Université de Reims Champagne Ardenne UFR Pharmacie

2007

N°203

THESE

Présentée pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Spécialité : Biologie Moléculaire et Physiologie

Soutenue publiquement le 4 Juin 2007

Par

Lahcen EDDABRA

Né le 13 janvier 1978 à Jorf (Maroc)

Expression et fonctions de protéines impliquées dans la résistance et la sensibilité aux agents anticancéreux : Nouveaux substrats des protéines ABC et nouvelles cibles de l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique

Laboratoire d'Onco-Pharmacologie JE2428 IFR53 Biomolécule - 51, rue Cognacq Jay 51096 Reims Cedex

Membres du Jury

Rapporteurs :	Monsieur le professeur Jean Pierre Marie (Paris	
	Monsieur le docteur Jean Bénard (Villejuif)	
Examinateurs :	Monsieur le professeur Jean François Riou (Reims)	
	Monsieur le docteur Jean Louis Mergny (Paris)	
Directeur de thèse :	Monsieur le docteur Hamid Morjani (Reims)	

Remerciements

Je voudrais remercier Monsieur Docteur Hamid Morjani, de m'avoir guidé dans ce travail pendant ces quatre années avec beaucoup de rigueur. Soyez assuré de ma respectueuse et profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-François Riou pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire JE Onco-Phramacologie et permis d'effectuer ce travail. Soyez assuré de mon plus profond respect

Je remercie vivement Monsieur le Docteur Jean Bénard et Monsieur le professeur Jean-Pierre Marie d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères

Je remercie également Monsieur le Docteur Jean-Louis Mergny, d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Recevez ici mes plus sincères remerciements.

Je remercie Madame Pascale Cornillet-Lefebvre pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie Monsieur Bouchaib Lamkhioued pour son aide et ses conseils.

Je remercie également tous les membres de la JE Onco-Pharmacologie.

Je voudrais remercier ma famille pour tout ce qu'elle a fait pour moi.

Enfin, Je voudrais remercier tous mes amis (Hassan, Mourad, Youssef, Rachid, Saïd, Mohamed, Karima, Nassima.....) pour leurs soutiens durant toutes ces années, pour leurs conseils et aides précieuses apportées lors de la réalisation de ce mémoire.

Abréviations

ABD :	ATP Binding Domain	
Abl :	Ableson	
ADN:	Acide désoxyribonucléique	
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire	
ALT :	Alternative Lengthening of Telomeres.	
ARNm :	Acide ribonucléique messager	
ATP :	Adénosine triphosphate	
Bcr :	Breakpoint cluster region	
BCRP :	Breast Cancer Resistance Protein	
BER :	Base excision repair	
BLM :	Bloom	
BSA:	Sérum albumine bovine	
DMSO :	Diméthylsulfoxide	
DOX :	Doxorubicine	
ERE :	Estrogen Response Element	
GSH :	Glutathion	
GST :	Glutathion S-transférases	
GUS:	β-glucouronidase	
HIF-1:	Hypoxia-Inducible Factor 1	
hTERT:	human TElomerase Reverse Transciptase	
hTR:	human Telomerase RNA	
IFN :	Interféron α	
kDa :	kiloDalton	
LAL:	Leucémie Aiguë Lymphoblastique	
LMC :	Leucémie Myéloïde Chronique	
LRP :	Lung Resistance related Protein	
MDR :	Multidrug resistance	
MMR :	MisMatch Repair	
MRP :	Multidrug Resistance-associated Protein	
MSD1 :	Membrane-Spanning Domains 1	

MTT :	(3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2, 5-diphényltétrazolium	
bromide)		
NBD:	Nucléotide Binding Domain	
NER :	Nucleotide Excision Repair	
NHEJ :	Non-Homologous End-Joining	
PDGF:	Platelet-Derived Growth Factor	
Pgp:	P-glycoprotéine	
POT1:	Protection Of Telomeres 1	
ROS:	Reactive Oxygen Species	
SDSA :	Synthesis Dependent Strand Annealing	
SNC :	Système Nerveux Nentral	
SSA :	Single Strand Annealing	
SVF:	Sérum foetal de veau	
TBP:	TATA-box Binding Protein	
TM :	Transmembrane Domain	
TRAP:	Telomeric Repeat Amplification Protocol	
TRF1 et TRF2:	Telomeric Repeat binding Factor 1 et 2	

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
DONNEES BIBLIOGRAPHIOUES	14
I. RESISTANCE PLEIOTROPIQUE ET PHENOTYPE MDR	
I.I. Concept de résistance pléiotropique	
1.2. Mécanismes de résistance pléiotropique	15
1.2.1. Augmentation de l'activité de réparation des lésions de l'ADN	
I.2.2. 1 dierance accrue aux lesions de l'ADN	18
I.2.3. Regulation negative du signal d'apoptose I 2 4. Mécanisme en amont de la cible cellulaire	19
II TRANSPORTEURS ABC HUMAINS IMPLIQUES DANS LE PHENOTYPE MDR	
II 1 Transports membranaires	23
II 2. P-gyconrotéine (Pgn)	25
II.2.1. Découverte	
II.2.2. Classification	
II.2.3. Structure du gène MDR1	
II.2.4. Structure de la Pgp	27
II.2.5. Modifications post-traductionnelles	27
II.2.6. Polymorphismes de la Pgp	
II.2.7. Fonctions physiologiques	
II.2.8. Substrats de la Pgp	
II.5. MKPS (Multidrug Resistance-associated Proteins)	
II.5.1. Decouverte de la MRP1	
II.3.3. Modifications post-traductionnelles	
II.3.4. Localisation subcellulaire et tissulaire de la MRP1	
II.3.5. Fonctions physiologiques	
II.3.6. Substrats de la MRP1	
II.3.7. Rôle de la MRP1 dans le phénotype MDR et signification clinique	
II.3.8. Famille des protéines MRP	35
II.4. BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)	
II.4.1. Découverte de la BCRP	
II.4.2. Structure du gène BCRP et les éléments de régulation de son expression	
II.4.3. Structure de la BCRP	
II.4.4. Localisation centrate et ussulaire II 4.5. Substrate de BCPP	
II 4.6 Polymorphisme de la BCRP	
II.4.7. Rôle de la BCRP dans le phénotype MDR et signification clinique	
II. 5. Réversion du Phénotype MDR.	
II.5.1. Modulation de l'expression des gènes MDR	
II.5.1.1. Stratégie antisens	
II.5.1.2. Stratégie anti-gène	45
II.5.2. Chimio-modulateurs	45
III- LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE	
III.1. Définition	
III.2. Evolution de la LMC	
III.3. Structure du BCR-ABL	49
III.4. Activité de BCR-ABL et voie de transduction du signal	50
III.5. Traitement de la leucémie myéloïde chronique	52
III.6. Mécanismes de résistance à l'imatinib	53
III.6.1. Mutation de BCR-ABL	54
III.6.2. Réactivation de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL	
III.6.3. Transporteurs ABC (Pgp et BCRP)	
III.0.4. Activation d'autres voies de survie	
IV. IELUWIEKE EI INSTADILITE GENUWIQUE DANS LES CELLULES DE LEUCEMIE MYELU CUDONIQUE	
UN 1 Los tálomàros	
IV 2 Tálomárasa	/ 5 حو
IV.2. I CIOINETASE	

IV.3. Localisation de la télomérase	60
IV.4. Protéines fixant les répétitions télomériques	61
V.5. Protéines de réparation des liaisons de l'ADN et maintien du télomère	
IV.6. La télomérase dans les cellules hématopoïétiques	
IV.7. Le télomère dans la leucémie myéloïde chronique	
IV.8. Implications des protéines de réparation dans l'instabilité génomique observée dans les cellul	es LMC
	67

MATERIELS ET METHODES	70
I. MATERIELS	71
L1. Effecteurs pharmacologiques	
I.1.1. Mitoxantrone	
I.1.2. Etoposide	72
I.1.3. Doxorubicine	73
I.1.4. Imatinib	73
I.2. Inhibiteurs et modulateurs de la résistance MDR	74
I.2.1. LY294002	75
I.2.2. Novobiocine	75
I.2.3. Fumitremorgine C	76
I.2.4. GG918	76
I.2.5. Buthionine sulfoximine	77
I.2.6. LY402913	78
I.2.7. Probénecide	78
I.3. Fluorochromes	79
I.3.1. Hoechst33342	79
I.3.2. Rhodamine 123	79
I.4. Lignées cellulaires	80
I.4.1. Lignées MCF7	80
I.4.2. Lignées 2008	80
I.4.3. Lignées HEK293	81
I.4.4. Lignées K562	81
I.4.5. Lignées HL60	82
I.5. Conditions de culture	82
I.6. Conservation des cellules	83
II. METHODES	83
II.1. Test MTT	83
II.2. PCR quantitative en temps réel	84
II.2.1. Principe	84
II.2.2. Recherche des amorces	85
II.2.3. RT-PCR en temps réel	86
II.3. Analyse de l'expression des protéines par western blot	87
II.4. Cytométrie en flux	88
II.4.1. Principe	88
II.4.2. Détection des protéines BCRP, Pgp et MRP1 par cytométrie en flux	91
II.4.3. Mesure de l'accumulation de la mitoxantrone, Hoechst33342 et Rhodamine123 par cytométrie en flux	92
II.5. Accumulation et efflux de l'etoposide	92
II.6. Immunofluorescence	93
II.6.1. Fixation au PaF 4%	93
II.6.2. Marquage	93
II.6.3. Visualisation	94
II.7. Microscope confocal	94
II.7.1. source de lumière	94
II.7.2. Système de balayage du faisceau laser	95
II.8. Détermination de l'activité télomérase	95
II.8.1. Préparation des extraits cellulaires	95
II.8.2. Dosage de l'activité télomérase : Test TRAP	95
II.9. Tests statistiques	97

CHAPITRE 1: LA MUTATION ARG482GLY DANS LA BCKP (BREAST CANCER RESISTANCE	e Protein) indui
AUGMENTATION DE LA RESISTANCE A L'ETOPOSIDE	
I.1. RESUME	
I.2. INTRODUCTION	
1.3. Expression des gènes BCRP et MRP1	
1.3. Détection de la BCRP et la MRP1	
1.4. Cytotoxicité de la mitoxantrone dans les lignées HEK293	••••••
I.5. Cytotoxicite de l'étoposide dans les cellules HEK293 et 2008	•••••
I.O. Accumulation cellulaire de la Kilodalille 125 et du fioeclist 55542	
I.7. Accumulation centulaire de l'étoposide dans les centules HER293 et 2008	
I.9. DISCUSSION	•••••
CHAPITRE II : ROLE DE LA MRP1 (MULITDRUG RESISTANCE ASSOCIATED PROTEIN) DAN	IS LA RESISTANCE
MITOXANTRONE	
II.1. RESUME	
II.2. INTRODUCTION	
II.3. Etablissement de la lignée cellulaire MCF7/MGG résistante à la mitoxantrone.	
II.4. Mise en évidence du phénotype MDR	
II.4.1. Expression de la BCRP et de la MRP1	
II.4.2. Détection de la MRP1, la BCRP et de la Pgp	
II.5. Cytotoxicite de la doxorubicine et l'etoposide	•••••
II.0. Cytoloxicile de la miloxantrone	
II.7. Accumulation centralité de la finitoxanicone	
II 9 Distribution intracellulaire de la doxorubicine et de la mitoxantrone dans les ce	llules 2008/MRP
MCF7/VP	114103 2000, 1114
II.10. DISCUSSION	
CHAPITRE III : REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA BCRP PAR L'IMATINIB DANS LES C	ELLULES DE LEU
MYELOÏDE CHRONIQUE K562	
III.1. RESUME	
III.2. INTRODUCTION	
III.3. Etablissement de la lignée cellulaire K562 résistante à l'imatinib	
III.4. Expression de l'ARNm du gène BCRP et de la protéine BCRP dans les cellule	s K562/BCRP et
K562/imatinib	
III.5. Effet de l'imatinib sur le niveeu d'expression de l'ADNm du gène DCDD	••••••
III.0. Effet de l'impainib sur l'expression de la BCPP	
III.8 Effet du LY294002 sur l'expression de la BCRP	••••••
III.9. Immuno-localisation de la BCRP	
III.10. Accumulation cellulaire de la mitoxantrone et du Hoechst33342	
III.11. Effet de l'imatinib sur la phosphorylation d'Akt	
III.12. DISCUSSION	
CHAPITRE IV : EFFET DE L'IMATINIB SUR L'EXPRESSION DE LA TELOMERASE ET PROTEIN	ES PARTENAIRES
LA LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE	
IV.1. RESUME	
IV.2. INTRODUCTION	
IV.3. Expression de la télomérase et protéines partenaires dans les cellules promyéle	ocytaires HL60
transiectees par BCR-ABL.	
IV.4. Effet de l'imatinio sur l'expression de la telomerase et proteines partenaires da	ans les centules K
IV 4 1 Effet de l'imatinih sur la prolifération des cellules K562	
IV.4.2. Expression de la télomérase après un traitement des cellules K562 avec l'imatinib	
IV.4. 3. Effet de l'imatinib sur l'activité de la télomérase	
IV.4. 4. Effet de l'imatinib sur l'expression de TRF2	
IV.4. 5. Effet de l'imatinib sur l'expression de RAD51	
IV.4. 5. Effet de l'imatinib sur l'expression de RAD51 IV.4. 6. Effet de l'imatinib sur l'expression de BLM	

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIES	190
ANNEXE	

INTRODUCTION

Le cancer constitue un problème majeur de santé publique dans le monde. La survenue dans un organisme d'une tumeur cancéreuse est liée à l'émergence d'un clone cellulaire échappant aux mécanismes qui régissent la prolifération et homeostasie tissulaire. C'est à cause de sa capacité à se reproduire d'une façon anarchique (phénomène appelé : perte de l'inhibition de contact) et son pouvoir de coloniser (métastase) des territoires tissulaires normalement réservés à d'autres catégories cellulaires, que les cellules cancéreuses se disséminent dans l'organisme et aboutissent à l'altération des fonctions de certains organes. Ce déséquilibre cellulaire qui caractérise les cellules cancéreuses est issu d'une altération majeure de l'information génétique, transmissible lors des divisions cellulaires successives.

Face à cette pathologie, les médecins ont à leur disposition trois types de traitement: la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière consiste en l'utilisation de médicaments qui interfèrent avec le métabolisme cellulaire. Elle occupe désormais une place centrale dans le traitement des cancers puisqu'elle réduit le volume de la masse tumorale primaire et élimine les cellules circulantes (leucémiques) et métastatiques. Cependant la capacité des cellules cancéreuses à survivre aux différents traitements chimio-thérapeutiques est un problème majeur qui limite l'efficacité de cette stratégie thérapeutique. En effet, plusieurs chercheurs ont rapporté une résistance multiple aux différents agents anticancéreux : résistance pléiotropique ou multidrug-resistance (MDR).

L'un des mécanismes responsable de cette résistance MDR implique une diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments anticancéreux et l'augmentation de leur transport vers le milieu extracellulaire, grâce à une famille de protéines transmembranaires ABC (ATP binding cassette). La mieux caractérisée de ces protéines est la P-glycoprotéine ou Pgp (170 kDa), qui agit comme une pompe ATP-dépendante et assure l'expulsion extracellulaire de molécules de natures très diverses (ex : anthracyclines et épipodophylotoxines). La Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1, 190 kDa) et la

10

Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), 70 kDa, sont des protéines de la même famille de la Pgp, également impliquées dans de ce type de résistance. Actuellement, l'étude de ce phénotype de résistance MDR et sa réversion constituent un enjeu majeur en cancerologie. Dans ce cadre, nous avons étudié l'implication de ces protéines transmembranaires dans la résistance à deux molécules, l'étoposide et la mitoxantrone, très couramment utilisées aujourd'hui en chimiothérapie.

L'étoposide est un inhibiteur de la topoisomérase II. Il est utilisé dans le traitement d'un certain nombre de cancers et particulièrement le cancer du poumon à petites cellules. Un phénotype de résistance de type MDR à cette molécule a été rapporté par plusieurs études. Les transporteurs ABC, notamment la Pgp et la MRP1, semblent jouer un rôle important dans cette résistance, alors que le rôle de la BCRP humaine dans la résistance MDR et le transport de l'étoposide ne sont pas encore bien étudiés. L'étude d'Allen et collaborateurs a pu mettre en évidene une surexpression de la Bcrp1 dans un modèle murin sélectionné *in vitro* à l'étoposide (Allen *et al.*, 2003). Cependant ce modèle cellulaire peut aussi mettre en jeu d'autres mécanismes de résistance. D'autre part, des études récentes ont montré que la mutation de la BCRP au niveau de l'acide aminé 482 induit une modification au niveau de la spécificité de la BCRP à certains de ses substrats.

La première partie de ce travail a 2 objectifs : 1) confirmer le rôle de la BCRP sur un modèle de cellules humaines transfectées d'une manière stable par le gène *BCRP* humaine; 2) étudier l'effet de deux mutations de la BCRP au niveau de l'acide aminé 482 (R482G et R482T) sur l'efflux de l'étoposide.

La mitoxantrone est un autre inhibiteur de la topoisomérase II, une molécule très utilisée en chimiothérapie. Les transporteurs ABC jouent un rôle primordial dans la limitation de son efficacité thérapeutique. Si plusieurs études ont rapporté le rôle de la Pgp et de la BCRP dans la résistance à la mitoxantrone, celui de la MRP1 reste discutable. Les travaux de Diah et collaborateurs ont permis d'observer un lien entre la surexpression de la MRP1 et la résistance à la mitoxantrone dans les cellules MCF7/VP (Diah *et al.*, 2001). Cependant, dans ce modèle cellulaire en plus de la surexpression de la MRP1, des modifications de la topoisomérase II et une surexpression de la MRP5 ont été observées. De plus, l'utilisation de certains inhibiteurs de la MRP1 n'augmente pas l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone.

La deuxième partie de ce travail a 2 objectifs : 1) valider dans un premier temps les données de la littérature sur un modèle cellulaire transfecté par le gène MRP1; 2) suivre l'expression d'éventuelles protéines ABC, en particulier la MRP1, grâce à l'établissement d'une lignée humaine de cancer mammaire résistante à la mitoxantrone associée au GG918 (inhibiteur de la Pgp et la BCRP).

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myéloprolifératif résultant de l'activation oncogénique d'un progéniteur hématopoïétique pluripotent. La population cellulaire en cause porte une anomalie chromosomique caractéristique, la translocation (t 9;22), qui crée un gène chimérique codant pour une protéine de fusion BCR-ABL qui à une activité tyrosine Kinase constitutive.

L'imatinib est un inhibiteur des tyrosines kinases. Il est utilisé depuis une dizaine d'années dans le traitement de leucémie myéloïde chronique. Tout récemment, certains auteurs ont rapporté l'émergence d'une résistance à ce médicament (Krystal, 2001; Luzzatto and Melo, 2002; Weisberg and Griffin, 2001). Parmi les mécanismes de résistance rapportés, le transport de l'imatinib par la BCRP, qui reste très contreversé. Burger et collaborateurs ont montré que l'imatinib est un substrat de la protéine BCRP dans deux lignées cellulaires humaine surexprimant la BCRP (Burger *et al.*, 2004). Le même groupe a également rapporté une surexpression de la BCRP après une exposition chronique des cellules intestinales humaines Caco2 à l'imatinib (Burger *et al.*, 2005). Cependant, la transfection du gène BCRP

sur des cellules Saos-2 n'entraine aucune résistance à l'effet cytotoxique de l'imatinib (Houghton *et al.*, 2004). Les tests de cytotoxicité réalisés dans notre laboratoire, *in vitro* montrent une faible résistance des cellules K562 transfectées par le gène *BCRP* à l'imatinib. De plus, l'exposition de cellules K562 à des concentrations croissantes d'imatinib n'induit pas de surexpression de la BCRP. Ces données nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une modulation de l'expression de la BCRP par le BCR-ABL dans ce modèle cellulaire.

Dans la troisième partie de ce travail, nous proposons d'étudier l'effet de l'imatinib sur l'expression de la BCRP dans des cellules K562 transfectées par la BCRP.

Enfin, cliniquement la leucémie myéloïde chronique évolue en trois phases : une phase chronique, une phase d'accélération et une phase blastique. Plusieurs études menées sur des prélèvements de patients ont montré qu'au cours de ces trois phases, le télomère des cellules leucémiques subit des modifications en terme de taille et de stabilité, liées essentiellement au changement de l'activité télomérasique et à la modification de l'expression de certaines protéines réparation associées aux télomères.

La dernière partie de ce travail est consacrée à l'étude de l'effet de l'imatinib sur l'expression et l'activité de la télomérase, ainsi que sur l'expression de protéines associées aux structures télomèriques.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE ET PHÉNOTYPE MDR

I.1. Concept de résistance pléiotropique

D'un point de vue théorique, la résistance des cellules à plusieurs agents cytotoxiques de structures et de mécanismes d'action différents peut s'expliquer par l'addition de différents mécanismes de résistance (Roninson, 1987), chacun étant spécifique de l'un des agents cytotoxiques employés ou par l'existence d'un seul mécanisme pouvant rendre compte de la résistance des cellules à plusieurs agents antitumoraux.

La notion de résistance pléiotropique ou MDR (multidrug resistance) est née des travaux de Biedler et Riehm (Biedler and Riehm, 1970). Dans cette étude, les auteurs démontrent l'existence d'une résistance croisée entre l'actinomycine D et d'autres agents anticancéreux. La résistance pléiotropique est donc la faculté que possèdent certaines cellules à présenter une résistance croisée à des agents cytotoxiques de structures différentes. Ces agents peuvent posséder différents mécanismes d'action. (Goldstein *et al.*, 1989).

I.2. Mécanismes de résistance pléiotropique

L'effet des agents anticancéreux sur leur cible cellulaire peut être modulé à différentes étapes. Historiquement, le premier mécanisme de résistance identifié est la surexpression de la dihydrofolate réductase, enzyme cible du méthotrexate : la cellule cancéreuse résiste dans ce cas à l'effet cytotoxique de la méthotrexate par une surexpression de sa cible (Schimke, 1984). Les différents mécanismes de résistance pléiotropique identifiés à ce jour concernent principalement (Figure 1):

- Métabolisme activateur ou inactivateur des agents cytotoxiques (ex : métabolisme du glutathion).
- Augmentation de l'activité de réparation des lésions de l'ADN.
- Modification de l'expression de certains gènes (ex : protéines anti-apoptotiques).

- Augmentation du transport actif transmembranaire (efflux).
- > Redistribution et séquestration intracellulaires des médicaments.



Figure 1 : Exemples de mécanismes de résistance pléiotropique

I.2.1. Augmentation de l'activité de réparation des lésions de l'ADN

Une augmentation de l'activité de réparation des lésions de l'ADN peut entraîner l'apparition d'une résistance non spécifique aux agents qui interagissent directement avec l'ADN comme les agents alkylants ou les dérivés du platine (figure 2)(Lehnert, 1996).

Lésions de l'ADN (Processus impliqués)	Voie de réparation principale
Cassure simple ou double-brin (réplication, I-Sce I/ HO, radiations ionisantes, recombinaison V(D)J, méiose)	RH, SSA, BIR, SDSA ou NHEJ
Mésappariement, boucle de délétion-insertion (réplication, RH)	MMR
Modification de la structure de la double-hélice (triple-hélice, RI, UV, cisplatine,)	NER, RH
Modification des bases (déamination des cytosines, alkylation et oxydation des bases)	BER

Figure 2: Liste des différents types de lésions de l'ADN et la voie de réparation associée. Processus concernés par ces lésions sont indiqués entre parenthèses. (RH : homology directed repair, SSA : single strand annealing, SDSA : Synthesis dependent strand annealing, NHEJ : Non-Homologous End-Joining, MMR : mismatch repair, NER : nucleotide excision repair, BER : base excision repair).

a. Agents alkylants

La résistance aux alkylants était classiquement attribuée au glutathion et à l'expression des enzymes qui interviennent dans la synthèse de ce métabolite cellulaire. La littérature récente n'évoque pratiquement plus ce mécanisme, d'autant que toutes les études en clinique qui ont visé la synthèse du glutathion ont débouché sur des échecs thérapeutiques (Chauffert *et al.*, 1999).

Le système de réparation des lésions d'alkylation peut mettre en jeu soit un système d'excision des bases alkylées, soit un système de transfert des lésions alkylées sur une protéine suicide faisant intervenir par exemple la O^6 -alkylguanine-ADN-alkyltransférase (AGAT) (Terashima *et al.*, 1993). Cette protéine répare les adduits en position «O6» de la guanine et la résistance aux alkylants paraît très liée à sa surexpression. L'AGAT peut être inhibée par la O^6 -benzylguanine chez l'homme (Gerson *et al.*, 1994). Cependant des mutants de l'AGAT résistants à cet inhibiteur sont déjà décrits (Xu-Welliver *et al.*, 1998).

b. Dérivés du cis-platine

Les dérivées du platine (cisplatine, carboplatine et oxaliplatine) agissent directement sur l'ADN en se liant de façon covalente aux bases (guanines adjacentes, adénines et guanines adjacentes et guanines séparées par un nucléotide) et créant ainsi des ponts intra- ou interbrins. Ces modifications provoquent des distorsions de l'ADN qui perturbent la machinerie de réplication, ralentissent ou arrêtent le cycle cellulaire et induisent l'apoptose.

Le système NER (Nucleotide Excision Repair) semble être le mécanisme prédominant qui excise les adduits cisplatine–ADN. Les modifications de conformation de l'ADN provoquées par les adduits sont reconnues par un complexe protéique (XPA-RPA), les brins de l'ADN sont déroulés par deux hélicases puis coupés : un fragment de 27-29 nucléotides est ainsi excisé. La séquence d'ADN transitoirement monocaténaire est protégée de l'action des nucléases par des protéines avant d'être réparée par des ADN polymérases et reliée par une ligase (Thoma and Vasquez, 2003). La résistance au cisplatine a été attribuée à la surexpression de certaines protéines du système NER (XPA, XPE, ERCC1) et à une réparation accrue des adduits notamment au niveau des gènes transcrits (Crul *et al.*, 1997).

I.2.2. Tolérance accrue aux lésions de l'ADN

Le déficit de réparation des mésappariements de l'ADN, MMR (mismatch repair), est mis en cause dans la résistance au cisplatine et aux agents alkylants (Aebi *et al.*, 1996) (Anthoney *et al.*, 1996). Le système MMR permet de réparer les mauvais appariements des bases nucléiques en excisant la partie concernée du brin d'ADN anormal. Les protéines MMR reconnaissent aussi les distorsions locales provoquées par les adduits de cisplatine mais l'étape d'excision et de réparation ne se fait pas. La cellule s'arrête en phase G2 du cycle cellulaire et enclenche un processus d'apoptose dépendant de la protéine p53. Si les protéines MMR sont absentes ou non fonctionnelles, la réplication de l'ADN se poursuit, on parle alors d'une résistance par tolérance accrue aux adduits (Fink *et al.*, 1998).

I.2.3. Régulation négative du signal d'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique de contrôle prolifératif des cellules de l'organisme. Elle permet entre autres d'éliminer les cellules avec des anomalies génétiques évitant ainsi la réplication de cellules anormales ou mutantes, une étape pendant la formation d'un cancer. Un des organites importants participants à l'apoptose est la mitochondrie qui joue un rôle central dans la phase précédant l'exécution de la mort cellulaire sous l'effet de plusieurs stimuli apoptotiques (Yang *et al.*, 1997). Plusieurs membres de la famille de Bcl-2 font partie des facteurs proapoptotiques et sont associés à la mitochondrie comme Bax, Bak, Bid et Bim. Toutefois, certains membres de cette famille sont au contraire anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL ou Bcl-W. La surexpression de la protéine Bcl-2 bloque l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN (Kim *et al.*, 2004).

La protéine p53 fait également partie des facteurs pro-apoptotiques. Activée en réponse à des lésions de l'ADN, elle mobilise les protéines Noxa, Puma et Bax. Ces protéines migrent vers la mitochondrie où elles neutralisent les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Plusieurs mutations du gène *p53* sont retrouvées dans plus de la moitié des cancers humains (Hollstein et al 1991), ce qui est souvent corrélé avec une résistance pléiotropique à la chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie (Nakanishi Y et al 1999).

I.2.4. Mécanisme en amont de la cible cellulaire

Pratiquement, tous les agents cytotoxiques concernés par le phénomène de résistance pléiotropique pénètrent dans les cellules cancéreuses par diffusion passive au travers de la membrane plasmique, selon un gradient de concentration. En conséquence, la concentration extracellulaire est le déterminant majeur de la pénétration cellulaire des agents anticancéreux. Différents facteurs peuvent empêcher l'obtention d'une concentration adéquate en substance active, qui peuvent être réparties en facteurs tissulaires, membranaires ou cytoplasmiques.

I.2.4.1. Mécanismes tissulaires

Les études pharmacocinétiques, pharmacogénomiques et pharmacodynamiques montrent qu'une même dose peut entraîner des effets très variables selon les patients. Une des raisons de cette variabilité est la différence du métabolisme hépatique des médicaments. Cette variabilité pouvant être due, par exemple, au polymorphisme d'enzymes telles que les cytochromes P450 ou les glutathion S-transférases (GST) (Smith *et al.*, 1994). Cependant, d'autres facteurs peuvent intervenir (Brown and Giaccia, 1998). La vascularisation tumorale peut conditionner l'accès des médicaments aux cellules cancéreuses. Les médicaments doivent aussi franchir de multiples barrières de diffusion : l'endothélium et la pression interstitielle élevée, par exemple (Tannock, 2001).

a. Barrière hémato-encéphalique

De nombreux médicaments anticancéreux ne sont pas capables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, le système nerveux central (SNC) est habituellement considéré comme un « sanctuaire pharmacologique » car les médicaments anticancéreux ne peuvent pas y pénétrer. Il est donc possible que des cancers connus pour être nettement chimiosensibles, tels que les leucémies aiguës ou les lymphomes malins ne répondent pas à un traitement anticancéreux systémique lors d'une localisation dans le SNC. Schinkel et collaborateurs ont montré chez la souris que la Pgp, codée par le gène murin *mdr1a*, tient un rôle important dans la protection du SNC vis à vis des agents cytotoxiques. Dans ce cas, ce sont des propriétés tissulaires intrinsèques qui empêchent l'agent anticancéreux d'atteindre une concentration suffisante à proximité de la cible (Schinkel *et al.*, 1994).

b. Vascularisation et tissu interstitiel

Ces deux facteurs peuvent intervenir particulièrement dans le cas des tumeurs solides (Jain, 1994). Le tissu normal possède une vascularisation relativement homogène qui permet une bonne oxygénation des cellules. Après avoir quitté les vaisseaux capillaires de la tumeur, le médicament anticancéreux doit atteindre les cellules tumorales par diffusion passive. La tumeur peut être faiblement vascularisée. De plus, la vascularisation tumorale présente des ruptures de la paroi vasculaire et une circulation sanguine irrégulière, créant ainsi des régions en hypoxie.

Le tissus interstitiel peut être riche en structures denses comme le collagène ; c'est le cas par exemple de certains carcinomes ou du tissu cicatriciel (après une radiothérapie ou une chirurgie). Dans ces deux cas, l'obtention d'une concentration suffisante de médicament anticancéreux à proximité de la cible est plus difficile. Toutefois, les capacités de diffusion tissulaires des médicaments employés interviennent aussi (Smith *et al.*, 1994) : le fluorouracil et le cisplatine pénètrent mieux dans une tumeur solide que des molécules plus grosses et ionisées telles que les anthracyclines ou les alcaloïdes.

Les tumeurs de la face et du cou illustrent l'importance de pénétration des médicaments anticancéreux sur les résultats de la chimiothérapie. Si la chimiothérapie est effectuée avant tout traitement local, on observe un taux de réponse au traitement de plus de 90 %, avec un nombre significatif de rémissions complètes. À l'opposé, chez des patients présentant une rechute dans une zone préalablement traitée par chirurgie ou radiothérapie (exemple : une zone cicatricielle), le taux de réponse à un même protocole de chimiothérapie est d'environ 20 à 30 % (Rooney *et al.*, 1985). Dans ces deux derniers cas, les propriétés tissulaires à l'origine de la chimiorésistance ne sont pas inhérentes au tissu comme dans le cas de la barrière hémato-encéphalique mais résultent de modifications liées à la présence de la tumeur.

I.2.4.1. Les mécanismes membranaires

La première ligne de défense que les agents anticancéreux peuvent rencontrer au moment de leur pénétration dans les cellules tumorales et à la présence de pompes transmembranaires telles que la P-glycoprotéine (Pgp), les MRPs (Multidrug Resistance-associated Protein) et la BCRP (Breast Cancer Resistance Protein). La présence de ces glycoprotéines confère le phénotype MDR. La Pgp est la première de ces trois protéines à être identifée en 1976 (Juliano and Ling, 1976). Elle a été localisée principalement au niveau membranaire. Par la suite l'équipe de Cole a identifié la MRP1 (Cole *et al.*, 1992). Puis celle de Doyle a identifié la BCRP en 1998 (Doyle *et al.*, 1998).

La composition lipidique des membranes pourrait aussi jouer un rôle primordial dans le phénotype MDR. Compte tenu de légères variations de la structure lipidique de la membrane cellulaire et de sa fluidité ont été observées (Wheeler *et al.*, 1982). Différentes études ont montré des modifications de la glycosylation des glycolipides membranaires dans les cellules résistantes (van der Bliek and Borst, 1989). Des modifications de la composition lipidique ont été décrites en association avec le phénotype MDR, notamment une augmentation du taux des glycosphingolipides (Lavie *et al.*, 1999).

I.2.4.2. Redistribution et séquestration intracellulaires des agents anticancéreux

Certains auteurs ont isolé des lignées cellulaires résistantes qui, bien que présentant un phénotype MDR, n'étaient associées ni à l'expression de Pgp ni à celle de MRP1 (Bhalla *et al.*, 1985) ; (Scheper *et al.*, 1993). Dans ces cellules résistantes, ils ont pu isoler une nouvelle protéine de 110 kDa. Cette protéine a été appelée LRP (Lung Resistance related Protein). Le gène codant cette protéine est situé sur le chromosome 16, à proximité du gène codant la protéine MRP1 (position 16p11.2 et 16p13.1, respectivement) (Lee *et al.*, 2000). La surexpression de cette protéine dans les cellules chimiorésistantes provoque une altération de la distribution intracellulaire des médicaments par rapport à celle observée dans les

cellules chimiosensibles (Breuninger et al., 1995); (Gervasoni et al., 1991). En utilisant des médicaments fluorescents tels que les anthracyclines ou la mitoxantrone, ont pu être mis en évidence un déplacement de la fluorescence du noyau vers le cytoplasme et une ponctuation de fluorescence correspondant à des vésicules cytoplasmiques. Le mécanisme précis responsable de l'accumulation de molécules dans ces vésicules n'est pas encore connu mais la protéine LRP pourrait être impliquée dans celui-ci (Scheper et al., 1993). Une surexpression de la LRP est observée non seulement dans les lignées cellulaires exprimant la MRP1 (Scheper et al., 1993), mais a aussi été observée dans des lignées cellulaires exprimant la Pgp (Lehnert, 1996). Néanmoins, la Pgp et la MRP1 pourraient aussi intervenir dans le mécanisme de séquestration vésiculaire (Breuninger et al., 1995); (Gervasoni et al., 1991). Scheffer et al. ont montré que cette protéine LRP était en fait une Major Vault Protein" (MVP) (Scheffer et al., 1995), qui semble être impliquée dans les transports nucléocytoplasmiques (Izquierdo et al., 1996). Ainsi, le mécanisme de séquestration vésiculaire des médicaments anticancéreux pourrait contribuer à la résistance en réduisant la concentration des médicaments en contact avec la cible, sans affecter la concentration cellulaire globale.

