenvironment to the double-stranded DNA. This observation validated an exclusive membrane origin of SERS intensity in MTX-treated cells.

The observed difference of MTX Raman intensity between resistant and sensitive lines could be due to a higher adsorption of MTX around the plasma membrane for resistant cells. Results obtained by fluorescence microscopy confirmed this higher MTX adsorption in the HCT-116 R microenvironment.

MTX-treated cells were maintained at  $4^\circ\text{C}$  to inhibit transport mechanisms by efflux pumps. At this temperature MTX-treated HCT-116 S displayed a weak change of the drug Raman diffusion. In contrast, a fast extinction of SERS intensity of resistant cells was observed during the first 30 min in a MTX-free medium, preceding equivalent SERS intensity between both cell types after 1 h. The sudden decrease of MTX Raman intensity for HCT-116 R could correspond to a quick drug release from an unstable site on plasma membrane towards the extracellular medium. Regarding the two cell lines the observed residual SERS intensity suggested a second common site, suggesting a better stability of MTX on plasma membrane. Furthermore, cell lines were pre-incubated with BA to increase the membrane permeability towards MTX. A high decrease of the MTX SERS intensity was observed for HCT-116 R, in contrast with

sensitive cells. This decrease of SERS intensity could be indirectly related to a disruption of the membrane microenvironment of HCT-116 R and could speed up the MTX flip-flop. Several studies have revealed that the use of membrane fluidizers, such as BA, inhibited efflux mediated proteic pumps [1,22] and increased the outside-in drug flip-flop. The increase of the membrane fluidity of HCT-116 R showed no adsorption on the unstable membrane site, which was specific to resistant cells.

In conclusion, SERS spectroscopy appears as a very informative method for the study of drug binding to the plasma membrane of living cells. Resistant cells should present a supplementary binding site of drug, revealing a higher drug adsorption in their membrane microenvironment. Further studies will concern the modification of the membrane microenvironment to modulate the drug transport across plasma membrane of HCT-116 R.

### Acknowledgments

The authors thank L. Candeil and B. Pau from the laboratory Génomique Fonctionnelle et Pharmacologie des Tumeurs CNRS UMR 5094 CRLC, Montpellier, France, for establishing BCRP/MXR resistance on HCT-116.

### References

- [1] R. Regev, Y.G. Assaraf, G.D. Eytan, Membrane fluidization by ether, other anesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 18–24.
- [2] P.J. Butler, T.C. Tsou, J.Y. Li, S. Usami, S. Chien, Rate sensitivity of shear-induced changes in the lateral diffusion of endothelial cell membrane lipids: a role for membrane perturbation in shear-induced MAPK activation, *FASEB J.* 16 (2002) 216–218.
- [3] J.M. Boon, B.D. Smith, Facilitated phosphatidylcholine flip-flop across erythrocyte membranes using low molecular weight synthetic translocases, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 6221–6226.
- [4] R. Chaloupka, T. Obsil, J. Plasek, F. Sureau, The effect of hypericin and hypocrellin-A on lipid membranes and membrane potential of 3T3 fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1418 (1999) 39–47.
- [5] J.A. Hamilton, Fatty acid transport: difficult or easy? *J. Lipid Res.* 39 (1998) 467–481.
- [6] I. Nabiev, G.D. Chumanov, R.G. Efremov, Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of biomolecules. Part II. Application of short- and long-range components of SERS to study of the structure and function of membrane proteins, *J. Raman Spectrosc.* 21 (1990) 49–54.
- [7] G. Breuzard, J.M. Millot, J.F. Riou, M. Manfait, Selective interactions of ethidium with G-quadruplex DNA revealed by surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4305–4311.
- [8] N.G. Abdulaev, I.R. Nabiev, R.G. Efremov, G.D. Chumanov, Retinal Schiff base position relative to the surfaces of photoreceptor disk, *FEBS Lett.* 213 (1987) 113–118.
- [9] L.C. Young, B.G. Camping, S.P. Cole, R.G. Deeley, J.H. Gerlach, Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1798–1804.
- [10] Y. Chen, A.C. Pant, S.M. Simon, P-glycoprotein does not reduce substrate concentration from the extracellular leaflet of the plasma membrane in living cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 7763–7769.
- [11] J.D. Allen, A.H. Schinkel, Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 427–434.
- [12] A.B. Hendrich, K. Michalak, Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells, *Curr. Drug Targets* 4 (2003) 23–30.
- [13] G.D. Eytan, R. Regev, G. Oren, Y.G. Assaraf, The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12897–12902.
- [14] M.F. Lecompte, G. Laurent, J.P. Jaffrezou, Sphingomyelin content conditions insertion of daunorubicin within phosphatidylcholine monolayers, *FEBS Lett.* 525 (2002) 141–144.
- [15] P.J. Butler, G. Norwich, S. Weinbaum, S. Chien, Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280 (2001) C962–969.
- [16] J. Shen, Y. Ye, J. Hu, H. Shen, Z. Le, Surface-enhanced Raman spectra study of metal complexes of *N*-D-glucosamine betanaphthaldehyde and glycine and their interaction with DNA, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 57 (2001) 551–559.
- [17] I. Nabiev, A.V. Baranov, I. Chourpa, A. Beljebbar, G.D. Sockalingum, M. Manfait, Does adsorption on the surface of a silver colloid perturb drug/DNA interactions? Comparative SERS, FT-SERS, and resonance Raman study of mitoxantrone and its derivatives, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 1608–1613.
- [18] J.H. Dolderer, G. Zimmer, B.G. Woodcock, H. Bockhorn, R. Bickeboller, H. Schuldes, Resistance modulation in CHO cells by R-verapamil and bile salts is associated with physical and chemical changes in the cell membrane, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38 (2000) 196–203.
- [19] Y. Lavie, M. Liscovitch, Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences, *Glycoconj. J.* 17 (2000) 253–259.
- [20] H. Schuldes, J.H. Dolderer, G. Zimmer, J. Knobloch, R. Bickeboller, D. Jonas, B.G. Woodcock, Reversal of multidrug resistance and increase in plasma membrane fluidity in CHO cells with R-verapamil and bile salts, *Eur. J. Cancer* 37 (2001) 660–667.
- [21] C. Heywang, M. Saint-Pierre Chazalet, C.M. Masson, J. Bolard, Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers: a surface-enhanced resonance Raman scattering study, *Biophys. J.* 75 (1998) 2368–2381.
- [22] R. Regev, G.D. Eytan, Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes, *Biochem. Pharmacol.* 54 (1997) 1151–1158.
- [23] F. Frezard, A. Garnier-Suillerot, Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells, *Eur. J. Biochem.* 196 (1991) 483–491.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Biochemical and Biophysical Research Communications 329 (2005) 64–70

BBRC

[www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Changes in adsorption and permeability of mitoxantrone on plasma membrane of BCRP/MXR resistant cells

G. Breuzard<sup>a</sup>, O. Piot<sup>a</sup>, J.-F. Angiboust<sup>a</sup>, M. Manfait<sup>a</sup>, L. Candeil<sup>b</sup>,  
M. Del Rio<sup>b</sup>, J.-M. Millot<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unité MéDIAN CNRS UMR 6142, IFR 53, UFR de pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

