

## UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE U.F.R. PHARMACIE

Année 2007

N°

### THESE

Présentée en vu de l'obtention du titre de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

### **Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Par Laura PERRIN

MODULATION DU PHENOTYPE DE MULTIDROGUES RESISTANCE DE CELLULES LEUCEMIQUES MURINES PAR UNE APPROCHE D'IMMUNOTHERAPIE ET DE CHIMIOTHERAPIE ADJUVANTE

Soutenance le 1<sup>er</sup> Mars 2007

Composition du Jury :

Pr. KALTENBACH Mathieu, Université de Reims, Dr. BOUTONNAT Jean, Université de Grenoble, Dr. PADRINES Marc, Université de Nantes, Dr. FLEURY Fabrice, Université de Nantes, Pr. MADOULET Claudie, Université de Reims, Pr. TARPIN Michel, Université de Reims, Président du Jury Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur Directeur

À mes Parents, À mon Frère,

À Michaël,

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma gratitude envers mes deux directeurs de thèse, les professeurs Claudie Madoulet et Michel Tarpin, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et permis d'effectuer ces études doctorales dans les meilleures conditions. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Je tiens à remercier tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu me porter en acceptant de juger ce travail. Les observations et les remarques qu'ils ont émises ont été particulièrement enrichissantes.

Je remercie le Professeur Matthieu Kaltenbach qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

J'adresse toute ma reconnaissante au Docteur Jean Routonnat qui m'a fait l'honneur d'être dans ce jury de thèse en tant que rapporteur, et qui a su juger ce travail avec un regard critique, pertinent, constructif et très encourageant.

J'adresse mes remerciements au Docteur Marc Padrines pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. J'apprécie la rapidité avec laquelle vous avez lu ce manuscrit et l'intérêt que vous y avez porté.

J'exprime également ma reconnaissance au Docteur Fabrice Fleury qui a accepté d'examiner mon travail et de faire parti de ce jury.

Merci à toutes les personnes, amis et collègues, qui m'ont soutenue et qui ont contribué à l'avancée de ce travail par leurs savoirs, leurs idées et leur gentillesse.

Débora, Christelle, Isabelle, Gaël, Annie, Laëtitia, Marie-Pierre, Stéphanie : je ne vous remercierai jamais assez d'avoir entretenu la bonne humeur quotidienne du laboratoire (chacune à sa manière...). Merci de votre présence chaque fois que j'en ai eu besoin et de la sincère amitié dont vous m'avez fait preuve au laboratoire et en dehors... Je ne pourrais terminer ces quelques lignes sans remercier ceux sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, merci à mes parents pour leur soutien dans les bons comme dans les mauvais moments..., merci à mon frère pour toutes ses attentions...,

Enfin, merci Michaël pour tous tes allers-retours, tes coups de fils..., pour ton soutien et ton réconfort (Angy). Merci.

#### **RESUME**

L'apparition de cellules tumorales résistantes aux agents anticancéreux demeure l'un des obstacles majeurs aux traitements chimiothérapeutiques des cancers. Parmi les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses, la "multidrug resistance" (MDR) est sans nul doute le mieux connu. Ce phénotype MDR est en grande partie dû à la surexpression de la glycoprotéine P, responsable de l'efflux de médicaments.

Dans le but d'inhiber l'activité de cette glycoprotéine, nous avons développé, une stratégie d'immunothérapie anti-MDR. Des auto-anticorps spécifiques des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la glycoprotéine P murine ont été induits chez la souris après immunisation avec des peptides synthétiques palmitoylés reconstitués dans des liposomes. Les animaux immunisés, ne présentent aucun symptôme d'auto-immunité 18 mois après l'immunisation, répondent mieux à la chimiothérapie à base de doxorubicine et de vinblastine, et ont une survie augmentée de 77%. *In vitro*, les sérums de souris immunisées sont capables de réduire la résistance à la chimiothérapie. Nous avons analysé par RT-PCR l'expression des gènes : *mdr1* (ou *mdr1a*), *mdr3* (ou *mdr1b*), tous deux actifs dans le transport d'agents anticancéreux, sur les cellules murines résistantes à la doxorubicine (B16 R, P388 R, L1210 R, LM(tk-) R) et dans les organes de souris immunisées. Les sérums de souris immunisées sont capables de réduire la résistance à la chémic la résistance à la vinblastine et la doxorubicine en fonction de l'expression des gènes impliqués.

Dans le souci de lutter contre la résistance aux agents anticancéreux, nous avons également développé une approche utilisant le *trans*-resvératrol sur des lignées cellulaires leucémiques (P388R, L1210R), fibroblastiques (LM(tk-)R) et démontré son pouvoir antiprolifératif et pro-apoptotique. Ces cellules cultivées en présence de doxorubicine avec des doses non toxiques de *trans*-resvératrol, retrouvent une sensibilité vis-à-vis de l'agent anticancéreux. De plus, nous avons constaté une accumulation de doxorubicine dans les cellules leucémiques ainsi qu'une modulation de l'expression du gène *mdr1*.

Ces résultats montrent que ces deux approches pourraient être utiles dans une association aux traitements chimiothérapeutiques traditionnels pour lutter contre le mécanisme de résistance qui apparaît fréquemment dans le cancer.

<u>Mots-clés</u>: Multidrogues résistance, MDR, glycoprotéine P, resvératrol, Immunothérapie, liposomes, lipopeptides.

#### **ABSTRACT**

Among the mechanisms by which cancer cells evade chemotherapy, multidrug resistance (MDR) is certainly the best known. Overproduction of a transmembrane glycoprotein, called P-glycoprotein, was found to correlate with the development of resistance phenotypes to number of unrelated drug and acts as an efflux pump.

The aim of this study was to inhibit glycoprotein P activity. We developed an immunotherapy strategy anti-MDR. Specific auto-antibodies to extracellular loops 1, 2 and 4 of murine P-glycoprotein were elicited in mice using palmitoylated synthetic peptides reconstituted in liposomes, with or without Lipid A, and resuspended in alum. The immune response against lipopeptides shows an increase of IgG anti-mpp2 at the third immunization Animals did not show any auto-immune symptoms or induced toxicity up to 18 months after the immunization, answer better of chemotherapy treatments with doxorubicin and vinblastine, an increase of 77% in the survival half time is observed. *In vitro*, immunized mice sera are able to decrease resistance to chemotherapy. In mice, three mdr isoforms expressed in some normal tissues are known. We analysed by RT-PCR the expression of *mdr1*, *mdr2* and *mdr3* in several organs of B6D2F1 mice after vaccination and murine cells. Culture of murine cell lines resistant to doxorubicin (B16R, P388R, L1210R, LM(tk-)R) in the presence of elicited antibodies led to decrease cellular resistance to Vinblastine and Doxorubicin according to *mdr* genes expression.

To reverse the drug resistance, we used *trans*-resveratrol (trans-3, 4', 5-trihydroxystilbene), on leukemia cells (L1210R, P388R), fibroblastic cells LM(tk-)R. When cells are treated with doxorubicin and sublethal concentrations of *trans*-resveratrol, the cells became sensitive to doxorubicin. We reported here that *trans*-resveratrol induced doxorubicin accumulation in leukemic cells as well as modulation of *mdr1* gene expression.

These data suggest that both, immunotherapy and *trans*-resveratrol have a strong potential to be used in combination with conventional chemotherapeutic drugs to reverse MDR in cancer cells.

<u>Key-words:</u> Multidrug resistance, MDR, P-glycoprotein, resveratrol, Immunotherapy, liposomes, lipopeptides.

I. IN	TRODUCTION	1
II. ET	UDE BIBLIOGRAPHIQUE	6
II.1.	MECANISMES GENERAUX DE RESISTANCE	7
II.2.	LA RESISTANCE MULTIDROGUE : PHENOTYPE MDR	8
II.2.A.	Protéines responsables d'une résistance multidrogue autre que la	
	glycoprotéine P	10
II.2.A	.1. Résistances enzymatiques	10
II.2	2.A.1.a. Résistance atypique ou at-MDR	10
II.2	A.1.b. Glutathion-S-transférases (GST)	10
II.2	A.1.c. Résistance au méthotrexate	
II.2.A	.2. MRP ("Multidrug resistance associated protein ") ou ABCC	
II.2.A		11
П.2.А Ц 2 Р	.4. BCRP ("Breast Cancer resistance Protein") ou ABCG2	11 12
П.2.D. П 2 Р	La glycoproteine P, Pgp ou gp-170	12
II.2.D II 2 B	2. Structure de la glycoprotéine P	12
II.2.D II 2 B	3 Biosynthèse de la glycoprotéine P	13
II.2.D II 2 B	4 Modifications post-traductionnelles de la glycoprotéine P	15
II.2.D II 2	$\mathbf{P} \mathbf{B} \mathbf{A}$ a Glycosylation	15
II.2 II.2	B 4 b. Phosphorylation	10
II.2.B	5 Activité ATPasique de la glycoprotéine P	10
II.2.B	.6. Expression de la glycoprotéine P	
II.2.B	.7. Mécanismes de transport des agents anticancéreux	
II.2.B	.8. Réversion du phénotype MDR	
II.2.C.	Le resvératrol	25
II.2.C	.1. Activités biologiques du resvératrol	25
II.2	C.1.a. Activité anti-oxydante	25
II.2	C.1.b. Répression de l'agrégation plaquettaire, activités vasodilatatrice et a	nti-
	inflammatoire	
II.2	C.1.c. Activité immunomodulatrice	26
II.2	C.1.d. Activités anticancéreuses	27
Ι	I.2.C.1.d.1. Enzymes de biotransformation	27
Ι	I.2.C.1.d.2. Inhibition de l'angiogenèse	
Ι	I.2.C.1.d.3. Activités sur la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire et	
	l'apoptose	28
TT 2	DUT DE CETTE ETUDE	21
<b>П.З.</b> П.2 Л	BUI DE CETTE ETUDE	
П.Э.А. Ц 2 Р	Modulation du phénotura MDP par la resuératrol	
п.э.д.		
III. M	ATERIEL ET METHODES	33
III.1.	LES EFFECTEURS PHARMACOLOGIQUES	34
III.1.A.	Doxorubicine (DOX)	34
III.1.B.	Vinblastine (VBL)	34

III.1.C.	Vérapamil ou (ISOPTINE <sup>®</sup> )	35
III.2.	TRANS-RESVERATROL (RESVERATROL)	36
III.3.	LES AGENTS FLUORESCENTS	36
III.3.A. III 3 B	Iodure de Propidium (IP)	36 37
III.3.D.	MODELES ANIMALIX	
111.7.		
III.5.	MODELES D'ETUDES CELLULAIRES	37
III.5.A.	Lignées cellulaires murines en suspension	37
III.5.B.	Lignees cellulaires murines en monocouche	38
III.J.C. III.5 D	Test myconlasmes	39
III.J.D.	Test mycopiasmes	39
III.6.	PREPARATION DU "VACCIN"	40
III.6.A.	Lipopeptides de synthèse	40
III.6.B.	Produits utilisés dans la composition des différentes préparations vaccinales	41
III.6.C.	Préparation des formulations vaccinales	41
III.6.D.	Immunisation des souris par les préparations vaccinales	42
III.6.E.	Analyse des sérums murins par Dot Blotting	42
III.6.F.	Persistance de la reponse immunitaire.	43
III.0.G.	Evaluation <i>in vivo</i> de l'infibition de chimioresistance des cellules P388R par	13
		43
III.7.	METHODES D'ETUDE DE LA CYTOTOXICITE.	44
III.7.A.	Test d'exclusion au bleu trypan	44
III.7.B.	Test colorimétrique au MTT	45
III.8.	INCORPORATION DE VINBLASTINE RADIOMARQUEE [ <sup>3</sup> H] VBL	46
III.9.	ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES MDR1. MDR2 ET MDR3	47
III.9.A.	Extraction et électrophorèse des ARN totaux	47
III.9.B.	Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)	47
III.9.C.	Amplification des ADNc par PCR	48
III.10.	ÉTUDES HISTOPATHOLOGIQUES	49
		40
III.10.A.	Realisation des coupes histologiques	49
Ш.10.В.	Coloration à l'Hématéine Dhlovine Safron	50 51
III.10.C.	Coloration a 1 Hemateme – Finoxine – Sanan	
III.11.	ETUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE	51
III.11.A.	Fixation des cellules en culture	51
III.11.B.	Immunorévélation	52
III 1 <b>2</b>	TECHNIQUES DE DETECTION DE LA MODT CELLUI AIDE	50
III.I2. III 12 Λ	Double marquage par l'iodure de propidium et la Hoachst 33342	52 52
III.12.A. III 12 R	Fragmentation de l'ADN génomique	<i>32</i> 52
III.12.D.	rugmentation de l'ribry genomique	

IV. RESULTATS       54         IV.1. MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR UNE PREPARATION VACCINALE       55         IV.1.A. Induction de la réponse humorale après administration de différentes préparations vaccinales.       55         IV.1.B. Persistance de la réponse immunitaire.       59         IV.1.C. Effets <i>in vivo</i> des différentes préparations sur un traitement.       59         IV.1.D. Effets <i>in vivo</i> des anticorps santi-glycoprotéine P van la réversion, de la chimiotésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la doxorubicine       62         IV.1.E. Eude ex vivo des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la chimiothérapie       64         IV.1.F. Détection par immunocytochimie des anticorps induits par la préparation vaccinale Lp1 sur différentes lignées cellulaires murines       66         IV.1.G. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1</i> , <i>mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les lignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine       69         IV.1.H. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1</i> , <i>mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a       70         IV.1.1. Induction de granulomes par l'alum       74         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VLABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.A. Etude de la vidifinit cellulaire       75         IV.2.2. Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       79	III.14.	INCORPORATION DE DOXORUBICINE		
<ul> <li>IV.1. MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR UNE PREPARATION VACCINALE</li></ul>	IV. R	ESULTATS	54	
PREPARATION VACCINALE       55         IV.1.A.       Induction de la réponse humorale après administration de différentes préparations vaccinales.       55         IV.1.B.       Persistance de la réponse immunitaire       59         IV.1.C.       Effets <i>in vivo</i> des différentes préparations sur un traitement.       59         IV.1.C.       Effets <i>in vivo</i> des différentes préparations sur un traitement.       60         IV.1.D.       Effets <i>in vivo</i> des anticorps anti-glycoprotéine P sur la réversion, de la chimiorésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la doxorubicine       62         IV.1.E.       Etude <i>ex vivo</i> des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la chimiorésistance la un divertentes lignées cellulaires murines.       66         IV.1.E.       Etude <i>ex vivo</i> des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la doxorubicine.       69         IV.1.G.       Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1, mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les lignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine.       69         IV.1.H.       Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1, mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a.       70         IV.1.I.       Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris.       72         IV.1.I.       Induction de granulomes par l'alum.       74         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR	IV.1.	MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR UNE		
<ul> <li>IV.1.A. Induction de la réponse humorale après administration de différentes préparations vaccinales.</li> <li>55</li> <li>IV.1.B. Persistance de la réponse immunitaire.</li> <li>59</li> <li>IV.1.C. Effets <i>in vivo</i> des différentes préparations sur un traitement.</li> <li>chimiothérapeutique chez des souris recevant des cellules P388R.</li> <li>60</li> <li>IV.1.D. Effets <i>in vivo</i> des anticorps anti-glycoprotéine P sur la réversion, de la chimiorésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la doxorubicine.</li> <li>62</li> <li>IV.1.E. Etude <i>ex vivo</i> des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la chimiothérapie</li> <li>64</li> <li>IV.1.F. Détection par immunocytochimie des anticorps induits par la préparation vaccinale Lp1 sur différentes lignées cellulaires murines.</li> <li>66</li> <li>IV.1.G. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1</i>, <i>mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les dignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine.</li> <li>69</li> <li>IV.1.H. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1</i>, <i>mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a.</li> <li>70</li> <li>IV.1.I. Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris.</li> <li>71</li> <li>IN.2.E. Etude de la prolifération cellulaire</li> <li>75</li> <li>IV.2.A. Etude de la prolifération cellulaire</li> <li>75</li> <li>IV.2.B. Etude de la prolifération cellulaire</li> <li>76</li> <li>IV.3.B. Analyse par double marquage Hoechst – lodure de propidium.</li> <li>79</li> <li>IV.3.B. Analyse de la fragmentation d'ADN.</li> <li>83</li> <li>IV.4. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE</li> <li>85</li> <li>IV.5. EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91</li> <li>IV.6. ACCUMULATION DE DOXORUBICINE.</li> <li>93</li> <li>IV.7. EFFET DU RESVERATR</li></ul>		PREPARATION VACCINALE.	55	
préparations vaccinales       55         IV.1.B.       Persistance de la réponse immunitaire       59         IV.1.C.       Effets in vitro des différentes préparations sur un traitement       60         IV.1.D.       Effets in vitro des anticorps anti-glycoprotéine P sur la réversion, de la chimiorésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la doxorubicine       62         IV.1.E.       Etude <i>ex vivo</i> des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la chimiothérapie       64         IV.1.F.       Détection par immunocytochimie des anticorps induits par la préparation vaccinale Lp1 sur différentes lignées cellulaires murines       66         IV.1.G.       Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1</i> , <i>mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les dignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine       69         IV.1.H.       Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes <i>mdr1</i> , <i>mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a       70         IV.1.I.       Induction de granulomes par l'alum       74         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VIABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.A.       Etude de la prolifération cellulaire       77         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VIABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.A.       Etude de la vabilité cellulaire       77         IV.2.	IV.1.A.	Induction de la réponse humorale après administration de différentes		
<ul> <li>IV.1.B. Persistance de la réponse immunitaire</li></ul>		préparations vaccinales	55	
<ul> <li>IV.1.C. Effets <i>in vivo</i> des différentes préparations sur un traitement. chimiothérapeutique chez des souris recevant des cellules P388R</li></ul>	IV.1.B.	Persistance de la réponse immunitaire	59	
<ul> <li>chimiothérapeutique chez des souris recevant des cellules P388R</li></ul>	IV.1.C.	Effets in vivo des différentes préparations sur un traitement	•••	
<ul> <li>IV.1.D. Effets <i>in vitro</i> des anticorps anti-glycoprotéine P sur la réversion, de la chimiorésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la doxorubicine</li></ul>		chimiothérapeutique chez des souris recevant des cellules P388R	60	
<ul> <li>chimiorésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la doxorubicine</li></ul>	IV.1.D.	Effets in vitro des anticorps anti-glycoprotéine P sur la réversion, de la		
doxorubicine		chimiorésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la		
<ul> <li>IV.1.E. Etude ex vivo des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la chimiothérapie</li></ul>		doxorubicine	62	
<ul> <li>Chimiotherapie</li></ul>	IV.1.E.	Etude <i>ex vivo</i> des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la	<i>с</i> 1	
<ul> <li>IV.1.F. Detection par immunocytocnimic des anticorps induits par la preparation vaccinale Lp1 sur différentes lignées cellulaires murines</li></ul>			64	
Vacchale Lp1 sur differentes lignées cellulaires murines       60         IV.1.G.       Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes mdr1, mdr2 et mdr3 sur les lignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine       69         IV.1.H.       Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes mdr1, mdr2 et mdr3 sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a       70         IV.1.E       Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris       72         IV.1.J.       Induction de granulomes par l'alum       74         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VIABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.       EffET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VIABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.A.       Etude de la prolifération cellulaire       77         IV.2.B.       Etude de la viabilité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       79         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.       Analyse par double marquage Hoechst – lodure de propidium       79         IV.3.B.       Analyse de la fragmentation d'ADN       83         IV.4.       ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.5.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VI	IV.I.F.	Detection par immunocytochimie des anticorps induits par la preparation	~	
IV.1.C.       Analyse par R1-PCR de l'expression des genes mar1, mar2 et mar3 sur les lignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine	W1C	Vaccinale Lp1 sur differentes lignees cellulaires murines	00	
IV.1.H.       Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes mdr1, mdr2 et mdr3 sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a       70         IV.1.I.       Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris       72         IV.1.I.       Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris       72         IV.1.I.       Effet DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VIABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VIABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.A.       Etude de la prolifération cellulaire       75         IV.2.B.       Etude de la viabilité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       79         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.A.       Analyse par double marquage Hoechst – lodure de propidium       79         IV.3.B.       Analyse DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.4.       ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.5.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91         IV.6.       ACCUMULATION DE DOXORUBICINE.       93         IV.7.	IV.I.G.	Analyse par RT-PCK de l'expression des genes <i>mar1</i> , <i>mar2</i> et <i>mar5</i> sur les	60	
IV.1.1.       Analyse par K1FFCK de l'expression des genes marr, marz et marz sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a	IV 1 U	Analysis per PT PCP do l'expression des gènes <i>mdr1 mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur les	09	
Image: States of the second intervent of the se	1 V . 1 . 1 1.	Analyse par K1-rCK de l'expression des genes <i>mar1</i> , <i>mar2</i> et <i>mar5</i> sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccingles I p1 ou		
IV.1.I.       Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris       70         IV.1.J.       Induction de granulomes par l'alum       74         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA       74         VIABILITE DES LIGNEES.       75         IV.2.A.       Etude de la prolifération cellulaire       75         IV.2.B.       Etude de la viabilité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       77         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.A.       Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium       79         IV.3.B.       Analyse du CYCLE CELLULAIRE       83         IV.4.       ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.5.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91         IV.6.       ACCUMULATION DE DOXORUBICINE       93         IV.7.       EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES <i>MDR1</i> ET <i>MDR3</i> SUR LES CELLULES L1210R ET P388R       94         V.       DISCUSSION ET PERSPECTIVES       96         V.1.       MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR IMMUNOTHERAPIE		I p2a	70	
IV.1.1.       Enters secondaries des preparations vaccinales sur la souris       72         IV.1.J.       Induction de granulomes par l'alum       74         IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA       74         VIABILITE DES LIGNEES       75         IV.2.A.       Etude de la prolifération cellulaire       75         IV.2.B.       Etude de la viabilité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       79         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.A.       Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium       79         IV.3.B.       Analyse de la fragmentation d'ADN       83         IV.4.       ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.5.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA       DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91         IV.6.       ACCUMULATION DE DOXORUBICINE       93         IV.7.       EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES <i>MDR1</i> ET <i>MDR3</i> SUR LES CELLULES L1210R ET P388R       94         V.       DISCUSSION ET PERSPECTIVES       96         V.1.       MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR       97	IV 1 I	Epza Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris		
IV.2.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA PROLIFERATION ET LA VIABILITE DES LIGNEES	IV.1.I. IV.1.J.	Induction de granulomes par l'alum	74	
IV.2.       EFFET DU RESVERATION SUR LA PROLIFERATION ET LA         VIABILITE DES LIGNEES.       75         IV.2.A.       Etude de la prolifération cellulaire       75         IV.2.B.       Etude de la viabilité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       79         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.A.       Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium       79         IV.3.B.       Analyse de la fragmentation d'ADN       83         IV.4.       ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.5.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA       90XORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91         IV.6.       ACCUMULATION DE DOXORUBICINE       93         IV.7.       EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES <i>MDR1</i> 94         V.       DISCUSSION ET PERSPECTIVES       96         V.1.       MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR       97	<b>IX</b> / <b>2</b>	FEET DU DESVEDATDOL SUD LA DDOL IEEDATION ET LA		
IV.2.A.       Etude de la prolifération cellulaire       75         IV.2.B.       Etude de la viabilité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       77         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.A.       Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium       79         IV.3.B.       Analyse de la fragmentation d'ADN       83         IV.4.       ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.5.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91         IV.6.       ACCUMULATION DE DOXORUBICINE       93         IV.7.       EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES <i>MDR1</i> ET <i>MDR3</i> SUR LES CELLULES L1210R ET P388R       94         V.       DISCUSSION ET PERSPECTIVES       96         V.1.       MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR IMMUNOTHERAPIE       97	1 V .2.	EFFEI DU RESVERAIROL SUR LA FROLIFERATION ET LA VIARII ITE DES I ICNEES	75	
IV.2.N.       Etude de la pionitiation centuate       77         IV.2.B.       Etude de la viabilité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       77         IV.2.C.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire       78         IV.3.       ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL       79         IV.3.A.       Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium       79         IV.3.B.       Analyse de la fragmentation d'ADN       83         IV.4.       ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE       85         IV.5.       EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91         IV.6.       ACCUMULATION DE DOXORUBICINE       93         IV.7.       EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES <i>MDR1</i> 94         V.       DISCUSSION ET PERSPECTIVES       96         V.1.       MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR       97	IV 2 A	Ftude de la prolifération cellulaire	.75	
IV.2.D.       Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire	IV.2.A. IV.2.B	Etude de la viabilité cellulaire	.,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
IV.2.6.       Diam des eness du restention sur la promotation et la cytotomene containe in the systematic contained in the systematic contex systematic contained	IV 2 C	Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire	78	
<ul> <li>IV.3. ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL</li></ul>	11.2.0.	Dian des effets du resterarior sur la promeration et la esteroxiene condune		
<ul> <li>IV.3.A. Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium</li></ul>	IV.3.	ETUDE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RESVERATROL	79	
<ul> <li>IV.3.B. Analyse de la fragmentation d'ADN</li></ul>	IV.3.A.	Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium	79	
IV.4.ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE85IV.5.EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91IV.6.ACCUMULATION DE DOXORUBICINE93IV.7.EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES MDRI ET MDR3 SUR LES CELLULES L1210R ET P388R94V.DISCUSSION ET PERSPECTIVES96V.1.MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR IMMUNOTHERAPIE97	IV.3.B.	Analyse de la fragmentation d'ADN	83	
<ul> <li>IV.5. EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91</li> <li>IV.6. ACCUMULATION DE DOXORUBICINE</li></ul>	IV.4.	ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE	85	
<ul> <li>IV.5. EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR.91</li> <li>IV.6. ACCUMULATION DE DOXORUBICINE</li></ul>				
IV.6.       ACCUMULATION DE DOXORUBICINE	IV.5.	EFFET DU RESVERATROL SUR LA CYTOTOXICITE DE LA DOXORUBICINE VIS-A-VIS DES CELLULES DE PHENOTYPE MDR	<b>2.</b> 91	
IV.7.       EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES MDR1 ET MDR3 SUR LES CELLULES L1210R ET P388R	IV.6.	ACCUMULATION DE DOXORUBICINE	93	
ET MDR3 SUR LES CELLULES L1210R ET P388R	IV.7.	EFFET DU RESVERATROL SUR L'EXPRESSION DES GENES MDRI	l	
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES		ET MDR3 SUR LES CELLULES L1210R ET P388R	94	
V.1. MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR IMMUNOTHERAPIE	<b>V. D</b>	SCUSSION ET PERSPECTIVES	96	
IMMUNOTHERAPIE	V.1.	MODULATION DE LA GLYCOPROTEINE P PAR		
		IMMUNOTHERAPIE	97	

<b>V.2.</b>	LE RESVERATROL	
V.3.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	
VI.	BIBLIOGRAPHIE	
VII.	ANNEXES	125

## Liste des abréviations utilisées

- **ABC** : <u>A</u>TP <u>b</u>inding <u>c</u>assette
- **ADN** : <u>a</u>cide <u>d</u>ésoxyribo<u>n</u>ucléique ou <u>d</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid (DNA)
- ADNc : ADN <u>c</u>omplémentaire, <u>c</u>omplementary DNA (cDNA)
- **AP-1** : <u>activator protein-1</u> ou protéine activatrice-1
- **ARN** : <u>a</u>cide <u>r</u>ibo<u>n</u>ucléique ou <u>r</u>ibo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid (RNA)
- ARNm : ARN <u>m</u>essager ou messager RNA (mRNA)
- **ARNr** : ARN <u>r</u>ibosomaux ou <u>r</u>ibosomic RNA (rRNA)
- **ATP** : <u>a</u>dénosine <u>trip</u>hosphate
- BCRP : <u>b</u>reast <u>c</u>ancer <u>r</u>esistance <u>p</u>rotein
- **bFGF2** : <u>b</u> <u>fibroblast</u> growth <u>factor</u> <u>2</u>
- COX : cyclooxygénase
- **CYP1B1** : <u>cy</u>tochrome <u>P</u>450, family <u>1</u>, subfamily <u>B</u>, polypeptide <u>1</u>
- DHFR : <u>dihydrof</u>olate <u>r</u>eductase
- DOX : <u>dox</u>orubicine
- **DMEM** : <u>D</u>ulbecco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle's <u>M</u>edium
- **DMPC**, **DMPG** : <u>dim</u>yristoyl<u>p</u>hosphatidyl<u>c</u>holine, <u>dim</u>yristoyl<u>p</u>hosphatidyl<u>g</u>lycérol
- **dNTP** : <u>d</u>éoxy<u>n</u>ucleoside <u>trip</u>hosphates
- **dpm** : <u>d</u>ésintégration <u>par m</u>inute
- ECL : <u>enhancer chemiluminescence</u> ou amplificateur de chimioluminescence
- EDTA : <u>e</u>thylene <u>d</u>iamine <u>t</u>etraacidic <u>a</u>cid ou acide éthylène diamine tétraacétique
- ELISA : <u>enzyme linked immunos</u>orbent <u>a</u>ssay
- **eNOS** : <u>endothelial nitric oxide synthase</u>
- FasL : <u>Fas</u> Ligand
- **GST** : <u>glutathion-S-transferase</u>

- **GTP** : guanosine triphosphate
- **HPS** : <u>h</u>ématéine-<u>p</u>hloxine-<u>s</u>afran
- ICAM : inter-cellular adherence molecule
- Ig : <u>immunog</u>lobuline
- IL : interleukine
- **IP** : <u>i</u>odure de <u>p</u>ropidium
- *Ip* : intra-péritonéal
- IS : immun sérum
- **kDa** : <u>k</u>ilo<u>da</u>ltons
- LDL : <u>low-d</u>ensity <u>lipoprotein</u>
- LPS : <u>lipopolys</u>acharide
- LRP : <u>lung r</u>esistance related <u>protein</u>
- **M** : <u>m</u>olaire
- MDR : <u>multidrug resistance</u> : multidrogue résistance
- mL : <u>m</u>illi<u>l</u>itre
- **MMP** : <u>major</u> <u>membrane</u> <u>protein</u>
- MPLA : <u>monophosphoryl lipid A</u>
- MRP : <u>multidrug resistance-associated protein</u> : protéine associée à la résistance multidrogue
- MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- **NBD** : <u>n</u>ucleotide <u>b</u>inding <u>d</u>omain
- **NF\kappaB** : <u>n</u>uclear <u>factor  $\kappa$ B</u>
- **PBS** : <u>phosphate</u> <u>b</u>uffer <u>s</u>aline
- **PCR** : <u>polymerase chain reaction ou amplification en chaîne par polymérase (ACP)</u>
- **P-gp** : <u>P-glycoprotein</u> : glycoprotéine P

- **PKA** : protéine kinase dépendante de l'<u>A</u>MP cyclique
- **PKC** : protéine <u>k</u>inase <u>C</u>
- **RES** : <u>res</u>vératrol
- **RPMI** : <u>R</u>oswell <u>Park</u> <u>M</u>emorial <u>Institute</u>
- **RT-PCR** : <u>reverse</u> <u>transcriptase</u> <u>polymerase</u> <u>chain</u> <u>reaction</u>
- SVF : <u>s</u>érum de <u>v</u>eau <u>f</u>œtal
- **TAE** : <u>Tris-a</u>cetate-<u>E</u>DTA
- Th1, Th2 : T helper type1, T helper type 2
- TM : transmembranaire
- TMD : transmembran domain : domaine transmembranaire
- TNFα : tumor <u>n</u>ecrosis <u>factor</u> α
- **TPA** : <u>tissue plasminogen a</u>ctivator
- UV :  $\underline{u}$ ltra  $\underline{v}$ iolet
- VBL : <u>v</u>in<u>bl</u>astine
- VCAM : <u>v</u>ascular <u>c</u>ell <u>antigen m</u>olecule
- VEGF : vascular endothelial growth factor
- VRP : <u>vér</u>apamil

## Líste des tableaux

Tableau 1	: Principaux médicaments anticancéreux impliqués ou non dans le phénomène	•
	MDR	.8
Tableau 2	: Famille de gènes homologues de la glycoprotéine P et ses isoformes	13
Tableau 3	: Modulateurs de la multidrogue résistance actifs in vitro	23
Tableau 4	: Séquence des lipopeptides correspondant aux 3 boucles extracellulaires	
	1 (mpp1), 2 (mpp2) et 4 (mpp4) de la glycoprotéine P murine	41
Tableau 5	: Amorces sens et antisens correspondant aux 3 isoformes mdr1, mdr2 et mdr3	
	chez la souris et au contrôle rRNA (M. Schiengold et coll., 2001)	48
Tableau 6	: Déroulement du processus de déshydratation des lames	49
Tableau 7	: Déroulement du processus de déparaffinage des lames	50
Tableau 8	: Activités ex vivo des anticorps induits par Lp1 et du Vérapamil sur la réversion	
	de chimiorésistance des cellules B16 R, L1210R, LM(tk-)R et P388R	65
Tableau 9	: Valeur des IC <sub>50</sub> après 24 et 48 h d'incubation avec le resvératrol sur les	
	différentes lignées cellulaires	75
Tableau 10	: Effets du resvératrol sur les lignées L1210, P388 et LM(tk-) sensibles et	
	résistantes à la doxorubicine. (+) pas d'effet, (+) effet antiprolifératif (+) effet	
	cytotoxique	78

# Liste des figures

Figure 1 : Progression tumorale et métastase (fondation contre le cancer)	3
Figure 2 : Les différents mécanismes impliqués dans la résistance des cellules cancéreuse	es7
Figure 3 : Structure secondaire de la glycoprotéine P	14
Figure 4 : Structure de la glycoprotéine P	15
Figure 5 : Modèles de fonctionnement de la glycoprotéine P	20
Figure 6 : Structure chimique du (a) trans et (b) cis-resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène	).25
Figure 7 : Structure chimique de la doxorubicine	34
Figure 8 : Structure chimique de la vinblastine	35
Figure 9 : Structure chimique du Vérapamil	35
Figure 10 : Structure chimique de l'Iodure de Propidium (IP)	36
Figure 11 : Structure chimique du Hoechst ou bisBenzimide	37
Figure 12 : Couplage de peptides synthétiques à 4 molécules d'acide palmitique	40
Figure 13 : Protocole d'immunisation des souris B6D2F1	55
Figure 14 : Titre en anticorps des sérums de souris en fonction du nombre d'immunisation	IS
(1ère, 2ème, 3ème injection). Lp2a (liposomes, alum) et Lp2b (liposomes, alu	m,
lipide A).	56
Figure 15 : Titre en anticorps des sérums de souris en fonction du nombre d'immunisation	IS
(1ère, 2ème, 3ème injection). Lp4 (mpp1, mpp2 et mpp4, alum)	57
Figure 16 : Titre en anticorps des sérums de souris en fonction du nombre d'immunisation	IS
(1ère, 2ème, 3ème injection). A, Lp1 (liposomes, palmitoylpeptides, alum); B,	,
Lp3 (liposomes, lipide A, palmitoylpeptides, alum)	58
Figure 17 : Protocole d'immunisation pour l'étude de persistance de la réponse immunitait	re59
Figure 18 : Titre en anticorps anti-mpp1, mpp2 et mpp4 des sérums de souris immunisées	par
Lp1 en fonction du temps.	60
Figure 19 : Protocole de chimiothérapie après immunisations et injection de cellules P388	R 61
Figure 20 : Temps de survie des souris immunisées par Lp1 et Lp2a	61
Figure 21 : Cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules P388R en présence d'agents de	;
réversion: Contrôle	62
Figure 22 : Effet du vérapamil (VRP $3\mu M$ ) ou des immuns sérums de souris immunisées p	oar
.Lp1 (1.2 %) ou Lp2a sur la cytotoxicité de la vinblastine 50 $\mu$ M (VBL)	63
Figure 23 : Incorporation de vinblastine radiomarquée [3H-VBL] par les cellules P388R	
incubées en présence de vérapamil (VRP) 3 µM ou de sérums de souris	64
Figure 24 : Etude immunocytochimique sur les cellules cancéreuses murines L1210	
résistantes et sensibles à la doxorubicine	66
Figure 25 : Etude immunocytochimique sur les cellules cancéreuses murines LM(tk-)	
résistantes et sensibles à la doxorubicine	67
Figure 26 : Etude immunocytochimique sur les cellules cancéreuses murines P388 résistar	ites
et sensibles à la doxorubicine.	68
Figure 27 : Etude de l'expression des gènes <i>mdr1</i> , <i>mdr2</i> , <i>mdr3</i> et du gène de référence <i>rR1</i>	VA
sur les lignées murines sensibles et résistantes à la doxorubicine	69
Figure 28 : Etude de l'expression des gènes <i>mdr1 mdr2</i> et <i>mdr3</i> sur des organes congelés o	de
souris B6D2F1 immunisées par le vaccin Lp1 ou Lp2a	71

Figure 29 : Analyse histologique des organes de souris immunisées par Lp1 (a, c, e, g) ou contrôles (b, d, f, h)	73
Figure 30 : Analyse histologique des organes de souris immunisées par Lp1, l'alum ou le sérum physiologique	74
Figure 31 : Effet du resvératrol sur la prolifération cellulaires des lignées L1210R et S, P388R et S, LM(tk-)R et S à 24 h et 48 h	76
Figure 32 : Effets du resvératrol sur la viabilité cellulaires des lignées L1210R et S, P388R et S, LM(tk-)R et S à 24 h et 48 h	77
Figure 33 : A) Observation en microscopie à fluorescence après coloration nucléaire des cellules L1210R par double marquage HO-IP ; B) Evaluation du pourcentage d cellules L1210R apoptotiques et nécrotiques en fonction des concentrations de resvératrol.	le 80
Figure 34 : Evaluation du pourcentage de cellules L1210S apoptotiques et nécrotiques en fonction des concentrations de resvératrol.	81
Figure 35 : Evaluation du pourcentage de cellules P388R apoptotiques et nécrotiques en fonction des concentrations de resvératrol.	81
Figure 36 : Evaluation du pourcentage de cellules P388S apoptotiques et nécrotiques en fonction des concentrations de resvératrol	82
Figure 37 : Evaluation du pourcentage de cellules LM(tk-)R apoptotiques et nécrotiques en fonction des concentrations des resvératrol	ı 82
Figure 38 : Evaluation du pourcentage de cellules LM(tk-)S apoptotiques et nécrotiques en fonction des concentrations de resvératrol	83
Figure 39 : Electrophorèse de l'ADN génomique sur gel d'agarose 1,8 %.	84
Figure 40 : Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules L1210R.	85
Figure 41 : Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules L1210S	86
Figure 42 : Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules P388R	87
Figure 43 : Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules P388S	88
Figure 44 : Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules LM(tk-)R.	89
Figure 45 : Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules LM(tk-)S	90
Figure 46 : Effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules	
L1210R	91
Figure 47 : Effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules P388R	92
Figure 48 : Effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules LM(tk)R	92
Figure 49 : Analyse de l'effet du prétraitement sur les cellules L1210R, P388R et LM(tk-)F	293
Figure 50 : accumulation de doxorubicine dans les cellules L1210R prétraitées avec 25 uM	l de
resvératrol durant 24 h. (A) 40µM DOX. (B) 80µM DOX.	93
Figure 51 : Accumulation de doxorubicine dans les cellules P388R prétraitées avec 10 μM resvératrol durant 24 h. (A) 5 μM DOX. (B) 10 μM DOX.	de 94
Figure 52 : Analyse de l'expression des gènes <i>mdr1</i> et <i>mdr3</i> par RT-PCR sur les cellules L1210R et P388R	95

# I.INTRODUCTION

Le cancer est aujourd'hui, en France, la deuxième cause de mortalité, derrière les affections cardiovasculaires. Avec environ 240 000 nouveaux cas par an et 143 000 décès. Le cancer constitue un réel problème de santé publique, qui ne peut que s'amplifier dans les années à venir, essentiellement du fait du vieillissement de la population. D'une manière générale, une femme sur trois et un homme sur deux risquent de développer un cancer au cours de sa vie.

Tous les organismes pluricellulaires ont la possibilité de développer une sorte de cancer. Il existe dans le corps humain plus de deux cents types de cellules différentes (cellules musculaires, cellules immunitaires, cellules nerveuses ...) qui ont chacun un rôle précis. Avant d'exercer leurs fonctions dans l'organisme, les cellules passent par des stades de prolifération et de différenciation durant lesquels elles acquièrent les propriétés et les modifications nécessaires à leurs spécialisations et à leurs fonctions. Ces cellules forment une communauté complexe où chaque groupe de cellules est impliqué dans le contrôle de la prolifération des autres. Les cellules normales ne se divisent que dans des conditions bien définies en fonction d'une part, de leur propre état physiologique et d'autre part, en fonction des informations provenant de leur environnement. Cette collaboration et ce dialogue incessant garantissent, à chaque tissu, une taille et une architecture adaptée aux besoins de l'organisme.

Les cellules cancéreuses, au contraire, ignorent les signaux qui limitent la prolifération et n'obéissent qu'à leur propre programme échappant ainsi au contrôle des autres cellules. Ainsi, l'altération des gènes de contrôle de la division cellulaire, de la prolifération et/ou de la mort cellulaire peut rompre l'équilibre permanent qui assure l'homéostasie tissulaire. Ces mutations peuvent survenir spontanément ou résulter de l'exposition de l'organisme à des agents mutagènes (physiques ou chimiques) présents dans notre environnement de façon naturel (soleil, alimentation) ou artificielle (expositions professionnelles ou accidentelles, tabagisme...) ainsi qu'à certains virus (Hépatite B et C, papillomavirus...).

Au cours des vingt cinq dernières années, on a identifié des gènes cibles des agents carcinogènes. Ces gènes qui stimulent la prolifération cellulaire, dits proto-oncogènes, existent dans la cellule tumorale, sous forme dite "oncogène". L'action des oncogènes est dominante, c'est à dire qu'une mutation sur une seule copie du gène permet les divisions cellulaires incontrôlées. L'activation d'un oncogène est ainsi une étape essentielle, à l'origine de nombreux types de cancers.

Plus récemment, on a identifié des gènes, dits suppresseurs de tumeurs ou "antioncogènes" qui ont pour fonction d'inhiber la multiplication cellulaire. Contrairement aux oncogènes, ces gènes ont une action récessive, c'est à dire que les deux copies du gène doivent être mutées pour qu'il n'y ait plus la fonction de frein à la division cellulaire. Le plus connu, le gène *p53*, est muté dans la moitié des cancers humains.

Le génome humain subit constamment des lésions qui doivent être réparées. Toutefois si le système de réparation est défectueux, la cellule conserve ces altérations et devient anormale. Ne répondant plus correctement aux signaux environnants, elle échappe progressivement à toute régulation. La cellule s'engage alors dans un processus anarchique qui conduit, par accumulation successive d'anomalies génétiques, au développement d'un cancer (C. C. Degos L, Abita Jp Et Coll . 1985). Par la suite, les cellules cancéreuses peuvent s'échapper de leur site d'origine et envahir les tissus adjacents, et ainsi être disséminées à distance pour former de nouvelles tumeurs. On parle alors de tumeurs secondaires ou métastases (fig. 1). Les tumeurs issues de telles cellules malignes sont de plus en plus agressives, et deviennent mortelles quand elles se développent dans des organes vitaux, dont elles perturbent le bon fonctionnement.



Figure 1: Progression tumorale et métastase (fondation contre le cancer)

Il existe un grand nombre de cancers très différents tant au niveau de leur localisation organique (cancer de l'ovaire, cancer du sein, cancer du poumon, etc...) que du type cellulaire (par exemple, il existe plusieurs types de cancer de l'ovaire). Chaque cancer présente des caractéristiques qui lui sont propres, bien que les mécanismes qui les engendrent soient communs. C'est la raison pour laquelle, il est nécessaire d'envisager un traitement adapté à chacun bien que tous les traitements aient pour but de supprimer les cellules cancéreuses.

Les traitements des cancers associent généralement différentes méthodes, dont les principales sont : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie. Les différents traitements sont adaptés à chaque patient.

Quand les tumeurs sont rapidement diagnostiquées, elles peuvent être éliminées, dans la plupart des cas, par des traitements locorégionaux (chirurgie et / ou radiothérapie). Par contre, quand le cancer est à un stade de dissémination métastatique, des traitements comme la chimiothérapie, l'hormonothérapie ou l'immunothérapie sont employés pour lutter contre le cancer en phase de généralisation.

Le premier agent anticancéreux a été découvert accidentellement, dans les années 40 par l'observation de lymphopénies dues au gaz de combat (le gaz moutarde, qui est un agent alkylant). Les travaux de Karnofsky (D. A. Karnofsky, 1950) ont ensuite établi l'efficacité d'un dérivé de ce gaz, la chlorméthine, dans le traitement de la maladie de Hodgkin. Les découvertes se sont ensuite accélérées avec la synthèse d'autres agents alkylants, comme celle du méthotrexate en 1948 et du 5-fluorouracile en 1957. En 1960 apparaissent les anthracyclines, les alcaloïdes de la pervenche, en 1971, l'étoposide, en 1983, le cisplatine, et au début de ce siècle les thérapeutiques ciblées grâce aux anticorps monoclonaux et aux antityrosine-kinases.

Les traitements par chimiothérapie consistent à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, des substances chimiques. Le but de la chimiothérapie est d'enrayer ou de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules tumorales par l'utilisation de molécules cytotoxiques présentant des mécanismes d'actions différents. Différentes classes d'agents anticancéreux sont ainsi distinguées selon leurs modes d'actions :

- Certains peuvent s'intercaler au niveau de la molécule d'ADN afin d'inhiber sa réplication, c'est le cas des anthracyclines.
- D'autres composés cytotoxiques peuvent agir sur les protéines du fuseau mitotique en bloquant la division cellulaire, comme les poisons du fuseau mitotique.
- 3) D'autres encore peuvent avoir une action sur les phénomènes métaboliques, en s'attaquant aux systèmes enzymatiques tels que le 5-fluorouracile qui inhibe la thymidylate synthétase et intervient au niveau de la synthèse des précurseurs nucléotidiques puriques et pyrimidiques et altère ainsi la synthèse de l'ADN.