II. TRANSPORTEURS ABC HUMAINS IMPLIQUES DANS LE PHENOTYPE MDR

Les transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette) appartiennent à l'une des plus importantes familles de protéines. On les rencontre chez toutes les espèces, de la bactérie à l'homme en passant par les plantes. 5 % du génome d'*Escherichia coli* code pour des transporteurs ABC (Linton and Higgins, 1998) et on en dénombre 48 chez l'homme (Dean *et*

al., 2001). La plupart sont des transporteurs actifs : ils lient et transportent leur substrat à travers la membrane en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP contre le gradient de concentration du substrat. Ces protéines sont impliquées dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions...) mais également de substances toxiques (métaux lourds, médicaments...). Elles se révèlent donc d'une importance toute particulière dans leur diversité de fonction. Chez l'homme, des mutations de gènes codant pour certains des transporteurs ABC sont la cause de certaines maladies génétiques. Parmi ces pathologies, la mucoviscidose (mutation de CFTR ; (Dean *et al.*, 2001)), la maladie de Tangier (mutation de ABC1 ; (Bodzioch *et al.*, 1999; Brooks-Wilson *et al.*, 1999; Paulusma *et al.*, 1996; Rust *et al.*, 1999), le syndrome de Dubin-Jonhson (mutation de MRP2 ; (Paulusma *et al.*, 1996)) ou la maladie de Startgardt (mutation de ABC4; (Allikmets *et al.*, 1997)).

II.1. Transports membranaires

Les cellules de phénotype MDR sont capables de se multiplier en présence d'une concentration de médicaments létale pour les cellules sensibles. La mésure de la concentration intracellulaire en médicaments permet de comprendre ce mécanisme de résistance. Ainsi il a été mis en évidence une diminution de la concentration intracellulaire des médicaments dans diverses lignées multichimiorésistantes comparées aux lignées sensibles (Carlsen *et al.*, 1976), (Riehm and Biedler, 1971), (Riordan and Ling, 1985). Cette diminution de concentration intracellulaire des agents anticancéreux peut avoir plusieurs origines : une diminution du flux entrant ou une augmentation du flux sortant appelé aussi efflux ou bien une combinaison de ces deux mécanismes.

Dans les années soixante-dix, différentes études (Dano, 1973), (Inaba *et al.*, 1979), (See *et al.*, 1974), (Skovsgaard, 1978) ont mis en évidence une augmentation significative de la concentration intracellulaire des médicaments dans les cellules MDR lorsque des inhibiteurs de la production d'énergie comme le 2-deoxyglucose, sont ajoutés à un milieu de

culture. Si du glucose est additionné au milieu de culture, la concentration intracellulaire de l'agent anticancéreux diminue dans ces cellules (Inaba *et al.*, 1979).

Kessel et al. ont montré sur des cellules de leucémie murines P388, que la diminution de la concentration intracellulaire des médicaments est liée à un efflux actif de ces composés (Kessel and Wilberding, 1985). Les différentes études menées ont conduit à proposer l'existence d'une pompe transmembranaire énergie-dépendante à l'origine de l'augmentation de l'efflux cellulaire et par conséquent à l'origine de la résistance pléiotropique. La première pompe décrite fut la Pgp.

II.2. P-gycoprotéine (Pgp)

II.2.1. Découverte

Cette protéine a été découverte en 1976 (Juliano and Ling, 1976). Elle fut observée principalement au niveau membranaire des cellules CHO résistantes à la colchicine (CHR). Les deux auteurs proposent dans un premier temps un mécanisme de résistance à la colchicine faisant intervenir cette glycoprotéine, en modifiant la perméabilité membranaire. Il a été montré par la suite que la Pgp était capable elle-même de transporter les agents anticancéreux (Gottesman and Pastan, 1993).

II.2.2. Classification

La famille des gènes MDR codant pour les Pgps, appartient à trois classes différentes. Les classes 1 et 2 se composent de Pgps impliquées dans le transport des cytostatiques telles que le gène *MDR1* humain (Chen *et al.*, 1986) et *mdr1* et *mdr3* chez la souris (Devault and Gros, 1990). La classe 3 inclut les gènes, non impliquées dans le transport des cytostatiques tels que *MDR2* humain et *mdr2* murin (Buschman *et al.*, 1992). L'expression de cette dernière classe est prédominante dans les membranes des canicules des hépatocytes et joue un rôle dans la sécrétion biliaire. La transfection de cellules *in vitro* par les gènes de cette classe ne confère aucune résistance aux médicaments anticancéreux (Buschman and Gros, 1994; Schinkel et al., 1991).

II.2.3. Structure du gène MDR1

Chez l'homme le gène *MDR1* (ABCB1) est situé sur le bras long du chromosome 7. Il est composé de plus de 100 kb et possède 29 exons et 28 introns. L'expression du gène MDR1 n'est pas limitée aux cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie. En effet, l'étude des tissus normaux a montré que ce gène s'exprime très fortement dans les glandes surrénales, le cortex, les reins, le placenta, le foie, l'intestin grêle, le colon et la barrière hemato-encéphalique (tableau 1).

Organe	Localisation	Fonction
Intestin grêle, côlon	Pôle apical des cellules épithéliales	Sécrétion des xénobiotiques dans la lumière intestinale (Thiebaut <i>et al.</i> , 1987)
Rein	Pôle apical des cellules du tube contourné proximal	Sécrétion des xénobiotiques dans le tubule proximal (Thiebaut <i>et al.</i> , 1987)
Foie	Membrane des canalicules des hépatocytes	Sécrétion des xénobiotiques dans la bile (Thiebaut <i>et al.</i> , 1987)
SNC	Face luminale des cellules endothéliales de la BHE	Protection du SNC (Cordon-Cardo et al., 1989)
Placenta	Trophoblastes	Protection du fœtus (Lankas et al., 1998)
Cœur	Membranes des cellules endothéliales myocardiques	Protection du cœur (Thiebaut et al., 1987)
Surrénales	Surface des cellules de la medulla et du cortex	Sécrétion des stéroïdes endogènes (Thiebaut <i>et al.</i> , 1987)
Testicules	Cellules endothéliales des capillaires sanguins	Barrière testiculaire (Thiebaut <i>et al.</i> , 1987)

Tableau 1 : Expression du gène MDR1 dans les différents tissus chez l'Homme et son rôledans le transport et des substances endogènes

II.2.4. Structure de la Pgp

La Pgp est une protéine de 1280 acides aminés et d'une masse moléculaire de 141 kDa (sans tenir compte des modifications glycosidiques). Elle est constituée de deux domaines hydrophobes MSD1 (membrane-spanning domain 1) et MSD2, qui comptent chacun six hélices α prédites potentiellement membranaires, et correspondants aux segments transmembranaires ou TM (transmembrane domain) (Figure 3). Les domaines hydrophiles intracellulaires NBD1 (Nucléotide Binding Domain 1) et NBD2 comptent environ 250 acides aminés. Ils incluent les deux séquences consensus de liaison à l'ATP. Les deux moitiés homologues de la Pgp sont séparées par un domaine appelé "région linker".



Figure 3 : Représentation topologique de la protéine Pgp avec ses deux domaines transmembranaires (MSD) et les deux sites de fixation de l'ATP (ABC)

II.2.5. Modifications post-traductionnelles

La Pgp n'est pas fonctionnelle immédiatement après sa biosynthèse (Loo and Clarke, 1999). Une large variété de masses moléculaires (130–200 kDa) a été rapportée par les premières études qui se fondaient sur des études de migration sur gel d'électrophorèse. Il a été tout d'abord, démontré qu'une telle hétérogénéité pouvait provenir des conditions

expérimentales (Endicott and Ling, 1989). Des séquences d'ADNc total isolées chez la souris et l'homme indiquent une masse moléculaire d'environ 140 kDa (Chen *et al.*, 1986) ; (Gros *et al.*, 1986). Les masses moléculaires les plus élevées de la Pgp mature résultent de modifications post-traductionnelles. Ces modifications incluent au minimum des glycosylations et des phosphorylations (Endicott and Ling, 1989). L'étude des différentes étapes nécessaires à la maturation de la Pgp permet d'envisager des solutions thérapeutiques nouvelles contre la résistance pléiotropique.

II.2.6. Polymorphismes de la Pgp

Le séquençage de différents ADNc du gène *MDR1* humain a permis d'identifier des variants polymorphiques des régions codantes sans répercussions sur la fonction de la Pgp (Choi *et al.*, 1988) ; (Kioka *et al.*, 1989). Toutefois, différentes autres mutations affectant la spécificité de la Pgp ont été décrites (Choi *et al.*, 1988) ; (Currier *et al.*, 1992). Loo et Clarke ont constaté que lorsque la Pgp ayant subi des mutations de la région TM7, elle perd sa capacité à conférer le phénotype MDR et que sa masse moléculaire est d'environ 150 kDa (170 kDa pour la Pgp « sauvage ») (Loo and Clarke, 1994).

II.2.7. Fonctions physiologiques

L'identification de la Pgp en tant que pompe énergie-dépendante capable d'induire une chimiorésistance à des agents cytotoxiques a soulevé la question de son rôle physiologique. La Pgp est exprimée dans les cellules épithéliales polarisées où elle est généralement localisée du côté membranaire apical de la cellule. Cette localisation suggère que cette protéine est principalement impliquée dans l'expulsion de certaines substances (par exemple : des xénobiotiques) (tableau 1 ; page 24).

II.2.8. Substrats de la Pgp

L'une des caractéristiques de la Pgp est sa grande variété de substrats tant du point de vue de leur structure chimique, de leur masse moléculaire que de leur mécanisme d'action pharmacologique. Du fait de sa localisation transmembranaire, ces substrats sont des molécules à caractère hydrophobe, de masse moléculaire variable allant de 250 Da (cielosporine A). Selon Ferte *et al.*, on distingue cinq grandes classes chimiques de molécules transportées par la Pgp (Ferte, 2000):

- les bases faiblement lipophiles, (Ex : doxorubicine)

- les cations lipophiles, (Ex : Rhodamine-123)

- les composés neutres polycycliques, (Ex : aldosterone)

– les molécules amphiphiles, (Ex : Triton X-100)

- les peptides hydrophobes. (Ex : valinomycine)

II.3. MRPs (*Multidrug Resistance-associated Proteins*)

II.3.1. Découverte de la MRP1

La Pgp a été associée à la résistance à de multiples médicaments à la fois dans de nombreuses lignées cellulaires sélectionnées en présence des médicaments et dans de nombreuses tumeurs cancéreuses humaines. La lignée la mieux caractérisée dont le phénotype MDR n'était pas expliqué par la présence de la Pgp est la lignée cellulaire H69AR. Elle a été sélectionnée en présence de doxorubicine et présentait une résistance croisée à plusieurs agents anticancéreux tels que les autres anthracyclines, les vinca-alcaloïdes et les épipodyphyllotoxines (Cole et al., 1991; Mirski and Cole, 1991). En 1992, Susan Cole et collaborateurs ont isolé, à partir de la lignée H69AR, l'ADNc correspondant à l'ARNm surexprimé par cette lignée (Cole *et al.*, 1992). Un gène localisé en 16p13.1 du chromosome 16, est désignée comme étant à l'origine de l'ARNm de la MRP1. Une étude de Grant et al. utilisant la transfection, démontre que la surexpression de cette protéine confère aux cellules un phénotype de résistance pléiotropique (Grant *et al.*, 1994).

II.3.2. Structure de la MRP1

Comme la Pgp, la MRP1 appartient à la superfamille des transporteurs membranaires ABC (ABCC1) (Leier *et al.*, 1994); (Young *et al.*, 1999). Les travaux de Zaman et collaborateurs montrent que la structure de MRP1 est similaire à celle de la Pgp.(Zaman *et al.*, 1994).

La protéine MRP1 a une masse moléculaire de 190 kDa et composée de 1531 acides aminés (Litman *et al.*, 2001). Elle possède trois domaines transmembranaires ou TM, deux NBDs (Nucleotide Binding Domain) et 17 hélices α transmembranaires ou TM (Bakos *et al.*, 1996) (Hipfner *et al.*, 1997) (Figure 4). Elle possède un domaine N-terminal glycosylé extracellulaire, contrairement à la Pgp. Ce domaine peut contenir entre 4 (Bakos *et al.*, 1996) et 6 ségments transmembranaires (Loe *et al.*, 1996).



Figure 4 : Représentation topologique de la protéine MRP1 avec ses trois domaines transmembranaires (MSD) et les deux sites de fixation de l'ATP (ABC)

II.3.3. Modifications post-traductionnelles

La masse de MRP1, en se basant sur sa composition en acides aminés, est de 170 kDa. Des études de Ma et collaborateurs ont montré que la MRP1 est hautement phosphorylée (Ma *et al.*, 1995). L'étude des mutants des sites potentiels de phophorylation permettrait de déterminer si la phosphorylation est impliquée ou non dans la régulation de l'accumulation des médicaments. Pour la glycosylation, la MRP1 possède 14 sites de N-glycosylation potentiels (Cole *et al.*, 1992), 3 sites uniquement ont été reconnus comme étant effectivement glycosylés (Hipfner *et al.*, 1997).

II.3.4. Localisation subcellulaire et tissulaire de la MRP1

La MRP1 a été principalement localisée dans la membrane plasmique de nombreuses lignées cellulaires sélectionnées en présence de médicaments anticancéreux (Almquist *et al.*, 1995; Flens *et al.*, 1994; Slapak *et al.*, 1994). Elle est aussi présente dans celle du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Breuninger et al., 1995; Flens et al., 1996; Marquardt and Center, 1992; Van Luyn et al., 1998). Dans les cellules polarisées, la MRP1 se trouve du côté des membranes basolatérales, à l'exception de certaines cellules du placenta où la MRP1 se trouverait du côté apical (St-Pierre *et al.*, 2000).

Au niveau tissulaire, la MRP1 humaine est exprimée de façon ubiquitaire dans tout le corps humain, son taux est particulièrement plus élevé dans certains tissus. Il s'agit du poumon (Brechot *et al.*, 1998; Flens *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1998) ou elle protégerait l'organisme contre les xénobiotiques (Evers *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999). Sa localisation dans certaines cellules du placenta a été décrite par St-Pierre et al. (St-Pierre *et al.*, 2000), suggérerait que MRP1 prévient ou limite l'entrée des anions organiques dans la circulation fœtale.

II.3.5. Fonctions physiologiques

L'expression de la protéine MRP1 dans les tissus humains normaux, démontre qu'elle possède un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire. Il a été démontré que la protéine MRP1 transporte le leucotriène C4 conjugué au glutathion (Jedlitschky *et al.*, 1994) (Leier *et al.*, 1994) (Muller *et al.*, 1994). Différentes études ont montré que la surexpression du gène *MRP1* dans les cellules tumorales entraîne une augmentation de l'élimination ATP-dépendante des dérivés conjugués au glutathion. Ces différentes études permettent de définir la protéine MRP1 comme une pompe GS-X (pour « Glutathione <u>S</u>- conjugate ex port ») (Ishikawa *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 1996) (figure 5). Cette pompe a un rôle physiologique important dans l'inflammation, le stress oxydant, le métabolisme des xénobiotiques et la chimiorésistance (Ishikawa *et al.*, 1998).

La MRP1 permet également le transport des lipides (Dekkers *et al.*, 1998; Raggers *et al.*, 1999). Ce transport est fortement diminué suite à une déplétion en GSH intracellulaire (Lorico *et al.*, 1997; Wijnholds *et al.*, 1997).



Figure 5 : Métabolisme et transport du glutathion (GSH) et ses conjugués par la MRP. La MRP1 permettant l'efflux du glutathion conjugué (GS-X) et du glutathione disulfure (GSSG).

II.3.6. Substrats de la MRP1

La comparaison des séquences codantes montre une homologie de 15% entre la protéine MRP1 et la Pgp (Cole *et al.*, 1992); (Grant *et al.*, 1994), le spectre de chimiorésistance dû à ces deux protéines est remarquablement similaire (figure 6). Ces 2 protéines peuvent induire une chimiorésistance aux anthracyclines (doxorubicine et daunorubicine), aux alcaloïdes (vincristine et vinblastine) (Paul *et al.*, 1996) et aux épipodophyllotoxines (étoposide et téniposide) (Kuwano *et al.*, 1999). Il existe, néanmoins des différences remarquables entre la Pgp et la MRP1. En effet, l'efflux des anticancéreux par la MRP1 n'est pas inhibé par le vérapamil ou la ciclosporine alors qu'il est inhibé par le probénécide (Versantvoort *et al.*, 1995a). De la même façon le paclitaxel, la colchicine, la mytomycine et l'actinomycine D ne sont pas transportées par la MRP1 (Breuninger *et al.*, 1995). En revanche, la MRP1 est capable de transporter des molécules telles que le méthotrexate (Borst *et al.*, 2000).



Figure 6 : Médicaments transportés par les trois transporteurs ABC MDR1, MRP1 et MXR (BCRP). Abréviations : MXR : Mitoxantrone resistance associted gene, VCR : vincristine, VBL : vinblastine, VP16 : étoposide, STER : stéroïdes, TAM : tamoxifène, TKI-INHIB : inhibiteurs des tyrosines kinases, DOX : doxorubicine, DNR : daunorubicine, EPIR : epirubicine, MX : mitoxantrone, TOPO : toptecan, BISAN : bisanthrone, COLCH : colchicine, ACTD : actinomycine D, MYTOM : mytomycine, TX : méthotrexate : CPHAM : cyclophosphamide, CHLB : chlorambucil, CARM : carmustine, LCV : leucovorine, HUR : hydroxyurée, CISPL : cisplatine, TAXOL : paclitaxel

II.3.7. Rôle de la MRP1 dans le phénotype MDR et signification clinique

Legrand et collaborateurs ont montré que la fonctionnalité de MRP1 est un facteur pronostique dans le cas de la leucémie myéloïde aiguë (Legrand *et al.*, 1999a; Legrand *et al.*, 1999b; Legrand *et al.*, 1999c). Dans ces études, il a été montré que la MRP1 est aussi fonctionnelle que la Pgp. De plus les patients non répondeurs à la chimiothérapie possèdent une fonctionnalité plus importante de ces deux protéines que les patients répondeurs au traitement. Mais la surexpression de ces deux protéines n'entraîne une résistance accrue qu'à 2 des 3 cytostatiques (anthracycline et l'étoposide) utilisés dans le traitement d'induction.

II.3.8. Famille des protéines MRP

Le gène *MRP1* a plusieurs gènes homologues (Leier *et al.*, 1994). Cette famille de gènes comporte au moins 7 membres : *MRP2*, *MRP3*, *MRP4*, *MRP5*, *MRP6* et *MRP7* dont la structure est représentée dans la figure 7. Deux nouveaux membres ont été récemment identifiés et correspondent aux protéines MRP8 et MRP9 (Litman *et al.*, 2001).



Figure 7 : Structure des protéines de la famille MRP

II.3.8.1. Protéine MRP2

La protéine MRP2 (Kool *et al.*, 1997) a tout d'abord été connue sous le nom de transporteur d'anion organique multispécifique (cMOAT «canalicular Multispecific Organic Anion Transporter»), présent dans les canalicules hépatiques. Cette protéine est impliquée dans la secrétion hépatobiliaire d'un grand nombre d'anions organiques et sa spécificité de substrats est très similaire à celle de la MRP1 (Jedlitschky *et al.*, 1997). La MRP2 est

indispensable à la sécrétion de la bilirubine conjuguée. Des mutations du gènes MRP2 sont à l'origine du syndrome de Dubin-Johnson (Scheffer *et al.*, 2000a). La similarité des substrats entre la MRP1 et la MRP2 suppose que la MRP2 possèderait un rôle dans la chimiorésistance vis à vis de divers médicaments comme le cisplatine, l'étoposide, la vincristine et le méthotrexate (Scheffer *et al.*, 1995). Suite à des études *in vitro* de transfection, il a été montré que la MRP2 est capable de transporter les anthracyclines, l'étoposide, la vincristine et le méthotrexate (Borst *et al.*, 2000; Koike *et al.*, 1997). La MRP2 a été détectée dans les membranes plasmiques de cellules cancéreuses de reins, des ovaires, du colon et du foie (Hinoshita *et al.*, 2000; Nies *et al.*, 2001; Schaub *et al.*, 1999).

II.3.8.2. Protéine MRP3

Cette protéine est aussi un transporteur d'anions organiques multispécifiques (Kool *et al.*, 1999b). Cependant, de toutes les protéines MRP, la MRP3 est celle qui est la plus proche de la protéine MRP1 (Kool *et al.*, 1999b), (Scheffer *et al.*, 2000a). Une étude de Young et al. (Young *et al.*, 1999), réalisée sur des cellules de cancer pulmonaires issues de patients, a montré une corrélation entre la chimiorésistance à la doxorubicine et l'expression des protéines MRP1 et MRP3. Cette étude n'a pas montré de corrélation entre chimiorésistance et expression des protéines MRP4 et MRP5. D'autres études ont confirmé l'implication de la MRP3 dans la résistance notamment à l'étoposide, la vincristine et le méthotrexate (Wijnholds *et al.*, 2000) (Kool *et al.*, 1999b), (Zeng *et al.*, 1999). L'expression de la MRP3 a une valeur pronostique chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (Benderra *et al.*, 2005).

II.3.8.3. Protéine MRP4

Aucune modification majeure dans l'expression de la MRP4 n'a été observée dans les
cellules résistantes à la doxorubicine ou au cisplatine (Kool et al., 1997). Toutefois, de récentes études (Schuetz et al., 1999), (Wijnholds et al., 2000) ont décrit une implication de cette protéine dans le transport d'analogues de nucléosides (Wheeler et al., 1982). En effet Shuetz et collaborateurs ont décrit le rôle de la MRP4 dans la résistance à des antiviraux (9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine), comme le **PMEA** le PMEG (9-(2phosphonylmethoxyethyl)guanine) et l'AZT (azidothymidine), bien connus pour leur utilisation dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Schuetz et al., 1999). Lee et collaborateurs ont récemment étudié le profil de chimiorésistance lié à la protéine MRP4. Leur étude confirme la résistance au PMEA (Lee et al., 2000). Le rôle de la protéine MRP4 dans la résistance au méthotrexate a été décrit par Chen et al. (Chen et al., 2002).

II.3.8.4. Protéine MRP5

McAleer et al. ont décrit une corrélation significative entre la surexpression de la protéine MRP5 et une résistance faible à des composés comme le CdCl (Cadmium Chloride) ou l'antimonyl- tartrate de potassium (McAleer *et al.*, 1999), (Scheffer *et al.*, 2000a). Wijnholds et al. ont démontré que MRP5 était aussi un transporteur d'anions organiques multispécifique (MOAT) qui induit aussi une résistance aux analogues de bases azotées ou de nucléotides (Wijnholds *et al.*, 2000). La protéine MRP5 peut induire une résistance à des médicaments anticancéreux comme la 6-mercaptopurine et à des antiviraux comme la PMEA (Dallas *et al.*, 2004). La fonction physiologique de la MRP5 n'est toujours pas connue.

II.3.8.5. Protéine MRP6

Le transporteur MRP6 n'aurait pas de rôle dans la chimiorésistance et serait seulement co-exprimé avec la MRP1 dont le gène est proche de celui de codant la MRP6 (Kool *et al.*,

1999a). Il a été montré que des mutations du gène *MRP6* étaient responsables du *pseudoxanthoma elasticum*, une pathologie du tissu conjonctif (Ringpfeil *et al.*, 2000).

II.4. BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)

II.4.1. Découverte de la BCRP

Chen et collaborateurs ont développé une lignée humaine de carcinome mammaire MCF7/AdrVp, sélectionnée en présence de doxorubicine et du vérapamil (Chen et al., 1990b). Les cellules MCF7/AdrVp présentaient une résistance croisée à la mitoxantrone et à la daunorubicine mais pas aux vinca-alcaloïdes, paclitaxel et cisplatine (Lee et al., 1997). De plus, la lignée MCF7/AdrVP ne surexprimait pas la Pgp, ni la MRP1 et montrait une faible accumulation de la daunorubicine et de la rhodamine 123 (Lee et al., 1997). Un nouveau gène codant pour une protéine capable de transporter aussi les médicaments a été découvert simultanément par trois laboratoires : Doyle et collaborateurs ont montré que la lignée MCF7/AdrVP surexprimait une nouvelle protéine de la famille ABC. Ils ont nommé cette protéine BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (Doyle et al., 1998). Allikmets et collaborateurs ont localisé ce gène en position chromosomique 4q22 et ont cloné celui-ci. Les auteurs l'ont nommé ABCP (pour ABC Placentaire) (Allikmets et al., 1998). Miyake et al. ont isolé ce gène à partir d'une lignée cellulaire humaine de carcinome du colon hautement résistante à la mitoxantrone ; le gène a été appelé MXR (Mitoxantrone Resistance-associated gene) (Miyake et al., 1999). Le gène BCRP code pour une protéine membranaire composée de 655 acides aminés et d'un poids moléculaire de 72,1 kDa (Litman et al., 2001).

II.4.2. Structure du gène BCRP et les éléments de régulation de son expression

Le gène humain de *BCRP* (*ABCG2*) est situé sur le chromosome 4q22. Ce gène présente 16 exons et 15 introns (Figure 8). La caractérisation de la région du promoteur du

gène de la BCRP indique que c'est un promoteur avec plusieurs sites de régulation : Sp1, AP1 et AP2 et un CCAAT box en aval des îlots CpG (Bailey-Dell *et al.*, 2001) ; Un élément ERE (Estrogen Response Element) a été identifié récemment dans ce promoteur. En effet un traitement des cellules par l'oestrogène induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de la BCRP (Ee *et al.*, 2004b). Une mutation au niveau de l'ERE atténue l'effet de l'oestrogène (Ee *et al.*, 2004b). Un autre mécanisme de régulation d'expression de la BCRP a été décrit récemment, il s'agit du facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). Ceci-ci permet aux cellules tumorales surexprimant la BCRP de survivre dans un environnement hypoxique (Krishnamurthy *et al.*, 2004).



Figure 8: Organisation génomique de la BCRP et structure primaire de la protéine (Staud and Pavek, 2005).

II.4.3. Structure de la BCRP

Le gène *BCRP* (ABG2) code pour une protéine de 655 acides aminés d'une masse moléculaire de 72,1 kDa qui est constituée d'un domaine N-terminal de liaison à l'ATP (NBD) et d'une région transmembranaire du côté C-terminal constituée de 6 hélices α membranaires. La BCRP est donc un semi-transporteur, car sa taille représente la moitié des autres transporteurs ABC qui possèdent au moins deux NBDs et 12 segments transmembranaires (Figure 9).

La BCRP fonctionnelle est sous forme de homodimères. A ce jour aucun hétérodimère n'a été identifié. En effet, des analyses cytogénétiques de lignées cellulaires surexprimant le transporteur, ont montré que seule la région du chromosome 4 contenant le gène ABCG2 était amplifiée, alors qu'aucune autre région n'était co-amplifiée (Knutsen et al., 2000). De plus, la surexpression de la BCRP dans les cellules d'insecte Sf9, qui ne contiennent probablement pas de partenaires possibles pour la BCRP, aboutit à un transporteur actif dont l'activité **ATPase** stimulée est par les médicaments (Ozvegy et al.. 2001).



Figure 9 : Représentation topologique de la protéine BCRP avec son domaine transmembranaire (MSD) et son site de fixation de l'ATP (ABC).

II.4.4. Localisation cellulaire et tissulaire

II.4.4.1. Localisation cellulaire

Des marquages immunohistochimiques ont permis de localiser la protéine dans la membrane plasmique de plusieurs lignées cellulaires tumorales (Brangi *et al.*, 1999; Litman *et*

al., 2000; Rocchi *et al.*, 2000; Scheffer *et al.*, 2000b). Une localisation plus faible dans des vésicules intracellulaires, a été également mise en évidence (Ross *et al.*, 1999).

II.4.4.2. Localisation tissulaire

Les tissus, qui comportent le plus haut niveau d'expression de la BCRP, sont le placenta (cellules trophoblasiques), le foie (membranes canaliculaires), l'intestin grêle et le colon (membranes apicales, suggérant un rôle de sécrétion), le poumon, le rein, les glandes surrénales, les épithéliums des veines, les vaisseaux sanguins et certaines cellules souches hématopoïétiques (Gottesman, 2002). Une expression relativement faible voire nulle, a été retrouvée dans le cerveau, le cœur, l'estomac, la prostate, la rate et l'utérus (Litman *et al.*, 2001). La forte expression de la BCRP dans les cellules de placenta suggère que celle-ci est responsable du transport de nutriments dans la circulation sanguine du fœtus, ou qu'elle permet au fœtus de se débarrasser des métabolites toxiques (Maliepaard *et al.*, 2001).

II.4.5. Substrats de BCRP

Les études fonctionnelles ont montré que la BCRP peut transporter plusieurs substrats. La plupart des lignées cellulaires sélectionnées avec des médicaments et surexprimant la BCRP montrent une forte résistance à la mitoxantrone. Par ailleurs, les cellules transfectées avec l'ADNc de la BCRP présentent une faible accumulation de la mitoxantrone comparées aux cellules transfectées avec le vecteur seul (Litman *et al.*, 2000; Minderman *et al.*, 2002). Ces données suggèrent que la mitoxantrone est un substrat qui possède une grande affinité pour la BCRP.

L'expression de BCRP est également fortement corrélée à une diminution de l'accumulation cellulaire de l'analogue de l'azaanthrapyrazole (BBR3390) (Rabindran *et al.*, 2000)(Hazlehurst *et al.*, 1999). La deuxième classe des substrats qui sont transportés par BCRP après la mitoxantrone est celles des dérivés de camptothecines comprenant le topotecan, irinotecan (CPT-11), et SN-38 (le métabolite actif de l'irinotecan) (figure 6). (Ishii *et al.*, 2000; Kawabata *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2000).

Robey et collaborateurs ont isolé une lignée cellulaire humaine du cancer de sein MCF7 résistante au flavopiridol (Robey *et al.*, 2001). Cette lignée présente une résistance croisée à la mitoxantrone et au topotecan. Les expériences de northern blot et immunomarquage ont montré une surexpression de la BCRP dans cette lignée.

Des études récentes ont montré l'implication de la BCRP dans le transport des conjugués anioniques. En plus de ses conjugués anioniques, la dehydroepiandrosterone (DHEAS) est également un substrat de la BCRP (Suzuki *et al.*, 2003). La BCRP transporte également le GSH et la 17β-estradiol 17- (β-D-glucuronide). Cependant, l'affinité de la BCRP pour les conjugués sulfatés (DHEAS) semble être plus grande que celle pour les conjugués du GSH (Chen *et al.*, 2003).

II.4.6. Polymorphisme de la BCRP

La spécificité des substrats de la BCRP est différente en fonction des cellules résistantes qui la surexpriment. En effet, deux types de lignées cellulaires sélectionnées avec des médicaments anticancéreux et surexprimant aussi la BCRP (MCF7/AdVp3000 et S1-M1-80) sont capables de transporter la rhodamine 123 et les anthracyclines d'une manière efficace, alors que d'autres lignées qui surexpriment aussi la BCRP n'en sont pas capables. L'analyse des séquences codantes pour cette protéine a révélé l'existence de mutations au niveau du codon 482, où l'arginine a été remplacée par la thréonine (R482T) dans les cellules MCF-7 AdVp3000 ou par la glycine (R482G) dans les cellules S1-M1-80. Par la suite la BCRP a été examiné systématiquement pour les *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) dans 90 populations ethniquement différentes. Jusqu'ici, plus de 43 SNPs ont été identifiés (Iida *et al.*, 2002) (Figure 10). Parmi lesquels seulement deux concernent des séquences exoniques. Dans une autre étude, 12 variations ont été décrites dont 4 se traduisent par des substitutions

d'acides aminés (Mizuarai *et al.*, 2004; Zamber *et al.*, 2003). Deux SNPs, G34A et C421A ont été fréquemment observés et qui pourraient modifier la fonction de transport de la BCRP et la sensibilité des cellules porteuses de ces mutations à plusieurs médicaments anticancéreux (Mizuarai *et al.*, 2004). Une étude récente chez l'homme mis en évidence un lieu entre la pharmacocinétique d'un substrat de BCRP, le diflomotecan et la mutation de la BCRP C421A (Sparreboom *et al.*, 2004). Les effets des SNPs (val12met et gln141lys) ont été aussi étudiés (Mizuarai *et al.*, 2004). La protéine porteuse de la substitution val12met présente une localisation membranaire altérée tandis que la protéine porteuse de la substitution gln141lys présente une fonction ATPase altérée. Une baisse d'expression de la protéine a été rapportée pour la mutation gln141lys (Imai *et al.*, 2002). Un polymorphisme rare aboutissant à la délétion du gène a également été identifié chez trois sujets japonais (Imai *et al.*, 2002). Plus récemment, deux études, visant à mettre en évidence l'influence du polymorphisme du gène *ABCG2* sur la biodistribution de l'irinotécan (de Jong *et al.*, 2004) et du diflomotécan ont été rapportées (Sparreboom *et al.*, 2004).



Figure 10 : Localisation des mutations au niveau de la BCRP (Krishnamurthy and Schuetz, 2006)

II.4.7. Rôle de la BCRP dans le phénotype MDR et signification clinique

Des anticorps monoclonaux récemment développés en vue de détecter la BCRP ont permis d'étudier l'expression de BCRP dans plus de 150 tumeurs cancéreuses non traitées (Maliepaard *et al.*, 2001; Scheffer *et al.*, 2000b). Les données obtenues ont montré que l'expression de BCRP est fréquente et pourrait avoir une signification clinique (Diestra *et al.*, 2002). Dans certaines tumeurs notamment dans la leucémie myéloïde aiguë, la BCRP, la MRP3 et la Pgp sont considérées comme des facteurs pronostics dont il faut tenir compte lorsque leurs substrats sont utilisés pour traiter cette pathologie (Benderra *et al.*, 2004; Benderra *et al.*, 2005)

II. 5. Réversion du Phénotype MDR

II.5.1. Modulation de l'expression des gènes MDR

De nombreux inhibiteurs de transport ont été développés ces dernières années mais leur utilisation est restreinte par leur toxicité (Chabner and Wilson, 1991; Dalton, 1994). Devant les nombreux échecs de la chimio-modulation *in vivo*, une stratégie de régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines ABC pouvait constituer l'alternative de la thérapeutique d'une chimio-résistance de type MDR.