<sup>b</sup> Génomique Fonctionnelle et Pharmacologie des Tumeurs CNRS UMR 5160, CRLC Val d'Aurelle Bâtiment Recherche, 35 rue de la Croix Verte, 34298 Montpellier Cedex 5, France

Received 18 January 2005

Available online 2 February 2005

### Abstract

A selective analysis of adsorbed mitoxantrone (MTX) was performed by surface-enhanced Raman scattering (SERS) at the range of cellular membrane. Disruption of the membrane fluidity was carried out to appraise changes in membrane adsorption of MTX and drug uptake in sensitive (HCT-116 S) and resistant BCRP/MXR (HCT-116 R) cells. Based on spectral MTX modifications, micro-SERS spectroscopy discriminated clearly drug adsorption phenomena on plasma membrane from drug in solution. A 3-fold higher SERS intensity of MTX for HCT-116 R was observed concluding to a higher drug adsorption on resistant membrane. The increase of membrane fluidity with benzyl alcohol (BA) or chloroform (CF) resulted in a 3-fold decrease of MTX adsorption on HCT-116 R, exclusively. BA and CF improved intracellular accumulation of MTX (e.g., 823 and 191 pmol MTX/10<sup>6</sup> HCT-116 R incubated with or without BA). At 4 °C, drug accumulation measurements showed a decrease of MTX permeability in resistant membrane (42 pmol MTX/10<sup>6</sup> cells), restored with fluidizers (e.g., 342 pmol MTX/10<sup>6</sup> cells with BA). Fluorescence confocal microscopy involved an exclusive MTX emission around the plasma membrane of resistant cells whereas fluidizers increased the intracellular uptake of MTX in both cell lines at the same time with less drug emission around the plasma membrane. Changes of the membrane structure of resistant cells should modify both drug adsorption and membrane permeation.

© 2005 Published by Elsevier Inc.

**Keywords:** Mitoxantrone; Plasma membrane; Higher adsorption; Resistance; SERS

Optimization of drug influx and limitation of its efflux across the membrane barrier are two most important targets to increase the efficacy of chemotherapeutic drugs [1]. Drug resistance remains one of the primary causes of suboptimal outcomes in cancer therapy [2]. The multi-drug resistance (MDR) was determined with an efflux protein overexpression as the breast cancer resistant protein (BCRP) and changes of lipid composition. The decrease of intracellular accumulation of cytotoxic drugs could be dependent on a slower drug uptake

through the plasma membrane [3]. Two different mechanisms were proposed to account for the solute permeation across lipid membranes such as (i) the diffusion through transient pores or defects in the membranes and (ii) partitioning into the hydrophobic phase of the bilayer followed by diffusion to the opposite side of the membrane [4].

A transfer step over the plasma membrane of most anticancer drugs implicates adsorption, insertion, and flip-flop that can be distinguished as consecutive stages in the transbilayer movements [5–7]. Hydrophobic interactions, membrane fluidity, and drug lipophilicity are decisive for efficient intracellular uptake of anticancer drugs [8,9]. Anthracyclines and mitoxantrone (MTX)

\* Corresponding author. Fax: +33 3 26 91 35 50.

E-mail address: [jm.millot@univ-reims.fr](mailto:jm.millot@univ-reims.fr) (J.-M. Millot).

are probably the best-studied examples in drug-membrane interactions [10–12]. Different agents fluidizing membrane (anesthetics, chloroform, neutral mild detergents, and certain MDR-type drugs) have been described to modulate the uptake of doxorubicin [7,13]. Regev et al. concluded the transbilayer movement of the drug was only correlated with membrane fluidity and indicated that the step limiting the movement rate was located in the membrane matrix. Thus, the relation between drug adsorption in a cellular resistance model [12] and the intracellular uptake still remains unclear.

We have previously reported the higher mitoxantrone adsorption on the plasma membrane of resistant cells compared to its sensitive strain by surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy [12]. Indeed, this method revealed to be a selective analysis of drug adsorption on membrane due to both high sensitivity ( $10^{-10}$  M drug) and to the exclusive analysis of drug near a surface. SERS is based on the enhancement by several orders of magnitude (up to  $10^9$  [14]) of the Raman intensity of molecules in the vicinity of a roughened metallic surface. This study aims to bring details about parameters allowing a modulation of membrane permeation of sensitive (HCT-116 S) and resistant BCRP/MXR (HCT-116 R) cells with fluidizers benzyl alcohol and chloroform. In addition, a relation between the drug adsorption on plasma membrane and its intracellular uptake in living cells will be proposed through the disruption of the membrane fluidity.

## Materials and methods

**Cell lines.** HCT-116 colon adenocarcinoma cell line was purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA). The following cell types were routinely grown as monolayers in RPMI 1640 medium with Glutamax-1 (Gibco, UK) containing 10% fetal calf serum (Gibco, UK) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and underwent trypsinization (trypsin EDTA (1×) in HBSS W/O CA&MG W/EDTA. 4NA, stored at -20 °C, Gibco, UK). The parental cell line was first cloned to obtain a reference SN38 sensitive clone, referred to as HCT-116 S. A continuous exposure of HCT-116 S to SN38 was carried out with stepwise increased concentrations ranging from 1 to 15 nM over a period of about 8 months. The cell population growing in 15 nM SN38 generated the HCT-116 R clone and overexpressed BCRP efflux proteins. A sulforhodamine test was determined after a 72 h treatment with mitoxantrone, and an IC<sub>50</sub> of 2.8 and 11.1 nM was measured, respectively, for HCT-116 S and HCT-116 R.

**Drug and chemicals.** Mitoxantrone (MTX) and synthetic fluidizers benzyl alcohol (BA) and chloroform (CF) were purchased from Sigma (St. Louis, USA, MW<sub>MTX</sub> = 517.4, MW<sub>BA</sub> = 108, and MW<sub>CF</sub> = 119.38). For SERS experiments, Ag sols were prepared as described by Lee and Meisel [15]. A 90 mg sample of AgNO<sub>3</sub> (ALFA, MW = 169.87) was suspended in 500 ml quartz-distilled water, purged with pure N<sub>2</sub>, and heated to 100 °C. Ten milliliters of a 1% solution of sodium citrate (Sigma, USA, MW = 258.1), purged with N<sub>2</sub>, was added dropwise to the boiling solution under vigorous stirring. The solution was kept boiling for 60–90 min. The absorption curve of the brownish suspension showed a maximum at 415 nm. One molar solution of NaClO<sub>4</sub> (Sigma, St. Louis, USA, MW = 122.4), MgSO<sub>4</sub>

(Sigma, St. Louis, USA, MW = 120), or NaCl (Prolabo, MW = 58.44) were used to aggregate Ag sols.