La chimiothérapie conventionnelle a apporté des résultats très prometteurs, toutefois deux problèmes limitant son utilisation sont rapidement survenus : la toxicité sur les tissus sains et l'apparition de populations de cellules résistantes à l'effet cytotoxique des agents anticancéreux. Il existe deux types de résistance. On distingue la résistance primaire ou intrinsèque (résistance innée) lorsque les tumeurs ne répondent pas à la chimiothérapie dès la première application et, la résistance secondaire (résistance acquise) qui apparaît durant des cycles répétés de traitement. Ces mécanismes de résistances sont variés mais l'un des plus décrits et le mieux étudié à l'heure actuelle se manifeste par une diminution de la concentration intracellulaire et une augmentation de l'efflux du médicament anticancéreux. La glycoprotéine-P (P pour *permeability*), les MRP (*multidrug resistance associated protein*) et la BCRP (*breast cancer resistance protein*) sont à l'origine de cet efflux.

Il s'agit d'une résistance croisée à une variété d'agents cytotoxiques sans similitude structurale ni fonctionnelle (M. M. Gottesman et I. Pastan, 1993). Ce type de résistance est appelé résistance multiple ou "MDR" pour (Multidrug-Resistance) nommée également résistance pléiotropique.

L'objectif principal de notre étude est de proposer des protocoles permettant d'inhiber, au moins en partie, la glycoprotéine P murine. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, développé une approche d'immunothérapie en induisant, chez la souris, la synthèse d'anticorps dirigés spécifiquement contre les boucles 1, 2 et 4 de cette protéine. Dans un second temps, nous avons développé, *in vitro*, une approche visant à moduler l'expression de la glycoprotéine P en utilisant un polyphénol, le resvératrol. Le développement de cette double démarche, s'inscrit dans la perspective de développer, *in vivo*, un protocole de modulation de l'expression de la glycoprotéine P associant la production d'anticorps spécifiques dirigés contre cette protéine et l'administration de ce polyphénol, connu pour ces propriétés biologiques et décrit comme responsable du "French paradox" (J. Constant, 1997; A. Y. Sun, A. Simonyi, et G. Y. Sun, 2002)

# II. ETUDE

# BIBLIOGRAPHIQUE

#### II.1. Mécanismes généraux de résistance

Les mécanismes impliqués dans la résistance à la chimiothérapie ont d'abord été mis en évidence en laboratoire en exposant des cellules en culture à des concentrations croissantes de divers agents anticancéreux. Les lignées cellulaires résistantes ainsi générées ont permis de démontrer que les cellules cancéreuses, probablement suite à une mutation ou à une amplification génique, empruntent ou contournent diverses voies métaboliques pour survivre à l'effet cytotoxique des médicaments. Les mécanismes qui peuvent induire la résistance sont très complexes et très divers, et sont propres à chaque modèle cellulaire (fig. 2).



# Figure 2 : Les différents mécanismes impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses. (J. Y. Charcosset, 1991)

1) diminution de pénétration dans la cellule ou influx des médicaments, il s'agit d'un mécanisme très fréquent de résistance, en rapport avec des défauts des systèmes de transport. Par exemple, la diminution de l'expression ou l'inactivation du système de transport des folates réduits, entraîne une diminution de la captation du methotrexate.

2) augmentation de la sortie de la cellule ou efflux des médicaments, due à l'expression de transporteurs spécifiques, tels que la P-glycoprotéine et la MRP, peut provoquer aussi une diminution du taux intracellulaire de médicaments.

**3) diminution du métabolisme activateur**, par exemple, une diminution de l'enzyme déoxycytidine kinase entraîne une diminution de la conversion de l'aracytidine en aracytidine triphosphate, ce dernier étant la forme active du médicament inhibant la synthèse d'ADN.

**4) augmentation du métabolisme inactivateur**, l'augmentation des métallothionéines ou de l'enzyme gluthation-S-transférase peut amener une résistance au cisplatine et à certains agents alkylants.

5) augmentation de la quantité de cible intracellulaire.

6) modification de la cible des médicaments anticancéreux, certains anti-mitotiques agissent sur les enzymes intracellulaires de la mitose. Des modifications qualitatives ou quantitatives de ces enzymes changent l'efficacité thérapeutique : ainsi la dihydrofolate réductase, la thymidylate synthétase ou la topoisomérase II se modifient en réponse à l'agression thérapeutique.

7) augmentation de la réparation de l'ADN. Un exemple est la synthèse ou l'activité accrue de l'ADN topoisomérase II qui peut engendrer une résistance aux anthracyclines

Remarque : une seule cible est représentée mais un même agent antitumoral peut *a priori* avoir plusieurs cibles. Toutefois le phénomène de résistance le plus décrit et le mieux étudié à l'heure actuelle est la résistance "MDR " (Multidrug Resistance) ou résistance pléiotropique.

### II.2. La résistance multidrogue : phénotype MDR

La résistance multiple aux agents anticancéreux (Multidrug Resistance) ou phénotype "MDR" a été mise en évidence dans des cellules de mammifère en culture. Ces cellules, après exposition continue à des agents anticancéreux, présentaient la capacité de proliférer et de se multiplier malgré de fortes concentrations en substances cytotoxiques. Cette résistance pléiotropique a été initialement décrite (J. L. Biedler et H. Riehm, 1970) à partir de cellules de hamster chinois résistantes à l'actinomycine D et qui présentaient une résistance croisée vis-àvis de molécules de structure et de mécanismes d'action totalement différents. Cette résistance croisée, retrouvée dans beaucoup de lignées tumorales, d'espèces et d'origines tissulaires différentes, peut se résumer de la façon suivante : une cellule résistante "multidrogue" est une cellule qui a été sélectionnée pour sa résistance à un agent thérapeutique unique et qui s'avère être simultanément résistante à tout un groupe de produits auxquels elle n'a jamais été exposée auparavant. Cette résistance s'observe vis-à-vis des anthracyclines (adriamycine, daunorubicine), des alcaloïdes ou poison du fuseau mitotique (vinblastine, vincristine), des taxanes, des épipodophyllotoxines (téniposide, étoposide) et de l'actinomycine D. Le seul lien entre ces différents agents est leur origine naturelle, ils peuvent donc être considérés comme des xénobiotiques (Tableau 1).

Tableau 1: Principaux médicaments anticancéreux impliqués ou non dans le phénomène MDR

Alcaloïdes et	agents	antimicrotubuline	

Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline : Vincristine, Vinblastine, Navelbine Inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline : Paclitaxel, Docetaxel

#### Agents antimétabolites

Antifolates : Méthotrexate, Trimetrexate et Ralitrexed Analogues des pyrimidines : Fluorouracile, Capecitabine, Eniluracile, Cytosine-arabinoside, Gemcitabine Analogues des purines : 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, Fludarabine, cladribine

#### Agents alkylants et apparentés

Moutardes azotées : Cyclophosphamide, Ifosfamide, Melphalan, Chlorambucil Aziridines : Thiotepa, Mitomycine C Alkyls sufonates : Busulphan Nitrosourées : carmustine ou BCNU, lomustine ou CCNU, MéthylCCNU

Hydrazines et triazines : Procarbazine, Dacarbazine et Temozolomide

Dérivés du platine : Cis Platine, Carboplatine et Oxaliplatine

#### Agents interagissant avec les topoisomérases

Epipodophyllotoxines : Etoposide ou VP-16, Teniposide ou VM-26 Analogues de la Camptothecine : Camptothecine, Irinotecan, Topotecan Anthracyclines et composés voisins : Doxorubicine, Epirubicine, Idarubicine, Mitoxantrone, Actinomycine D

#### Autres molécules

Bléomycine, Hydroxyurée, L-Asparaginase, Colchicine (non utilisé en clinique)

Les nombreuses études réalisées sur des lignées cellulaires résistantes à divers médicaments ont montré que les cellules résistantes "multidrogue" présentent un certain nombre de caractéristiques bien spécifiques liées à des changements structuraux et fonctionnels au niveau de leur membrane plasmique, du cytoplasme, des compartiments cellulaires ou du noyau. L'ensemble de ces caractéristiques représente le phénotype MDR qui se traduit par :

- ✓ une diminution de l'accumulation intracellulaire des drogues cytotoxiques,
- ✓ des modifications de l'activité ou de l'expression de certaines protéines,
- $\checkmark$  des modifications physiologiques de la cellule.

La caractéristique principale des cellules MDR est la diminution de l'accumulation des drogues cytotoxiques (J. A. Endicott et coll., 1987; M. M. Gottesman et I. Pastan, 1993), qui est liée à l'augmentation de l'efflux de médicaments. Il s'agit d'un efflux actif nécessitant la production d'ATP intracellulaire (K. Dano, 1973). Ce phénotype MDR peut être aboli par des substances variées, appelées "modulateurs" comme le vérapamil ou la nifédipine.

Plusieurs molécules de la famille des transporteurs ABC (ABC pour ATP-*binding cassette*), la glycoprotéine P (P pour *permeability*), les MRP (multi-drug resistance associated protein) et la BCRP (breast cancer resistance protein) sont à l'origine de cet efflux.

La famille des transporteurs ABC est l'une des familles les plus importantes, tant par sa taille que par son implication dans diverses maladies. Ces transporteurs ont été découverts et étudiés, dès les années 1950, dans les bactéries mais ce n'est qu'en 1990 que leur présence a été établie dans tout le règne vivant (J. M. Mourez M, Hofnung M, Dassa E, 2000). Ces protéines présentent une remarquable conservation dans leur séquence et dans leur organisation structurale, caractérisée par une structure en quatre domaines : deux domaines hydrophobes, formant le site de reconnaissance du substrat, et deux domaines hydrophiles conservés, impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport. Ces données semblent indiquer que les différents transporteurs ABC proviennent d'une protéine ancestrale commune (W. Saurin, M. Hofnung, et E. Dassa, 1999).

En utilisant l'hydrolyse de l'ATP, ces transporteurs sont capables d'importer ou d'exporter de façon unidirectionnelle, une variété considérable de substrats tels que des acides aminés, des peptides, des protéines, des ions organiques et inorganiques, certaines toxines, voir même des antibiotiques.

# II.2.A. Protéines responsables d'une résistance multidrogue autre que la glycoprotéine P

Bien que de nombreuses études sur la multidrogue résistance concernent principalement la glycoprotéine P, d'autres mécanismes de chimiorésistance multiple ont été décrits. Certaines lignées cellulaires MDR peuvent notamment co-exprimer plusieurs protéines de résistance (J. Beck, D. Niethammer, et V. Gekeler, 1994) ce qui complique d'avantage la compréhension de leurs mécanismes.

Il existe probablement d'autres protéines, plus ou moins bien identifiées à ce jour, jouant un rôle actif dans la résistance multidrogue.

#### II.2.A.1. Résistances enzymatiques

Le phénotype MDR peut également résulter d'une modification du taux d'expression (diminution ou augmentation) ou d'une variation structurale d'une protéine.

#### II.2.A.1.a. Résistance atypique ou at-MDR

La résistance atypique met en jeu des enzymes nucléaires dont le rôle est de réguler la topologie de l'ADN. Ce sont les topoisomérases. Elles sont impliquées dans la régulation de la structure tridimensionnelle de l'ADN, la réplication et la transcription en créant des cassures transitoires simples brins (topoisomérase I) ou doubles brins (topoisomérase II). Ces enzymes sont les sites d'action de plusieurs agents antitumoraux comme la camptothécine qui se fixe sur la topoisomérase I. Les anthracyclines, les épipodophyllotoxines et l'asmacrine ont pour cible la topoisomérase II, ces molécules stabilisent le complexe ADN-topoisomérase II, laissant l'ADN lié de façon définitive à l'enzyme. Cette liaison irréversible altère durablement le processus de réplication. Lorsqu'elle est impliquée dans le phénotype MDR la topoisomérase II apparaît sous-exprimée (E. W. Eijdems et coll., 1992).

#### II.2.A.1.b. Glutathion-S-transférases (GST)

Les Glutathion-S-transférases sont des enzymes de détoxification glutathion dépendante, qui catalysent la liaison du glutathion avec des composés électrophiles ou hydrophobes très divers. Les glutathion-S-transférases sont surexprimées dans de nombreux tissus tumoraux. (M. Volm et coll., 1993).

#### II.2.A.1.c. Résistance au méthotrexate

Le mécanisme de résistance au méthotrexate a pour cible enzymatique la dihydrofolate réductase (DHFR), qui intervient dans la synthèse des nucléotides. Les cellules tumorales qui présentent cette forme de résistance, sont caractérisées par une augmentation de la quantité de DHFR, inhibée par le méthotrexate (J. T. Bolin et coll., 1982). L'étude de la résistance au méthotrexate dans diverses lignées cellulaires a montré que la quantité de DHFR produite est due à l'existence de chromosomes doubles minutes et d'une modification de sa structure.

#### II.2.A.2. MRP ("Multidrug resistance associated protein ") ou ABCC

La glycoprotéine P n'est pas toujours détectée dans les lignées cellulaires présentant un phénotype MDR. Cette MDR atypique est attribuée à une famille de protéines membranaires, les MRP qui appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC. Elles contiennent 8 domaines transmembranaires dans la moitié N-terminale et 4 dans la moitié Cterminale (S. P. Cole et coll., 1992). L'analyse de l'expression et de la localisation cellulaires des MRP par immunomarquage a permis de les détecter au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi avec une faible localisation au niveau de la membrane plasmique (M. J. Flens et coll., 1994). Les protéines MRP utiliseraient l'hydrolyse de l'ATP pour expulser les drogues hors de la cellule, ceci en présence de glutathion.

#### **II.2.A.3.** LRP ("lung resistance related protein")

La protéine LRP ou *lung resistance related protein* a été découverte dans une lignée cellulaire pulmonaire présentant un phénotype MDR sans expression de P-gp. Cette protéine n'appartient pas à la famille des transporteurs ABC (G. L. Scheffer et coll., 1995). La LRP est l'homologue de la « major vault protein » du rat. Les "vault proteins" sont hautement conservées au cours de l'évolution, suggérant leur importance dans la physiologie cellulaire (L. Rome, N. Kedersha, et D. Chugani, 1991). La LRP est une ribonucléoprotéine largement distribuée dans le cytoplasme et présente à proximité des pores nucléaires suggérant un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique (M. A. Izquierdo et coll., 1996).

#### II.2.A.4. BCRP (" Breast Cancer resistance Protein ") ou ABCG2

Cette protéine est exprimée dans les cancers du sein, du colon et de l'estomac (D. D. Ross et coll., 1999). La protéine BCRP est constituée d'un seul site de fixation à l'ATP, situé en N-terminal et six domaines transmembranaires en C-terminal (D. D. Ross, 2000). Elle est

fonctionnelle à l'état de dimère et efflue préférentiellement la mitoxantrone, mais aussi les anthracyclines, le bisanthrène et le topotécan. Le suivi de la localisation subcellulaire de la BCRP par immunomarquage, montre que cette protéine est distribuée, d'une façon discontinue et prédominante au niveau de la membrane plasmique, ce qui renforce son action comme pompe membranaire responsable de l'efflux des agents anticancéreux (E. Rocchi et coll., 2000).

#### II.2.B. La glycoprotéine P, P-gp ou gp-170

#### II.2.B.1. Classification des isoformes de la glycoprotéine P

Les premières analyses biochimiques sur les lignées multidrogues résistantes ont suggéré qu'une ou plusieurs protéines membranaires avaient été affectées par des altérations majeures (W. T. Beck, T. J. Mueller, et L. R. Tanzer, 1979; J. L. Biedler et coll., 1975), dont la surexpression d'une phospho-glycoprotéine membranaire de 170 KDa, nommée glycoprotéine P, ou P-gp ("P" se rapporte au rôle proposé de cette protéine dans la modulation de la perméabilité cellulaire des différents médicaments). Cette forme de résistance est la mieux caractérisée, et représente environ 50 % des cas de résistance tumorale chez l'homme (M. M. Gottesman et I. Pastan, 1993). Le clonage de la glycoprotéine P, réalisé simultanément par trois équipes (C. J. Chen et coll., 1986; J. H. Gerlach et coll., 1986; P. Gros, J. Croop, et D. Housman, 1986), a permis d'identifier dans ces séquences amplifiées, le gène codant pour cette protéine, appelé gène MDR1 chez l'homme, et subdivisé en deux variants, *mdr1a* (ou *mdr3*) et *mdr1b* (ou *mdr1*) chez la souris. La transfection de ce gène dans des cellules sensibles conduit à un phénotype "multidrug resistant" complet. Malgré une grande identité de la séquence en acides aminés, la famille des gènes *mdr*, appartient à trois classes différentes (Tableau 2). Les isoformes de classe I et II sont impliquées dans le transport de cytostatiques et semblent induire des profils différents de résistance croisée (K. Choi et coll., 1991; P. Gros et coll., 1991). Un gène apparenté, appelé MDR2 ou MDR3 n'a aucun rôle dans la résistance et code pour une phosphatidylcholine translocase (P. Gros et coll., 1988). La transfection cellulaire des gènes de classe III ne confèrent pas de résistance MDR aux agents anticancéreux. Chez l'humain, le hamster, la souris et le rat, ces gènes mdr sont localisés respectivement sur les chromosomes 7, 1, 5 et 4, (A. Fojo et coll., 1986; A. P. Jongsma et coll., 1987; T. Martinsson et G. Levan, 1987).

			Souris	
Classe	Humain	Hamster	schéma A	schéma B
Ι	MDR1	pgpl	mdr3	mdrla
II		pgp2	mdr1	mdr1b
III	MDR2 / 3	pgp3	mdr2	mdr2

Tableau 2: Famille de gènes homologues de la glycoprotéine P et ses isoformes. (W. F. Ng et coll., 1989; J. A. Silverman et coll., 1991)

#### II.2.B.2. Structure de la glycoprotéine P

Grâce au séquençage des ADN complémentaires MDR1 humain (C. J. Chen et coll., 1986), mdr1 de souris (P. Gros, J. Croop, et D. Housman, 1986) et Pgp1 de hamster (J. H. Gerlach et coll., 1986), les structures primaires et secondaires de ces protéines sont connues (figure 3). La glycoprotéine P humaine, d'un poids moléculaire de 170 KDa, partie glycosidique comprise, est composée de 1280 acides aminés, contenant deux moitiés homologues (43% d'identité et 78% d'homologie) entre elles, réunies par une région "Linker" (nommé R) pouvant être phosphorylée et qui semble jouer un rôle de régulation non pas au niveau du transport actif mais au niveau du canal chlore (S. P. Hardy et coll., 1995).

Chacune de ces moitiés comportent un domaine hydrophobe (coté N-terminal) et un domaine hydrophile (coté C-terminal), orienté vers le cytoplasme (J. A. Endicott et V. Ling, 1989). La première boucle extracellulaire N-terminale est le siège d'une glycosylation d'environ 30 KDa qui peut être inhibée par un traitement à la tunicamycine.

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la provenance de ce motif en tandem : la duplication d'un gène ancestral d'une part (M. Raymond et P. Gros, 1989) et la fusion de deux gènes structurellement similaires d'autre part (C. J. Chen et coll., 1990).

#### Le profil d'hydropathie a permis de montrer que chaque moitié contient :

Un domaine hydrophobe : constitué de six segments transmembranaires (TM), possédant chacun une vingtaine de résidus d'acides aminés hydrophobes reliés entre eux par des boucles extra et intra cellulaires. Les domaines hydrophobes formant la voie par laquelle le soluté est transporté à travers la membrane, fournissent les résidus d'acides aminés qui interagissent directement avec le substrat et forment le site de liaison du substrat.

Un domaine hydrophile : domaine cytoplasmique qui lie les nucléotides ou encore appelé "Nucleotide Binding domain"(NBD) (C. J. Chen et coll., 1986). Ce domaine partage trois motifs caractérisant la "cassette" de fixation de l'ATP : les motifs de Walker A et B (J. E. Walker et coll., 1982) (courtes séquences en acides aminés, conservées dans plusieurs protéines ayant la propriété de lier les nucléotides, (ex : les sous unités α et β de l'ATPase F1 mitochondriale)), et un motif LSGGQ qui constitue la "signature" spécifique des transporteurs ABC.



Figure 3 : Structure secondaire de la glycoprotéine P

La connaissance de la structure 3D de la glycoprotéine P a été une étape capitale dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les processus biologiques du cancer (C. F. Higgins et coll., 1997). Une image tridimensionnelle reconstituée à partir de clichés obtenus par microscopie électronique de cristaux bidimensionnels (M. F. Rosenberg et coll., 1997) a permis de proposer une structure de la glycoprotéine P à 2,5 nm de résolution. Vue de dessus, la protéine ressemble à un tore avec un pore central d'un diamètre de 50Å bouché du côté cytoplasmique de la membrane par deux lobes qui correspondent aux NBD.

Cette architecture forme une coupe "aqueuse" au sein de la membrane qui communique avec les lipides (fig. 4).



#### Figure 4 : Structure de la glycoprotéine P (M. F. Rosenberg et coll., 1997)

**P** correspond au pore central ouvert sur la face extracellulaire de la membrane ; **TMD** sont deux domaines transmembranaires et **NBD** domaines de 3 nm sur la face cytoplasmique de la membrane correspondant probablement aux deux domaines liant l'ATP.

**A** : vue perpendiculaire à la surface de la membrane lipidique. **B** : vue de profil

#### II.2.B.3. Biosynthèse de la glycoprotéine P

La détection de l'expression de la glycoprotéine P a souvent fait appel à des techniques immunocytochimiques utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (MRK16, C219, E3, UIC2...) (S. Huet et coll., 1998; E. Okochi, T. Iwahashi, et T. Tsuruo, 1997). La glycoprotéine P montre une localisation prédominante au niveau de la membrane plasmique (M. C. Willingham et coll., 1987). Cette protéine se trouve également associée à des organites membranaires intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (A. Molinari et coll., 1994). Une étude suggère l'association spécifique transitoire de plusieurs protéines avec les domaines transmembranaires et les sites de fixation d'ATP (respectivement calnexin et Hsc70) (T. W. Loo et D. M. Clarke, 1995a).

#### II.2.B.4. Modifications post-traductionnelles de la glycoprotéine P

La P-gp est une protéine relativement stable qui possède une demi-vie membranaire variant entre 18 et 72 heures (M. M. Gottesman et coll., 1995). Les modifications post-traductionnelles de la glycoprotéine P ont été étudiées dans le but d'identifier les facteurs qui influencent la biosynthèse, le ciblage, l'activité de transport et la spécificité de substrat de la protéine. La glycosylation et la phosphorylation sont les deux modifications post-traductionnelles probablement impliquées dans la régulation de la synthèse et de l'activité de la glycoprotéine P.

#### **II.2.B.4.a.** Glycosylation

La glycoprotéine P a un poids moléculaire de 130 à 180 kDa suivant l'espèce et le type cellulaire où elle est exprimée. Des expériences de marquage (pulse-chase) ont révélé que la glycoprotéine P est synthétisée sous forme de précurseur non glycosylé, de masse moléculaire apparente de 120 à 140 kDa. La structure primaire des P-gp de différentes espèces animales a permis de prédire 2 à 4 sites de glycosylation (J. A. Silverman et coll., 1991). Le nombre exact et la position de ces sites diffèrent entre l'homme et les rongeurs, mais dans tous les cas, la localisation concerne la première boucle extracellulaire, du coté N-terminal. En revanche, l'absence de glycosylation de la glycoprotéine P, ne semble pas altérer totalement la fonction de cette protéine (M. Ichikawa et coll., 1991). Par contre, la fréquence d'obtention de lignées résistantes est beaucoup plus faible chez les mutants non glycosylés, cela suggère que la glycosylation est nécessaire au "processing" de la glycoprotéine P depuis ces sites de synthèse dans l'appareil de Golgi jusqu'à son acheminement à la membrane plasmique (A. H. Schinkel et coll., 1993b). Bien que les isoformes de la glycoprotéine P murine diffèrent par leurs sites et leurs taux de glycosylation, leur stabilité est équivalente (environ 18 heures de demi-vie), ce qui indique que la glycosylation n'a pas un rôle de protection contre les digestions protéolytiques (D. Cohen, C. P. Yang, et S. B. Horwitz, 1990).

#### **II.2.B.4.b.** Phosphorylation

Il a été observé dans plusieurs lignées cellulaires résistantes aux cytostatiques que la glycoprotéine P est soumise en permanence à des processus de phosphorylationdéphosphorylation.

Des études ont montré, que l'exposition de cellules de phénotype MDR à des activateurs des protéines kinases (ester de phorbol ou TPA) entraîne une augmentation de la phosphorylation de la glycoprotéine P et réduit significativement l'accumulation intracellulaire du médicament (D. T. Aftab, J. M. Yang, et W. N. Hait, 1994; T. C. Chambers et coll., 1990; R. L. Fine, J. Patel, et B. A. Chabner, 1988), alors qu'une exposition à des inhibiteurs (staurosporine, calphostine C) réduit la phosphorylation de la glycoprotéine P et augmente l'accumulation intracellulaire du médicament (S. E. Bates et coll., 1993). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'état de phosphorylation de la P-gp pourrait réguler l'efflux des drogues et moduler, de ce fait, la résistance multidrogue (M. M. Gottesman et coll., 1995). Cependant, le rôle de la phosphorylation dans la résistance reste à

discuter de part la faible spécificité des différents activateurs et inhibiteurs des protéines kinases utilisés.

La compréhension du rôle exact de la phosphorylation dans l'activité de la P-gp nécessite l'identification des différentes protéines kinases impliquées dans cette modification post-traductionnelle. Le bilan des travaux visant l'identification biochimique des sites de phosphorylation de la glycoprotéine P indique qu'un "cluster" de seulement 4 résidus sérine (ser-661, ser-667, ser-671 et ser-683) est accessible et reconnu comme cible pour la phosphorylation par plusieurs protéines kinases (PKC, PKA et kinase v-1).

Ces sites sont confinés dans la "région linker" contenue dans le domaine cytoplasmique central, constitué d'environ 60 acides aminés et séparant les deux moitiés homologues de la P-gp (G. A. Orr et coll., 1993). Cette région apparaît donc plus accessible aux protéines kinases que les autres parties de la glycoprotéine P.

#### II.2.B.5. Activité ATPasique de la glycoprotéine P

La glycoprotéine P possède deux fonctions indépendantes, une fonction de transporteur d'agents hydrophobes, ATP dépendante, et une fonction d'efflux d'ions chlore, contrôlée par le volume cellulaire. La fonction "canal chlore" nécessite la liaison de l'ATP à la glycoprotéine P mais pas son hydrolyse.

Des analyses biochimiques réalisées sur des cellules résistantes sélectionnées en présence d'un agent anticancéreux ou transfectées par le gène *MDR1*, montrent que la glycoprotéine P peut fixer des analogues de l'ATP, tel que le <sup>32</sup>P-8-azido-ATP (B. Sarkadi et coll., 1992), le GTP ainsi que des analogues non hydrolysables de l'ATP (AMP-PNP), mais pas l'ADP, le ribose-5-phosphate et les cytotoxiques. Ces résultats suggèrent que la glycoprotéine P contient des régions spécifiques à la fixation de l'ATP différentes des sites de liaison des médicaments (M. M. Cornwell et coll., 1987).

Selon plusieurs études, les deux domaines de liaison de l'ATP, situés en N et C-terminales, sont essentiels pour l'activité d'efflux de la glycoprotéine P (T. W. Loo et D. M. Clarke, 1994). L'introduction d'une mutation dans le motif Walker A de NBD1 ou NBD2 inactivent l'activité ATPasique de la glycoprotéine P et sa capacité à conférer la multidrogue résistance (M. Azzaria, E. Schurr, et P. Gros, 1989; T. W. Loo et D. M. Clarke, 1995b), confirmant que les deux sites nucléotidiques interagissent pour assurer la fonction normale de la glycoprotéine P.

Dans certaines études, il a été montré que la fixation et l'hydrolyse de l'ATP au niveau de la glycoprotéine P sont affectées par l'état phasique des lipides dans lesquels elle est reconstituée. Ces lipides peuvent moduler son activité ATPasique par interaction avec les domaines transmembranaires, ou directement avec les sites de fixation de l'ATP. Par conséquent, l'environnement membranaire (composition lipidique) peut réguler l'activité de transport de la glycoprotéine P (Y. Romsicki et F. J. Sharom, 1998).

Une étude a montré que l'activité ATPase "basale" de la glycoprotéine P diminue lorsque les membranes sont appauvries en cholestérol. Il existe un antagonisme mutuel entre le cholestérol et des substrats de la glycoprotéine P sur l'activité ATPase de celle-ci. De plus, elle assure une redistribution du cholestérol du feuillet cytosolique vers le feuillet externe des membranes plasmiques. Cette activité de redistribution est réduite en présence de concentrations importantes de substrats de la glycoprotéine P. Ces observations suggèrent que l'une des fonctions physiologiques de la glycoprotéine P est d'assurer la translocation du cholestérol vers le feuillet externe des membranes plasmiques. A. E. Escargueil, et S. Orlowski, 2002).

Des mutations ponctuelles dans divers segments transmembranaires ou boucles cytoplasmiques changent la spécificité de la glycoprotéine P pour différents médicaments conférant le phénotype MDR, en modifiant l'affinité de ces médicaments pour le transporteur (P. Lepage et P. Gros, 1995).

Par ailleurs, il a été mis en évidence la capacité de la glycoprotéine P à se lier à de nombreux composés photoactivables, analogues structuraux de modulateurs de résistance ou de médicaments anticancéreux (A. R. Safa, 1993). Par exemple un analogue de la vinblastine se fixerait directement sur la P-gp, cette fixation serait inhibée par la vincristine et le vérapamil, ce qui suggère un mécanisme de compétition entre ces substances sur ces sites de reconnaissances.

#### II.2.B.6. Expression de la glycoprotéine P

De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de l'expression de la glycoprotéine P dans les tissus normaux. L'ARN messager du gène *MDR1* peut être détecté par des analyses en Northern-blot, hybridation *in situ* ou PCR (Polymerase Chain Reaction). Par ailleurs, l'étude de l'expression de la glycoprotéine P a été réalisée à l'aide d'une série d'anticorps monoclonaux par immunocytochimie ou cytométrie en flux. Un grand nombre de travaux ont

montré que la glycoprotéine P s'exprime en permanence à haut niveau dans les tissus et cellules assurant des fonctions de détoxification (tubule rénal, canalicule hépatique) ou de protection vis-à-vis du monde extérieur (intestin, macrophages, cellules *natural killer*) (F. Thiebaut et coll., 1987). Sa localisation dans le pôle apical des cellules épithéliales semble en faveur de son rôle naturel de transporteur de substances toxiques (H. Glavinas et coll., 2004).

La glycoprotéine P est également exprimée par les cellules souches médullaires CD34<sup>+</sup> ce qui permet la régénération sanguine après une chimiothérapie intensive (P. M. Chaudhary et I. B. Roninson, 1991). Dans les autres cellules, normales ou cancéreuses, l'expression de la glycoprotéine P est inductible en condition de stress (chaleur, irradiation, toxiques, carcinogènes). L'activation pourrait résulter d'un réarrangement génique faisant passer le gène *MDR1* sous le contrôle de nouveaux promoteurs transcriptionnels. L'expression de *MDR1* est contrôlée, entre autre, par la protéine p53 ou par une protéine régulatrice YB-1 qui se fixe sur un site promoteur amont, après un traitement aux UV ou par des médicaments génotoxiques (T. Ohga et coll., 1998; J. V. Thottassery et coll., 1997). L'hyperexpression du gène *MDR1* est également associée à la stabilité de l'ARN messager au niveau des tumeurs du foie chimio-induites du rat (C. H. Lee, G. Bradley, et V. Ling, 1998).

Chez la souris, le gène *mdr1* est surtout exprimé dans les glandes surrénales, le placenta, le rein et l'utérus des souris en gestation. Alors que l'expression du gène *mdr2* est localisée dans le foie et les muscles, et l'on retrouve *mdr3* dans le poumon, le tube digestif et la barrière hémato-encéphalique (J. M. Croop et coll., 1989).

#### II.2.B.7. Mécanismes de transport des agents anticancéreux

Les cellules résistantes, comparées aux cellules sensibles, se caractérisent par une faible accumulation intracellulaire des médicaments. Ce phénomène s'explique, à la fois par une diminution de l'influx des drogues et une augmentation de l'efflux actif des cytostatiques. De plus, il est incontestable que la glycoprotéine P reconnaît un grand nombre de composés qui sont chimiquement et structurellement différents, néanmoins le mécanisme exact d'action de la glycoprotéine P n'est pas connu. Plusieurs mécanismes ont toutefois été proposés.

✓ Les modèles directs, décrivent généralement une interaction spécifique entre la glycoprotéine P et son substrat ainsi que l'utilisation de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP par la protéine pour changer de conformation et libérer le médicament du côté extérieur de la membrane.
Dans le modèle conventionnel baptisé "aspirateur hydrophobe" par Gottesman et Pastan (M. M. Gottesman et I. Pastan, 1993), la glycoprotéine P interagit directement avec le xénobiotique au niveau de la membrane plasmique avant que celui-ci atteigne le cytosol.

Alors que dans le modèle "flippase" (C. F. Higgins, 1994), la glycoprotéine P interagit avec le substrat du côté interne de la bicouche lipidique et le transporte vers le côté externe de la membrane plasmique. Ce dernier modèle est soutenu par le fait que le produit du gène *MDR2* est une phosphatidylcholine translocase (flippase) essentielle pour l'extrusion de la phosphatidylcholine de la membrane plasmique hépatique dans la bile.

Dans les deux cas, il en résulte une augmentation de l'expulsion du médicament et par conséquent, une diminution de son accumulation intracellulaire. (fig. 5).



Figure 5 : Modèles de fonctionnement de la glycoprotéine P

✓ Le modèle indirect, le moins caractérisé, a été suggéré, car les cellules tumorales MDR ainsi que les cellules transfectées par la glycoprotéine P ont en général un pH interne plus haut et un potentiel membranaire plus bas que les cellules de contrôle.

Cette augmentation du pH intracellulaire ou cette diminution du potentiel membranaire peuvent réduire l'accumulation intracellulaire de composés cationiques. De plus, un pH intracellulaire alcalin peut baisser l'accumulation de bases faibles tels que les substrats MDR (doxorubicine, vinblastine), et affecter également la liaison des drogues à leur cibles intracellulaires (ex : liaison de la colchicine à l' $\alpha$  tubuline) (P. D. Roepe, 1992; L. Y.

Wei et P. D. Roepe, 1994). En accord avec ce modèle, il a été montré qu'au niveau des cellules sauvages, l'alcalinisation cytoplasmique entraîne une diminution de l'accumulation des drogues, alors que les agents acidifiants reversent le phénotype MDR (S. M. Simon et M. Schindler, 1994).

Plusieurs données expérimentales favorisent l'implication directe de la glycoprotéine P dans la liaison et le transport de multiples drogues :

- La glycoprotéine P se lie à des analogues des médicaments marqués, suggérant un contact direct entre le substrat et la protéine (A. R. Safa, 1993).
- La mutation d'un seul résidu d'acide aminé dans ou au voisinage des domaines transmembranaires de la glycoprotéine P, peut altérer l'interaction spécifique du substrat avec la protéine (T. W. Loo et D. M. Clarke, 1993). Par conséquent, une diminution de la liaison du substrat à la glycoprotéine P ainsi qu'une modulation de son transport sont observées (S. Kajiji et coll., 1993).
- La glycoprotéine P se lie à des analogues de l'ATP et possède une activité ATPasique stimulable par différents médicaments. Des mutations touchant un des sites spécifiques de fixation d'ATP affectent l'activité d'expulsion des cytotoxiques par cette protéine (M. Azzaria, E. Schurr, et P. Gros, 1989).
- Le transport actif des substrats assurés par la glycoprotéine P à travers la membrane se fait contre un gradient de concentration. Ce transport actif n'est pas affecté par les changements de potentiel membranaire et est indépendant du gradient de protons à travers la membrane (S. Ruetz et P. Gros, 1994).

Alors que le mécanisme indirect pourrait dans quelques exemples contribuer au phénotype MDR, l'augmentation de la libération de molécules d'ATP par des cellules résistantes suggère que la glycoprotéine P est une pompe à ATP (E. H. Abraham et coll., 1993). Il a donc été proposé qu'un gradient électrochimique d'ATP plutôt que son hydrolyse, puisse être à l'origine de l'efflux des agents anticancéreux. De plus, l'augmentation du pH cytosolique des cellules exprimant la glycoprotéine P, suggère que cette protéine est, soit un régulateur direct de pH (P. D. Roepe, 1994), soit un modulateur du gradient électrochimique de la membrane plasmique. Ce modèle indirect semble toutefois être spécifique à certaines lignées cellulaires.

#### II.2.B.8. Réversion du phénotype MDR

La chimiorésistance des cellules cancéreuses est un obstacle majeur auquel se heurtent les cliniciens. Afin de maîtriser et d'inverser le phénotype MDR plusieurs approches ont été envisagées comme l'utilisation dans les traitements anticancéreux de cytostatiques non concernés par ce type de résistance ou de certains médicaments ayant une sensibilité collatérale (par exemple les corticostéroïdes) (W. S. Dalton et S. E. Salmon, 1992).

Néanmoins, les chercheurs ont principalement focalisé leurs efforts sur la découverte de nombreux composés capables de stopper la réduction de l'accumulation de "drogue" dans les cellules de phénotype MDR. Ces composés appelés, chimiosensibilisants, sont des modulateurs ou encore des agents révertants. Ils inhibent l'efflux produit par la glycoprotéine P, ce qui rend les cellules résistantes à nouveau sensibles au traitement, et permet une réversion partielle ou totale de la multidrogue résistance. Certains anticorps (MRK-16, UIC2, HYB-24 1, HYB-612, 265/F4), dirigés contre un épitope extracellulaire de la glycoprotéine P entraînent une augmentation de l'accumulation intra-tumorale des médicaments chez les souris porteuses d'une tumeur d'origine humaine (T. Efferth et M. Volm, 1993; L. S. Rittmann-Grauer et coll., 1992; T. Tsuruo et coll., 1989). MRK-16 potentialise la cytotoxicité de médicaments impliqués dans la résistance pléïotropique (vincristine, dactinomycine) de façon dose-dépendante. Cet anticorps entraînerait une augmentation de la concentration intracellulaire en bloquant l'efflux des médicaments. Des essais *in-vivo*, chez la souris, montrent que l'utilisation de MRK-16 permet une rémission rapide et la guérison de certains animaux (M. Volm, 1998).

D'autre part, des immunotoxines formées par la combinaison du MRK-16 et de l'exotoxine de *Pseudomonas*, se sont avérées létales pour des cellules résistantes en culture (D. J. Fitzgerald et coll., 1987). L'encapsulation d'agents anti-cancéreux dans des liposomes de même que la conjugaison de médicaments à la transferrine (doxorubicine-transferrine) peuvent augmenter les concentrations intracellulaires de médicaments dans les cellules cancéreuses (P. Lemieux et M. Page, 1994; G. H. Mickisch et coll., 1992)

Dès 1981 l'équipe de Tsuruo a montré que la sensibilité des cellules de phénotype MDR résistantes aux vinca alcaloïdes pouvait être restaurée transitoirement par le vérapamil (T. Tsuruo et coll., 1981). Depuis, de nombreux modulateurs ont été développés et testés *in vitro*. Ces composés appartiennent à différentes classes pharmacologiques et thérapeutiques : Tableau 3

## Tableau 3: Modulateurs de la multidrogue résistance actifs in vitro

ANTAGONISTES DU CALCIUM	ANTIOESTROGENES
ANTAGONISTES DU CALCIUM Phénalkylamines : vérapamil, tiapamil Benzothiazépines : diltiazem Dihydropyridines : niguldipine, nifédipine, nimodipine Prénylamines : prénylamine Autres : bépridil, nicardipine	ANTIOESTROGENESTamoxifèneSURFACTANTTween, tritonANALOGUES DE MEDICAMENTSVindoline, analogues d'anthracyclines
<b>NEUROLEPTIQUES</b> <b>Phénothiazines</b> : trifuopérazine, chlorpromazine, fluphénazine <b>Thioxanthines</b> : flupenthixol, clopenthixol	ALCALOIDES INDOLES Réserpine, yohimbine ANTICORPS POLY ET MONOCLONAUX
ANTIDREPRESSEURS Clomipradine, imipradine	MRK 16, C219, UIC2, HYB-24 1, HYB-612, 265/F4 OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS
STEROIDES Progestérone, cortisol, testostérone QUINOLONES Chloroquine, quinacine, quinine, quinidine, LY335979	Ribozymes, interference par l'ARN (small Interfering RNA, microRNA) <u>AUTRES</u> Cyclosporine A, staurosporine, propanolol, S9788, PSC833, XR9576

La glycoprotéine P se caractérise par une faible spécificité vis-à-vis des substrats qu'elle expulse. Il n'est donc pas étonnant de constater que de très nombreuses molécules, d'actions pharmacologiques variées, peuvent entrer en compétition avec des cytostatiques au niveau de ces sites de fixation. Cependant, ces modulateurs sont souvent des composés lipophiles, hétérocycliques et chargés positivement à pH neutre. Leur mode d'action fait l'objet de nombreuses recherches car ils permettraient de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui régissent la résistance et d'imaginer d'autres stratégies thérapeutiques pouvant s'y opposer.

Le mécanisme d'action de ces modulateurs repose, pour la plupart, sur une inhibition compétitive, ou non, de l'efflux des cytotoxiques auprès de la glycoprotéine P, sans en modifier son expression. Toutefois, certaines molécules peuvent agir indirectement sur la glycoprotéine P par la voie des protéines kinases qui jouent un rôle essentiel dans la phosphorylation de cette protéine. La protéine kinase C semble impliquée dans le processus de phosphorylation qui conduit à une augmentation de la résistance. De nombreux inhibiteurs de la PKC (staurosporine, calphostine C...) sont capables de s'opposer à cette résistance (A. Basu, 1993; S. E. Bates et coll., 1993). Ils pourraient agir non seulement sur l'activité de pompe exercée par la glycoprotéine P, mais aussi en diminuant l'expression du gène *MDR1* (H. Grunicke et J. Hofmann, 1992).

L'expérimentation préclinique d'un modulateur est relativement complexe. Cependant, de nombreux essais de phase I et II en hématologie comme dans les tumeurs solides, associant des médicaments anticancéreux et des révertants, ont permis de sélectionner la quinine et la cyclosporine comme étant capables d'atteindre des concentrations sériques inhibitrices de la glycoprotéine P, sans toxicité majeure ou irréversible. Le PSC833 a été le premier modulateur à être utilisé en phase III, il s'agit d'un dérivé de la cyclosporine D, 5 à 30 fois plus révertant que la cyclosporine A (T. Watanabe et coll., 1995), mais ni néphrotoxique ni immunomodulateur (X. R. Jiang et coll., 1995). En revanche, comme la cyclosporine A, il entraîne un syndrome rétentionnel transitoire et une diminution très importante de la clairance des cytostatiques co-administrés dépendant de la glycoprotéine P, comme les anthracyclines, les vinca-alcaloïdes, l'étoposide ou les taxanes. Cette interaction est moins prononcée pour la quinine. Les modulateurs de la glycoprotéine P actuellement en développement sont moins avancés, et sont soit en phase II, soit en début de phase III. Le LY335979 (E. H. Rubin et coll., 2002) est un dérivé quinolé, le XR9576 (P. Mistry et coll., 2001) un dérivé d'acide anthranilique, tous deux efficaces par voie orale.

Malheureusement, l'efficacité des modulateurs en clinique reste cependant très souvent limitée en raison de l'apparition d'effets toxiques sévères aux doses suffisamment actives pour obtenir une réversion complète.

#### II.2.C. Le resvératrol

Le resvératrol est un stilbène appartenant à la famille des phytoalexines, c'est un composé antibiotique produit par la plante en réponse à une blessure, à une attaque pathogène (*Mildiou, Oïdium, botrytis cinerea*) (L. Fremont, 2000), à des radiations UV (P. Langcake et R. J. Pryce, 1977) ainsi qu'à l'ozone (R. Schubert et coll., 1997).

C'est un composé polyphénolique de la classe des non flavonoïdes, qui se présente sous deux formes isomériques *cis* et *trans* (fig. 6). L'isomère *trans* est stériquement la forme la plus stable et donc la plus fréquemment rencontrée dans la nature (W. A. Trela B, 1996). C'est donc cet isomère que nous avons utilisé dans notre étude.



Figure 6 : Structure chimique du (a) trans et (b) cis-resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène)

#### II.2.C.1. Activités biologiques du resvératrol

Les recherches réalisées sur le resvératrol montrent qu'il possède un grand nombre de propriétés biologiques justifiant son utilisation dans de nombreux traitements en pathologies humaines :

#### II.2.C.1.a. Activité anti-oxydante

Le resvératrol possède une puissante activité anti-oxydante liée à la présence de ses groupements hydroxyles capables de capter les radicaux libres produits *in vivo* (L. Fremont, 2000). L'excès de radicaux libres, ou "stress oxydatif", dans l'organisme participe à de nombreux processus pathologiques en lien avec le vieillissement et les maladies de dégénérescence. Le resvératrol protège les lipides de la péroxydation (L. Belguendouz, L. Fremont, et A. Linard, 1997) et stoppe de façon dose-dépendante l'entrée des LDL oxydées (mauvais cholestérol) dans la paroi vasculaire (S. Chanvitayapongs, B. Draczynska-Lusiak, et A. Y. Sun, 1997; G. A. Losa, 2003; B. Tadolini et coll., 2000).