II.5.1.1. Stratégie antisens

La stratégie antisens cible la traduction de l'ARNm, elle a été utilisée avec succès pour moduler partiellement la résistance des cellules aux antitumoraux (Quattrone *et al.*, 1994); (Alahari *et al.*, 1998; Brigui *et al.*, 2003). Cependant la faible spécificité des oligodeoxyribonucléotides complémentaires (ODNs) pour l'ARNm cible (Borowski *et al.*, 2005), conduit au constat qu'il est difficile d'inhiber l'expression des gènes MDR sans atteindre des doses cytotoxiques en oligonucléotides. Pour surmonter ce problème des travaux sur les "small interfering RNA" (siRNA) qui ciblent les gènes *MDR1* et *BCRP* ont été récemment développés (Ee *et al.*, 2004a; Priebsch *et al.*, 2006; Stierle *et al.*, 2004).

II.5.1.2. Stratégie anti-gène

Dans le cadre de cette stratégie, le nombre de sites potentiels est restreint aux séquences oligopyrimidiques-oligopuriques qui sont présentes au nombre de trois sur le gène MDR1 : deux d'entre elles sont dans les exons 2 et 3 et une longue séquence de 410 paires de bases se situe dans l'intron 14 (Chen *et al.*, 1990a; Pauly *et al.*, 1995). Quelques travaux ont décrit le ciblage de l'une de ces séquences (celle présente dans l'exon 3) avec des OFT en motif (G, T) et (T,C) non modifiés, permettant d'observer une réduction significative du taux d'ARNm (Morassutti *et al.*, 1999; Scaggiante *et al.*, 1994), sans qu'un "effet triple-hélice" n'ait été par ailleurs clairement démontré. D'autre part, Garbesi et al. ont mis au point la synthèse d'oligonucléotides conjugués avec des dérivés de la daunorubicine pour le ciblage de la séquence oligopyrimidique du gène MDR1 située dans l'exon 2 (Garbesi *et al.*, 1997).

II.5.2. Chimio-modulateurs

Un grand nombre de substances modifient la chimiorésistance un effet commun à de nombreuses substances, capable de bloquer la fonction des Pgp. Les modulateurs de Pgp sont classés selon leur mode d'action. Les bloqueurs de canaux calciques, tels que le vérapamil (Thiebaut *et al.*, 1987) et le R-vérapamil (moins toxique), la cyclosporine A et ses dérivés (Boesch *et al.*, 1991) tels que le PSC-833, et le tamoxifène, antiœstrogène qui agit indépendamment du statut hormonal de la cellule cible (Ramu *et al.*, 1984). La troisième catégorie de modulateurs de la Pgp sont les inhibiteurs de la liaison de l'ATP, notamment les analogues d'ATP (azido-ATP par exemple).

Certains des modulateurs de la Pgp modulent également la fonction de la MRP1 (figure 11). Parmi ces modulateurs, le vérapamil qui semble moduler la résistance des cellules transfectées ou sélectionnées surexprimant la MRP1 (Binaschi *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1994). La génistéine, inhibiteur de tyrosine kinase, est capable d'inhiber l'efflux de la daunorubicine dans des cellules cellules surexprimant la MRP1 (Versantvoort *et al.*, 1993). Le MK571, antagoniste du récepteur de LCT₄, module spécifiquement la résistance induite par MRP1. Puisque la MRP1 transporte les agents complexés au GSH, les inhibiteurs de sa synthèse sont capables également d'inhiber la fonction de MRP1 (exemple : la buthionine sulphoximine ou BSO). Le sylfinpyrazone inhibe la MRP1 en entrant en compétition avec le GSH sur son site de fixation au niveau de la MRP1 (Evers *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la BCRP, plusieurs inhibiteurs ont été décrits. Parmi ces inhibiteurs la fumitromorgine C (FTC), qui est extraite d'*Aspergilllus fumigatus*. Elle est capable d'inhiber complètement la résistance à des concentrations sub-micromolaires dans les lignées cellulaires qui présentent un haut niveau de résistance à la mitoxantrone (Rabindran *et al.*, 1998; Rabindran *et al.*, 2000). Cependant, celle-ci présente une toxicité. Plus de vingt analogues de la FTC ont été synthétisés, mais aucun d'entre eux ne possède un effet aussi efficace que la FTC elle-même (He et al. 1999). Un deuxième inhibiteur a également été décrit, il s'agit du GG918 (GG120918), qui est également un inhibiteur de la Pgp (figure 11).



Figure 11 : Modulateurs des transporteurs ABC, Pgp (MDR1), MRP1 et MXR (BCRP) Abréviations : CSA : cyclosporine A, VERAP : vérapamil, STAURO : staurosporine, ECON : econazole, PRAZ : prazosine, FTC : fumitromorgin C, PROB : probenicide, BBR : benzbromarone, SUPYR : sulfinpyrazone, INDO : indomethacine, GENIS : genisteine, PGA2 : prostaglandine A2, CCCP : chlorocarbonyl cyanide phenylhydrazone, GF120918 : GG918.

III- LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE

III.1. Définition

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie chronique caractérisée par l'expansion clonale de cellules différenciées de la lignée granuleuse (figure 13). Elle constitue un des modèles d'étude privilégiés de la leucémogenèse car les cellules tumorales sont caractérisées par un échange de matériel chromosomique : la translocation t(9;22), qui entraîne la formation d'un chromosome 22 anormal, dénommé chromosome de Philadelphie (Ph) (figure 12). Cette translocation équilibrée conduit à un gène chimérique codant pour une protéine de fusion BCR-ABL, dont les propriétés sont différentes de celles des partenaires de la fusion (BCR et ABL).



Figure 12 : Schéma du chromosome de Philadelphie

III.2. Evolution de la LMC

En l'absence de tout traitement, la maladie évolue naturellement de la phase chronique vers une phase d'accélération liée à l'apparition d'événements génétiques secondaires. Il est alors possible d'observer des anomalies cytogénétiques additionnelles au caryotype. Cette phase d'évolution de la LMC est caractérisée par la présence de cellules peu différenciées (blastes) dans le sang. À terme, lorsque les blastes représentent 20% des cellules médullaires, ils définissent une phase de transformation aiguë de la maladie (phase blastique : CML-BP) (figure 15), associée à un tableau clinique proche de celui d'une leucémie aiguë.



Figure 13 : Développement de la leucémie myéloïde chronique. Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) qui expriment BCR-ABL se différencient en progéniteurs myéloïdes (CMPs), qui se différencient à leurs tour en granulocytes/macrophages (GMPs; progéniteurs des granulocytes (G)des macrophages (M)et et en progéniteurs de mégacaryocytes/érythrocytes (MEP; progéniteurs des globules rouges (RBCs) et des mégacaryocytes, qui produisent les plaquettes). Les HSCs peuvent également se différencier en progéniteurs lymphoïdes (CLPs), qui vont donner les lymphocytes. La phase chronique de la LMC (CML-CP) est caractérisée par une prolifération massive des granulocytes. L'acquisition des mutations génétiques additionnelles au delà de l'expression de BCR-ABL induit une progression de la LMC de la phase chronique à la phase de blastique (CML-BP). (d'après (Ren, 2005).

III.3. Structure du BCR-ABL

Structurellement, la protéine BCR-ABL contient la plupart des domaines fonctionnels de c-abl, domaines SH2 (Src-homology 2) et SH3, domaine tyrosine kinase, domaine de fixation à l'ADN et domaine de liaison à l'actine. Le domaine de tétramérisation de BCR, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion, permet une activation constitutive de la fonction tyrosine kinase de c-abl et la localisation majoritairement cytoplasmique de la protéine BCR-ABL (figure 14). Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la protéine BCR-ABL, par son activité tyrosine kinase constitutive, était responsable de la LMC.



Figure 14: Structure de la protéine $P^{210bcr-abl}$ (BCR-ABL). Le BCR-ABL possède un domaine de fixation à l'ADN, un domaine de liaison à l'actine, un domaine DBL : domaine d'homologie avec la protéine DBL, cette partie présente une zone d'échanges GTP/GDP, deux domaines SH2, un domaine SH3, un domaine tétramerisation et un domaine Tyrosine kinase.

III.4. Activité de BCR-ABL et voie de transduction du signal

L'étude des substrats de BCR-ABL a permis d'identifier les voies de transduction du signal activées par l'oncoprotéine. Bien que difficilement individualisables de par leurs caractères souvent redondants et l'existence de complexes multiprotéiques associant diverses protéines adaptatrices communes, leur désorganisation par le BCR-ABL est à la base des principaux effets cellulaires observés. En effet, La protéine BCR-AB possède, sur sa partie Bcr, une Tyrosine phosphorylable, l'Y177 ou Tyr177 (figure 15). Elle va permettre le déclenchement de la voie Ras. Ras est une protéine appartient à la famille des petites protéines G. elle est dans sa forme active recrutée à la membrane et liée au GTP. Son

activation par le BCR-ABL peut être directe (séquence: phosphorylation de Tyr177, liaison à GRB2, puis complexe GRB2-SOS activateur) ou indirecte par l'intermédiaire de protéines adaptatrices substrats de BCR-ABL (Shc ou CRKL par exemple). La transcription de gènes cibles fait ensuite intervenir deux voies effectrices possibles : la cascade enzymatique des MAP kinases et/ou les SAP kinases. Il existe une autre tyrosine phosphorylable localisée dans la boucle d'activation du domaine d'abl (Y1294) capable, elle aussi, d'activer la voie de signalisation Ras (figure 15).

Le BCR-ABL, *via* des protéines adaptatrices (Grb2, SHC, Crkl) et par l'intermédiaire de la PI3kinase (Salter et al. can cell 2002) (figure 15), active la sérine-thréonine kinase (Akt), ce qui permet de maintenir Bad phosphorylé. Dans cet état, Bad est incapable de se lier aux protéines anti-apoptotiques BclX, il est alors neutralisé dans le cytosol, ce qui induit une régulation positive de la protéine anti-apoptotique Bcl2. l'activation de cette voie a comme conséquence une inhibition de l'apoptose et une prolifération des cellules cancéreuses.



Figure 15 : Voies de transduction activées par le BCR-ABL. Plusieurs voies de transduction de signal sont activées, notamment la voie Ras et la voie de la PI3K par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (Ren, 2005)

III.5. Traitement de la leucémie myéloïde chronique

Le traitement de la LMC a changé de manière déterminante ces dernières années. Parmi les premières approches thérapeutiques, la greffe de moelle allogénique, mais qui est utilisée uniquement dans une minorité de patients. Pour l'approche médicamenteuse, deux étapes majeures l'on marqué: l'introduction de l'interféron α (IFN) et celle, récente, de l'imatinib. Les résultats prometteurs obtenus avec l'IFN ont été améliorés, notamment en ce qui concerne la survie, par son association avec l'aracytine (ARA-C) (Guilhot *et al.*, 1997). Cette association était considérée jusqu'à une date récente comme le traitement standard de la LMC, et entraîne des réponses cytogénétiques complètes (absence de translocation t(9; 22) dans 30 % des cas environ, dont certaines se traduisant par des rémissions complètes. Chez les patients résistants à l'IFN, les options thérapeutiques étaient limitées, toxiques et peu efficaces (Turhan, 2003).

En 1996, l'imatinib inhibiteur de tyrosines kinases a été identifié. Cette molécule est capable d'inhiber l'activité tyrosine kinase du PDGF (platelet-derived growth factor), mais aussi celle de v-abl et de BCR-ABL. L'imatinib agit au niveau de la poche de liaison à l'ATP de la portion ABL de manière sélective alors qu'elle n'a aucun effet inhibiteur sur l'activité tyrosine kinase d'autres récepteurs comme le VEGF-R (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) et EGF-R (Epidermal. Growth Factor Receptor). Cette sélectivité a conduit rapidement à l'introduction de cet inhibiteur en clinique, et depuis 1998, plusieurs milliers de patients atteints de LMC ont été traités avec cette molécule en première ligne. Ainsi, l'imatinib a montré une efficacité majeure chez les patients résistant à l'IFN et chez les patients dont la maladie était en phase aiguë ou blastique (Tothova *et al.*, 2005). De même, le médicament est actif chez les patients présentant une leucémie aiguë lymphoblastique et porteurs de la translocation t(9; 22), avec une proportion de rémission importante (Yanada and Naoe, 2006). Cependant, les rechutes surviennent chez des patients leucémie aiguë lymphoblastique (LAL Ph+) avec différents mécanismes de résistance.

III.6. Mécanismes de résistance à l'imatinib

Les études des mécanismes de résistance ont été menées principalement sur des lignées cellulaires rendues résistantes par exposition à des doses croissantes d'imatinib. Cette approche *in vitro* a été complétée par des travaux réalisés sur des cellules sanguines ou médullaires de patients en phase accélérée de LMC et n'ayant jamais présenté de réponse favorable au traitement, ainsi que sur des cellules de patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) associée à la translocation (9 ; 22) Ph (LAL Ph+). Ces approches ont permis d'élucider certains mécanismes de résistance (Roche-Lestienne *et al.*, 2004).

III.6.1. Mutation de BCR-ABL

L'effet des mutations de c-abl sur la sensibilité à l'imatinib varie selon leur nature ou leur localisation. Dans la LMC, les mutations situées dans le site de fixation de l'ATP (la boucle P: phosphate binding loop), présentent une valeur pronostique défavorable chez les patients. En effet, dans une étude rétrospective, Brandford et al. ont montré que 92% des patients traités par imatinib, ayant une ou plusieurs mutations dans cette région, décèdent dans les six mois qui suivent leur détection, alors que si les mutations sont situées dans une autre région du site actif de c-abl, la proportion de décès est de 21% (Branford et al., 2003). L'analyse structurale de la boucle P montre qu'une mutation affectant l'acide aminé 253 ou 255 modifie la conformation tridimensionnelle, perturbant l'interaction de l'imatinib avec le site catalytique de c-abl (Corbin et al., 2003). De plus, la substitution d'une tyrosine par une phénylalanine en position 253 confère à la tyrosine kinase une activité oncogénique accrue, puisque les cellules BCR-ABL portant cette mutation sont capables de produire une quantité plus importante de phosphotyrosines in vitro (Roumiantsev et al., 2002). Il est donc tout à fait possible que ce type de mutation détermine non seulement une résistance importante à l'imatinib, mais contribue également à l'accélération de la maladie (Roche-Lestienne et al., 2004). Les mutations localisées dans la boucle d'activation (boucle A), comme la substitution de l'histidine en position 396, altèrent l'affinité de l'imatinib pour son substrat. De même, la substitution des résidus hydrophobes en position 351 ou 486 perturbe l'interaction avec la région amino-terminale de la tyrosine kinase. Ainsi, ces mutations déstabilisent la forme inactive de c-abl et déplacent l'équilibre vers sa configuration active, non reconnue par l'imatinib (Roche-Lestienne et al., 2004).

III.6.2. Réactivation de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL

Une modification quantitative de la cible par amplification du gène *BCR-ABL* peut être à l'origine d'une réactivation de l'activité tyrosine kinase dans les cellules devenues résistantes à l'imatinib (Mahon *et al.*, 2000). Cependant, le phénotype résistant observé est réversible puisque la suppression de l'imatinib du milieu de culture conduit à la diminution du taux de synthèse de l'ARNm et de la protéine chimérique BCR-ABL. Ce mécanisme de résistance est observé chez moins de 5% des patients ayant eu une recherche d'amplification génique ((Mahon *et al.*, 2000); (Gorre *et al.*, 2001); (Hochhaus *et al.*, 2001); (Hochhaus *et al.*, 2002)

III.6.3. Transporteurs ABC (Pgp et BCRP)

Une augmentation conjointe de l'expression de *BCR-ABL* et de *MDR1* a été observée dans une lignée résistante à l'imatinib LAMA84R (Mahon *et al.*, 2003). Dans un second modèle issu d'une lignée érythroïde K562, la résistance à la doxorubicine due à l'expression du gène *MDR1* protège ces cellules contre l'effet de l'imatinib (Mahon *et al.*, 2003). Enfin, l'augmentation de l'expression du gène *MDR1* induite par transfection contribue à la résistance d'une lignée AR230 à de faibles concentrations d'imatinib (Mahon *et al.*, 2000), mais n'a aucun effet la lignée K562 dans les mêmes conditions (Ferrao *et al.*, 2003)). *In vivo*, dans la LMC, la résistance à l'imatinib liée à l'expression du gène *MDR1* est difficile à évaluer en raison d'une expression physiologique importante de ce gène dans les cellules sanguines. En ce qui concerne la BCRP, les résultats sont contradictoires. En effet, dans un modèle de cellules intestinales Caco2 exprimant la tyrosine kinase PDGFR, Burger et collaborateurs ont sélectionné une lignée résistante à l'imatinib, qui surexprime la BCRP. Cette surexpression est accompagnée d'une diminution de l'accumulation intracellulaire de l'imatinib (Burger *et al.*, 2005). Cependant, la transfection du gène *BCRP* dans le modèle de sarcome humain Saos-2 n'induit aucune résistance à l'effet cytotoxique de l'imatinib, en

revanche, la résistance à d'autres substrats de la BCRP est modulée par l'imatinib (Houghton *et al.*, 2004).

III.6.4. Activation d'autres voies de survie

Pour une concentration d'imatinib donnée, un délai de cent heures est nécessaire pour obtenir l'apoptose *in vitro* de cellules leucémiques de patients atteints de LMC, alors que l'apoptose de cellules blastiques de patients atteints de LAL Ph+ est induite en 16 à 20 heures (Donato *et al.*, 2003). Cette cinétique d'induction d'apoptose moins rapide pour les cellules de LMC pourrait résulter de l'activation accrue d'autres voies de survie, indépendantes de BCR-ABL. Ces autres voies peuvent être affectées par des anomalies génétiques additionnelles provoquées par la forte instabilité génomique propre à cette pathologie. Le modèle de cellules K562, résistantes à l'imatinib mais présentant une diminution du taux d'expression du transcrit BCR-ABL, a permis de montrer que la résistance pouvait résulter de l'activation de la voie des src-kinases (Donato *et al.*, 2003).

L'augmentation de la phosphorylation des protéines telles que src-kinase LYN, permettrait de contourner l'inhibition de BCR-ABL par l'imatinib. *In vivo*, l'augmentation de l'activité de LYN, observée chez certains patients en phase accélérée de LMC, est probablement liée à l'évolution de la maladie, mais pourrait aussi participer à la résistance à l'imatinib (Donato *et al.*, 2003).

56

IV. TELOMERE ET INSTABILITE GENOMIQUE DANS LES CELLULES DE LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE

IV.1. Les télomères

Les télomères sont des complexes nucléo-protéiques protégeant l'extrémité des chromosomes. Ils évitent que les chromosomes linéaires soient reconnus comme un dommage de l'ADN et les protègent de la dégradation ou de la fusion entre chromosomes. Leur raccourcissement progressif au cours des divisions cellulaires est associé aux mécanismes de sénescence cellulaire où ils joueraient le rôle « d'horloge mitotique ». Les cellules somatiques normales de mammifères prolifèrent jusqu'à un nombre limite de divisions pour entrer en sénescence réplicative (Bodnar et al., 1998; Lanza et al., 2000). Les cellules qui échappent à la sénescence réplicative continuent à se diviser jusqu'à la mort cellulaire massive déclenchée par un raccourcissement critique des télomères qui ne peuvent plus protéger l'extrémité des chromosomes. L'analyse des chromosomes a montré que près de 200 pb d'ADN sont perdues à chaque division cellulaire. En cas de perte ou d'érosion excessive ces extrémités libres deviennent un substrat pour les systèmes de réparation, conduisant ainsi à des mauvaises recombinaisons. Ce phénomène est bien mis en évidence dans les fibroblastes murins en culture pendant la phase dite de crise. Dans les cellules humaines, cette phase d'intenses remaniements chromosomiques ne s'observent qu'après transfection par *hTERT* qui est la sous-unité catalytique de la télomérase (human telomerase reverse transcriptase) et d'une partie du génome du virus SV40, nécessaire pour l'inactivation de p53 et Rb (Thomas et al., 2002).

Les télomères sont composés d'une répétition en tandem de plusieurs kilobases (10-30 kb), riche en GT (TTAGGG) et de facteurs protéiques (de Lange, 2005). Ils se terminent par une extension 3' simple brin riche en G qui forme une boucle terminale appelée T-loop (Figure 16), où les séquences télomériques forment un large cercle (Nikitina and Woodcock, 2004). En effet, le brin 3' sortant des télomères envahit l'ADN télomérique double brin adjacent pour s'apparier au brin riche en C et déplacer le brin riche en G.



Figure 16 : Structure schématique d'une ''T loop''. L'extrémité 3' sortante envahit le duplexe télomérique adjacent formant alors une "D loop". La taille des "T loops" est variable. (d'après de Lange, 2005).

IV.2. Télomérase

La télomérase, enzyme responsable du maintien de la taille du télomère, a été découverte par l'équipe de Blackburn en 1985 (Greider and Blackburn, 1985). En 1989, Morin et al. montrent l'existence d'une activité télomérase dans des cellules cancéreuses humaines contribuant à leurs immortalisation (Morin, 1989).

La télomérase est un large complexe d'environ 1000 kDa constitué de deux composants essentiels : l'ARN matrice ou hTR (human Telomerase RNA) qui sert de matrice pour la synthèse de l'ADN télomérique matrice et l'enzyme reverse transcriptase hTERT (human TElomerase Reverse Transcriptase). L'association de hTERT et hTR constitue le complexe télomérase actif minimal (Beattie *et al.*, 1998). La télomérase humaine semble fonctionner *in vivo* sous forme de dimère ou de multimère (Beattie *et al.*, 2001). Le poids

moléculaire natif de la télomérase humaine recombinante (600 kDa) correspond à un dimère (Wenz *et al.*, 2001). La télomérase ajoute des séquences (TTAGGG) à l'extrémité 3' des chromosomes (Figure 17).

L'expression de hTERT est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Bien que la transcription de hTERT soit faible dans de nombreux tissus humains, elle est réactivée dans de nombreuses cellules cancéreuses. Des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation de hTERT ont également été observées lors de l'activation des lymphocytes T (Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1999).

L'activité de la télomérase est absente dans la majorité des cellules somatiques normales alors qu'elle est présente dans plus de 90% des cancers. Les cellules souches et les cellules germinales possèdent également une activité télomérase qui leur permet d'assurer le renouvellement des tissus et la reproduction, respectivement. Par contre, il a récemment été mis en évidence que les fibroblastes possèdent aussi une activité télomérase qui joue un rôle important dans le contrôle du potentiel réplicatif de cellules (Masutomi *et al.*, 2003). En absence de la télomérase certaines lignées cellulaires peuvent échapper à la sénescence et maintenir la longueur de leurs télomères en activant le mécanisme ALT (Alternative Lengthening of Telomeres). Cette activation conduit à une capacité réplicative illimitée. Le mécanisme ALT est souvent responsable de l'élongation des télomères par des systèmes de recombinaison faisant intervenir les complexes impliqués dans la réparation de l'ADN.



Figure 17 : Ccomplexe télomérase et ADN télomérique : La télomérase est constituée d'une sous unité catalytique hTERT et d'un ARN matrice hTR. Elle ajoute des répétitions de l'hexamère TTAGGG en se fixant à l'extrémité du chromosome. hTR est utilisé par hTERT comme amorce pour ajouter les nucléotides. Après un hexamère ajouté, la télomérase se repositionne pour permettre un nouveau cycle d'élongation.

IV.3. Localisation de la télomérase

La détection de hTERT, grâce à un marquage par les protéines fluorescentes, montre une localisation nucléaire dépendante du cycle cellulaire (Tomlinson *et al.*, 2006). Yang et al. ont observé que 80% des cellules qui expriment de façon stable YFP-hTERT montrent une localisation nucléaire de hTERT, une exclusion du nucléole pour 10% d'entres elles alors qu'environ 6% des cellules présentent une localisation nucléolaire (Yang *et al.*, 2002). En réponse aux dommages à l'ADN, les cellules tumorales montrent une accumulation nucléolaire de Htert (Yang *et al.*, 2002). Cette localisation nucléolaire pourrait alors permettre une séquestration de la télomérase pendant la phase de réparation de l'ADN afin de l'éloigner de la chromatine endommagée et d'éviter ainsi une activité anarchique de la télomérase.

IV.4. Protéines fixant les répétitions télomériques

Plusieurs protéines associées aux télomères ont été caractérisées. Elles régulent la longueur des télomères et la formation des T loops. Les protéines spécifiques de l'ADN télomérique double brin, TRF1 et TRF2 (telomeric repeat binding factor 1 et 2) sont des acteurs importants de cette régulation (Riou et al., 2005). Elles agissent sous forme de dimères, et possèdent deux motifs de liaison à l'ADN double brin spécifiques de la séquence 5'-YTAGGGTTR-3' (Y=pyrimidine, R=purine). Les autres protéines, TIN2 (TRF1interacting protein 2) et Rap1 (repressor activator protein 1), interagissent avec TRF1 et TRF2, respectivement, alors que TPP1/PIP1 (POT1-interacting protein 1) interagit avec TIN2 (Figure 18). POT1 (Protein of telomere 1) est la plus conservée de ces protéines et s'associe spécifiquement à la séquence simple brin 5'-(T) TAGGGTTAG-3'). L'association de TRF1, TRF2 et POT1 a ainsi une haute capacité de reconnaissance des télomères avec cinq motifs de liaison à l'ADN qui leur permettent de distinguer les télomères de tout autre extrémité d'ADN. Ces six protéines peuvent former un seul et même complexe qui est abondant à l'extrémité des chromosomes et s'associe tout au long du cycle cellulaire aux télomères. Elles contrôlent le recrutement de la télomérase qui requiert en particulier l'activité de POT1 (de Lange, 2005).



Figure 18 : Représentation des six protéines associées au complexe télomérique (shelterin) positionnées au niveau du télomère (de Lange, 2005).

V.5. Protéines de réparation des liaisons de l'ADN et maintien du télomère

Les protéines télomériques interagissent avec de nombreux facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN. Cette interaction empêche les télomères d'être reconnus comme un dommage à l'ADN et permet de les préserver de recombinaisons indésirables conduisant à la fusion des chromosomes ou encore à la perte des télomères.

Opresko et collaborateurs ont montré que les hélicases de type RecQ précisément WRN (Werner) et BLM (Bloom) s'associent aux télomères dans plusieurs lignées cellulaires humaines de type ALT (Opresko *et al.*, 2004b). L'hélicase WRN s'associe également aux télomères dans des fibroblastes humains primaires en culture pendant la phase S du cycle cellulaire (Crabbe *et al.*, 2004). WRN et BLM interagissent avec les protéines télomériques TRF1 et TRF2. Ces complexes ont été localisées au niveau des télomères (Lillard-Wetherell *et al.*, 2004; Opresko *et al.*, 2002; Stavropoulos *et al.*, 2002).

WRN et BLM possèdent une fonction particulière qui consiste en la reconnaissance et la migration le long des jonctions de Holliday (intermédiaires des phases de recombinaison d'ADN, possédant une structure à 4 branches) (Mohaghegh *et al.*, 2001). Elles sont également impliquées dans la résolution de structures particulières, telles que les D-loop (figure 16) (van Brabant *et al.*, 2000) ou les G-quadruplexes (structure à quatre brins de l'ADN formée par les répétitions de guanine) (Mohaghegh *et al.*, 2001); (Fry and Loeb, 1999); (Wu and Maizels, 2001); (Han *et al.*, 2000). La resolution des structures G-quadruplexes (figure 19) pourrait réguler la formation de ces structures au cours de la réplication des télomères et intervenir dans le changement de conformation de l'extrémité télomérique (assemblage ou désassemblage de la T-loop ; (figure 16)) (Khakhar *et al.*, 2003; Opresko *et al.*, 2004a). L'inactivation de BLM et de WRN chez la souris renforce les effets de l'inactivation du composant ARN de la télomérase (TERC) et provoque une dysfonction du télomère (Du *et al.*, 2004).

Les topoisomérases II et III s'associent à BLM, WRN et Sgs1 pour relaxer les Gquadruplexes (Wu *et al.*, 2000); (Watt et al., 1996; Wu and Hickson, 2002). La topoisomérase I possède également une activité de fixation des structures G-quadruplexes (Arimondo *et al.*, 2000). Tsai et collaborateurs ont montré dans une étude récente, l'implication de la topoisomérase IIIα dans le maintien des télomères des cellules de type ALT Saos-2 (Tsai *et al.*, 2006)



Figure 19 : Rôles des hélicases RecQ dans la maintenance de l'intégrité de génome durant la réplication de l'ADN. a. La progression d'une fourche de réplication peut être bloquée par les structures secondaires dans l'ADN, telles que des épingles à cheveux ou des Gquadruplexe. Les hélicases RecQ peuvent résoudre ces structures et ainsi permettre la progression de la fourche de réplication. b. Si une fourche rencontre une lésion (cercle orange) sur la matrice du brin de tête, la fourche peut régresser et les brins naissants d'ADN (vert) peuvent s'hybrider pour former une jonction à 4 branches (jonction de Holliday). Le brin de tête est alors synthétisé en utilisant le brin de queue comme matrice. Une hélicase RecQ peut résoudre la jonction à 4 branches et permettre un « by pass » de la lésion. (Hickson, 2003).

IV.6. La télomérase dans les cellules hématopoïétiques

Contrairement à la plupart des cellules somatiques normales, les cellules hématopoïétiques ont la capacité d'exprimer la télomérase à des phases particulières d'activation et de différenciation. Une activité télomérasique est détectée dans la moelle osseuse, le sang périphérique et les organes lymphoïdes.

Au niveau de la moelle osseuse, alors que les cellules les plus primitives (CD34+CD38-) ne présentent pas ou très peu d'activité télomérasique, les cellules déjà engagées dans une voie de différenciation (CD34+CD38+) présentent une activité télomérasique (Engelhardt et al., 1997 ; Chiu et al., 1996). Les cellules les plus différenciées sont dépourvues d'activité télomérasique. Par conséquent, l'induction de la télomérase serait donc transitoire au cours des premières étapes de la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Weng et al. ont détecté une forte activité télomérasique lors de la différenciation thymique des lymphocytes T (Weng *et al.*, 1997). Les lymphocytes T qui sont majoritairement non actives dans le sang circulant, ne présentent pas une forte activité télomérasique (Weng *et al.*, 1996). Cependant, dans ces cellules, l'activité télomérasique est nettement augmentée de manière transitoire lors de l'activation antigénique. De la même manière, l'activation des lymphocytes B induit une augmentation de l'activité télomérasique, qui est absente dans les cellules inactives (Igarashi and Sakaguchi, 1997). Malgré cette activité télomérasique, la taille des télomères des cellules hématopoïétiques diminue au cours des divisions cellulaires.

IV.7. Le télomère dans la leucémie myéloïde chronique

Au cours des trois phases d'évolution de la LMC, le télomère subit des changements en terme de taille et de stabilité liés essentiellement au changement de l'activité télomérasique des cellules et à la modification de l'expression de certaines protéines télomériques et de réparation. Avant l'utilisation l'utilisation de l'imatinib dans le traitement de LMC, la phase chronique de la LMC était relativement stable avec une durée moyenne de 5-6 ans qui est finalement suivie par la phase d'accélération. Dans cette phase, une augmentation de l'instabilité génétique mène à l'acquisition d'anomalies cytogénétiques et de mutations additionnelles responsables de la forte prolifération des clones cancéreux (figure 20).

Les télomères des cellules leucémiques sont sensiblement plus courts que ceux des lymphocytes-T (Ph-) du même donneur (Brummendorf *et al.*, 2000). Des études récentes réalisées sur les prélèvements de patients ont montré que dans la phase chronique, la majorité de patients atteints de LMC présentent une longueur du télomère réduite (Ohyashiki *et al.*, 2000). Ce raccourcissement de la taille du télomère est probablement lié à une faible activité télomérasique et à la division cellulaire. Durant les phases d'accélération et blastique les télomères arrivent à une taille critique. Les cellules LMC présentent des changements au niveau des microsatellites, signe d'une forte instabilité génomique dans ces deux phases. Ceci montre que l'expression et l'activation de la télomérase dans la phase d'accélération et blastique sont probablement associées à l'instabilité génomique.

L'expression de hTERT dans les cellules de LMC chez les patients en phase chronique est similaire à celle des cellules normales. Cependant, son épissage alternatif est modifié et l'expression de son partenaire hTR diminue. Ceci explique la faible activité de la télomérase dans cette phase (Drummond *et al.*, 2005).

La progression de la maladie dans les phases d'accélération et blastique est associée à l'augmentation significative des niveaux d'expression de hTERT (10 à 50 fois) (Engelhardt *et al.*, 2000; Ohyashiki *et al.*, 2000). Pendant la phase blastique, l'activité de la télomérase est très élevée par rapport à la moyenne de l'activité télomérasique observée chez des sujets normaux.

Plusieurs études ont rapporté une régulation post-traductionnelle de l'activité de hTERT par sa phosphorylation, notamment par la tyrosine kinase c-abl (Kharbanda *et al.*, 2000), néanmoins la localisation cytoplasmique du BCR-ABL et nucléaire de hTERT ne permettrait pas cette régulation (Hartmann *et al.*, 2005). Cependant le BCR-ABL contrôle des voies de signalisation décrites comme étant impliquées dans la phosphorylation de hTERT, notamment la voie de la PI3K/Akt (Kang *et al.*, 1999).



Figure 20 : Evolution du télomère au cours de la progression de la LMC. Dans la phase chronique de la LMC, la taille du télomère diminue jusqu'à une taille critique. (1) Le traitement avec l'imatinib accélère cette réduction et provoque l'entrée des cellules en phase de sénescence. (2) En absence du traitement, l'expression et l'activité de la télomérase augmente, ce qui permettra de stabiliser ou d'augmenter la taille des télomères et d'échapper ainsi à la sénescence.

IV.8. Implications des protéines de réparation dans l'instabilité génomique observée dans les cellules LMC

Dans les cellules normales, il existe un équilibre entre les mécanismes de réparation d'ADN et les voies d'apoptose. Ainsi un excès de dommages d'ADN ou de lésions irréparables constituent une menace à la stabilité génomique de ces cellules, ce qui les amènent à entrer en apoptose. Cependant, les cellules tumorales est en particulier les cellules BCR-ABL-positives semblent être mieux équipées pour survivre aux dommages d'ADN.

Les observations cliniques (Alimena *et al.*, 1987) ; (Kelman *et al.*, 1989); (Rowley, 1982) et les résultats obtenus *in vitro* (Honda *et al.*, 2000); (Laneuville *et al.*, 1992); (Salloukh and Laneuville, 2000) montrent que BCR-ABL peut induire une instabilité génomique, menant à des translocations chromosomiques, suppressions de chromosomes, amplifications et mutations de gènes (duplication du chromosome Ph, trisomie 8 ou isochromosome 17 par exemple) (Etienne and Mahon, 2001). Ce phénomène est peut être lié à aux aberrations observées dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules leucémiques BCR-ABL-positives.