**SERS spectroscopy.** Micro-SERS experiments were performed with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon), using a Titanium-Sapphire laser (Spectra Physics) tuned at 785 nm as excitation source. The microspectrometer is equipped with an Olympus model microscope and the measurements were recorded with a 100× objective (NA = 0.9) suitable for near infrared light. A 10<sup>4</sup> attenuating filter was inserted in the beam path to irradiate a single colloid aggregate by 20 μW. As dispersive element, the Labram microspectrometer is equipped with a holographic grating of 950 lines/mm giving a spectral resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. Micro-SERS spectra were recorded from 200 to 1800 cm<sup>-1</sup>, with an acquisition time of 10 s. Macro-SERS spectra were obtained with an OMARS 89 spectrometer (DILOR, France). The diffraction was assured by a 1800 line/mm grating that allowed the analysis of a spectral window of about 400 cm<sup>-1</sup> at a time. The detection system was constituted of 512 photodiodes coupled with a light amplifier. The excitation used for SERS experiments was the 514.6 nm line of an Ar<sup>+</sup> laser (Spectra Physics 2020-03 model). The theoretical spectral resolution was determined at 0.83 cm<sup>-1</sup>. The spectrometer was linked to a computer, which allowed acquisition and mathematical processing of spectra with homemade software. The laser power was about 400 mW at samples. In these conditions, no contribution of Raman scattering from cells was observed.

A first series of tests determined aggregation conditions of silver colloid. Drug and cells were analyzed with isotonic Ag sols (diluted at V/V 30%, pH 7), aggregated by salts NaClO<sub>4</sub>, or MgSO<sub>4</sub>, or finally NaCl ([salt]<sub>final</sub> = 0.1 M). NaCl salts allowed the highest Raman scattering. Different colloidal batches were tested with 10<sup>-8</sup> M MTX and showed a reproducible drug Raman enhancement, validating a homogeneous colloidal preparation.

For micro-SERS experiments, cellular strains were treated with 2 μM MTX for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and washed twice with MTX-free RPMI medium (Gibco, UK). Each cell line was mixed with 500 μl isotonic aggregated colloid (pH 7). Colloid aggregates and cell culture were first visualized with a video camera. Stable aggregates, localized on cell surface, were irradiated one at a time with the laser beam. Each spectrum of MTX was obtained in focusing the laser line on one colloid grain in contact with the cell membrane. Presented spectra were representative of a series of five reproducible spectra of MTX-treated cells. In these conditions, no contribution of Raman scattering from untreated cells was observed. A control with 10<sup>-9</sup> M MTX in solution was performed in focusing the laser line on a colloid grain in contact with the bottom of the petri dish.

For macro-SERS experiments, each cell type was treated with 2 μM MTX for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, trypsinated, and washed twice with MTX-free RPMI medium (Gibco, UK) (3 min at 1000 rpm). Each population of cells was suspended in 50 μl isotonic aggregated colloid (pH 7) for SERS spectroscopy analysis. The viability of cells analyzed with silver hydrosol was checked by microscopy with 0.1% trypan blue test determining the cellular death percentage that was less than 0.5%. Each cell type was incubated in 1 mM BA or 1 mM CF for 10 min as described previously [16] to study the permeability influence of the plasma membrane on MTX adsorption preceding a treatment with 2 μM MTX for 1 h at 37 °C under a hydrated atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. For each analysis series, a standard test with 10<sup>-8</sup> M MTX validated the correct feature of the aggregated colloid. Each presented spectrum was a medium spectrum of 10<sup>6</sup> MTX-treated cells resulting from 20 accumulations of 3 s each and was representative of a series of three reproducible spectra of three different cell batches. For different graphs (Fig. 2), each reported measurement corresponded to the band area (1250 and 1350 cm<sup>-1</sup>) of SERS average spectrum. Significance of results was determined by Student's *t* test. The level of significance chosen was 99% (*P* < 0.01).

**Confocal fluorescence microscopy.** Fluorescence microscopy was performed using an MRC-1024 confocal system (Bio-Rad, Micro-science, Hemel Hempsted, UK). The scanning confocal system was

coupled with an Optiphot epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan), equipped with a 60 $\times$  magnification water immersion objective of numerical aperture NA = 1.4. Experiments were performed with a Kr<sup>+</sup>/Ar<sup>+</sup> laser at 568 nm. MTX emission was collected through a 680 nm band-pass filter. Cell types were treated with 5  $\mu$ M MTX, with or without an incubation with 10 mM BA or 10 mM CF for 1 h at 37  $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, and washed in MTX-free RPMI medium to locate drug fluorescence emission. Images were recorded with LaserSharp Version 2.1 T (Bio-Rad software) and were calculated with Confocal Assistant (Bio-Rad software). Each image was represented with 512  $\times$  512 pixels of 0.1  $\times$  0.1  $\mu$ m each, and acquired with a Kalman filter to reduce background noise (average on 3 scanning images).

**Spectrophotometric measurements of MTX accumulation.** Intracellular MTX accumulation was quantified in both cell types by spectrophotometric measurements using UVIKON Spectrophotometer (Kontron Instruments, Italy). Five hundred microliters of a cellular lysate was analyzed between 550 and 680 nm with a 50 nm/min speed scanning. A reference range of MTX in solution was carried out between 10<sup>-7</sup> and 10<sup>-5</sup> M concentrations to validate this method. After a linear baseline subtraction, the intracellular uptake of MTX was estimated from the value of drug absorbance spectra at the maximum 622 nm, referred to as a reference range and reported in 10<sup>6</sup> cells. Treated cells were lysed in 1% Triton X-100 (Sigma, USA) for 5 min at room temperature before absorbance reading.

## Results

### Confocal microscopy imaging of MTX

HCT-116 S and R were treated with MTX to observe the cellular layout. The two cell strains were treated with 5  $\mu$ M MTX for 1 h at 37  $^{\circ}$ C in a hydrated atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After washing in MTX-free

RPMI at 4  $^{\circ}$ C, cells were observed by confocal microscopy (Fig. 1). Image of MTX-treated HCT-116 S displayed a high fluorescence emission in cytoplasm and nucleoli. In contrast, the MTX fluorescence distribution in HCT-116 R mainly located around the plasma membrane in spite of several plotted organelles.

MTX-treated HCT-116 S and R were incubated with 10 mM benzyl alcohol (BA) or chloroform (CF) in the same conditions to observe the effect of fluidizers on MTX intracellular layout. For HCT-116 S, a slight increase of MTX emission was observed. Compared to their control MTX-treated HCT-116 R incubated with BA or CF revealed clearly a higher MTX fluorescence emission in nuclei and cytoplasm. In addition, BA and CF slightly decreased the MTX fluorescence emission next to the plasma membrane.