# II.2.C.1.b. Répression de l'agrégation plaquettaire, activités vasodilatatrice et anti-inflammatoire

Le resvératrol inhibe l'agrégation plaquettaire de manière dose-dépendante permettant ainsi de réduire la mort subite ou les accidents ischémiques graves (C. R. Pace-Asciak et coll., 1995). Il possède aussi une activité vasodilatatrice due à la stimulation de l'expression du gène eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) (T. Wallerath et coll., 2002). C'est également un composé anti-inflammatoire inhibant les enzymes, (COX1) (W. L. Smith, R. M. Garavito, et D. L. Dewitt, 1996), (COX2) (D. A. Kujubu et coll., 1991) (cyclooxygénases 1 et 2), 5- et 15lypoxygénases (Y. Kimura, H. Okuda, et S. Arichi, 1985), nécessaires à la synthèse des acides gras poly-insaturés (eicosanoïdes) médiateurs biologiques responsables de l'inflammation.

#### II.2.C.1.c. Activité immunomodulatrice

Le resvératrol possède une activité immunomodulatrice suggérant qu'il puisse jouer un rôle important dans le traitement des maladies impliquant une surproduction de cytokines inflammatoires (J. F. Marier et coll., 2005). Par exemple, il inhibe, de façon dose-dépendante, l'expression du facteur tissulaire (U. R. Pendurthi, J. T. Williams, et L. V. Rao, 1999) chez des cellules endothéliales stimulées par divers agonistes, comprenant l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et le LPS, mais il n'a aucun effet sur la liaison NF $\kappa$ B (T. L. Wadsworth et D. R. Koop, 1999). Le resvératrol ralentit *in vitro* l'activation des macrophages, réduit la cytotoxicité des lymphocytes ainsi que celle des cellules NK (natural killer), et diminue la production de cytokines par les cellules T CD4+ et CD8+ (R. Falchetti et coll., 2001). De plus, il a été démontré que le resvératrol pouvait inhiber l'expression des ARNm du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  induite par le LPS dans les cellules endothéliales et les monocytes (A. A. Bertelli et coll., 2001).

#### II.2.C.1.d. Activités anticancéreuses

Le resvératrol possède également des propriétés anticancéreuses puisqu'il est capable de stopper diverses étapes du développement tumoral dans différents types de cancers. Le resvératrol est efficace lors des trois phases du processus tumoral: l'initiation, la promotion et la progression. Il agit par un grand nombre de mécanismes allant du blocage des oestrogènes, des androgènes jusqu'à la modulation de l'expression des gènes. Ces propriétés permettent d'envisager son utilisation dans le traitement de différents types de cancers tant au niveau préventif que curatif (M. Jang et coll., 1997).

#### **II.2.C.1.d.1.** Enzymes de biotransformation

Lors de traitements anticancéreux, tout comme dans les conditions naturelles, l'organisme est susceptible d'être exposé à des xénobiotiques pouvant engendrer une toxicité en s'accumulant dans les cellules. Pour pallier à cette accumulation, l'organisme développe un processus de détoxification qui se déroule en trois phases opérées par les enzymes de biotransformation de phase I, II et III.

Les enzymes de phase I catalysent des réactions dites de "fonctionnalisation ": oxydation, réduction ou hydrolyse. Les réactions de phase II sont dites de "conjuguaison ", qui augmentent notablement la polarité de la molécule, facilitant ainsi son élimination. Enfin, la phase III regroupe les systèmes de transport qui jouent un rôle important dans la défense de la cellule et de l'organisme contre les xénobiotiques (T. Ishikawa, 1992; P. Zimniak, S. Awasthi, et Y. C. Awasthi, 1993). Ces transporteurs sont généralement des glycoprotéines membranaires (glycoprotéine P) de type MDR (Multidrug resistance) et MRP (multidrug resistance associated protein) (W. T. Bellamy, 1996) et permettent l'expulsion du xénobiotique ou de ses métabolites hors de la cellule.

Si les processus de biotransformation ont un rôle de détoxification, ils sont également susceptibles d'influer sur le devenir de la cellule en induisant des phénomènes de prolifération/survie cellulaire (promotion tumorale), ou de mort cellulaire tant par apoptose que par nécrose.

Il a été démontré que le resvératrol interagissait avec certaines enzymes de la phase I (R. Frotschl et coll., 1998), dont les cytochromes (B. Piver et coll., 2001) et tout particulièrement le cytochrome P450 (C. Yu et coll., 2003). Cette enzyme, connue sous le nom de CYP 1B1, que l'on retrouve dans de nombreuses tumeurs (G. I. Murray et coll., 1997;

G. A. Potter et coll., 2002), convertit le resvératrol en un phytooestrogène anticancéreux, le piceatannol, inhibiteur de tyrosine kinase connu pour son activité antiproliférative dans les cellules leucémiques (N. R. Ferrigni et coll., 1984).

Il est également capable d'induire certaines enzymes de phase II (H. Szaefer et coll., 2004). Par ailleurs, il peut être métabolisé en dérivés glucuronidé ou sulfaté par ces mêmes enzymes.

#### II.2.C.1.d.2. Inhibition de l'angiogenèse

Le resvératrol a la capacité d'inhiber l'angiogenèse en supprimant la néovascularisation *in vivo* induite par le facteur de croissance fibroblastique (bFGF2 = bFibroblast Growth Factors 2) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF = vascular endothelial growth factor), et en inhibant la prolifération des cellules endothéliales capillaires (E. Brakenhielm, R. Cao, et Y. Cao, 2001).

Le resvératrol est également capable de réduire l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales après stimulation par le TNFα ainsi que l'augmentation de la perméabilité. Par ailleurs, il peut inhiber l'expression d'autres molécules d'adhésion et en particulier les molécules d'adhésion intracellulaires-1 (ICAM-1) (A. A. Bertelli et coll., 2001; A. Fulgenzi et coll., 2001).

Récemment il a été démontré qu'il avait un effet inhibiteur direct sur l'expression ainsi que l'activité des MMPs, en particulier la MMP9 (Y. T. Li et coll., 2003; J. H. Woo et coll., 2004), qui dégrade la matrice extracellulaire favorisant ainsi la progression tumorale.

# II.2.C.1.d.3. Activités sur la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire et l'apoptose

Le resvératrol est capable d'inhiber la prolifération d'un grand nombre de cellules tumorales, incluant les cancers myéloïdes, lymphoïdes, mélanomes, cancers du sein, colon, pancréas, estomac, prostate, ovaires et foie. En plus d'inhiber la prolifération, il induit également l'apoptose. Le resvératrol, comme un certain nombre d'agents cytotoxiques, affecte la prolifération cellulaire en perturbant le bon déroulement du cycle cellulaire. Le blocage de la progression des cellules à travers le cycle cellulaire varie en fonction du type cellulaire, de la dose de resvératrol et de la durée du traitement.

Suivant sa concentration, le resvératrol peut soit stimuler (K. Mizutani et coll., 1998), soit inhiber la prolifération cellulaire (M. V. Clement et coll., 1998; A. K. Joe et coll., 2002). Généralement, aux concentrations utilisées *in vitro*, l'effet du resvératrol est antiprolifératif comme démontré dans un grand nombre de cellules tumorales (K. P. Bhat et J. M. Pezzuto, 2002).

L'activité antiproliférative qu'exerce le resvératrol sur un grand nombre de lignées cellulaires, peut s'expliquer d'une part, par sa capacité à inhiber l'activité de la ribonucléotide réductase, enzyme nécessaire à la synthèse d'ADN durant la phase S du cycle cellulaire (K. Fukuhara et N. Miyata, 1998), et donc de provoquer un arrêt de la croissance cellulaire.

D'autre part, il peut inhiber la synthèse d'ADN en interagissant directement avec l'ADN polymérase (L. A. Stivala et coll., 2001). Le resvératrol peut aussi inhiber l'ornithine décarboxylase (Y. Schneider et coll., 2000), une enzyme clé impliquée dans la biosynthèse de polyamine, qui est accrue au niveau du cancer.

Un grand nombre d'études, ont montré, que diverses lignées cellulaires humaines tumorales, traitées au resvératrol, arrêtent leur cycle cellulaire à la transition G1/S (N. Ahmad et coll., 2001), en phase S (S. Banerjee, C. Bueso-Ramos, et B. B. Aggarwal, 2002; S. Fulda et K. M. Debatin, 2004; U. G. Haider et coll., 2003; A. K. Joe et coll., 2002) ou, moins fréquemment, en phase G2/M (Y. C. Liang et coll., 2003).

L'induction d'apoptose déclenchée par le resvératrol a été observée dans de nombreuses cellules tumorales. Elle présente les caractéristiques de la mort induite par la plupart des agents cytotoxiques, comme la perte de l'asymétrie membranaire et la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN.

Certains auteurs ont montré que le resvératrol pouvait entraîner l'activation des voies extrinsèques nécessitant l'intervention des récepteurs de mort de la superfamille du TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) dont fait partie la protéine Fas encore appelé CD95 ou Apo1 (M. V. Clement et coll., 1998). Par contre, d'autres équipes ont montré que le resvératrol pouvait entraîner l'arrêt en phase S des cellules leucémiques CEM-C7H2, ainsi que l'apoptose ceci indépendamment du système Fas-FasL (D. Bernhard et coll., 2000). Ces différents résultats

indiquent que l'effet du resvératrol sur la participation de la voie de signalisation de Fas-FasL pourrait dépendre du type cellulaire.

Le resvératrol peut également induire l'apoptose en dépolarisant les membranes mitochondriales et en activant la caspase 9 des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë, ceci indépendamment de la voie de signalisation Fas (J. Dorrie et coll., 2001; S. Pervaiz, 2001).

Selon le type de lignées cellulaires, l'apoptose induite par le resvératrol peut être indépendante de la protéine p53 (D. Bernhard et coll., 2000), ou au contraire associée à une augmentation d'expression du gène codant pour cette protéine (T. C. Hsieh et coll., 1999a; T. C. Hsieh et coll., 1999b; C. Huang et coll., 1999). Le gène p53 est l'un des plus importants suppresseurs de tumeur puisqu'il est muté dans près de la moitié des cas de cancers humains.

Il existe maintenant de nombreux exemples d'un lien entre une activité exacerbée de NFκB et le cancer. Ainsi une activité élevée de NFκB est une caractéristique de nombreuses leucémies, lymphomes et tumeurs solides. De plus, son activation par les chimiothérapies et les radiations s'oppose à l'efficacité de ces traitements. Le resvératrol pourrait être un inhibiteur de ce facteur de transcription car il est capable d'inhiber l'activité d'IκB ainsi que l'expression des gènes régulés par NFκB (K. P. Bhat et J. M. Pezzuto, 2002; Z. Estrov et coll., 2003; M. Holmes-Mcnary et A. S. Baldwin, Jr., 2000). Ainsi, les effets anti-cancérigène, anti-inflammatoire, et antiprolifératif du resvératrol peuvent être partiellement attribués à l'inhibition de l'activation de NF-κB, d'Ap-1 et des kinases associées (S. K. Manna, A. Mukhopadhyay, et B. B. Aggarwal, 2000).

En se basant sur les études réalisées à ce jour, il est sûr que le resvératrol possède un fort potentiel dans la prévention et la thérapie d'un grand nombre de tumeurs. Le resvératrol, agent pleïotropique, est capable d'interagir de façon significative avec de nombreux processus biochimiques. Par conséquent, son activité ne peut être résumée en un mécanisme d'action unique mais semble plutôt être la résultante de diverses actions complémentaires sur différentes voies biochimiques. Cependant, les différents résultats indiquent également que les voies de signalisation activées par le resvératrol sont encore très controversées et dépendent à la fois du système cellulaire étudié et de la concentration de resvératrol utilisées. Enfin, le resvératrol a le potentiel de traiter des maladies autres que le cancer et les maladies cardiovasculaires.

# II.3. But de cette étude

Les nombreux échecs de la chimiothérapie et de la chimiomodulation pour inhiber la glycoprotéine P *in vivo*, ainsi que la possibilité *in vitro* de diminuer la résistance des cellules de phénotype MDR par des anticorps dirigés contre cette glycoprotéine, ont orienté initialement nos recherches vers une approche innovante et efficace consistant à induire la formation d'auto-anticorps dirigés contre la glycoprotéine P.

Actuellement, l'efficacité des traitements anticancéreux est subordonnée à différents types de thérapies, c'est pourquoi en complément de notre approche d'immunomodulation nous avons développé une stratégie utilisant une substance : le resvératrol. En effet, bon nombre d'études suggèrent que le resvératrol offre des possibilités chimiopréventives et chimiothérapeutiques intéressantes contre le cancer. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser cette molécule pour étudier son effet sur des lignées cellulaires de phénotype MDR, surexprimant la glycoprotéine P.

#### II.3.A. Production d'auto-anticorps anti-glycoprotéine P

L'objectif est de provoquer *in vivo*, ceci par "vaccination", l'inhibition de cette protéine en induisant des anticorps spécifiques de certains fragments extracellulaires de la glycoprotéine P murine afin d'inhiber la résistance aux agents cytotoxiques ceci avant ou au cours des traitements chimiothérapeutiques.

Dans le but d'induire des auto-anticorps spécifiques d'épitopes extra-cellulaires de la glycoprotéine P murine chez des souris B6D2F1, nous avons dans un premier temps, analysé l'antigénicité d'une préparation vaccinale composée d'adjuvant et de lipopeptides incorporés dans des liposomes.

Une évaluation de l'activité *ex vivo* des anticorps induits par l'inoculation de la préparation vaccinale a ensuite été réalisée. Quatre lignées cellulaires de souris résistantes à la doxorubicine, B16R, P388R, L1210R et LM(tk-)R ont ainsi été utilisées pour mesurer l'activité inhibitrice de sérums de souris immunisées par la préparation vaccinale.

L'évaluation du potentiel des auto-anticorps induits à restituer *in vitro* et *in vivo* la sensibilité d'une tumeur chimiorésistante, a exigé la mise au point d'un modèle expérimental de tumeur murine résistante à la doxorubicine. Ce modèle a été réalisé à partir de la lignée de type monocytaire P388R.

Nous avons étudié sur des souris B6D2F1 immunisées, les effets de la préparation vaccinale au niveau des organes (foie, reins, rate, glandes surrénales, pancréas, ovaires, poumons, cœur), qui expriment de façon naturelle la glycoprotéine P.

Cette méthode pourrait être un modèle plus prédictif pour un succès clinique.

## II.3.B. Modulation du phénotype MDR par le resvératrol

Le resvératrol a été utilisé sur les lignées cellulaires sensibles (S) et résistantes (R) à la doxorubicine à savoir les cellules P388, L1210, et LM(tk-).

Les effets du resvératrol, utilisé à différentes concentrations  $(0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 \mu M)$ , ont été analysés par des techniques distinctes et complémentaires, afin de préciser son implication potentielle dans la prolifération cellulaire, la cytotoxicité, le cycle cellulaire et la modulation de la glycoprotéine P.

La méthode d'exclusion au bleu trypan a été utilisée afin d'évaluer la mort cellulaire induite par le resvératrol dans chaque lignée cellulaire. Le test au MTT nous a permit d'une part de déterminer l' $IC_{50}$  et l'effet antiprolifératif du resvératrol sur les différentes lignées cellulaires, mais également d'estimer son pouvoir chimiomodulateur en présence de doxorubicine.

Nous avons étudié l'induction de l'apoptose par le resvératrol sur les différentes lignées cellulaires. L'apoptose a été évaluée par l'analyse de la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN et par le double marquage de l'ADN à l'iodure de propidium et au Hoechst. Quant à son action au niveau du cycle cellulaire, elle a été analysée par cytométrie en flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium.

L'effet du resvératrol sur l'expression des gènes *mdr* a été analysé par RT-PCR.

Et enfin, nous avons évalué, par cytométrie en flux, la potentialité éventuelle du resvératrol à moduler l'accumulation de la doxorubicine. Cette étude est basée sur les propriétés de fluorescence des anthracyclines.

# III.MATERIEL ET METHODES

# III.1. Les effecteurs pharmacologiques

#### III.1.A. Doxorubicine (DOX)

La doxorubicine ou adriamycine est un antibiotique de la famille des anthracyclines (fig. 7). Nous avons utilisé une solution mère de chlorhydrate de doxorubicine à 50 mg / 25 mL soit  $3,45 \times 10^{-3} \text{ M}$  (TEVA *classics*; Paris, France). Cette solution est aliquotée et conservée à  $-20^{\circ}$ C à l'abri de la lumière. La préparation des différentes concentrations utilisées sur les cultures cellulaires est obtenue par des dilutions extemporanées successives de cette solution mère dans du milieu de culture.



Figure 7 : Structure chimique de la doxorubicine

#### III.1.B. Vinblastine (VBL)

La vinblastine appartient à la famille des agents antimitotiques ou "poisons du fuseau" et à la classe des vinca-alcaloïdes (fig. 8). La solution mère de vinblastine [(VBLE<sup>®</sup>) (EG LABO – Boulogne-Billancourt, France)] est préparée à  $10^{-2}$  M en dissolvant 10 mg de sulfate de vinblastine sous forme de poudre lyophilisée dans 1,100 mL d'eau stérile. Cette solution est aliquotée et conservée à  $-20^{\circ}$ C à l'abri de la lumière.



Figure 8 : Structure chimique de la vinblastine

# III.1.C. Vérapamil ou (ISOPTINE<sup>®</sup>)

Le vérapamil appartient à la famille des antagonistes des flux transmembranaires du calcium. C'est un dérivé synthétique de la papavérine (fig. 9). Le vérapamil (Laboratoires ABBOTT France, Rungis, France) se présente sous forme d'ampoules injectables de 5 mg / 2 mL soit 5 mM.



Figure 9 : Structure chimique du Vérapamil

#### III.2. Trans-resvératrol (resvératrol)

Le resvératrol est un stilbène appartenant à la famille des phytoalexines. C'est un composé polyphénolique soluble dans des solvants organiques. Nous avons préparé la solution mère de resvératrol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dans de l'éthanol aux concentrations de 0,2 M et 0,05 M. Cette solution est aliquotée et conservée à -20°C. (Structure du resvératrol au § II.2.C fig. 6 p25)

## **III.3.** Les agents fluorescents

#### III.3.A. Iodure de Propidium (IP)

L'iodure de propidium est un agent fluorescent utilisé pour sa spécificité vis-à-vis des acides nucléiques (fig. 10). Sa longueur d'onde d'excitation se situe entre 520-570 nm, alors que son pic d'émission est situé à 615 nm. La solution mère est obtenue par dissolution de 5 mg d'IP (Sigma) dans 10 mL d'eau distillée. Cette solution concentrée à 0,5 mg / mL est aliquotée et conservée à 4°C



Figure 10: Structure chimique de l'Iodure de Propidium (IP)

#### **III.3.B.** Hoechst 33342

Le Hoechst est un dérivé de benzimidazole (sigma) (fig. 11) qui émet une fluorescence bleue (>420nm) quand il est excité dans l'UV (330-380 nm). Il a une haute affinité pour l'ADN et se lie préférentiellement aux bases A-T. C'est un colorant perméant.



Figure 11 : Structure chimique du Hoechst ou bisBenzimide

# III.4. Modèles animaux

Des femelles hydrides B6D2F1 d'haplotype H2b//H2d, résultant de croisements entre des femelles de la souche C57B1/6 (H2b) et de mâles de la souche DBA/2 (H2d), fournies par (Iffa Credo, L'Arbresle, France) pesant entre 19 et 22 g et âgées de 5 à 6 semaines sont utilisées à l'âge de 6 à 10 semaines pour les différentes expérimentations.

#### III.5. Modèles d'études cellulaires

#### III.5.A. Lignées cellulaires murines en suspension

Nous avons utilisé des lignées cellulaires de type monocytaire, P388 (G. Atassi, Laboratoire Servier, Courbevoie, France) et leucémique L1210 (J. C. Jardillier, Institut Jean Godinot, Reims, France) sensible et résistante à la doxorubicine.

Les différentes lignées cellulaires sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 + Glutamax I<sup>TM</sup> (GIBCO<sup>TM</sup>, Cergy Pontoise, France). Le milieu est supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (GIBCO<sup>TM</sup>) préalablement décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min afin d'éliminer les facteurs du complément. En entretien courant, la suspension

cellulaire est ensemencée à 20 000 cellules par millilitre en boîte de culture (Nunc<sup>TM</sup>) (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) de 25 cm<sup>2</sup> sous un volume de 10 mL de milieu de culture. Elles sont ainsi transférées dans du milieu neuf deux fois par semaine alors qu'elles sont en phase exponentielle de croissance. Les numérations cellulaires sont effectuées à l'aide d'un hématimètre KOVA<sup>®</sup> GLASSTIC<sup>®</sup> SLIDE (HYCOR, USA). Afin de maintenir la résistance à la doxorubicine des cellules L1210R, celles-ci sont cultivées en présence de 1  $\mu$ M de doxorubicine (TEVA *classics*, Paris, France). Pour la lignée cellulaire P388R deux concentrations de doxorubicine ont été utilisées, 10  $\mu$ M pour les expérimentations d'immunothérapie et 1  $\mu$ M pour les expérimentations *in vitro* utilisant le resvératrol. Une semaine avant chaque expérience, ces cellules sont remises en culture dans du milieu sans doxorubicine, afin de les sevrer. Les boîtes sont maintenues à 37°C dans une étuve, sous une atmosphère saturée en CO<sub>2</sub> à 5 %.

#### III.5.B. Lignées cellulaires murines en monocouche

Nous avons utilisé deux types de lignées cellulaires adhérentes, une lignée de type fibroblastique, LM(tk-) sensible et résistante à la doxorubicine (fournies par le Docteur R. Arceci, Children's Hospital, Cincinnati, OH, USA) ainsi qu'une lignée originaire d'un mélanome chez les souris C57Bl/6J, d'haplotype H2b. Les cellules B16 résistantes à la doxorubicine ont été sélectionnées par le Docteur Rosana Supino à l'Institut National des tumeurs de Milan. Elles dérivent du stock ATCC (B16F0) et ont été isolées par une sélection progressive des cellules B16V, obtenues à partir de mélanome B16F0 transplantés *in vivo*, en présence de concentrations croissantes de doxorubicine. Les cellules B16 sensibles à la doxorubicine correspondent aux cellules B16V. Les deux lignées cellulaires ont respectivement un indice de résistance à la doxorubicine de 0,35 et 4 µM.

Les cellules adhérentes sont cultivées dans du milieu "Dulbecco's Modified Eagle Medium" DMEM + Glutamax I<sup>TM</sup> (GIBCO<sup>TM</sup>) et 10 % de sérum de veau foetal (GIBCO<sup>TM</sup>) décomplémenté.

A 80% de confluence, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire lavé par un tampon phosphate stérile (PBS 1X, pH 7.2, NaCl 155,4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,71 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,54 mM). Les cellules sont détachées de leur support par incubation de 5 à 10 min avec une solution de trypsine-EDTA 1X (GIBCO<sup>TM</sup>). L'action de la trypsine est inhibée par addition de milieu de culture complet, puis les cellules sont remises en culture dans du milieu à la densité souhaitée.

Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours. La culture et la numération des cellules sont effectuées par les mêmes méthodes et dans les mêmes conditions que pour les cellules en suspension.

#### **III.5.C.** Conservation des cellules

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont centrifugées à 250 g pendant 8 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est remis en suspension dans un milieu de congélation [suivant le type cellulaire RPMI 1640 ou DMEM (60%), de SVF (30%) et de glycérol (10%)]. La suspension cellulaire ( $1.10^7$  cellules / mL) est répartie en fraction de 1 mL dans des cryotubes (Nunc<sup>TM</sup>). La congélation doit se faire lentement (-1 à - 4°C par min), pour cela les cryotubes sont placés 15 min dans de la glace pilée puis à – 80°C dans du coton cardé pendant 24 heures, avant d'être placés dans de l'azote liquide pour des durées supérieures à trois semaines. Inversement, la décongélation doit se faire rapidement. Après avoir sorti le cryotube de l'azote liquide, il est incubé dans un bain-marie à 37°C puis les cellules sont placées dans une boîte stérile contenant 9 mL de milieu de culture. 24 à 48 heures après, les cellules sont débarrassées de toutes traces de glycérol et remises en culture dans du milieu neuf.

#### III.5.D. Test mycoplasmes

Afin de vérifier l'absence de contamination de nos différentes lignées cellulaires par des mycoplasmes (microorganismes procaryotes de type bactérien, dépourvus de paroi et possédant une simple membrane), tous les mois, nous réalisons un test de détection où les cellules sont incubées en présence de 3 µM de Hoechst 33342 à 37°C durant 30 min, puis observées sous UV au microscope à fluorescence (NIKON ECLIPSE TE300). Si les cellules sont contaminées par des mycoplasmes, nous observons des points bleus formant un halo autour des noyaux cellulaires, qui correspondent aux mycoplasmes se trouvant dans le cytoplasme des cellules.

# III.6. Préparation du "vaccin"

#### III.6.A. Lipopeptides de synthèse

Des peptides correspondant aux séquences des boucles extra-cellulaires 1 (mpp1), 2 (mpp2) et 4 (mpp4) de la glycoprotéine P murine (P. F. Tosi, D. Radu, et C. Nicolau, 1995) ont été synthétisés par un synthétiseur de peptide "Applied Biosystems 430A" utilisant le tertiobutyloxycarbonyl/benzyl et une activation par le (N- [(1H – benzotriazol – 1 – yl) (diméthylamino) méthylène] – N- méthylméthanaminium hexafluorophosphate N-oxide (B. Merrifield, 1986; M. Schnolzer et S. B. Kent, 1992). Chaque peptide ainsi obtenu est couplé de façon covalente à 4 molécules d'acide palmitique (C16) pour former les lipopeptides qui pourront être insérés dans les liposomes (fig. 12).



Figure 12 : Couplage de peptides synthétiques à 4 molécules d'acide palmitique

La qualité des lipopeptides synthétisés a été contrôlée par hydrolyse totale acide pour déterminer la composition en résidus d'acides aminés, suivi d'une HPLC pour la pureté, puis d'une analyse au spectromètre de masse afin de comparer la masse moléculaire théorique à celle observée (Tableau 4).

Nom des lipopeptides	Séquence en acides aminés	Masse moléculaire théorique	Masse moléculaire expérimentale	Pureté (%)
mpp1	K-G-GNMTDSFTKAEASILP SITNQSGPNSTLIISNSSLEEE- G-K-K-NH <sub>2</sub>	5436	5437	91,6
mpp2	K-G-KVLTSFTNKEQAYA K-G-K-K-NH <sub>2</sub>	3293	3293	93,8
mpp4	K-G-SRDDDHETKR QNCN-G-K-K-NH <sub>2</sub>	3190	3188	95,3

Tableau 4: Séquence des lipopeptides correspondant aux 3 boucles extracellulaires1 (mpp1), 2 (mpp2) et 4 (mpp4) de la glycoprotéine P murine.

# III.6.B. Produits utilisés dans la composition des différentes préparations vaccinales

Dans la perspective d'un produit utilisable dans des essais cliniques chez l'homme, les substances utilisées dans la composition des préparations vaccinales sont d'origine synthétique pour éviter les possibles contaminations par des endotoxines, prions ou virus.

Les phospholipides (dimyristoylphosphatidylcholine ou DMPC, dimyristoylphosphatidylglycérol ou DMPG) sont d'origine synthétique (Avanti Polar Lipids, Alabastar, USA). L'hydroxyde d'aluminum (Alum) est issu d'un lot stérile et apyrogène (lot 97V191) préparé et fourni par la branche vaccins de Pasteur Mérieux (Connaught, Marcy L'étoile, France).

#### III.6.C. Préparation des formulations vaccinales

Les liposomes sont préparés en mélangeant DMPC (10 mg / mL), DMPG (10 mg / mL) et cholestérol dans un rapport molaire final de 0,9 ; 0,1 ; 0,7. Le monophosphoryl lipide A (MPLA) (List Biological Campell, Californie) et le cholestérol (Avanti Polar Lipids) sous forme de poudre sont repris dans du chloroforme ( $^{V}/_{V}$ ). Le MPLA est ajouté à une concentration de 40 µg par µmole de phospholipides (L. F. Fries et coll., 1992). L'ensemble de ces constituants est homogénéisé.

#### Quatre types de liposomes et les lipopeptides seuls sont préparés :

- Lp1 : DMPC, DMPG, cholestérol, lipopeptides palmitoylés mpp1, 2 et 4.
- Lp2a: DMPC, DMPG, cholestérol
- Lp2b : DMPC, DMPG, cholestérol, MPLA.
- Lp3: DMPC, DMPG, cholestérol, lipopeptides, MPLA.
- Lp4 : Lipopeptides seuls

Les lipopeptides palmitoylés (mpp1, mpp2 et mpp4) sont ajoutés aux phospholipides dans un rapport molaire de 1:250. Les solvants organiques permettant l'homogénéisation de cet ensemble sont évaporés sous un dessiccateur à vide pendant environ 2 h. Le film résultant, est ajusté à une concentration finale en phospholipides de 4 mM après hydratation avec du PBS pH 7,4 stérile.

Les différents lots ont été préparés un jour avant la première immunisation. La fraction nécessaire pour cette immunisation a été conservée à 4°C, le reste a été divisé en aliquotes et congelé à -20°C. Ces aliquotes ont été décongelés juste avant leur injection, cette étape de congélation-décongélation ne modifiant en rien les caractéristiques immunogènes des vaccins. Les liposomes en suspension sont au moment de l'immunisation mélangés à de l'Alum stérile dans un rapport volumique (V/V).

#### III.6.D. Immunisation des souris par les préparations vaccinales

Les différentes préparations vaccinales ont été injectées à des souris B6D2F1 suivant le protocole suivant : 3 injections intra péritonéale (i.p) de 200 µL de préparation vaccinale à 15 jours d'intervalle. Pour chaque souris, il est prélevé au niveau du sinus rétro orbital 100 µL de sang, un jour avant le rappel et 15 jours après la dernière immunisation. Chaque échantillon de sang est centrifugé et le sérum isolé est utilisé pour y quantifier les différentes immunoglobulines induites par l'inoculation des préparations vaccinales (cf. Analyse des sérums murins par Dot Blotting).

#### III.6.E. Analyse des sérums murins par Dot Blotting

Les lipopeptides dilués dans du PBS, sont déposés sur des membranes de nitrocellulose à température ambiante. Au bout de 30 min, les molécules antigéniques sont bloquées avec 3 mL de tampon de blocage (PBS + 5% lait écrémé). Les membranes sont incubées pendant 2 h à température ambiante sans lavage avec 2 mL d'une solution A (PBS + 1% lait écrémé + 0.1% de tween 20) additionnée de 24 µL de sérum dilué au demi dans du PBS. Les membranes sont rincées 3 fois avec la solution A puis incubées 1 h à température ambiante dans une solution A supplémentée avec l'Anticorps secondaire anti-IgG (The binding site, Grenoble, France) de souris couplé à la peroxydase (dilué au 1 / 3000<sup>ème</sup>). Après 2 lavages dans 3 mL de solution A, les membranes sont rincées dans du PBS seul pendant 10 min et placées une nuit à 4°C dans 500 µL de PBS. La détection des complexes ECL = chimiluminescence Antigènes / Anticorps se fait par (Kit Enhanced Chemiluminescence, Amersham) qui correspond à l'oxydation du Luminol catalysé par le mélange Peroxydase / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu alcalin. L'émission de luminescence peut être détectée avec un faible temps d'exposition à l'aide d'un film radiographique sensible à la lumière bleue (film KODAK - X - OMAT, KODAK, Rochester, MD, USA).

L'ECL est déposé à la surface des membranes  $(0,125 \text{ mL} / \text{cm}^2)$  durant 1 min. Celles-ci sont égouttées et placées entre 2 films Saran<sup>®</sup> (DOW Chemical Company), puis exposées dans une cassette froide, durant quelques minutes à 1 h, à un film radiographique. La sensibilité de la réaction de chimiluminescence présente un seuil de détection des Anticorps induits de 0,2 ng / mL dans ces conditions expérimentales.

#### III.6.F. Persistance de la réponse immunitaire

Afin d'étudier la persistance de la réponse immunitaire engendrée par la préparation immunogène Lp1 au cours du temps, nous avons réalisé l'immunisation de 9 souris par le lot Lp1 comme décrit précédemment. Nous avons quantifié les anticorps anti-mpp1, 2 et 4 des 9 sérums de souris immunisées et titré les anticorps 9, 24, 45, 75 et 240 jours après immunisation.

# III.6.G. Evaluation *in vivo* de l'inhibition de chimiorésistance des cellules P388R par la préparation vaccinale Lp1.

Des groupes de 9 souris B6D2F1 ont été immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a comme décrit ci-dessus. Puis les souris ont reçu 1 mois et demi après la dernière immunisation, 10<sup>6</sup> P388R cellules par voie intra péritonéale. Cette injection cellulaire est considérée comme jour zéro. Aux jours 1, 10 et 22, chaque souris a reçu une chimiothérapie

alternée de doxorubicine 5,5 mg / kg et aux jours 4, et 14 de vinblastine 2,5 mg / kg. Pendant cette période, nous avons suivi la survie des souris.

#### III.7. Méthodes d'étude de la cytotoxicité.

La viabilité des cellules est appréciée dans un premier temps, par une observation générale de la culture au microscope optique inversé à contraste de phase. Les numérations cellulaires sont effectuées à l'aide d'un hématimètre KOVA<sup>®</sup> GLASSTIC<sup>®</sup> SLIDE (HYCOR ; USA).

Les cellules vivantes apparaissent bien rondes et réfringentes tandis que les cellules mortes de couleur sombre offrent des contours beaucoup plus irréguliers. Afin d'estimer plus finement la viabilité cellulaire, nous effectuons un test d'exclusion au bleu trypan ou un test MTT (B. K. Bhuyan et coll., 1976).

#### III.7.A. Test d'exclusion au bleu trypan

Le pourcentage de viabilité cellulaire est estimé par le test d'exclusion au bleu trypan. 100  $\mu$ L de la suspension cellulaire, bien homogénéisés, sont prélevés et dilués au ½ dans du bleu trypan (0,16%). Ces cellules sont ensuite comptées à l'aide d'un hématimètre KOVA<sup>®</sup> GLASSTIC<sup>®</sup> SLIDE par observation au microscope optique. Il est ainsi possible d'apprécier la forme des cellules et de déterminer le taux de mortalité de la culture puisque les cellules mortes ont incorporé le bleu trypan.

Afin d'évaluer la toxicité du resvératrol, les lignées cellulaires en suspensions P388 et L1210 sensibles et résistantes à la doxorubicine sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de  $25 \times 10^3$  cellules dans 1 mL de RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF contenant du resvératrol (0, 5, 10, 25, 50, 100 et 200  $\mu$ M). Après 24 h et 48 h d'incubation, nous effectuons un test d'exclusion au bleu trypan.

Pour les cellules adhérentes LM(tk-)R et S,  $20 \times 10^3$  cellules sont ensemencées la veille au soir dans 0,5 mL de milieu de culture (DMEM + 10 % SVF). Le lendemain, on ajoute 0,5 mL de milieu de culture contenant du resvératrol afin d'obtenir les concentrations précédemment décrites. Avant d'effectuer un test au bleu trypan à 24 et 48 h les cellules sont détachées par trypsination.

#### III.7.B. Test colorimétrique au MTT

Dans ce test, la cytotoxicité des échantillons est étudiée par la mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules qui sont vivantes. Cette enzyme réduit le MTT de couleur jaune (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) en cristaux de formazan violets. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans du DMSO et la coloration est quantifiée au spectrophotomètre ELISA (Bio-rad; Marnes-la-Coquette, France). La quantité de formazan formée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

#### ✓ Evaluation de l'activité *ex vivo* des anticorps induits par Lp1

Les lignées cellulaires résistantes à la doxorubicine, ont été utilisées pour mesurer l'activité inhibitrice des sérums de souris immunisées par Lp1. Cette évaluation permet de déterminer la sensibilité exacte des cellules tumorales *ex vivo* aux médicaments anticancéreux en présence ou non d'agents de réversion (Vérapamil et sérums Lp1).

Des plaques de cultures 96 puits (Nunc<sup>TM</sup>) sont ensemencées avec des cellules en phase exponentielle de croissance, à raison de  $4,5 \times 10^3$  cellules par puits, ceci en présence ou non des agents de réversion à comparer [Vérapamil 3 µM ou sérums Lp1] dans un volume final de 100 µL. Après une incubation d'une heure à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 100 µL de chaque agent anticancéreux (doxorubicine ou vinblastine) sont additionnés au volume cellulaire. Les plaques sont remises à l'étuve pendant 48 h. Puis 20 µL de MTT à 2,5 mg / mL (pH 7,2), sont ajoutés au volume cellulaire. Les plaques sont incubées pendant 3 heures à 37°C avant d'être centrifugées à 250 g pendant 15 min. Le surnageant est aspiré avec précaution et 200 µL de DMSO sont ajoutés sur chaque culot cellulaire afin de solubiliser le dépôt cristallin de formazan. Après complète dissolution des cristaux de formazan, la coloration formée est quantifiée au spectrophotomètre ELISA par mesure de l'Absorbance à 550 nm. Une autre mesure à 690 nm est nécessaire afin de soustraire l'absorbance du bruit de fond.

# ✓ Effet du resvératrol sur les différentes lignées cellulaires sensibles et résistantes

La cytotoxicité du resvératrol a été établie en utilisant la technique colorimétrique qui permet d'évaluer la prolifération cellulaire. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont ensemencées dans des microplaques 96 puits à une densité de  $8 \times 10^3$  cellules par puits dans 200 µL de milieu complet de culture contenant 0, 5, 10, 25, 50, 100 et 200 µM de resvératrol. Après incubation à 37°C la viabilité cellulaire est estimée par MTT.

Les cellules LM(tk-)R sont ensemencées dans des plaques 96 puits à  $8 \times 10^3$  cellules par puits la veille au soir puis incubées avec 0, 5, 10, 25, 50, 100 et 200 µM de resvératrol durant 24 h. Les cellules sont lavées et incubées avec ou sans doxorubicine pendant 24 h à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. La viabilité cellulaire est estimée par le test MTT comme précédemment décrit.

Les lignées cellulaires en suspensions L1210R et P388R sont ensemencées dans des plaques 6 puits à  $25 \times 10^3$  cellules par mL avec ou sans resvératrol pendant 24 h. Les cellules sont lavées et incubées dans des plaques 96 puits en présence ou non de doxorubicine, puis nous avons procédé comme pour les cellules LM(tk-)R.

La technique de coloration au MTT nous permet, d'une part de déterminer la cytotoxicité des composés testés, d'autre part leur pouvoir révertant. Le calcul du pourcentage de cytotoxicité et de réversion s'effectue selon le calcul suivant :

 $\% = [(Abs_{550nm} - Abs_{690nm})_{cellules traitées} / (Abs_{550nm} - Abs_{690nm})_{cellules témoins}] \times 100$ 

# III.8. Incorporation de vinblastine radiomarquée [<sup>3</sup>H] VBL

 $1.6 \times 10^6$  cellules dans 400 µL de RPMI avec 10 % SVF sont incubées à 37°C pendant une heure avec ou sans effecteur (Vérapamil 3 µM ou sérums de souris immunisées), puis sont introduites dans des tubes en verre siliconé avec 2 µCi de [<sup>3</sup>H-VBL] (Amersham, Saclay, France) et de vinblastine non radioactive (1 µM) à température identique. Après 30 minutes, 100 µL de suspension cellulaire sont prélevés et placés dans des microtubes contenant 50 µL d'acide perchlorique à 6 % recouvert par 100 µL d'un mélange phtalate-ester respectivement dans un rapport 2,5 / 1. Les tubes sont immédiatement centrifugés à 13000 g pendant 30 secondes et congelés dans l'azote liquide. Les tubes sont sectionnés au niveau de la phase inférieure acide. La moitié supérieure est immergée dans 5 mL de liquide scintillant formula 963 (New England Nuclear) et la radioactivité est déterminée dans un compteur à scintillation LKB. Les résultats sont exprimés en désintégration par minute (dpm) pmoles de VBL pour 10<sup>6</sup> cellules et en pourcentage d'incorporation par comparaison avec les cellules P388R incubées avec l'immun sérum contrôle (IS Lp2a).

## III.9. Etude de l'expression des gènes mdr1, mdr2 et mdr3

Nous avons étudié l'expression des gènes *mdr*, au niveau des lignées cellulaires murines sensibles ou résistantes à la doxorubicine (P388R et S; L1210R et S; B16R et S; LM(tk)R et S ainsi qu'au niveau des organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a. Les ARN totaux de ces échantillons cellulaires ou organiques sont extraits puis incubés en présence de la reverse transcriptase. Les ADN complémentaires (ADNc) ainsi produits sont amplifiés par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analysés sur gel d'agarose.

#### III.9.A. Extraction et électrophorèse des ARN totaux

Les ARN totaux ont été isolés suivant le protocole préconisé dans le Kit QIAGEN RNeasy<sup>®</sup> (QIAGEN ; Courtaboeuf, Fance). La concentration en ARN total des extraits est calculée après mesure de l'absorbance à 260 nm sur le spectrophotomètre Ultrospec 3000 pro (Amersham pharmacia biotec). Une unité d'absorbance à 260 nm est égale à 40 µg/mL d'ARN totaux.

L'intégrité des ARN et l'absence de contamination par de l'ADN génomique sont vérifiées par une séparation des ARN totaux (1  $\mu$ g) par électrophorèse en gel d'agarose 1% (Euromedex ; Mundolsheim, France) dans du tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris-HCl 0,5 M, acide acétique 50 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4) et en présence de 0,5 mg/mL de bromure d'éthidium (Euromedex, Souffelweyrsheim, France). Le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases des acides nucléiques et permet leur visualisation lors de l'irradiation par les UV.

#### III.9.B. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)

Les réactions de transcription inverse sont réalisées à partir de 1  $\mu$ g d'ARN totaux dans un volume final de 20  $\mu$ L, avec 1  $\mu$ L de random octamer (Q-BIOgene ; Illkirch, France) et de superscript II RT (Invitrogen ; Cergy Pontoise, France) conformément aux instructions du fabricant. L'hybridation des amorces est effectuée à 25°C pendant 10 min, l'élongation des ADNc à 45°C pendant 50 min, et enfin, l'inactivation de l'enzyme à 70°C pendant 15 min. Les ADNc obtenus sont dilués avec 480  $\mu$ L d'eau stérile puis stockés à – 20°C jusqu'à utilisation.

#### III.9.C. Amplification des ADNc par PCR

Nous avons procédé à l'amplification de fragments d'ADNc au moyen d'amorces spécifiques des ARNm des gènes *mdr1*, *mdr2*, *mdr3* et *rRNA* (témoin interne) (Tableau 5).

Nous avons effectué l'amplification des ADNc des organes de souris immunisées dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ L contenant : 5  $\mu$ L provenant de la solution d'ADNc, 10% de tampon HotStarTaq (PCR Buffer 10X QIAGENE), 2  $\mu$ L de dNTP (dNTP Mix 10 mM, Invitrogen), 5  $\mu$ M de chaque amorce, 2,5 U de Taq polymérase (HotStarTaq DNA Polymerase 5 U/ $\mu$ L, QIAGENE), eau stérile. Les amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur (maxicycler) (Eppendorf; Le Pecq, France).

Tableau 5. Amorces sens et antisens correspondant aux 3 isoformes mdr1, mdr2 et mdr3 chez la souris et au contrôle *rRNA* (M. Schiengold et coll., 2001).

	amorce sens	amorce anti-sens	Température d'hybridation retenue	Taille des fragments amplifiés
mdr1	5'TGCTTATGGATCCCAGAGTGAC3'	5'TTGGTGAGGATCTCTCCGGCT3'	63°C	404 pb
mdr2	5'CTCGTTAACATGCAGACAGCAG3'	5'GACCAGGGAGAACATGTTACAC3'	61°C	404 pb
mdr3	5'GAAAGATGGTGAACTATGCC3'	5'TTACCAAAAGTGGCCCACTA3'	63°C	404 pb
rRNA	5'GAAAGATGGTGAACTATGCC3'	5'TTACCAAAAGTGGCCCACTA3'	50°C	346 pb

Après une phase initiale de dénaturation de 15 minutes à 94°C, on réalise 40 cycles comportant une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 45 secondes à une température spécifique du couple d'amorces et une étape d'élongation de 1 min à 72°C. Au terme de ces cycles, suit une étape finale de 7 minutes à 72°C puis les tubes sont portés à 4°C.

Les conditions d'amplification des ADNc issus des lignées cancéreuses de souris sont en partie les mêmes que pour les ADNc issus des organes de souris immunisées. Excepté pour la phase de dénaturation qui est réduite à 2 minutes ainsi que pour la solution réactionnelle qui contient : 5  $\mu$ L de la solution contenant l'ADNc, 0,5  $\mu$ M d'amorce sens et antisens, 2  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 2,5  $\mu$ L de tampon Taq (PCR Buffer 10X, Invitrogen), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) et 1 unité de Taq Polymérase (5 U /  $\mu$ L) (Invitrogen).

Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % en TAE 1X, contenant 0,5  $\mu$ g / mL de bromure d'éthidium. L'amplification des fragments d'ADNc du gène ubiquiste *rRNA* nous a permis de contrôler que nous avions effectué chaque PCR à partir de quantités équivalentes d'ADNc.

# III.10. Études histopathologiques

Les souris immunisées par les différentes préparations vaccinales sont sacrifiées un an après la dernière immunisation et les organes qui expriment naturellement la glycoprotéine P (reins, glandes surrénales, pancréas, rate, foie, ovaires) sont prélevés puis fixés. Les études histologiques sont réalisées sur des prélèvements de 3 µm d'épaisseur inclus en paraffine, puis colorés à l'Hématéine–Phloxine-Safran ou HPS. Cette coloration est une coloration trichromique : coloration nucléaire en violet par l'hémalum de Mayer, coloration cytoplasmique en rose par la phloxine et une coloration du tissu conjonctif en jaune par le safran.