Généralement deux types de dommages d'ADN peuvent contribuer à l'instabilité génomique: les dommages spontanés qui se produisent simplement comme résultat de l'effet de composés comme les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species), et les dommages provoqués par des facteurs externes, comme des thérapies génotoxiques. Dans les cellules LMC, il a été observé que BCR-ABL augmente la production des ROS (Sattler *et al.*, 2000). Les niveaux élevés des ROS dans les cellules transfectées par le BCR-ABL peut contribuer aux dommages d'ADN spontanés et à l'instabilité génomique (Aitken and Krausz, 2001). Parmi les protéines qui interviennent dans les mécanismes de réparation d'ADN, on trouve Les hélicases de la famille RecQ. Cette famille d'hélicase est composée de 5 protéines connues : BLM, WRN, RTS, RecQL1 et RecQL5. Ces hélicases peuvent agir tôt dans la voie

de recombinaison en créant un substrat simple-brin, qui peut être employé par l'hélicase de type RecA (RAD51) (Harmon and Kowalczykowski, 1998). *In vitro* RAD51 se polymérise le long d'un ADN simple brin et catalyse l'échange de brin entre deux séquences homologues. Cet échange est favorisé par la présence de RAD52, du dimère RAD55-RAD57 et de RAD54 (Sung, 1997a; Sung, 1997b).

Les travaux de Slupianek et al. montrent que les hélicases BLM et RAD51 sont activées par le BCR-ABL (Slupianek *et al.*, 2005; Slupianek *et al.*, 2001). BCR-ABL régule aussi bien la transcription, la dégradation, et la phosphorylation de RAD51 (Figure 21).



Figure 21 : Régulation de la transcription, la phosphorylation et la dégradation de RAD51 par le BCR-ABL. DSB : double strand break (cassures double brin)

La régulation positive de l'expression de BLM et de RAD51 par BCR-ABL a comme conséquence directe une augmentation de la réparation d'ADN par recombinaison homologue, suite à une résistance à des agents comme le cisplatine ou la mitomycine C (figure 22) (Slupianek *et al.*, 2005; Slupianek *et al.*, 2001).



Figure 22 : Mécanismes de résistance aux médicaments génotoxiques dans les cellules exprimant BCR-ABL

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS

I.1. Effecteurs pharmacologiques

I.1.1. Mitoxantrone

La mitoxantrone (Sigma, St Quentin Fallavier) est un inhibiteur de la topoisomerase II (Crespi *et al.*, 1986) qui appartient à la famille des anthracenediones. Elle est couramment utilisée dans le traitement de plusieur cancers. Elle est utilisée chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloide (Tallman *et al.*, 2005). Des études récentes indiquent une incidence élevée de leucémie chez les patientes présentant un cancer du sein et traitées avec un protocole thérapeutique contenant la mitoxantrone (Saso *et al.*, 2000); (Kroger *et al.*, 2003). Cependant, il n'y a aucune donnée qui montre un risque leucémique quand la mitoxantrone est donnée en monothérapie. La solution mère est préparée à une concentration de 5 10^{-2} M et stockée à -20° C.



Figure 23: Structure de la mitoxantrone

I.1.2. Etoposide

L'étoposide est un dérivé hémisynthétique de la podophyllotoxine, molécule naturelle extraite de podophyllum. Une vingtaine d'années de recherche ont été nécessaires pour passer de la podophyllotoxine à l'étoposide (Imbert, 1998). Les modifications apportées au squelette de la podophyllotoxine se sont traduites par un changement du mécanisme d'action. En effet, alors que la podophyllotoxine est un poison du fuseau mitotique, l'étoposide inhibe la topoisomérase II. C'est médicament anticancéreux très utilisés de nos jours en chimiothérapie (Hande, 1998b) (Meresse et al., 2004). Il est utilisé dans le traitement d'un certain nombre de cancers et particulièrement le cancer du poumon à petites cellules et le cancer des testicules (Belani et al., 1994); (Pommier et al., 1996); (Hande, 1998a). De plus, il est utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë, le lymphome non-Hodgkinien, le sarcome de Kaposi et le neuroblastome (Hande, 2003). Parfois utilisé en monochimiothérapie, l'étoposide est souvent associé à d'autres antitumoraux, tels que le cisplatine, le carboplatine ou le cyclophosphamide. L'étoposide ou VP16 provient de chez Merck (Lyon). La solution mère est préparée à une concentration de 3,5 10^{-2} M et stockée à -20° C. La forme radioactive ³H-VP16 provient de chez Moraveck (Brea, CA). La concentration de sa solution mère est de 1,7.10⁻² M (250 µCi, 1mCi/ml, 300-900 mCi/mmol) et stockée à -20°C.



Figure 24: Structure de l'étoposide
I.1.3. Doxorubicine

La doxorubicine est l'un des premiers antibiotiques de la famille des anthracyclines à être utilisé dans le traitement du cancer. Elle est obtenue par fermentation chez différents micro-organismes appartenant au genre Streptomyces (Arcamone *et al.*, 1997). Elle est utilisée dans le traitement de plusieurs types de tumeurs solides, notamment le carcinome du sein, carcinome pulmonaire et le cancer de la thyroïde et hémopathies malignes. La doxorubicine, qui s'intercale entre les bases d'ADN (G-C), est un inhibiteur de la topoisomérase II qui induit des cassures double brin (Koehn *et al.*, 2007). La doxorubicine provient de chez Sigma. La solution mère est préparée dans de l'eau stérile à 10⁻³M et conservée à -20°C.



Figure 25 : Structure de la doxorubicine

I.1.4. Imatinib

L'imatinib est un dérivé de 2-phenylaminopyrimidine développé par les laboratoires Novartis (Bâle, Suisse). Il a été décrit comme un inhibiteur de la tyrosine kinase BCR-ABL (Druker *et al.*, 1996) et PDGF (Buchdunger *et al.*, 1996). Dans les études précliniques, cette molécule s'est avérée capable d'inhiber *in vitro* toutes les kinases abl comprenant les protéines p210, p190, v-Abl et c-Abl. *In vitro*, l'imatinib induit, à des concentrations micromolaires, la mort de toutes les lignées cellulaires exprimant le BCR-ABL, mais reste sans effet sur d'autres lignées transformées n'exprimant pas le BCR-ABL. L'imatinib entre en compétition avec l'ATP au niveau du site de liaison de l'ATP du domaine catalytique de la protéine abl. Cette fixation entraîne une diminution de la capacité de la fonction de la fonction de BCR-ABL, avec comme conséquence principale une inhibition de la signilalisation liée à la prolifération. La solution mère est préparée dans du DMSO à la concentration 3,4 10⁻² M et conservée à -20° C.



Figure 26 : Structure de l'imatinib

I.2. Inhibiteurs et modulateurs de la résistance MDR

I.2.1. LY294002

Le LY294002 est un inhibiteur sélectif de la PI3-K (Vlahos *et al.*, 1994). Cette molécule induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, induisant l'inhibition de la prolifération de cellules de mélanome (Casagrande *et al.*, 1998) et l'inhibition partielle de la croissance de cellules d'osteosarcoma MG-63 (Thomas *et al.*, 1997). Le LY294002 provient de chez Eli and Lilly (Indianapolis, IN, USA). La solution mère est préparée dans du DMSO à la concentration 10^{-2} M et conservée à -20° C.



Figure 27: Structure du LY294002

I.2.2. Novobiocine

La novobiocine (Sigma), est un dérivé de la coumarine comportant en outre un phénol substitué et un sucre. C'est un antibiotique antistaphylococcique actif sur les coccis à Gram positif. Elle inhibe la gyrase bactérienne (Gormley *et al.*, 1996). Récemment, il a été montré qu'elle est capable de moduler la BCRP (Shiozawa *et al.*, 2004). La solution mère est préparée à une concentration de 10^{-2} M dans du DMSO et stockée à -20° C.



Figure 28 : Structure de la novobiocine

I.2.3. Fumitremorgine C

La fumitremorgine C est une toxine fongique extraite à partir d'*Aspergillus fumigatus*. Celle-ci est capable d'inhiber complètement la résistance médiée par la BCRP à des concentrations submicromolaires (Rabindran *et al.*, 2000). La fumitremorgine C est fournie par le Dr RW Robey et Prof S. Bates from the Cancer Therapeutics Branch (NCI, Bethesda, MD). La solution mère est préparée à une concentration de 5 10^{-3} M dans du DMSO et stockée à -20° C.



Figure 29 : Structure de la fumitremorgine C

I.2.4. GG918

Le GG918 (N-{4-[2-(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimetnoxy-2-isoquinolinyl)-ethyl]phenyl}-9.10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-4-acridine-carboxamide) est un dérivé d'acridine. Il est capable de restaurer la sensibilité des cellules qui expriment la Pgp et la BCRP aux agents cytotoxiques (de Bruin *et al.*, 1999). Le GG918 provient de chez Glaxosmithkline (Les Ulis, Paris). La solution mère est préparée à une concentration de 10^{-3} M dans du DMSO et stockée à -20° C.



Figure 30 : Structure du GG918

I.2.5. Buthionine sulfoximine

La buthionine sulfoximine ou BSO (Sigma) est un inhibiteur de la γ -glutamylcystéine synthétase et par conséquent de la synthèse du gluthation (GSH) (Arrick *et al.*, 1981). Un prétraitement avec la BSO diminue *in vitro* la résistance à la daunorubicine dans des cellules surexprimant la MRP1 (Versantvoort et al., 1995). Cette molécule sur augmente aussi l'éfficacité thérapeutique *in vivo* de la doxorubicine dans des tumeurs surexprimant la MRP1 (Versantvoort *et al.*, 1995b). La BSO est préparée dans l'eau stérile à 5 10⁻² M et est conservée à –20°C.



Figure 31 : Structure de la buthionine sulfoximine

I.2.6. LY402913

Le LY402913 est un inhibiteur sélectif de la MRP1 (Ma *et al.*, 2002). Celui-ci a été fourni par Eli et Lilly Pharmaceuticals (Greenfield, IN). Le LY402913 est préparé à une concentration de 2.10^{-3} M dans le DMSO et stocké à -20° C.



Figure 32 : Structure du LY402913

I.2.7. Probénecide

Le probénecide est un inhibiteur de l'activité d'efflux de la MRP1 (Chauvier *et al.*, 2002). La solution mère (Sigma) est préparée à 1 M dans le DMSO et stockée à -20°C.



Figure 33 : Structure du probenicide

I.3. Fluorochromes

I.3.1. Hoechst33342

Le Hoechst33342 est un dérivé de benzimidazole (Harapanhalli *et al.*, 1994). Il est utilisé comme marqueur fluorescent vital, capable de franchir la membrane cytoplasmique pour se fixer de façon stoechiométrique sur les bases A-T de l'ADN. Il est efficacement transporté par la BCRP et la Pgp (Evseenko et al., 2006; Shapiro and Ling, 1998). Son maximum d'absorption se situe à 340 nm et il émet une fluorescence bleue vers 470 nm. La solution mère (Sigma) est préparée à 10^{-2} M dans le DMSO et stockée à -20° C.



Figure 34 : Structure du Hoechst33342

I.3.2. Rhodamine 123

La Rhodamine 123 est un fluorochrome cationique utilisé pour marquer les mitochondries actives. Elle est considérée comme un indicateur du potentiel de membrane mitochondriale (Johnson *et al.*, 1980), son absorption maximale est à 529 nm et son émission maximale est à 507 nm. Cette sonde est un substrat de la Pgp et de la BCRP (Gong *et al.*, 2001) (Honjo *et al.*, 2001). La Rhodamine 123 provient de chez Interchim (Interchim, Montluçon, France), la solution mère est préparée à 10^{-2} M et stockée - 20° C.



Figure 35: Structure de la Rhodamine 123

I.4. Lignées cellulaires

I.4.1. Lignées MCF7

La lignée cellulaire MCF7 est issue d'un adénocarcinome mammaire d'une patiente caucasienne de 69 ans (Fairchild *et al.*, 1987). Les lignées résistantes MCF7/VP et MCF7/DOX résistantes à l'étoposide (VP16) et à la doxorubicine (DOX) respectivement, ont été obtenues après exposition continue des cellules MCF7 à des concentrations croissantes de VP16 et de DOX. Les cellules MCF7/VP et MCF7/DOX sont entretenues avec 1 μ M de VP16 et de DOX respectivement (Fairchild *et al.*, 1987) (Schneider *et al.*, 1994). Les deux lignées résistantes ont été fournies par le Professeur J. Robert (Université de Bordeaux). La lignée cellulaire MCF7/MGG a été sélectionnée dans notre laboratoie en présence de concentrations croissantes de mitoxantrone (jusqu'à 500 nM) et du modulateur de Pgp et BCRP le GG918 (1 μ M).

I.4.2. Lignées 2008

La lignée cellulaire 2008 provient d'un carcinome ovarien humain. La lignée 2008/MRP1 est établie par transfection du vecteur pRc/RSV-MRP1 dans lequel la séquence codante pour la MRP1 plus 115 bases du côté 5' et 800 bases du côté 3' de séquences non

codantes est introduite. Par la suite, les cellules transfectées de façon stable sont sélectionnées en présence de 400 μ g ml⁻¹ de géniticine (Sigma). La lignée cellulaire 2008/MRP1 a été fournie par le Prof. P. Borst (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands)

I.4.3. Lignées HEK293

La lignée HEK293 provient de cellules embryonnaires de rein humain. Les lignées HEK293 surexprimant la BCRP ont été établies par une transfection avec un vecteur pcDNA3 contenant l'ADNc de la BCRP. Trois lignées ont été obtenues, une lignée surexprimant la BCRP sauvage (HEK/R482) et deux lignées surexprimant une BCRP mutée au niveau de l'acide aminé arginine 482, substitué soit par une thréonine (HEK/R482T), soit par une glycine (HEK/R482G). La lignée témoin HEK/V est établie par une transfection des cellules HEK293 avec le vecteur nu. Par la suite, les cellules transfectées stables sont sélectionnées en présence de 500 µg ml⁻¹de géniticine. L'ensemble de ces lignées cellulaires ont été fournies par le professeur S. Bates (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

I.4.4. Lignées K562

La lignée K562 a été isolée à partir du liquide pleural d'une patiente atteinte d'une leucémie myéloïde chronique en crise blastique (Lozzio and Lozzio, 1975). La lignée K562/DOX résistante à la DOX, a été obtenue par exposition des cellules K562 à des concentrations croissantes de DOX (Nishiyama *et al.*, 1990). La lignée K562/DOX surexprime la Pgp. La lignée K562/BCRP a été établies par une transfection des cellules K562 avec le rétrovirus HaBCRP, contenant l'ADNc de la BCRP humaine et une sélection des clones qui expriment cette protéine avec 20 ng/ml de SN-38 (Imai *et al.*, 2004). Les lignées K562/V et K562/BCRP ont été fournies par le Dr. Yoshikazu Sugimoto (Japanese Foundation for Cancer Research). La lignée K562/Imatinib a été sélectionnée dans notre laboratoire en présence de concentrations croissantes d'imatinib (jusqu'à 500 nM).

I.4.5. Lignées HL60

La lignée cellulaire HL6O provient d'une leucémie aiguë myéloblastique (ATCC, CCL-240). La lignée HL60/DOX résistante à la DOX a été obtenue après une exposition continue des cellules HL60 sensibles à la DOX (Marquardt *et al.*, 1990). Ces cellules ont été sélectionnées pour résister à une concentration de 40 nM de DOX. La lignée HL60/DOX surexprime le MRP1 (Kostrzewa-Nowak *et al.*, 2005).

Les cellules HL60/BCR-ABL sont obtenues aprés transfection avec un vecteur rétroviral exprimant la protéine fluorescente (eGFP : Green Fluorescente Protein) et la protéine BCR-ABL, en utilisant le réactif SuperFect (QIAGEN). Les cellules tranfectées ont été analysées pour leur expression de GFP par cytomètrie en flux. Les cellules HL60 positives en GFP/BCR-ABL représentent 98% du nombre total des cellules totales (Ptasznik *et al.*, 2002). La lignée HL60/BCR-ABL a été fournie par Stéphanie Salesse (Unité CNRS UMR6198, UFR Sciences, Reims).

I.5. Conditions de culture

Les cellules K562 et HL60 sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI-1640 (Invitrogen, Paris), supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal et d'un mélange d'antibiotiques (Streptomycine 40 mg/L et Pénicilline 5.10⁵ U/L). Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 jours. Pour les cellules résistantes K562/DOX et HL60/DOX, le milieu contenant la doxorubicine est additionné.

Les cellules (2008, MCF7) sont cultivées en monocouche, dans du milieu de culture RPMI-1640, supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal et du mélange d'antibiotiques cité précédemment. Les cellules HEK293 sont cultivées dans du milieu MEM (Invitrogen). Lorsque les cellules atteignent un état de croissance subconfluent, le milieu de culture est aspiré puis les cellules sont lavées avec 3mL de PBS pendant 3 minutes. Après élimination du PBS, les cellules sont détachées à l'aide de 500 µL de trypsine (Invitrogen) pendant 5 minutes à 37°C et reprises dans 6 mL de milieu.

Les cellules en culture sont maintenues à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et contenant 5 % de CO₂. Toutes les manipulations sont réalisées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical. La densité cellulaire est déterminée par comptage dans des hématimètres cova slide (CML, paris) au microscope optique à contraste de phase. La densité cellulaire utilisée pour les tests de cytotoxicité est déterminée pour chaque lignée en fonction du nombre de doublement par 24 heures et de la durée de culture.

I.6. Conservation des cellules

La congélation des cellules est réalisée dans des cryotubes de 2 ml. Un culot de 3.10⁻⁶ cellules est repris dans du milieu contenant 70% de RPMI 1640 ou de MEM, 20% de SVF et 10% de DMSO. Les tubes sont congelés à -80°C pendant 48 h avant d'être mis dans l'azote liquide

II. METHODES

II.1. Test MTT

Le test au (3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2, 5-diphényltétrazolium bromide) ou MTT (Sigma) est utilisé pour évaluer la croissance cellulaire. Les cellules vivantes possèdent des déshydrogénases mitochondriales fonctionnelles qui réduisent le MTT de couleur jaune en cristaux pourpres de MTT-formazan solubles dans le diméthylsulfoxide (DMSO) (Carmichael *et al.*, 1987).

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont ensemencées dans des microplaques de 96 puits à une densité de 5000 cellules par mL dans un volume de 200 μ L. Après 24 heures, les cellules sont exposées à différentes concentrations du ou des produit(s) pharmacologique(s) dilué(s) dans le milieu de culture. Les plaques sont ensuite remises en culture à 37°C pendant 3 jours. 20 μ L de MTT à 2,5 mg.mL⁻¹ sont ensuite rajoutés dans chaque puits. Les cellules sont incubées pendant de 3 heures à 37°C. Les cristaux de MTT-formazan ainsi formés sont dissous dans 200 μ L de DMSO. La lecture des densités optiques (DO) est effectuée sur un lecteur de microplaques (Series 750 microplates reader, Cambridge Technology, Watertown, MA) à la longueur d'onde de 540 nm. Le pourcentage de croissance cellulaire est déterminé par le calcul du rapport de la moyenne des DO des cellules traitées sur celle des cellules non traitées représenté sous forme de pourcentage. Une courbe d'inhibition de croissance peut être tracée (% de viabilité cellulaire en fonction du log des concentrations du médicament). Ainsi la concentration qui induit 50% d'inhibition de croissance (CI₅₀) peut être déterminée.

Cl₅₀ de la lignée résistante

Ces concentrations permettent d'évaluer l'index de résistance IR =

Cl₅₀ de la lignée sensible

II.2. PCR quantitative en temps réel

II.2.1. Principe

Chaque échantillon d'ADNc est amplifié avec des amorces spécifiques du transcrit à analyser. Le produit de la PCR est quantifié en mesurant en continu la fluorescence résultant de la liaison du SYBR Green à l'ADN double brin généré à chaque cycle d'amplication. Le Ct (threshold Cycle) se définit comme le nombre de cycles auquel la courbe d'amplification atteint le seuil de fluorescence statistiquement différent du bruit de fond, situé précocement

dans la portion exponentielle de la courbe d'amplification. Ainsi, le Ct est d'autant plus faible que le transcrit est fortement exprimé dans l'échantillon initial.

Puisque le rendement de l'extraction des ARN et la qualité de la rétrotranscription varient d'un échantillon à l'autre, l'expression des différents gènes testés est normalisée par l'expression du gène TBP (TATA-box Binding Protein) ou GUS (β -glucouronidase); ces deux gènes « ubiquitaires » sont exprimés de façon stable dans toutes les lignées. L'index d'accumulation des transcrits (TAI) détermine l'expression relative d'un échantillon par rapport à un témoin, ce témoin représentant la valeur 1 d'expression de chaque gène. Le TAI est calculé d'après la formule suivante :

TAI = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct$ = (Ct gène cible - Ct gène de ménage) échantillon – (Ct gène cible – Ct gène de ménage) témoin. Cette formule ne peut être utilisée qu'après avoir vérifié que l'efficacité d'amplification, comprise entre 90 et 110 %, est identique entre le gène cible et le gène de ménage.

II.2.2. Recherche des amorces

Les amorces sont choisies par l'intermédiaire du logiciel primer express (Applied Biosystems) selon des critères bien définis :

- ✓ Les amorces ne doivent pas former de dimères, ni d'amplicons non spécifiques.
- ✓ Les amorces doivent permettre un doublement du nombre de cibles à chaque cycle Les amorces qui répondent à ces deux critères proviennent d'Eurogentec (Bruxelles, Belgique) et sont reportoriés dans le tableau 3.

	SENS	ANTISENS			
ТВР	3'- GCACAGGAGCCAAGAGTGAA -5'	5'- TCACAGCTCCCCACCATGTT -3'			
GUS	3'- CTCATTTGGAATTTTGCCGATT -5'	5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA -3'			
MDR1	3'- AGGAAGCCAATGCCTATGACTTTA -5'	5'- CAACTGGGCCCCTCTCTCTC -3'			
MRP1	3'- GAAGGCCATCGGACTCTTCA -5'	5'- CAGCGCGGACACATGGT -3'			
MRP2	3'- TGCAGCCTCCATAACCATGAG -5'	5'- GATGCCTGCCATTGGACCTA -3'			
MRP3	3'- CACACGGATCTTGACAGACAATGA -5'	5'- ACAGGGCACTCAGCTGTCTCA -3'			
BCRP	3'- CAGGTCTGTTTCAATCTCACA -5'	5'- TCCATATGGTGGAATGCTGAAG -3'			
Rad51	3'- TGTACCGGAAAGGAAGTGGAG -5'	5'- GGGTCTGGTGGTCTGTGTTGA -3'			
TRF1	3- TCCTAAGTCAATGGCGTCGT -5'	5'- AAGGTCTTGTTGCTGGGTTC -3'			
TOPOIII	3'- ACTGCCCAGAGAATTTTGTAGAC -5'	5'- ACGTGGATAATCTCAAACCCGAT -3'			
BLM	3'- GACTGTGACGCTAGACAGAT -5'	5'- CAGTTCGTTCCCACAATCCA -3'			
WRN	3'- GGCAGGTGTAGGAATTGAAG -5'	5'- TAAGGCTCCAGGTCTCTGTA -3'			
TRF2	3'- CTTTGATATGGAGGCTGAGC -5'	5'- GCAGCTTCCTTGACCAGTTT -3'			
hTERT	3'- GGTGATTTCTCGTCCGTTCA -5'	5'- GCTCCCAAAGTTCCCTCAAA -3'			
BCR-ABL	3'- CGTCCACTCAGCCACAT -5'	5'- TGCAGATGCTGACCAACTCG -3'			

Tableau 3: Séquences des amorces sens et anti-sens des gènes étudiés par PCR quantitative.

II.2.3. RT-PCR en temps réel

L'ARN total est extrait à partir de culots secs de 0,5 millions de cellules avec le kit RNAeasy mini (Qiagen, Bothell, WA). La transformation d'1 μ g d'ARN total en ADNc (20 μ L final) est réalisée avec le kit Superscript firts-strand synthesis system (Invitrogen), en utilisant les hexamères aléatoires. L'ADNc est repris dans 30 μ L d'eau DEPC, 5 μ L seront amplifiés dans un volume final de 25 μ L en utilisant le kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA). L'amplification est effectuée dans une microplaque de 96 puits, placée dans un appareil de PCR en temps réel ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). L'amplification se déroule pendant 40 cycles alternant 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. La fluorescence est analysée en continu et le logiciel définit le Ct de chaque échantillon.

II.3. Analyse de l'expression des protéines par western blot

Les cellules sont récupérées et centrifugées 10 minutes à 1000 g. Le culot est lavé une fois dans du PBS puis repris dans 250 µL de tampon de lyse RIPA 1X (Upstate) (50 mM Tris HCl pH 7,4 ; 0,25 % sodium desoxycholate; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF, leupeptine, aprotinine et pepstatine) puis les cellules sont lysées pendant une heure à 4°C. Après une centrifugation de 30 minutes à 14000 g à 4°C, les débris cellulaires sont sédimentés et le surnageant récupéré. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Bradford.

Quarante μ g de protéines additionnées de 5 μ L de bleu de charge Laemmli et le marqueur de poids moléculaire sont déposés dans un gel polyacrylamide-SDS. Ce gel est composé d'un gel de concentration 4,5% (2,5 ml tampon de concentration 4X (0,4 % SDS; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), 6,6 ml H₂O, 0,8 ml d'acrylamide 40%, 100 μ l APS, 10 μ l TEMED) et un gel de séparation 8 % (2,5 ml tampon de résolution (0,4 % SDS; 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 5,4 ml H₂O, 2 ml d'acrylamide 40%, 50 μ l APS, 5 μ l TEMED). La migration s'effectue dans un tampon de migration Tris (250 mM), glycine (2 M), SDS (1 %) à 200 V pendant 45 minutes. Les protéines sont ensuite transférées par électroélution sur une membrane de PVDF (porablot, Macherey Nagel) préalablement activée 1 minute dans du méthanol. Le transfert est réalisé dans un tampon Tris (250 mM), glycine (2 M) en appliquant un potentiel de 30 V toute la nuit à 4°C. Cette membrane PVDF est ensuite saturée pendant une heure sous agitation dans une solution de PBS-Tween (PBS contenant 0.1 % de Tween 20) additionnée de 5 % de lait écrémé en poudre puis incubée pendant 2 heures sous agitation à température ambiante avec l'anticorps primaire de chaque protéine étudiée (tableau 4) diluée dans une solution de PBS-Tween 0,1 % additionnée de 1 % de BSA.

La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 5 minutes dans du PBS-Tween à 0,1 %, puis incubée pendant 45 minutes sous agitation à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à la péroxydase et dilué au 1/2500 dans une solution de PBS-Tween 0,1 % additionnée de 1 % de BSA. La membrane est ensuite lavée trois fois pendant 5 minutes dans du PBS-Tween 0,1 %. Puis un réactif à base de luminol (Kit ECl, Amersham Biosciences) est appliqué à celle-ci. La luminosité est détectée par un film KODAK MS. Le niveau d'expression de chaque protéine a été normalisé à l'aide de l'actine grâce au logiciel Image Quant 5.2 (Amersham Biosciences).

Protéine ciblée	Caractéristiques	Dilution	
Actine	Anticorps monoclonal de souris	1/10000	
BCRP (BXP21)	Anticorps monoclonal de souris	1/1000	
АКТ	AKT Anticorps polyclonal de lapin		
AKT-P	Anticorps polyclonal de lapin	1/1000	
Τορο ΙΙΙα	Anticorps polyclonal de lapin	1/1000	
BLM	Anticorps monoclonal de souris	1/1000	
RAD51	Anticorps monoclonal de souris	1/1000	
TRF2 Anticorps monoclonal de la		1/500	

Tableau 4 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés en western blot.

II.4. Cytométrie en flux

II.4.1. Principe

La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse individuelle et multiparamétrique de cellules ou d'élément subcellulaires. Elle donne une indication sur la taille, la granulométrie, le rapport nucléocytoplasmique et l'intensité de fluorescence dans un système cellulaire. L'interaction cellule-faisceau excitateur est obtenue par un déliement hydrodynamique des cellules devant le faisceau excitateur. Pour permettre leur analyse individuelle dans des conditions optimales, les cellules doivent traverser le rayon au sein d'un écoulement laminaire. La suspension cellulaire est donc envoyée sous pression et vient se placer au centre d'une gaine liquide qui amène les cellules jusqu'à une chambre de mesure où elles sont interceptées et analysées une par une (figure 36).



Figure 36 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux.

En fonction des caractéristiques spectrales des fluorochromes, nous avons utilisé deux types de cytomètres :

- FACScalibur (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Cette appareil est équipé d'un laser Argon (15 mW, 488 nm) et d'une photodiode (635 nm). Il est équipé de filtres suivants : passe-bande 530 ± 30 nm ; passe-bande 585 ± 44 , passe-haut 670 nm et passe-bande 661 ± 20 nm. Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel Cell Quest Pro (BD Biosciences, Pont de Claix, France).

- FACSarea (BD Biosciences, Pont de Claix, France)

Ce dernier offre la possibilité d'analyser et trier les cellules sur la base de 2 paramètres de morphologie (taille/structure) ainsi que 7 émissions de fluorescence (5 provenant après une une excitation à 488 nm et 2 après une excitation à 630 nm). L'appareil est capable de trier les cellules à la vitesse de 25000 particules par seconde sur la base de tous ces paramètres et permet de trier simultanément 4 populations. Cet appareil compte 3 lasers qui permettent de détecter jusqu'à 15 paramètres et 13 fluorochromes (tableau 5) :

- 488 nm : 8 détecteurs (SSC + 7 fluorochromes)
- 633 nm : 3 détecteurs (3 fluochromes).
- 407 nm (violet): 3 détecteurs (3 fluochromes).

Laser	Fluorochrome
	FITC, Alexa Fluor 488, GFP, YFP
	PE, Cy3
488nm	PE-Texas-Red, PI
	PE-Cy5, Quantum Red
	PerCP-Cy5.5
	PE-Cy7
	APC, Alexa Fluor 647, Cy5
633nm	APC-Cy5.5
	APC-Cy7, APC-Alexa Fluor 750
407nm (purple)	Cascade Blue, Pacific Blue, DAPI, Hoechst, Alexa Fluor 405
	Alexa Fluor 430

Tableau 5 : Les fluorochromes détectées par cytométrieen flux, avec les différenteslongueurs d'onde d'excitation correspondantes

II.4.2. Détection des protéines BCRP, Pgp et MRP1 par cytométrie en flux

La détection des protéines de transport (BCRP, Pgp et MRP1) a été réalisée par immunomarquage. Pour la mise en évidence de la BCRP, l'anticorps BXP34 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) a été choisi. Cet anticorps reconnaît un épitope intracellulaire de la BCRP. La MRP1 est mise en évidence grâce à l'anticorps MRPm6 (Alexis Biochemicals) qui reconnait un épitope interne. Ces deux anticorps nécessitent une perméabilisation préalable. La Pgp est détectée grâce à l'anticorps UIC2 (Immnotech, Marseille) qui reconnaît un épitope externe de cette protéine. Par conséquent le marquage ne nécessite pas une perméablisation des cellules. Une suspension de 10⁶ cellules sont fixées et perméablisées (dans le cas de la BCRP et MRP1) grâce au kit Intraprep (Immunotech, Marseille), puis incubées en présence de l'anticorps BXP34 (5 μ g.ml⁻¹) ou UIC2 (2 μ g.ml⁻¹) ou MRPm6 (2 µg.ml⁻¹) pendant 45 min à température ambiante. Une suspension cellulaire identique est traitée avec l'anticorps de contrôle IgG1 (BXP34 et MRPm6) et IgG2a (UIC2) (Dako A/S, Trappes) à la même dilution. Après un lavage avec du PBS contenant 1% de BSA (Sigma). Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 min à 4°C avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la FITC dilué au 1/50. Après trois lavages avec du PBS-BSA à 1%, le culot est remis en suspension dans 400 µl de PBS puis analysées par cytométrie en flux (FACScalibur). La longueur d'onde d'excitation 488 nm d'un laser argon ionisé est utilisée. L'émission de fluorescence est collectée après passage à travers un filtre pass-bande (530 nm). L'émission de fluorescence est mesurée sur une échelle logarithmique. Les résultats sont exprimés par le rapport de la moyenne de l'intensité d'émission de fluorescence des cellules marquées et celle des cellules contrôles.

II.4.3. Mesure de l'accumulation de la mitoxantrone, Hoechst33342 et Rhodamine123 par cytométrie en flux

Les cellules sont ensemencées pendant 24 h dans des plaques 6 puits à une densité de $5x10^5$ cellules/puits, puis traitées soit avec la mitoxantrone à 2 µM pendant une 1 h, la Rhodamine 123 à 2 µM pendant 30 min ou le Hoechst33342 à 2 µM pendant 15 min. Ensuite, les cellules adhérentes sont détachées par la trypsine. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS froid, puis analysées par la cytométrie en flux. Pour la mitoxantrone, la longueur d'onde d'excitation est de 633 nm et celle d'émission de fluorescence est de 670 nm (FACS calibur). La Rhodamine 123 est excitée à 488 nm et l'émission de fluorescence est détectée à 530 nm (FACS Area). Le Hoechst 33342 est excité à 360 nm et l'émission fluorescence est détectée sur une échelle logarithmique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'accumulation des des cellules d'intêret par rapport à celle de leur cellules parentale.

II.5. Accumulation et efflux de l'etoposide

Afin de déterminer l'accumulation cellulaire du VP16 dans les cellules HEK293 et 2008, 5 x 10^5 de cellules/puit ont été ensemencées sur des plaques de 6 puits pendant 24 h à 37°C. Les cellules sont traitées par la suite avec 2 ³H-VP16 à 2 µM correspondant à 0.2 µCi/ml, avec ou sans modulateurs 100 µM novobiocine ou 10 µM de FTC. Après une incubation de 2 h à 37°C, les plaques sont placées sur la glace, le milieu a été retiré et les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS froid. Les cellules sont ensuite solubilisées avec 0.2 ml de solvable (Packard Biosciences, Meriden, CT). Le contenu du VP16 tritié est ensuite quantifié par un compteur à scintillation (Packard). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicate.

Pour l'analyse de l'efflux du VP16, les cellules sont traitées avec $2 \mu M du$ ³H-VP16 pendant 2 h. Elles sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS et incubées pendant 1 h dans du milieu sans VP16 contenant ou pas la FTC. Le contenu en ³H-VP16 résiduel dans les cellules est quantifié comme décrit précédemment. Les données sont représentées en pourcentage d'accumulation résiduelle par rapport à l'acumulation initiale.

II.6. Immunofluorescence

II.6.1. Fixation au PaF 4%

- Les cellules K562/BCRP traitées ou non par l'imatinib ou le LY294002, sont mises en contact avec une lame coatée en poly-L-lysines (Sigma) pendant 6 min (2.10⁵ cellules par lame).
- Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS et fixées pendant 15 minutes dans du PaF
 4% à température ambiante. Les lames peuvent être conservées à -20°C.