### Modulation of MTX influx

A quantification of the intracellular MTX was performed in both cell types to determine the influence of fluidizers on the MTX influx. HCT-116 S and R were treated with 5  $\mu$ M MTX with or without 10 mM BA or CF for 1 h at 37  $^{\circ}$ C in a hydrated atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> preceding an optical density analysis at 622 nm (Fig. 2, graph 1). At 37  $^{\circ}$ C, the intracellular accumulation of MTX in HCT-116 S showed a 2.5-fold higher MTX accumulation (about 447  $\pm$  67 pmol/10<sup>6</sup> cells) in comparison with that in HCT-116 R (about 191  $\pm$  28 pmol/10<sup>6</sup> cells). An incubation of MTX-treated HCT-116 S with BA or CF revealed a 1.9- and

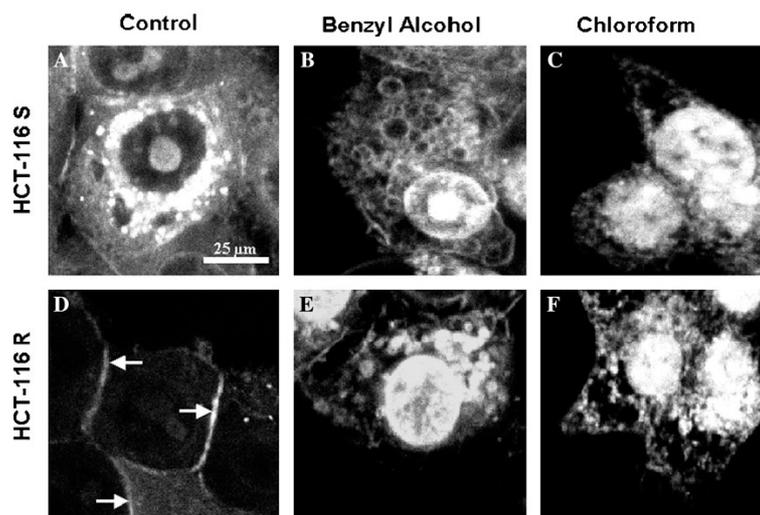


Fig. 1. Confocal fluorescence microscopy images of MTX emission in sensitive HCT-116 S (A–C) and resistant HCT-116 R (D–F) cells. Each cell type was incubated with MTX (A, D) and fluidizers benzyl alcohol (B, E) or chloroform (C, F). An exclusive MTX emission around plasma membrane of resistant cells (white arrows) is observed whereas fluidizers increase the intracellular uptake of MTX in both cell lines at the same time with a less MTX emission around the plasma membrane. Experimental conditions: each cell type was treated with 5  $\mu$ M MTX for 1 h at 37  $^{\circ}$ C and incubated with 10 mM benzyl alcohol or chloroform; laser excitation was fixed at 568 nm and MTX emission was collected through a 680 nm band-pass filter. Each image corresponds to 512  $\times$  512 pixels, each of 0.1  $\times$  0.1  $\mu$ m<sup>2</sup> size.

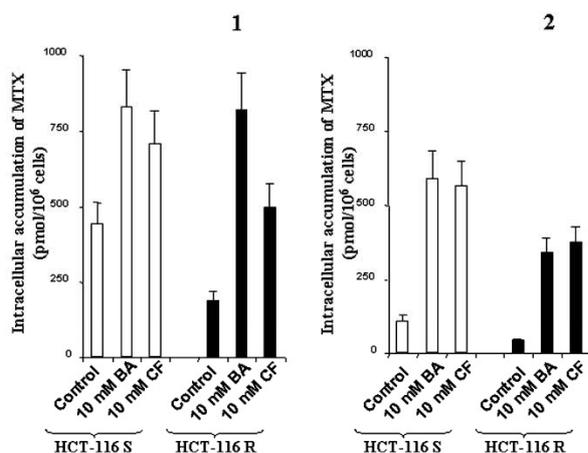


Fig. 2. Improved effects of fluidizers benzyl alcohol or chloroform on MTX influx in sensitive (HCT-116 S) and resistant (HCT-116 R) cells at 37 °C (graph 1) or 4 °C (graph 2). Experimental conditions: each cell type was treated with 5  $\mu$ M MTX with or without 10 mM benzyl alcohol or chloroform for 1 h either at 37 °C or at 4 °C to block BCRP activity and to decrease the natural fluidity of plasma membrane. Each value was obtained by absorbance reading at 622 nm; the intracellular concentration of MTX was calculated from a range standard and reported in pmol/10<sup>6</sup> cells. Results are mean values of three experiments  $\pm$  SD.  $P < 0.01$ .

1.6-fold higher drug accumulation, respectively. MTX-treated HCT-116 R incubated with BA or CF showed a 4.3- and 2.6-fold increase of the intracellular MTX accumulation, respectively.

An incubation of both cell lines with 5  $\mu$ M MTX for 1 h was carried out at 4 °C to inhibit efflux pump BCRP and to rigidify phospholipidic bilayer (Fig. 2, graph 2). At 4 °C the same 2.5-fold factor of intracellular MTX accumulation was observed between resistant (42  $\pm$  6 pmol/10<sup>6</sup> cells) and sensitive (115  $\pm$  17 pmol/10<sup>6</sup> cells) cells compared at 37 °C. Thus, this result allowed us to conclude that the difference of MTX intracellular accumulation between these two cell strains was not exclusively dependent on efflux protein overexpression. Moreover, a 5.2- and 4.9-fold increase of MTX accumulation in HCT-116 S incubated with BA or CF was observed, respectively. At the same time, an 8.1- and 9-fold higher MTX accumulation in HCT-116 R incubated with BA or CF, respectively. The increase factor of MTX accumulation was higher with fluidizers for resistant cells than for its sensitive strain. Fluidizers antagonize rigidified effect of temperature on membrane behavior at 4 °C. Results confirmed observations of increased fluorescence emission of intracellular MTX by confocal microscopy.

#### Modulation of MTX adsorption for the plasma membrane

The SERS method was applied to characterize an adsorption of MTX on a cellular membrane. A specific

drug interaction with the plasma membrane could be demonstrated by differences of SERS spectra compared to MTX in solution. Each spectrum of MTX was obtained by micro-SERS analysis in focusing the laser line on one colloid grain in contact with the membrane of treated cells. HCT-116 S were incubated in 2  $\mu$ M MTX for 1 h at 37 °C, washed twice in drug-free RPMI, and mixed with isotonic pre-aggregated colloid before micro-SERS analysis (Fig. 3). Modifications of the 475 and 517  $\text{cm}^{-1}$  bands were observed for membrane-adsorbed MTX spectra (full line in Fig. 3A) compared to drug in solution (dot line in Fig. 3A). Moreover, a significant shift of the 1307  $\text{cm}^{-1}$  band toward 1303  $\text{cm}^{-1}$  was determined for MTX adsorbed with cells (Fig. 3B). The drug spectral fingerprint allowed us to discrim-