#### III.10.A. Réalisation des coupes histologiques

Pour être examiné au microscope photonique, les échantillons tissulaires vont être tout d'abord fixés dans du formol 10 % pH 7,4 (ou formaldéhyde, Sigma) durant 18 h, puis progressivement déshydratés par passages successifs dans des solutions alcooliques de plus en plus concentrées (Tableau 6)

- 1		
	Alcool 80°	30 min
	Alcool 95°	30 min
	Alcool 95°	45 min
	Alcool 100°	45 min
	Alcool $100^{\circ} \times 2$ bains	60 min

Tableau 6 : Déroulement du processus de déshydratation des lames

L'alcool est ensuite remplacé par un solvant organique, le xylène (VWR, Val de Fontenay, France).

Les prélèvements ainsi déshydratés sont inclus dans de la paraffine à + 60°C, puis on les laisse refroidir. Enfin, des coupes microscopiques de 3  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leitz, Wetzlab, Allemagne). Les coupes sont ensuite étalées sur des lames de verre Superfrost (Menzel-gläzer, Allemagne), séchées 25 min à 55°C. L'étape préalable à la coloration est le retour à un état hydrophile du prélèvement, assuré par le processus de déparaffinage (Tableau 7).

Toluène × 2 bains	10min
Alcool 100°	5min
Alcool 95°	5min
Alcool 70°	5min
H <sub>2</sub> O	5min

Tableau 7: Déroulement du processus de déparaffinage des lames

Quand la réhydratation est complète, les coupes sont colorées par la coloration HPS.

## III.10.B. Préparation des colorants

# ✓ Hemalum de Mayer (sigma)

✓ Acide-alcool :

- alcool 95° (Charbonneaux Brabant, Reims, France)	500 mL

- acide chlorhydrique 25% (sigma) 1,2 mL
- ✓ Solution mère de Phloxine B :
  - Phloxine B (Sigma) 0,5 g
  - eau distillée 100 mL

- Diluer au ¼ la solution mère avant emploi dans de l'eau distillée.

✓ Eau acétique :

- eau distillée	500 mL
- acide acétique concentré (Sigma)	1 mL

- ✓ Safran :
- Faire sécher 5 g de safran à l'étuve à 60°C pendant une semaine. Mettre le safran sec dans 1 L d'alcool absolu dans un ballon bouché, à l'étuve à 60°C.
  Laisser la préparation au moins une semaine et transvaser en flacon.

#### III.10.C. Coloration à l'Hématéine – Phloxine – Safran

Dans un premier temps, les coupes sont incubées dans de l'hemalum de Mayer pendant 3 min. Après une étape de rinçage de 30 secondes avec de l'eau courante, les lames sont immergées dans un bain d'acide-alcool de 15 secondes, rincées à nouveau, 30 secondes, dans un bain d'eau distillée, puis colorées 2 min avec de la Phloxine B . Un rinçage de 30 secondes est ensuite réalisé dans un bain d'acide acétique à 0,2%. Les lames sont alors deshydratées 30 secondes dans des bains successifs d'alcool 70°, 95° et 100°, colorées une dernière fois par du safran en solution alcoolique et rincées 30 secondes avec de l'alcool 100° et 1 min avec du xylène. Finalement, pour protéger les prélèvements, les lames sont montées à l'Eukitt (LaboNord ; Templemars, France).

## III.11. Etude Immunocytochimique

Cette technique a servi à la détection *in situ* de la glycoprotéine P par réaction immunoenzymatique indirecte dans les lignées cellulaires L1210R et S, P388R et S, LM(tk-)R et S grâce au kit histoMouse<sup>TM</sup>-SP (Zymed® - Invitrogen).

#### III.11.A. Fixation des cellules en culture

Après un lavage en PBS, les cellules sont fixées pendant 1h à température ambiante avec une solution de formaldéhyde 10% pH 7,4 fraîchement préparée puis, 250  $\mu$ L de la suspension cellulaire est cytospinée sur une lame Super Frost Plus recouverte de poly-<sub>L</sub>-Lysine (Sigma) à une vitesse de 200g pendant 10 min. Pour l'étape de fixation des cellules, la lame polylysinée est trempée durant 5 min dans un bain de méthanol (Charbonneaux Brabant), puis 5 min dans un bain d'acétone (Sigma) en laissant égoutter 5 min à température ambiante après chaque bain. Avant de commencer la procédure de marquage, les frottis cellulaires sont tout d'abord réhydratés 10 min dans un bain de PBS, puis incubés 10 min dans de l'eau contenant 3% de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (sigma) pour bloquer les activités peroxydases endogènes, qui pourraient être présentes dans les cellules. Les lames sont ensuite rincées 3 fois 2 min dans du PBS

#### III.11.B. Immunorévélation

Le protocole utilisé correspond à celui décrit dans le kit histoMouse<sup>TM</sup>-SP. Les immuns sérums Lp1 et Lp2a dilués au 1 / 50<sup>ème</sup> sont déposés sur les lames durant toute la nuit en chambre froide à 4°C. Le chromogène utilisé pour l'immunorévélation est l'amino-3-éthyl-9carbazole (AEC). L'AEC oxydé forme un précipité rouge soluble dans l'alcool. Le développement de la coloration est suivi au microscope ou visuellement. Lorsque la coloration obtenue est satisfaisante, les lames peuvent être contre-colorées en les incubant 3 minutes dans de l'hématoxyline, puis lavées avec de l'eau distillée avant d'être montée en milieu aqueux.

#### **III.12.** Techniques de détection de la mort cellulaire

#### III.12.A. Double marquage par l'iodure de propidium et le Hoechst 33342

La mort cellulaire apoptotique et nécrotique ont été caractérisées au moyen du double marquage iodure de propidium et Hoechst 33332. Après un traitement de 24 h avec le resvératrol (0 à 200  $\mu$ M), les cellules sont marquées avec 10  $\mu$ M / mL de Hoechst 33342 et 50  $\mu$ M / mL d'iodure de propidium durant 15 min à l'obscurité. Après avoir été lavées au PBS, environ 200 cellules choisies de façon aléatoire ont été comptées, ceci pour chaque échantillon. Les cellules vivantes peuvent être identifiées par leur noyau intact de fluorescence bleue (Hoechst 33342 + PI), et les cellules apoptotiques par leur noyau fragmenté montrant l'une ou l'autre fluorescence. La fluorescence bleue correspond à une apoptose précoce alors qu'une fluorescence orangée correspond à une apoptose plus tardive.

#### III.12.B. Fragmentation de l'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait des lignées cellulaires traitées au resvératrol. L'extraction et la purification de l'ADN génomique ont été effectuées selon le protocole suivant :

Après 24 h de traitement  $3 \times 10^6$  cellules sont lavées au PBS et incubées dans un tampon de lyse [10 mM Tris HCl pH 7.4 (Euromedex) 0.2% Triton X-100 (Sigma), 1 mM EDTA pH8 (Sigma), 100 µg / mL protéinase K (Roche ; Meylan, France)] 10 min à 4°C et 1 h à température ambiante. Au terme de cette incubation, le lysat est centrifugé à 13000 × g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant contenant l'ADN génomique est récupéré. L'ADN

génomique est précipité toute la nuit par adjonction de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C. Conservé à -20°C, les échantillons sont ensuite centrifugés 30 min à 13000 × g. Le culot d'ADN ainsi obtenu est soigneusement lavé par addition de 500  $\mu$ L d'éthanol 70 %, puis séché à l'air ambiant et remis en solution dans 50  $\mu$ L d'eau distillée et incubé 30 min à 37°C avec 50  $\mu$ g / mL de Ribonucléase A DNAse free (Sigma). Un dosage de la quantité d'ADN génomique présente dans les échantillons est réalisé par spectrophotométrie UV (le rapport des densités optiques (DO) à 260 et 280 nm doit être d'environ de 1,8). Les préparations peuvent être conservées à 4°C. Afin d'identifier la fragmentation d'ADN nous avons utilisé 5  $\mu$ g d'ADN génomique par une électrophorèse en gel d'agarose 1,8%.

#### III.13. Analyse du cycle cellulaire

Les cellules ont été traitées comme précédemment en présence de resvératrol (0-200  $\mu$ M). Après 24 h d'incubation, 10<sup>6</sup> cellules sont lavées dans du PBS et remis en suspension dans 1 mL de tampon krishan (R. Ghosh et coll., 2005) [1 mg / mL de citrate de sodium (Sigma), 0.01% IGEPAL CA-630 (sigma)] additionné de 46  $\mu$ g/mL d'iodure de propidium et 10  $\mu$ g / mL de RNase DNAse free. Après incubation durant 30 min à l'obscurité, à température ambiante les cellules sont analysées par cytométrie en flux par l'utilisation de l'appareil FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry systems).

# III.14. Incorporation de doxorubicine

Les cellules L1210R sont ensemencées à  $25 \times 10^3$  cellules par mL et incubées sans ou avec 25  $\mu$ M de resvératrol durant 24 h à 37°C. Les cellules sont lavées avec du PBS 1X et centrifugées à 250 g pendant 8 min et incubées pendant 24 h à 37°C avec 0, 40 et 80  $\mu$ M de doxorubicine et après un dernier lavage elles sont analysées par cytométrie en flux.

Les cellules P388R sont ensemencées à  $20 \times 10^4$  cellules par mL et incubées avec 0 ou 10  $\mu$ M de resvératrol durant 24 h à 37°C. Puis les cellules sont lavées avec du PBS 1X et centrifugées comme précédemment et incubées pendant 24 h à 37°C avec 0, 5 et 10  $\mu$ M de doxorubicine. Puis elles sont lavées et analysées par cytométrie en flux.

# IV. RESULTATS

# IV.1. Modulation de la glycoprotéine P par une préparation vaccinale

# **IV.1.A.** Induction de la réponse humorale après administration de différentes préparations vaccinales.

Nous avons préparé cinq lots de préparations vaccinales, **Lp1** (liposomes, alum et lipopeptides palmitoylés mpp1, mpp2 et mpp4 correspondant respectivement aux boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la glycoprotéine P murine), **Lp2a** (liposomes, alum), **Lp2b** (liposomes, alum et lipide A), **Lp3** (liposomes, alum, lipopeptides palmitoylés mpp1, mpp2 et mpp4 et lipide A). Les préparations Lp2a et Lp2b correspondent donc respectivement aux préparations contrôles des lots Lp1 et Lp3 et enfin la préparation **Lp4** (mpp1, 2 et 4, alum).

Après immunisations de souris B6D2F1 (fig. 13) avec les différents lots de préparations vaccinales, nous avons quantifié dans chaque sérum, les anticorps antilipopeptides palmitoylés mpp1, mpp2 et mpp4 ainsi que les différents isotypes produits (fig. 14, 15 et 16).



Quantification par Dot Blotting des Immunoglobulines induites et isotypes

#### Figure 13 : Protocole d'immunisation des souris B6D2F1

Les injections avec les préparations contrôles Lp2a et Lp2b (fig. 14) conduisent à la production d'anticorps IgM dont la concentration reste constante au cours des trois immunisations. Cette production d'anticorps dirigée contre les boucles extracellulaires 1, 2 et 4 correspond à une réponse immunitaire aspécifique puisque les préparations Lp2a et Lp2b ne contiennent pas les lipopeptides palmytoilés mpp1, mpp2 et mpp4. Ces dosages d'IgM peuvent être considérés comme des faux positifs, et de ce fait, la concentration basale
en anticorps sera soustraite à celle trouvée dans les sérums des souris immunisées avec les préparations Lp1 et Lp3.

L'analyse des sérums des souris qui ont reçu la préparation vaccinale Lp4, qui ne contient que les lipopeptides palmitoylés (fig. 15), montre l'apparition prédominante d'anticorps IgM anti-mpp1, 2 et 4 à l'issue de la première immunisation. La quantité d'anticorps IgM diminue ensuite au cours des deuxième puis troisième immunisations pour laisser apparaître, au terme de la troisième immunisation, une réponse immunitaire prépondérante en IgG1 dirigée, en particulier, contre la boucle 2 de la glycoprotéine P murine.



Figure 14 : Titre en anticorps des sérums de souris en fonction du nombre d'immunisations (1ère, 2ème, 3ème injection). Lp2a (liposomes, alum) et Lp2b (liposomes, alum, lipide A). Les anticorps anti-mpp1 (, mpp2 (, mpp4 (, sont quantifiés et les différents isotypes sont détectés en utilisant un anticorps secondaire spécifique des Ig murines (M, G3, G2a, G2b, G1). Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues à partir des sérums de 5 souris prélevés 12 jours après immunisation. Une unité correspond à 0.2 µg Ig / mL. Les écarts types varient entre 5 et 25%.



Figure 15 : Titre en anticorps des sérums de souris en fonction du nombre d'immunisations (1ère, 2ème, 3ème injection). Lp4 (mpp1, mpp2 et mpp4, alum). Les anticorps anti-mpp1 (, mpp2 (, mpp4 (, sont quantifiés et les différents isotypes sont détectés en utilisant un anticorps secondaire spécifique des Ig murines (M, G3, G2a, G2b, G1). Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues à partir des sérums de 5 souris prélevés 12 jours après immunisation. Une unité correspond à 0.2 µg Ig / mL. Les écarts types varient entre 5 et 25%.

Les immunisations avec les préparations Lp1 et Lp3 induisent la production d'immunoglobulines de classe M après la première injection, puis la réponse devient prépondérante en IgG2b et IgG2a pour Lp1 (fig. 16A) et en IgG2b pour Lp3 (fig.16B) après la seconde injection. Ce type de réponse correspond classiquement à la mise en place d'une réponse immunitaire, primaire puis secondaire, suite à l'injection de substances immunogènes. Avec les deux formulations, le titre en anticorps IgG1 est maximum après la troisième immunisation. Chez les souris immunisées avec la préparation Lp1, le titre en IgG1 est 65% plus élevé que chez les souris inoculées avec Lp3. Parmi les IgG1 produites contre les différents lipopeptides, le titre en anticorps anti-mpp2 produit des taux d'anticorps respectivement 2,6 et 2 fois plus élevés que ceux dirigés contre mpp1 ou mpp4. Dans les différents sérums, la teneur totale en IgG varie de 66 à 100%.

Enfin, nous pouvons observer une meilleure réponse immunitaire dans la formulation simplifiée (Lp1), que dans les préparations contenant le lipide A (Lp3) ou les lipopeptides seuls (Lp4).





Figure 16 : Titre en anticorps des sérums de souris en fonction du nombre d'immunisations (1ère, 2ème, 3ème injection). A, Lp1 (liposomes, palmitoylpeptides, alum); B, Lp3 (liposomes, lipide A, palmitoylpeptides, alum). Les anticorps anti-mpp1 (, mpp2 (), mpp4 ()), sont quantifiés et les différents isotypes détectés en utilisant un anticorps secondaire spécifique des Ig murines (M, G3, G2a, G2b, G1). Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues à partir des sérums de 5 souris prélevés 12 jours après immunisation. Une unité correspond à 0.2 μg Ig / mL Les écarts types varient entre 5 et 25%.

#### IV.1.B. Persistance de la réponse immunitaire

La meilleure réponse immunitaire étant obtenue avec les souris immunisées par le lot Lp1 nous avons étudié la persistance de cette réponse immunitaire au cours du temps (fig. 17) et titré les anticorps anti-mpp1, 2 et 4 de 9 sérums de souris immunisées par la formulation Lp1 (fig. 18).



### Figure 17 : Protocole d'immunisation pour l'étude de persistance de la réponse immunitaire

Neuf jours après la première immunisation, aucune réponse immunitaire d'IgG1 n'est observée. A 24 jours, soit 9 jours après la seconde immunisation, nous pouvons observer une augmentation de la réponse immunitaire vis-à-vis des trois lipopeptides palmitoylés mpp1, 2 et 4. A 45 jours, soit 15 jours après la troisième et dernière immunisation, nous pouvons observer une nouvelle augmentation de la quantité d'anticorps, en particulier vis-à-vis de la boucle 2 de la glycoprotéine P. Comme le montre la figure 18, les anticorps anti-mpp2 sont respectivement 1,9 et 1,7 fois plus abondants que les anticorps anti-mpp1 et anti-mpp4. A 75 jours (2,5 mois) et 240 jours (8 mois) nous pouvons noter une diminution progressive de la quantité en anticorps dans les sérums, toutefois, la réponse immunitaire reste prépondérante pour le lipopeptide palmitoylé mpp2. A 75 jours, nous pouvons également constater que la teneur en anticorps anti-mpp4. A 240 jours, ces différences s'accentuent pour atteindre des taux en anti-mpp1 et anti-mpp4. A 240 jours, ces différences s'accentuent pour atteindre des



Figure 18 : Titre en anticorps anti-mpp1 (, mpp2 (, temp4 (, temp4 (, temp)))))) des sérums de souris immunisées par Lp1 en fonction du temps. Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenue à partir des sérums de 9 souris prélevées à 9, 24, 45, 75 et 240 jours après immunisation. Une unité représente 0,2 µg Ig / mL. (, +) Représente les immunisations.

## IV.1.C. Effets *in vivo* des différentes préparations sur un traitement chimiothérapeutique chez des souris recevant des cellules P 388R

Afin de tester l'efficacité des anticorps produits lors de l'inoculation de la préparation vaccinale Lp1, nous avons immunisé à titre préventif, des souris B6D2F1 avec le lot Lp1 comme décrit précédemment. Un mois et demi après la troisième immunisation, nous leur avons injecté un million de cellules tumorales murines P388 résistantes à la doxorubicine et de phénotype MDR, afin de voir si elles développent un cancer. Parallèlement, nous avons réalisé une chimiothérapie à base de doxorubicine et de vinblastine suivant le protocole expérimental représenté figure 19.



### Figure 19 : Protocole de chimiothérapie après immunisations et injection de cellules P388R

Nous pouvons observer sur la figure 20, une médiane de survie globale de 39 jours pour les souris immunisées par le lot Lp1 alors qu'elle n'est que de 22 jours pour les souris inoculées avec le lot contrôle Lp2a. La préparation vaccinale Lp1 conduit donc à une augmentation de 77% de la survie des souris. Dans le groupe de souris immunisées par le lot Lp2a, il faut noter la survie d'une souris au-delà de 70 jours, cette rémission de son cancer est due vraisemblablement à sa propre immunité et au traitement chimiothérapeutique.



Figure 20 : Temps de survie des souris immunisées par Lp1 (-) et Lp2a (-). Au jour zéro, 10<sup>6</sup> cellules P388R ( $\wedge$ ) sont inoculées. Injections aux jours 1, 10 et 22 de doxorubicine 5,5mg/kg ( $\wedge$ ) et aux jours 4, et 14 de vinblastine 2,5mg/kg ( $\wedge$ ).

## IV.1.D. Effets *in vitro* des anticorps anti-glycoprotéine P sur la réversion de la chimiorésistance des cellules monocytaires P388R résistantes à la doxorubicine

La cytotoxicité de la doxorubicine pour les cellules P388R est évaluée, par la technique au MTT (§ III.7.B p 44), en présence de 3 µM de vérapamil (inhibiteur de canaux calcique) ou de sérums de souris immunisées par Lp1. De façon à mettre en évidence l'activité des anticorps induits sur la résistance des cellules P388R, différentes concentrations de sérums anti-glycoprotéine P sont testées.

Les résultats présentés sur la figure 21 montrent que le sérum de souris immunisées avec la formulation contrôle Lp2a n'a aucun effet sur la cytotoxicité de la doxorubicine vis-àvis des cellules P388R puisque la courbe de prolifération cellulaire est comparable à celle obtenue en présence de doxorubicine seule. Par contre, on observe une réversion de la chimiorésistance avec le sérum Lp1. Cette réversion est fonction de la concentration en sérum utilisée. La concentration en sérum Lp1 la plus efficace est 0,6 % puisqu'à cette concentration on observe un effet inhibiteur de la résistance similaire au vérapamil 3  $\mu$ M.



Figure 21 : Cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules P388R en présence d'agents de réversion: Contrôle : DOX (♦) ; VRP: Vérapamil 3 µM (●); Moyenne de 5 Sérums de souris immunisées par Lp1 (IS Lp1) à différentes concentrations: IS Lp1 0,6 % (■); IS Lp1 0,3 % (▲) ; IS Lp1 0,15 % (■). IS Lp2a 0,6 % (x = contrôle).

Nous avons testé, dans les mêmes conditions que précédemment, un autre agent anticancéreux, la vinblastine, toujours en comparaison avec le vérapamil (3  $\mu$ M) (fig. 22).

Avec la vinblastine, les meilleurs résultats sont obtenus pour une concentration d'immun sérum Lp1 de 1,2 % (fig. 22). L'effet de l'immun sérum Lp1 sur la cytotoxicité induite par la vinblastine (50  $\mu$ M) montre que l'incubation des cellules P388R avec 1,2 % de sérum de souris immunisées par Lp1 entraîne une inhibition de la résistance environ 2 fois supérieure à celle obtenue avec le vérapamil 3  $\mu$ M. Le vérapamil semble ne pas avoir d'effet sur la cytotoxicité de la vinblastine tout comme les incubations avec les sérums provenant de souris immunisées avec la formulation contrôle Lp2a.



Figure 22 : Effet du vérapamil (VRP  $3\mu$ M) ou des immuns sérums de souris immunisées par Lp1 (1.2 %) ou Lp2a sur la cytotoxicité de la vinblastine 50  $\mu$ M (VBL). Les résultats correspondent à la moyenne de trois déterminations sur 5 sérums différents. p < 0,05 (a).

Pour confirmer et compléter ces résultats, nous avons étudié l'incorporation de vinblastine radioactive [<sup>3</sup>H-VLB] par les cellules P388R incubées en présence de vérapamil ou de 1,2 % de sérums de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a (fig. 23). Parmi 8 sérums de souris immunisées par la préparation vaccinale Lp1, six exercent une activité inhibitrice de l'efflux de VLB (ISLp1 actifs) similaire à l'activité exercée par 3  $\mu$ M de vérapamil, alors que deux (ISLp1 inactifs) n'ont pas d'activité et présentent une incorporation de vinblastine radioactive semblable aux contrôles en présence de vinblastine seule ou avec 1,2 % de sérum Lp2a.



Figure 23 : Incorporation de vinblastine radiomarquée [3H-VBL] par les cellules P388R incubées en présence de vérapamil (VRP) 3  $\mu$ M ou de sérums de souris. Au niveau des sérums de souris immunisées par Lp1, deux groupes sont séparés en IS Lp1 actifs (6 sérums) et non actifs (2 sérums). p < 0,05 (a).

## IV.1.E. Etude *ex vivo* des anticorps induits sur la réversion des cellules résistantes à la chimiothérapie

Les sérums de souris immunisées par Lp1 augmentent la cytotoxicité de la doxorubicine et de la vinblastine sur les cellules P388R. Nous avons donc cherché à établir la capacité de la préparation vaccinale Lp1 à réverser le phénotype MDR. Nous avons analysé, par la technique au MTT, la croissance de quatre lignées cellulaires murines : B16R, L1210R,

LM(tk-)R et P388R en présence de doxorubicine ou de vinblastine par comparaison au Vérapamil.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le Tableau 8 et permettent de montrer qu'aucune réversion n'est observée pour les cellules de mélanome B16R puisque le pourcentage de réversion est en moyenne égal à 2±2. Pour les lignées cellulaires L1210R, nous observons un pourcentage de réversion inférieur à celui engendré par le vérapamil que ce soit vis-à-vis de la doxorubicine ou de la vinblastine. Sur les cellules LM(tk-)R l'effet cytotoxique de l'immun sérum LP1 sur la doxorubicine et la vinblastine est similaire à l'effet du vérapamil. Enfin sur la lignée P388R l'immun sérum Lp1 est inducteur d'une réversion inférieure à celle induite par le vérapamil sur la doxorubicine et quasi égale vis-à-vis de la vinblastine.

Tableau	8:	Activités	ex	vivo	des	anticorps	induits	par	Lp1	et du	u Vé	erapamil	sur	la
réversion	ı de	chimioré	sist	ance	des c	cellules B10	6 R, L12	10R,	LM(	tk-)R	et P.	388R.		

		% de réversion					
Lignées cellulaires	Drogues	Sérum Lp1 (1,2%)	Vérapamil (3µM)				
B16R	DOX (10 µM)	2±2	3±2				
	<b>VLB</b> (50 μM)	2±2	2±2				
L1210R	DOX (10 µM)	21±4	34±6				
	VLB (50 μM)	8±3	10±3				
LM(tk-)R	DOX (10 µM)	3±2	2±2				
	<b>VLB</b> (50 μM)	23±4	18±3				
P388 R	DOX (10 µM)	15±3	25±4				
	VLB (50 µM)	7±2	5±2				

## IV.1.F. Détection par immunocytochimie des anticorps induits par la préparation vaccinale Lp1 sur différentes lignées cellulaires murines

Afin de montrer que les anticorps induits par la préparation vaccinale Lp1 sont bien dirigés contre les boucles extracellulaires de la glycoprotéine P murine, nous avons réalisé sur les trois lignées cellulaires ayant subi une réversion (L1210R, LM(tk-)R et P388R), une détection par immunocytochimie indirecte comme décrit dans le § III.11.



Figure 24 : Étude immunocytochimique sur les cellules cancéreuses murines L1210 résistantes et sensibles à la doxorubicine. a : L1210R incubées avec l'immun sérum de souris Lp1, b : L1210S incubées avec l'immun sérum Lp1, c : L1210R incubées en présence de sérum contrôle Lp2a, d : L1210S incubées en présence en présence de sérum contrôle Lp2a.

Un immuno-marquage positif (coloration brune) n'est observable qu'à la surface des cellules L1210R en présence d'immun sérum Lp1 (fig. 24). Cette étude immunocytochimique confirme la spécificité des anticorps produits suite à l'immunisation avec la préparation vaccinale Lp1 puisque seules les cellules résistantes (R), et exprimant à leur surface la

glycoprotéine P sont immuno-révélées. Aucune immuno-détection de la glycoprotéine P n'est observable avec l'immun sérum contrôle Lp2a.



Figure 25 : Étude immunocytochimique sur les cellules cancéreuses murines LM(tk-) résistantes et sensibles à la doxorubicine. a : LM(tk-)R incubées avec l'immun sérum de souris Lp1, b : LM(tk-)S incubées avec l'immun sérum Lp1, c : LM(tk-)R incubées en présence de sérum contrôle Lp2a, d : LM(tk-)S incubées en présence de sérum contrôle Lp2a.

Comme dans le cas précédent de la lignée L1210, seules les cellules LM(tk-) résistantes à la doxorubicine (LM(tk-)R présentent une immuno-détection de la glycoprotéine P à leur surface en utilisant l'immun sérum Lp1. De nouveau, l'utilisation de l'immun sérum Lp2a ne révèle aucun marquage, synonyme de l'absence d'anticorps anti-glycoprotéine P dans ce sérum contrôle (fig. 25).



Figure 26 : Étude immunocytochimique sur les cellules cancéreuses murines P388 résistantes et sensibles à la doxorubicine. a : P388R incubées avec l'immun sérum de souris Lp1, b : P388S incubées avec l'immun sérum Lp1, c : P388R incubées en présence de sérum contrôle Lp2a, d : P388S incubées en présence en présence de sérum contrôle Lp2a.

Avec la lignée P388, la glycoprotéine P est immuno-révélée uniquement avec l'immun sérum Lp1 sur les cellules P388 résistantes à la doxorubicine. Les cellules P388 sensibles n'expriment pas la glycoprotéine P. De même, aucun marquage n'est observable avec l'immun sérum contrôle Lp2a (fig. 26).

Les résultats obtenus dans cette étude immunocytochimique (fig. 24 à 26), montrent que les trois lignées cellulaires sensibles ne présentent aucune coloration brune, qu'elles soient incubées avec les immuns sérums Lp1 (fig. 24b, 25b et 26b) ou contrôle Lp2a (fig. 24d, 25d et 26d). Comme pour les cellules sensibles, nous n'observons pas de coloration brune pour les cellules de phénotype MDR en présence de l'immun sérum Lp2a (fig. 24c, 25c et 26c). Par contre, nous pouvons noter une coloration brune, preuve de l'immuno-localisation de la glycoprotéine P, sur les 3 lignées de cellules résistantes à la doxorubicine lorsqu'elles sont incubées avec l'immun sérum Lp1 (fig. 24a, 25a et 26a).

## IV.1.G. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *mdr1*, *mdr2* et *mdr3* sur les lignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine

Afin d'étudier l'effet des anticorps induits sur l'expression des gènes *mdr*, nous avons choisi la technique de RT-PCR car l'analyse par Northern-blot n'est pas assez sensible pour détecter les gènes *mdr1*, *mdr2* et *mdr3* dans les cellules murines ou les échantillons de tissus murins congelés.



### Figure 27 : Etude de l'expression des gènes *mdr1*, *mdr2*, *mdr3* et du gène de référence *rRNA* sur les lignées murines sensibles et résistantes à la doxorubicine.

Dans notre étude, le gène *rRNA* qui code pour l'ARN ribosomal 28S, correspond au gène de référence exprimé de façon ubiquitaire chez la souris (fig. 27). Il est donc exprimé dans toutes les cellules de souris qu'elles soient sensibles ou résistantes à la doxorubicine.

Les résultats par RT-PCR de l'expression du gène *mdr1* sur les lignées cellulaires murines sensibles et résistantes à la doxorubicine montrent que les cellules, L1210R, P388R

LM(tk-)R et B16R expriment le gène *mdr1* (fig. 27). Les cellules L1210 S, P388S, P388R, LM(tk-)S et B16S n'expriment que de façon très réduite le gène *mdr1*.

L'étude de l'expression des gènes *mdr2* et *mdr3* sur les cellules sensibles et résistantes à la doxorubicine montre que les cellules L1210R, P388R et B16R expriment le gène *mdr2* à l'inverse des lignées cellulaires L1210S, P388S, LM(tk-)R, LM(tk-)S et B16S qui ne l'expriment que très faiblement, mais celui ci n'est pas décrit comme étant impliqué dans le mécanisme de la résistance multiple (MDR) (fig. 27). Quant au gène *mdr3*, il est fortement exprimé dans les cellules L1210R, P388R et LM(tk-)R, faiblement dans le lignées cellulaires L1210S, P388S, LM(tk-)S, B16R et B16S et pas dans la lignée LM(tk-)S.

Le phénotype MDR semble être du à la co-expression des gènes *mdr1* et *mdr3* pour les cellules L1210R, P388R, LM(tk-)R et à un autre mécanisme que l'expression du gène *mdr1* et *mdr3* pour les cellules de mélanome B16R puisque les anticorps induits n'ont aucune action sur leur résistance (Tableau 8, p 65).

### IV.1.H. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *mdr1*, *mdr2* et *mdr3* sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a

La souris exprime de façon naturelle les gènes *mdr1*, *mdr2* et *mdr3*. Nous avons réalisé des RT-PCR sur des organes congelés de souris immunisées avec la préparation vaccinale immunogène Lp1 ou la préparation contrôle Lp2a pour voir si les anticorps induits par l'immunisation avec Lp1 étaient responsables de modifications dans le mécanisme de régulation de la transcription.

Comme précédemment, le gène *rRNA* sert de référence interne à nos expériences de RT-PCR Le gène *rRNA* est bien exprimé au niveau de tous les organes testés validant ainsi notre protocole expérimental de RT-PCR (fig. 28).



Figure 28 : Etude de l'expression des gènes *mdr1 mdr2* et *mdr3* sur des organes congelés de souris B6D2F1 immunisées par le vaccin Lp1 ou Lp2a

L'analyse de l'expression du gène *mdr1* (fig. 28) montre qu'il est exprimé dans tous les organes de souris, sauf au niveau des poumons de souris immunisées par la préparation vaccinale contrôle Lp2a. De plus, nous pouvons constater une diminution de l'expression de ce gène au niveau du pancréas et des ovaires de souris immunisées par la préparation immunogène Lp1 en comparaison aux souris immunisées par Lp2a.

L'expression du gène mdr2 au niveau des organes de souris immunisées par les formulations Lp1 ou Lp2a est représentée sur la figure 28. Nous pouvons noter que le gène mdr2 n'est pas exprimé au niveau des poumons, qu'il est très faiblement exprimé au niveau du pancréas, moyennement au niveau des surrénales, de la rate, du cœur et plus fortement au niveau du foie et des ovaires. De plus, nous remarquons que le pancréas ainsi que les surrénales expriment de façon similaires le gène mdr2 quelle que soit la préparation injectée aux souris. Par ailleurs, nous pouvons observer une diminution de son expression au niveau des ovaires, du foie et des reins de souris immunisées par Lp1 en comparaison au contrôle Lp2a. A l'inverse, nous pouvons constater l'augmentation de l'expression du gène mdr2 au niveau du cœur et de la rate de souris immunisées par Lp1 toujours en comparaison avec Lp2a.

Les résultats de l'expression du gène *mdr3* par RT-PCR, représentés sur la figure 28 ne montrent aucune expression du gène *mdr3* au niveau des poumons et du pancréas. Bien que l'expression du gène *mdr3* soit identique au niveau de la rate et du cœur quel que soit le type de préparation vaccinale utilisée, ces deux organes ne l'expriment que très faiblement. Nous pouvons également observer une baisse de l'expression du gène *mdr3* au niveau des ovaires, du foie, des reins, et des surrénales chez les souris immunisées par la préparation contrôle Lp2a.

#### **IV.1.I.** Effets secondaires des préparations vaccinales sur la souris

Enfin, nous avons réalisé chez les souris immunisées avec les formulations vaccinales Lp1 et Lp2a, une étude histologique sur des organes exprimant naturellement la glycoprotéine P (rate, foie, glandes surrénales, pancréas, ovaires). Dans ces différents organes, nous n'avons pas trouvé de lésion ou d'infiltration de lymphocytes ou monocytes. Cependant, nous avons observé quelques granulomes *intra péritonéaux* (identifiés par des flèches sur la figure 29) associés au pancréas, aux surrénales, à la rate (chez 80% des souris) et rarement au niveau du foie (20%) chez les animaux immunisés par Lp1 et Lp2a (fig. 29).

Nous pouvons ainsi observer une lésion granulomateuse à la surface du foie (fig. 29a), sous la capsule du foie avec la présence de micro calcifications que nous pouvons visualiser grâce aux flèches (fig. 29b). Sur les figures 29c et d, nous pouvons noter un granulome localisé dans le tissu adipeux entourant la glande surrénale. Au niveau de la rate, nous pouvons observer des lésions granulomateuses dans le tissu adipeux (fig. 29e) et quelques cellules géantes isolées (fig. 29f). Enfin, au niveau du pancréas, de nombreuses cellules épithéliales granulomateuses dans les tissus gras péri pancréatiques sont observées (fig. 29g). La figure 29h montre un détail d'un granulome péri pancréatique.

Qu'elles soient immunisées par Lp1 ou Lp2a, les souris possèdent toutes des granulomes au niveau de leurs organes. L'induction de granulomes au niveau des organes de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a est donc due à un des composés communs aux deux préparations vaccinales



Figure 29 : Analyse histologique des organes de souris immunisées par Lp1 (a, c, e, g) ou contrôles (b, d, f, h). Coupes en paraffine colorées par l'hématoxyline-Phloxine-Safran. Barre d'échelle, 100 μm.

### IV.1.J. Induction de granulomes par l'alum

Dans le but de déterminer le composé responsable de la formation de granulomes au niveau des organes de souris immunisées par la solution immunogène Lp1 ou contrôle Lp2a, nous avons de nouveau réalisé une étude histologique sur des organes de souris immunisées par trois lots différents de préparation immunogène : Lp1, l'alum seul ou du sérum physiologique. Les résultats de cette analyse sont représentés par la figure 31 où nous pouvons observer la présence de granulomes au niveau du foie, de la rate, du pancréas et des ovaires de souris immunisées par Lp1 ou l'alum seul. A l'inverse, aucune présence de granulomes n'est observée au niveau des organes de souris immunisées uniquement avec du sérum physiologique. L'alum, composé commun aux préparations Lp1 et Lp2a, est donc responsable du développement des granulomes à l'issu des immunisations.



Figure 30: Analyse histologique des organes de souris immunisées par Lp1, l'alum ou le sérum physiologique. Coupes en paraffine colorées par l'hématoxyline-Phloxine-Safran. Barre d'échelle, 100 µm.

## IV.2. Effet du resvératrol sur la prolifération et la viabilité des lignées cellulaires murines

### IV.2.A. Etude de la prolifération cellulaire

Les effets du resvératrol ont été étudiés sur trois lignées cellulaires sensibles et résistantes à la doxorubicine, L1210R et S, P388R et S, LM(tk-)R et S. Ces lignées cellulaires ont été incubées en l'absence ou en présence de diverses concentrations de resvératrol (5, 10, 25, 50, 100 et 200  $\mu$ M) durant 24 h et 48 h. Les IC<sub>50</sub> (Tableau 9) ainsi que la croissance cellulaire (fig. 31) de ces différentes lignées ont été évaluées par le test MTT.

A 24 h, les IC<sub>50</sub> du resvératrol sur les lignées cellulaires L1210R, P388R, P388S et LM(tk-)S sont statistiquement comparables, alors que les cellules L1210S sont plus sensibles avec une IC<sub>50</sub> égale à  $31,33 \pm 3,03$  et les cellules LM(tk-)R sont moins sensibles à l'effet du resvératrol (IC<sub>50</sub> :  $103,33 \pm 15,64$ ). Après 48 h de traitement avec du resvératrol, les cellules L1210R et LM(tk-)R par comparaison aux cellules sensibles présentent des IC<sub>50</sub> plus élevées, alors que celui-ci a un effet similaire sur les cellules P388R et S. De plus, nous pouvons également observer une diminution des IC<sub>50</sub> dans toutes les populations cellulaire à 48 h. Le resvératrol exerce donc un effet en fonction du temps.

Tableau 9 : Valeur des  $IC_{50}$  après 24 et 48 h d'incubation avec le resvératrol sur les différentes lignées cellulaires

Lignées c	ellulaires	L1210R	L1210S	P388R	P388S	LM(tk-)R	LM(tk-)S
IC <sub>50</sub> Resvératrol	24 h	41,33 ± 1,52	31,33 ± 3,03	45,67 ± 0,72	48 ± 3,31	103,33 ± 15,64	54,67 ± 9,19
$[\mu M] \pm SEM$	48 h	25 ± 0,94	11 ± 0,82	18,33 ± 1,58	19 ± 1,65	59,33 ± 4,46	31 ± 1,63

Les résultats de la figure 31 montrent que le resvératrol a un effet inhibiteur sur la prolifération de chacune des lignées cellulaires testées. Cette inhibition est à la fois fonction de la dose et du temps de traitement des cellules avec le resvératrol ceci comparé au contrôle 0,1% éthanol, qui est l'équivalent de la concentration d'éthanol présent dans 200  $\mu$ M de resvératrol.



Figure 31 : Effet du resvératrol sur la prolifération cellulaires des lignées L1210R et S, P388R et S, LM(tk-)R et S à 24 h (■)et 48 h (■). p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c)



#### IV.2.B. Etude de la viabilité cellulaire



Resvératrol [µM]

Figure 32: Effets du resvératrol sur la viabilité cellulaires des lignées L1210R et S, P388R et S, LM(tk-)R et S à 24 h (■)et 48 h (■). p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c)

Nous avons également évalué la mort cellulaire des différentes lignées sensibles et résistantes à la doxorubicine par la méthode d'exclusion au bleu trypan (fig. 32). Nous pouvons noter qu'aux valeurs d'IC<sub>50</sub> trouvées précédemment par le test MTT à respectivement 24 h et 48 h (Tableau 9), les cellules L1210R (41,33  $\mu$ M et 25  $\mu$ M), L1210S (31,33  $\mu$ M et 11  $\mu$ M), LM(tk-)R (103,33  $\mu$ M et 59,33  $\mu$ M) et LM(tk-) S (54,67  $\mu$ M et 31  $\mu$ M) ne présentent pas plus de 5% de cellules mortes. Ces résultats suggèrent que les effets inhibiteurs du resvératrol sur la croissance cellulaire de ces lignées sont dûs principalement à un effet antiprolifératif. En revanche, aux valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues à respectivement 24 h et 48 h pour les cellules P388R (45,67  $\mu$ M et 18,33  $\mu$ M) et P388S (48  $\mu$ M et 19  $\mu$ M) la mort cellulaire avoisine les 50%, suggérant dans le cas de ces lignées, un effet cytotoxique du resvératrol.

Ainsi, l'effet inhibiteur du resvératrol sur la croissance cellulaire serait dû, au moins en partie, à un effet antiprolifératif pour les cellules L1210R, L1210S, LM(tk-)R, LM(tk-)S et à un effet cytotoxique pour les cellules P388R et P388S.

### IV.2.C. Bilan des effets du resvératrol sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire

Tableau 10 : Effets du resvératrol sur les lignées L1210, P388 et LM(tk-) sensibles et résistantes à la doxorubicine. (+) pas d'effet, (+) effet antiprolifératif (+) effet cytotoxique.

		Resvératrol en µM								
Lignées cellulaires	Temps	0	5	10	25	50	100	200		
I 1210D	24 h	+	+	+	+	+	+	+		
LIZION	48 h	+	+	+	+	+	+	+		
T 1210C	24 h	+	+	+	+	+	+	+		
L12105	48 h	+	+	+	+	+	+	+		
D200D	24 h	+	+	+	+	+	+	+		
FJOOK	48 h	+	+	+	+	+	+	+		
P388S	24 h	+	+	+	+	+	+	+		
	48 h	+	+	+	+	+	+	+		
	24 h	+	+	+	+	+	+	+		
LIVI(IK-)K	48 h	+	+	+	+	+	+	+		
I M(41-)S	24 h	+	+	+	+	+	+	+		
LIVI(UK-)S	48 h	+	+	+	+	+	+	+		

En cumulant les résultats obtenus par les tests de colorimétrie au MTT et d'exclusion au bleu trypan nous avons pu établir un tableau récapitulatif des effets cytostatiques et cytotoxiques du resvératrol sur les cellules L1210, P388 et LM(tk-) sensibles et résistantes à la doxorubicine (Tableau 10).

De façon générale, ces résultats montrent que les cellules résistantes à la doxorubicine sont plus sensibles au resvératrol que les cellules non résistantes.

### **IV.3.** Etude de l'apoptose induite par le resvératrol

#### IV.3.A. Analyse par double marquage Hoechst – Iodure de propidium

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet potentiel du resvératrol sur le phénomène d'apoptose sur les lignées L1210, P388, LM(TK-) sensibles et résistantes à la doxorubicine. Les lignées cellulaires sont incubées durant 24 h avec des concentrations croissantes de resvératrol (0-200  $\mu$ M). Un double marquage Hoechst-Iodure de Propidium (HO-IP) est réalisé, suivi d'une observation au microscope à fluorescence. Le marquage au Hoechst permet de visualiser les noyaux cellulaires de toutes les cellules et de détecter d'éventuelles fragmentations nucléaires caractéristiques de l'apoptose. Le marquage à l'iodure de propidium permet, quant à lui, d'identifier les cellules en nécrose. Par ce double marquage, nous pouvons ainsi identifier quatre populations de cellules : les cellules normales, les cellules en apoptose précoce (flèche jaune), les cellules en apoptose tardive (flèche blanche) et les cellules nécrotiques (flèche rouge) (fig. 33A). Après identification et comptage des différentes populations de cellules, le pourcentage de noyaux apoptotiques et nécrotiques est évalué (fig. 33B à 38).

Pour la lignée cellulaire L1210R, le pourcentage de cellules apoptotiques le plus élevé atteint  $25,92\% \pm 7,45$  après un traitement de 100  $\mu$ M de resvératrol et le pourcentage de cellules nécrotiques atteint  $17,97\% \pm 0,84$  à 200  $\mu$ M de resvératrol (fig. 33B).

A

0 µM resvératrol

25 µM resvératrol

200 µM resvératrol

B



Figure 33: A) Observation en microscopie à fluorescence après coloration nucléaire des cellules L1210R par double marquage HO-IP ; B) Evaluation du pourcentage de cellules L1210R apoptotiques ( $\blacksquare$ ) et nécrotiques ( $\blacksquare$ ) en fonction des concentrations de resvératrol utilisées. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,005 (c).

La lignée cellulaire L1210S (fig. 34) quant à elle ne présente pas plus de 3% de noyaux apoptotiques par rapport au contrôle. Par contre, après un traitement de 200  $\mu$ M de resvératrol 19,3% ± 4,94 de cellules en nécrose sont observées.



Figure 34: Evaluation du pourcentage de cellules L1210S apoptotiques ( $\blacksquare$ ) et nécrotiques ( $\blacksquare$ ) en fonction des concentrations de resvératrol utilisées. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Dans le cas de la lignée P388R, le pourcentage de cellules apoptotiques augmente en fonction de la concentration en resvératrol utilisée pour atteindre le taux le plus élevé de  $75,23\% \pm 2,39$  à 200  $\mu$ M de resvératrol alors que le marquage à l'iodure de propidium ne révèle aucun pourcentage significatif de cellules nécrotiques (fig. 35).



Figure 35: Evaluation du pourcentage de cellules P388R apoptotiques ( $\blacksquare$ ) et nécrotiques ( $\blacksquare$ ) en fonction des concentrations de resvératrol utilisées. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Comme pour les cellules P388R, les cellules P388S ont un pourcentage de noyaux apoptotiques qui croît avec la concentration de resvératrol pour atteindre un maximum à 200  $\mu$ M de resvératrol avec 81,23 % ± 10,55 de cellules en apoptose. Les cellules P388S, comme les P388R ne présentent pas de nécrose (fig. 36).



Figure 36: Evaluation du pourcentage de cellules P388S apoptotiques ( $\blacksquare$ ) et nécrotiques ( $\blacksquare$ ) en fonction des concentrations de resvératrol utilisées. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Les cellules LM(tk-)R ne présentent ni apoptose ni nécrose de façon significative quelle que soit la concentration de resvératrol (fig. 37).



Figure 37: Evaluation du pourcentage de cellules LM(tk-)R apoptotiques ( $\blacksquare$ ) et nécrotiques ( $\blacksquare$ ) en fonction des concentrations des resvératrol utilisées. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Comme pour les cellules LM(tk-)R, les cellules LM(tk-)S ne présentent pas un pourcentage de noyaux apoptotiques ou nécrotiques significatif par rapport au contrôle 0,1% éthanol (fig. 38).