II.6.2. Marquage

- Après une hydratation au PBS froid pendant 5 minutes, les lames sont traitées pendant 10 minutes avec du PBS contenant 10% de BSA.
- Elles sont ensuite incubées à 4°C en présence de l'anticorps BXP21 dilué dans le PBS contenant 1% de BSA pendant 2 h.
- Les lames sont ensuite lavées dans du PBS et incubées 45 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière avec l'anticorps secondaire de souris AF488.
- Les lames sont ensuite lavées dans du PBS et incubées avec 2 µM de Hoechst 33342
- Après lavage au PBS, les lames sont montées sous lamelle avec le Slow Fade Light
 Antifade kit (Molecular Probes Europe BV, Pays Bas).

II.6.3. Visualisation

Les cellules sont observées en videomicroscopie Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Les images fluorescentes sont détectées grâce un laser argon (488nm). Le microscope est équipé d'un objectif à immersion (Zeiss x100/NA 1.4). La capture des images est obtenue grâce à une caméra Coolsnap HQ pilotée par le logiciel Metamorph software (Roper Scientific, Duluth, GA, USA).

II.7. Microscope confocal

Le microscope confocal diffère du microscope conventionnel par :

- La source de lumière
- La configuration

II.7.1. source de lumière

L'un des principes de base du microscope confocal est d'illuminer l'échantillon avec une source ponctuelle fortement convergente. Le plus fréquement, un microscope confocal est équipé avec un ou plusieurs lasers. Par rapport à une lampe à vapeur de mercure, le laser produit une lumière sur une ou seulement quelques longueurs d'ondes particulières, très peu divergente et très haute brillance.

Ainsi le microscope confocal Biorad MRC-1024 est équipe de 2 lasers :

- Un laser à aragon ionisé d'une puissance totale de 100 mW. Celui-ci produit 2 raies majeures à 488 et 514 nm (environ 36 et 24 mW respictivement) et une raie mineur à 457 nm (environ 3,2 mW)
- Un laser à Krypton/Aragon d'une puissance totale de 15 mW. Celui-ci produit 2 raies à
 488 et 568 nm (d'environ 2,2 mW chacune) et une raie à 647 nm (d'environ 3,2 mW)

Les longueurs d'onde 457 nm et 568 nm ont été choisies pour étudier la distribution cellulaire de la doxorubicine et de la mitoxantrone respectivement.

II.7.2. Système de balayage du faisceau laser

Etant donné la petite taille du champ d'illumination, le déplacement du faisceau laser sur la préparation est généré par un système de balayage constitué de 2 miroirs vibrants (miroirs galvanométriques) disposés perpendiculairement l'un à l'autre. La conjugaison des 2 vibrations amène le faisceau laser à balayage l'objet selon une ligne en X puis, après un déplacement d'une certaine valeur en Y, à balayer une nouvelle ligne en X.

II.8. Détermination de l'activité télomérase

II.8.1. Préparation des extraits cellulaires

Les cellules sont lavées avec du PBS, puis centrifugées pendant 10 minutes à 800 g. Le culot cellulaire ($5x10^6$ cellules) est remis en suspension dans un tampon de lyse CHAPS (CHAPS 0,5 %, MgCl₂ 1 nM, EDTA 1 mM, Benzamidine 0,1 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM, glycérol 10 %, Tris-HCl pH 7,5 10 mM) pendant 30 minutes dans la glace. Le lysat cellulaire subit une centrifugation pendant 20 minutes à 4°C et à 12000 g. Le surnageant constitue l'extrait cellulaire. La concentration protéique est déterminée sur un aliquot par la méthode de Bradford. Les extraits sont conservés à -20°C.

II.8.2. Dosage de l'activité télomérase : Test TRAP

Le test TRAP comporte deux réactions successives, une extension d'un oligonucléotide TS par la télomérase puis une amplification des séquences télomériques produites par PCR à l'aide des amorces CX externe et TS, servant respectivement d'amorce antisens et d'amorce sens. Un contrôle interne de l'activité Taq polymérase, à l'aide de l'oligonucléotide TSNT, amplifié par les amorces TS et NT, est inclus dans ce test (Krupp *et al.*, 1997). Les réactions sont réalisées dans un milieu réactionnel de 50 μ L composé de: Tris-HCl pH 8.0 20 mM, dNTP 50 μ M, MgCl₂ 15 mM, KCl 63 mM, EGTA 1 mM, Tween 20

0,005 %, BSA 20 µg/mL, primers (figure 37) TS et CX ext 150ng, primer NT 50 ng, TSNT 0,01 aM, Taq polymérase 2,5 unités (DyNazyme II, Ozyme) et des quantités variables en protéines totales. L'incubation est réalisée dans un appareil Eppendorf Mastercycler avec couvercle chauffant selon les cycles suivants : 15 minutes à 30°C, 1 minute à 90°C, puis 30 cycles de 30 secondes à 92°C, 30 secondes à 50°C et 30 secondes à 72°C, suivis d'un cycle terminal de 1 minute 30 secondes à 72°C et d'une incubation finale à 4°C. Afin d'arrêter la réaction, du bleu de charge (sucrose 20 %, TBE 6X, bleu de bromophénol 0,2 %, xylène cyanole) est ajouté aux échantillons. Un aliquot de 15 µL est déposé sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide (19 :1) à 12 % et est résolu par électrophorèse à 200 V pendant 45 minutes. Ensuite le gel est coloré dans une solution de TBE 1X (50 mL) additionné de 5 µL de SYBR Green I (Roche Diagnostics, France). Le gel est ensuite scané par le Typhoon (Amersham Biosciences, Orsay, Ulis).

TS : 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' CX ext : 5'-GTGCCCTTACCCTTACCCTTA-3' NT : 5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3' TSNT : 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3'

Figure 37 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées dans une analyse TRAP.

Produits de télomérase



Figure 38 : Schéma des produits de PCR issus d'une analyse TRAP. La télomérase ajoute des répétitions d'hexamères télomériques sur l'amorce TS. Les produits issus de l'activité de la télomérase sont amplifiés par PCR à l'aide d'une seconde amorce (CXext). Cependant, au niveau de la réaction de PCR, peuvent être obtenus des fragments d'élongation non désirés ainsi que la dimérisation des amorces TS+CXext.

II.9. Tests statistiques

Les résultats présentent la moyenne de 3 à 4 expériences indépendantes et la comparaison des moyennes a été faite grâce au test de Student.

RESULTATS

Chapitre I : La mutation Arg482Gly dans la BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) induit une augmentation de la résistance à l'étoposide

I.1. RESUME

La BCRP fait partie des protéines dites transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) responsables de la résistance aux agents anticancéreux. Cette protéine est capable de transporter plusieurs agents anticancéreux, comme la mitoxantrone, les camptothecines et les anthracyclines. Jusqu'à présent l'étoposide a été considéré comme un substrat de la Pgp, MRP1 et MRP3. Le rôle de la BCRP humaine dans la résistance et le transport de cet agent reste très peu étudié. L'objectif de ce travail est d'étudier l'implication de la BCRP humaine et de la mutation de l'acide aminé 482 dans la résistance à cet agent anticancéreux.

Les tests de cytotoxicité réalisés sur des cellules embryonnaires de rein humain HEK293, transfectées par la BCRP humaine sauvage (R482) ou muté (R482G et R482T) ont montré une résistance à l'étoposide (index de résistance : 5, 30 et 6 respectivement). Cette résistance, modulée par la novobiocine et la fumitromorgine C et elle est accompagnée d'une réduction de l'accumulation intracellulaire de l'étoposide tritié, et particulièrement dans les lignées exprimant la protéine mutée R482G. Une modulation de l'incorporation intracellulaire de l'étoposide tritié a été observée en présence de la novobiocine et de la fumitromorgine C. Ces données suggèrent que la BCRP humaine induit une résistance à l'étoposide et que l'acide aminé en position 482 joue un rôle important dans la reconnaissance et le transport de ce médicament.

I.2. INTRODUCTION

La BCRP fait partie des trois principales protéines ABC impliquées dans le transport des agents anticancéreux les mieux décrites. Elle transporte notamment la mitoxantrone, les anthracyclines, le topotecan, le SN38 ainsi que le méthotrexate (Doyle and Ross, 2003; Litman et al., 2001).

La résistance à l'étoposide a été souvent associée à la surexpression de la Pgp et de la MRP1 (Borst et al., 2000; Gottesman and Pastan, 1993). Cependant différents niveaux de résistance à l'étoposide ont été observés dans plusieurs lignées sélectionnées avec des agents anticancéreux et surexprimant la BCRP (Robey *et al.*, 2003; Volk *et al.*, 2000). Allen et collaborateurs ont pu sélectionner une lignée cellulaire de foie de souris résistante à l'étoposide et surexprimant la Bcrp1. La résistance à l'étoposide dans cette lignée a été associée une diminution de l'accumulation cellulaire de cet agent anticancéreux. Il faut noter que, dans cette lignée cellulaire, les gènes *mdr1* et *mrp1* ont été préalablement invalidés (Allen *et al.*, 2003).

La découverte de la BCRP humaine a été faite dans une lignée de carcinome mammaire (MCF7/AdrVp1000) sélectionnée avec la doxorubicine associé au vérapamil (Doyle *et al.*, 1998). Par la suite il s'est avéré que la BCRP exprimée dans cette lignée était mutée au niveau de l'acide aminé 482 positionné dans l'exon 12. Il s'agit d'une substitution de l'arginine 482 par la thréonine (R482T) (Honjo *et al.*, 2001). Une autre mutation sur le même acide aminé a été observée dans la lignée S1-M1-3.2 sélectionnée avec la mitoxantrone. Cette fois-ci il s'agit de la substitution de l'arginine 482 avec la glycine (R482G) (Honjo *et al.*, 2001; Miyake *et al.*, 1999). Ces deux mutations induisent des modifications au niveau de la spécificité et le transport des substrats de la BCRP (Honjo *et al.*, 2001; Komatani *et al.*, 2001). Cependant le rôle de ces deux mutations dans la résistance et le transport de l'étoposide n'a pas encore été étudié.

Dans ce chapitre, nous étudierons la résistance à l'étoposide et son transport dans un modèle cellulaire transfecté avec le gène de BCRP. Pour cela, nous avons utilisé la lignée humaine de cellules embryonnaire de rein HEK293 transfectée avec le gène de BCRP sauvage et muté. Nous avons également utilisé la lignée humaine de cancer ovarien 2008/MRP1 transfectée avec le gène *MRP1* comme contrôle positif pour les expériences de cytotoxicité à l'étoposide et les tests fonctionnels.

I.3. Expression des gènes BCRP et MRP1

Le niveau de l'expression du gène *BCRP* sauvage ou muté dans les cellules HEK293 et du gène MRP1 dans les cellules 2008 est mesuré par RT-PCR quantitative en temps réel. Les données sont présentées sous forme d'expression relative de la BCRP ou de la MRP1 en utilisant la méthode comparative de cycle de seuil (Ct) (nombre de cycles auquel la courbe d'amplification atteint le seuil de fluorescence statistiquement différent du bruit de fond). L'expression de BCRP ou de MRP1 dans les cellules transfectées est normalisée par rapport à celle du gène de ménage *TBP* (Δ Ct) et comparée au rapport de BCRP/TBP ou de MRP1/TBP dans les cellules parentales ($\Delta\Delta$ Ct). La différence d'expression entre la lignée transfectée et parentale est 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}. Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Les cellules transfectées HEK293 avec le gène *BCRP* sauvage ou mutée, montrent un niveau d'expression relative du gène BCRP très élevée par rapport aux cellules HEK/V (tableau 6). En effet, l'expression de la BCRP dans les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T est respectivement 347, 247 et 315 fois élevée par rapport aux cellules HEK/V. L'expression de la MRP1 dans la lignée 2008/MRP1 est 35 fois supérieure à celle de la lignée parentale 2008.

	HEK/V	HEK/R482	HEK/R482G	KEK/R482T	2008/WT	2008/MRP1	
ТВР	21,2	20,59	20,43	20,07	25,13	25,31	
BCRP	28,41	19,36	19,69	18,98	-	-	
MRP1	-	-	-	-	27,2	22,23	
ΔCt	7,21	-1,23	-0,74	-1,09	2,07	-3,08	
ΔΔCt	-	-8,44	-7,95	-8,30	-	-5,15	
2 ^{-∆∆Ct}	-	347,29	247,28	315,17	-	35,51	

Tableau 6: Expression relative des gènes BCRP et MRP1 dans les cellules HEK293 et 2008respectivement.

I.3. Détection de la BCRP et la MRP1

Pour confirmer les résultats obtenus par RT-PCR quantitative en temps réel, nous avons évalué l'expression de la BCRP dans les cellules HEK293 par cytométrie en flux par marquage à l'anticorps BXP34. Les niveaux d'expression de la protéine ont été évalués dans les différentes lignées cellulaires en normalisant l'intensité de fluorescence obtenue par l'anticorps BXP34 par rapport à celle de l'isotype IgG1 (figure 39). La lignée HEK/V présente un taux d'expression de la BCRP de l'ordre de 1,56. Les lignées transfectées HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T présentent des niveaux d'expression de la BCRP de l'ordre de 20, 25 et 21 respectivement (tableau 7).

Les mêmes expériences ont été réalisées en utilisant l'anticorps MRPm6 dirigé contre la protéine MRP1 dans les lignées 2008 et 2008/MRP1. Les cellules 2008/MRP1 présentent une expression de l'ordre de 4,44. La lignée 2008 parentale présente par contre un taux d'expression de MRP1 de l'ordre de 1,02 (tableau 7).



Figure 39: Expression de la BCRP et de la MRP1 par cytométrie en flux dans les cellules HEK293 et 2008. Les histogrammes noirs représentent l'isotype IgG. Les histogrammes blancs représentent l'émission de fluorescence du marquage avec l'anticorps BXP34.

	HEK/V	HEK/R482	HEK/R482G	HEK/R482T	2008/WT	2008/MRP1
BCRP	1,48	20	25	22	-	-
MRP1	-	-	-	-	1,02	4,44

Tableau 7: Le rapport des moyennes d'intensité de fluorescence des anticorps BXP34 ou MRPm6 et l'isotype IgG1. Ces résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

I.4. Cytotoxicité de la mitoxantrone dans les lignées HEK293

Afin de bien caractériser les lignées HEK293 transfectées par la BCRP, nous avons étudié l'effet cytotoxique de la mitoxantrone (substrat classique de la BCRP) (Doyle *et al.*, 1998; Hazlehurst *et al.*, 1999; Litman *et al.*, 2000; Miyake *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1999) dans ces cellules. La cytotoxicité de la mitoxantrone est évaluée par le test MTT (figure 40). Nous avons ainsi pu déterminer la concentration du médicament qui induit 50% d'inhibition de croissance cellulaire (CI₅₀) dans les différentes lignées cellulaires. Ceci nous a permis de calculer le facteur de résistance (FR) des lignées transfectées par rapport aux lignées parentales (tableau 8).

Les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T présentent une très forte résistance à la mitoxantrone. Le facteur de résistance est de 11, 20 et 20 pour les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T respectivement. La modulation de la résistance à la mitoxantrone a été ensuite évaluée en présence ou en absence de 1 μ M de FTC ou 10 μ M de novobiocine. Dans les lignées HEK/R482G et HEK/R482G et HEK/R482T, la novobiocine sensibilise partiellement la résistance à la mitoxantrone, alors que la lignée HEK/R482, en présence de ce modulateur présente la même CI₅₀ que la lignée HEK/V. La FTC induit une modulation de la résistance à la mitoxantrone passe de 20 à 1,75 pour les cellules HEK/R482G et de 20 à 2,67 pour les cellules HEK/R482T. Ce résultat montre que la BCRP induit une résistance à la mitoxantrone et que cette résistance est modulée par les deux inhibiteurs de la BCRP.



Figure 40 : Courbes de cytotoxicité de la mitoxantrone dans les cellules HEK293 transfectées par le gène de la BCRP. Dans A, B et C les cellules sont traitées uniquement avec la mitoxantrone. Dans D, E et F les cellules sont co-traitées avec la mitoxantrone et la novobiocine. HEK293 (♦), HEK/R482 (■), HEK/R482T (•) et HEK/R482G (▲).

		Lignée cellulaire						
	Inhibiteur	HEK/V	/V HEK/R482		HEK/R482G		HEK/R482T	
		CI ₅₀		RF	CI ₅₀	RF		RF
Mitoxantrone	-	0,15	1,70	11,33	3,10	20,67	3	20
	Novobiocine	0,08	0,08	1	0,50	6,25	0,90	11,25
	FTC	0,12	0,11	0,92	0,21	1,75	0,32	2,67

Tableau 8 : CI50 de la mitoxantrone et index de résistance dans les cellules HEK/R482,HEK/R482G et HEK/R482T par rapport aux cellules HEK/V. Ces résultats sont la moyennede 3 expériences indépendantes.

I.5. Cytotoxicité de l'étoposide dans les cellules HEK293 et 2008

Dans cette étude nous avons utilisé la lignée humaine de cancer ovarien 2008/MRP1 comme témoin positif de résistance à l'étoposide (figure 41). Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes d'étoposide pendant 72 h à 37°C. Nous avons observé une résistance significative des cellules 2008/MRP1 à l'étoposide par rapport à la lignée parentale 2008 avec un facteur de résistance à l'étoposide de l'ordre de 8 dans la lignée 2008/MRP1 (tableau 4). Les cellules humaines embryonnaire de rein HEK/ R482 et HEK/ R482T présentent respectivement des index de résistance de 5 et 8 par rapport aux cellules HEK/V. De manière intéressante, les cellules HEK/R482G présentent une résistance beaucoup plus importante avec un facteur de résistance égal à 30 (tableau 9).

La résistance à l'étoposide dans les cellules HEK293 transfectées est modulée par la novobiocine et la FTC. Cependant, les résultats obtenus montrent que la novobiocine ne module pas la résistance à l'étoposide dans les cellules HEK/R482T. En effet, le facteur de résistance reste inchangé dans la lignée HEK/R482T lorsqu'elles sont traitées avec la

novobiocine, alors qu'il baisse fortement en présence de la FTC. Il est de 1, 8 et en présence de FTC dans les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T respectivement (tableau 4).

Ces résultats suggèrent que la BCRP humaine est impliquée dans la résistance à l'étoposide et que la mutation au niveau de l'acide aminée 482, particulièrement la mutation R482G altère la cytotoxicité de l'étoposide.



Figure 41 : Cytotoxicité de l'étoposide dans les cellules HEK293 (A) et 2008 (B), A : HEK293/V (\blacklozenge), HEK/R482 (\blacksquare), HEK/R482T (\bullet) et HEK/R482G (\blacktriangle) et B : 2008 (\blacklozenge) et 2008/MRP1 (\blacktriangle).
		Lignée cellulaire									
	Inhibiteur	HEK/V	HEK/R482		HEK/R482G		HEK/R482T		2008	2008/MRP1	
			CI ₅₀	RF		RF	CI ₅₀	RF	CI 50	CI 50	RF
	-	1	5	5	30	30	8	8	0,7	6	8,57
Etoposide	Novobiocine	1	2	2	4,5	4,5	8,2	8,2			
	FTC	1	1,3	1,3	8,2	8,2	3,2	3,2			

Tableau 9 : CI₅₀ de l'étoposide et index de résistance dans les cellules HEK293 et 2008. Ces résultats sont la moyenne de 3 expériences.

I.6. Accumulation cellulaire de la Rhodamine 123 et du Hoechst 33342

Honjo et collaborateurs ont observé que les cellules MCF-7/AdVp3000 et S1-M1-80 qui expriment la BCRP présentant les mutations R482G et R482T étaient capables de transporter la Rhodamine 123 et les anthracyclines efficacement, alors que la BCRP sauvage transporte peu ou pas cette molécule (Honjo et al 2001).

Nous avons vérifié si l'accumulation cellulaire de la Rhodamine 123 est effectivement altérée dans les cellules transfectées avec la BCRP mutée. Les cellules ont été traitées pendant 30 min avec 2 μ M de Rhodamine 123. L'accumulation cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux. Cette accumulation est diminuée de 63 et de 74% dans les lignées HEK/R82G et HEK/R482T respectivement par rapport à la lignée HEK/V, alors qu'il n'y a qu'une très faible diminution d'accumulation dans les cellules HEK/R482 (10%) (figure 42). Nous avons également mesuré l'accumulation du Hoechst 33342, substrat transporté par la BCRP sauvage et ses deux mutants (Janvilisri *et al.*, 2005). Après 1 h de traitement avec 2 μ M de Hoechst 33342, l'accumulation cellulaire de cette sonde est diminuée de 52, 42 et 44% dans les cellules HEKR482, HEK/R482G et HEK/R482T respectivement par rapport à la lignée HEK/V (figure 43). Ces résultats nous ont permis de valider nos modèles cellulaires surtout en terme de fonctionnalité différentielle vis-à-vis de la Rhodamine 123.



Figure 42 : Pourcentage d'accumulation cellulaire de la Rhodamine 123 dans les cellules HEK293 transfectées par le gène de la BCRP. Les cellules ont été traitées pendant 2 h avec 2 μM de Rhodamine 123. La Rhodamine 123 est excitée à 407nm et son émission de fluorescence est détectée à 530 nm.



Figure 43 : Pourcentage d'accumulation cellulaire du Hoechst 33342 dans les cellules HEK293 transfectées par le gène de la BCRP. Les cellules ont été traitées pendant 2 h avec 2 μM de Hoechst 33342. Le Hoechst 33342 est excité à 360 nm et la fluorescence émise est détectée à 424 nm.

I.7. Accumulation cellulaire de l'étoposide dans les cellules HEK293 et 2008

La différence entre les niveaux de résistance à l'étoposide dans les cellules transfectées par le gène de la BCRP sauvage et mutée suggère que cette résistance est due à une altération de l'accumulation cellulaire de ce médicament. Pour répondre à cette question nous avons mesuré l'accumulation intracellulaire de l'étoposide-[³H] après 1 h, 2 h et 4 h de traitement dans les cellules HEK293 et après 2 h dans de traitement dans les cellules 2008.

Après 2 h de traitement la radioactivité mesurée dans les cellules 2008/MRP1 est fortement diminuée (440 dpm/ 10^6 cells) par rapport à la lignée 2008 parentale qui présente une accumulation de l'ordre de 800 dpm/ 10^6 cells (p<0.01) (figure 44). Dans les cellules transfectées par la BCRP nous observons une diminution significative de l'accumulation cellulaire de l'étoposide dès 1 h de traitement. Cette diminution est plus importante après 2 h de traitement. En effet les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T présentent une accumulation cellulaire d'étoposide qui correspond à 63% (p<0.02), 40% (p<0.01) et 54% (p<0.02) respectivement par rapport à la lignée HEK/V (figure 44). Après 4 h de traitement les pourcentage d'accumulation cellulaire de l'étoposide reste inchangés par rapport à 2 h.

Afin de mettre en évidence une fonction de transport altéré de l'étoposide dans les cellules HEK293 transfectées par la BCRP, nous avons modulé l'accumulation cellulaire de ce dernier avec 100 μ M de novobiocine. Dans les 3 lignées transfectées par la BCRP, l'accumulation cellulaire de l'étoposide-[³H] augmente significativement (figure 45). Après 2 h de co-traitement 92% (p<0.05), 77% (p<0.02) et 81% (p<0.05) dans les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T respectivement. En présence la FTC, de l'inhibiteur spécifique de la BCRP, nous observons également une forte augmentation de l'accumulation de l'étoposide dans ces cellules, avec des pourcentages d'accumulation avoisinant ceux observés après le traitement avec la novobiocine.



Figure 44 : Accumulation cellulaire de l'étoposide -[³H] dans les cellules HEK293 et 2008, A : 1 h, B : 2 ht, C : 4 h. D : 2 h de traitement avec l'étoposide. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M de l'étoposide-[³H]. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.



Figure 45 : Modulation de l'accumulation cellulaire de l'étoposide dans les cellules HEK293. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'étoposide-[³H] pendant 2 h avec ou sans modulation.. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. A : Modulation avec la novobiocine (100 μ M), B : Modulation avec la FTC (10 μ M).

I.8. Efflux de l'étoposide

Afin de confirmer le rôle de la BCRP dans le transport de l'étoposide, nous avons mesuré l'efflux de l'étoposide dans les cellules HEK293 transfectées par la BCRP. Les cellules sont traitées avec $2 \mu M$ étoposide-[³H] pendant 2 h, lavées avec du PBS et remises dans du milieu de culture sans étoposide en présence ou non de la FTC à 10 μM pendant 1 h. La radioactivité

intracellulaire résiduelle mesurée après l'efflux est normalisée par rapport celle mesurée après 2 h d'accumulation dans chaque lignée. En absence de FTC, la concentration cellulaire résiduelle d'étoposide-[³H] est de l'ordre de 58% dans les cellules HEK/V. Les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T présentent une concentration résiduelle de l'étoposide-[³H] significativement différente par rapport aux cellules HEK/V. En effet celle-ci est de 44% (p<0.05), 35% (p<0.01) et 41% (p<0.02) respectivement (figure 46). En présence de la FTC, la concentration cellulaire résiduelle d'étoposide-[³H] augmente. Elle passe à 73% (p<0.02), 77% (p<0.01) et 68% (p<0.01) dans les cellules HEK/R482, HEK/R482G et HEK/R482T respectivement, alors que dans les cellules HEK/V elle reste inchangée (figure 46).



Figure 46 : Accumulation cellulaire d'étoposide résiduelle -[³H] après efflux dans les cellules HEK293 transfectées. Les cellules ont été traitées dans un premier temps en présence de 2 μ M d'étoposide-[³H] pendant 2 h. Ensuite les cellules ont été lavées et l'accumulation cellulaire d'étoposide-[³H] est mesurée. Sur un deuxième échantillon, les cellules sont remises dans du milieu de culture sans étoposide-[³H] en présence ou non de FTC (10 μ M). L'accumulation cellulaire d'étoposide d'étoposide résiduelle est mesurée après 1h d'efflux. Les données correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes.

I.9. DISCUSSION

La BCRP [(MXR/ABCG2)] humaine est impliquée dans la résistance à plusieurs agents anticancéreux notamment la mitoxantrone, les anthracyclines, le topotecan, SN38 et le méthotrexate (Doyle and Ross, 2003; Litman et al., 2001). Deux mutations de la BCRP ont été identifiées récemment dans deux lignées cellulaires sélectionnées avec des agents anticancéreux. L'expression de la BCRP dans ces lignées est accompagnée par un efflux de la rhodamine 123 et des anthracyclines, alors que la BCRP sauvage ne transporte pas ces molécules (Honjo et al., 2001). L'analyse des séquences codantes pour la BCRP a révélé l'existence de mutations (acquises) au niveau du codon 482, où l'arginine a été remplacée par une thréonine (R482T) dans les cellules MCF7/AdVp3000 ou par une glycine (R482G) dans les cellules S1-M1-80. L'existence de ces deux mutations est probablement une conséquence du traitement prolongé avec les médicaments puisqu'elles sont absentes dans les lignées parentales (Honjo *et al.*, 2001; Miyake *et al.*, 1999). Les mutations R482T et R482G induisent une forte résistance au SN38, au méthotrexate et au topotecan (Robey et al 2003 ; (Shafran *et al.*, 2005). L'acide aminée 482 de la BCRP joue donc un rôle crucial dans la reconnaissance et la spécificité des substrats.

Le rôle de la BCRP humaine dans la résistance et le transport des epipodophyllotoxines n'est pas encore bien étudié. Cependant l'étude d'Allen et al. montre que lorsque la Pgp et la MRP1 sont invalidées dans les cellules de foie de souris et sélectionnées par l'étoposide, c'est la Bcrp1 qui est surexprimée. Celle-ci est associée à une diminution de l'accumulation de l'étoposide dans ces cellules (Allen *et al.*, 2003).

Afin d'élucider le rôle de la BCRP humaine dans la résistance et le transport de l'étoposide, nous avons utilisé les cellules embryonnaires de rein HEK293 transfectées par la BCRP sauvage (HEK/R482) et par les deux mutants R482G (HEK/R482G) et R482T (HEK/R482T) (Robey *et al.*, 2003). Ces trois lignées cellulaires présentent une résistance à la

mitoxantrone et transportent efficacement le Hoechst33342 (tableau 3 et figure 43). La mesure de l'accumulation de la rhodamine 123 dans ces cellules, confirme que les deux mutations R482G et R482T augmentent le transport de cette sonde comparées à la BCRP sauvage (R482) (figures 42).

Dans ce travail, nous montrons pour la première fois une augmentation significative de la résistance à l'étoposide dûe à la présence de la mutation R482G. La CI₅₀ de l'étoposide dans les cellules HEK/R482G est six fois plus importante à celle dans les cellules HEK/R482 (tableau 9). Ces données sont fortement corrélées à celles de l'accumulation cellulaire de l'étoposide (figure 44). Ceci suggère que la substitution de l'arginine 482 par la glycine confère à la BCRP une meilleure affinité vis-à-vis de l'étoposide et un transport plus efficace de cet agent.

L'utilisation des deux modulateurs de la BCRP la novobiocine et la FTC, nous ont permis de moduler la résistance et l'efflux de l'étoposide. En présence de la FTC, l'accumulation cellulaire de l'étoposide augmente significativement et plus particulièrement dans les cellules HEK/R482 et HEK/R482G (figure 45). De la même façon la FTC induit une restauration de l'accumulation intracellulaire résiduelle de l'étoposide (figure 45).

Allen et collaborateurs ont montré que la résistance à l'étoposide médiée par la Bcrp1, est modulée par le GG918 et le Ko143 (dérivé de la FTC) (Allen *et al.*, 2003). Les mêmes auteurs ont suggèré que la mutation au niveau de l'acide aminée R482 n'a aucun rôle dans le transport de l'étoposide, étant donné que la Bcrp1 surexprimée dans leur modèle cellulaire était sauvage (R482). Notre étude montre clairement que la BCRP humaine est impliquée dans la résistance à l'étoposide et que la mutation R482G altère la résistance à l'étoposide.

Chapitre II : Rôle de la MRP1 (*Mulitdrug Resistance associated Protein*) dans la résistance à la mitoxantrone

II.1. RESUME

La mitoxantrone est un inhibiteur de la topoisomérase II, utilisée dans le traitement de certaines tumeurs solides et des leucémies. Le mécanisme de résistance à ce médicament le plus étudié est son transport actif vers le milieu extracellulaire. Ce transport fait intervenir des transporteurs de la famille ABC, en particulier la P-glycoprotéine (MDR1, ABCB1), ainsi que la BCRP' (ABCG2). Le rôle de la MRP1 (ABCC1) dans le transport de ce médicament reste plus ou moins controversé. Dans ce chapitre nous avons étudié le rôle de cette protéine dans la résistance et le transport de la mitoxantrone, en utilisant plusieurs modèles cellulaires. Nous avons sélectionné un modèle de cellules humaines du carcinome mammaire (MCF7 /MGG) avec la mitoxantrone en présence du modulateur de la Pgp et de la BCRP, le GG918. Ces cellules présentent une surexpression de la MRP1 et une résistance à la mitoxantrone accompagnée d'une diminution de son accumulation cellulaire. Nous avons également utilisé un modèle de cellules humaines de cancer ovarien transfectées avec le gène de MRP1 (2008/MRP1), pour éviter les altérations qui peuvent être à l'origine d'autres mécanismes de résistance, occasionnées par la sélection des cellules avec des médicaments anticancéreux. La résistance et l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone dans ces cellules sont modulées par l'inhibiteur de la MRP1, le LY402913. La diminution du taux de glutathion, par la BSO, induit également une augmentation de l'accumulation de la mitoxantrone dans ces cellules. Ces données suggèrent un co-transport du glutathion et de la mitoxantrone par la MRP1. En conclusion, la MRP1, au même titre que la Pgp et la BCRP, est impliquée dans la résistance et le transport actif de la mitoxantrone.

II.2. INTRODUCTION

La mitoxantrone est un inhibiteur de la topoisomérase II (Crespi *et al.*, 1986), elle est couramment utilisé dans le traitement des leucémies, cancer de prostate et d'autres cancer (DiPaola *et al.*, 2001). Elle est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres agents antitumoraux. Plusieurs mécanismes de résistance à la mitoxantrone ont été décrits, notamment des altérations au niveau de sa cible la topoisomérase II et le transport actif accru du médicament vers le milieu extracellulaire (Consoli *et al.*, 1997; Errington *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999). Le transport actif de la mitoxantrone implique des transporteurs de la famille ABC, en particulier la P-glycoprotéine (MDR1, ABCB1) (Consoli et al., 1997 ; Litman et al., 2000), ainsi que la BCRP' (ABCG2) (Doyle et al., 1998 ; Ross et al., 1999 ; Litman et al., 2000).

Bien que le rôle de ces deux protéines soit bien établi dans la résistance à la mitoxantrone, celui de la MRP1 (ABCC1) reste plus ou moins controversé. Certains auteurs considèrent que la MRP1 n'induit pas de résistance à la mitoxantrone, tandis que d'autres ont rapporté une résistance modérée à ce médicament liée à l'expression de la MRP1 (Breuninger et al., 1995). Les travaux de Diah et collaborateurs ont permis d'observer un lien entre la surexpression de la MRP1 et la résistance à la mitoxantrone dans les cellules MCF7/VP (cellules résistantes à l'étoposide). La résistance observée dans ces cellules est accompagnée d'une diminution de l'accumulation de la mitoxantrone qui peut être modulée par une privation d'ATP (Diah *et al.*, 2001). Cependant, l'inhibiteur de la synthèse du glutathion (GSH), la buthionine sulfoximine (BSO) ne modulait pas cette résistance dans ces cellules. Le sulfinpyrazone (inhibiteur de la MRP1 qui se fixe sur le site de liaison du GSH) était capable de restaurer une accumulation cellulaire de la mitoxantrone proche de celle des cellules MCF7 parentales. La conclusion de cette étude ne permettait pas de mettre en évidence un lien direct entre la résistance à la mitoxantrone et la MRP1, du fait de l'absence de conjugué GSH-

mitoxantrone (Diah et al., 2001). En effet, l'activité de la topoisomérase II est altérée dans les cellules MCF7/VP, en plus de la surexpression de la MRP1 (Schneider et al., 1994). Ainsi, il a été suggéré que d'autres modèles cellulaires et surexprimant la MRP1, permettrait de confirmer l'hypothèse d'un transport de la mitoxantrone par la MRP1.

Dans ce chapitre nous avons cherché à mettre en évidence le lien direct entre la surexpression de MRP1 et la résistance à la mitoxantrone, en utilisant plusieurs modèles cellulaires. Nous avons utilisé la lignée humaine de cancer ovarien 2008/MRP1 transfectée par l'ADNc de *MRP1*, de telle sorte que la seule différence entre la lignée parentale (sensible) et transfectée (résistante) est la surexpression de la MRP1. Nous avons également sélectionné la lignée MCF7/MGG en présence de 500 nM de mitoxantrone. Pour éviter une surexpression de la Pgp et la BCRP dans ces cellules, suite au traitement à la mitoxantrone, les cellules ont été co-traitées avec le modulateur de ces deux transporteurs le GG918 (1 μ M). Cette lignée nous permettra de vérifier une surexpression possible de MRP1, qui confirmera le rôle de MRP1 dans le transport et la résistance à la mitoxantrone. La lignée MCF7/VP est utilisée pour corréler nos résultats avec ceux obtenus par l'équipe de Diah (Diah et al. 2001).