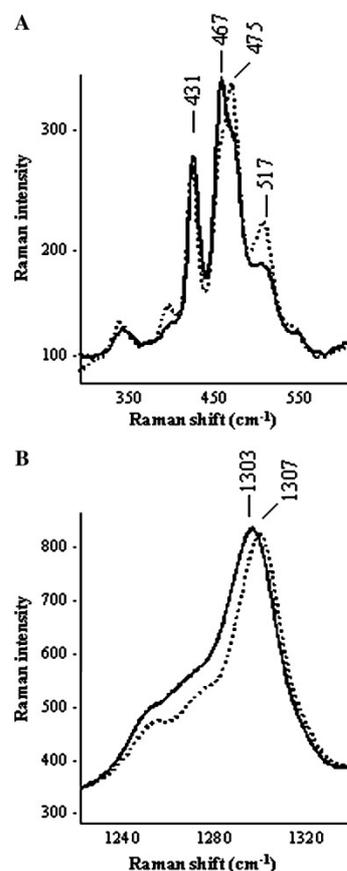


Fig. 3. Discrimination of MTX adsorbed on the plasma membrane of sensitive cells from drug in solution by micro-SERS spectroscopy. SERS spectra of MTX adsorbed on membrane (in full line) and MTX in solution (in dot line) between 300 and 600  $\text{cm}^{-1}$  (A), and between 1220 and 1340  $\text{cm}^{-1}$  (B). Spectra were normalized on the 431  $\text{cm}^{-1}$  band (A) and on the 1177  $\text{cm}^{-1}$  band (B). Experimental conditions: laser line was focused on one colloid grain in contact with cellular membrane or at the bottom of the petri dish for MTX in solution; for each spectrum: 20  $\mu$ W laser power (785 nm of titanium-sapphire line) at sample and 1 accumulation of 10 s.

inate clearly MTX adsorption phenomena on plasma membrane from drug in solution.

Spectral profiles were reproducible whereas a high intensity variability was noticed on whole SERS spectra depending on each nanoparticle size. Thus, next experiments were carried out by macro-SERS spectroscopy on  $10^6$  cells in a 50  $\mu$ l colloid volume, to avoid this variability. In this aim, HCT-116 S and R were incubated in increased MTX concentrations ranging from 0.1 to 2  $\mu$ M for 1 h at 37  $^{\circ}$ C, trypsinated, and washed twice in MTX-free RPMI at 4  $^{\circ}$ C. About  $10^6$  cells were mixed with isotonic pre-aggregated colloid (Fig. 4). A 3-fold higher intensity was observed for MTX-treated HCT-116 R compared to HCT-116 S at each drug concentration. This result involved a tight MTX adsorption in the plasma membrane microenvironment. The variation coefficient (VC) of MTX Raman enhancement was calculated from the 1250 to 1350  $\text{cm}^{-1}$  area band on three different cell batches and was estimated to be about 29% for MTX-treated sensitive cells and 17% for resistant cells, concluding that the difference of MTX Raman diffusion between resistant and sensitive cells was significant ( $P < 0.01$ ). Moreover, tests with other colloidal batches demonstrated a reproducible VC between both cell lines.

BA or CF was added to cells during treatment with MTX to determine the changes in consequences of membrane structure on MTX adsorption. Each cell type was incubated in increased MTX concentrations (0.1–2  $\mu$ M) with 1 mM BA or CF at each time for 1 h at 37  $^{\circ}$ C

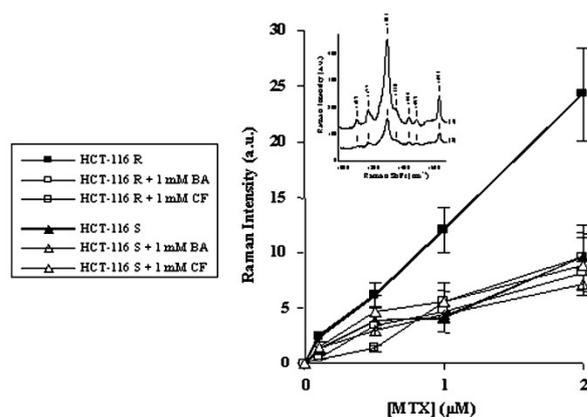


Fig. 4. Influence of the MTX concentration (0.1–2  $\mu$ M MTX for 1 h at 37  $^{\circ}$ C) on drug adsorption on resistant (HCT-116 R) and sensitive (HCT-116 S) cell membrane pre-incubated with or without 1 mM membrane fluidizers benzyl alcohol or chloroform by SERS spectroscopy. Each reported value (a.u.) corresponds to the integrated intensity of SERS spectra between 1250 and 1350  $\text{cm}^{-1}$ . Experimental conditions: about  $10^6$  cells were used, for each spectrum: 400 mW laser power (514 nm of  $\text{Ar}^+$  line) at sample and 20 accumulations of 3 s. each. Results are mean values of three experiments  $\pm$  SD.  $P < 0.01$ . Inset in figure: an average SERS spectrum of  $10^6$  resistant (1) or sensitive (2) cells treated with 1  $\mu$ M MTX 1 h at 37  $^{\circ}$ C.

(Fig. 4). A 3-fold decrease of MTX Raman intensity was observed for MTX-treated HCT-116 R incubated with BA or CF whereas no intensity change for HCT-116 S incubated with BA or CF was observed (see insert in Fig. 4). The difference of MTX Raman diffusion for resistant cells incubated with or without fluidizers was significant ( $P < 0.01$ ). Addition of BA and CF agents resulted in modulating MTX adsorption on the plasma membrane of HCT-116 R, exclusively.

The MTX release from the membrane microenvironment was carried out at 4  $^{\circ}$ C to reveal differences between drug affinity and the membrane bilayer in the absence of BCRP ATPase activity. Each cell type was treated with 2  $\mu$ M MTX with or without 1 mM BA or CF for 1 h at 37  $^{\circ}$ C. Then, cells were washed (time  $T = 0$ ) and added to fluidizer- and MTX-free RPMI at 4  $^{\circ}$ C before SERS analysis (Fig. 5). A rapid decrease of MTX SERS intensity was observed for MTX-treated HCT-116 R from 10 min in MTX-free RPMI whereas no spectral change for MTX-treated HCT-116 S occurred. The observed decrease of SERS diffusion in resistant cells corresponded to a MTX release out of a membrane microenvironment. The higher MTX scattering on HCT-116 R, followed by a rapid drug release from plasma membrane in medium, could reveal a specific adsorption site of MTX. Moreover, a little change of SERS intensities occurred in the presence of fluidizers during the MTX release from the plasma membrane at 4  $^{\circ}$ C. The fluidizer, either BA or CF, should disrupt this specific site exclusively.

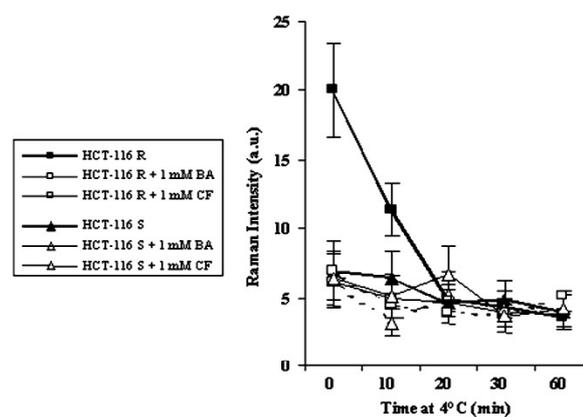


Fig. 5. Release of adsorbed MTX at 4  $^{\circ}$ C from the plasma membrane of HCT-116 R and S pre-incubated with or without membrane fluidizers benzyl alcohol or chloroform. Cells were incubated in 2  $\mu$ M MTX with or without 1 mM benzyl alcohol or chloroform for 1 h at 37  $^{\circ}$ C and at time 0, cells were added to MTX- and fluidizer-free medium for different time laps (0–60 min). Each reported value (a.u.) corresponds to the integrated intensity of SERS spectra between 1250 and 1350  $\text{cm}^{-1}$ . Experimental conditions: about  $10^6$  cells were used, for each spectrum: 400 mW laser power (514 nm of  $\text{Ar}^+$  line) at sample and 20 accumulations of 3 s. each. Results are mean values of three experiments  $\pm$  SD.  $P < 0.01$ .