Figure 38: Evaluation du pourcentage de cellules LM(tk-)S apoptotiques ( $\blacksquare$ ) et nécrotiques ( $\blacksquare$ ) en fonction des concentrations de resvératrol utilisées. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

L'ensemble de ces résultats montre que le resvératrol a un effet pro-apoptotique très important sur les lignées P388R et P388S (environ 80% à 200  $\mu$ M), un effet beaucoup moins marqué sur la lignée L1210R (25% à 200  $\mu$ M), alors que sur les autres lignées cellulaires L1210S, LM(tk-)R et LM(tk-)S, le resvératrol ne semble pas déclencher le programme de mort cellulaire programmée. Ces résultats sont en corrélation avec les tests de cytotoxicité.

#### IV.3.B. Analyse de la fragmentation d'ADN

Afin de confirmer l'apparition des modifications morphologiques nucléaires observées en microscopie au cours de l'apoptose induite par le resvératrol, nous avons recherché la présence d'une échelle d'ADN ou "ladders" caractéristique de la fragmentation chromatinienne dans les différentes lignées cellulaires traitées au resvératrol.

Ces résultats confirment ceux de microscopie à fluorescence puisqu'une fragmentation d'ADN plus élevée au niveau des cellules P388R et P388S que des cellules L1210R est observée, confirmant ainsi une induction d'apoptose par le resvératrol sur les cellules P388R et P388S. Ces résultats montrent également que l'apoptose déclenche un effet cytotoxique dans les lignées cellulaires P388R et P388S, mais contribue à l'inhibition de croissance des cellules L1210R. Enfin, le resvératrol semble avoir un effet antiprolifératif sur les lignées cellulaires L1210S, LM(tk-)R et LM(tk-)S puisqu'aucune fragmentation d'ADN n'est observée. La figure 39 nous montre une fragmentation de l'ADN cellulaire avec un profil en échelle dans les cellules L1210R (n° 5, 6, 7), P388R (n° 4, 5, 6 et 7), P388S (n° 2, 3, 4, 5, 6 et 7).



L1210R









LM(tk-)S

Figure 39 : Electrophorèse de l'ADN génomique sur gel d'agarose 1,8 %. 1 : ADN des cellules traitées avec 0,1% d'éthanol, 2 à 7 : ADN des cellules traitées avec 5, 10, 25, 50, 100 et 200 µM de resvératrol. 8 : marqueur de poids moléculaire Smart ladder SF (1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 pb)

### IV.4. Analyse du cycle cellulaire

L'inhibition de la prolifération cellulaire peut s'expliquer par la mise en œuvre de deux phénomènes qui sont, soit un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire, soit le déclenchement du processus de mort cellulaire programmée. Pour compléter notre étude, nous avons analysé la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Pour ce faire, les cellules L1210R et L1210S, P388R et P388S, LM(tk-)R et LM(tk-)S ont été traitées pendant 24 h avec des concentrations croissantes, mais sub-létales, de resvératrol (0, 5, 10, 25, et 50 µM) avant d'être analysées en cytométrie en flux après un marquage à l'iodure de propidium.



L1210R

Figure 40: Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules L1210R. A) Distribution des cellules L1210R dans le cycle cellulaire, M1 phase  $G_0/G_1$ , M2 phase  $G_2/M$ , M3 phase S et M4 Phase sub- $G_1$ ; B) Répartition du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction des concentrations de resvératrol. Phase sub- $G_1$  (**m**), phase  $G_0/G_1$  (**m**), phase S (**m**) et phase  $G_2/M$  (**m**). Pp<0,05 (a), p<0,005 (b), p<0,0005 (c). Pour les cellules L1210R (fig. 40), une accumulation du nombre de cellules en phase  $G_0/G_1$  à 5 et 10  $\mu$ M de resvératrol est observée. Simultanément, une diminution du nombre de cellules L1210R en phase S et  $G_2/M$  apparaît, suggérant ainsi un arrêt du cycle cellulaire en phase  $G_1$ . Pour des concentrations supérieures à 10  $\mu$ M de resvératrol, les cellules L1210R sont décalées de la phase  $G_0/G_1$  vers une population cellulaire sub- $G_1$  caractéristique des cellules apoptotiques. La présence de cette population sub- $G_1$  altère la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Ainsi, l'arrêt du cycle cellulaire ne peut être estimé lorsque la population cellulaire sub- $G_1$  apparaît.



L1210S

Figure 41: Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules L1210S. A) Distribution des cellules L1210S dans le cycle cellulaire, M1 phase  $G_0/G_1$ , M2 phase  $G_2/M$ , M3 phase S et M4 Phase sub- $G_1$ ; B) Répartition du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction des concentrations de resvératrol. Phase sub- $G_1$  (**m**), phase  $G_0/G_1$  (**m**), phase S (**n**) et phase  $G_2/M$  (**m**). p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c). Concernant les cellules L1210S, une légère accumulation du nombre de cellules en phase  $G_0/G_1$  ( $\approx$  7%), par rapport au contrôle 0,1% éthanol, est observée (fig. 41). Ceci correspond à une diminution du nombre de cellules en phase S et G<sub>2</sub>/M ce qui induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub>. Toutefois, comme pour les cellules L1210R, l'apparition d'une population cellulaire sub-G<sub>1</sub>, pour des concentrations de resvératrol supérieures à 10  $\mu$ M, altère la répartition des cellules L1210S dans le cycle cellulaire et l'évaluation de l'arrêt du cycle.



Figure 42: Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules P388R. A) Distribution des cellules P388R dans le cycle cellulaire, M1 phase  $G_0/G_1$ , M2 phase  $G_2/M$ , M3 phase S et M4 Phase sub- $G_1$ ; B) Répartition du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction des concentrations de resvératrol. Phase sub- $G_1$  (**n**), phase  $G_0/G_1$  (**n**), phase S (**n**) et phase  $G_2/M$  (**n**). p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Pour les cellules P388R, 30 % des cellules sont en phase sub- $G_1$  dès un traitement de 10  $\mu$ M de resvératrol, rendant l'interprétation de l'arrêt du cycle cellulaire difficile. Toutefois, une augmentation significative en phase S est notée chez les cellules P388R traitées avec

 $5 \mu M$  de resvératrol par rapport au contrôle 0,1% éthanol, suggérant un arrêt du cycle cellulaire en phase S (fig. 42).



P388S

Figure 43: Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules P388S. A) distribution des cellules P388S dans le cycle cellulaire, M1 phase  $G_0/G_1$ , M2 phase  $G_2/M$ , M3 phase S et M4 Phase sub- $G_1$ ; B) Répartition du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction des concentrations de resvératrol. Phase sub- $G_1$  ( $\blacksquare$ ), phase  $G_0/G_1$  ( $\blacksquare$ ), phase S ( $\blacksquare$ ) et phase  $G_2/M$  ( $\blacksquare$ ). p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire des cellules P388S (fig. 43) indiquent une diminution du pourcentage de cellules en phase  $G_0/G_1$ , S et  $G_2/M$  après traitement avec des concentrations croissantes de resvératrol. Simultanément une augmentation du pourcentage du nombre de cellules P388S en phase sub- $G_1$  est observée. Comme pour la lignée cellulaire P388R la présence d'une population sub- $G_1$  dès 5  $\mu$ M rend difficile toute interprétation de l'arrêt du cycle cellulaire.



LM(tk-)R

Figure 44: Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules LM(tk-)R. A) distribution des cellules LM(tk-)R dans le cycle cellulaire, M1 phase  $G_0/G_1$ , M2 phase  $G_2/M$ , M3 phase S et M4 Phase sub- $G_1$ ; B) Répartition du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction des concentrations de resvératrol. Phase sub- $G_1$  (**n**), phase  $G_0/G_1$  (**n**), phase S (**n**) et phase  $G_2/M$  (**n**). p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Comme l'indique la figure 44, le nombre de cellules LM(tk-)R en phase  $G_0/G_1$ diminue jusqu'à 25 µM puis augmente de nouveau pour 50 µM. L'inverse est obtenu pour la phase S. Le pourcentage de cellules LM(tk-)R en phase  $G_0/G_1$  traitées en présence de 25 µM de resvératrol durant 24 h est de 43,10 % alors qu'il est de 62,47 % (P<0,05) pour les cellules traitées avec 0,1% d'éthanol (contrôle). Par conséquent, le nombre de cellules en phase S augmente considérablement après traitement. En effet, seulement 15,66 % de cellules témoins sont en phase S tandis que 30,1 % de cellules traitées en présence de 25 µM de resvératrol sont en phase de réplication. Pour les cellules en phase  $G_2/M$ , le nombre de cellules augmente légèrement pour les concentrations 5  $\mu$ M et 10  $\mu$ M de resvératrol (respectivement 23,19 % et 29,27 %) mais ne varie pas de façon significative pour les concentrations de 25  $\mu$ M et 50  $\mu$ M par rapport au témoin éthanol (18,95 %). Enfin, le pourcentage de cellules en phase sub-G1 ne change pas de façon significative en fonction des concentrations de resvératrol utilisées.



#### LM(tk-)S



Figure 45: Effets du resvératrol sur le cycle cellulaire des cellules LM(tk-)S. A) Distribution des cellules LM(tk-)S dans le cycle cellulaire, M1 phase  $G_0/G_1$ , M2 phase  $G_2/M$ , M3 phase S et M4 Phase sub- $G_1$ ; B) Répartition du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction des concentrations de resvératrol. Phase sub- $G_1$  ( $\blacksquare$ ), phase  $G_0/G_1$  ( $\blacksquare$ ), phase S ( $\blacksquare$ ) et phase  $G_2/M$  ( $\blacksquare$ ). p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Comme le montre les résultats obtenus figure 45, le resvératrol semble induire un arrêt du cycle cellulaire des cellules LM(tk-)S en phase G<sub>1</sub> puisqu'une accumulation des cellules en

phase  $G_0/G_1$  est observée après un traitement avec 50  $\mu$ M de resvératrol, en comparaison avec le contrôle.

En conclusion, l'accumulation des cellules L1210R et L1210S et LM(tk-)S en phase  $G_0/G_1$  du cycle cellulaire confirme l'effet antiprolifératif du resvératrol dans ces trois lignées, alors que la rapide apparition d'une population sub- $G_1$  dans les cellules P388R et P388S traitées au resvératrol est en corrélation avec l'effet cytotoxique important de celui-ci sur ces cellules. Enfin, la répartition des cellules LM(tk-)R dans le cycle cellulaire varie suivant les concentrations de resvératrol utilisées.

# IV.5. Effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine vis-à-vis des cellules de phénotype MDR

Dans le but de mettre en évidence une activité anti-MDR du resvératrol, nous avons testé lors de ces expériences, la capacité du resvératrol à moduler la sensibilité des cellules L1210R, P388R et LM(tk-)R à l'agent chimiothérapeutique, la doxorubicine. Ceci a été évalué par analyse au MTT. Comme le montrent les figures 46 et 47, le resvératrol améliore la cytotoxicité de la doxorubicine d'environ 20 % pour les cellules L1210R et P388R après un prétraitement de 24 h avec respectivement 25  $\mu$ M et 10  $\mu$ M de resvératrol. En revanche, un prétraitement à des doses allant jusque 50  $\mu$ M de resvératrol sur les cellules LM(tk-)R n'a qu'un effet minime puisque l'augmentation de la cytotoxicité de la doxorubicine sur ces cellules ne dépasse pas 10 % (fig. 48). Ces résultats suggèrent qu'un prétraitement de resvératrol durant 24 h est capable d'augmenter la sensibilité à la doxorubicine des cellules de phénotype MDR.



Figure 46: Effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules L1210R. p < 0.05 (a), p < 0.005 (b), p < 0.0005 (c).


Figure 47: Effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules P388R. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).



Figure 48: Effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules LM(tk-)R. p < 0.05 (a), p < 0.005 (b), p < 0.0005 (c).

Au vu de ces résultats, nous avons estimé si l'effet du prétraitement de resvératrol sur les trois lignées cellulaires résistantes traitées à la doxorubicine entraînait un effet synergique, cumulatif ou antagoniste par rapport à l'addition des effets de chacun des deux composés. Pour ce faire, nous avons utilisé la formule suivante : **[IC (RES+DOX)/ (ICRES+ICDOX)] :** où IC correspond aux inhibitions de croissance observées dans le cas des différents traitements.

Les résultats représentés figure 49 montrent un faible effet antagoniste du resvératrol sur les cellules L1210R, P388R et pas ou très peu d'effet sur les cellules LM(tk-)R.



Figure 49: Analyse de l'effet du prétraitement sur les cellules L1210R, P388R et LM(tk-)R

L'ensemble des résultats montrent qu'un prétraitement de resvératrol n'a pas ou peu d'effet sur la cytotoxicité de la doxorubicine vis-à-vis des cellules LM(tk-)R. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés pour la suite de nos travaux seulement aux lignées cellulaires L1210R et P388R.

#### **IV.6.** Accumulation de doxorubicine

Les résultats encourageants obtenus lors de l'étude de l'effet du resvératrol sur la cytotoxicité de la doxorubicine nous ont conduits à étudier son action potentielle sur l'accumulation intracellulaire de doxorubicine dans les lignées cellulaires L1210R et P388R par cytométrie en flux comme décrit dans le matériel et méthodes.



Figure 50: accumulation de doxorubicine dans les cellules L1210R prétraitées avec 25  $\mu$ M de resvératrol durant 24 h. (A) 40 $\mu$ M DOX, (B) 80 $\mu$ M DOX. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Les résultats présentés figure 50 indiquent que les cellules L1210R prétraitées avec 25  $\mu$ M de resvératrol durant 24 h puis traitées avec 40  $\mu$ M de doxorubicine (DOX) (fig. 50A) ne présentent pas d'accumulation de DOX par comparaison aux cellules traitées uniquement avec 40  $\mu$ M de DOX. En revanche, pour les cellules L1210R incubées en présence de 80  $\mu$ M de DOX, un prétraitement de 25  $\mu$ M de resvératrol induit une augmentation de l'accumulation de la DOX d'environ 17 % (fig. 50B), ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors de l'analyse du resvératrol sur la cytotoxicité de la DOX vis-à-vis des cellules L1210R.

Pour les cellules P388R, l'augmentation de l'accumulation est respectivement de 29,43 %  $\pm$  3,84 et 12,64 %  $\pm$  3,48 pour 5 et 10  $\mu$ M de DOX (fig. 51).



Figure 51: Accumulation de doxorubicine dans les cellules P388R prétraitées avec 10  $\mu$ M de resvératrol durant 24 h. (A) 5  $\mu$ M DOX, (B) 10  $\mu$ M DOX. p < 0,05 (a), p < 0,005 (b), p < 0,0005 (c).

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la sensibilité à la doxorubicine induite par le resvératrol, qui a été observée par le test MTT dans les lignées cellulaires résistantes, est due à l'accumulation de DOX.

### IV.7. Effet du resvératrol sur l'expression des gènes *mdr1* et *mdr3* sur les cellules L1210R et P388R

Au vu des résultats précédents, nous avons testé par RT-PCR l'effet du resvératrol sur l'expression des gènes *mdr1* et *mdr3* impliqués dans la surexpression de la glycoprotéine P chez les lignées cellulaires L1210R et P388R.

Comme le montre la figure 52, après un prétraitement de 24 h des lignées cellulaires L1210R et P388R à des doses non toxiques de resvératrol (respectivement 25  $\mu$ M et 10  $\mu$ M), suivi ou non d'un traitement de doxorubicine (DOX), aucun changement significatif de l'expression du gène *mdr3* n'est observé pour ces deux lignées cellulaires.



L1210R

P388R

Figure 52: Analyse de l'expression des gènes *mdr1* et *mdr3* par RT-PCR sur les cellules L1210R et P388R

Pour les cellules L1210R traitées avec 25  $\mu$ M de resvératrol aucun changement de l'expression du gène *mdr1* n'est observé par rapport au contrôle. Par contre, lorsque les cellules L1210R sont incubées en présence de 40  $\mu$ M de DOX, le niveau d'expression du gène *mdr1* comparé au contrôle est augmenté. Curieusement, un prétraitement de 25  $\mu$ M de resvératrol provoque la diminution des ARNm mdr1 induits par le traitement de 40  $\mu$ M de DOX. En revanche, un traitement de 80  $\mu$ M de DOX des cellules L1210R diminue l'expression du gène *mdr1* et aucune modification n'est observée avec un prétraitement de 25  $\mu$ M de 25  $\mu$ M de resvératrol.

Pour les cellules P388R traitées avec 10  $\mu$ M de resvératrol ou 5 $\mu$ M de DOX une augmentation de l'expression du gène *mdr1* est observée par rapport au contrôle. Aucun changement n'est observé avec un prétraitement de 10  $\mu$ M de resvératrol comparé avec 5  $\mu$ M de DOX seule. Par contre, un traitement de 10  $\mu$ M de DOX induit une augmentation de l'expression des ARNm mdr1 qui est inhibée par un prétraitement de 10  $\mu$ M de resvératrol.

Nos résultats démontrent donc qu'un prétraitement des lignées cellulaires L1210R et P388R avec du resvératrol reverse l'augmentation de l'expression du gène *mdr1* induit par la DOX.

# V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre du développement des nouvelles approches thérapeutiques anticancéreuses, notre objectif est de mettre au point une stratégie complémentaire aux traitements traditionnels pour lutter contre le mécanisme de résistance qui apparaît fréquemment dans le cancer.

L'apparition de cellules tumorales résistantes aux agents anticancéreux demeure l'un des obstacles majeurs aux traitements chimiothérapeutiques des cancers. Depuis ces 20 dernières années, les modèles expérimentaux et l'exploration des échantillons cliniques ont permis d'identifier plusieurs causes de résistance aux chimiothérapies (S. V. Ambudkar et coll., 1998; L. G. Baggetto, 1997; S. M. Simon et M. Schindler, 1994). La plus fréquemment observée est la multidrogue résistance ou "MDR" qui a été mise en évidence par Biedler et Riehm, en 1970 (J. L. Biedler et H. Riehm, 1970). Le phénotype MDR est le plus souvent associé à la surexpression d'une glycoprotéine membranaire de haut poids moléculaire (170 kDa) appelée "glycoprotéine P", ou "P-gp", surexprimée par les cellules cancéreuses MDR humaines ou de rongeurs et codée chez l'homme par le gène *MDR1*. L'homologue murin est codé par les gènes *mdr1a (mdr3)* et *mdr1b (mdr1)*. La glycoprotéine P se comporte comme une pompe ATP-dépendante, favorisant l'extrusion des xénobiotiques, entraînant ainsi une diminution de leur toxicité.

Toutes ces protéines sont impliquées dans des mécanismes qui permettent à la cellule tumorale d'échapper tant aux effets toxiques des médicaments qu'à la mort cellulaire programmée (apoptose) induits par de nombreux agents anticancéreux.

#### V.1. Modulation de la glycoprotéine P par immunothérapie

La réversion de la multidrogue résistance par des substances pharmacologiques comme les inhibiteurs calciques, les inhibiteurs de la calmoduline, les anesthésiques locaux a déjà été décrite (B. L. Lum et coll., 1993). Des études cliniques ont montré que ces modulateurs de la multidrogue résistance présentent souvent une toxicité chez l'Homme et les concentrations thérapeutiques ne peuvent jamais être atteintes (A. Figueredo et coll., 1990; J. M. Ford et W. N. Hait, 1990).

Afin de lutter contre la multidrogue résistance, nous avons développé une approche d'immunothérapie anti-glycoprotéine P *in vivo*.

Des travaux antérieurs montrent que des peptides palmitoylés mimant les boucles externes 1, 2 et 4 de la glycoprotéine P murine, insérés dans des liposomes, en présence de lipide A, permettent d'instaurer une réponse immunitaire spécifique anti-glycoprotéine P chez la souris. De plus, les anticorps induits sont capables, *in vitro*, d'inhiber l'activité de cette protéine dans les cellules L1210 résistantes à la doxorubicine (P. F. Tosi, D. Radu, et C. Nicolau, 1995).

Il a également été montré que la reconstitution dans des liposomes de peptides auxquels sont fixés deux chaînes d'acide palmitique aux extrémités aminé et carboxyterminales permet la formation d'une boucle qui améliore d'une part la présentation de l'antigène et d'autre part la capacité d'induire des auto anticorps contre des peptides du soi. Cette forme de présentation a été utilisée dans la constitution d'un vaccin à base de fragments  $\beta$  amyloïde prévenant la formation d'une plaque de dépôts amyloïdes chez les souris jeunes et la progression de la plaque chez l'animal plus âgé confirmant ainsi la capacité d'induire des auto-anticorps contre des peptides du soi (C. Nicolau et coll., 2002).

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre au point une préparation vaccinale dirigée contre la glycoprotéine P. Nous avons choisi les boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la glycoprotéine P murine déjà connues pour avoir une activité antigénique. Ces préparations contiennent, en plus des lipopeptides palmitoylés, des molécules adjuvantes qui sont le monophosphoryl lipide A (MPLA) et/ou l'alum.

Le MPLA est un composant bactérien dérivé du lipopolysaccharide (LPS), obtenu par traitement à l'acide chlorhydrique, ce qui lui permet d'être moins toxique et de conserver son efficacité en tant qu'adjuvant (P. Baldrick et coll., 2002). Des vaccins contenant du MPLA sont déjà testés en phase I/II contre des parasites (malaria) (J. A. Stoute et coll., 1998), des virus (hépatite B, Herpès, Influenza) (C. A. Jones et A. L. Cunningham, 2004), dans le traitement du cancer (non small cell lung cancer) (S. North et C. Butts, 2005) et des allergies aux pollens (K. J. Drachenberg et coll., 2001). La majorité de ces applications ciblées contre des maladies virales et des infections parasitaires ont une activité dépendant du déclenchement de la réponse de l'immunité cellulaire Th1 (T helper type 1) (P. Moingeon, J. Haensler, et A. Lindberg, 2001). Ce type de réponse peut être induit par le MPLA, ce qui en justifie son utilisation dans ces cas.

En revanche, pour induire des réponses immunitaires de type humoral (Th2) aboutissant à la production d'anticorps, d'autres adjuvants sont utilisés parmi lesquels les sels d'aluminium (l'alum) (J. C. Cox et A. R. Coulter, 1997; E. B. Lindblad, 2004), les cytokines (P. Rizza et coll., 2002) et le MPLA. Toutefois, ce dernier est moins spécifique que les cytokines et moins efficace que l'alum (D. M. Vermout S, Losson B, Mignon B, 2003). Dans le cas d'un "vaccin" anti-glycoprotéine P, l'activité n'est possible que s'il y a déclenchement d'une réponse immunitaire humorale contre cette protéine (C. Pawlak-Roblin et coll., 2004; P. F. Tosi, D. Radu, et C. Nicolau, 1995). Du fait de la distribution de la glycoprotéine P dans de nombreux tissus, il est préférable, et même nécessaire, que la réponse immunitaire ne soit pas de type cellulaire (Th1) et ne devienne pas de type auto-immune. Ceci laisse donc le choix entre l'efficacité non spécifique du MPLA qui expose, de plus, à un risque toxique et l'induction d'une réponse humorale modérée associée à l'alum qui présente l'avantage d'être un adjuvant déjà utilisé dans de nombreux vaccins commercialisés comme la diphtérie ou encore le tétanos (R. Edelman et C. O. Tacket, 1990).

Nos résultats indiquent que les lipopeptides correspondant aux boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la glycoprotéine P murine injectés seuls (Lp4) sont peu immunogènes montrant ainsi le rôle clé de leur reconstitution dans l'environnement membranaire.

La formulation liposomes-lipopeptides-alum (Lp1), bien que la plus simple dans sa formulation, semble être la plus efficace puisqu'elle permet d'augmenter l'immunogénicité des lipopeptides mpp1, mpp2 et mpp4. Cette préparation pourrait être bénéfique à l'hôte pour un développement thérapeutique futur. Un vaccin contre la maladie d'alzheimer sans lipide A a été étudié chez l'Homme à raison de 2 à 3 injections intramusculaires (225 µg de peptides) dans le deltoïde espacées d'un mois ou plus (J. M. Orgogozo et coll., 2003). La réponse immunitaire devient significative 2 mois après la 1<sup>ère</sup> injection avec une production d'anticorps chez 83% des patients. La croissance du titre en anticorps s'échelonne entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> mois après la 1<sup>ère</sup> injection et est suivie d'une décroissance progressive (sauf dans le cas d'un 3<sup>ème</sup> rappel).

Nos travaux montrent, chez les souris immunisées par la préparation vaccinale Lp1 sans MPLA, une réponse immunitaire du même type qui présente une croissance du titre en anticorps suivie d'une diminution, tout en ayant une persistance de la réponse immunitaire 240 jours après la troisième injection et en particulier vis-à-vis de la boucle extracellulaire 2 de la glycoprotéine P murine. Le profil de réponse immunitaire des mpp 1, mpp 2, mpp 4 murins est identique à celui observé avec des antigènes comme l'hémocyanine de patelle (KLH) ou les globules rouges de mouton, qui présentent une réponse immunitaire maximale en IgG1, 38 jours après la première immunisation (T. Hebell, J. M. Ahearn, et D. T. Fearon, 1991). Le lipide A a été utilisé pour augmenter la réponse immunitaire contre des peptides incorporés dans le volume interne des liposomes ou pour induire des anticorps contre des

petites molécules comme le cholestérol (R. L. Richards et coll., 1988). L'alum est un adjuvant efficace de la réponse immunitaire humorale couramment utilisé dans des vaccins humains contre la diphtérie ou encore le tétanos (Edelman R, 1980). Cette augmentation de la réponse immunitaire existe surtout dans les vaccins utilisant des peptides linéaires avec des résidus di ou tripalmitoylés (I. Bourgault et coll., 1994; K. Deres et coll., 1989; E. Watari et coll., 1987).

Les lipopeptides suspendus soit dans du PBS, dans PBS-alum ou reconstitués dans des liposomes sans alum n'engendrent pas de lésion autoimmune dans les reins, foie, poumons, glandes surrénales et pancréas, 18 mois après l'immunisation. Toutefois, une étude histologique a mis en évidence la présence de granulomes intra-péritonéaux due à l'alum (principalement au niveau du pancréas, de la rate et du foie) à la fois chez les souris immunisées par la préparation immunogène Lp1 et contrôle Lp2a. Bien que nous ne puissions pas expliquer complètement l'absence de lésions auto-immunes dans les tissus où la glycoprotéine P est exprimée en grande quantité, il ne faut pas oublier que dans les organes possédant des cellules sécrétrices, cette protéine est présente sur la face luminale des cellules ce qui doit réduire de manière significative l'accessibilité aux anticorps anti-glycoprotéine P circulants (W. T. Beck, 1991).

Des études visant à inhiber la glycoprotéine P ont montré que l'immunothérapie anticancéreuse passive, qui consiste en l'injection d'anticorps monoclonaux MRK16, à permis une meilleure incorporation des anticancéreux et une rémission rapide voire la guérison de certains animaux (M. Volm, 1998). Ainsi l'inhibition de l'activité de la glycoprotéine P pourrait améliorer le pronostic des patients cancéreux (T. Efferth et M. Volm, 1992).

*In vitro*, les auto-anticorps produits réduisent la résistance des cellules P388R à la chimiothérapie. Pour la doxorubicine, les concentrations d'IgG1 anti- mpp 1, 2 et 4 à un taux inférieur à 4 ng / ml donnent les mêmes résultats de réversion que le vérapamil 3  $\mu$ M. Dans des études cliniques, la concentration maximale de vérapamil dans le sérum n'excède pas 2.2  $\mu$ M (T. P. Miller et coll., 1991).

Pour la vinblastine, un effet révertant des anticorps induits est observé à la fois sur la cytotoxicité et le transport de vinblastine radiomarquée. Les expériences de cytotoxicité avec la Vinblastine (50  $\mu$ M) montrent que l'incubation des cellules avec 1,2 % de sérum de souris immunisées par Lp1 entraîne une inhibition de la résistance supérieure au vérapamil (3  $\mu$ M). Ces anticorps ont aussi une activité inhibitrice de l'efflux de vinblastine identique au vérapamil 3  $\mu$ M. Ces résultats démontrent bien que les auto-anticorps engendrés par la préparation vaccinale Lp1 chez les souris B6D2F1 sont spécifiques de la glycoprotéine P.

Cette spécificité est confirmée par les résultats obtenus en immunocytochimie puisque seules les cellules surexprimant la glycoprotéine P sont reconnues par les anticorps produits par les souris immunisées par la formule Lp1.

Nous avons réalisé une étude *ex vivo* montrant que les immuns sérums (1,2 %) de souris immunisées par la solution Lp1 potentialisent l'effet de la doxorubicine et/ou de la vinblastine sur les cellules L1210R, P388R et LM(tk-)R mais pas sur les cellules B16R, ceci malgré une surexpression du gène *mdr1* codant pour la glycoprotéine P. Cela suggère donc qu'en plus de la surexpression du gène *mdr1b*, les cellules B16R développeraient un autre mécanisme de résistance à préciser (topoisomérases, glutathion-S-transférases ...) (M. Volm, 1998).

Alors que certains auteurs (A. Pierre et coll., 1992) ont obtenu une augmentation de survie de 49% avec un dérivé triazinoaminopiperidine, le S9788 (6-[4 - [2, 2-di (4-fluorophényl)-éthylamino]-1-pipéridinyl]-N, N'-di-2-propényl-1, 3, 5-triazine-2, 4-diamine) (100 mg / kg / jour) nos expériences *in vivo* montrent quant à elles une augmentation de 77% de la survie des souris immunisées par la préparation vaccinale Lp1, ce qui est très encourageant.

Dans d'autres études, l'immunisation passive avec les anticorps monoclonaux MRK16 et UIC2 permet une meilleure incorporation des anticancéreux dans les cellules MDR (H. J. Broxterman et coll., 1988; A. H. Schinkel et coll., 1993a) et l'inhibition de l'activité P170 pourrait améliorer le pronostic des patients cancéreux (H. S. Chan et coll., 1997; T. Efferth et M. Volm, 1992; T. P. Miller et coll., 1991). Le concept d'induire des auto anticorps thérapeutiques par immunisation avec des lipopeptides synthétiques reconstitués dans des liposomes peut être étendu à d'autres protéines de surfaces telle que la MRP (S. P. Cole et coll., 1992) ou des antigènes associés aux tumeurs comme c-erbB-2 (J. Baselga et coll., 1996). En conclusion, nos résultats décrits ici nous font espérer que rompre la tolérance immunitaire contre des protéines du soi telles que MDR1,  $\beta$  amyloïde (C. Nicolau et coll., 2002) ou MRP pourrait conduire à des traitements efficaces contre les cancers chimiorésistants ou la maladie d'Alzheimer.

L'analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *mdr1*, *mdr2* et *mdr3* sur les organes congelés de souris immunisées par les préparations vaccinales Lp1 ou Lp2a montre un niveau d'expression d'ARNm différent suivant le type d'organe. Cette expression différentielle des gènes *mdr* au sein des différents organes a déjà été décrite (A. T. Fojo et coll., 1987). De plus, les auto-anticorps produits suite à l'immunisation des souris B6D2F1 avec la préparation Lp1

sont capables d'intervenir au niveau de la régulation transcriptionnelle puisqu'une baisse d'expression du gène *mdr1* au niveau des ovaires et du pancréas, du gène *mdr3* au niveau des glandes surrénales, des reins, des ovaires et du foie, du gène *mdr2* au niveau du foie, des ovaires, du pancréas et des reins est observée. Cette baisse pourrait être due à un maintien de la glycoprotéine P sur la face membranaire généré par les auto-anticorps induisant ainsi un rétrocontrôle négatif et l'inhibition de l'expression des gènes *mdr*.

#### V.2. Le resvératrol

Ces dernières années, les antioxydants naturellement présents dans l'alimentation tel que le resvératrol ont fait l'objet d'un grand nombre d'études pour leurs effets bénéfiques sur la santé comme agents chimiopréventifs des cancers (E. J. Park et J. M. Pezzuto, 2002). Dans la recherche de stratégies visant à surmonter la résistance multiple des cellules tumorales, nous avons testé l'activité du *trans*-resvératrol (resvératrol) sur les cellules tumorales leucémiques murines (L1210, P388) et fibroblastiques LM(tk-) sensibles et résistantes à la doxorubicine.

Nous avons tout d'abord étudié l'inhibition de la croissance cellulaire et la toxicité du resvératrol sur les différentes lignées cellulaires. Notre étude a démontré que le resvératrol est capable d'inhiber la prolifération de chacune des lignées cellulaires de manière dose et chrono-dépendant. L'inhibition de la croissance cellulaire induite par le resvératrol pourrait être due à des effets antiprolifératifs ou pro-apoptotiques. Selon des études le resvératrol est capable de déclencher le ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire et d'induire l'apoptose (Y. A. Kim et coll., 2003; Y. Schneider et coll., 2000), qui sont deux mécanismes par lesquels cette molécule peut exercer son activité antiproliférative.

Ici, nous avons montré l'induction nette de l'apoptose et l'inhibition simultanée de la prolifération cellulaire des cellules P388R et P388S incubées avec le resveratrol. Par contre, chez les cellules L1210R, le resveratrol induit une inhibition de la prolifération cellulaire plus élevée que la mort cellulaire programmée. Ceci a été démontré par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> suivie d'une accumulation des cellules L1210R dans la phase sub-G<sub>1</sub>. Enfin, dans les lignées cellulaires LM(tk-)R, LM(tk-)S et L1210S le resvératrol semble provoquer, au contraire, un ralentissement du cycle cellulaire sans pour autant entrainer un arrêt total. L'inhibition de la prolifération des lignées cellulaires LM(tk-)S corrobore les effets antiprolifératifs du resvératrol précédemment

rapportés envers d'autre lignées cellulaires tumorales tel que les cellules cancéreuses humaines du colon et de la prostate (Y. A. Kim et coll., 2003; Y. Schneider et coll., 2000).

De plus, plusieurs rapports ont montré que le resveratrol inhibe différentes lignées cellulaires à diverses étapes du cycle cellulaire par la régulation de protéines du cycle tel que les cyclines (N. Ahmad et coll., 2001; T. C. Hsieh et coll., 1999a; N. Kuwajerwala et coll., 2002; Y. C. Liang et coll., 2003).

Globalement, nos résultats ont prouvé que le resvératrol a un effet cytotoxique plus important sur les lignées cellulaires P388 que les lignées cellulaires L1210 et LM(tk-).

En plus de l'effet anti-tumoral direct du resvératrol sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses sensibles et résistantes à la doxorubicine, nous avons étudié son effet inhibiteur sur le phénotype MDR. Les lignées cellulaires de phénotype MDR dépendantes de la glycoprotéine P sont connues pour expulser activement les xénobiotiques et abaisser leur concentration intracellulaire. Il a également été démontré que la plupart des modulateurs MDR inhibent la fixation des agents anticancéreux induisant ainsi une baisse de l'efflux et une augmentation de la quantité de médicament dans les cellules de phénotype MDR (T. Tsuruo et coll., 1981). Toutefois, les modulateurs MDR s'accompagnent, aux concentrations nécessaires pour obtenir un effet reversant, d'une toxicité non négligeable sur le plan clinique (A. Figueredo et coll., 1990; J. M. Ford et coll., 1990; E. Solary et coll., 1992; D. L. Trump et coll., 1992).

Par conséquent, il a été suggéré que l'utilisation de composés diététiques à des concentrations non toxiques soient de meilleurs candidats à cet égard.

La capacité du resvératrol à réduire la chimiorésistance des cellules L1210, P388 et LM(tk-) résistantes à la doxorubicine a été examinée et a montré qu'un prétraitement de resvératrol durant 24 h provoque une augmentation de 20% de la cytotoxicité de la doxorubicine sur les lignées cellulaires leucémiques (L1210R, P388R) et pas plus de 10% sur les cellules fibroblastiques LM(tk-)R alors qu'une co-incubation de doxorubicine avec des concentrations non-toxiques de resvératrol n'a entrainé aucun changement envers la chimiorésistance (résultats non montrés). Ces données indiquent donc que le resvératrol n'a probablement pas une action directe contre la glycoprotéine P car une co-incubation de modulateurs MDR (inhibiteurs de la P-gp) tels que les bloqueurs de canaux calciques (vérapamil), les anticorps (MRK-16) avec des agents anticancéreux reversent la résistance cellulaire en altérant directement la fonction d'extrusion de la glycoprotéine P (T. Efferth et M. Volm, 1993; T. Tsuruo et coll., 1981).

Afin d'expliquer un effet indirect du resvératrol, nous avons recherché si le resvératrol diminuait l'expression de la glycoprotéine P. La réduction de l'expression de la glycoprotéine P, soit au niveau transcriptionnel ou au niveau protéique, a été suggéré être l'un des mécanismes pour certains modulateurs ou agents, particulièrement la quinine, à reverser le phénotype MDR (Y. P. Hu et coll., 1996). Lors de l'étude de l'expression des gènes mdr responsables du phénotype "multidrug-resistance" (mdr1 et mdr3) des cellules L1210R et P388R, aucune différence de l'expression de ces gènes n'a été observé dans la lignée cellulaire L1210R traitée avec 25 µM de resvératrol. A l'inverse, les résultats montrent que le traitement des cellules P388R avec 10 µM de resvératrol augmente le niveau d'expression d'ARNm mdr1 comparé au contrôle 0,1% éthanol. Cette augmentation pourrait être due à une "réponse au stress". Des études concernant la fonction de la glycoprotéine P ont suggéré que la glycoprotéine P était une protéine de "réponse au stress" puisque son activité peut être modulée par des facteurs environnementaux. Parmi ces stress nous retrouvons : le choc thermique, l'inflammation, les rayons UV, les hormones et particulièrement les agents anticancéreux (P. M. Chaudhary et I. B. Roninson, 1993). De plus, nous avons noté que le traitement des cellules L1210R et P388R avec de la doxorubicine induisait une augmentation de l'expression du gène *mdr1*. Il a été montré qu'une exposition à la doxorubicine ou à des analogues d'anthracyclines administrés à des concentrations sub-létales chez des lignées leucémiques humaines ainsi que leur dérivés MDR entraînait une augmentation de l'expression d'ARN messager (ARNm) MDR1 (X. F. Hu et coll., 1999). De façon intéressante, une pré-exposition de 24h au resvératrol réduit cette expression. Ces résultats indiquent qu'un prétraitement au resvératrol peut augmenter l'efficacité de la doxorubicine dans les cellules de phénotype MDR et que cette combinaison agit sur la régulation transcriptionnelle de l'expression du gène *mdr1*.

Par la suite, afin d'étudier l'effet du resvératrol envers la glycoprotéine P mdr1 murine, nous avons réalisé des western-blotting avec différents anticorps dirigés contre la glycoprotéine P MDR1 humaine (anticorps JSB1, Proteogenic, Oberhausbergen, France et anticorps H-241, Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) et la glycoprotéine P de hamster (anticorps 265/F4, interchim, Montlucon, France). Malheureusement, aucun résultat significatif n'a été obtenu même après avoir effectué une purification membranaire. De plus, l'anticorps C219 anti-MDR dirigé contre la glycoprotéine P humaine n'a pas été employé dans cette expérience parce qu'il cross-réagit avec la protéine c-erbB2 de 185 kDa (H. S. Chan et V. Ling, 1997; B. Liu et coll., 1997), qui correspond au poids moléculaire de la glycoprotéine P. En outre, nous avons observé qu'un prétraitement de resvératrol durant 24 h induit une

augmentation de l'accumulation intracellulaire de doxorubicine dans les cellules L1210R et P388R alors qu'une co-incubation des deux drogues n'induit aucun changement au niveau de l'accumulation de la doxorubicine. Ces résultats confirment que le resvératrol a un effet indirect sur la glycoprotéine P probablement *via* l'inhibition de l'expression du gène *mdr1*, en opposition au vérapamil qui agit comme un inhibiteur direct de la glycoprotéine P (résultats non montrés).

Il a été soutenu que la diminution de l'expression de MDR1 induite sélectivement est une cible thérapeutique plus attrayante que l'inhibition directe de la fonction d'efflux de la glycoprotéine P (S. Jin et coll., 2000).

#### V.3. Conclusions et perspectives

En conclusion, les résultats décrits ici montrent une spécificité et un rôle prophylactique de la préparation vaccinale Lp1 chez les souris B6D2F1. Toutefois, du fait de la forte homologie des séquences entre les isoformes I et II codant pour la glycoprotéine P nous souhaitons étudier l'affinité des anticorps induits à ces deux isoformes par la technique SPR (surface plasmon resonance).

Nous souhaitons également moduler la multidrogue résistance en développant une auto-immunisation thérapeutique curative dans le modèle murin par "vaccination" ou sérothérapie.

Etant donné la similitude de structure de la glycoprotéine P murine avec la glycoprotéine P humaine, nous envisageons de développer ce mode de vaccination à l'homme pour induire des anticorps anti-glycoprotéine P humaine à des fins thérapeutiques et ainsi apporter des solutions complémentaires aux traitements traditionnels pour lutter contre le mécanisme de résistance.

Le concept qui consiste à induire des auto-anticorps thérapeutiques par immunisation avec des lipopeptides synthétiques reconstitués dans des liposomes pourrait être étendu à d'autres protéines de surfaces telle que la MRP (S. P. Cole et coll., 1992) ou des antigènes associés aux tumeurs comme c-erbB-2 (J. Baselga et coll., 1996).

Dans une seconde approche nous avons pu montrer que l'utilisation d'un polyphénol, le resvératrol, sur des cellules tumorales de phénotype MDR est capable d'améliorer leur chimiosensibilité vis-à-vis de la doxorubicine. Toutefois, il serait bon d'étudier la voie de transduction par laquelle le resvératrol a été capable de réduire la chimiorésistance des cellules de phénotype MDR, par le biais d'analyses biochimiques (interaction protéine/protéine, microarray ...) *in vitro* plus poussées.

De plus, des expérimentations animales seraient requises pour déterminer si le resvératrol a le potentiel d'un chimiosensibilisant efficace et sûr pour traiter les cancers de phénotype MDR surexprimant la glycoprotéine P. Il a récemment été montré *in vitro* que le resvératrol est capable de décaler la balance Th1 / Th2 vers une réponse immunitaire de type Th2 (D. Rachon, G. Rimoldi, et W. Wuttke, 2006). C'est pourquoi, nous pourrions envisager d'immuniser des souris B6D2F1 avec la préparation vaccinale Lp1 ainsi que du resvératrol afin d'améliorer la réponse immunitaire.

Ces deux approches ouvrent donc de nouvelles voies complémentaires à la chimiothérapie.

## VI. Bíblíographie

#### **A** -

- Abraham, E. H., Prat, A. G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arceci, R. J., Kramer, R., Guidotti, G., et Cantiello, H. F. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1993) 90(1), 312-6.
- Aftab, D. T., Yang, J. M., et Hait, W. N. Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-glycoprotein) by protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 cells. *Oncol Res.* (1994) 6(2), 59-70.
- Ahmad, N., Adhami, V. M., Afaq, F., Feyes, D. K., et Mukhtar, H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res.* (2001) 7(5), 1466-73.
- Ambudkar, S. V., Lelong, I. H., Zhang, J., et Cardarelli, C. Purification and reconstitution of human P-glycoprotein. *Methods Enzymol.* (1998) 292(492-504.
- Azzaria, M., Schurr, E., et Gros, P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the mdr1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol.* (1989) 9(12), 5289-97.

#### -B -

- **Baggetto, L. G.** Biochemical, genetic, and metabolic adaptations of tumor cells that express the typical multidrug-resistance phenotype. Reversion by new therapies. *J Bioenerg Biomembr*. (1997) 29(4), 401-13.
- Baldrick, P., Richardson, D., Elliott, G., et Wheeler, A. W. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol.* (2002) 35(3), 398-413.
- Banerjee, S., Bueso-Ramos, C., et Aggarwal, B. B. Suppression of 7,12dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res.* (2002) 62(17), 4945-54.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C., et Norton, L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol. (1996) 14(3), 737-44.
- **Basu, A.** The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol Ther.* (1993) 59(3), 257-80.
- Bates, S. E., Lee, J. S., Dickstein, B., Spolyar, M., et Fojo, A. T. Differential modulation of P-glycoprotein transport by protein kinase inhibition. *Biochemistry*. (1993) 32(35), 9156-64.

- Beck, J., Niethammer, D., et Gekeler, V. High mdr1- and mrp-, but low topoisomerase II alpha-gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemias. *Cancer Lett.* (1994) 86(1), 135-42.
- Beck, W. T. Do anti-P-glycoprotein antibodies have a future in the circumvention of multidrug resistance? *J Natl Cancer Inst.* (1991) 83(19), 1364-6.
- Beck, W. T., Mueller, T. J., et Tanzer, L. R. Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* (1979) 39(6 Pt 1), 2070-6.
- Belguendouz, L., Fremont, L., et Linard, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochem Pharmacol.* (1997) 53(9), 1347-55.
- Bellamy, W. T. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* (1996) 36(161-83.
- Bernhard, D., Tinhofer, I., Tonko, M., Hubl, H., Ausserlechner, M. J., Greil, R., Kofler, R., et Csordas, A. Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell Death Differ*. (2000) 7(9), 834-42.
- Bertelli, A. A., Baccalini, R., Battaglia, E., Falchi, M., et Ferrero, M. E. Resveratrol inhibits TNF alpha-induced endothelial cell activation. *Therapie*. (2001) 56(5), 613-6.
- Bhat, K. P., et Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* (2002) 957(210-29.
- Bhuyan, B. K., Loughman, B. E., Fraser, T. J., et Day, K. J. Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res.* (1976) 97(2), 275-80.
- **Biedler, J. L., et Riehm, H**. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* (1970) 30(4), 1174-84.
- Biedler, J. L., Riehm, H., Peterson, R. H., et Spengler, B. A. Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of Chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst.* (1975) 55(3), 671-80.
- Bolin, J. T., Filman, D. J., Matthews, D. A., Hamlin, R. C., et Kraut, J. Crystal structures of Escherichia coli and Lactobacillus casei dihydrofolate reductase refined at 1.7 A resolution. I. General features and binding of methotrexate. J Biol Chem. (1982) 257(22), 13650-62.
- Bourgault, I., Chirat, F., Tartar, A., Levy, J. P., Guillet, J. G., et Venet, A. Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. Induction in rhesus macaques of GAG- or NEF-specific cytotoxic T lymphocytes by lipopeptides. J Immunol. (1994) 152(5), 2530-7.