II.3. Etablissement de la lignée cellulaire MCF7/MGG résistante à la mitoxantrone

Les cellules MCF7 ont été choisies en raison de leurs sensibilités élevées à la mitoxantrone. Ces cellules ne présentent pas d'expression des trois transporteurs ABC Pgp, MRP1 et BCRP. Le traitement est initié avec une concentration de 10 nM de mitoxantrone en présence de 1 μ M de GG918. La concentration de la mitoxantrone est progressivement augmentée jusqu'à 500 nM en présence de 1 μ M de GG918. Les cellules résistantes appelées MCF7/MGG ont été établies après 9 mois de traitement et caractérisées par la suite.

II.4. Mise en évidence du phénotype MDR

Dans le but de caractériser le phénotype de résistance dans les cellules MCF7/VP, MCF7/MGG et 2008/MRP1, nous avons étudié d'une part, l'expression des gènes *MDR1*, *MRP1* et *BCRP* par RT-PCR quantitative en temps réel et d'autre part l'expression membranaire des protéines par cytométrie en flux.

II.4.1. Expression de la BCRP et de la MRP1

Le niveau de la transcription des gènes *MDR* est mesuré par RT-PCR quantitative en temps réel. Les données sont présentées en tant qu'expression relative en utilisant la méthode comparative de cycle de seuil (Ct) décrite précédemment.

Les cellules 2008/MRP1, MCF7/MGG et MCF7/VP, montrent un taux d'expression du gène très élevée par rapport aux cellules parentales 2008 et MCF7/S. En effet, ces lignées expriment 35,5, 59,3 et 53,8 fois respectivement la MRP1 par rapport à leur lignées parentales respectives. Aucune surexpression significative des autres gènes MDR (MDR1, MRP2, MRP3 et BCRP) n'a été observée. Seul le gène *MRP2* est légèrement surexprimé (2 fois) dans les cellules MCF7/VP par rapport à la lignée parentale MCF7/S (tableau 10).

Càna	Lignée	cellulaire		2 ^{-AACt}	
Géne	2008/WT	2008/MRP1	ΔΔCt		
TBP	25,13	25,31			
MDR1	28,17	33,4	5,05	0,03	
MRP1	27,2	22,23	-5,15	35,51	
MRP2	29,62	30,86	1,06	0,48	
MRP3	25,21	26,4	1,01	0,5	
BCRP	28,63	30,54	1,73	0,3	
<i>a</i> .	Lignée	cellulaire		e-AACt	
Gène	MCF7/S	MCF7/VP	ΔΔCt	2	
ТВР	23,22	23,37			
MDR1	-	-	-	-	
MRP1	24,59	18,85	-5,89	59,3	
MRP2	29,33	28,44	-1,04	2,06	
MRP3	25,41	30,7	5,14	0,028	
BCRP	26,39	25,78	-0,76	1,69	
	Lignée	cellulaire			
Gène	MCF7/S	MCF7/MGG	ΔΔCt	2 ^{-4ACC}	
ТВР	23,22	23,37			
MDR1	-	38	-	-	
MRP1	24,59	18,99	-5,75	53,82	
MRP2	29,33	29,13	-0,35	1,27	
MRP3	25,41	26,7	1,14	0,45	
BCRP	26,39	25,95	-0,59	1,51	

Tableau 10: Expression relative des gènes MDR dans les cellules 2008/MRP1, MCF7/VP etMCF7/MGG respectivement.

II.4.2. Détection de la MRP1, la BCRP et de la Pgp

Pour confirmer les résultats obtenus par RT-PCR quantitative en temps réel, nous avons évalué l'expression des protéines MRP1, BCRP et Pgp dans les cellules 2008/MRP1, MCF7/MGG et MCF7/VP par cytométrie en flux. Les marquages sont réalisés grâce aux anticorps spécifiques BXP34 pour la BCRP, UIC2 pour Pgp et MRPm6 pour la MRP1. Les niveaux d'expression de chaque protéine ont été évalués dans chaque lignée en normalisant l'intensité de fluorescence obtenue par l'anticorps spécifique avec celle de l'isotype correspondant.

Les cellules 2008 transfectées avec le gène *MRP1* présentent un taux d'expression de la protéine MRP1 de 4,44 \pm 0,20, alors que celui de la lignée parentale 2008 n'est que de 1,02 \pm 0,20 (tableau 11). Les lignées MCF7/VP et MCF7/MGG surexpriment également la MRP1 avec un taux d'expression de l'ordre de 3,20 \pm 0,25 et 4,20 \pm 0,17 respectivement. Les protéines BCRP et Pgp ne sont pas surexprimées dans les lignées sélectionnées MCF7/VP et MCF7/MGG (tableau 11).

	MCF7/WT	MCF7/VP	MCF7/MGG	2008/WT	2008/MRP1
Рдр	1,00±0,20	1,20±0,15	1,13±0,21		
MRP1	1,12±0,20	3,20±0,25	4,20±0,17	1,02±0,15	4,44±0,20
BCRP	1,68±0,15	0,87±0,10	1,32±0,23		

Tableau 11: Expression de la Pgp, MRP1 et BCRP dans les cellules 2008/MRP1,MCF7/VP et MCF7/MGG. Cette expression est représentée par le rapport des moyennes del'intensité fluorescence des anticorps BXP34 ou MRPm6 ou UIC2 et l'isotype correspondant,ces résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

II.5. Cytotoxicité de la doxorubicine et l'étoposide

La cytotoxicité aux agents anticancéreux est évaluée par le test MTT (figure 2). Les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes de doxorubicine ou d'étoposide pendant 72 heures. Les cellules 2008/MRP1, MCF7/VP et MCF7/MGG présentent une très forte résistance à l'étoposide (substrat classique de la MRP1) par rapport aux cellules parentales respectives (figure 47). Le facteur de résistance est de l'ordre de 7, 9 et 28 pour les cellules 2008/MRP1, MCF7/MGG (tableau 12) et MCF7/VP respectivement. Nous avons également utilisé dans cette étude un autre substrat établi de la MRP1, la doxorubicine (Aouali N et al. 2003) pour mettre en évidence le phénotype MDR dans ces cellules (figure 49). Les cellules MCF7/VP et 2008/MRP1 présentent des facteurs de résistance de 25 et 6 respectivement pour la doxorubicine (tableau 12).

Des travaux récents ont montré que le LY402913 est capable d'augmenter la cytotoxicité et l'accumulation de médicaments anticancéreux dans les cellules surexprimant la MRP1(Sun *et al.*, 2001). Ainsi, nous avons utilisé ce modulateur pour moduler la résistance de l'étoposide dans les cellules MCF7/MGG. Les cellules ont été traitées avec l'étoposide en absence et en présence de 2 μ M de LY402913 pendant 72 h. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la sensibilité de ces cellules à l'étoposide. En effet le facteur de résistance des cellules MCF7/MGG est diminué 6,5 fois en présence du LY402913 (tableau 12).



Figure 47: Cytotoxicité de l'étoposide dans les cellules 2008/MRP1 et MCF7/MGG. Les cellules sont traitées à l'étoposide pendant 72h.

•



Figure 48: Cytotoxicité de la doxorubicine dans les cellules MCF7/VP et 2008/MRP1. Les cellules sont traitées à l'étoposide pendant 72h.

		lignée cellulaire								
Médicament	Inhibiteur	MCF7/S MCF7/VP		MCF7/MGG		2008	2008/MRP1			
				RF		RF	CI50	_ CI ₅₀	RF	
Etoposide	-	3,5			30	8,57	0,8	5,5	6,87	
	LY402913 (2µM)	3,1			4	1,3				
Doxorubicine	-	0,4	10	25			0,2	1,2	6	

Tableau 12 : CI₅₀ et index de résistance de l'étoposide et la doxorubicine dans les cellulesMCF7 et 2008. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

II.6. Cytotoxicité de la mitoxantrone

Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de mitoxantrone pendant 72 h et à 37°C. Nous avons observé une forte résistance des cellules surexprimant la MRP1 par rapport à leurs lignées parentales (figure 47, 48 et 49). En effet les cellules 2008 transfectées par la MRP1 sont 4 fois résistantes à la mitoxantrone par rapport aux cellules parentales 2008. Les cellules MCF7/VP présentent un facteur de résistance à la mitoxantrone égal à 5. Les cellules sélectionnées en présence de la mitoxatrone et qui ne surexpriment ni la Pgp, ni la BCRP, montrent une résistance beaucoup plus importante à la mitoxantrone. Le facteur de résistance est de l'ordre de 8 (tableau 13). Ces résultats suggèrent que la MRP1 est impliquée dans la résistance à la mitoxantrone.

Pour confirmer l'implication de la MRP1 dans la résistance à la mitoxantrone, nous l'avons modulée avec l'inhibiteur de la MRP1, le LY402913. Cette réversion a été évaluée après 72 h de traitement avec différentes concentration de la mitoxantrone des cellules en présence ou non de 2 μ M de LY402913 (tableau 13). Dans l'ensemble des lignées surexprimant la MRP1, le LY402913 induit une augmentation de la cytotoxicité la mitoxantrone. En effet les facteurs de résistance observés après le co-traitement des cellules avec la mitoxantrone et le LY402913 sont beaucoup moins importants que ceux observés en présence de mitoxantrone seule. Les cellules 2008/MRP1, MCF7/VP et MCF7/MGG présentent un facteur de résistance à la mitoxantrone égal à 2,5 (tableau 3). Ces résultats suggèrent que la surexpression de la MRP1 dans ces cellules induit bien une résistance à la mitoxantrone.



Figure 49: Cytotoxicité de la mitoxantrone dans les cellules MCF7/VP, 2008/MRP1 et MCF7/MGG.

		lignée cellulaire								
Médicament	Inhibiteur	MCF7/S MCF7/VP		7/VP	MCF7/MGG		2008	2008/MRP1		
			CI ₅₀	RF	CI ₅₀	RF		CI ₅₀	RF	
Mitoxantrone	-	0,17	0,9	5,29	1,4	8,23	0,06	0,25	4,16	
	LY402913 (2µM)	0,12	0,31	2,58	0,3	2,5	0,03	0,07	2,5	

Tableau13 : Cytotoxicité et index de résistance de la mitoxantrone dans les cellulesMCF7 et 2008. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

II.7. Accumulation cellulaire de la mitoxantrone

Nous avons voulu vérifier si la résistance de la mitoxantrone des cellules surexprimant la MRP1 était corrélée à une diminution de l'accumulation de la mitoxantrone. Les cellules ont été traitées pendant 2 h avec 2 µM de la mitoxantrone. L'accumulation cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux (figure 50). L'accumulation cellulaire de la mitoxantrone diminue de 50 % à peu prés dans les cellules MCF7/MGG et MCF7/VP comparées aux cellules sensibles MCF7/S et de 52 % dans les cellules 2008/MRP1 comparées aux cellules parentales 2008 (figure 51).

II.8. Effet de la BSO et du LY402913 sur l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone

La modulation de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone est réalisée grâce à deux inhibiteurs de la MRP1, le LY402913 et la BSO (inhibiteur de la synthèse du glutathion). Les cellules sont pré-traitées soit par de la BSO pendant 24 h ou avec 2 μ M de LY402913 pendant 1 h, puis avec 2 μ M de la mitoxantrone pendant 1 h.

En présence de ces deux modulateurs, on observe une augmentation de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone dans les cellules MCF7/VP et MCF7/MGG par rapport aux cellules MCF7/S et dans les cellules 2008/MRP1 par rapport à la lignée parentale 2008 (figure 51). L'augmentation de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone, après traitement avec la BSO, suggère un co-transport de ces deux molécules avec le glutathion par la MRP1.



Figure 50 : Accumulation cellulaire de la mitoxantrone. Les cellules ont été traitées avec de 2 μ M de mitoxantrone pendant 2 h, en présence ou non du LY402913 (2 μ M) ou de la BSO (100 μ M). L'accumulation cellulaire de La mitoxantrone a été déterminée par cytométrie en flux. Chaque histogramme montre la fluorescence de la mitoxantrone en absence des modulateurs de la MRP1 (vert), en présence de la BSO (jaune) et du LY402913 (rouge).



Figure 51: Effet de la BSO et du LY402913 sur l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone dans les cellules MCF7 (A) et 2008 (B). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

II.9. Distribution intracellulaire de la doxorubicine et de la mitoxantrone dans les cellules 2008/MRP1 et MCF7/VP

Plusieurs études ont rapporté une diminution importante de l'accumulation nucléaire des anthracyclines et de la mitoxantrone dans les cellules tumorales présentant un phénotype MDR (Breuninger et al. 1995 ; Meschini et al. 1994).

Afin d'analyser la distribution intracellulaire de la mitoxantrone et la doxorubicine dans les cellules transfectées 2008/MRP1 et les cellules MCF7/VP, nous avons incubé les cellules pendant 2 heures en présence de 2 μ M de doxorubicine ou de mitoxantrone, puis analysées par microscopie confocal. La longueur d'onde d'excitation pour la mitoxantrone est de 568 nm et celle d'émission de fluorescence de 670 nm. La doxorubicine est excitée à 457 nm et l'émission de fluorescence examinée à travers un filtre "passe-haut" à 530 nm. Pour chaque image 10 à 20 plans focaux ont été évalué.

Les images obtenues montrent une accumulation nucléaire de la doxorubicine et de mitoxantrone très faible dans la lignée MCF7/VP par rapport à la lignée parentale MCF7/S (figure 52). Les cellules 2008 transfectées avec le gène *MRP1* montrent également une faible accumulation de doxorubicine et de mitoxantrone dans les noyaux par rapport aux cellules 2008 (figure 52). On note également une localisation périnucléaire très importante de la doxorubicine dans les cellules MCF7/VP. Ces données confirment les résultats de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone obtenus par cytométrie en flux.



Figure 52: Distribution cellulaire de la doxorubicine et de la mitoxantrone dans les cellules MCF7 et les cellules 2008.

II.10. DISCUSSION

Le rôle de MRP1 (ABCC1) dans le transport et la résistance à la mitoxantrone est plus au moins controversé. Plusieurs équipes n'ont identifié aucun rapport entre la surexpression de la MRP1 et la résistance à la mitoxantrone, tandis que d'autres ont rapporté une résistance modérée liée à MRP1 (Schneider et al., 1994 ; Breuninger et al., 1995 ; Borst et al., 2000). Les travaux de Diah et collaborateurs ont permis d'observer un lien entre la surexpression de la MRP1 et la résistance à la mitoxantrone dans les cellules MCF7/VP. La résistance observée dans ces cellules est accompagnée d'une diminution de l'accumulation de la mitoxantrone qui est modulée par une privation d'ATP (Diah et al. 2001). Cependant le modèle cellulaire choisi par ces auteurs ne permet pas de proposer un rôle direct de la MRP1 dans la résistance à la mitoxantrone. En effet la lignée peut surexprimer d'autres protéines ABC lors de la sélection en présence de l'étoposide. D'autre part le transport des médicaments via la MRP1 fait appel au glutathion et dans le cas de la mitoxantrone aucun conjugué GSH-mitoxantrone n'a été identifié (Diah et al. 2001). Cependant ces auteurs ont observé une diminution de l'accumulation de la mitoxantrone dans ces cellules (Diah et al. 2001). Considérant que ce transport s'effectuait indépendamment du GSH par la MRP1 ou par une autre protéine ABC. En effet, certains substrats, ne semblent pas être co-transporté avec le GSH par la MRP1 (Leslie et al., 2001; Peklak-Scott et al., 2005; Qian et al., 2001).

Diah et collaborateurs proposent aussi que la différence dans la sensibilité à la mitoxantrone pourrait être probablement due aussi à un mécanisme supplémentaire de résistance à la mitoxantrone, indépendant du transport. L'expression de la topoisomérase II dans cellules MCF7/VP n'est pas modifiée, alors que son activité, par contre est altérée. En effet la formation du complexe clivable induit par des inhibiteurs de la topoisomérase II est 7 fois moins important pour la topoisomérase II extraite des cellules MCF7/VP par rapport à celle extraite des cellules MCF7 parentales (Schneider et al. 1994), Ainsi, l'utilisation d'autres

lignées cellulaires non sélectionnées selon ces auteurs et surexprimant la MRP1, permettrait de confirmer l'hypothèse du transport de la mitoxantrone par la MRP1.

Les données de cytotoxicité que nous avons obtenues montrent que la transfection des cellules 2008 par le gène *MRP1* leur confère une résistance à la mitoxantrone, avec un index de résistance de l'ordre de 4,16 par rapport à la lignée 2008. L'équipe de Morrow, a obtenu le même résultat avec le modèle cellulaire MCF7 transfecté avec le gène *MRP1* (Morrow *et al.*, 2006). Les cellules sélectionnées MCF7/MGG surexpriment le gène MRP1 et présentent également un index de résistance à la mitoxantrone de l'ordre 8,28. Le co-traitement des cellules MCF7/MGG, MCF7/VP et 2008/MRP1 avec l'inhibiteur de la MRP1, le LY402913, a induit une augmentation de la sensibilité de ces cellules à la mitoxantrone.

La BSO et le LY402913 induisent une augmentation de l'accumulation de la mitoxantrone dans les cellules MCF7/VP, MCF7/MGG et 2008/MRP1. Les données obtenues récemment par l'équipe de Morrow sur les vésicules préparées à partir des membranes plasmiques des cellules MCF7/MPR1, montrent clairement un transport ATP-dépendent de la miotxantrone en présence du glutathion ou de son dérivé le S-methylé. Ces auteurs ont aussi montré également que le transport actif du [³H]-glutathion dans ces vésicules est stimulé par la présence de la mitoxantrone. Ces résultats suggèrent un co-transport de la mitoxantrone et du glutathion par la MRP1 (Morrow et al., 2006). Dans l'étude de Morrow et collaborateurs, l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone dans les cellules MCF7 transfectées par le gène *MRP1* est partiellement modulée par le MK571 inhibiteur de la MRP1.

En conclusion, comme les autres transporteurs de la mitoxantrone connus, la Pgp et la BCRP, la MRP1 peut jouer aussi un rôle significatif dans la résistance des cellules tumorales à la cytotoxicité de la mitoxantrone.

Chapitre III : Régulation de l'expression de la BCRP par l'imatinib dans les cellules de leucémie myéloïde chronique K562

III.1. RESUME

L'imatinib est un inhibiteur de l'activité de tyrosines kinases (TK) propres à la protéine de fusion BCR-ABL exprimée dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) et Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) et C-Kit exprimées dans les tumeurs gastro-intestinales. La sélection d'une résistance à l'imatinib dans un modèle de cellules humaines de cancer colique, Caco2, s'accompagne de la surexpression de la BCRP et une diminution de l'accumulation cellulaire de l'imatinib (Burger *et al.*, 2005). Cependant, l'établissement d'une résistance à l'imatinib dans un modèle de cellules LMC n'induit pas de surexpression de la BCRP (données du laboratoire).

Sachant que l'une des voies de régulation de l'expression de la BCRP est la voie phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K/AKT), nous avons émis l'hypothèse d'une régulation de l'expression de la BCRP par l'imatinib via cette voie dans les cellules LMC résistantes à l'imatinib. Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé le modèle de cellules humaines de LMC K562 transfectées par un vecteur portant le gène de la BCRP (K562/BCRP). Après traitement des cellules K562/BCRP par l'imatinib pendant 24 heures, les données obtenues par western-blot et cytométrie en flux montrent une diminution de 66% de l'expression protéique de la BCRP, en dépit de l'absence d'une dimunition du taux d'ARN.du gène BCRP. Le LY294002, inhibiteur de la voie PI3K/AKT, induit le même effet. La diminution de l'expression de la BCRP induit une augmentation de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone (substrat de la BCRP) dans les cellules K562/BCRP. L'imatinib n'a aucun effet sur l'expression de la P-glycoprotéine dans des cellules K562 résistantes à la doxorubicine (Nishiyama et al., 1990). De plus, cet inhibiteur de TK n'a pas d'effet sur l'expression de la BCRP dans des cellules leucémiques myéloblastiques HL60 résistantes à la doxorubicine. Ces données montrent que la régulation de l'expression de la BCRP par l'imatinib est spécifique aux cellules LMC mais aussi à la protéine BCRP. De plus les données obtenues sur la phosphorylation d'AKT montrent que l'imatinib diminue le taux d'AKT phosphorylé, En conclusion l'imatinib régule l'expression de la BCRP via la voie PI3K/AKT.

III.2. INTRODUCTION

L'imatinib mesylate (STI571, Gleevec®) est un inhibiteur sélectif de l'activité tyrosine kinase d'ABL, ARG, BCR-ABL, c-KIT et PDGFR, en se fixant sur le site de liaison de l'ATP de la partie enzymatique de ces différentes protéines (Roskoski, 2003). Ce médicament est actuellement utilisé pour le traitement de la leucémie myéloide chronique (BCR-ABL) et constitue la thérapie principale des patients présentant des tumeurs stomales, gastro-intestinales (c-KIT) (Druker *et al.*, 2001 ; van Oosterom et *al.*, 2001 ; Demetri *et al.*, 2002).

Plusieurs mécanismes de résistance à l'imatinib ont été rapportés, comme l'altération du site de fixation de l'ATP due à des mutations de celui-ci, une diminution d'efficacité suite à une amplification et une surexpression du gène BCR-ABL, ainsi qu'une diminution de l'accumulation dans les cellules LMC surexprimant le gène MDR1/ABCB1 (Gambacorti-Passerini *et al.*, 2003 ; Mahon *et al.*, 2003 ; Shah et scieurs, 2003 ; Widmer *et al.*, 2003).

Récemment, Burger et collaborateurs ont montré que l'imatinib est un modulateur fonctionnel de la protéine ABCG2/BCRP et qu'il est transporté par cette protéine (Burger *et al.*, 2004). Le même groupe a également rapporté une surexpression de la BCRP après une exposition chronique des cellules intestinales Caco2 à l'imatinib (Burger *et al.*, 2005). Cependant, la transfection des cellules Saos-2 avec le gène de la BCRP n'induit aucune résistance à l'effet cytotoxique de l'imatinib (Houghton *et al.*, 2004).

La tyrosine kinase BCR-ABL active plusieurs voies de transduction de signal et en particulier celle du phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt) (Kawauchi *et al.*, 2003 ; Steelman *et al.*, 2004). Cette dernière voie est impliquée dans la modulation post-transcriptionnelle de la BCRP (Mogi *et al.*, 2003 ; Takada *et al.*, 2005). BCR-ABL étant

138

activé de façon constitutive (Benekli *et al.*, 2003), nous avons émis l'hypothèse d'une régulation de l'expression de la BCRP par l'imatinib via la voie PI3K/Akt.

Pour exclure cette hypothèse, les cellules leucémiques K562 exprimant la tyrosine kinase BCR-ABL et transfectées avec le gène de la BCRP (K562/BCRP) ont été utilisées pour mesurer l'effet de l'imatinib sur les niveaux d'expression de l'ARNm du gène BCRP ainsi que de la protéine qu'il spécifie.

Nous avons également comparé l'effet de l'imatinib à celui de l'inhibiteur de la PI3K/AKT le LY294002. Les résultats obtenus suggèrent une interaction complexe entre l'imatinib et la BCRP dans les cellules leucémiques exprimant BCR-ABL.

III.3. Etablissement de la lignée cellulaire K562 résistante à l'imatinib

Dans cette étude nous avons sélectionné une lignée humaine de LMC K562 résistante à l'imatinib et analysé l'expression de la BCRP dans cette lignée par la suite.

Les cellules K562 est un modèle cellulaire qui ne présente pas de surexpression des trois transporteurs ABC Pgp, MRP1 et BCRP. Le traitement des cellules K562 à l'imatinib est initié avec une concentration de 0,1 μ M à l'imatinib. Toutes les 3 à 4 semaines la dose d'imatinib est doublée jusqu'à une concentration de 500 nM. Après 10 mois de traitement une lignée résistante à l'imatinib appelée "K562/imatinib" est établie.

III.4. Expression de l'ARNm du gène *BCRP* et de la protéine BCRP dans les cellules K562/BCRP et K562/imatinib

Pour mesurer le niveau de transcription du gène *BCRP* dans les cellules K562/imatinib, nous avons utilisé la RT-PCR quantitative en temps réel. L'expression du gène *BCRP* a été aussi analysée dans la lignée K562 transfectée par K562/BCRP. Les données sont présentées en tant qu'expression relative de la BCRP en utilisant la méthode comparative

de cycle de seuil (Ct). Le taux d'ARNm du gène BCRP est quasiment nul dans les cellules K562, K562 transfectées par le vecteur seul (K562/V) et K562/Imatinib ($\Delta\Delta$ Ct = 0). Cependant, dans les cellules K562/BCRP, nous observons un niveau d'expression d'ARNm de la BCRP élevé (- $\Delta\Delta$ Ct = 18) (figure 53).

Pour confirmer à un niveau protéique d'expression de la BCRP observé dans la lignée cellulaire K562/BCRP, des expériences de cytométrie en flux ont été réalisées en utilisant l'anticorps BXP34 (figure 54A). La figure 54B montre que les cellules K562/V ont un niveau d'expression de BCRP faible avec un rapport BXP34/IgG1 égal à 2.6. Dans les cellules K562/BCRP, ce rapport est de l'ordre de 48. Ces données ont été confirmées par western blot (figure 55).



Figure 53: Expression relative (- $\Delta \Delta Ct$) du gène BCRP dans les cellules K562/V, K562/BCRP et K562/imatinib.



Figure 54: Détection de la BCRP par cytométrie en flux dans les cellules K562/V et K562/BCRP (A). Le rapport des moyennes d'intensité de fluorescence des anticorps BXP34 et l'isotype IgG1. Ces données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes (B.



Figure 55 : Expression de la BCRP dans les cellules K562/V et K562/BCRP par Western blot. La détection de la BCRP a été réalisée grâce à l'anticorps BXP21.

III.5. Effet cytotoxique de l'imatinib et de la mitoxantrone

Afin de vérifier que les cellules K562/imatinib qui n'expriment pas la BCRP sont résistantes au traitement à l'imatinib, nous les avons traitées pendant 72 heures avec des concentrations croissantes d'imatinib (figure 56A et 56B). Effictivement ces cellules K562/imatinib présentent un index de résistance de 16 vis-à-vis de l'imatinib (figure 56D), sans surexprimer la BCRP. Ce résultat suggère l'existence d'un autre mécanisme de résistance à l'imatinib dans ces cellules. Nous avons ensuite vérifié si la surexpression de la BCRP dans les cellules K562/BCRP confèrant une résistance à la mitoxantrone (substrat classique de la BCRP) et à l'imatinib (figure 56C). Les cellules K562/BCRP présentent un index de 8 vis-à-vis de la mitoxantrone (figure 56) alors que celui observé en présence d'imatinib (figure 56B) est d'une valeur de 3 (figure 56D). Ce résultat confirme que l'imatinib est un substrat de la BCRP, mais la valeur faible de l'index de résistance suggère également un effet de l'imatinib sur l'expression de la BCRP.



Figure 56: Effet cytotoxique de l'imatinib (A et B) et de la mitoxantrone (C) dans les cellules K562. Les index de résistance (D) sont calculés à partir du rapport de l'CI₅₀ de chaque médicament observé dans les cellules K562/Imatinib ou K562/BCRP et celle observée dans les cellules K562 ou K562/V respectivement. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes

III.6. Effet de l'imatinib sur le niveau d'expression de l'ARNm du gène BCRP

Les données obtenues précédemment nous ont amenées dans un premier temps à étudier l'effet de l'imatinib sur l'expression de la BCRP au niveau transcriptionnel. Nous avons ainsi étudié l'effet de l'imatinib sur le taux d'ARNm du BCRP par RT-PCR quantitative en temps réel. Les cellules K562/BCRP sont traitées avec 5 μ M ou 10 μ M d'imatinib pendant 24 h avant d'analyser le niveau d'expression de l'ARNm de la BCRP. L'expression de l'ARNm du gène *BCRP* reste inchangée dans les cellules K562/BCRP après traitement à l'imatinib (Figure 57). Suggèrant que l'imatinib ne module pas l'expression de la BCRP au niveau transcriptionnel.



Figure 57: Expression relative de la BCRP ($N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) dans les cellules K562/BCRP après traitement avec l'imatinib à 5 et 10 μ M pendant 24 h. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. NS : non significatif.
III.7. Effet de l'imatinib sur l'expression de la BCRP

Afin de vérifier si le niveau d'expression de la BCRP pourrait être modulé par l'imatinib, nous avons traité les cellules K562/BCRP pendant 24 h avec 5 µM d'imatinib et nous avons analysé dans un premier temps l'expression de la protéine BCRP par cytométrie en flux. Nous avons observé une diminution d'environ 66% (p<0.002) de l'expression de la BCRP dans ces cellules traitées par rapport aux cellules non traitées (figure 59). Ce résultat a été confirmé par les expériences de western blot (figure 60). Afin d'examiner si l'effet de l'imatinib est dépendant de la présence de BCR-ABL, les cellules leucémiques promyélocytaires HL60/DOX, surexprimant entre autre la BCRP, ont été traitées également avec l'imatinib et l'expression de la BCRP a été mesurée. Celle-ci reste inchangée en présence de 5 µM d'imatinib tandis qu'une concentration plus élevée d'imatinib (10 µM) induit une diminution significative de l'expression de la BCRP (p<0.04) (figure 61A et 61C) suggérant qu'une concentration plus élevée inhiberait la tyrosine kinase c-ABL et que l'imatinib régule l'expression de la BCRP préférentiellement dans les cellules exprimant le BCR-ABL. Afin de vérifier si l'effet de l'imatinib est spécifique à la BCRP, nous avons analysé l'effet de ce médicament sur l'expression de la Pgp dans les cellules K562/DOX. Le traitement des cellules K562/DOX avec l'imatinib n'affecte pas l'expression de la Pgp (figure 61B et 61D). De façon générale, ces résultats suggèrent que l'imatinib régule spécifiquement l'expression de la BCRP dans les cellules qui expriment BCR-ABL.



Figure 58 : Détection de la BCRP par cytométrie en flux dans les cellules K562/BCRP témoins (a), traitées par l'imatinib (b) ou par le LY294002 (c).



Figure 59 : Effet de l'imatinib et du LY294002 sur l'expression de la BCRP dans les cellules K562/BCRP. L'expression relative de la protéine est représentée en % par rapport aux cellules témoins. Ces données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes



Figure 60: Expression de la BCRP dans les cellules K562/BCRP suite à un traitement avec l'imatinib ou LY294002. Le marquage par Western blot à été réalisé grâce à l'anticorps BXP21.







Figure 61 : Expression de la BCRP dans les cellules HL60/D0X (A) et de la Pgp dans les cellules K562/DOX (B). La détection des protéines est réalisée par cytométrie en flux après un marquage de la BCRP avec l'anticorps BXP34 et la Pgp avec l'anticorps UIC2. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. NS : non significatif ; *

III.8. Effet du LY294002 sur l'expression de la BCRP

D'après la littérature, la voie PI3K/Akt joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la BCRP (Mogi *et al.*, 2003). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'inhibiteur de la PI3K, le LY294002, sur l'expression de la BCRP dans les cellules K562/BCRP (figure 59). Après 24 heures de traitement avec 20 μ M de LY294002, l'expression de la BCRP a été réduite à un niveau semblable à celui obtenu avec l'imatinib (p<0.003), suggérant avec les données obtenues précédemment que l'imatinib régule probablement l'expression de la BCRP via la voie PI3K/Akt. Il est important de noter que la tyrosine kinase BCR-ABL active la voie PI3K/Akt tyrosine kinase (Kawauchi et al., 2003 ; Steelman *et al.*, 2004).

III.9. Immuno-localisation de la BCRP

Dans cette partie du travail, nous avons étudié l'effet de l'imatinib et du LY294002 sur la localisation cellulaire de la BCRP par microscopie de fluorescence (figure 60). Le marquage est réalisé comme cela a été décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». La protéine BCRP est localisée préférentiellement à la surface des cellules, mais elle est également localisée au niveau des compartiments intracellulaires (figure 60A). Les traitements avec 5 μ M (figure 60B) et 10 μ M d'imatinib (figure 60C) ou avec 20 μ M LY294002 (figure 60D) semble induire une diminution de l'intensité du marquage de la BCRP et particulièrement à la surface des cellules traitées. Cet effet est plus important dans le cas d'un traitement avec l'imatinib.



Figure 62 : Localisation de la BCRP par microscopie de fluorescence dans les cellules K562/BCRP (A) et après un traitement avec 5 μ M (B) et 10 μ M (C) d'imatinib ou 20 μ M de LY294002 (D). Le marquage de la BCRP a été réalisé en utilisant l'anticorps BXP-21 (émission verte). Les noyaux ont été marqués avec le Hoechst33342 (émission bleue).

III.10. Accumulation cellulaire de la mitoxantrone et du Hoechst33342

La diminution de l'expression des protéines de transport de type MDR est toujours corrélée à une augmentation de l'accumulation cellulaire de leurs substrats. Pour mettre en évidence cette corrélation dans notre modèle d'étude, nous avons mesuré par cytométrie en flux l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone (figure 63 et 64) dans les cellules K562/BCRP. L'accumulation cellulaire de la mitoxantrone augmente de 240% (p<0.04), 300% (p<0.02) et 330% (p<0.004) lorsque les cellules sont traitées avec l'imatinib à 2, 5 et 10 μ M respectivement (figure 64A). En présence des concentrations de 10 et de 20 μ M de LY294002, l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone augmente de 235% (p<0.004) et 260% (p<0.004) respectivement (figure 64A). L'imatinib n'induit pas de modification significative dans l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone dans les cellules K562/V. Des données similaires ont été obtenues avec le Hoechst33342 (figure 64B). En effet, l'accumulation cellulaire du Hoechst33342 est environ 9 fois plus importante dans les cellules K562/BCRP après traitement avec l'imatinib (p<0.02), alors qu'elle est 3 fois plus importante lorsque les cellules sont traitées avec le LY294002 (p<0.02).



Figure 63 : Effet de l'imatinib et du LY294002 sur l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone. Les cellules K562/BCRP ont été traitées avec l'imatinib et le LY294002 pendant 24 heures, puis incubées pendant 1 h en présence de mitoxantrone (2 μ M). L'accumulation cellulaire de la mitoxantrone a été déterminé par cytometrie en flux. La longueur d'onde d'excitation de la mitoxantrone est de 633 nm et celle d'émission de fluorescence est de 670 nm. Les histogrammes de l'autofluorescense des cellules sont représentés en noir et ceux de la mitoxantrone en blanc



Figure 64 : Pourcentage d'accumulation de la mitoxantrone (A) et du Hoechst 33342 dans les cellules K562/BCRP traitées par l'imatinib et le LY294002 (A). * p<0.04; ** p<0.02; *** p<0.004.