## Discussion

The interaction of anticancer drugs like doxorubicin or MTX with membranes has been intensively studied with the use of various methods including spectroscopic techniques [11,12,17,18]. The details of drug interactions with plasma membrane are crucial in the understanding of their diffusion kinetics. Membrane lipid changes between sensitive and resistant cells have been described to be associated with MDR phenotype [3,19]. Plasma membrane lipid bilayer reveals a dozen of different lipid species whose distribution is far from homogeneous due to the presence of microdomains such as lipid raft and caveolae [20]. Several studies of fluorescence with TMA-DPH probe have revealed a reduced fluidity of membrane for resistant cells compared to parental lines [3,8]. The intracellular accumulation decrease of a cytotoxic compound could be due to a slower drug diffusion across the membrane, depending on the nature of phospholipidic entities and the bilayer structure [1]. Specific affinities of MTX with membrane components are not well known. Besides, using electron spin resonance (ESR) and fluorescence spectroscopy, Marczak et al. [18] have shown that MTX led to a disturbance in the structure of membrane lipids and proteins on erythrocytes. Thus, MTX may interact with phospholipids or with the negative charged lipids.

We previously reported that an increase of SERS intensity could be attributed to an additional adsorption site for resistant cells, since the difference of 3-fold SERS intensity between MTX-treated HCT-116 R and S rapidly disappeared in a MTX-free medium at 4 °C [12]. These results could correspond to a quick release of MTX from an unstable adsorption site on the plasma membrane of resistant cells, exclusively. This study related the consequences of this additional adsorption site for HCT-116 R to the lower drug uptake. In a medium at 4 °C to inhibit BCRP efflux pump, a cellular incubation in MTX also showed a 2.5-fold lower accumulation of drug in HCT-116 R compared to its sensitive line. Drug permeability differences between resistant and sensitive cells should occur in spite of an efflux mechanism. The source of this permeability difference between both cell lines remains to be defined. Addition of BA or CF produced a high decrease of the MTX SERS intensity for HCT-116 R. The increase of the membrane fluidity affected only the supplementary adsorption site of MTX on resistant cells. In addition, the lower intracellular uptake of MTX in HCT-116 R was widely dependent on cohesion of the plasma membrane, since BA and CF disrupted membrane fluidity speeded up MTX flip-flop. Influx experiments showed that fluidizers increase largely the intracellular accumulation of MTX in both cell lines, irrespective of the temperature of medium. Besides, we have already observed BA or CF inhibit the MTX efflux on HCT-116 R (data not shown). Regev

et al. [13] have described modulating effects of different membrane fluidizers on Pgp ATPase activity and on the intracellular concentration of doxorubicin. BA and CF should change deeply the membrane structure and drug adsorption of resistant cells. These changes could favor the intracellular accumulation of MTX both by increasing the drug uptake and inhibiting the BCRP efflux pump.

In conclusion, SERS spectroscopy appears as an informative method for the study of drug binding to the plasma membrane of living cells. We have revealed that resistant cells should present a higher drug adsorption in their plasma membrane concluding to a supplementary binding site of drug. The higher adsorption on resistant cells could correspond to a change of membrane structure, since membrane permeation disrupts MTX adsorption on plasma membrane and increases intracellular uptake of MTX.

## References

- [1] R.J. Veldman, S. Zerp, W.J. van Blitterswijk, M. Verheij, N-hexanoyl-sphingomyelin potentiates in vitro doxorubicin cytotoxicity by enhancing its cellular influx, *Br. J. Cancer* 90 (2004) 917–925.
- [2] G.D. Leonard, T. Fojo, S.E. Bates, The role of ABC transporters in clinical practice, *Oncologist* 8 (2003) 411–424.
- [3] A.B. Hendrich, K. Michalak, Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells, *Curr. Drug Targets* 4 (2003) 23–30.
- [4] V.Y. Erukova, O.O. Krylova, Y.N. Antonenko, N.S. Melik-Nubarov, Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin, *Biochim. Biophys. Acta* 1468 (2000) 73–86.
- [5] M. Przybylska, Z. Jozwiak, Relevance of drug uptake, cellular distribution and cell membrane fluidity to the enhanced sensitivity of Down's syndrome fibroblasts to anticancer antibiotic-mitoxantrone, *Biochim. Biophys. Acta* 1611 (2003) 161–170.
- [6] M.F. Lecompte, G. Laurent, J.P. Jaffrezou, Sphingomyelin content conditions insertion of daunorubicin within phosphatidylcholine monolayers, *FEBS Lett.* 525 (2002) 141–144.
- [7] R. Regev, G.D. Eytan, Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes, *Biochem. Pharmacol.* 54 (1997) 1151–1158.
- [8] M. Jedrzejczak, A. Koceva-Chyla, K. Gwozdziński, Z. Jozwiak, Changes in plasma membrane fluidity of immortal rodent cells induced by anticancer drugs doxorubicin, aclarubicin and mitoxantrone, *Cell Biol. Int.* 23 (1999) 497–506.
- [9] H. Schuldes, J.H. Dolderer, G. Zimmer, J. Knobloch, R. Bickeboller, D. Jonas, B.G. Woodcock, Reversal of multidrug resistance and increase in plasma membrane fluidity in CHO cells with R-verapamil and bile salts, *Eur. J. Cancer* 37 (2001) 660–667.
- [10] P.R. Wielinga, H.V. Westerhoff, J. Lankelma, The relative importance of passive and P-glycoprotein mediated anthracycline efflux from multidrug-resistant cells, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 649–657.
- [11] C. Heywang, M. Saint-Pierre Chazalet, C.M. Masson, J. Bolard, Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers: A surface-enhanced resonance Raman scattering study, *Biophys. J.* 75 (1998) 2368–2381.