- Brakenhielm, E., Cao, R., et Cao, Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *Faseb J*. (2001) 15(10), 1798-800.
- Broxterman, H. J., Kuiper, C. M., Schuurhuis, G. J., Tsuruo, T., Pinedo, H. M., et Lankelma, J. Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* (1988) 37(12), 2389-93.

#### -*C* -

- Chambers, T. C., McAvoy, E. M., Jacobs, J. W., et Eilon, G. Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *J Biol Chem.* (1990) 265(13), 7679-86.
- **Chan, H. S., et Ling, V.** Anti-P-glycoprotein antibody C219 cross-reactivity with c-erbB2 protein: diagnostic and clinical implications. *J Natl Cancer Inst.* (1997) 89(20), 1473-6.
- Chanvitayapongs, S., Draczynska-Lusiak, B., et Sun, A. Y. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport*. (1997) 8(6), 1499-502.
- Charcosset, J. Y. (1991). "Biologie des cancers." elippses ed.
- Chaudhary, P. M., et Roninson, I. B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*. (1991) 66(1), 85-94.
- Chaudhary, P. M., et Roninson, I. B. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst.* (1993) 85(8), 632-9.
- Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., et Roninson, I. B. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell.* (1986) 47(3), 381-9.
- Chen, C. J., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M., et Roninson, I. B. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem.* (1990) 265(1), 506-14.
- Choi, K., Frommel, T. O., Stern, R. K., Perez, C. F., Kriegler, M., Tsuruo, T., et Roninson, I. B. Multidrug resistance after retroviral transfer of the human MDR1 gene correlates with P-glycoprotein density in the plasma membrane and is not affected by cytotoxic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1991) 88(16), 7386-90.
- Clement, M. V., Hirpara, J. L., Chawdhury, S. H., et Pervaiz, S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood.* (1998) 92(3), 996-1002.

- Cohen, D., Yang, C. P., et Horwitz, S. B. The products of the mdr1a and mdr1b genes from multidrug resistant murine cells have similar degradation rates. *Life Sci.* (1990) 46(7), 489-95.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., et Deeley, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. (1992) 258(5088), 1650-4.
- Constant, J. Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Coron Artery Dis.* (1997) 8(10), 645-9.
- Cornwell, M. M., Tsuruo, T., Gottesman, M. M., et Pastan, I. ATP-binding properties of P glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. *Faseb J.* (1987) 1(1), 51-4.
- **Cox, J. C., et Coulter, A. R.** Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. (1997) 15(3), 248-56.
- Croop, J. M., Raymond, M., Haber, D., Devault, A., Arceci, R. J., Gros, P., et Housman,
  D. E. The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissuespecific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol.* (1989) 9(3), 1346-50.

#### -D -

- Dalton, W. S., et Salmon, S. E. Drug resistance in myeloma: mechanisms and approaches to circumvention. *Hematol Oncol Clin North Am.* (1992) 6(2), 383-93.
- Dano, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta*. (1973) 323(3), 466-83.
- **DEGOS L, C. C., ABITA JP et coll .** Une cellule maligne peut elle devenir normale ? *Med. Sci.* (1985) 1(42-46.
- **Deres, K., Schild, H., Wiesmuller, K. H., Jung, G., et Rammensee, H. G.** In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature*. (1989) 342(6249), 561-4.
- **Dorrie, J., Gerauer, H., Wachter, Y., et Zunino, S. J.** Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* (2001) 61(12), 4731-9.
- **Drachenberg, K. J., Wheeler, A. W., Stuebner, P., et Horak, F.** A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy.* (2001) 56(6), 498-505.

-*E*-

Edelman, R. Vaccine adjuvants. Rev Infect Dis. (1980) 2(3), 370-83.

- Efferth, T., et Volm, M. Antibody-directed therapy of multidrug-resistant tumor cells. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. (1992) 9(1), 11-9.
- Efferth, T., et Volm, M. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by monoclonal antibodies, immunotoxins or antisense oligodeoxynucleotides in kidney carcinoma and normal kidney cells. *Oncology*. (1993) 50(4), 303-8.
- Eijdems, E. W., Borst, P., Jongsma, A. P., de Jong, S., de Vries, E. G., van Groenigen, M., Versantvoort, C. H., Nieuwint, A. W., et Baas, F. Genetic transfer of non-Pglycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR) in somatic cell fusion: dissection of a compound MDR phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1992) 89(8), 3498-502.
- Endicott, J. A., Juranka, P. F., Sarangi, F., Gerlach, J. H., Deuchars, K. L., et Ling, V. Simultaneous expression of two P-glycoprotein genes in drug-sensitive Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.* (1987) 7(11), 4075-81.
- Endicott, J. A., et Ling, V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*. (1989) 58(137-71.
- Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H. M., Talpaz, M., et Aggarwal, B. B. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood.* (2003) 102(3), 987-95.

#### -F-

- Falchetti, R., Fuggetta, M. P., Lanzilli, G., Tricarico, M., et Ravagnan, G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci.* (2001) 70(1), 81-96.
- Ferrigni, N. R., McLaughlin, J. L., Powell, R. G., et Smith, C. R., Jr. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of Euphorbia lagascae. J Nat Prod. (1984) 47(2), 347-52.
- Figueredo, A., Arnold, A., Goodyear, M., Findlay, B., Neville, A., Normandeau, R., et Jones, A. Addition of verapamil and tamoxifen to the initial chemotherapy of small cell lung cancer. A phase I/II study. *Cancer*. (1990) 65(9), 1895-902.
- Fine, R. L., Patel, J., et Chabner, B. A. Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1988) 85(2), 582-6.
- FitzGerald, D. J., Willingham, M. C., Cardarelli, C. O., Hamada, H., Tsuruo, T., Gottesman, M. M., et Pastan, I. A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1987) 84(12), 4288-92.
- Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Fritz, J. M., Meijer, C. J., Scheper, R. J., et Zaman, G. J. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* (1994) 54(17), 4557-63.

- Fojo, A., Lebo, R., Shimizu, N., Chin, J. E., Roninson, I. B., Merlino, G. T., Gottesman, M. M., et Pastan, I. Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet*. (1986) 12(4), 415-20.
- Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., et Pastan, I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1987) 84(1), 265-9.
- Ford, J. M., Bruggemann, E. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., et Hait, W. N. Cellular and biochemical characterization of thioxanthenes for reversal of multidrug resistance in human and murine cell lines. *Cancer Res.* (1990) 50(6), 1748-56.
- Ford, J. M., et Hait, W. N. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev.* (1990) 42(3), 155-99.
- Fremont, L. Biological effects of resveratrol. Life Sci. (2000) 66(8), 663-73.
- Fries, L. F., Gordon, D. M., Richards, R. L., Egan, J. E., Hollingdale, M. R., Gross, M., Silverman, C., et Alving, C. R. Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1992) 89(1), 358-62.
- Frotschl, R., Chichmanov, L., Kleeberg, U., Hildebrandt, A. G., Roots, I., et Brockmoller, J. Prediction of aryl hydrocarbon receptor-mediated enzyme induction of drugs and chemicals by mRNA quantification. *Chem Res Toxicol.* (1998) 11(12), 1447-52.
- Fukuhara, K., et Miyata, N. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorg Med Chem Lett.* (1998) 8(22), 3187-92.
- Fulda, S., et Debatin, K. M. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene*. (2004) 23(40), 6702-11.
- Fulgenzi, A., Bertelli, A. A., Magni, E., Ferrero, E., et Ferrero, M. E. In vivo inhibition of TNFalpha-induced vascular permeability by resveratrol. *Transplant Proc.* (2001) 33(3), 2341-3.

#### -G-

- Garrigues, A., Escargueil, A. E., et Orlowski, S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci* USA. (2002) 99(16), 10347-52.
- Gerlach, J. H., Endicott, J. A., Juranka, P. F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K. L., et Ling, V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*. (1986) 324(6096), 485-9.

- Ghosh, R., Nadiminty, N., Fitzpatrick, J. E., Alworth, W. L., Slaga, T. J., et Kumar, A.
  P. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. *J Biol Chem.* (2005) 280(7), 5812-9.
- Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., et Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv*. (2004) 1(1), 27-42.
- Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schoenlein, P. V., Germann, U. A., et Pastan, I. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet*. (1995) 29(607-49.
- Gottesman, M. M., et Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* (1993) 62(385-427.
- **Gros, P., Croop, J., et Housman, D.** Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell.* (1986) 47(3), 371-80.
- Gros, P., Dhir, R., Croop, J., et Talbot, F. A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse mdr1 and mdr3 drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1991) 88(16), 7289-93.
- Gros, P., Raymond, M., Bell, J., et Housman, D. Cloning and characterization of a second member of the mouse mdr gene family. *Mol Cell Biol.* (1988) 8(7), 2770-8.
- Grunicke, H., et Hofmann, J. Cytotoxic and cytostatic effects of antitumor agents induced at the plasma membrane level. *Pharmacol Ther*. (1992) 55(1), 1-30.

#### -H-

- Haider, U. G., Sorescu, D., Griendling, K. K., Vollmar, A. M., et Dirsch, V. M. Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* (2003) 63(4), 925-32.
- Hardy, S. P., Goodfellow, H. R., Valverde, M. A., Gill, D. R., Sepulveda, V., et Higgins, C. F. Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance Pglycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *Embo J.* (1995) 14(1), 68-75.
- Hebell, T., Ahearn, J. M., et Fearon, D. T. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science*. (1991) 254(5028), 102-5.
- Higgins, C. F. P-glycoprotein. To flip or not to flip? Curr Biol. (1994) 4(3), 259-60.
- Higgins, C. F., Callaghan, R., Linton, K. J., Rosenberg, M. F., et Ford, R. C. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol.* (1997) 8(3), 135-42.
- Holmes-McNary, M., et Baldwin, A. S., Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res.* (2000) 60(13), 3477-83.

- Hsieh, T. C., Burfeind, P., Laud, K., Backer, J. M., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., et Wu, J. M. Cell cycle effects and control of gene expression by resveratrol in human breast carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Int J Oncol.* (1999a) 15(2), 245-52.
- Hsieh, T. C., Juan, G., Darzynkiewicz, Z., et Wu, J. M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.* (1999b) 59(11), 2596-601.
- Hu, X. F., Slater, A., Rischin, D., Kantharidis, P., Parkin, J. D., et Zalcberg, J. Induction of MDR1 gene expression by anthracycline analogues in a human drug resistant leukaemia cell line. *Br J Cancer*. (1999) 79(5-6), 831-7.
- Hu, Y. P., Pourquier, P., Doignon, F., Crouzet, M., et Robert, J. Effects of modulators of multidrug resistance on the expression of the MDR1 gene on human KB cells in culture. *Anticancer Drugs*. (1996) 7(7), 738-44.
- Huang, C., Ma, W. Y., Goranson, A., et Dong, Z. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis.* (1999) 20(2), 237-42.
- Huet, S., Marie, J. P., Gualde, N., et Robert, J. Reference method for detection of Pgp mediated multidrug resistance in human hematological malignancies: a method validated by the laboratories of the French Drug Resistance Network. *Cytometry*. (1998) 34(6), 248-56.

#### ~I ~

- Ichikawa, M., Yoshimura, A., Furukawa, T., Sumizawa, T., Nakazima, Y., et Akiyama,
   S. Glycosylation of P-glycoprotein in a multidrug-resistant KB cell line, and in the human tissues. *Biochim Biophys Acta*. (1991) 1073(2), 309-15.
- Ishikawa, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* (1992) 17(11), 463-8.
- Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Shoemaker, R. H., Rome, L. H., et Scheper, R. J. Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology*. (1996) 19(3), 191-7.

#### -J-

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., et Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* . (1997) 275(5297), 218-20.

- Jiang, X. R., Kelsey, S. M., Wu, Y. L., et Newland, A. C. Circumvention of P-glycoproteinmediated drug resistance in human leukaemic cells by non-immunosuppressive cyclosporin D analogue, SDZ PSC 833. *Br J Haematol.* (1995) 90(2), 375-83.
- Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., et Scotto, K. W. Ecteinascidin 743, a transcriptiontargeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2000) 97(12), 6775-9.
- Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D., et Weinstein, I. B. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* (2002) 8(3), 893-903.
- Jones, C. A., et Cunningham, A. L. Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease. *Herpes*. (2004) 11(1), 12-7.
- Jongsma, A. P., Spengler, B. A., Van der Bliek, A. M., Borst, P., et Biedler, J. L. Chromosomal localization of three genes coamplified in the multidrug-resistant CHRC5 Chinese hamster ovary cell line. *Cancer Res.* (1987) 47(11), 2875-8.

#### -K-

- Kajiji, S., Talbot, F., Grizzuti, K., Van Dyke-Phillips, V., Agresti, M., Safa, A. R., et Gros, P. Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site. *Biochemistry*. (1993) 32(16), 4185-94.
- **Karnofsky, D. A.** Nitrogen mustards in the treatment of neoplastic disease. *Adv Intern Med.* (1950) 4(1-75.
- Kim, Y. A., Rhee, S. H., Park, K. Y., et Choi, Y. H. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food*. (2003) 6(4), 273-80.
- Kimura, Y., Okuda, H., et Arichi, S. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta*. (1985) 834(2), 275-8.
- Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., et Herschman, H. R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. J Biol Chem. (1991) 266(20), 12866-72.
- Kuwajerwala, N., Cifuentes, E., Gautam, S., Menon, M., Barrack, E. R., et Reddy, G. P. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into s phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res.* (2002) 62(9), 2488-92.

#### -L-

Langcake, P., et Pryce, R. J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. (1977) 33(2), 151-2.

- Lee, C. H., Bradley, G., et Ling, V. Increased P-glycoprotein messenger RNA stability in rat liver tumors in vivo. *J Cell Physiol.* (1998) 177(1), 1-12.
- Lemieux, P., et Page, M. Sensitivity of multidrug-resistant MCF-7 cells to a transferrindoxorubicin conjugate. *Anticancer Res.* (1994) 14(2A), 397-403.
- Lepage, P., et Gros, P. La glycoprotéine-P : de la résistance croisée aux médicaments au transport des lipides biliaires. *Médecine/sciences*. (1995) 11(357-366.
- Li, Y. T., Shen, F., Liu, B. H., et Cheng, G. F. Resveratrol inhibits matrix metalloproteinase-9 transcription in U937 cells. *Acta Pharmacol Sin.* (2003) 24(11), 1167-71.
- Liang, Y. C., Tsai, S. H., Chen, L., Lin-Shiau, S. Y., et Lin, J. K. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol.* (2003) 65(7), 1053-60.
- Lindblad, E. B. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* (2004) 82(5), 497-505.
- Liu, B., Sun, D., Xia, W., Hung, M. C., et Yu, D. Cross-reactivity of C219 anti-p170(mdr-1) antibody with p185(c-erbB2) in breast cancer cells: cautions on evaluating p170(mdr-1). *J Natl Cancer Inst.* (1997) 89(20), 1524-9.
- Loo, T. W., et Clarke, D. M. Functional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem.* (1993) 268(27), 19965-72.
- Loo, T. W., et Clarke, D. M. Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J Biol Chem.* (1994) 269(10), 7750-5.
- Loo, T. W., et Clarke, D. M. P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones. *J Biol Chem.* (1995a) 270(37), 21839-44.
- Loo, T. W., et Clarke, D. M. Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities. *J Biol Chem.* (1995b) 270(37), 21449-52.
- Losa, G. A. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest.* (2003) 33(9), 818-23.
- Lum, B. L., Gosland, M. P., Kaubisch, S., et Sikic, B. I. Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy*. (1993) 13(2), 88-109.

#### -M-

Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., et Aggarwal, B. B. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and

apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. J Immunol. (2000) 164(12), 6509-19.

- Marier, J. F., Chen, K., Prince, P., Scott, G., del Castillo, J. R., et Vachon, P. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can J Vet Res.* (2005) 69(2), 151-4.
- Martinsson, T., et Levan, G. Localization of the multidrug resistance-associated 170 kDa Pglycoprotein gene to mouse chromosome 5 and to homogeneously staining regions in multidrug-resistant mouse cells by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. (1987) 45(2), 99-101.
- Merrifield, B. Solid phase synthesis. *Science*. (1986) 232(4748), 341-7.
- Mickisch, G. H., Rahman, A., Pastan, I., et Gottesman, M. M. Increased effectiveness of liposome-encapsulated doxorubicin in multidrug-resistant-transgenic mice compared with free doxorubicin. *J Natl Cancer Inst.* (1992) 84(10), 804-5.
- Miller, T. P., Grogan, T. M., Dalton, W. S., Spier, C. M., Scheper, R. J., et Salmon, S. E. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol*. (1991) 9(1), 17-24.
- Mistry, P., Stewart, A. J., Dangerfield, W., Okiji, S., Liddle, C., Bootle, D., Plumb, J. A., Templeton, D., et Charlton, P. In vitro and in vivo reversal of P-glycoproteinmediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* (2001) 61(2), 749-58.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., et Yamori, Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (1998) 253(3), 859-63.
- Moingeon, P., Haensler, J., et Lindberg, A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine*. (2001) 19(31), 4363-72.
- Molinari, A., Cianfriglia, M., Meschini, S., Calcabrini, A., et Arancia, G. P-glycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells. *Int J Cancer*. (1994) 59(6), 789-95.
- Mourez M, J. M., Hofnung M, Dassa E. Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *médecine/sciences*. (2000) 16(386-394.
- Murray, G. I., Taylor, M. C., McFadyen, M. C., McKay, J. A., Greenlee, W. F., Burke, M. D., et Melvin, W. T. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* (1997) 57(14), 3026-31.

- Ng, W. F., Sarangi, F., Zastawny, R. L., Veinot-Drebot, L., et Ling, V. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol Cell Biol.* (1989) 9(3), 1224-32.
- Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., et Hopkins, R. J. A liposomebased therapeutic vaccine against beta -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002). 99(4), 2332-7.

#### -0-

- Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., et Kohno, K. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem.* (1998) 273(11), 5997-6000.
- Okochi, E., Iwahashi, T., et Tsuruo, T. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. *Leukemia*. (1997) 11(7), 1119-23.
- Orgogozo, J. M., Gilman, S., Dartigues, J. F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L. C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B. F., Boada, M., Frank, A., et Hock, C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. (2003) 61(1), 46-54.
- Orr, G. A., Han, E. K., Browne, P. C., Nieves, E., O'Connor, B. M., Yang, C. P., et Horwitz, S. B. Identification of the major phosphorylation domain of murine mdr1b P-glycoprotein. Analysis of the protein kinase A and protein kinase C phosphorylation sites. *J Biol Chem.* (1993) 268(33), 25054-62.

#### -P-

- Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G., et Goldberg, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. (1995) 235(2), 207-19.
- Park, E. J., et Pezzuto, J. M. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* (2002) 21(3-4), 231-55.
- Pawlak-Roblin, C., Tosi, P. F., Perrin, L., Devy, J., Venteo, L., Albert, P., Nicolau, C., et Madoulet, C. Inhibition of multidrug resistance by immunisation with synthetic Pglycoprotein-derived peptides. *Eur J Cancer*. (2004) 40(4), 606-13.
- **Pendurthi, U. R., Williams, J. T., et Rao, L. V.** Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1999) 19(2), 419-26.
- **Pervaiz, S.** Resveratrol--from the bottle to the bedside? *Leuk Lymphoma*. (2001) 40(5-6), 491-8.

- Pierre, A., Dunn, T. A., Kraus-Berthier, L., Leonce, S., Saint-Dizier, D., Regnier, G., Dhainaut, A., Berlion, M., Bizzari, J. P., et Atassi, G. In vitro and in vivo circumvention of multidrug resistance by Servier 9788, a novel triazinoaminopiperidine derivative. *Invest New Drugs.* (1992) 10(3), 137-48.
- **Piver, B., Berthou, F., Dreano, Y., et Lucas, D.** Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol Lett.* (2001) 125(1-3), 83-91.
- Potter, G. A., Patterson, L. H., Wanogho, E., Perry, P. J., Butler, P. C., Ijaz, T., Ruparelia, K. C., Lamb, J. H., Farmer, P. B., Stanley, L. A., et Burke, M. D. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br J Cancer*. (2002) 86(5), 774-8.

#### -R -

- Rachon, D., Rimoldi, G., et Wuttke, W. In vitro effects of genistein and resveratrol on the production of interferon-gamma (IFNgamma) and interleukin-10 (IL-10) by stimulated murine splenocytes. *Phytomedicine*. (2006) 13(6), 419-24.
- Raymond, M., et Gros, P. Mammalian multidrug-resistance gene: correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1989) 86(17), 6488-92.
- Richards, R. L., Hayre, M. D., Hockmeyer, W. T., et Alving, C. R. Liposomes, lipid A, and aluminum hydroxide enhance the immune response to a synthetic malaria sporozoite antigen. *Infect Immun.* (1988) 56(3), 682-6.
- Rittmann-Grauer, L. S., Yong, M. A., Sanders, V., et Mackensen, D. G. Reversal of Vinca alkaloid resistance by anti-P-glycoprotein monoclonal antibody HYB-241 in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* (1992) 52(7), 1810-6.
- Rizza, P., Ferrantini, M., Capone, I., et Belardelli, F. Cytokines as natural adjuvants for vaccines: where are we now? *Trends Immunol.* (2002) 23(8), 381-3.
- Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, E. L., Yang, C. H., Litman, T., Bates, S. E., et Schneider, E. 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), 42-6.
- **Roepe, P. D.** Analysis of the steady-state and initial rate of doxorubicin efflux from a series of multidrug-resistant cells expressing different levels of P-glycoprotein. *Biochemistry.* (1992) 31(50), 12555-64.
- **Roepe, P. D.** Indirect mechanism of drug transport by P-glycoprotein. *Trends Pharmacol Sci.* (1994) 15(12), 445-6.
- Rome, L., Kedersha, N., et Chugani, D. Unlocking vaults: organelles in search of a function. *Trends Cell Biol.* (1991) 1(2-3), 47-50.

- Romsicki, Y., et Sharom, F. J. The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoproteinmodulation by interaction with defined phospholipids. *Eur J Biochem.* (1998) 256(1), 170-8.
- Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Ford, R. C., et Higgins, C. F. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem.* (1997) 272(16), 10685-94.
- **Ross, D. D**. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia*. (2000) 14(3), 467-73.
- Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., et Doyle, L. A. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. J Natl Cancer Inst. (1999) 91(5), 429-33.
- Rubin, E. H., de Alwis, D. P., Pouliquen, I., Green, L., Marder, P., Lin, Y., Musanti, R., Grospe, S. L., Smith, S. L., Toppmeyer, D. L., Much, J., Kane, M., Chaudhary, A., Jordan, C., Burgess, M., et Slapak, C. A. A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* (2002) 8(12), 3710-7.
- Ruetz, S., et Gros, P. A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet? *Trends Pharmacol Sci.* (1994) 15(7), 260-3.

#### -S -

- Safa, A. R. Photoaffinity labeling of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *Cancer Invest.* (1993) 11(1), 46-56.
- Sarkadi, B., Price, E. M., Boucher, R. C., Germann, U. A., et Scarborough, G. A. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem.* (1992) 267(7), 4854-8.
- Saurin, W., Hofnung, M., et Dassa, E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol.* (1999) 48(1), 22-41.
- Scheffer, G. L., Wijngaard, P. L., Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Slovak, M. L., Pinedo, H. M., Meijer, C. J., Clevers, H. C., et Scheper, R. J. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med.* (1995) 1(6), 578-82.
- Schiengold, M., Schwantes, L., Schwartsmann, G., Chies, J. A., et Nardi, N. B. Multidrug resistance gene expression during the murine ontogeny. *Mech Ageing Dev.* (2001) 122(3), 255-70.
- Schinkel, A. H., Kemp, S., Dolle, M., Rudenko, G., et Wagenaar, E. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem.* (1993) 268(10), 7474-81.

- Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N., et Raul, F. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett.* (2000) 158(1), 85-91.
- Schnolzer, M., et Kent, S. B. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science*. (1992) 256(5054), 221-5.
- Schubert, R., Fischer, R., Hain, R., Schreier, P. H., Bahnweg, G., Ernst, D., et Sandermann, H., Jr. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol Biol.* (1997) 34(3), 417-26.
- Silverman, J. A., Raunio, H., Gant, T. W., et Thorgeirsson, S. S. Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance (mdr) gene family. *Gene*. (1991) 106(2), 229-36.
- Simon, S. M., et Schindler, M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1994) 91(9), 3497-504.
- Smith, W. L., Garavito, R. M., et DeWitt, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* (1996) 271(52), 33157-60.
- Solary, E., Caillot, D., Chauffert, B., Casasnovas, R. O., Dumas, M., Maynadie, M., et Guy, H. Feasibility of using quinne, a potential multidrug resistance-reversing agent, in combination with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemia. *J Clin Oncol.* (1992) 10(11), 1730-6.
- Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U. M., Albini, A., Prosperi, E., et Vannini, V. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem.* (2001) 276(25), 22586-94.
- Stoute, J. A., Kester, K. E., Krzych, U., Wellde, B. T., Hall, T., White, K., Glenn, G., Ockenhouse, C. F., Garcon, N., Schwenk, R., Lanar, D. E., Sun, P., Momin, P., Wirtz, R. A., Golenda, C., Slaoui, M., Wortmann, G., Holland, C., Dowler, M., Cohen, J., et Ballou, W. R. Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. J Infect Dis. (1998) 178(4), 1139-44.
- Sun, A. Y., Simonyi, A., et Sun, G. Y. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med.* (2002) 32(4), 314-8.
- Szaefer, H., Cichocki, M., Brauze, D., et Baer-Dubowska, W. Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. *Nutr Cancer*. (2004) 48(1), 70-7.

#### -*T*-

Tadolini, B., Juliano, C., Piu, L., Franconi, F., et Cabrini, L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* (2000) 33(1), 105-14.

- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., et Willingham, M.
  C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1987) 84(21), 7735-8.
- Thottassery, J. V., Zambetti, G. P., Arimori, K., Schuetz, E. G., et Schuetz, J. D. p53dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1997) 94(20), 11037-42.
- Tosi, P. F., Radu, D., et Nicolau, C. Immune response against the murine mdri protein induced by vaccination with synthetic lipopeptides in liposomes. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995) 212(2), 494-500.
- **Trela B, W. A**. Resveratrol isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem.* (1996) 44(1253-1257.
- Trump, D. L., Smith, D. C., Ellis, P. G., Rogers, M. P., Schold, S. C., Winer, E. P., Panella, T. J., Jordan, V. C., et Fine, R. L. High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent: phase I trial in combination with vinblastine. J Natl Cancer Inst. (1992) 84(23), 1811-6.
- **Tsuruo, T., Hamada, H., Sato, S., et Heike, Y.** Inhibition of multidrug-resistant human tumor growth in athymic mice by anti-P-glycoprotein monoclonal antibodies. *Jpn J Cancer Res.* (1989) 80(7), 627-31.
- **Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., et 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), 1967-72.

#### -V-

- Vermout S, D. M., Losson B, Mignon B. Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann. Med. Vet.* (2003) 147(393-401.
- Volm, M. Multidrug resistance and its reversal. Anticancer Res. (1998) 18(4C), 2905-17.
- Volm, M., Kastel, M., Mattern, J., et Efferth, T. Expression of resistance factors (Pglycoprotein, glutathione S-transferase-pi, and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas. *Cancer*. (1993) 71(12), 3981-7.

#### -W-

- Wadsworth, T. L., et Koop, D. R. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.* (1999) 57(8), 941-9.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., et Gay, N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-

requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J.* (1982) 1(8), 945-51.

- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., et Forstermann,
   U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. (2002) 106(13), 1652-8.
- Watanabe, T., Tsuge, H., Oh-Hara, T., Naito, M., et Tsuruo, T. Comparative study on reversal efficacy of SDZ PSC 833, cyclosporin A and verapamil on multidrug resistance in vitro and in vivo. *Acta Oncol.* (1995) 34(2), 235-41.
- Watari, E., Dietzschold, B., Szokan, G., et Heber-Katz, E. A synthetic peptide induces long-term protection from lethal infection with herpes simplex virus 2. *J Exp Med.* (1987) 165(2), 459-70.
- Wei, L. Y., et Roepe, P. D. Low external pH and osmotic shock increase the expression of human MDR protein. *Biochemistry*. (1994) 33(23), 7229-38.
- Willingham, M. C., Richert, N. D., Cornwell, M. M., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., et Pastan, I. H. Immunocytochemical localization of P170 at the plasma membrane of multidrug-resistant human cells. *J Histochem Cytochem*. (1987) 35(12), 1451-6.
- Woo, J. H., Lim, J. H., Kim, Y. H., Suh, S. I., Min do, S., Chang, J. S., Lee, Y. H., Park, J. W., et Kwon, T. K. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene*. (2004) 23(10), 1845-53.

#### -Y-

Yu, C., Shin, Y. G., Kosmeder, J. W., Pezzuto, J. M., et van Breemen, R. B. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of inhibition of human cytochrome P450 isozymes by resveratrol and resveratrol-3-sulfate. *Rapid Commun Mass Spectrom.* (2003) 17(4), 307-13.

#### -Z-

Zimniak, P., Awasthi, S., et Awasthi, Y. C. Phase III detoxification system. *Trends Biochem Sci.* (1993) 18(5), 164-6.

## VII. ANNEXES

Elsevier Editorial System(tm) for Biochemical Pharmacology

Manuscript Draft

Manuscript Number: BCP-D-07-00033

Title: Resveratrol induced-cell growth inhibition and modulation of multidrug resistance in mouse leukemia cell lines resistant to doxorubicin

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Antibiotics and Chemotherapeutics

Keywords: Trans-resveratrol; P-glycoprotein; MDR; Multidrug resistance

Corresponding Author: DR Michel TARPIN, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Reims

First Author: Laura PERRIN

Order of Authors: Laura PERRIN; Marie-Pierre COURAGEOT, PhD; Stéphanie SALESSE, PhD; Christelle OUDOT-DELACOUX, PhD; Philippe ALBERT, PhD; Claudie MADOULET, PhD; Michel TARPIN, PhD

Manuscript Region of Origin: Europe

Abstract: Resveratrol, a nonflavonoid polyphenol found in grapes and other food products, has been shown to have anticancer effects on various cancer cells. In this study, the in vitro antitumoral activity of resveratrol was examined on murine leukemia cell lines resistant to doxorubicin L1210R and P388R. Resveratrol treatment of these cell lines inhibited the cell growth in a doseand time-dependant manner. In P388R, the growth inhibition was associated with extensive cell death and an increase of cells in subGl phase whereas, in L1210R cells, the treatment resulted in G0/Gl phase arrest and apoptosis. Furthermore, resveratrol pretreatment during 24 hours enhanced sensitivities of L1210R and P388R cell lines to doxorubicin by increasing its intracellular accumulation. A decrease of mdr1 gene over expression induced by doxorubicin treatment in L1210R and P388R cells was observed. These data suggest that resveratrol might have effectiveness as either a therapeutic or chemopreventive agent against leukemia and have potentiality to reverse multidrug resistance in cancer chemotherapy. Title: Resveratrol induced-cell growth inhibition and modulation of multidrug resistance in mouse leukemia cell lines resistant to doxorubicin.

Laura Perrin<sup>a</sup>, Marie-Pierre Courageot<sup>a</sup>, Stéphanie Salesse<sup>a</sup>, Christelle Oudot-Delacoux<sup>a</sup>, Philippe Albert<sup>a</sup>, Claudie Madoulet<sup>b</sup>, Michel Tarpin<sup>a,\*</sup>

a : Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire EA 3796, UFR Sciences, IFR 53 Biomolécules, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

b : Laboratoire de Biochimie EA 3796, UFR de Pharmacie, IFR 53 Biomolécules, 3, avenue du Maréchal Juin, 51096 Reims Cedex, France

Classification: Antibiotics and Chemotherapeutics

**Abbreviations:** MDR, multidrug resistance; P-gp, P-glycoprotein; PKC, protein kinase C; DOX, doxorubicin; PI, propidium iodide; resveratrol, *trans*-resveratrol; MTT, 3-(4.5-dimethylthazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; DMSO, dimethyl sulfoxide; PBS, phosphate buffered saline.

Key words: Trans-resveratrol, P-glycoprotein, MDR, Multidrug resistance.

Corresponding author: \*Tarpin Michel, e mail: <u>michel.tarpin@univ-reims.fr</u>, Tel: (33) 03 26 91 34 08, Fax: (33) 03 26 91 32 82, IFR53, UFR Sciences, Moulin de la Housse 51096 Reims Cedex, France
#### Abstract:

Resveratrol, a nonflavonoid polyphenol found in grapes and other food products, has been shown to have anticancer effects on various cancer cells. In this study, the *in vitro* antitumoral activity of resveratrol was examined on murine leukemia cell lines resistant to doxorubicin L1210R and P388R. Resveratrol treatment of these cell lines inhibited the cell growth in a dose- and time-dependant manner. In P388R, the growth inhibition was associated with extensive cell death and an increase of cells in subG1 phase whereas, in L1210R cells, the treatment resulted in G0/G1 phase arrest and apoptosis. Furthermore, resveratrol pretreatment during 24 hours enhanced sensitivities of L1210R and P388R cell lines to doxorubicin by increasing its intracellular accumulation. A decrease of *mdr1* gene over expression induced by doxorubicin treatment in L1210R and P388R cells was observed. These data suggest that resveratrol might have effectiveness as either a therapeutic or chemopreventive agent against leukemia and have potentiality to reverse multidrug resistance in cancer chemotherapy.

#### 1. Introduction

In search for new antitumoral agents, many plant extracts have been investigated, so stilbene-based compound are in development due to their wide ranging biological activities. One of the most relevant and extensively studied stilbenes is *trans*-resveratrol (*trans*-3, 4', 5-trihydroxystilbene, Fig. 1), a phytoalexin presents in grapes and other foods, which has many biological and pharmaceutical properties, especially as a cancer chemopreventive agent [1-4]. Indeed, several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that resveratrol inhibits cellular events associated with cancer initiation, promotion, and progression [5, 6].

Jang et al. [7] showed the antitumor potential of *trans*-resveratrol and many studies described resveratrol intracellular targets whose modulation give rise to overlapping responses that lead to growth arrest, death and chemotherapy responsiveness.

Multidrug resistance (MDR) is a resistance of tumors to chemically unrelated anticancer drugs. Although multiple mechanisms mediates MDR, the first mediator of multidrug resistance to be characterized at the molecular level was P-glycoprotein (P-gp) [8, 9]. P-gp is encoded by a small family of closely related genes *pgp* or *mdr* which often become amplified in highly drug-resistant cell lines [10-12]. The *mdr/pgp* gene family is composed of three members in rodents and two members in humans [13]. The protein acts as an energy-dependent extrusion pump that efficiently transports cationic and lipophilic chemotherapeutic agents as well as some toxins outside the tumor cells. P-gp mediates resistance to various classes of chemotherapeutic agents including vinblastine, vincristine, daunorubicin, doxorubicin, colchicine, paclitaxel, and etoposide. Thereby, it causes a concomitant decrease in accumulation and retention of these agents. Thus, P-gp plays a very important role in MDR and the overexpression of the efflux protein has been associated with the clinical MDR phenotype and poor prognosis for many human cancers [14, 15]. Reversion

of MDR by agents, including calcium channel blockers, calmodulin antagonists, cyclosporins, quinolines and their analogs have been found to be potent P-gp inhibitors in MDR cancer cells. However, the clinical results have been disappointing, due to the toxicities of these modulators and resulting from the pharmacokinetic interactions between the modulators and cytotoxic drugs [16]. Therefore, search of new compounds with low toxicity and high efficacy in modulation of MDR is one of the most active fields in cancer research.

Resveratrol, like other polyphenols, is able to overcome drug resistance of tumors that express multidrug resistance-associated proteins (MRP) [17, 18] and P-glycoprotein [19].

In the present study, we investigated the chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol on the sensitivity of L1210R and P388R to doxorubicin. Our findings indicated that treatment with resveratrol led to growth inhibition in a dose and time dependent manner, to antiproliferative activity and to induction of apoptosis. Moreover, resveratrol pretreatment enhances accumulation of doxorubicin within the tumor cell lines as well as a decreased *mdr1* gene expression level.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Cell lines

The murine leukemia L1210R and the lymphoid neoplasm P388R cells (obtained respectively from Dr J.C. Jardillier, Institut Jean Godinot, Reims France and G. Atassi, Laboratoire Servier, Courbevoie, France) were grown in RPMI 1640 (GIBCO<sup>TM</sup>, Cergy Pontoise; France) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco<sup>TM</sup>) and maintained under humidified atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C.

#### 2.2. Proliferation Assay

The resveratrol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier; France) effect on cell proliferation was assessed using a cell proliferation assay by MTT (3-(4.5-dimethylthazol-2yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)) (Sigma-Aldrich) as previously described [20]. Resveratrol stock solutions were dissolved in ethanol. Untreated control cells were given the corresponding ethanol amounts as used for the highest ethanol concentration (0.1 %). Briefly,  $8.10^3$  cells were seeded for 24 h and 48 h into 96-well microplates in 200 µl growth medium containing resveratrol concentrations (0, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 µM). After incubation at 37 °C, 20 µl of MTT (2.5 mg/ml) was added to each well, plates were incubated for 3 h at 37 °C, media were removed and 200 µl DMSO were added to dissolve the formazan. Optical density was measured using on a flow multiscann-MC-Plate reader (Bio-rad; Marnes-la-Coquette, France) at 550 nm and 650 nm. Results were expressed as percentage of growth, with 100 % representing control cells treated with 0.1 % ethanol alone.

#### 2.3. Trypan blue Exclusion assay

Viable cell ratio was determined using the dye exclusion assay.  $25 \times 10^3$  cells/ml were plated into 24-well plates with growth medium containing resveratrol (0, 5, 10, 25, 50, 100 and 200  $\mu$ M). After incubation for 24 h and 48 h, cells counting were performed with trypan blue.

#### 2.4. Apoptotic Staining Assay

Apoptotic or necrotic cell death was characterized using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) and propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich). After 24 hours treatment with resveratrol (0 to 200  $\mu$ M), cells were stained with 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 and 50  $\mu$ g/ml PI in the dark for 15 min. After PBS washes, about 200 randomly selected cells were counted for each sample. Viable cells were identified by the intact nuclei with blue fluorescence (Hoechst 33342), necrotic cells by the intact nuclei with yellow-red fluorescence (Hoechst 33342 + PI), and apoptotic cells by the fragmented nuclei, exhibiting either a blue (Hoechst 33342; early apoptosis) or yellow-red fluorescence (Hoechst 33342 + PI; late apoptosis).

#### 2.5. DNA fragmentation analysis

After 24 h treatment with 0 to 200  $\mu$ M of resveratrol, 3 x 10<sup>6</sup> cells were collected, washed and resuspended in cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml proteinase K) for 10 min on ice followed by 60 min at room temperature and spinned at 13,000 x g for 30 min at 4 °C. The supernatant containing fragmented DNA was collected, precipitated overnight at -20 °C in cold absolute ethanol with 0.3 M sodium acetate. The pellet was collected after centrifugation at 13,000 x g for 30 min at 4 °C, washed with 70 % ethanol, air dried, resuspended in water and incubated for 30 min at

37 °C with 50  $\mu$ g/ml RNase-DNase free. Samples were separated on 1.8 % agarose gel in Tris-acetate (0.04 M tris-acetate, 0.001 M EDTA) electrophoresis buffer, stained with 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide and DNA observed under UV light.

#### 2.6. Cell cycle analysis

Cells were treated with resveratrol (0-200  $\mu$ M) for 24 h. 1.10<sup>6</sup> cells were washed with PBS and suspended in 1 ml Krishan buffer [21] with ± 46  $\mu$ g/ml propidium iodide (PI) and 10  $\mu$ g/ml RNase DNase free and then incubated for 30 min at room temperature in the dark. Flow cytometry was performed using FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Fluorochrome excitation was performed by blue laser at 488 nm and fluorescence emission was analyzed with the 585 nm filter.

#### 2.7. Measurement of doxorubicin cytotoxicity

 $8.10^{-3}$  cells were seeded in 96-well plates for 24 h without resveratrol or with 25  $\mu$ M for L1210R and 10  $\mu$ M for P388R cells. After the incubation, resveratrol was removed and various concentrations of doxorubicin (DOX) were added for 24 h (40  $\mu$ M or 80  $\mu$ M in L1210R cells and 5  $\mu$ M or 10  $\mu$ M in P388R cells). Cell proliferation was estimated by MTT as previously described.

#### 2.8. RT-PCR assay

Total RNA was isolated using the QIAGEN RNeasy<sup>®</sup> Kit procedure (QIAGEN; Courtaboeuf, France), mRNA was transcribed for 50 min at 45 °C using random octamers (Q.BIOgene; Illkirch, France) and Superscriptt II RT (Invitrogen; Cergy Pontoise, France). The reaction was performed in a thermal cycler (Eppendorf; Le Pecq, France). Sequencespecific primers were designed (Table 1) [22] and to prevent non-specific amplification, primer concentration optimization was performed and verified by gel analysis. The amplification was performed with 30 cycles of three-step PCR (30 s at 95 °C and 45 s at 63 °C or 50 °C mdr1, mdr3 and rRNA respectively and 1 min at 72 °C) after initial denaturation (94 °C for 2 min). Amplification of rRNA mRNA as an endogenous control was used to standardize the amount of sample added to the reactions.

#### 2.9. Flow cytometric analysis of doxorubicin

Intracellular accumulation of doxorubicin was determined by the following procedure. L1210R and P388R cells were seeded at  $25 \times 10^3$  cells/ml with or without  $25 \mu$ M or  $10 \mu$ M of resveratrol for 24 h. Cells were washed with phosphate buffer saline and seeded with 40  $\mu$ M or 80  $\mu$ M doxorubicin for L1210R cells, and 5  $\mu$ M or 10  $\mu$ M for P388R cells, this during 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>. Cells were washed and doxorubicin accumulation was quantified by flow cytometric analysis. Fluorochrome excitation was performed by blue laser at 488 nm and doxorubicin fluorescence emission was analyzed with the 530 nm filter.

#### 2.10. Statistical analysis

The results were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The statistical significance was estimated using a student's paired *t*-test. *P* values < 0.05 were taken as statistically significant.

#### 3. Results

#### 3.1. Resveratrol decreases cell growth and viability of leukemia cell lines

We investigated resveratrol effects on cell growth in murine leukemia cell lines of MDR phenotype, resistant to doxorubicin. L1210R and P388R cells were exposed to various

concentrations of resveratrol (0-200  $\mu$ M) for 24 h and 48 h. At 24 h, resveratrol IC50 (50% inhibitory concentration) in L1210R and P388R cells were 41.33  $\mu$ M  $\pm$  1.52 and 45.67  $\mu$ M  $\pm$  0.72 respectively using MTT assay and reached 25  $\mu$ M  $\pm$  0.94 and 18.33  $\mu$ M  $\pm$  1.52 after 48 h incubation (Fig. 2). In addition, the inhibition of cell growth by resveratrol was dose and time dependent as compared with the 0.1% ethanol treated control.

Cell death was also evaluated by trypan blue exclusion method (Fig. 3). 5 % of dead L1210R cells were observed at 24 h and 48 h with the MTT IC50 values (41.33  $\mu$ M and 25  $\mu$ M of resveratrol respectively). These results suggest that the inhibitory effect of resveratrol on L1210R cell growth is mostly due to an antiproliferative phenomenon. By contrast, at MTT IC50 values in P388R cells at 24 h and 48 h (respectively 45.67  $\mu$ M and 18.33  $\mu$ M of resveratrol), around 50% of cell death was reached, suggesting a cytotoxic effect of resveratrol.

Thus, resveratrol growth inhibitory effect seems to be due mostly to an antiproliferative effect in L1210R cells and to a cytotoxic effect in P388R cells.

#### 3.2. Resveratrol induces apoptosis in leukemia cell lines

To study resveratrol effects, we investigated apoptosis induction in L1210R and P388R cells.

Both cell lines were incubated 24 h with increased doses of resveratrol (0-200  $\mu$ M), and apoptotic and necrotic cells percentages were evaluated by microscopic observations with Hoechst and propidium iodide double staining (Fig. 4). In L1210R cells, the highest apoptotic cells percentage reached 25.92 % ± 7.45 after treatment with 100  $\mu$ M resveratrol and necrotic cells percentage reached 17.97 % ± 0.84 with 200  $\mu$ M resveratrol (Fig. 4A). In P388R cells, apoptotic cells percentage increased from 0.6 % ± 0.49 to 75.23 % ± 2.39 according to

resveratrol concentrations used (5 to 200  $\mu$ M). Moreover, necrotic cells percentage did not change after treatment with resveratrol whatever the concentrations (Fig. 4B).

To confirm resveratrol-induced apoptotic cell death, DNA fragmentation was analyzed in L1210R and P388R cells treated with increasing resveratrol concentrations (5-200  $\mu$ M) for 24 h (Fig. 5). A typical ladder pattern of internucleosomal fragmentation was detected in 10  $\mu$ M resveratrol-treated L1210R cells (Fig. 5A) and 50  $\mu$ M resveratrol-treated P388R cells (Fig. 5B). Higher DNA fragmentation in P388R than in L1210R cells confirmed an apoptosis induction by resveratrol in P388R cells.

These results show that apoptosis triggers resveratrol cytotoxic effect in P388R cells, but contributes to L1210R growth inhibition.