III.11. Effet de l'imatinib sur la phosphorylation d'Akt

La tyrosine kinase BCR-ABL active la voie P13K/AKT dans la leucémie myéloide chronique (Kawauchi et al., 2003 ; Steelman et al.,2004). Afin de vérifier l'éxistance d'une telle régulation dans notre modèle cellulaire, nous avons traité les cellules K562/BCRP avec 5 ou 10 μ M d'imatinib et 20 μ M de LY294002 et étudié la phosphorylation de AKT par western blot. Le traitement avec le LY294002 induit une forte diminution de la phosphorylation d'Akt sur la Ser 473 (figure 65). Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'imatinib à 5 μ M, suggérant que la modulation de l'activité de la kinase BCR-ABL par l'imatinib inhiberait la voie de PI3K/Akt et changerait le statut de phosphorylation d'Akt, qui pourrait mener à une diminution de l'expression de la BCRP.



Figure 65 : Effets de l'imatinib et du LY294002 sur la phosphorylation d'Akt. Les cellules K562/BCRP ont été exposées à l'imatinib ou le LY294002 pendant 24 heures. Le western blot est réalisé avec l'anticorps anti-Akt et l'anticorps anti-phospho-Akt (Ser473).

III.12. DISCUSSION

Dans cette partie de notre thèse, nous avons montré que la sélection de cellules humaines de LMC résistantes en présence d'imatinib n'induit pas de surexpression du gène de la BCRP. De plus, l'expression des autres gènes MDR (MDR1, MRP1, MRP2 et MRP3) et du gène BCR-ABL ne se trouve pas modifiée dans ces cellules. Ces résultats sont en contradiction avec l'étude menée par Burger et collaborateurs qui ont montré une surexpression de la BCRP après une exposition chronique des cellules Caco2 intestinales à l'imatinib (Burger et al. 2005). Ces auteurs ont également ont attribué à l'imatinib un rôle de modulateur potentiel de la BCRP et montre que ce médicament est transporté par la BCRP dans les cellules HEK293 humaines embryonnaire de rein transfectées par la BCRP (Burger et al. 2004). Dans les cellules K562/Imatinib, la résistance pourrait être expliquée par un autre mécanisme de résistance, comme la mutation ponctuelle dans la protéine BCR-ABL. D'ailleurs Houghton et collaborateurs ont montré aussi que la BCRP ne pouvait pas induire de résistance à l'imatinib dans la lignée Saos-2 (Houghton et al., 2004). Par ailleurs, Jordanides et collaborateurs ont montré également que l'imatinib est un inhibiteur et non un substrat de la BCRP dans les cellules souches de LMC CD34+ (Jordanides et al., 2006). La tyrosine kinase BCR-ABL active la voie de signalisation PI3K/Akt (Kawauchi et al., 2003) (Steelman et al., 2004) et l'inhibition de cette voie induit une régulation négative de l'expression de la BCRP de surface (Mogi et al., 2003; Takada et al., 2005). Nous proposons que l'imatinib soit impliquée dans la régulation de l'expression de la BCRP dans le cas de la LMC.

Pour vérifier si l'imatinib induit une régulation de l'expression de la BCRP, nous avons utilisé les cellules K562 transfectées avec le gène *BCRP* (K562/BCRP). Ces cellules sont respectivement 3 et 8 fois résistantes à l'imatinib et à la mitoxantrone, lorsqu'elles sont traitées pendant 24 h avec 5 μ M d'imatinib présentant une diminution de l'expression de la

BCRP. Ceci pouvrait expliquer la faible résistance à l'imatinib observée dans les cellules K562/BCRP. En effet, le niveau résiduel de la BCRP dans les cellules traitées par l'imatinib n'est que de 34%.

Le traitement des cellules K562/BCRP avec l'imatinib induit une diminution de l'expression de la protéine BCRP sans affecter le niveau de son ARNm, suggérant que l'expression de la BCRP est modulée au niveau post-transcriptionel. Nakanishi et collaborateurs ont rapporté la même observation sur la même lignée cellulaire mais avec une sélection supplémentaire de ces cellules en présence de 10 nM de mitoxantrone (Nakanishi et al., 2006). L'analyse de la distribution cellulaire de la BCRP par microscopie de fluorescence nous a permis de montrer une diminution préférentielle de l'expression de la protéine de surface lorsque les cellules K562/BCRP sont traitées avec l'imatinib, suggérant que la modulation de l'expression de la BCRP se fait également au niveau de la localisation cellulaire de la protéine. Les résultats obtenus sur les mesures d'accumulation cellulaire de la BCRP après un traitement par l'imatinib. En effet ce traitement induit une augmentation de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone et du Hoechst33342.

Une des voies de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la BCRP est la voie PI3K/Akt. Cette voie a été déjà décrite comme voie impliquée dans le régulation de l'expression de la BCRP de surface (Mogi *et al.*, 2003; Takada *et al.*, 2005). De ce fait nous avons traité les cellules K562/BCRP avec l'inhibiteur de la PI3K le LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994) montré que ce traitement induit une diminution de l'expression de la BCRP et une augmentation de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone et du Hoechst33342 (figure 60 et 64).

Afin de déterminer si cet effet était spécifique ou non à la BCRP et/ou BCR-ABL, nous avons analysé l'effet de l'imatinib sur l'expression de la Pgp dans les cellules K562/DOX ainsi que la BCRP dans les cellules HL60/DOX. Les données obtenues montrent qu'il n'y a pas de diminution significative de l'expression de ces protéines suggérant que la BCRP est régulée de façon spécifique dans les cellules « BCR-ABL ».

Akt est une protéine phosphorylée via la PI3K (Chang et al., 1997 ; Cantley et Neel, 1999). Quatre sites de phosphorylation ont été identifiés au domaine NH2-terminal d'Akt : Ser124 ; Thr308 ; Thr450 ; et Ser473 (Alessi *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 1999). Nos données ainsi que celles d'autres auteurs montrent que la phosphorylation d'Akt est bloqué par l'imatinib et le LY294002 sur la Ser473 (figure 65) (Semba *et al.*, 2002). Nakanishi et collaborateurs ont montré que la régulation de la BCRP par l'imatinib n'est pas dû à une dégradation de la protéine (Nakanishi et al., 2006), en total accord avec nos données.

En conclusion, le niveau élevé de rémission complète dans la leucémie myéloïde chronique traitée par l'imatinib (Deininger et al., 2005) et le fait que la BCRP n'est pas exprimée dans les cellules LMC traitées par l'imatinib, suggère l'hypothèse de travail que l'inhibiteur de TK réprime l'expression de BCRP.

Chapitre IV : Effet de l'imatinib sur l'expression de la télomérase et protéines partenaires dans la leucémie myéloïde chronique

IV.1. RESUME

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie chronique caractérisée par une prolifération clonale des cellules porteuse de la translocation t(9;22). Le résultat de cette translocation est la formation d'un gène chimérique codant pour la tyrosine kinase BCR-ABL. Plusieurs études *in vitro* et sur des prélèvements de patients ont montré que l'activité tyrosine kinase constitutive du BCR-ABL induit des modifications au niveau du télomère et au niveau de l'expression de certaines protéines qui lui sont associées. En plus de ces modifications, une très forte instabilité génomique a été observée dans ces cellules. D'où l'intérêt d'étudier ces modifications et d'identifier ces protéines, *in vitro* ainsi que sur les prélèvements de patients pour estimer leur importance dans la LMC.

In vitro, nous avons utilisé deux modèles cellulaires : la lignée cellulaire HL60 transfectées par le gène BCR-ABL (HL60/BCR-ABL) et la lignée K562. L'analysé de l'expression des gènes *hTERT*, *TRF2*, *TRF1*, *POT1*, *WRN*, *BLM*, *RAD51 et Topo IIIa* par RT-PCR quantitative en temps réel dans la lignée HL60/BCR-ABL, montre une surexpression des gènes *hTERT*, *TRF2*, *BLM*, *RAD51* et *Topo IIIa*, alors que l'expression des gènes *WRN*, *TRF1 et POT1* reste inchangée. Le traitement des cellules K562 à l'imatinib, induit une diminution de l'expression de hTERT et de son activité. D'autres part, nous avons observé une diminution de l'expression de *BLM*, *RAD51* et *Topo IIIa*, alors que l'expression de TRF2 augmente après traitement à l'imatinib dans ces cellules. Ces données suggèrent que le BCR-ABL régule l'expression de hTERT et de la *Topo IIIa* en plus de BLM et de RAD51 déjà rapportées par des études ultérieures. Nous avons également mené une étude de l'expression de ces gènes dans des prélèvements de patients atteints de LMC. Les résultats préliminaires obtenus sont insuffisants pour estimer leur importance dans cette pathologie.

IV.2. INTRODUCTION

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie chronique caractérisée par une prolifération incontrôlée de progéniteurs hématopoïétiques. Elle évolue inévitablement par une série d'étapes, de la phase chronique en passant par la phase accélérée à la phase blastique (Kantarjian *et al.*, 1987). L'apparition de l'imatinib (Gleevec ; STI571), inhibiteur de la tyrosine kinase BCR-ABL, a révolutionné le traitement de la LMC et beaucoup de patients nouvellement diagnostiqués sont maintenant traités avec succès (Mughal and Goldman, 2004).

Les télomères sont des séquences répétitives d'ADN (TTAGGG) situées à l'extrémité des chromosomes. Ces séquences jouent un rôle important dans l'intégrité des chromosomes en empêchant les phénomènes de fusions chromosomiques et recombinaison non désirables. La perte progressive de ces séquences est associée à la sénescence des cellules. L'intégrité des télomères est assurée par une enzyme complexe, la télomérase, responsable de la synthèse de ces séquences répétitives. L'activité de cette enzyme est absente dans la majorité des cellules somatiques normales, alors qu'elle est présente dans plus de 90% des cancers. Elle est également détectée dans les cellules hématopoïétiques à des phases particulières de division et de différenciation.

Des études réalisées sur les prélèvements de patients atteints de LMC ont montré que dans la phase blastique par rapport à la phase chronique, la majorité de patients présentent une longueur du télomère réduite (Ohyashiki *et al.*, 1997). La progression de la maladie dans les phases d'accélération et blastique est associée à l'augmentation significative des niveaux d'expression de la télomérase (10 à 50 fois) (Ohyashiki *et al.*, 1997); (Engelhardt *et al.*, 2000). Dans une étude récente, il a été montré que le traitement à l'imatinib des patients en phase chronique induit une augmentation de l'expression de hTERT, suggérant une diminution de cette dernière dans cette phase (Campbell *et al.*, 2006). Les patients en phase blastique

présentant une activité télomérase moyenne ou élevée, présentent une fréquence de changements cytogénétiques additionnels très importante (Ohyashiki *et al.*, 1997).

La régulation de la taille du télomère dans les cellules tumorales n'est pas liée uniquement à l'expression de hTERT et à son activité, mais également à l'intervention de plusieurs protéines partenaires (POT1, TRF1, TRF2, PiP1 et tankyrase). Les protéines de réparation L'ADN (WRN, BLM, Topo IIIa....), interviennent également dans la régulation de la longueur des télomères et dans la stabilité génomique associée au télomère (Riou *et al.*, 2005).

D'autre part, les observations cliniques (Alimena *et al.*, 1987); (Kelman *et al.*, 1989); (Rowley, 1982) et les résultats obtenus *in vitro* (Honda *et al.*, 2000); (Laneuville *et al.*, 1992); (Salloukh and Laneuville, 2000) démontrent que BCR-ABL peut induire une instabilité génomique, menant à des translocations chromosomiques, suppressions de chromosomes, amplifications et mutations de gènes. Ces événements peuvent être liés au raccourcissement du télomère dans la phase chronique et à la dérégulation des voies de réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules LMC.

Les travaux de Slupianek et collaborateurs montrent que l'expression les hélicases BLM et RAD51 est augmentée par BCR-ABL (Slupianek *et al.*, 2005); (Slupianek *et al.*, 2001). La régulation de l'expression de BLM et de RAD51 par le BCR-ABL induit une augmentation des capacités de la réparation d'ADN par recombinaison homologue et une résistance aux dommages à l'ADN induits par le cisplatine ou la mitomycine C (Slupianek *et al.*, 2005; Slupianek *et al.*, 2001).

L'objectif de cette partie de ce travail est dans un premier temps, étudier l'expression de hTERT et des protéines associés aux télomères (TRF1, TRF2, POT1, BLM, RAD51, WRN et topo IIIα) dans un modèle cellulaire transfecté d'une manière stable par le gène *BCR-ABL* (HL60/BCR-ABL). Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'imatinib sur l'expression de hTERT et de ces protéines dans les cellules K562. Le dernier point de cette étude concerne l'effet de l'imatinib sur l'expression de ces protéines chez des patients atteints de LMC et traités par ce médicament.

IV.3. Expression de la télomérase et protéines partenaires dans les cellules promyélocytaires HL60 transfectées par BCR-ABL

Les cellules leucémiques HL60 ont été transfectées avec le gène de BCR-ABL (Andrzej Ptasznik et al 2002). La vérification de l'expression du gène *BCR-ABL* dans ces cellules a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel. Le cycle seuil Ct dans les cellules HL60/BCR-ABL est de l'ordre de 21,68 et de 38 pour les cellules HL60 (tableau 14).

	HL60	HL60/BCRABL	AACT	
	Ct	Ct		2
GUS	22,62	22,24		
BCR-ABL	37,62	21,68	-15,64	51063,3299

Tableau 14 : Expression relative du gène BCR-ABL dans les cellules HL60/BCR-ABL

Nous avons ensuite analysé dans ces cellules l'expression des gènes *hTERT*, *TRF1*, *TRF2*, *POT1*, *BLM*, *RAD51*, *WRN* et *Topo IIIα* par RT-PCR quantitative en temps réel. Nous avons observé que l'expression des gènes *hTERT*, *TRF2*, *BLM*, *RAD51* et *Topo IIIα* augmentait, alors que l'expression des autres gènes reste inchangée. Ces gènes surexprimés sont reparties en deux groupes, un groupe incluant hTERT, BLM et RAD51 avec un facteur d'expression supérieur à 5 dans les cellules HL60/BCR-ABL par rapport aux cellules HL60 et un deuxième groupe composé des gènes *Topo IIIα et TRF2* avec un facteur d'expression des gènes Topo IIIα et RAD51 confirment la surexpression des protéines TRF2, Topo IIIα et RAD51 dans les HL60/BCR-ABL (figure 67).



Figure 66 : Expression relative des gènes hTERT, BLM, Topo IIIa, RAD51 et WRN dans les cellules HL60 parentales et HL60/BCR-ABL. Ces données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.



Figure 67 : Expression des protéines TRF2, de Topo IIIa et de RAD51 dans les cellules HL60 et HL60/BCR-ABL.

IV.4. Effet de l'imatinib sur l'expression de la télomérase et protéines partenaires dans les cellules K562

IV.4. 1. Effet de l'imatinib sur la prolifération des cellules K562

La cytotoxicité de l'imatinib dans les cellules K562 est évaluée par le test MTT (figure 68). Nous avons ainsi pu déterminer la concentration du médicament qui induit 50% d'inhibition de croissance cellulaire (CI_{50}) dans les cellules K562. La CI_{50} obtenue dans ces cellules après 96 h de traitement à l'imatinib est égale à 200 nM. Nous avons utilisé au cours de nos expériences des concentrations allant jusqu'à 10 μ M et une durée de traitement de 24h.



Figure 68 : Effet cytotoxique de l'imatinib dans les cellules K562. Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'imatinib pendant 96 h.

IV.4.2. Expression de la télomérase après un traitement des cellules K562 avec l'imatinib

La régulation de la télomérase s'effectue à de nombreux niveaux: transcription, épissage, maturation, modification de hTR, transport et localisation subcellulaire de chacun des composants. Il a été identifié par RT-PCR huit transcrits différents de hTERT dans les tissus humains. Ces transcrits sont la conséquence d'insertions ou de délétions par épissage alternatif.

Nous avons analysé l'expression de l'isoforme active de hTERT $(+\alpha+\beta)$ après traitement des cellules K562 avec 2, 5 et 10 μ M d'imatinib pendant 24 h. L'expression relative du gène *hTERT* est normalisée par rapport à celle du gène de ménage *GUS* (β -glucouronidase). Nous avons observé une diminution d'environ 75 % de l'expression de hTERT dans les cellules K562 traitées à l'imatinib par rapport aux cellules non traitées (figure 69).



Figure 69 : *Expression relative du gène hTERT* (+α+β) *dans les cellules K562 traitées avec l'imatinib. Ces données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes*

IV.4. 3. Effet de l'imatinib sur l'activité de la télomérase

Les cellules K562 ont été exposées pendant 24 h à 2 et 5 μ M d'imatinib. L'activité de la télomérase a été évaluée en utilisant le test TRAP. Elle est réduite de façon dose dépendante dans les cellules K562 traitées par l'imatinib (figure 70). En effet l'imatinib à 2 μ M induit une inhibition de 35% de l'activité télomérase, alors qu'à 5 μ M d'imatinib induit une inhibition de l'activité télomérase d'environ 50%.



Figure 70 : Activité télomérase dans les cellules K562. Les cellules ont été traitées avec l'imatinib pendant 24 h. Ensuite les protéines sont extraites et dosées. L'activité télomérase de plusieurs concentrations protéiques (de 1 à 10 ng) est mesurée par le test TRAP.

IV.4. 4. Effet de l'imatinib sur l'expression de TRF2

La protéine TRF2 reconnait les répétitions télomériques par un domaine C-terminal Myb. Cette protéine fonctionne comme un homodimère grâce à un domaine TRFH (TRF homology) de dimérisation et régule avec TRF1 l'élongation des télomères. L'altération des fonctions de TRF2 induit la dégradation du simple brin télomérique (Stansel *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2003).

Etant donné l'importance de cette protéine dans la protection des télomères, nous avons analysé l'effet de l'imatinib sur son expression dans les cellules K562. Le traitement de ces cellules à 2 μ M d'imatinib induit une augmentation d'expression de l'ARNm de TRF2 d'un facteur 1,5 (figure 71A). Cette augmentation d'expression relative de l'ARNm de TRF2 reste inchangée, lorsqu'on augmente la concentration de l'imatinib à 5 μ M ou à 10 μ M. Le niveau d'expression de la protéine augmente également d'un facteur 2 après un traitement de 10 μ M d'imatinib (figure 71B et 71C).



Figure 71 : Effet de l'imatinib sur l'expression de TRF2 dans les cellules K562. A : Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel de l'expression de l'ARNm de TRF2. B : analyse par western blot du niveau de l'expression de la protéine TRF2. C : Quantification de l'expression de TRF2 par rapport à la β -actine. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

IV.4. 5. Effet de l'imatinib sur l'expression de RAD51

Christodoulopoulos et collaborateurs ont montré que la surexpression de RAD51 est liée à la résistance au chlorambucil dans les cellules de leucémie lymphoïde chronique B (Christodoulopoulos et al., 1999). Réciproquement, la régulation négative de RAD51 augmente la radiosensibilité des cellules du cancer de prostate (Collis et al., 2001) et des cellules de gliome (Ohnishi et al., 1998). BCR-ABL induit une surexpression de RAD51 (Slupianek et al., 2001) qui résulte d'une activation de STAT5 et une réduction de la dégradation de RAD51 par la caspase-3 (Slupianek et al., 2001). Afin de vérifier si le traitement des cellules K562 avec l'imatinib provoque une diminution de l'expression de RAD51, nous avons traité les cellules K562 avec différentes concentrations d'imatinib pendant 24 h. L'expression de l'ARNm de RAD51 diminue significativement et de façon dose dépendante. En effet, elle diminue d'un facteur de 2,3, 2,4 et 4,3 lorsque les cellules sont traitées avec 2, 5 et 10 µM d'imatinib respectivement (figure 72A). Le résultat de l'analyse de l'expression de la protéine RAD51 par western blot montre une diminution de l'expression de la protéine après traitement avec l'imatinib (figure 72B). Le niveau d'expression de RAD51 diminue de 30 %, 50 %, 57% et 72% pour les traitements de 1, 2, 5 et 10 µM d'imatinib respectivement (figure 72C).







Figure 72 : Effet de l'imatinib sur l'expression de RAD51 dans les cellules K562. A : Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel de l'expression de l'ARNm de RAD51. B: Analyse par western blot du niveau d'expression de la protéine RAD51. C : Quantification de

l'expression de la protéine RAD51 par rapport à β -actine. Les valeurs correspondent à la moyenne 3 expériences indépendantes.

IV.4. 6. Effet de l'imatinib sur l'expression de BLM

L'hélicase BLM joue un rôle important dans les réponses aux cassures double brin d'ADN et dans les fourches de réplication (Langland *et al.*, 2002). La modulation des capacités de réparation d'ADN par BCR-ABL est associée une expression élevée de BLM (Slupianek *et al.*, 2005).

Ici, nous confirmons les résultats obtenus précédemment par l'équipe de Slupianek (figure 73B et 73C) (Slupianek *et al.*, 2005). Nous montrons également une régulation de l'expression de BLM par l'imatinib au niveau transcriptionnel (figure 8A). En effet, l'expression de l'ARNm de BLM diminue d'un facteur de 2,5 fois aprés traitement avec 2 et 5 μ M d'imatinib et fois après un traitement avec 10 μ M d'imatinib (figure 9A).



Figure 73 : Effet de l'imatinib sur l'expression de BLM dans les cellules K562. A : Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel de l'expression de l'ARNm de BLM. B : Analyse par western blot du niveau d'expression de la protéine BLM. C : Quantification de l'expression de BLM par rapport à la β -actine. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

IV.4. 7. Effet de l'imatinib sur l'expression de la Topo IIIa

Le rôle de la Topo IIIa dans le cancer et en particulier dans la leucémie myéloïde chronique n'est pas encore élucidé. Cependant cette protéine pourrait jouer un rôle dans la régulation du télomère de cellules présentant un phénotype ALT (Tsai *et al.*, 2006). Vu les interactions de la Topo IIIa avec un ensemble de protéines de réparation d'ADN, nous avons émis l'hypothèse que la Topo IIIa pourrait être régulé également sur l'effet de l'imatinib.

Le traitement des cellules K562 avec l'imatinib induit une diminution de l'expression de l'ARNm de la Topo III α (figure 74A). On note une diminution de 2,5 fois après un traitement de 24 h avec 2, 5 et 10 μ M d'imatinib. De la même façon l'expression de la protéine Topo III α diminue en taux de protéines, elle diminue à peu prés de 35 % pour les traitements 1, 2 et 5 μ M d'imatinib et de 60 % avec un traitement de 10 μ M (figure 74C). Après 48 h de traitement, l'expression de la Topo III α diminue de 42 % et 87% avec les traitements de 1 et 2 μ M respectivement (figures 74B et 74C).



Figure 74 : Effet de l'imatinib sur l'expression de la Topo IIIa dans des cellules K562. A : Analyse par RT-PCR quantitative en temps réel de l'expression de l'ARNm de la Topo IIIa. B : Analyse par western blot du niveau d'expression de la protéine topo IIIa. C : Quantification de l'expression de la Topo IIIa par rapport à β -actine. Les valeurs relatives à l'expression de l'ARNm de la Topo IIIa. de la correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

IV.5. Expression de la télomérase et protéines partenaires dans des cellules LMC de patients traités avec l'imatinib

La formation du gène de fusion *BCR-ABL* sur le chromosome 22 est la caractéristique de la LMC. Le gène de fusion est transcrit en un ARNm détectable en RT-PCR en temps réel, ce qui a permis le suivi de la maladie résiduelle. La majorité des patients traités en phase chronique ont une réponse durable. Il reste cependant un certain nombre de patients d'emblée résistants ou ne manifestant qu'une réponse transitoire. Or il est important de détecter ces patients avant même les manifestations cliniques de la résistance ou de la rechute, afin de tenter d'identifier les mécanismes de résistance et éventuellement adapter la thérapeutique. Sous imatinib, on observe une bonne corrélation entre les résultats cytogénétiques (Tableau 15) et les résultats en PCR quantitative en temps réel (exemple : figure 75).



Figure 75 : Suivi de l'expression du BCR-ABL par RT-PCR quantitative en temps réel (sonde Taqman) chez un patient atteint de LMC. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un rapport BCR-ABL/Abl et en pourcentage par rapport au niveau d'expression du BCR-ABL au diagnostic (suivi/diag (%)). Ces données sont corrélées aux résultats de la cytogénétique.

Dans cette étude, nous avons utilisé la RT-PCR quantitative en temps réel pour évaluer l'expression des gènes *hTERT, Topo IIIa, RAD51, BLM et WRN* chez des patients atteints de LMC traités à l'imatinib (tableau 15). Les résultats préliminaires obtenus sur des prélèvements de six patients (tableau 16), sont insuffisants pour estimer l'importance de ces gènes dans la pathologie et l'effet du traitement à l'imatinib sur leur expression. Cependant les premières indications apportées par cette analyse montrent une surexpression de RAD51 à partir du $3^{\text{ème}}$ mois de traitement par rapport au diagnostic chez les deux patients qui ont bien répondu au traitement (tableau 16). Par contre l'expression de la Topo IIIa diminuée chez trois patients dont deux résistants (BERT et DELC), augmente chez deux des patients non résistants et reste inchangé pour les deux autres (DEMA et WAC). L'expression de WRN et BLM reste inchangé chez 4 patients sur six. Pour l'expression de hTERT aucune conclusion ne peut être établie. En effet elle augmente chez 3 patients, diminue chez 2 patients et reste inchangé chez 1 patient (tableau 16).

	BERT	DELC	DEMA	WAG (R)	TAMB (R)	LAMO
Age (année)	76	50	68	33	49	71
Sex	М	М	М	М	М	М
Posologie	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg
Etat actuelle	sensible à l'imatinib (<0,1 à 18 mois)	sensible à l'imatinib (<0,1 à 18 mois)	sensible à l'imatinib (<0,1 à 18 mois)	résistance moléculaire (> 0,1 à 18 mois)	Décès suite à une accutisation (Leucémie aigue myéloïde)	sensible à l'imatinib (<0,1 à 18 mois)
Caryotype au diagnostic	100% Phi+variante (t(9;22;12;2)(q34;q1 1;p13;p1?4)	100% Phi+ (t(9;22)(q34;q11)	100% Phi+	100 % Phi+	100% Phi+	100% Phi+
Caryotype après 3 mois	ND	ND	ND	ND	ND	échec
Caryotype après 6 mois	Normal	ND	ND	Normal	échec	ND
Caryotype après 9 mois	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Caryotype après 12 mois		ND	ND	ND	Normal	ND
Caryotype après 15 mois		ND			duplication Phi+	Normal

Tableau 15 : Caractéristiques des patients atteins de LMC traités à l'imatinib. Le caryotype est réalisé au diagnostic et après le traitement à

l'imatinib.

patients	BERT		DELC		DEMA		WAG (R)		TAMB (R)		LAMO			
mois	3	6	9	3	6	9	6	9	3	6	3	6	3	6
hTERT	-1,34	-2,02	-0,41	0,43	-0,22	1,33	0,64	0,63	0,16	1,87	-1,43	-2,42	-1,04	-1,3
Торо IIIa	-1,34	-1,35	-1,55	-1,21	-0,45	-2,1	0,29	-0,38	-0,61	0,72	1,43	-0,51	0,32	1
BLM	-0,28	-0,15	0,02	2	1,95	1,95	-0,27	-0,44	1,25	3,02	-0,24	0,21	-0,39	-0,62
WRN	-0,65	-0,72	-0,31	-0,51	-0,88	-0,51	0,42	-0,89	-0,59	-0,45	-1,31	-0,9	-1,19	-1,16
RAD51	2,41	2,25	2,22	1,95	2,36	2,48	0,72	1,4	-3,96	-4,88	-2,63	-2,64	0,73	1,04

Tableau 16: Expression relative de hTERT, Topo IIIa, BLM, WRN et RAD51 sur des prélèvements de patients atteints de LMC traités avec l'imatinib pendant plusieurs mois. Les valeurs expriment le $\Delta\Delta$ Ct obtenu par rapport aux prélèvements au diagnostic. Les données représentent le résultat d'une seule expérience. Le $\Delta\Delta$ Ct est considéré comme non significatif lorsqu'il est compris entre $-1 < \Delta\Delta$ Ct >1. Les chiffres en rouge représentent la diminution de l'expression des gènes. Les chiffres en bleu représentent l'augmentation de cette expression. R : résistant

	Augmentation	Diminution	inchangé
hTERT	3(1R)	2(1R)	1
Торо Ша		3(2R)	3
BLM		2	4 (2R)
WRN	2(1R)		4 (1R)
RAD51	2(2R)	4	

Tableau 3 : Répartition des patients en fonction de la variation des niveaux d'expression de hTERT Topo IIIa, BLM, WRN et RAD51, après le 3 ^{ème} mois de traitement à l'imatinib. R : résistant.

IV.6. DISCUSSION

Les traitements de la LMC ont sensiblement changé pendant les dernières années, principalement grâce au développement de l'inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase BCR-ABL l'imatinib. Les taux des réponses hématologiques et cytogénétiques s'en sont considérablement améliorés. Ceci s'est traduit par une meilleure survie des patients, bien que le développement de la résistance à l'imatinib devienne de plus en plus un problème dans le traitement de cette pathologie. Un des mécanismes d'acquisition de la résistance et/ou de la progression de la maladie est l'augmentation de l'instabilité génétique menant à l'acquisition des anomalies génétiques secondaires qui rendent les cellules Ph+ BCR-ABL-indépendantes (Turhan, 2003). Le raccourcissement progressif des télomères est corrélé avec la progression de la LMC (Brummendorf *et al.*, 2000) et constitue un mécanisme potentiel par lequel l'instabilité génétique peut être augmentée. Quand les télomères atteignent une taille critique, l'activation de télomérase est nécessaire pour l'évolution clonale observée pendant la progression de la LMC de phase chronique à la phase blastique.

Plusieurs études *in vitro* et sur des prélèvements de patients ont été menées ces dernières années pour mettre en évidence la régulation de la taille et la stabilité du télomère par le BCR-ABL (Campbell *et al.*, 2006); (Brummendorf *et al.*, 2000; Ohyashiki *et al.*, 2000).

Dans ce sens nous avons analysé l'expression de plusieurs gènes (*hTERT, TRF2, TRF1, POT1, topo IIIα, RAD51, BLM et WRN*), dans la lignée cellulaire HL60/BCR-ABL. Les résultats obtenus par RT-PCR quantitative montrent une surexpression des gènes *TRF2, RAD51, BLM et Topo IIIα* dans les cellules HL60/BCR-ABL par rapport aux cellules HL60, cette surexpression est confirmée par western blot pour TRF2, RAD51 et Topo IIIα. Dans les mêmes cellules on a observé une surexpression du gène *hTERT*. Le traitement des cellules K562 par l'imatinib induit une diminution de l'expression de hTERT (figure) et de son activité. Ces cellules sont isolées chez une patiente atteinte d'une LMC en crise blastique (Lozzio and Lozzio, 1975). Dans cette phase, une surexpression de hTERT et de son activité a été observé dans les prélèvements de patients (10 à 50 fois) (Engelhardt *et al.*, 2000; Ohyashiki *et al.*, 1997). Ce résultats suggère une régulation positive de l'expression et de l'activité de la télomérase par le BCR-ABL dans ces cellules.

D'autre part, le maintien et l'élongation des télomères ne dépend pas uniquement de hTERT mais également de plusieurs protéines associées (TRF1, TRF2, Tin2, tankyrase, Rap1)(Riou *et al.*, 2005). Le traitement des cellules K562 à l'imatinib induit une surexpression de la protéine TRF2 dans ces cellules. Plusieurs études ont rapporté que la surespression de cette protéine dans les lignées ALT provoque une accéleration du raccourcissement du télomère.

Les protéines de réparation d'ADN (BLM, WRN, Topo IIIa....), interviennent également dans la régulation du télomère. Les hélicases BLM et WRN possèdent une fonction particulière qui consiste en la reconnaissance et la migration le long des jonctions de Holliday (Mohaghegh *et al.*, 2001). Des études récentes ont montré une surexpression de ces deux hélicases dans les cellules BCR-ABL-positives (Slupianek *et al.*, 2005); (Slupianek *et al.*, 2001). Le traitement des cellules K562 à l'imatinib induit une dimunition de l'expression de RAD51 et de BLM. Il induit également une diminution de l'expression de la Topo IIIa (figure). Ce qui suggère une régulation de l'expression de cette protéine par le BCR-ABL.

En parallèle aux études menées *in vitro*, nous avons initié une étude de l'expression des gènes (*hTERT, TRF2, BLM, RAD51, WRN et Topo IIIa*) dans des prélèvements de patients atteints de LMC et traités à l'imatinib. Les résultats préliminaires obtenus sur ces prélèvements (tableau 3), sont insuffisants pour estimer l'importance de ces gènes dans la
pathologie et l'effet du traitement à l'imatinib sur leurs expressions, vu le nombre très limité de patients (six patients).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La résistance multiple ou multidrug-resistance (MDR), intrinsèque ou acquise, est l'obstacle majeur dans le traitement des tumeurs solides et des leucémies. C'est un phénomène complexe qui fait appel à de multiples mécanismes cellulaires. Souvent, une surexpression des protéines de la famille ABC en particulier la Pgp, la MRP1 et la BCRP, est observée au niveau des cellules résistantes. Ces protéines sont responsables du transport actif des médicaments anticancéreux vers le milieu extracellulaire. L'étude de ce phénotype et l'identification des molécules qui sont concernées par ce transport sont deux domaines très importants dans la lutte contre le cancer. Dans ce cadre, nous avons étudié l'implication de la MRP1 et de la BCRP dans le transport et la résistance à deux inhibiteurs de la topoisomérase II, l'étoposide et la mitoxantrone respectivement.

De nombreux polymorphismes génétiques de la BCRP ont été rapportés. Ceux-ci sont susceptibles de modifier son activité. Ils pourraient ainsi constituer une source importante de variabilité de l'efficacité thérapeutique d'agents anticancéreux. Les résultats des tests de cytotoxicité et d'accumulation cellulaire de l'étoposide ont montré que cette molécule est bien transportée par la BCRP. En outre, l'étude de l'effet des deux mutations R482G et R482T sur la spécificité de l'étoposide à la BCRP, montre que la mutation R482G induit une augmentation de la résistance à l'étoposide et son efflux. Ceci suggère que la mutation R482G altère le transport des substrats de la BCRP.

En perspective, sur le plan clinique, il serait intéressant de séquencer le gène codant pour la BCRP dans des prélèvements de patients, particulièrement dans la région codante pour l'acide aminée 482, ce qui pourrait avoir une importance en clinique pour les tumeurs traitées à l'étoposide et les molécules dont le transport est altérée par cette mutation.