- [12] G. Breuzard, J.F. Angiboust, P. Jeannesson, M. Manfait, J.M. Millot, Surface-enhanced Raman scattering reveals adsorption of mitoxantrone on plasma membrane of living cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 615–621.
- [13] R. Regev, Y.G. Assaraf, G.D. Eytan, Membrane fluidization by ether, other anaesthetics, and certain agents abolishes P-glycoprotein ATPase activity and modulates efflux from multidrug-resistant cells, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 18–24.
- [14] I. Nabiev, G.D. Chumanov, R.G. Efremov, Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of biomolecules. Part II. Application of short- and long-range components of SERS to study of the structure and function of membrane proteins, *J. Raman Spectrosc.* 21 (1990) 49–54.
- [15] P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3391–3395.
- [16] P.J. Butler, G. Norwich, S. Weinbaum, S. Chien, Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280 (2001) C962–969.
- [17] L. Gallois, M. Fiallo, A. Garnier-Suillerot, Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles. Circular dichroism study, *Biochim. Biophys. Acta* 1370 (1998) 31–40.
- [18] A. Marczak, A. Wrzesien-Kus, E. Krykowski, T. Robak, Z. Juzwiak, The interaction of daunorubicin and mitoxantrone with the red blood cells of acute myeloid leukemia patients, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8 (2003) 885–890.
- [19] J.H. Dolderer, G. Zimmer, B.G. Woodcock, H. Bockhorn, R. Bickeboller, H. Schuldes, Resistance modulation in CHO cells by R-verapamil and bile salts is associated with physical and chemical changes in the cell membrane, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38 (2000) 196–203.
- [20] Y. Lavie, M. Liscovitch, Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences, *Glycoconj. J.* 17 (2000) 253–259.

## ***LISTE DES FIGURES***

Figure 1. Structure de la P-glycoprotéine humaine présentée par Gottesman <i>et al.</i> (Gottesman <i>et al.</i> , 1993).....	8
Figure 2. Structure de la P-glycoprotéine humaine selon Konno <i>et al.</i> (Konno <i>et al.</i> , 2003)....	9
Figure 3. Comparaison des structures de la Breast Cancer Resistant Protein (BCRP), de la P-glycoprotéine (Pgp) et de la Multidrug-Resistance associated Protein (MRP1) selon Ross (Ross, 2000). .....	10
Figure 4. Agents antinéoplasiques, substrat des protéines à efflux Pgp, MRP1 et BCRP.....	11
Figure 5. Expérience de Raman et Krishnan (1928). .....	18
Figure 6. Modèle de diffusion de la lumière par une molécule dans le phénomène Raman....	19
Figure 7. Conséquences spectrales de la diffusion Raman. ....	20
Figure 8. Diagramme de Jablonski.....	21
Figure 9. Micrographie électronique d'agrégat d'argent utilisé en spectroscopie SERS (extrait de l'article de Kneipp <i>et al</i> (Kneipp <i>et al.</i> , 1999)). .....	27
Figure 10. Diagramme de conversion d'énergie selon Jablonski.....	29
Figure 11. Principe du transfert d'énergie d'après le diagramme de Jablonski. ....	32
Figure 12. Localisation et orientation des sondes fluorescentes membranaires dans la bicouche phospholipidique. ....	36
Figure 13. Observation par microscopie à contraste de phase des lignées cellulaires HCT-116 et MCF 7 (Objectif × 10).....	39
Figure 14. Structure moléculaire des molécules anticancéreuses (mitoxantrone, doxorubicine) et des agents modulateurs de protéines à efflux utilisés (alcool benzylique, fumitrémorgine C, cyclosporine A et vérapamil).....	41
Figure 15. Structure moléculaire de la sonde 4-(4-(didécylamino)styryl)-N-méthylpyridinium. ....	42
Figure 16. Structure moléculaire de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5diphényl Tétrazolium (MTT) et le produit de la réduction de ces sels (formazan) par la succinate-tétrazolium réductase.....	43
Figure 17. Mesure par la lecture de l'absorbance de l'activité métabolique selon la réduction des sels MTT. ....	43
Figure 18. Spectre d'absorbance du colloïde d'argent préparé selon la méthode de Lee et Meisel (Lee <i>et al.</i> , 1982). ....	45

Figure 19. Schéma du dispositif expérimental pour la spectroscopie SERS. <i>L</i> : lentille ; <i>M</i> , <i>m</i> : miroirs ; <i>C</i> : condensateur. ....	46
Figure 20. Détails du trajet optique du microscope MRC-1024 (BioRad, Hemel hemsyead, UK).....	50
Figure 21. Exemple de filtres utilisés en microscopie et spectroscopie de fluorescence.....	52
Figure 22. Principe du spectrofluorimètre Shimadzu RF5000.....	56
Figure 23. Principe du microspectrofluorimètre. ....	62
Figure 24. Principe de la confocalité.....	63
Figure 25. Spectres SERS de la mitoxantrone (MTX) en solution. ....	68
Figure 26. Analyse de MTX en solution par spectroscopie SERS.....	69
Figure 27. Imagerie confocale de cellules traitées par MTX en présence de grains de colloïde. ....	72
Figure 28. Signature spectrale spécifique de MTX cellulaire.....	72
Figure 29. Analyse SERS de MTX adsorbée à la membrane cellulaire. Spectres SERS de : .	74
Figure 30. Activité cytostatique de MTX sur les cellules HCT-116 résistante R (courbe ■) et sensible S (courbe ▲). ....	76
Figure 31. Microscopie confocale de MTX chez HCT-116 S (A) et HCT-116 R (B).....	76
Figure 32. Quantification de MTX intracellulaire chez HCT-116 R et S à 37°C ou à 4°C par la lecture de l'absorbance.....	78
Figure 33. Analyse SERS de MTX adsorbé à la membrane plasmique de HCT-116 R et S...	80
Figure 34. Analyse SERS de MTX adsorbé à la membrane plasmique de MCF7 R et S.....	80
Figure 35. Effet du temps d'incubation sur les intensités SERS de HCT-116 R (courbe ■) et HCT-116 S (courbe ▲) traitées par MTX. ....	82
Figure 36. Effet de la concentration de MTX sur les intensités SERS de HCT-116 R (courbe ■) et S (courbe ▲) traitées par MTX.....	82
Figure 37. Effet de la température lors de l'incubation des cellules avec MTX.....	84
Figure 38. Stabilité de l'adsorption de MTX à la membrane plasmique de HCT-116 R.....	84
Figure 39. Libération de MTX adsorbé à la membrane de HCT-116 R (courbe ■) et S (courbe ▲).....	86
Figure 40. Microscopie confocale de la stabilité de l'émission membranaire de MTX chez HCT-116 S (A, B) et HCT-116 R (C, D).....	86
Figure 41. Deux hypothèses d'intégration de MTX dans la membrane plasmique des cellules résistantes et sensibles. Les étapes de la diffusion de la molécule au travers de la bicouche de phospholipide restent mal définies (notées par le symbole « ? »). ....	88