#### 3.3. Resveratrol acts on cell cycle progression of leukemia cell lines

We were also interested in studying the effects of resveratrol on cell cycle progression in exponentially dividing cultures of L1210R and P388R cell lines. Cells were treated with increased concentration of resveratrol (0-50  $\mu$ M), for 24 h and were labeled with propidium iodide and analyzed by flow cytometry (Fig. 6).

In L1210R cells, 5 and 10  $\mu$ M of resveratrol induced an increase of cells in the G0/G1 phase and a corresponding decrease of cells in the S and G2/M phases, suggesting a cell cycle arrest in G1 phase. At concentrations superior to 10  $\mu$ M resveratrol, L1210R cells shifted from G0/G1 phase to SubG1 cell population, corresponding to a cell population with apoptotic DNA fragmentation (Fig. 6A). Presence of the SubG1 cell population altered the cell repartition between the different phases of cell cycle. Thus, cell cycle arrest was not estimated when SubG1 cell population appeared. In P388R cells, 30 % of cells were in SubG1 phase, since 10  $\mu$ M resveratrol treatment, leading to difficulties in cell cycle arrest interpretation (Fig. 6B). However, a significant increase in S phase was observed in 5  $\mu$ M

resveratrol-treated P388R cells compared to the 0.1 % ethanol control, suggesting a cell cycle arrest in S phase (Fig. 6B).

The L1210R cells accumulation in G0/G1 cell cycle phase confirms the antiproliferative effect of resveratrol in L1210R cells, whereas rapid presence of cells in SubG1 phase in resveratrol treated-P388R cells correlates with important resveratrol cytotoxic effect in the cell line.

#### 3.4. Resveratrol potentializes doxorubicin effect on leukemia cells

In order to characterize an anti-MDR activity of resveratrol, we analyzed its effect on L1210R and P388R cells doxorubicin (DOX) sensitivity as described in materials and methods. In this experiment, both cell lines were pretreated with non-toxic resveratrol concentration: 25  $\mu$ M of resveratrol in L1210R cells and 10  $\mu$ M in P388R cells. As MTT IC50 values obtained after 24 h DOX incubation were about 95  $\mu$ M in L1210R cells and 9  $\mu$ M in P388R cells (data not shown), we used 40  $\mu$ M and 80  $\mu$ M DOX in L1210R cells, and 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M DOX in P388R cells. As shown in Fig. 7, resveratrol pretreatment increased DOX sensitivity of about 20% in L1210R and P388R cell lines.

#### 3.5. Resveratrol induces the intracellular doxorubicin accumulation in leukemia cell lines

Resveratrol effect on intracellular DOX accumulation was analyzed in L1210R and P388R cell lines by flow cytometry as described in materials and methods.

In L1210R cells incubated with 40  $\mu$ M DOX, no significant change in DOX accumulation was observed whether cells were pretreated or not with 25  $\mu$ M resveratrol (Fig. 8A). By contrast, when cells were incubated with 80  $\mu$ M DOX, 25  $\mu$ M resveratrol pretreatment induced an increase of about 17 % in DOX accumulation (Fig. 8B).

In P388R cells, 10  $\mu$ M resveratrol pretreatment increased DOX accumulation by about 30 % and 13 % at 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of DOX, respectively (Fig. 8C and D).

These results suggest that the increase of resveratrol-induced DOX sensitivity observed in MTT could be due to DOX accumulation.

#### 3.6. Resveratrol modulates mdr1 gene expression

Previously, we observed that L1210R and P388R cells expressed *mdr1* and *mdr3* mRNA (data not shown). To assess if resveratrol could modulate *mdr* genes expression, RT-PCR analysis were carried out in L1210R and P388R as described in materials and methods.

No obvious change of *mdr3* gene expression was observed, whatever the treatment used in L1210R and P388R cell lines (Fig. 9).

In L1210R cells, 25  $\mu$ M of resveratrol treatment did not change *mdr1* gene expression compared with 0.1 % ethanol control. 40  $\mu$ M DOX treatment increased *mdr1* gene expression compared with control. Interestingly, 25  $\mu$ M resveratrol pretreatment decreased the *mdr1* gene expression induced by 40  $\mu$ M DOX. By contrast, 80  $\mu$ M DOX treatment decreased *mdr1* gene expression and no change was observed with resveratrol pretreatment (Fig. 9A).

In P388R cells, 10  $\mu$ M resveratrol treatment or 5  $\mu$ M DOX treatment enhanced *mdr1* gene expression compared with control. No change was observed with 10  $\mu$ M resveratrol pretreatment compared with 5  $\mu$ M DOX treatment alone. By contrast, 10  $\mu$ M resveratrol pretreatment inhibited *mdr1* gene expression that was increased by 10  $\mu$ M DOX treatment (Fig. 9B).

Thus, our results demonstrate that resveratrol pretreatment reverses the *mdr1* over expression induced by DOX in both cell lines.

#### 4. Discussion

Resveratrol has shown promise as a novel chemotherapeutic agent against a variety of cancers [23-25]. It has been reported that resveratrol inhibits *in vitro* the cell growth of several mouse and human leukemia cell lines [23, 26, 27]. However, few studies were known on antitumor effects of resveratrol in MDR leukemia cell lines. In order to study antitumoral and antimultidrug resistant effects of resveratrol, we used murine leukemia cancer cell lines doxorubicin resistant: L1210R cell line, with lymphoblastic morphology and, P388R cell line with a monocytic morphology.

The present study shows that resveratrol inhibits L1210R and P388R cells growth in dose- and time-dependant manner. The inhibition induced by resveratrol could be due to an antiproliferative or a pro-apoptotic effects. According to many investigations, resveratrol is able to trigger the slowing down or cell cycle arrest and induce apoptosis [28, 29], two mechanisms by which this molecule can carry on its antiproliferative activity. Here, we noted clear induction of apoptosis and concomitant inhibition of cellular proliferation in P388R cells incubated with resveratrol. By contrast, resveratrol in L1210R cells induced a higher proliferation inhibition than programmed cell death. This was demonstrated by a G0/G1-phase cell cycle arrest followed by an accumulation of L1210R cells in subG1 phase. The proliferation inhibition of L1210R and P388R cell lines corroborates its previously reported antiproliferative effects against several other tumor cell lines such as human colonic or breast cancer cells [29, 30].

Moreover, various reports indicated that resveratrol inhibits at different stages of the cell cycle [31-34], the cell growth, through cell cycle protein regulation such as cyclines.

Taken together, the results showed that resveratrol has a higher cytotoxic effect on P388R cell line than on L1210R cell line. A different resveratrol sensitivity of two human

13

leukemia cell lines from myeloid and lymphoid lineages as already been reported [27]. Such variability is in accordance with the well-known notion that leukemia cell lines differed in their *in vivo* and *in vitro* chemosensibilities [35].

In addition to the direct antitumoral resveratrol effect on both multidrug resistant leukemia cell lines, we studied its inhibitory effect on MDR phenotype. P-gp-dependent MDR cells are known to actively extrude the substrate drugs and to lower the intracellular concentration. It is also demonstrated that most of MDR-reversing agents inhibit the binding of antitumor drug to P-gp resulting in lowered efflux and accumulation of antitumor drug in MDR cells [36]. However, clinical studies have shown that MDR modulators exert high toxic effects in humans and the therapeutic concentrations of MDR-modifiers can rarely be achieved in clinical practice [37-40]. Therefore, sub-toxic dietary agents are suggested to be better candidates in this regard.

Resveratrol capacity to reduce chemoresistance in L1210R and P388R doxorubicin resistant cells was studied. We demonstrated that 24 h resveratrol pretreatment increase of 20% the doxorubicin cytotoxicity in L1210R and P388R cell lines whereas, co-incubation of the two drugs induced no change towards chemoresistance (data not shown). Co-incubation with P-gp inhibitors (verapamil, antibodies) and anticancer drug usually reverse cellular resistance by impairing directly the drug extrusion function of the P-gp [36, 41]. Our data suggest that resveratrol might not have a direct action against P-gp.

To explain an indirect resveratrol effect on P-gp, we checked its effect on P-gp expression. Reduction of P-gp expression at either the transcriptional or protein level has been suggested to be one of the mechanisms for certain modulators or agents, especially quinine, to reverse MDR phenotype [42]. We observed no difference in *mdr* gene expression in resveratrol treated L1210R cells. By contrast, in P388R cells, resveratrol increased mdr1 mRNA level. This could be due to a "stress-response" since, investigations on P-gp function

suggested that MDR1 expression in tissue culture can be increased by several types of stressinducing treatment, including: thermal shock, UV, hormones and particularly anti-cancer agents [43]. In addition, we observed that doxorubicin treatment in L1210R and P388R cell lines induced an increase in mdr1 gene expression. Studies demonstrated that doxorubicin or anthracyclin analogue administrated at sublethal concentrations in human leukemia cell lines and MDR sublines induced increase of MDR1 mRNA levels [43, 44]. Interestingly, 24 h resveratrol pre-exposure reduced this expression. These results indicate that resveratrol pretreatment can increase potency of doxorubicin in MDR cells and this combination acts on transcriptional regulation of mdr1 gene expression.

To study resveratrol effect towards mouse mdr1 P-gp, we realized western-blotting with various antibodies directed against anti-human MDR1 (JSB1 antibody, Proteogenic, Oberhausbergen, France and H-241 antibody, Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) and anti-hamster MDR (265/F4, interchim, Montlucon, France). Unfortunately, no convincing results were obtained even after membrane purification. Moreover, the anti-human MDR C219 antibody was not used in this experiment because it cross-reacts with a 185 kDa protein c-erbB2 [45, 46], which corresponds to the P-gp molecular weight.

Furthermore, we observed that 24 h resveratrol pretreatment produced an increase in doxorubicin intracellular accumulation in L1210R and P388R cells, whereas co-incubation of the two drugs induced no change on doxorubicin accumulation. These results confirmed that resveratrol has an indirect effect on P-gp probably through inhibition of *mdr* gene expression, in opposite to verapamil that acts as a direct P-gp blocker (data not shown).

It has been argued that selectively decrease MDR1 expression is a more attractive therapeutic target than direct inhibition of P-gp efflux activity [47].

We can conclude that, resveratrol induces first, an antitumoral activity by direct antiproliferative and pro-apoptotic effects, and, secondly acts as a non-toxic dietary agent to modulate MDR phenotype. However, more studies are required to understand the molecular mechanism of resveratrol to modulate P-gp expression and evaluate *in vivo* the effect of resveratrol on MDR phenotype associated with P-gp during chemotherapy.

Interestingly, our laboratory showed that palmitoylpeptides mimicking the external loops of the murine mdr1 P-gp reconstituted in liposomes elicited a humoral immune response in mice. Sera from these mice were able to inhibit P-gp activity in murine leukemia cell lines *in vitro* [48]. Recent results showed that, *in vitro*, resveratrol potentialized the humoral immune response shifting the Th1/Th2 balance towards a Th2 response [49]. These results suggest that resveratrol might enhance the humoral immune response against MDR murine leukemia cells.

In conclusion, the antitumoral properties of resveratrol associated to its immunomodulatory capacities let us to think that the molecule could be used as a promising lead compound for the design of more efficient anticancer agent.

#### References

- Dorai T and Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. Cancer Lett 2004;215:129-40.
- [2] Fremont L. Biological effects of resveratrol. Life Sci 2000;66:663-73.
- [3] Soleas GJ, Diamandis EP and Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? Clin Biochem 1997;30:91-113.
- [4] Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME and Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. J Agric Food Chem 2002;50:3337-40.
- [5] Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 1997;275:218-20.
- [6] Savouret JF and Quesne M. Resveratrol and cancer: a review. Biomed Pharmacother 2002;56:84-7.
- [7] Jang M and Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. Drugs Exp Clin Res 1999;25:65-77.
- [8] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I and Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999;39:361-98.
- [9] Johnson WW, ABC transporter proteins and cellular drug resistance: P-glycoprotein and analogous transporters. In: Lu D.R ØieS editors. Cellular Drug Delivery: Principles and Practice. Totowa: Humana Press, 2004. p. 129:62.
- [10] Croop JM, Gros P and Housman DE. Genetics of multidrug resistance. J Clin Invest 1988;81:1303-9.

- [11] Endicott JA and Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem 1989;58:137-71.
- [12] Gottesman MM and Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. J Biol Chem 1988;263:12163-6.
- [13] Ng WF, Sarangi F, Zastawny RL, Veinot-Drebot L and Ling V. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. Mol Cell Biol 1989;9:1224-32.
- [14] Nooter K and Sonneveld P. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in haematological malignancies. Leuk Res 1994;18:233-43.
- [15] List AF. The role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996;10 Suppl 1:S36-8.
- [16] Volm M. Multidrug resistance and its reversal. Anticancer Res 1998;18:2905-17.
- [17] Wortelboer HM, Usta M, van der Velde AE, Boersma MG, Spenkelink B, van Zanden JJ, et al. Interplay between MRP inhibition and metabolism of MRP inhibitors: the case of curcumin. Chem Res Toxicol 2003;16:1642-51.
- [18] Zhang S and Morris ME. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. J Pharmacol Exp Ther 2003;304:1258-67.
- [19] Nabekura T, Kamiyama S and Kitagawa S. Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function. Biochem Biophys Res Commun 2005;327:866-70.
- [20] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
- [21] Ghosh R, Nadiminty N, Fitzpatrick JE, Alworth WL, Slaga TJ and Kumar AP. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. J Biol Chem 2005;280:5812-9.

- [22] Schiengold M, Schwantes L, Schwartsmann G, Chies JA and Nardi NB. Multidrug resistance gene expression during the murine ontogeny. Mech Ageing Dev 2001;122:255-70.
- [23] Gautam SC, Xu YX, Dumaguin M, Janakiraman N and Chapman RA. Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. Bone Marrow Transplant 2000;25:639-45.
- [24] Tsan MF, White JE, Maheshwari JG, Bremner TA and Sacco J. Resveratrol induces Fas signalling-independent apoptosis in THP-1 human monocytic leukaemia cells. Br J Haematol 2000;109:405-12.
- [25] Bernhard D, Tinhofer I, Tonko M, Hubl H, Ausserlechner MJ, Greil R, et al. Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. Cell Death Differ 2000;7:834-42.
- [26] Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, Vercauteren J, Belloc F, Billiard C, et al. Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. Carcinogenesis 2002;23:1327-33.
- [27] Luzi C, Brisdelli F, Cinque B, Cifone G and Bozzi A. Differential sensitivity to resveratrol-induced apoptosis of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. Biochem Pharmacol 2004;68:2019-30.
- [28] Kim YA, Rhee SH, Park KY and Choi YH. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. J Med Food 2003;6:273-80.
- [29] Schneider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, et al. Antiproliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. Cancer Lett 2000;158:85-91.

- [30] Lu R and Serrero G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. J Cell Physiol 1999;179:297-304.
- [31] Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK and Mukhtar H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. Clin Cancer Res 2001;7:1466-73.
- [32] Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER and Reddy GP. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into s phase and inhibits DNA synthesis. Cancer Res 2002;62:2488-92.
- [33] Hsieh TC, Burfeind P, Laud K, Backer JM, Traganos F, Darzynkiewicz Z, et al. Cell cycle effects and control of gene expression by resveratrol in human breast carcinoma cell lines with different metastatic potentials. Int J Oncol 1999;15:245-52.
- [34] Liang YC, Tsai SH, Chen L, Lin-Shiau SY and Lin JK. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells.
  Biochem Pharmacol 2003;65:1053-60.
- [35] McKenna SL and Cotter TG. Functional aspects of apoptosis in hematopoiesis and consequences of failure. Adv Cancer Res 1997;71:121-64.
- [36] Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and 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;41:1967-72.
- [37] Ford JM, Bruggemann EP, Pastan I, Gottesman MM and Hait WN. Cellular and biochemical characterization of thioxanthenes for reversal of multidrug resistance in human and murine cell lines. Cancer Res 1990;50:1748-56.

- [38] Figueredo A, Arnold A, Goodyear M, Findlay B, Neville A, Normandeau R, et al. Addition of verapamil and tamoxifen to the initial chemotherapy of small cell lung cancer. A phase I/II study. Cancer 1990;65:1895-902.
- [39] Solary E, Caillot D, Chauffert B, Casasnovas RO, Dumas M, Maynadie M, et al. Feasibility of using quinine, a potential multidrug resistance-reversing agent, in combination with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemia. J Clin Oncol 1992;10:1730-6.
- [40] Trump DL, Smith DC, Ellis PG, Rogers MP, Schold SC, Winer EP, et al. High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent: phase I trial in combination with vinblastine. J Natl Cancer Inst 1992;84:1811-6.
- [41] Efferth T and Volm M. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by monoclonal antibodies, immunotoxins or antisense oligodeoxynucleotides in kidney carcinoma and normal kidney cells. Oncology 1993;50:303-8.
- [42] Hu YP, Pourquier P, Doignon F, Crouzet M and Robert J. Effects of modulators of multidrug resistance on the expression of the MDR1 gene on human KB cells in culture. Anticancer Drugs 1996;7:738-44.
- [43] Chaudhary PM and Roninson IB. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. J Natl Cancer Inst 1993;85:632-9.
- [44] Gekeler V, Beck J, Noller A, Wilisch A, Frese G, Neumann M, et al. Drug-induced changes in the expression of MDR-associated genes: investigations on cultured cell lines and chemotherapeutically treated leukemias. Ann Hematol 1994;69 Suppl 1:S19-24.

- [45] Liu B, Sun D, Xia W, Hung MC and Yu D. Cross-reactivity of C219 anti-p170(mdr-1) antibody with p185(c-erbB2) in breast cancer cells: cautions on evaluating p170(mdr-1). J Natl Cancer Inst 1997;89:1524-9.
- [46] Chan HS and Ling V. Anti-P-glycoprotein antibody C219 cross-reactivity with cerbB2 protein: diagnostic and clinical implications. J Natl Cancer Inst 1997;89:1473-6.
- [47] Jin S, Gorfajn B, Faircloth G and Scotto KW. Ecteinascidin 743, a transcriptiontargeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:6775-9.
- [48] Pawlak-Roblin C, Tosi PF, Perrin L, Devy J, Venteo L, Albert P, et al. Inhibition of multidrug resistance by immunisation with synthetic P-glycoprotein-derived peptides. Eur J Cancer 2004;40:606-13.
- [49] Rachon D, Rimoldi G and Wuttke W. In vitro effects of genistein and resveratrol on the production of interferon-gamma (IFNgamma) and interleukin-10 (IL-10) by stimulated murine splenocytes. Phytomedicine 2006;13:419-24.

## Acknowledgments:

We thank the "Association pour la Recherche contre le Cancer" for financial support.

#### **Figures legends:**

Figure 1: Chemical structure of *trans*-resveratrol

**Figure 2:** Effects of resveratrol on the growth of L1210R cells (A) and P388R cells (B). L1210R and P388R cell lines were treated for 24 h ( $\blacksquare$ ) and 48 h ( $\Box$ ) with resveratrol. 0 represents the 0.1 % ethanol control. Cell growth was assessed by MTT method as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Key: (\*) significantly different from the control (p < 0.05).

**Figure 3:** Effects of resveratrol on the cell death of L1210R (A) and P388R (B). Cells were treated for 24 h (--  $\blacktriangle$  --) and 48 h (—  $\blacksquare$ —) with resveratrol. 0 represents the 0.1 % ethanol control. The cells were then processed for trypan blue staining. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. Key: (\*) significantly different from the control (p < 0.05).

**Figure 4:** L1210R (A) and P388R (B) apoptotic and necrotic evaluation after fluorescence microscopy analysis with Hoechst and Propidium Iodide (PI) double staining. Cells were incubated for 24 h in the presence of various concentrations of resveratrol. 0 represents the 0.1 % ethanol control. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Key: (\*) significantly different from the control (p < 0.05).

**Figure 5:** Analysis of DNA fragmentation using gel electrophoresis L1210R (A) and P388R (B). Cells were incubated in the presence of 5 to 200  $\mu$ M of resveratrol for 24 h. Genomic DNA was prepared as described in materials and methods and analyzed by 1.8 % gel electrophoresis and ethidium bromide staining. (1) control sample 0.1 % ethanol; (2-7) samples treated with 5, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M of resveratrol and (8) standard DNA Ladder.

**Figure 6:** Effects of resveratrol on the cell cycle. L1210R (A) and P388R (B) cells were incubated in (RPMI + 10 % SVF) with 0.1 % ethanol as control (0), 5, 10, 25 and 50  $\mu$ M resveratrol for 24 h. Cell cycle was performed as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Key: (\*) significantly different from the control (p< 0.05).

**Figure 7:** Effects of resveratrol on the cytotoxicity of doxorubicin (DOX) in L1210R (A) and P388R (B). Cytotoxicity induced by DOX on cells in the presence of resveratrol was assessed by the MTT method as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Key: (\*) significantly different from the control (p< 0.05).

**Figure 8:** Accumulation of doxorubicin (DOX) in L1210R (A-B) and P388R(C-D). Accumulations of doxorubicin in individual cells in the absence (control ethanol) or presence of resveratrol were analyzed by FACS flow cytometry. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Key: (\*) significantly different from the control (p < 0.05).

**Figure 9:** Effects of resveratrol on the expression of mdr1 and mdr3 mRNA in L1210R (A) and P388R (B). Expression of mdr1, mdr3 and rRNA mRNA was determined by RT-PCR.

Figure 1 : First author's name: Laura Perrin





# Figure 2 :

# First author's name: Laura Perrin



# Figure 3 :

# First author's name: Laura Perrin



# Figure 4 : First author's name: Laura Perrin



% apoptotic cells ( $\blacksquare$ ) % necrotic cells ( $\Box$ )

# Figure 5 : First author's name: Laura Perrin





Figure 6 : First author's name: Laura Perrin



# ■ SubG1 □ G0/G1 ■ S ⊡ G2 /M

# Figure 7 :

# First author's name: Laura Perrin



# Figure 8 :

## First author's name: Laura Perrin



L1210R

Figure 9 :

First author's name: Laura Perrin



# Communication Immunothérapie anti-tumorale contre la multidrogue résistance

Cl. Madoulet (1), L. Perrin (2), P.F. Tosi (1), P. Albert (2)

Résumé. La surexpression de la glycoprotéine (P170) représente un des mécanismes les plus courants de la multidrogue résistance (MDR) en cancérologie. Des autoanticorps spécifiques des boucles 1, 2 et 4 de la P170 murine ont été induits chez la souris en utilisant des peptides synthétiques palmitoylés reconstitués dans des liposomes avec ou sans lipide A et remis en suspension dans l'alum au moment de l'injection. Des IgM spécifiques sont détectées 14 jours après la première injection et à partir de la troisième injection, la réponse immunitaire est prépondérante en IgG1 anti-P170. Les animaux immunisés ne présentent aucun symptôme d'autoimmunité 18 mois après l'immunisation. Les souris immunisées répondent mieux à la chimiothérapie à base de doxorubicine et de vinblastine et la survie des souris est augmentée de 77 %. Les sérums de souris immunisées sont capables de réduire la résistance à la chimiothérapie in vitro. Cette approche d'immunothérapie anti-MDR1 pourrait avoir des développements potentiels en clinique.

Summary. Overexpression of a membrane glycoprotein (P170) represents the most common multidrug resistance (MDR) mechanism in cancer therapy. Specific autoantibodies to extracellular loops 1, 2 and 4 of murine P170 are elicited in mice using palmitoylated synthetic peptides reconstituted in liposomes with or without Lipid A and resuspended in alum. IgM antibodies are detected 14 days following the first injection and IgG1 become predominant after the third challenge. Animals do not show any autoimmunity symptoms or induced toxicity up to 18 months after the immunization. Previous immunizations of mice using liposomes with mdr1 peptides efficiently improve chemotherapy with doxorubicin and vinblastine against P388 R cells with a 77% increase of survival half time in the immunized group. Sera from immunized mice are also effective in reducing cellular resistance to vinblastine and doxorubicin in vitro. Taken together these data suggest that this immunization approach might have potential clinical applications.

*Key-words:* Multidrug resistance (MDR), P-Glycoprotein 170 kDa (P170), Immunization, Lipopeptides, Liposome.

*Mots-clés*: Multidrogue résistance (MDR), P-Glycoprotéine 170 kDa (P170), Immunisation, Lipopeptides, Liposome. Anti-tumor immunotherapy against multidrug resistance. Cl. Madoulet, L. Perrin, P.F. Tosi, P. Albert. *Ann Pharm Fr* 2006, *64*: 87-96.

a Multidrogue résistance (MDR) des cellules tumorales est responsable de l'échec des traitements en cancérologie [1, 2]. La surproduction d'une glycoprotéine appelée P170 est corrélée avec l'apparition du phénotype de résistance vis-à-vis de médicaments anticancéreux,

(1) Laboratoire de Biochimie EA 3796, Ufr de Pharmacie, Ifr 53 Biomolécules, 3, avenue du Maréchal Juin, F 51096 Reims Cedex.
 (2) Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3796, Ufr de Sciences, Reims.

*Présentation devant l'Académie nationale de pharmacie dans le cadre de la séance du 16 mars 2005 délocalisée à Reims.* **Tirés à part :** Cl. Madoulet, à l'adresse ci-dessus.

E-mail : claudie.madoulet@univ.reims.fr

#### Cl. Madoulet et Coll.

des anthracyclines, des épipodophyllotoxines, des vinca alcaloïdes, de l'actinomycine D et des dérivés taxanes. Chez l'homme, le gène mdr1 code pour une protéine de 1 280 acides aminés comprenant deux moitiés homologues constituées chacune de six hélices transmembranaires reliées par des boucles extra et intracellulaires et un site consensus de fixation à l'ATP [3, 4]. Cette glycoprotéine agit comme une pompe à efflux vis-à-vis de composés n'ayant aucune homologie de structure, ni mécanisme d'action pharmacologique [5]. Ce gène mdr1 est exprimé dans toutes les cellules hématopoïetiques progénitrices [6] et dans beaucoup d'organes et tissus tels que le foie, l'intestin, les reins, les surrénales, le pancréas, le cerveau et les testicules [7, 8]. Ceci implique que dans les tumeurs provenant de ces tissus, la résistance est spontanée et intrinsèque et le traitement par chimiothérapie a peu d'effet. Dans d'autres cas, cette résistance peut être acquise au cours du traitement. Certaines stratégies ont été développées pour lutter contre ce phénotype de résistance par des agents chimiques comme certains inhibiteurs de canaux calciques (vérapamil), des antagonistes de la calmoduline, différents anticorps monoclonaux spécifiques du mdr1 humain [9]. Ces anticorps reconnaissent les épitopes de la boucle 1 de la protéine et le plus efficace est l'UIC2 chez la souris [10].

Le *mdr1* cDNA murin code pour une protéine de 1 276 acides aminés avec une structure similaire à son homologue humain [11]. Les séquences de P170 murine et humaine ont 80 % d'homologie dans la partie intracytoplasmique de la protéine tandis que les séquences extracellulaires diffèrent de manière significative [3]. Trois gènes mdr ont été séquencés et caractérisés : mdr1 (ou mdr1a), mdr3 (ou mdr1b) et mdr2 [12]. Parmi ces isoformes, mdr1 et mdr3 sont tous deux actifs dans le transport d'agents anticancéreux alors que mdr2 n'intervient pas dans cette activité mais code pour une phosphatidylcholine translocase. Nous avons démontré précédemment que l'immunisation de souris avec des séquences peptidiques externes de la mdr1 P170 murine permettait de développer des anticorps spécifiques aux épitopes extracellulaires de la protéine et étaient capables de réverser in vitro le phénotype MDR des cellules L1210 [13]. Une telle stratégie

de rupture de la tolérance immunitaire contre des protéines du soi a été testée *in vivo* contre les plaques  $\beta$ -amyloïdes dans le pancréas des souris transgéniques NORBA [14].

Dans notre étude, le but est de tester *in vivo* les effets d'immunisation avec des peptides mimant les boucles extracellulaires de la P170 murine reconstituées dans des liposomes avec ou sans lipide A [15]. Dans l'idée de rompre non seulement la tolérance immune envers la protéine *mdr1* mais d'induire plus particulièrement des anticorps efficaces, nous avons analysé la cinétique et les isotypes des anticorps induits.

#### Matériels et méthodes

#### Synthèse des peptides palmitoylés

Des peptides palmitoylés (tableau I) correspondant aux séquences des boucles extra-cellulaires 1 (mpp1), 2 (mpp2) et 4 (mpp4) de la P170 murine [13, 16] ont été synthétisés par un synthétiseur de peptide « Applied Biosystems 430A » utilisant le [17, 18] tertiobutyloxycarbonyl/benzyl et in situ une activation par le (N- [(1H – benzotriazol – 1 - yl) (diméthylamino) méthylène] - N- méthylméthanaminium hexafluorophosphate N-oxyde [19], puis couplés de manière covalente avec quatre molécules d'acide palmitique par molécule de peptide. Chaque lipopeptide est analysé par spectrométrie de masse : mpp 1, [M+H]<sup>+</sup>, PM calculé 5436, PM trouvé (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization-Time of Flight : MALDI-TOF) : 5437. mpp 2, [M+H]<sup>+</sup> PM calculé : 3293, PM trouvé (Plasma Desorption Mass Spectrometry-Time of Flight : PDMS-TOF) : 3293. mpp 4, [M+H]<sup>+</sup> PM calculé: 3190, PM trouvé (PDMS-TOF): 3188. Les acides aminés des peptides sont analysés après hydrolyse dans HCl 6N/phénol à 110 ° C. Les résultats (attendus/trouvés) sont les suivants :

**mpp 1**, A (2/1,5), D (5/4,4), E (5/6,6), F (1/0,6), G (4/3,4), I (4/3,6), K (4/4,0), L (3/3,5), M (1/0,7), P (2/1,8), T (4/3,0), S (8/7,4). **mpp 2**, A (2/2,3), D (1/1,2), E (2/2,4), F (1/1,0), G (2/2,1), K (6/6,0), L (2/2,1), S (1/0,9), V (1/1,0), Y (1/1,0). **mpp 4**, D (5/5,0), E (3/3,1), G (2/2,0), K (4/3,7), S (1/0,9), R (2/1,9).
#### Immunothérapie anti-tumorale contre la multidrogue résistance

Peptides	Séquences en Acides Aminés (AA)	nombre d'AA
mpp1	к-G-GNMTDSFTKAEASIVLPSITNQSGPNSTLIISNSSLEEE-G-к-к-NH2 1 2 3 4	43
mpp2	K-G-KVLTSFTNKELQAYAK-G-K-K-NH2	21
mpp4	K-G-SRDDDMETKRQNEN-G-K-K-NH2	19

Tableau I. — Palmitoylpeptides correspondant aux boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la P170 *mdr1* murine. *Murine palmitoylpeptides corresponding to extracellular loops 1, 2 and 4 of the P170 mdr1*.

Chaque peptide est couplé à quatre acides palmitiques pour obtenir des palmitoylpeptides murins (mpp1, mpp2 et mpp4). Les séquences et les sites potentiels de glycosylatioin (en quatre boîtes) sont référencés (11). Les régions possédant une haute probabilité de réponse immunitaire sont surlignées.

#### Préparation des liposomes

Les liposomes sont préparés en mélangeant du dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), du dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) et du cholestérol (Avanti Polar lipids, Alabaster, Alabama) dans un rapport molaire de 0,9 : 0,1 : 0,7 respectivement. Le monophosphoryl lipide A, (MPLA) (List Biological Campbell, California) est ajouté à une concentration de 40 µg par µmole de phospholipides [20]. Trois types de liposomes sont alors préparés : Lpl : DMPC, DMPG, Cholestérol, lipopeptides ; Lp2 : DMPC, DMPG, Cholestérol et Lp3: DMPC, DMPG, Cholestérol, lipopeptides, MPLA. Les trois lipopeptides sont ajoutés dans un rapport molaire avec les phospholipides de 1 : 250. Les solvants organiques permettant l'homogénéisation de cet ensemble sont évaporés sous un dessiccateur à vide pendant deux heures environ. Le film résultant, après hydratation avec du PBS pH 7,4 stérile, est ajusté à une concentration finale en phospholipides de 4 mM. Les différents lots de liposomes ont été préparés un jour avant la première immunisation. Pour les seconde et troisième immunisations, chaque lot de liposomes est conservé à - 20 ° C. Avant l'injection, la suspension de liposomes est mélangée (V/V) avec 0,1 ml d'alum stérile (Pasteur Mérieux, Marcy L'Étoile, France).

## Protocole d'immunisation

Les différentes préparations ont été injectées à des groupes de neuf souris B6D2F1 (Iffa Credo, L'Arbresle, France) pesant entre 19 et 22 g environ suivant le protocole établi : trois injections intra péritonéales à 15 jours d'intervalle de 200 µl de préparation « vaccinale ». Pour chaque

souris, 100  $\mu$ l de sang sont prélevés au niveau du sinus rétro-orbital, un jour avant le rappel et 15 jours après la dernière injection. Chaque échantillon de sang est ensuite centrifugé et le sérum recueilli a été utilisé pour y quantifier par *dot blot* les différentes immunoglobulines induites par la vaccination.

#### Analyse de la réponse immunitaire

Les lipopeptides servant de molécules antigéniques, dilués dans du tampon PBS, sont dans un premier temps déposés à température ambiante sur les membranes de nitrocellulose selon le procédé décrit dans la référence [13]. Différents isotypes d'immunoglobulines (IgM, IgG3, IgG2a, IgG2b, IgG1) sont recherchés en utilisant des anticorps secondaires spécifiques couplés à la peroxidase du raifort (The binding site, Grenoble, France). L'activité est détectée en utilisant la chimiluminescence (ECL<sup>TM</sup>, Amersham; Pharmacia Biotech Bickinghameshire, England) par exposition sur des films Kodak X-Omat (Sigma). Les films sont analysés par densitométrie et la concentration est estimée à partir de dilutions standards d'Ig (M, G3, G2a, G2b, G1) purifiées (The Binding Site).

# Activité in vitro des anticorps induits

Les cellules lymphoïdes murines P 388R (fournies par G. Atassi, Laboratoire Servier, Courbevoie, France) sont cultivées en milieu RPMI (Gibco) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) et traitées avec 10  $\mu$ M de doxorubicine (Sigma). Pour les études de cytotoxicité, les cellules (45 x 10<sup>3</sup>) sont cultivées à 37 ° C en atmosphère humide de 5 % CO2/95 % air et incubées

# CI. Madoulet et Coll.

avec des sérums (0,6; 0,3; 0,15% dilués en RPMI, 10 % SVF) pendant une heure à 37 ° C puis ensuite 48 heures avec des dilutions de doxorubicine (DXR) ou de vinblastine (VLB) 50  $\mu$ M dans le milieu. La viabilité cellulaire est estimée par le test colorimétrique au MTT [21]. Afin de comparer les effets des anticorps induits, le vérapamil (VPL, Sigma) est utilisé comme modulateur de référence de la résistance et la viabilité cellulaire est effectuée dans les mêmes conditions.

# Incorporation de [3H] VLB

1,6 x 106 cellules dans 400 µl de RPMI avec 10 % SVF sont incubées à 37 ° C pendant une heure avec ou sans effecteur (VLB ou sérums de souris immunisées), puis sont introduits dans des tubes en verre siliconé avec 2 µCi de [3H-VLB] (Amersham, Saclay, France) et de VLB non radioactive (1 µM) à température identique [22]. Après 30 minutes, 100 µl de suspension cellulaire sont prélevés et placés dans des tubes en plastique contenant 50 µl d'acide perchlorique à 6 % recouvert par 100 µl d'un mélange phtalate-ester. Les tubes sont immédiatement centrifugés à 13 000 g pendant 30 secondes et congelés dans l'azote liquide. Les tubes sont sectionnés en deux. La moitié supérieure est immergée dans 5 ml de liquide scintillant formula 963 (New England Nuclear) et la radioactivité est déterminée dans un compteur à scintillation LKB. Les résultats sont exprimés en pmoles de VLB pour 106 cellules et en pourcentage d'incorporation par comparaison avec les cellules P 388R incubées avec l'immun sérum contrôle (IS Lp2).

# Étude *in vivo* des effets des pré-sensibilisations avec les différents lots

Des groupes de neuf souris B6D2F1 pré-immunisées par Lp1 ou Lp2 ont reçu par voie intra péritonéale 10<sup>6</sup> cellules P 388R au jour zéro. Aux jours 1, 10 et 22, chaque souris reçoit une chimiothérapie alternée de DXR 5,5 mg/kg et aux jours 4, 14 de VLB 2,5 mg/kg. Pendant cette période, le poids des animaux est suivi et l'étude de leur survie est estimée. Avant injection des cellules P 388R, durant une période comprise entre 15 et 45 jours après la troisième immunisation, les sérums seront utilisés pour y quantifier les anticorps et contrôler leur activité.

# Étude anatomopathologique des organes de souris immunisées

Les souris sont sacrifiées plus d'un an après la dernière immunisation. Les organes qui expriment naturellement la P170 (reins, glandes surrénales, pancréas, rate, foie, cœur, poumon, ovaires) sont prélevés et fixés dans du formol 10 % pH 7,4 pendant 18 heures environ. Les études histologiques sont ensuite réalisées sur des prélèvements de 3 µm d'épaisseur, sont fixés en paraffine, puis colorés à l'hématéine-phloxine-safran ou HPS. Cette coloration est une coloration trichromique : à la double coloration nucléaire en violet par l'hémalum de Mayer et cytoplasmique en rose par la phloxine, s'ajoute une coloration du tissu conjonctif en jaune par le safran.

# Résultats

# Induction de la réponse humorale après administration des différentes préparations

Trois lots sont préparés : Lp1 lipopeptides, liposomes, alum, Lp2 identique à Lp1 sans lipopeptides, Lp3 identique à Lp1 sans lipide A. Afin de quantifier les anticorps induits spécifiques à mpp 1, mpp 2, mpp 4 et déterminer leurs isotypes, nous avons utilisé la technique de dot blotting. Les sérums de souris immunisées avec la préparation contrôle Lp2 servent de référence pour les anticorps IgM, IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgG1. Les réponses immunitaires des animaux immunisés avec Lp1 ou Lp3 sont représentées dans les figures 1A et B. Les préparations Lp1 et Lp3 après inoculation i.p. chez la souris, permettent l'induction d'anticorps de classe IgM après la première injection. La réponse devient prépondérante en IgG2b et IgG3 pour Lp1 (fig. 1A) et en IgG2b pour Lp3 (fig. 1B) après la seconde injection. Le titre en IgG1 est maximum après la troisième immunisation pour les deux formulations et est 65 % plus important chez les souris immunisées avec Lp1. Parmi les titres en IgG1 induits contre les différents lipopeptides, mpp 2 est respectivement 2,6 et 2 fois plus immunogène que mpp 1 ou mpp 4.

## Immunothérapie anti-tumorale contre la multidrogue résistance

Le pourcentage de sérums de souris contenant des anticorps contre les lipopeptides varie de 66 à 100 %. De plus, dans la formulation simplifiée (Lp1), nous avons une meilleure réponse immunitaire que dans la préparation avec le lipide A (Lp3). En utilisant les mêmes contrôles que ceux décrits dans la réf 13 (analyses par cytométrie de flux et *western blotting*) nous constatons que Lp1 est capable de produire des anticorps polyclonaux anti-P170 de façon reproductible.

Les mêmes lipopeptides sont utilisés après dix mois de conservation à - 20 ° C et serviront à préparer un nouveau lot de Lp1. La réponse immunitaire est identique en dépit du fait que des anticorps spécifiques en mpp 2 sont détectés chez 40 % des animaux seulement. Afin d'évaluer les effets de l'immunisation par Lp1, nous avons comparé le poids des souris et leur comportement 18 mois après leur dernière immunisation. Durant cette période, le poids moyen des souris montre des variations inférieures à 3 % dans les groupes Lp1, Lp2 et Lp3. De plus, les animaux ne présentent aucune modification dans leur comportement. Une étude histologique a été réalisée sur les organes exprimant naturellement la P170 (rate, foie, reins, glandes

surrénales, pancréas, ovaires, cœur, poumons) chez les souris traitées avec les différentes formulations vaccinales. Nous n'avons pas trouvé dans les différents organes de lésion ou d'infiltration de lymphocytes ou monocytes. Cependant, quelques granulomes intrapéritonéaux associés au pancréas, aux surrénales, à la rate (chez 80 % des souris) et rarement au niveau du foie (20 %) sont détectés chez les animaux immunisés par Lp1 et Lp2 *(fig. 2)*.

# Effets *in vivo* des différentes préparations sur un traitement chimiothérapeutique chez des souris recevant des cellules P 388R

Des cellules P 388R sont injectées à des souris préalablement immunisées et une chimiothérapie à base de doxorubicine et de vinblastine est réalisée selon le protocole décrit précédemment (*fig. 3*). Avant l'injection, le titre en anticorps dans les sérums de souris immunisées par Lp1 a été mesuré et respectivement 100 %, 40 % et 80 % des sérums possèdent des IgG1 anti-mpp 1, 2 et 4 à des taux de 0,30, 0,21 et 0,33 µg/ml. Durant le traitement, nous n'avons pas observé de modification du poids moyen des souris. La moyenne du temps de survie des souris immunisées par Lp1 est



Figure 1. Titre en anticorps dans le sérum de souris en fonction du temps d'immunisation  $(1^{re}, 2^e, 3^e \text{ injection})$ . **A**, Lp1 (liposomes, palmitoylpeptides, alum) ; **B**, Lp3 (liposomes, lipid A, palmitoylpeptides, alum). Pour les deux parties A et B, antimpp 1 ( $\Box$ ), mpp2 ( $\blacksquare$ ), mpp 4 ( $\blacksquare$ ) sont quantifiés et les différents isotypes détectés en utilisant un anticorps secondaire spécifique des 1 g murines (M, G3, G2a, G2b, G1). Chaque histogramme représente la moyenne des valeurs obtenues à partir des sérums de 5 souris prélevés 12 jours après immunisation. Une unité correspond à 0,2 µg 1 g/ml. Les écarts types ne sont pas montrés ici, ils varient entre 5 et 25 %.

Antibody titre in the sera of mice as a function of time immunisation  $(1^{st}, 2^{nd}, 3^{rd}injection)$ . a, Lp1 (liposomes, palmitoylpeptides, alum); b, Lp3 (liposomes, lipid A, palmitoyl-peptides, alum). For both figures, the antimpp1 ( $\Box$ ), mpp2 ( $\blacksquare$ ), mpp4 ( $\blacksquare$ ) were quantified and the different isotypes detected by using secondary antibodies respectively specific to murine 1g (M, G3, G2a, G2b, G1). Each histogram represents an average of the values obtained from sera of 5mice bled 12days after immunisation. One unit corresponds to 0.2µg 1g/ml. SD are not shown, they varied between 5 and 25%.

91

Cl. Madoulet et Coll.



Figure 2. Analyse histologique des organes de souris immunisées par Lp1 (a, c, e, g) ou contrôles (b, d, f, h). Des coupes en paraffine colorées par l'hématoxyline-Phloxine-Safran montrent : (a) une lésion granulomateuse à la surface du foie, (b) granulome situé sous la capsule du foie avec des microcalcifications (flèches), (c, d) granulome localisé dans le tissus adipeux entourant la glande surrénale, (e) lésions granulomateuses dans le tissus adipeux autour de la rate (f) quelques cellules géantes isolées dans la rate, (g) nombreuses cellules épithéliales granulomateuses dans les tissus gras péri pancréatiques, (h) détail d'un granulome péri pancréatique. Barre d'échelle, 100 µm.

Histologic features of organs obtained from mice immunized by anti-P170 (a, c, e, g) or control immunisations (b, d, f, h). Hematoxylineosin stained paraffin sections shows: (a) a granulomatous lesion at the surface of the liver, (b) granulomas situated under the capsule of the liver with microcalcifications (arrows), (c, d) granulomas located in the adipose tissue surrounding adrenal gland, (e) granulomatous lesions in the perispleenic adipose tissue, (f) some isolated giant cells in the spleen, (g) numerous epithelioid cell granulomas present in the peripancreatic fat tissue, (h) detail of a peripancreatic granuloma. Scale bar, 100µm. These are representative fields of organs with the most lesions and the same mice, other organs were normal.

de 39 jours alors qu'elle est de 22 jours dans les lots contrôles *(fig. 3)*. Dans le groupe Lp2, nous avons une souris qui survit après 70 jours probablement par rémission de son cancer due à sa propre immunité et après chimiothérapie. Durant une période de 22 à 62 jours après injection des P 388R,



Figure 3. Temps de survie des souris immunisées par Lp1 ( $\blacklozenge$ ) et Lp2 ( $\blacksquare$ ). Au jour zéro, 10<sup>6</sup> cellules P388R ( $\uparrow$ ) sont inoculées. Aux jours 1, 10, 22, doxorubicine 5,5 mg/kg ( $\uparrow$ ) et aux jours 4 et 14, vinblastine 2,5 mg/kg ( $\downarrow$ ) sont injectées. Survival time of mice immunized by Lp1 ( $\blacklozenge$ ) and Lp2 ( $\blacksquare$ ). At day zero, 10<sup>6</sup> P388R cells ( $\uparrow$ ) were i.p inoculated. At day 1, 10, 22, Doxorubicin 5.5mg/kg ( $\downarrow$ ) and on day 4 and 14, Vinblastine 2.5mg/kg ( $\downarrow$ ) were injected.

l'hématocrite et la concentration en hémoglobine ne sont pas modifiés chez les animaux immunisés par rapport aux souris contrôles.

# Étude *in vitro* de l'activité anti-mdr des anticorps induits

La cytotoxicité de la doxorubicine dans les cellules P 388R est évaluée en présence de vérapamil et de sérums de souris immunisées par Lp1. De façon à mettre en évidence l'activité des anticorps induits, différentes concentrations de sérums anti-P170 sur la résistance des cellules P 388R sont testées. La concentration la plus efficace en sérum est 0,6 %, avec un effet inhibiteur de la résistance similaire au vérapamil 3 µM (fig. 4). Des expériences de cytotoxicité avec la vinblastine 50 µM montrent que l'incubation des cellules avec 1,2 % de sérum de souris immunisées par Lp1 entraîne une inhibition de la résistance deux fois supérieure au vérapamil 3 µM (fig. 5). Pour confirmer ces résultats, l'incorporation de vinblastine radioactive [3H-VLB] par les cellules P 388R incubées en présence de vérapamil et de sérums de souris immunisées par Lp1 ou Lp2 est réalisée (fig. 6). Sur huit sérums de souris immunisées par Lp1 testés, six exercent une activité inhibitrice de l'efflux de VLB identique au vérapamil 3 µM.