Figure 42. Spectres normalisés d'excitation et d'émission de fluorescence de 4Di-10ASP et de MTX.....	90
Figure 43. Microscopie confocale de l'atténuation de fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez HCT-116. ....	90
Figure 44. Atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP membranaire par MTX chez HCT-116 S.....	92
Figure 45. Efficacité d'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez HCT-116 R (■) et HCT-116 S (▲). ....	92
Figure 46. Modélisation de l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX suivant une cinétique biexponentielle chez les cellules HCT-116. ....	94
Figure 47. Microscopie confocale de MTX chez les cellules HCT-116 traitées par un fluidifiant.....	98
Figure 48. Effets de fluidifiants sur l'accumulation de MTX intracellulaire chez HCT-116 R et S.....	100
Figure 49. Effet de fluidifiants sur l'efflux de MTX chez HCT-116.....	102
Figure 50. Exemples de focalisation du rayonnement laser sur des jonctions membranaires. ....	104
Figure 51. Quantification par la microspectrofluorimétrie de l'intensité de fluorescence de MTX chez les cellules HCT-116 R et S. Les cellules sont incubées avec MTX de 10 sec à 60 min :.....	104
Figure 52. Comparaison des profils des spectres de MTX des cellules HCT-116 R et S à 37°C. ....	105
Figure 53. Profils de spectres de MTX dans différents solvants.....	105
Figure 54. Effet de la température sur les profils des spectres de MTX des cellules HCT-116 S.....	106
Figure 55. Effet de AB sur les profils des spectres de MTX des cellules HCT-116 S à 37°C. ....	106
Figure 56. Effet de AB ou CHCl <sub>3</sub> sur les intensités SERS de MTX chez les cellules HCT-116 R (A) et HCT-116 S (B).....	109
Figure 57. Effet de la concentration de MTX sur les intensités SERS de HCT-116 R (A) et HCT-116 S (B) pré-incubées avec AB ou CHCl <sub>3</sub> . ....	110
Figure 58. Libération de MTX adsorbé à la membrane de HCT-116 R (A) et S (B) pré-incubées avec AB ou CHCl <sub>3</sub> . ....	110

Figure 59. Effet de AB sur l'atténuation de la fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez HCT-116 S. ....	112
Figure 60. Hypothétique effet de AB sur l'intégration de MTX dans la membrane des cellules HCT-116. Les étapes de la diffusion de la molécule au travers de la bicouche de phospholipide traitée par l'alcool benzylique restent mal définies (notées par le symbole « ? »).....	114
Figure 61. Effet de AB sur l'efficacité d'atténuation de 4Di-10ASP des phases 1 et 2 chez HCT-116.....	116
Figure 62. Effet de la fumitrémorgine C (FTC), du vérapamil (VPL) et de la cyclosporine A (CsA) sur les efficacités d'atténuation de 4Di-10ASP des phases 1 et 2 chez HCT-116. ....	116
Figure 63. Microscopie confocale de MTX chez les cellules HCT-116 R (A, C, E, G) et S (B, D, F, H) traitées par FTC (C, D), CsA (E, F) ou VPL (G, H).....	118
Figure 64. Modèles d'intégration et de diffusion de MTX au travers de la membrane plasmique. ....	134

## ***LISTE DES TABLEAUX***

Tableau 1. Différentes approches pour mesurer le FRET <sup>s</sup> .....	34
Tableau 2. Récapitulatif des différents filtres d'excitation et d'émission disponibles pour le microscope confocal MRC-1024. ....	52
Tableau 3. Filtres caractéristiques de chaque photomultiplicateur. ....	53
Tableau 4. Positions des principales bandes de MTX et leur attribution au type de liaisons caractérisé par leur mode de vibration. $\nu$ : élongation ; $\delta$ : déformation ; $\theta$ : rotation.....	68
Tableau 5. Paramètres de l'atténuation de fluorescence de 4Di-10ASP par MTX chez les HCT-116.....	94
Tableau 6. Comparaison des efficacités d'atténuation de 4Di-10ASP avec la quantification de l'intensité de fluorescence de MTX chez les cellules HCT-116.....	112
Tableau 7. Effet de la modulation de la fluidité membranaire par AB sur la localisation de MTX chez les cellules HCT-116 R et S.....	128
Tableau 8. Valeurs numériques pour le calcul de l'intégrale $J$ de recouvrement spectral entre le donneur (4Di-10ASP) et l'accepteur d'énergie (MTX). ....	174



**BREUZARD Gilles** – Mise en évidence de l'intégration membranaire de la mitoxantrone à l'échelle de la cellule vivante par spectroscopie Raman SERS et transfert d'énergie de fluorescence.

Th. de Dr. Université de Reims Champagne-Ardenne : 2006

## **RESUME**

La résistance cellulaire aux agents anticancéreux se caractérise par une diminution de la concentration intracellulaire du médicament. Il est très largement décrit que cette résistance cellulaire se définit par des modifications du profil lipidique et une surexpression de protéines responsables de l'efflux de xénobiotiques. Cependant, la relation entre l'intégration membranaire et le transfert du médicament au travers de la bicouche de phospholipides reste mal définie. L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence le mode d'intégration de la mitoxantrone (MTX) à la surface de la membrane plasmique dans un modèle cellulaire de résistance multiple de type BCRP/MXR.

Des méthodes biophysiques ont été développées pour étudier l'intégration du médicament. D'une part, la spectroscopie SERS (Surface-Enhanced Resonance Scattering) implique un colloïde d'argent extracellulaire permettant une exaltation Raman de molécules en situation membranaire. D'autre part, le transfert d'énergie d'une sonde membranaire fluorescente vers MTX permet de déterminer des paramètres d'intégration du médicament dans les deux feuillettes de la membrane.

Une exaltation SERS de MTX est observée lorsque le rayonnement laser est focalisé sur un grain de colloïde en contact avec la membrane de cellules traitées par le médicament. Ces résultats sont interprétés comme une intégration partielle de MTX sur la membrane plasmique. De plus, une intensité SERS de MTX trois fois plus importante est observée chez les cellules résistantes. Cette différence d'intensité SERS de MTX entre les deux lignées est assimilée à une accessibilité différente de MTX par le colloïde. Par transfert d'énergie de fluorescence, la comparaison des vitesses d'intégration de l'agent anticancéreux met en évidence une quantité équivalente de molécules de MTX intégrées dans la membrane entre les deux types cellulaires. D'autre part, des agents fluidifiants induisent une diminution importante de la diffusion SERS de MTX uniquement chez les cellules résistantes. Le transfert d'énergie de fluorescence montre qu'un traitement des cellules avec de tels agents augmente l'intégration de MTX dans le feuillet externe de la membrane plasmique des deux types cellulaires. Une augmentation de la fluidité membranaire a pour conséquence directe une intégration plus importante de MTX dans la bicouche phospholipidique, ce qui pourrait être à l'origine de l'accumulation plus importante de MTX vers le cytoplasme.

En conclusion, la spectroscopie SERS et le transfert d'énergie de fluorescence permettent une analyse sélective de molécules anticancéreuses à l'échelle de la membrane plasmique. Des modifications de la structure membranaire pourraient être à l'origine des différences d'intégration de MTX et de perméabilité membranaire entre les deux types cellulaires.

**SPECIALITE** : Biomolécules et Dynamique Cellulaire.

**MOTS-CLES** : adsorption, mitoxantrone, multirésistance aux médicaments, analyse spectrale raman, fluorescence de transfert de l'énergie de résonance, tumeurs.

## **JURY** :

Rapporteurs : Pr. AUBARD J., Professeur des Universités, Paris VII ;

Pr. MELY Y., Professeur des Universités, Strasbourg.

Examineurs :

Directeur de thèse : Pr. MILLOT J.-M., Professeur des Universités, Reims.

## **Adresse de l'auteur** :

BREUZARD Gilles, 7 route de la Charité – Beauregard, 58400 Varennes-les-Narcy.