Figure 4. Cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules P388R en présence d'agents de réversion : Contrôle (--) ; VRP : Vérapamil 3  $\mu$ M (--) ; Moyenne de 5 Sérums de souris immunisées par Lp1 (IS Lp1) à différentes-concentrations (-- : IS Lp1 0,6 % ; -- : IS Lp1 0,3 % ; -x- : IS Lp1 0,15 %). L'aire grise correspond aux variations de survie des cellules après incubation avec l'immunsérum IS Lp2 (contrôle) à la concentration de 0,15, 0,3 et 0,6 %. Les points correspondent à la moyenne de trois déterminations.

Cytotoxicity induced by Doxorubicin on P388R cells in the presence of reversal agents: Control (- -); VRP: Verapamil 3µM (- -); Average of 5 Sera from Lp1 immunized mice (IS Lp1) at different concentrations (- -: IS Lp1 0.6%; - - -: IS Lp1 0.3%; - -: IS Lp1 0.15%). The shaded area corresponds to the variation of cells survival following incubations with IS Lp2 (control liposomes) at concentration of 0.15, 0.3 and 0.6%. Points, mean of triplicate determinations.



Figure 5. Pourcentage de cellules mortes après traitement par VLB (50  $\mu$ M) des cellules P388R en présence d'agents révertants : Vérapamil (VRP) 3  $\mu$ M ; Immun sérum de souris immunisées par Lp1 (1,2 %) (Les résultats correspondent à la moyenne de trois déterminations sur 5sérums différents). *Cell death percentage induced by VLB (50\muM) on P388R cells in the presence of reversal agents: Verapamil (VRP) 3\muM; Sera (IS) of Lp1 immunized mice 1.2% (average of triplicate measurements on 5 differents sera*).

# **Discussion et conclusion**

La réversion de la multidrogue résistance par des substances pharmacologiques comme les inhibiteurs calciques, les inhibiteurs de la calmoduline,



Figure 6. Transport de Vinblastine radiomarquée [<sup>3</sup>H-VLB] par les cellules P388R incubées en présence de Vérapamil (VRP) 3  $\mu$ M ou de sérums de souris immunisées par Lp1 ou Lp2. Sur 8 sérums de souris immunisées par Lp1, Deux groupes sont séparés en IS Lp1 actifs (6 sérums) et non actifs (2 sérums).

Uptake of radiolabeled Vinblastine  $[^{3}H-VLB]$  by P388R cells incubated in the presence of Verapamil (VRP)  $3\mu M$  or sera of mice immunized by Lp1 or Lp2. From eight sera of Lp1 immunized mice, two groups were separated IS Lp1 active (6sera) and non active (2sera).

les anesthésiques locaux a déjà été décrite [23]. Des études cliniques ont montré que ces modulateurs de la MDR présentent souvent une toxicité chez l'Homme et les concentrations thérapeutiques ne peuvent jamais être atteintes [24-27]. De nombreuses cellules multidrogues résistantes surexpriment la P170, cependant le profil de résistance est très hétérogène [28]. Afin de lutter contre cette MDR, nous avons développé une approche d'immunothérapie anti-P170 in vivo. Dans un précédent travail, nous avons montré que des peptides palmitoylés mimant les boucles externes de la P170 murine, reconstitués dans des liposomes contenant du lipide A permettaient l'instauration d'une réponse immunitaire spécifique anti-P170 chez la souris et que les anticorps induits étaient capables d'inhiber l'activité de la P170 dans les cellules L1210 (MDR) in vitro [13].

Des peptides palmitoylés ayant deux chaînes d'acide palmitique aux extrémités aminé et carboxyterminale ont été reconstitués dans des liposomes permettant la formation d'une boucle améliorant la présentation de l'antigène. Cette forme de présentation a été utilisée dans la constitution d'un vaccin à base de fragments

## CI. Madoulet et Coll.

β-amyloïde prévenant la formation d'une plaque de dépôts amyloïdes chez les souris jeunes et la progression de la plaque chez l'animal plus âgé [14] confirmant ainsi la capacité d'induire des auto-anticorps contre des peptides du soi. Les lipopeptides suspendus soit dans du PBS, dans PBSalum ou reconstitués dans des liposomes sans alum n'engendrent pas de lésion autoimmune dans les reins, foie, poumons, glandes surrénales et pancréas, 18 mois après l'immunisation. Cette formulation liposomes-lipopeptides-alum semble être la plus simple et la plus efficace permettant d'augmenter l'immunogénicité de nos lipopeptides. Le profil de réponse immunitaire des mpp 1, mpp 2, mpp 4 murins est identique à celui observé avec des antigènes comme l'hémocyanine de patelle (KLH) ou les globules rouges de mouton, qui présentent une réponse immunitaire maximale en IgG1, 38 jours après la première immunisation [29]. Le lipide A a été utilisé pour augmenter la réponse immunitaire contre des peptides incorporés dans le volume interne des liposomes [15] ou pour induire des anticorps contre des petites molécules comme le cholestérol [30]. Dans nos expériences, la préparation immune sans lipide A permet une meilleure réponse anticorps avec un titre plus important. Cette préparation sera bénéfique à l'hôte pour un développement thérapeutique futur. L'alum est un adjuvant efficace de la réponse immunitaire humorale couramment utilisé dans des vaccins humains contre la diphtérie ou encore le tétanos [31]. Cette augmentation de la réponse immunitaire existe surtout dans les vaccins utilisant des peptides linéaires avec des résidus di ou tripalmitoylés [32-34].

*In vitro*, les auto anticorps produits réduisent la résistance des cellules P 388R à la chimiothérapie. Pour la doxorubicine, les concentrations d'IgG1 anti- mpp 1, 2 et 4 à un taux inférieur à 4 ng/ml donnent les mêmes résultats de réversion que le vérapamil 3  $\mu$ M. Dans des études cliniques, la concentration maximale de vérapamil dans le sérum n'excède pas 2,2  $\mu$ M [35]. Pour la vinblastine, un effet révertant des anticorps induits est observé à la fois sur la cytotoxicité et le transport de vinblastine radiomarquée. Les expériences de cytotoxicité avec la vinblastine (50  $\mu$ M) montrent que l'incubation des cellules avec 1,2 % de sérum de

souris immunisées par Lp1 entraîne une inhibition de la résistance supérieure au vérapamil (3  $\mu$ M). Ces anticorps ont aussi une activité inhibitrice de l'efflux de vinblastine identique au vérapamil 3  $\mu$ M.

Les expériences in vivo montrent une augmentation de 77 % de la survie des souris immunisées par Lp1. D'autres auteurs [36] ont obtenu une augmentation de survie de 49 % avec la molécule S9788 (6-[4-[2, 2-di (4-fluorophényl)-éthylamino]-1-pipéridinyl]-N, N'-di-2-propényl-1, 3, 5triazine-2, 4-diamine) (100 mg/kg/jour). Nos protocoles d'immunisation n'engendrent pas de symptôme d'auto-immunité et une étude histologique met en évidence la présence de granulomes intra-péritonéaux due à l'alum (principalement au niveau du pancréas, de la rate et du foie) chez les souris immunisées et les contrôles. Bien que nous ne puissions pas expliquer complètement l'absence de lésions auto-immunes dans les tissus où la P170 est exprimée en grande quantité, il ne faut pas oublier que dans les organes avec des cellules sécrétrices, la P170 est présente à la face luminale des cellules ce qui réduit de manière significative l'accessibilité aux anticorps P170 circulants [37, 38]. Dans d'autres études, l'immunisation passive avec les anticorps monoclonaux MRK16 et UIC2 permet une meilleure incorporation des anticancéreux dans les cellules MDR [9, 39] et l'inhibition de l'activité P170 pourrait améliorer le pronostic des patients cancéreux [40, 41]. Le concept d'induire des auto-anticorps thérapeutiques par immunisation avec des lipopeptides synthétiques reconstitués dans des liposomes peut être étendu à d'autres protéines de surfaces telle que la MRP [42] ou des antigènes associés aux tumeurs comme c-erbB-2 [43].

En conclusion, nos résultats décrits ici nous font espérer que rompre la tolérance immunitaire contre des protéines du soi telles que MDR1,  $\beta$ amyloïde [14] ou MRP pourrait conduire à des traitements efficaces contre les cancers chimiorésistants ou la maladie d'Alzheimer.

# Aknowledgments

We would like to thank the "Association de la recherche contre le cancer" for financial support.

## Immunothérapie anti-tumorale contre la multidrogue résistance

# Références

- Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoproteinmediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 137-71.
- Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. Cancer Chemother Biol Resp Modif 1990; 11: 97-114.
- Chen C, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM *et al.* Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr-1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; 47: 381-9.
- Devault A, Gros P. Two members of the mouse mdr gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol* 1990; *10*: 1652-63.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce RS *et al.* Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990; 346: 362-5.
- 6. Roninson IB. The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 95-104.
- Hegmann EJ, Bauer HC, Kerbel RS. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells. *Cancer Res* 1992; 52: 6969-75.
- Schinkel AH, Smit JJ, Van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, Van Deemter L. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
- Schinkel AH, Arceci RJ, Smit JJ, Wagenaar E, Baas F, Dolle M et al. Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein. Int J Cancer 1993; 30: 55 (3), 478-84.
- Mechetner EB, Roninson IB, Efficient inhibition of Pglycoprotein mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5824-8.
- 11. Gros PH, Croop J, Housman D. Mammalian drug resistance gene : complete cDNA sequence indicates a strong homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells. *Cell* 1986 ; 47 : 371-80.
- 12. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, Van Deemter L *et al.* Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a

complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75: 451-62.

- Tosi PF, Radu D, Nicolau C. Immune response against the murine mdrl protein induced by vaccination with synthetic lipopeptides in liposomes. *Biochem Biophys Res Com* 1995; 212: 2, 494-500.
- 14. Nicolau C, Greferath R, Balaban ST, Lazarte JE, Hopkins RJ. A liposome-based therapeutic vaccine against β-amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002 ; 99 : 4, 2332-42.
- Richards RL, Hayre MD, Hockmeyzr WT, Alving CR. Liposomes, lipid A and aluminium hydroxide enhance the immune response to a synthetic malaria sporozoite antigen. *Infect Immun* 1988; 56: 682-6.
- Gros P, Buschman E. The mouse multidrug resistance gene family : Structural and functional analysis. *Int Rev Cyto* 1993 ; *137C* : 169-97.
- Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. J Am Chem Soc 1963; 85: 2149-54.
- Merrifield RB. Solid phase synthesis. Science 1986; 232: 341.
- Schnölzer M, Alewood P, Jones A, Alewood D, Kent SBH. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *Int J Peptide Protein Res* 1992; 40: 180-93.
- 20. Fries LF, Gordon DM, Richards RL, Egan JE, Hollingdale MR, Gross M et al. Liposomal malaria vaccine in humans : a safe and potent adjuvant strategy. Proc Natl Acad Sci USA 1992 ; 89 : 358-62.
- 21. Jiao H, Shen W, Ohe Y, Miura K, Tamura T, Saijo N. A new 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug-resistant cell lines *in vitro. Cancer Immunol Immunother* 1992 ; 35 : 412-6.
- 22. Grant S, Rausher F, Jakubowski A, Cadman E. Effect of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate on S-azacytidine metabolism in P388 and L1210 cells. *Cancer Res* 1981; 41: 410-4.
- Lum BL, Gosland MP, Kaibish S, Sikic BI. Molecular targets in oncology : implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* 1993 ; 13 : 88-109.
- Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990 ; 42 : 155-99.
- 25. Figueredo A, Arnold A, Goodyear M, Findlay B, Neville A, Normandeau R *et al*. Addition of verapamil and tamoxifen to the initial chemotherapy of small cell lung cancer. A phase I/II study. *Cancer* 1990 ; 65 : 1895-902.
- 26. Solary E, Caillot D, Chauffert B, Casasnovas RO, Dumas M, Maynadie M et al. Feasibility of using quinine, a potential multidrug resistance-reversing agent, in combination

with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemia. *Clin Oncol* 1992; *10*: 1730-6.

- 27. Trump DL, Smith DC, Ellis PG, Rogers MP, Schold SC, Winer EP *et al.* High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent : phase I trial in combination with vinblastine. *J Natl Cancer Inst* 1992 ; 84 : 1811-6.
- Beck WT, Danks MF. In: Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells (Roninson IB, Ed) 1991, 3-55, Plenum Press, New York.
- Hebell T, Ahearn JM, Fearon DT. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science* 1991; 254: 102-5.
- Swartz GM Jr, Gentry MK, Amende LM, Blanchette-Mackie EJ, Alving CR. Antibodies to cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 1902-6.
- 31. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis* 1980; 2: 370-83.
- 32. Watari E, Dietzschold B, Szokan D, Heber-Katz E. A synthetic peptide induces long-term protection from lethal infection with herpes simplex virus 2. J Exp Med 1987 ; 165 : 459-70.
- 33. Deres K, Schilf H, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 1989; 342: 561-4.
- 34. Bourgault I, Chirat F, Tartar A, Levy JP, Guillet JG, Venet A. Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. J Immunol 1994; 152: 2530-7.
- 35. Miller TP, Grogan TM, Dalton WSN, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 1991; 9: 17-24.

- 36. Pierré A, Dunn TA, Kraus-Berthier L, Leonce S, Saint-Dizier D, Regnier G *et al. In vitro* and *in vivo* circumvention of multidrug resistance by servier 9788, a novel triazinoaminopiperidine derivative. *Invest New Drug* 1992; *10*: 137-48.
- 37. Beck WT. Do anti-P-glycoprotein antibodies have a future in the circumvention of multidrug resistance? J Natl Cancer Inst 1991; 83: 19, 1364-6.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 385-427.
- 39. Broxterman HJ, Kuiper CM, Schuurhuis GJ, Tsuruo T, Pinedo HM, Lankelma J. Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 12, 2389-93.
- 40. Chan HSL, Grogan TM, Haddad G, Deboer G, Ling VP. P-glycoprotein expression : critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. J Natl Cancer Inst 1997 ; 89 : 22, 1706-15.
- Efferth T, Volm M. Antibody-directed therapy of multidrug-resistant tumor cells. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1992; 9:1, 11-9.
- 42. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Machie JE, Grant CE, Almquist KCN *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992 ; 258 : 1650-4.
- 43. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L *et al.* Phase II study of weekly intravenous recombinant humanised anti-p185 *HER2* monoclonal antibody in patients with *HER2*/neu-overexpressing metastatic breast. *J Clin Oncol* 1996 ; 14 : 737-44.



European Journal of Cancer 40 (2004) 606-613

European Journal of Cancer

www.ejconline.com

# Inhibition of multidrug resistance by immunisation with synthetic P-glycoprotein-derived peptides

C. Pawlak-Roblin<sup>a</sup>, P.-F. Tosi<sup>a</sup>, L. Perrin<sup>a</sup>, J. Devy<sup>a</sup>, L. Venteo<sup>a</sup>, P. Albert<sup>b</sup>, C. Nicolau<sup>c</sup>, C. Madoulet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>IFR53, UFR Pharmacie, 3 avenue du Maréchal Juin, 51096 Reims, Cedex, France <sup>b</sup>Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3306, UFR des Sciences, 51096 Reims Cedex, France <sup>c</sup>AC Immune PSE-EPFL, 1015 Lausanne, Switzerland

Received 22 July 2003; received in revised form 20 October 2003; accepted 21 November 2003

#### Abstract

Overexpression of the membrane glycoprotein (P170) represents the most common multidrug resistance (MDR) mechanism in cancer therapy. Specific auto-antibodies to extracellular loops 1, 2 and 4 of murine P170 were elicited in mice using palmitoylated synthetic peptides reconstituted in liposomes, with or without Lipid A, and resuspended in alum. IgM antibodies were detected 14 days following the first injection and IgG1 became predominant after the third challenge. Animals did not show any auto-immune symptoms or induced toxicity up to 18 months after the immunisation. Previous immunisations of mice using liposomes with MDR1 peptides increases the efficacy of chemotherapy treatments with doxorubicin and vinblastine against P388 R cells with increase of 77% in the survival half time in the immunised group. Sera from the immunised mice were also effective in reducing cellular resistance to vinblastine and doxorubicin *in vitro*. Taken together, these data suggest that this immunisation approach might have potential clinical applications.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Multidrug resistance (MDR); P-glycoprotein 170Kd (P170); Immunisation; Liposomes; Lipopeptides

## 1. Introduction

Multidrug resistance (MDR) of tumour cells is known to be responsible for treatment failures in cancer chemotherapy [1,2]. Overproduction of a glycoprotein, called P170, was found to correlate with the development of resistance phenotypes to a number of unrelated drugs, including anthracyclines, epipodophyllotoxins, vinca alkaloids, actinomycin D, and taxoid derivatives. In humans, the *mdr1* gene encodes a 1280 amino acid protein with two homologous halves, each comprising six putative transmembrane domains, and one nucleotide binding site [3,4]. This glycoprotein acts as an efflux pump on a wide variety of compounds that do not have either common chemical structures or common mechanisms of pharmacological action [5]. The mdr1 gene is expressed in all haematopoietic progenitor cells [6] and in many organs and tissues such as the liver, intestine, kidney, pancreas, blood-brain barrier and blood-testicular barrier [7,8]. This implies that in tumours arising from these tissues, resistance is intrinsic and chemotherapeutic treatments are poorly effective. In other cases, MDR is induced during treatment. Therefore, strategies have been developed in order to reverse the MDR phenotype. Indeed, successful reversal of MDR might improve the treatment approaches for different cancers. Experimental reversal of the mdr phenotype has been reported by chemical agents such as channel blockers (verapamil), calmodulin antagonists and different monoclonal antibodies specific to the human MDR1 [9]. Several of these monoclonal antibodies recognise epitopes of the loop 1 and one of the most efficient in mice is UIC2 [10].

The murine *mdr1* cDNA encodes a 1276 amino acid protein with a structure similar to its human homologue

*Abbreviations:* MDR, multidrug resistance; P 170, glycoprotein 170 Kd; mpp, murine palmitoylpeptides; Lp, liposomes; alum, aluminum hydroxide.

<sup>\*</sup> Corresponding author: IFR53, UFR Pharmacie, 3 avenue du Maréchal Juin, 51096 Reims Cedex, France. Tel.: +33-03-2691-3732; fax: +33-03-2691-3730.

E-mail address: claudie.madoulet@univ.reims.fr (C. Madoulet).

<sup>0959-8049/\$ -</sup> see front matter  $\odot$  2003 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.ejca.2003.11.019

[11]. Sequences of mouse and human P170 are 80% homologous, with the strongest homology occurring in the intra-cytoplasmic part of the protein, whereas extracellular sequences differ significantly [3]. Three mdr genes have been sequenced and characterised: mdr1 (or mdr1a), mdr3 (or mdr1b) and mdr2 [12]. Among these isoforms, mdr1 and mdr3 are both active for the transport of anticancer drugs, whereas mdr2 is not.

We showed previously that immunisation of mice with external sequences of the murine mdr1 P170 elicited antibodies that are specific to extracellular epitopes of the protein capable of reverting *in vitro* the MDR phenotype of L1210-resistant cancer cells [13]. Such a strategy of breaking the immune tolerance to the selfprotein was shown to be effective *in vivo* against  $\beta$ -amyloid plaques on the pancreas in transgenic NORBA mice [14].

In the present study, we aimed to investigate further the *in vivo* effectiveness of immunisation with synthetic peptides mimicking extracellular loops of murine P170 reconstituted in liposomes, without or with lipid A [15]. We hoped not only to break the immune tolerance towards the *MDR1* protein, but particularly to induce the most efficient antibodies possible, therefore we analysed the kinetics of the different isotypes.

### 2. Materials and methods

# 2.1. Synthetic palmitoylpeptides

The palmitoylpeptides (Table 1) corresponding to sequences of the extracellular loops 1 (mpp 1), 2 (mpp 2) and 4 (mpp 4) of the *mdr1* P170 [13,16] have been synthesised on an Applied Biosystems 430A peptide synthesiser using the tertiobutyloxycarbonyl/benzyl chemistry [17,18] and *in situ* (N-[(1H-benzotriazol-1-yl) (dimethylamino) methylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide activation [19]. Each peptide coupled with 4 palmitic acid molecules was analysed by mass spectrometry: mpp 1,  $[M+H]^+$ ,

calculated (calcd): 5436, found (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization-Time of Flight, MALDI-TOF): 5437. mpp 2,  $[M+H]^+$  calcd: 3293, found (Plasma Desorption Mass Spectrometry-Time of Flight: PDMS-TOF): 3293. mpp 4,  $[M+H]^+$  calcd: 3190, found (PDMS-TOF): 3188. The peptides were also analysed by amino acid analysis following hydrolysis of an aliquot in HCl 6N/phenol at 110 °C. Results (expected/found) were as follows:

mpp 1, A (2/1.5), D (5/4.4), E (5/6.6), F (1/0.6), G (4/ 3.4), I (4/3.6), K (4/4.0), L (3/3.5), M (1/0.7), P (2/1.8), T (4/3.0), S (8/7.4).

mpp 2, A (2/2.3), D (1/1.2), E (2/2.4), F (1/1.0), G (2/ 2.1), K (6/6.0), L (2/2.1), S (1/0.9), V (1/1.0), Y (1/1.0). mpp 4, D (5/5.0), E (3/3.1), G (2/2.0), K (4/3.7), S (1/ 0.9), R (2/1.9).

## 2.2. Immune formulation

Liposomes were prepared by mixing dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) and cholesterol (Avanti Polar lipids, Alabaster, Alabama) at the molar ratios of 0.9; 0.1; 0.7, respectively. Monophosphoryl lipid A (MPLA) (List Biologicals, Campbell, California) was added at a concentration of 40 µg per µmole of phospholipids [20]. Three suspensions of liposomes were prepared: Lp 1: DMPC, DMPG, cholesterol, palmitoylpeptides; Lp 2: DMPC, DMPG, cholesterol and Lp 3: DMPC, DMPG, cholesterol, palmitoylpeptides, MPLA. The 3 palmitoylpeptides (mpp 1, mpp 2, mpp 4) were mixed in a constant 1/250 molar ratio with phospholipids. After evaporation of the solvent, the lipids were dried in a vacuum dessicator. The resultant film after hydration with sterile phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4) was adjusted to a final phospholipid concentration of 4 mM. For the second and third immunisations, each batch of liposomes was kept frozen. Before the injection, the liposome suspension was mixed volume-to-volume with 0.1 ml of sterile Alum provided by Pasteur Merieux (Marcy L'Etoile, France).

Table 1

AA sequences of the synthetic lipopeptides corresponding to extracellular loops 1, 2 and 4 of the P170 mdr1

AA sequences	AA number
K-G-GNMTDSFTKAEASIVLPSITNQSGPNSTLIISNSSLEEE-G-K-K-NH2 1 2 3 4	43
K-G-KVLTSFTNKELQAYAK-G-K-K-NH2	21
K-G-SRDDDMETKRQNEN-G-K-K-NH2	19
	AA sequences K-G-GNMTDSFTKAEASIVLPSITNOSGPNSTLIISNSSLEEE-G-K-K-NH2 2 3 4 K-G-KVLTSFTNKELQAYAK-G-K-K-NH2 K-G-SRDDDMETKRQNEN-G-K-K-NH2

AA, amino acid. Each peptide was coupled with 4 palmitic acids to obtain the murine palmitoylpeptides (mpp 1, mpp 2 and mpp 4). The sequences and potential glycosylation sites (in 4 boxes) are from Ref. [11]. The regions with a higher probability for induction of an immune response are overlined.

## 2.3. Immunisation protocol

Groups of 9 B6D2F1 female mice (Iffa Credo, L'Arbresle, France) weighing 19–22 g were immunised by 3 intraperitoneal (i.p.) inoculations at two week intervals with 200  $\mu$ l of the different immune preparations. Blood samples were collected between 7 and 12 days after each immunisation by bleeding from the retro-orbital plexus. Each sample was processed and the sera were separated and stored at 4 °C for the Ig assay for less than 4 days.

#### 2.4. Immune response analysis

Each serum sample was incubated in the presence of nitrocellulose adsorbed palmitoylpeptides as previously described in Ref. [13]. Different immunoglobulins (IgM, IgG3, IgG2a, IgG2b, IgG1) were detected by using a secondary antibody covalently linked with peroxidase (The Binding Site, Grenoble, France). The activity was detected using enhanced chemiluminescence (ECL<sup>TM</sup>) reagents (Amersham Pharmacia Biotech Buckinghameshire, England) by exposure to Kodak X-O MAT film (Sigma). Films were scanned using a densitometer and concentrations were estimated from standard dilutions of purified Ig (M, G3, G2a, G2b, G1) from The Binding Site.

### 2.5. In vitro activity of the elicited antibodies

Murine lymphoid neoplasm P 388R cells (provided by G. Atassi, Laboratoire Servier, Courbevoie, France) were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and treated with 10  $\mu$ M doxorubicin (Sigma). For cytotoxicity assays, cells (45×10<sup>3</sup>) were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% carbon dioxide/95% air and incubated with sera

(0.6; 0.3; 0.15% dilution in RPMI, 10% FBS) for one hour at 37 °C and then grown for 48 h with serial dilutions of doxorubicin (DXR) or vinblastine (VLB) 50  $\mu$ M in medium. Cell viability was estimated by the colorimetric dimethylthiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test [21]. To compare the effect of the elicited antibodies, verapamil (Sigma) was used as a reference modulator of resistance and cell viability and was analysed under the same conditions.

## 2.6. Uptake of $[^{3}H]$ -vinblastine

 $1.6 \times 10^6$  cells in 400 µl RPMI with 10% FBS were incubated at 37 °C for 1 h, with or without effector (VLB or sera of immunised mice), then introduced in siliconed glass tube to 2 µCi of [<sup>3</sup>H-VLB] (Amersham, Saclay, France) and non-radioactive VLB (final concentration 1µM) at an identical temperature [22]. After 30 min, 100 µl of the cell suspension was pipetted into plastic tubes containing 50 µl of 6% perchloric acid solution overlaid by 100 µl phtalate-ester mixing. Tubes were immediately centrifuged at 13000g for 30 seconds and frozen in liquid nitrogen. Tubes were bisected, the bottom half was immersed in 5 ml of formula 963 (New England Nuclear) scintillation fluid and radioactivity was determined in a LKB scintillation spectrometer. Results were expressed as pmoles of VLB per 10<sup>6</sup> cells and as a percentage of incorporation in comparison with P 388R cells incubated with control immune sera (IS Lp 2).

# 2.7. In vivo evaluation of the immune formulations

Groups of 9 mice preimmunised either by Lp 1 or Lp 2 received by i.p. injection 10<sup>6</sup> P 388R cells on day zero. On days 1, 10 and 22, each mouse was injected with DXR 5.5 mg/kg and on days 4, 14 with VLB at 2.5 mg/kg. During that period, eating, drinking, alertness and



Fig. 1. Antibody titre in the sera of mice as a function of immunisation time (1st, 2nd, 3rd injection). a, Lp 1 (liposomes, palmitoylpeptides, alum); b, Lp 3 (liposomes, lipid A, palmitoyl-peptides, alum). For both figures, the anti-mpp 1 ( $\square$ ), -mpp 2 ( $\blacksquare$ ), -mpp 4 ( $\blacksquare$ ) were quantified and the different isotypes detected by using secondary antibodies specific to murine Ig (M, G3, G2a, G2b, G1). Each histogram represents an average of the values obtained from sera of 5 mice bled 12 days after immunisation. One unit corresponds to 0.2 µg Ig/ml. standard deviations (SD) are not shown, they varied between 5 and 25%.

weight were noted and survival was also recorded. Before injection with P 388R cells, sera obtained between 15 to 45 days after the third immunisation were used to quantify the anti-P170 antibodies and check their activity. These experiments were conducted following the animal care and use rules of the European Community.

## 2.8. Histopathological studies

Mice were sacrified 13 months after the last immunisation and their organs (kidneys, adrenal glands, pancreas, spleen, liver, heart, lung, ovary) were removed and fixed in neutral-buffered formalin. Histopathology studies were done on 3  $\mu$ m sections of paraffin-embedded organs stained with haematoxylin-eosin.

# 3. Results

# 3.1. Induction of the humoral immune response following administration of the different formulations

Three different immune formulations were prepared: Lp 1, Lp 2 and Lp 3. In order to quantify the antibodies specific to mpp 1, mpp 2, mpp 4 and determine their isotypes, we used to dot blot assay. The sera of mice immunised with control preparation Lp 2 were used as controls for the antibodies e.g. IgM, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgG1. The responses of animals immunised with Lp 1 or Lp 3 are shown in Fig. 1a and b. The preparations Lp 1 and Lp 3 after i.p. inoculation in mice, elicited IgM after the first injection. The response became predominantly IgG2b and IgG3 for Lp 1 (Fig. 1a) and IgG2b for Lp 3 (Fig. 1b) after the second injection. The titre of IgG1 shows a maximum after the third challenge for both formulations and is 65% higher in mice immunised with Lp 1. Among the titres of IgG1 antibodies induced against the different palmitoylpeptides, mpp 2 is 2.6- and 2-fold more immunogenic than mpp 1 or mpp 4, respectively. The percentage of sera with detectable antibodies against these palmitoylpeptides varied from 66 to 100%. Thus, it appears that the simplified immune formulation (Lp 1) is more efficient than the same immune preparation with lipid A (Lp 3). and these results were reproducible in 3 experiments. Using the same controls as described in Ref. [13] (flow cytometry and Western Blot analysis) indicated that the Lp 1 formulation is sufficient to reproducibly elicit polyclonal anti-P170 antibodies.

The same palmitoylpeptides were used after ten months of storage at -20 °C, to prepare a new batch of Lp 1 formulation. The immune response elicited was similar, despite the fact that antibodies specific to mpp 2 were detected in only 40% of the animals. To evaluate the potential side-effects of Lp 1 immunisation, we compared the weight and the behaviour of the immunised mice, during the 18 months after the last immunisation. During this period, the mean weight of mice immunised by 3 differents batches of immune preparation showed intergroups variations of less than 3% (data not shown) and the animals did not present with any modifications in their behaviour (i.e. eating, drinking, alertness).

Organs that express P170 (spleen, liver, kidneys, adrenal glands, pancreas, ovary, heart, lung) originating from the mice treated with the different formulations were subjected to histopathological study. We found that no intra-organic lesion or lymphocyte/monocyte infiltration in the organs investigated. However, peritoneal granulomas, mainly in the pancreas, adrenals, spleen (in 80% of the mice), and rarely in the liver (20%), was detected in both Lp 1- and Lp 2-immunised animals (Fig. 2).



Ing. 21. Instological leatures of organs obtained nom line minumsets by anti-P170 (a, c, e, g) or control immunisations (b, d, f, h). Haematoxylin-eosin-stained paraffin sections show: (a) a granulomatous lesion at the surface of the liver, (b) granulomas situated under the capsule of the liver with microcalcifications (arrows), (c, d) granulomas located in the adipose tissue surrounding adrenal gland, (e) granulomatous lesions in the perisplenic adipose tissue, (f) some isolated giant cells in the spleen, (g) numerous epithelioid cell granulomas present in the peripancreatic fat tissue, (h) detail of a peripancreatic granuloma. Scale bar, 100  $\mu$ m. These are representative fields of organs with the most lesions and the same mice; other organs were normal.

3.2. In vivo effect of the immune formulation on the effectiveness of chemotherapy against lymphoid neoplasms in mice

Previously immunised mice were injected with P 388R cells and injections of doxorubicin and vinblastine were performed as described in the methods (Fig. 3). Before the injection, antibody titres in the sera of mice inoculated by Lp 1 were measured: 100%, 40% and 80% of the sera presented IgG1 anti-mpp 1, 2 and 4, respectively with average values of 0.30, 0.21 and 0.33  $\mu$ g/ ml.

During treatment, the weight of the mice was measured. There was no significant weight loss in the treated mice. Mean survival time of mice immunised with Lp 1 was 39 days compared with 22 days for the control group (Fig. 3). In the Lp 2 group, we observed one mouse which survived after 70 days. From this observation, we can conclude that this animal is in cancer remission after chemotherapy treatment. Fig. 3 shows that the maximal effect of the immune formulation occurs 22 to 62 days after the injection of the P 388R cells. Haematocrit and haemoglobin concentrations



Fig. 3. Survival time of mice immunised by Lp 1 ( $\blacklozenge$ ) and Lp 2 ( $\blacksquare$ ). At day zero, 10<sup>6</sup> P 388R cells ( $\uparrow$ ) were inoculated intraperitoneally (i.p.). At day 1, 10, 22, doxorubicin 5.5mg/kg ( $\uparrow$ ) and on day 4 and 14, vinblastine 2.5mg/kg ( $\downarrow$ ) were injected.



Fig. 4. Cytotoxicity induced by doxorubicin on P 388R cells in the presence of reversal agents: Control  $(-\bullet-)$ ; VRP: verapamil 3  $\mu$ M  $(-\bullet-)$ ; Average of 5 sera from Lp 1-immunised mice (IS Lp 1) at different concentrations (---): IS Lp 1 0.6%; ----: IS Lp 1 0.3%; -x--: IS Lp 1 0.15%). The shaded area corresponds to the variation in cell survival following incubations with IS Lp 2 (control liposomes) at concentrations of 0.15, 0.3 and 0.6%. *Points*, mean of triplicate determinations.

were unchanged in the immunised animals compared with the control mice (data not shown).

# *3.3.* In vitro *anti-MDR activity of the Lp 1-elicited antibodies*

The cytotoxicity induced by doxorubicin in the P 388R cells was evaluated in the presence of verapamil and sera from Lp 1-immunised mice. In order to characterise the anti-MDR activity of the elicited antibodies, the effect of concentrations of anti-P-170 sera on the drug resistance of P 388R cells was analysed. The most efficient serum concentration was 0.6%, with an inhibitory activity similar to 3  $\mu$ M verapamil (Fig. 4). After conducting cytotoxicity experiments with 50  $\mu$ M vinblastine, we observed that incubation with sera of Lp 1-immunised mice at a concentration of 1.2% induced an inhibition of resistance twice that of 3  $\mu$ M verapamil (Fig. 5).



Fig. 5. Percentage of cell death induced by vinblastine (VLB) (50 µM) on P 388R cells in the presence of reversal agents: VRP 3 µM; sera (IS) of Lp 1-immunised mice 1.2% (average of triplicate measurements on 5 different sera).



Fig. 6. Uptake of radiolabelled vinblastine [<sup>3</sup>H-VLB] by P 388R cells incubated in the presence of 3  $\mu$ M VRP or sera of mice immunised by Lp 1 or Lp 2. From eight sera of Lp 1-immunised mice, two groups were determined IS Lp 1 active (6 sera) and not-active (2 sera).

To extend these results, the uptake of radiolabelled vinblastine [<sup>3</sup>H-VLB] by P 388R cells incubated in presence of verapamil and sera of mice immunised with Lp 1 or Lp 2 was assayed (Fig. 6). From 8 sera immunised with Lp 1 that were tested, 6 had an inhibitory effect on the VLB efflux that was similar to that observed with 3  $\mu$ M verapamil.

## 4. Discussion

Reversal of MDR by pharmacological substances, e.g. calcium channel blockers, calmodulin inhibitors, local anaesthetics has been attempted [23]. However, clinical studies have shown that MDR modulators often have intolerably high toxic side-effects in humans and that therapeutic concentrations of MDR-modifiers can rarely be achieved in clinical practice [24-27]. A large number of multidrug-resistant cells overexpressing P170 have been described, their specific drug resistance profiles being quite heterogeneous [28]. In order to overcome MDR, antibody-directed approaches for the eradication of MDR cells have been developed. Data presented here clearly show the first demonstration of the effectiveness of an anti-P170 immunisation strategy in vivo. This fits with our previous data showing that palmitoylpeptides mimicking the external loops of the murine mdr1 P170 reconstituted in liposomes containing lipid A elicited a strong immune response in mice and that sera from these mice were able to inhibit P170 activity in L1210 (MDR) cells in vitro [13].

For the anti-P170 immunisation, palmitoylpeptides with two palmitoyl chains at the amino- and carboxyterminus of the peptide have been reconstituted in the liposome bilayer allowing a "loop" presentation of the antigen. This form of presentation of a  $\beta$ -amyloid fragment has also been used in a vaccine preventing amyloid plaque formation in young mice and plaque progression in older animals [14] confirming the capacity of inducing auto-antibodies to such self-peptides. Palmitoylpeptides, resuspended either in PBS or in PBS-Alum or reconstituted in liposomes without Alum, did not induce any auto-immune lesions in the kidney, liver, lung, adrenals and pancreas, up to 18 months after immunisation. It appears that the formulation liposomes-palmitoylpeptides-Alum is the most efficient and simplest to enhance the immunogenicity of our palmitoylpeptides. The profile of the immune response to the murine mpp 1, mpp 2, mpp 4 was similar to that observed with antigens like keyhole limpet haemocyanin or sheep erythrocytes, which presented a maximal IgG1 immune response 38 days after the first immunisation [29]. Lipid A had been used to enhance the immune response against peptides incorporated in the internal volume of liposomes [15] or to induce antibodies against small molecules such as cholesterol [30]. In our experiments, the immune preparation without lipid A elicited a higher antibody response and for future therapeutic development avoiding bacterial lipopolysaccharide (LPS) would be beneficial to the host. Alum has been described as an efficient adjuvant of the humoral immune response and is currently used in several human diphteria and tetanus vaccines [31]. Interestingly, enhancement of the cellular immune response has been described in vaccines using foreign linear peptides anchored by di- or tri-palmitoyl residues [32–34].

The anti-MDR antibodies induced a reduction in the resistance of P 388R cells to doxorubicin and vinblastine *in vitro*. For doxorubicin, concentrations of IgG1 anti-mpp 1, 2 and 4 as low as 4 ng/ml led to the same results as 3  $\mu$ M verapamil. In clinical studies, the medium peak serum concentration of verapamil can not exceed 2.2  $\mu$ M [35]. For vinblastine, a similar potent effect for the antibodies was observed, both in cytotoxicity and uptake of radioactive studies. When 3  $\mu$ M verapamil was used as a control revertant, its activity was decreased in presence of 50  $\mu$ M vinblastine, whereas uptake experiments confirmed an efficient reversal of resistance.

The in vivo experiments showed a 77% increase in the survival time of the immunised mice. Other authors [36], using a chemical model, obtained an increase in survival half time of only 49% with S9788 (6-[4-[2, 2-di (4-fluorophenyl)-ethylamino]-1-piperidinyl]-N, N'-di-2-propenyl-1, 3, 5-triazine-2, 4-diamine) (100 mg/kg/day). While no auto-immune symptoms were detected, our histopathological results showed peritoneal granulomas (principally in the vicinity of the pancreas, spleen and liver) in mice immunised both with control and anti-P170 immune preparations. Studies in our laboratory have shown that 3 i.p. injections of Alum alone can result in the development of similar lesions (data not shown). While we can not explain completely the lack of autoimmune lesions in tissues where P170 is abundantly expressed, it must be noted that in organs with secretory cells, P170 is present mainly at the luminal face of the cells, thus significantly reducing its accessibility to circulating anti-P170 antibodies [37,38]. The absence of LPS in the immune formulation may reduce the risk for inducing other auto-antibodies.

In other studies, passive immunisation with the monoclonal antibodies, MRK16 and UIC2, led to an increase in the uptake of anticancer drugs in MDR cells [9,39], and according to previous reports, inhibition of P170 activity might improve the prognosis of cancer patients [40,41]. The concept of eliciting therapeutic "auto-antibodies" by immunisation with synthetic lipopeptides reconstituted in liposomes might extended to other cell surface proteins such as the MRP glycoprotein [42] or tumour-associated antigens such as c-erbB-2 [43] provided that no auto-immune disease results from this therapy. From the results described herein, we

expect that breaking the immune tolerance to specific self-proteins such as MDR1,  $\beta$  amyloid [14] or MRP could lead to effective treatments against defined diseases such as chemoresistant cancers or Alzheimers.

### Acknowledgements

We thank L. Bourel, O. Melnyck, Pr H. Gras-Masse (Institut Pasteur de Lille, France) for the synthesis of the lipopeptides and Pr. Pluot for the histopathological studies. This work was supported by the région Champagne-Ardenne for P. F Tosi and by a grant from Astra Zeneca (Reims, France).

#### References

- Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989, 58, 137–171.
- Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. Cancer Chemother Biol Resp Modif 1990, 11, 97–114.
- Chen C, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr-1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986, 47, 381–389.
- Devault A, Gros P. Two members of the mouse mdr gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol* 1990, **10**, 1652–1663.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, et al. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990, 346, 362–365.
- 6. Roninson IB. The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1992, **43**, 95–104.
- Hegmann EJ, Bauer HC, Kerbel RS. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells. *Cancer Res* 1992, **52**, 6969–6975.
- Schinkel AH, Smit JJ, Van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, Van Deemter L. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994, 77, 491–502.
- Schinkel AH, Arceci RJ, Smit JJ, et al. Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein. Int J Cancer 1993, 30, 478–484.
- Mechetner EB, Roninson IB. Efficient inhibition of P-glycoprotein mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 89, 5224–5228.
- Gros PH, Croop J, Housman D. Mammalian drug resistance gene: complete cDNA sequence indicates a strong homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells. *Cell* 1986, 47, 371–380.
- 12. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, *et al.* Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993, **75**, 451–462.
- Tosi PF, Radu D, Nicolau C. Immune response against the murine mdr1 protein induced by vaccination with synthetic lipopeptides in liposomes. *Biochem Biophys Res Com* 1995, 212, 494– 500.
- Nicolau C, Greferath R, Balaban ST, Lazarte JE, Hopkins RJ. A liposome-based therapeutic vaccine against β-amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002, **99**, 2332–2342.

- Richards RL, Hayre MD, Hockmeyzr WT, Alving CR. Liposomes, lipid A and aluminium hydroxide enhance the immune response to a synthetic malaria sporozoite antigen. *Infect Immun* 1988, 56, 682–686.
- Gros P, Buschman E. The mouse multidrug resistance gene family: structural and functional analysis. *Int Rev Cyto* 1993, 137C, 169–197.
- 17. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. J Am Chem Soc 1963, 85, 2149–2154.
- 18. Merrifield RB. Solid phase synthesis. Science 1986, 232, 341.
- Schnölzer M, Alewood P, Jones A, Alewood D, Kent SBH. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *Int J Peptide Protein Res* 1992, 40, 180–193.
- Fries LF, Gordon DM, Richards RL, et al. Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89, 358–362.
- Jiao H, Shen W, Ohe Y, Miura K, Tamura T. SaijoN. A new 3-(4,5-dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug-resistant cell lines *in vitro. Cancer Immunol Immunother* 1992, **35**, 412–416.
- Grant S, Rausher F, Jakubowski A, Cadman E. Effect of *N*-(phosphonacetyl)-L-aspartate on S-azacytidine metabolism in P388 and L1210 cells. *Cancer Res* 1981, 41, 410–414.
- Lum BL, Gosland MP, Kaibish S, Sikic BI. Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* 1993, 13, 88–109.
- Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990, 42, 155–199.
- Figueredo A, Arnold A, Goodyear M, et al. Addition of verapamil and tamoxifen to the initial chemotherapy of small cell lung cancer. A phase I/II study. Cancer 1990, 65, 1895–1902.
- Solary E, Caillot D, Chauffert B, *et al.* Feasibility of using quinine, a potential multidrug resistance-reversing agent, in combination with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemia. *Clin Oncol* 1992, **10**, 1730–1736.
- Trump DL, Smith DC, Ellis PG, et al. High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent: phase I trial in combination with vinblastine. J Natl Cancer Inst 1992, 84, 1811– 1816.
- Beck WT, Danks MF. In Roninson IB, ed. Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells. New York, Plenum Press, 1991, 3–55.
- Hebell T, Ahearn JM, Fearon DT. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science* 1991, 254, 102–105.
- Swartz Jr. GM, Gentry MK, Amende LM, Blanchette-Mackie EJ, Alving CR. Antibodies to cholesterol. *Proc Natl Acad Sci* USA 1988, 85, 1902–1906.
- 31. Edelman R. Vaccine adjuvants. Rev Infect Dis 1980, 2, 370-383.
- Watari E, Dietzschold B, Szokan D, Heber-Katz E. A synthetic peptide induces long-term protection from lethal infection with herpes simplex virus 2. *J Exp Med* 1987, **165**, 459–470.
- Deres K, Schilf H, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. Nature 1989, 342, 561–564.
- Bourgault I, Chirat F, Tartar A, Levy JP, Guillet JG, Venet A. Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. J Immunol 1994, 152, 2530–2537.
- 35. Miller TP, Grogan TM, Dalton WSN, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 1991, **9**, 17–24.
- Pierré A, Dunn TA, Kraus-Berthier L, et al. In vitro and in vivo circumvention of multidrug resistance by servier 9788, a novel triazinoaminopiperidine derivative. Invest New Drug 1992, 10, 137–148.

- Beck WT. Do anti-P-glycoprotein antibodies have a future in the circumvention of multidrug resistance? J Natl Cancer Inst 1991, 83, 1364–1366.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993, 62, 385–427.
- Broxterman HJ, Kuiper CM, Schuurhuis GJ, Tsuruo T, Pinedo HM, Lankelma J. Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1988, **37**, 2389–2393.
- 40. Chan HSL, Grogan TM, Haddad G, Deboer G, Ling VP.

P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1997, **89**, 1706–1715.

- Efferth T, Volm M. Antibody-directed therapy of multidrug-resistant tumor cells. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1992, 9, 11–19.
- Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992, 258, 1650–1654.
- 43. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanised anti-p185 HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast. J Clin Oncol 1996, 14, 737–744.