Sur le plan fondamental, nous avons sélectionné une lignée MCF7 en présence d'étoposide (800 nM), vérapamil (40 μ M) et LY402913 (1 μ M) pour inhiber la Pgp et la MRP1 respectivement. Il serait intéressant d'étudier l'accumulation cellulaire de l'étoposide

dans ces cellules, puis analyser ou vérifier l'expression des protéines ABC, en particulier la BCRP. Si ce modèle cellulaire présente une surexpression de cette protéine, nous allons la séquencer pour vérifier si elle présente des mutations. D'autre part, nous avons étudié le profil de cytotoxicité d'un dérivé de l'étoposide (F11782) dans les cellules HEK293 exprimant les différentes protéines BCRP (sauvage et mutée). Les données obtenues montrent une résistance croisée faible vis-à-vis de cette molécule comparée à l'étoposide, en particulier dans les cellules exprimant les deux formes de BCRP mutées. Nous envisageons d'étudier la corrélation de ces données avec l'incorporation cellulaire et l'efflux du ¹⁴C-F11782.

Afin de mettre en évidence le rôle de la MRP1 dans le transport et la résistance à la mitoxantrone, nous avons sélectionné une lignée cellulaire MCF7/MGG en présence de la mitoxantrone et du modulateur de la Pgp et la BCRP (GG918). L'analyse de l'expression des gènes MDR dans cette lignée montre une surexpression de la MRP1. Les résultats du test de cytotoxicité montrent que la transfection des cellules 2008 par le gène *MRP1*, leur confère une résistance à la mitoxantrone. Les cellules MCF7/MGG présentent également une résistance à la mitoxantrone. Les cellules MCF7/MGG présentent également une résistance à la mitoxantrone. Le co-traitement des cellules surexprimant de la MRP1 avec le LY402913 (inhibiteur de la MRP1), a eu comme conséquence une augmentation de la sensibilité de ces cellules à la mitoxantrone. L'étude de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone en utilisant les deux modulateurs de la MRP1 (BSO et LY402913), montre une augmentation de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone dans les cellules 2008/MRP1 et MCF7/MGG. En conclusion, comme les autres transporteurs de la mitoxantrone connus Pgp et BCRP, la MRP1 peut avoir aussi un impact significatif sur la sensibilité des cellules tumorales à la cytotoxicité de la mitoxantrone.

En perspective, la caractérisation du rôle du GSH dans le transport de la mitoxantrone par la MRP1 nécessitera, dans un premier temps, l'étude de l'effet de la mitoxantrone sur l'incorporation du GSH dans des vésicules inversées enrichies en MRP1. Par la suite, le taux intracellulaire basal de GSH sera mesuré dans les différentes lignées MCF7 sélectionnées en présence d'étoposide (MCF7/VP) ou de la mitoxantrone associée au GG918 (MCF7/MGG).. Finalement, il sera d'une très grande importance d'analyser l'effet de la BSO sur le taux de GSH et sa corrélation avec l'augmentation de la sensibilité à la mitoxantrone dans ces lignées comparées à la lignée parentale MCF7. L'étude de Benderra et al. a déjà montré que la diminution du taux de GSH suite à un traitement avec la BSO sensibilisait bien les cellules MCF7/VP à l'effet cytotoxique de la daunorubicine, sans affecter celui induit dans les cellules MCF7 (Benderra et al., 2000).

D'autre part, les protéines de la famille MRP, MRP2 en particulier, peuvent avoir aussi un impact significatif sur le transport et la résistance à la mitoxantrone. Il serait donc intéressant d'étudier leur rôle dans l'efflux et leur apport dans la résistance à cette molécule

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie chronique caractérisée par une prolifération clonale des cellules porteuses de la translocation t(9;22). L'introduction de l'imatinib dans le traitement de cette pathologie a considérablement amélioré le pourcentage de rémission complète. Cependant, récemment plusieurs études ont rapporté l'émergence d'une résistance à cette molécule.

En se basant sur les données de la littérature concernant l'implication de la BCRP dans la résistance à l'imatinib et la régulation de l'expression de certaines protéines par BCR-ABL, nous avons analysé l'effet de l'imatinib sur l'expression de la BCRP dans une lignée transfectée par le gène codant pour cette protéine (K562/BCRP). Le traitement de ces cellules avec l'imatinib induit une diminution de l'expression de la protéine BCRP sans affecter le niveau d'expression de son ARNm. L'analyse par la suite de la distribution cellulaire de la BCRP par microscopie de fluorescence nous a permis de montrer une diminution préférentielle de l'expression de la protéine de surface des cellules K562/BCRP. Les résultats obtenus par les mesures d'accumulation cellulaire de la mitoxantrone et du Hoechst33342, montrent qu'en présence de l'imatinib, on observe une augmentation de l'accumulation cellulaire de ces deux molécules. D'autre part, le traitement des cellules K562/BCRP avec l'inhibiteur de la PI3K (LY294002) induit les mêmes effets que l'imatinib. En effet, nos données ainsi que celles d'autres auteurs montrent que la phosphorylation d'Akt est bloquée par l'imatinib et le LY294002 sur la Ser473. L'analyse de l'effet de l'imatinib sur l'expression de la Pgp dans les cellules K562/DOX, ainsi que la BCRP dans les cellules HL60/DOX montre qu'il n'y a pas de diminution significative de l'expression de ces protéines, suggérant que la BCRP est régulée de façon spécifique dans les cellules « BCR-ABL ». L'ensemble de ces résultats suggère une modulation de l'expression de la BCRP par l'imatinib à un niveau post-transcriptionnel. En conclusion, le niveau élevé de rémission complète dans la leucémie myéloïde chronique traitée par l'imatinib et le fait que la surexpression de la BCRP induit une résistance relative à l'imatinib dans ces cellules pourrait être expliqué par le fait que le médicament réprime l'expression de cette protéine.

En perspective, il serait intéressant d'étudier comment la régulation négative de la voie PI3K/AKT, pourrait induire une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la BCRP. L'étape de la cascade de signalisation mTOR (P70S6K et 4EBP1) qui se trouve en aval par rapport à Akt pourrait retenir une attention particulière. La forme phosphorylée de P70S6K phosphoryle la protéine ribosomal S6 au niveau des serines 235/236 qui augmente à son tour la traduction. D'autre part, 4EBP1 phosphorylé permet la libération d'eIF4E (facteur d'initiation de la traduction) à partir de l'hétérodimère 4EBP1-eIF4E facilitant ainsi la traduction. La phosphorylation de mTOR, p70S6K et 4EBP1 pourrait être évaluée après traitement avec l'imatinib par rapport aux cellules témoins. Des expériences de coimmunoprécipitation permettraient de montrer la formation de l'hétérodimère 4EBP1-eIF4E après traitement avec l'imatinib. Il est important aussi de noter que l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans le développement de la résistance à l'imatinib (Buchert et al., 2005). La combinaison de l'imatinib avec les inhibiteurs de cette voie constituerait donc une nouvelle approche thérapeutique contre la LMC. De même le développement de nouveaux inhibiteurs du BCR-ABL associés aux inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR augmenterait l'espoir des patients présentant une résistance primaire ou acquise à l'imatinib seul.

D'autre part, la translocation t(9;22) est la seule anomalie cytogénétique détectable au cours de la phase chronique de la LMC. La progression vers les phases accélérée puis blastique s'accompagne d'anomalies génétiques additionnelles marqueurs d'une instabilité génomique croissante (duplication du chromosome Ph, trisomie 8 ou isochromosome 17 par exemple). Des altérations (délétions, réarrangements) de gènes suppresseurs de tumeur tels que p53 et p16 ont été mises également en évidence. De nombreux travaux, réalisés principalement chez des patients en phase blastique de LMC, ont montré l'activation fréquente d'oncogènes tels que *c-Myc* ainsi qu'une augmentation croissante de l'activité télomérase dans les cellules Ph⁺. Différentes études suggèrent fortement que la perte des séquences télomériques contribuerait à l'apparition des aberrations chromosomiques (ex : chromosomes dicentriques) et mutations. Ceci suggère que le raccourcissement des télomères dans la phase chronique de la LMC pourrait mener à l'instabilité génomique observée dans cette pathologie.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons tout d'abord étudié l'expression de plusieurs gènes (*hTERT, TRF2, TRF1, POT1, Topo IIIα, RAD51, BLM et WRN*), dans deux lignées cellulaires exprimant la tyrosine kinase BCR-ABL (HL60/BCR-ABL et K562). Les résultats obtenus montrent une surexpression de TRF2, RAD51, BLM et *Topo IIIα* dans les cellules HL60/BCR-ABL par rapport aux cellules HL60. Dans les mêmes cellules, on a observé une surexpression du gène *hTERT*. Le traitement des cellules K562 à l'imatinib induit

une diminution de l'expression de ces gènes à l'exception de *TRF2*. Ceci suggère une régulation de leur expression par le BCR-ABL.

La modification de l'expression de ces gènes est susceptible d'induire une instabilité liée soit à un raccourcissement des télomères observés lors des trois phases de la LMC, soit à l'altération des mécanismes de réparation d'ADN associés aux protéines codées par ces gènes. Nos résultats *in vitro* et ceux de la littérature, nous ont poussé à étudier l'expression de cinq de ces gènes (*hTERT, Topo IIIa, RAD51, BLM et WRN*) par PCR quantitative sur des prélèvements de patients. Les résultats préliminaires ne nous permettent pas d'estimer leur importance dans cette pathologie.

Sur le plan fondamental, et afin de pouvoir étudier la relation qui pourrait exister entre l'expression de la protéine BCR-ABL et celle de TRF2 ainsi que Topo III α , nous prévoyons d'étudier l'effet direct d'un siRNA dirigé contre *BCR-ABL* sur l'expression de TRF2 et Topo III α . D'autre part, les données obtenues par d'autres auteurs montrent que l'expression de RAD51 était régulée par BCR-ABL via STAT5 au niveau transciptionnel au même titre que BCL-X_L (Slupianek et al., 2001). Ces mêmes auteurs ont montré plus récemment, que contrairement à RAD51, la régulation de l'expression de BLM est contrôlée par BCR-ABL, mais pas par le biais de la voie STAT5. Ce résultat s'explique par le fait que la transfection des cellules D32 avec STAT5 muté, n'avait aucun effet sur l'expression de BLM (Slupianek et al., 2005). Ils ont aussi montré que BLM possède un site de clivage pour la caspase 3 et que BCR-ABL la protège contre l'action de cette caspase (régulation post-transcriptionnelle).

Au même titre que BLM et RAD51, il serait intéressant d'étudier les voies par lesquelles BCR-ABL est capable d'augmenter l'expression de la Topo III a et TRF2. L'augmentation de l'expression de TRF2 suite à un traitement des cellules K562 avec l'imatinib est en contradiction avec le résultat obtenu sur les cellules HL60/BCR-ABL. Cependant, l'augmentation de l'expression de TRF2 après un traitement avec des agents anticancéreux induisant des lésions de l'ADN a été décrite (Ning et al., 2006). Cette augmentation serait donc une réponse pour la protection du génome et particulièrement du télomère. Il serait donc intéressant d'étudier la relation entre les effets de l'imatinib sur les télomères de cellules exprimant BCR-ABL et l'expression de TRF2.

Nous prévoyons de pouvoir accéder à d'autres tumorothèques de LMC afin de valider dans un premier temps, l'étude sur le plan statistique en terme de corrélation entre l'expression de la télomérase ainsi que son activité et le statut « rémission » après traitement à l'imatinib. Dans un deuxième temps, nous comparerons chez des patients « résistants » le taux d'expression de la télomérase avec celui observé au diagnostic. L'expression de la Topo IIIα et TRF2 dans les prélèvements issus de patients pourrait servir aussi de marqueurs pour les stades de développement et d'évolution de cette pathologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIES

- Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. Cancer Res 1996; 56: 3087-90.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122: 497-506.
- Alahari SK, DeLong R, Fisher MH, Dean NM, Viliet P, Juliano RL. Novel chemically modified oligonucleotides provide potent inhibition of P-glycoprotein expression. J Pharmacol Exp Ther 1998; 286: 419-28.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. Embo J 1996; 15: 6541-51.
- Alimena G, De Cuia MR, Diverio D, Gastaldi R, Nanni M. The karyotype of blastic crisis. Cancer Genet Cytogenet 1987; 26: 39-50.
- Allen JD, Van Dort SC, Buitelaar M, van Tellingen O, Schinkel AH. Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. Cancer Res 2003; 63: 1339-44.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placentaspecific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. Cancer Res 1998; 58: 5337-9.
- Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. Science 1997; 277: 1805-7.
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. Cancer Res 1995; 55: 102-10.
- Anthoney DA, McIlwrath AJ, Gallagher WM, Edlin AR, Brown R. Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. Cancer Res 1996; 56: 1374-81.
- Arcamone F, Animati F, Berettoni M, Bigioni M, Capranico G, Casazza AM, et al. Doxorubicin disaccharide analogue: apoptosis-related improvement of efficacy in vivo. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 1217-23.
- Arimondo PB, Riou JF, Mergny JL, Tazi J, Sun JS, Garestier T, et al. Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures. Nucleic Acids Res 2000; 28: 4832-8.
- Arrick BA, Griffith OW, Cerami A. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. J Exp Med 1981; 153: 720-5.
- Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, Ross DD. Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. Biochim Biophys Acta 2001; 1520: 234-41.
- Bakos E, Hegedus T, Hollo Z, Welker E, Tusnady GE, Zaman GJ, et al. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. J Biol Chem 1996; 271: 12322-6.
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. Curr Biol 1998; 8: 177-80.
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. Mol Cell Biol 2001; 21: 6151-60.
- Belani CP, Doyle LA, Aisner J. Etoposide: current status and future perspectives in the management of malignant neoplasms. Cancer Chemother Pharmacol 1994; 34 Suppl: S118-26.
- Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Chaoui D, Marie JP, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. Clin Cancer Res 2004; 10: 7896-902.

- Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Tang R, Chaoui D, et al. MRP3, BCRP, and Pglycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2005; 11: 7764-72.
- Bhalla K, Hindenburg A, Taub RN, Grant S. Isolation and characterization of an anthracycline-resistant human leukemic cell line. Cancer Res 1985; 45: 3657-62.
- Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. Cancer Res 1970; 30: 1174-84.
- Binaschi M, Supino R, Gambetta RA, Giaccone G, Prosperi E, Capranico G, et al. MRP gene overexpression in a human doxorubicin-resistant SCLC cell line: alterations in cellular pharmacokinetics and in pattern of cross-resistance. Int J Cancer 1995; 62: 84-9.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. Science 1998; 279: 349-52.
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. Nat Genet 1999; 22: 347-51.
- Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loor F. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. Cancer Res 1991; 51: 4226-33.
- Borowski E, Bontemps-Gracz MM, Piwkowska A. Strategies for overcoming ABCtransporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. Acta Biochim Pol 2005; 52: 609-27.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 1295-302.
- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. Blood 2003; 102: 276-83.
- Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G, Takimoto C, et al. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance halftransporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. Cancer Res 1999; 59: 5938-46.
- Brechot JM, Hurbain I, Fajac A, Daty N, Bernaudin JF. Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium. J Histochem Cytochem 1998; 46: 513-7.
- Breuninger LM, Paul S, Gaughan K, Miki T, Chan A, Aaronson SA, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. Cancer Res 1995; 55: 5342-7.
- Brigui I, Djavanbakht-Samani T, Jolles B, Pigaglio S, Laigle A. Minimally modified phosphodiester antisense oligodeoxyribonucleotide directed against the multidrug resistance gene mdr1. Biochem Pharmacol 2003; 65: 747-54.
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet 1999; 22: 336-45.
- Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. Cancer Res 1998; 58: 1408-16.
- Brummendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, et al. Prognostic implications of differences in telomere length between normal and

malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. Blood 2000; 95: 1883-90.

- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. Cancer Res 1996; 56: 100-4.
- Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. Blood 2004; 104: 2940-2.
- Burger H, van Tol H, Brok M, Wiemer EA, de Bruijn EA, Guetens G, et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. Cancer Biol Ther 2005; 4: 747-52.
- Buschman E, Arceci RJ, Croop JM, Che M, Arias IM, Housman DE, et al. mdr2 encodes Pglycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoformspecific antibodies. J Biol Chem 1992; 267: 18093-9.
- Buschman E, Gros P. The inability of the mouse mdr2 gene to confer multidrug resistance is linked to reduced drug binding to the protein. Cancer Res 1994; 54: 4892-8.
- Campbell LJ, Fidler C, Eagleton H, Peniket A, Kusec R, Gal S, et al. hTERT, the catalytic component of telomerase, is downregulated in the haematopoietic stem cells of patients with chronic myeloid leukaemia. Leukemia 2006; 20: 671-9.
- Carlsen SA, Till JE, Ling V. Modulation of membrane drug permeability in Chinese hamster ovary cells. Biochim Biophys Acta 1976; 455: 900-12.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987; 47: 936-42.
- Casagrande F, Bacqueville D, Pillaire MJ, Malecaze F, Manenti S, Breton-Douillon M, et al. G1 phase arrest by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY 294002 is correlated to up-regulation of p27Kip1 and inhibition of G1 CDKs in choroidal melanoma cells. FEBS Lett 1998; 422: 385-90.
- Chabner BA, Wilson W. Reversal of multidrug resistance. J Clin Oncol 1991; 9: 4-6.
- Chauffert B, Correia M, Sergent C. [Update on mechanisms of drug resistance]. Bull Cancer 1999; 86: 97-103.
- Chauvier D, Kegelaer G, Morjani H, Manfait M. Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated daunorubicin resistance by camptothecin. J Pharm Sci 2002; 91: 1765-75.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell 1986; 47: 381-9.
- Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. J Biol Chem 1990a; 265: 506-14.
- Chen YN, Mickley LA, Schwartz AM, Acton EM, Hwang JL, Fojo AT. Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. J Biol Chem 1990b; 265: 10073-80.
- Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, et al. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. Cancer Res 2002; 62: 3144-50.
- Chen ZS, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren XQ, Sugimoto Y, et al. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-

glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. Cancer Res 2003; 63: 4048-54.

- Choi KH, Chen CJ, Kriegler M, Roninson IB. An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the mdr1 (P-glycoprotein) gene. Cell 1988; 53: 519-29.
- Christodoulopoulos G, Malapetsa A, Schipper H, Golub E, Radding C, Panasci LC. Chlorambucil induction of HsRad51 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res 1999; 5: 2178-84.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 1992; 258: 1650-4.
- Cole SP, Chanda ER, Dicke FP, Gerlach JH, Mirski SE. Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in a small cell lung cancer cell line: evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. Cancer Res 1991; 51: 3345-52.
- Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, et al. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. Cancer Res 1994; 54: 5902-10.
- Collis SJ, Tighe A, Scott SD, Roberts SA, Hendry JH, Margison GP. Ribozyme minigenemediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells. Nucleic Acids Res 2001; 29: 1534-8.
- Consoli U, Van NT, Neamati N, Mahadevia R, Beran M, Zhao S, et al. Cellular pharmacology of mitoxantrone in p-glycoprotein-positive and -negative human myeloid leukemic cell lines. Leukemia 1997; 11: 2066-74.
- Corbin AS, La Rosee P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. Blood 2003; 101: 4611-4.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at bloodbrain barrier sites. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86: 695-8.
- Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. Science 2004; 306: 1951-3.
- Crespi MD, Ivanier SE, Genovese J, Baldi A. Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 1986; 136: 521-8.
- Crul M, Schellens JH, Beijnen JH, Maliepaard M. Cisplatin resistance and DNA repair. Cancer Treat Rev 1997; 23: 341-66.
- Currier SJ, Kane SE, Willingham MC, Cardarelli CO, Pastan I, Gottesman MM. Identification of residues in the first cytoplasmic loop of P-glycoprotein involved in the function of chimeric human MDR1-MDR2 transporters. J Biol Chem 1992; 267: 25153-9.
- Dallas S, Schlichter L, Bendayan R. Multidrug resistance protein (MRP) 4- and MRP 5mediated efflux of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine by microglia. J Pharmacol Exp Ther 2004; 309: 1221-9.
- Dalton WS. Is p-glycoprotein a potential target for reversing clinical drug resistance? Curr Opin Oncol 1994; 6: 595-600.
- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. Biochim Biophys Acta 1973; 323: 466-83.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 1999; 13: 2905-27.
- de Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. Cancer Lett 1999; 146: 117-26.

- de Jong FA, Marsh S, Mathijssen RH, King C, Verweij J, Sparreboom A, et al. ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition. Clin Cancer Res 2004; 10: 5889-94.
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev 2005; 19: 2100-10.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. J Lipid Res 2001; 42: 1007-17.
- Dekkers DW, Comfurius P, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF. Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Biochemistry 1998; 37: 14833-7.
- 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.
- Diah SK, Smitherman PK, Aldridge J, Volk EL, Schneider E, Townsend AJ, et al. Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins. Cancer Res 2001; 61: 5461-7.
- Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, et al. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. J Pathol 2002; 198: 213-9.
- DiPaola RS, Chenven ES, Shih WJ, Lin Y, Amenta P, Goodin S, et al. Mitoxantrone in patients with prostate specific antigen progression after local therapy for prostate carcinoma. Cancer 2001; 92: 2065-71.
- Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. Blood 2003; 101: 690-8.
- Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). Oncogene 2003; 22: 7340-58.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 15665-70.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 1996; 2: 561-6.
- Drummond MW, Hoare SF, Monaghan A, Graham SM, Alcorn MJ, Keith WN, et al. Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells. Leukemia 2005; 19: 381-9.
- Du X, Shen J, Kugan N, Furth EE, Lombard DB, Cheung C, et al. Telomere shortening exposes functions for the mouse Werner and Bloom syndrome genes. Mol Cell Biol 2004; 24: 8437-46.
- Ee PL, He X, Ross DD, Beck WT. Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference. Mol Cancer Ther 2004a; 3: 1577-83.
- Ee PL, Kamalakaran S, Tonetti D, He X, Ross DD, Beck WT. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. Cancer Res 2004b; 64: 1247-51.
- Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu Rev Biochem 1989; 58: 137-71.

- Engelhardt M, Mackenzie K, Drullinsky P, Silver RT, Moore MA. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. Cancer Res 2000; 60: 610-7.
- Errington F, Willmore E, Tilby MJ, Li L, Li G, Li W, et al. Murine transgenic cells lacking DNA topoisomerase IIbeta are resistant to acridines and mitoxantrone: analysis of cytotoxicity and cleavable complex formation. Mol Pharmacol 1999; 56: 1309-16.
- Etienne G, Mahon FX. [Leukemogenesis and new therapy development: the example of chronic myelogenous leukemia]. Bull Cancer 2001; 88: 651-8.
- Evers R, Cnubben NH, Wijnholds J, van Deemter L, van Bladeren PJ, Borst P. Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. FEBS Lett 1997; 419: 112-6.
- Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J, et al. Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. Br J Cancer 2000; 83: 375-83.
- Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006; 290: R1357-65.
- Fairchild CR, Ivy SP, Kao-Shan CS, Whang-Peng J, Rosen N, Israel MA, et al. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. Cancer Res 1987; 47: 5141-8.
- Ferrao PT, Frost MJ, Siah SP, Ashman LK. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. Blood 2003; 102: 4499-503.
- Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. Eur J Biochem 2000; 267: 277-94.
- Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. Clin Cancer Res 1998; 4: 1-6.
- Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL, Fritz JM, Meijer CJ, Scheper RJ, et al. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. Cancer Res 1994; 54: 4557-63.
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol 1996; 148: 1237-47.
- Fry M, Loeb LA. Human werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)n. J Biol Chem 1999; 274: 12797-802.
- Garbesi A, Bonazzi S, Zanella S, Capobianco ML, Giannini G, Arcamone F. Synthesis and binding properties of conjugates between oligodeoxynucleotides and daunorubicin derivatives. Nucleic Acids Res 1997; 25: 2121-8.
- Gerson SL, Berger SJ, Varnes ME, Donovan C. Combined depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and glutathione to modulate nitrosourea resistance in breast cancer. Biochem Pharmacol 1994; 48: 543-8.
- Gervasoni JE, Jr., Fields SZ, Krishna S, Baker MA, Rosado M, Thuraisamy K, et al. Subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-positive and -negative drug-resistant cell lines using laser-assisted confocal microscopy. Cancer Res 1991; 51: 4955-63.
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. J Natl Cancer Inst 1989; 81: 116-24.

- Gong Y, Wang Y, Chen F. [Subcellular distribution of daunorubicin in the P-glycoproteinmediated multidrug-resistant cell line K562/ADR]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2001; 23: 184-6.
- Gormley NA, Orphanides G, Meyer A, Cullis PM, Maxwell A. The interaction of coumarin antibiotics with fragments of DNA gyrase B protein. Biochemistry 1996; 35: 5083-92.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 2001; 293: 876-80.
- Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. Annu Rev Med 2002; 53: 615-27.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annu Rev Biochem 1993; 62: 385-427.
- Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. Cancer Res 1994; 54: 357-61.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 1985; 43: 405-13.
- Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. Nature 1986; 323: 728-31.
- Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Harousseau JL, Maloisel F, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. N Engl J Med 1997; 337: 223-9.
- Han H, Bennett RJ, Hurley LH. Inhibition of unwinding of G-quadruplex structures by Sgs1 helicase in the presence of N,N'-bis[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10perylenetetracarboxylic diimide, a G-quadruplex-interactive ligand. Biochemistry 2000; 39: 9311-6.
- Hande KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. Biochim Biophys Acta 1998a; 1400: 173-84.
- Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. Eur J Cancer 1998b; 34: 1514-21.
- Hande KR. Topoisomerase II inhibitors. Cancer Chemother Biol Response Modif 2003; 21: 103-25.
- Harapanhalli RS, Howell RW, Rao DV. Bis-benzimidazole dyes, Hoechst 33258 and Hoechst 33342: radioiodination, facile purification and subcellular distribution. Nucl Med Biol 1994; 21: 641-7.
- Harmon FG, Kowalczykowski SC. RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. Genes Dev 1998; 12: 1134-44.
- Hartmann U, Balabanov S, Ziegler P, Fellenberg J, van der Kuip H, Duyster J, et al. Telomere length and telomerase activity in the BCR-ABL-transformed murine Pro-B cell line BaF3 is unaffected by treatment with imatinib. Exp Hematol 2005; 33: 542-9.
- Hazlehurst LA, Foley NE, Gleason-Guzman MC, Hacker MP, Cress AE, Greenberger LW, et al. Multiple mechanisms confer drug resistance to mitoxantrone in the human 8226 myeloma cell line. Cancer Res 1999; 59: 1021-8.
- Hickson ID. RecQ helicases: caretakers of the genome. Nat Rev Cancer 2003; 3: 169-78.
- Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, et al. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. Clin Cancer Res 2000; 6: 2401-7.
- Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG, et al. Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH2 terminus. J Biol Chem 1997; 272: 23623-30.

- Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia 2002; 16: 2190-6.
- Hochhaus A, Lahaye T, Kreil S, Berger U, Metzgeroth G, Hehlmann R. [Selective inhibition of tyrosine kinases a new therapeutic principle in oncology]. Onkologie 2001; 24 Suppl 5: 65-71.
- Honda H, Ushijima T, Wakazono K, Oda H, Tanaka Y, Aizawa S, et al. Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. Blood 2000; 95: 1144-50.
- Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Perez WY, Robey RW, van de Laar A, et al. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. Cancer Res 2001; 61: 6635-9.
- Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E, et al. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. Cancer Res 2004; 64: 2333-7.
- Igarashi H, Sakaguchi N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. Blood 1997; 89: 1299-307.
- Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kitamura Y, Kondo K, et al. Catalog of 605 singlenucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. J Hum Genet 2002; 47: 285-310.
- Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, et al. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. Mol Cancer Ther 2002; 1: 611-6.
- Imai Y, Tsukahara S, Asada S, Sugimoto Y. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. Cancer Res 2004; 64: 4346-52.
- Imbert TF. Discovery of podophyllotoxins. Biochimie 1998; 80: 207-22.
- Inaba M, Kobayashi H, Sakurai Y, Johnson RK. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. Cancer Res 1979; 39: 2200-3.
- Ishii M, Iwahana M, Mitsui I, Minami M, Imagawa S, Tohgo A, et al. Growth inhibitory effect of a new camptothecin analog, DX-8951f, on various drug-resistant sublines including BCRP-mediated camptothecin derivative-resistant variants derived from the human lung cancer cell line PC-6. Anticancer Drugs 2000; 11: 353-62.
- Ishikawa T, Akimaru K, Nakanishi M, Tomokiyo K, Furuta K, Suzuki M, et al. Anti-cancerprostaglandin-induced cell-cycle arrest and its modulation by an inhibitor of the ATPdependent glutathione S-conjugate export pump (GS-X pump). Biochem J 1998; 336 (Pt 3): 569-76.
- Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, et al. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. J Biol Chem 1996; 271: 14981-8.
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Shoemaker RH, Rome LH, Scheper RJ. Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. Cytotechnology 1996; 19: 191-7.
- Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. Sci Am 1994; 271: 58-65.
- Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW. Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). Biochem J 2005; 385: 419-26.

- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. Cancer Res 1994; 54: 4833-6.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. ATPdependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. Biochem J 1997; 327 (Pt 1): 305-10.
- Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc Natl Acad Sci U S A 1980; 77: 990-4.
- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 1976; 455: 152-62.
- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. J Biol Chem 1999; 274: 13085-90.
- Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. Am J Med 1987; 83: 445-54.
- Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Smith TL, Giles FJ, Faderl S, et al. Imatinib mesylate for Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. Clin Cancer Res 2002; 8: 2177-87.
- Kawabata S, Oka M, Shiozawa K, Tsukamoto K, Nakatomi K, Soda H, et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 280: 1216-23.
- Kawauchi K, Ogasawara T, Yasuyama M, Ohkawa S. Involvement of Akt kinase in the action of STI571 on chronic myelogenous leukemia cells. Blood Cells Mol Dis 2003; 31: 11-7.
- Kelman Z, Prokocimer M, Peller S, Kahn Y, Rechavi G, Manor Y, et al. Rearrangements in the p53 gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. Blood 1989; 74: 2318-24.
- Kessel D, Wilberding C. Anthracycline resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonists. Cancer Res 1985; 45: 1687-91.
- Khakhar RR, Cobb JA, Bjergbaek L, Hickson ID, Gasser SM. RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance. Trends Cell Biol 2003; 13: 493-501.
- Kharbanda S, Kumar V, Dhar S, Pandey P, Chen C, Majumder P, et al. Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. Curr Biol 2000; 10: 568-75.
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. Cancer 2004; 101: 2491-502.
- Kioka N, Tsubota J, Kakehi Y, Komano T, Gottesman MM, Pastan I, et al. P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. Biochem Biophys Res Commun 1989; 162: 224-31.
- Knutsen T, Rao VK, Ried T, Mickley L, Schneider E, Miyake K, et al. Amplification of 4q21q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. Genes Chromosomes Cancer 2000; 27: 110-6.
- Koehn H, Magan N, Isaacs RJ, Stowell KM. Differential regulation of DNA repair protein Rad51 in human tumour cell lines exposed to doxorubicin. Anticancer Drugs 2007; 18: 419-25.

- Koike K, Kawabe T, Tanaka T, Toh S, Uchiumi T, Wada M, et al. A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. Cancer Res 1997; 57: 5475-9.
- Komatani H, Kotani H, Hara Y, Nakagawa R, Matsumoto M, Arakawa H, et al. Identification of breast cancer resistant protein/mitoxantrone resistance/placenta-specific, ATPbinding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure. Cancer Res 2001; 61: 2827-32.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. Cancer Res 1997; 57: 3537-47.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. Cancer Res 1999a; 59: 175-82.
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. Proc Natl Acad Sci U S A 1999b; 96: 6914-9.
- Kostrzewa-Nowak D, Paine MJ, Wolf CR, Tarasiuk J. The role of bioreductive activation of doxorubicin in cytotoxic activity against leukaemia HL60-sensitive cell line and its multidrug-resistant sublines. Br J Cancer 2005; 93: 89-97.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. J Biol Chem 2004; 279: 24218-25.
- Krishnamurthy P, Schuetz JD. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2006; 46: 381-410.
- Kroger N, Damon L, Zander AR, Wandt H, Derigs G, Ferrante P, et al. Secondary acute leukemia following mitoxantrone-based high-dose chemotherapy for primary breast cancer patients. Bone Marrow Transplant 2003; 32: 1153-7.
- Krupp G, Kuhne K, Tamm S, Klapper W, Heidorn K, Rott A, et al. Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay. Nucleic Acids Res 1997; 25: 919-21.
- Krystal GW. Mechanisms of resistance to imatinib (STI571) and prospects for combination with conventional chemotherapeutic agents. Drug Resist Updat 2001; 4: 16-21.
- Kuwano M, Toh S, Uchiumi T, Takano H, Kohno K, Wada M. Multidrug resistanceassociated protein subfamily transporters and drug resistance. Anticancer Drug Des 1999; 14: 123-31.
- Laneuville P, Sun G, Timm M, Vekemans M. Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl. Blood 1992; 80: 1788-97.
- Langland G, Elliott J, Li Y, Creaney J, Dixon K, Groden J. The BLM helicase is necessary for normal DNA double-strand break repair. Cancer Res 2002; 62: 2766-70.
- Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. Reprod Toxicol 1998; 12: 457-63.
- Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. Science 2000; 288: 665-9.
- Lavie Y, Fiucci G, Czarny M, Liscovitch M. Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells. Lipids 1999; 34 Suppl: S57-63.

- Lee JS, Scala S, Matsumoto Y, Dickstein B, Robey R, Zhan Z, et al. Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression. J Cell Biochem 1997; 65: 513-26.
- Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD. Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 1934-40.
- Legrand O, Simonin G, Beauchamp-Nicoud A, Zittoun R, Marie JP. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. Blood 1999a; 94: 1046-56.
- Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Both Pgp and MRP1 activities using calcein-AM contribute to drug resistance in AML. Adv Exp Med Biol 1999b; 457: 161-75.
- Legrand O, Zittoun R, Marie JP. Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia. Leukemia 1999c; 13: 578-84.
- Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. Eur J Cancer 1996; 32A: 912-20.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. J Biol Chem 1994; 269: 27807-10.
- Leslie EM, Ito K, Upadhyaya P, Hecht SS, Deeley RG, Cole SP. Transport of the beta -Oglucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog. J Biol Chem 2001; 276: 27846-54.
- Lillard-Wetherell K, Machwe A, Langland GT, Combs KA, Behbehani GK, Schonberg SA, et al. Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. Hum Mol Genet 2004; 13: 1919-32.
- Linton KJ, Higgins CF. The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. Mol Microbiol 1998; 28: 5-13.
- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, et al. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). J Cell Sci 2000; 113 (Pt 11): 2011-21.
- Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. Cell Mol Life Sci 2001; 58: 931-59.
- Liu K, Hodes RJ, Weng N. Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. J Immunol 2001; 166: 4826-30.
- Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 5147-52.
- Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. Eur J Cancer 1996; 32A: 945-57.
- Loo TW, Clarke DM. Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human Pglycoprotein with calnexin during biogenesis. J Biol Chem 1994; 269: 28683-9.
- Loo TW, Clarke DM. The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy. Faseb J 1999; 13: 1724-32.

- Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA, Sartorelli AC. Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. Cancer Res 1997; 57: 5238-42.
- Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood 1975; 45: 321-34.
- Luzzatto L, Melo JV. Acquired resistance to imatinib mesylate: selection for pre-existing mutant cells. Blood 2002; 100: 1105.
- Ma L, Krishnamachary N, Center MS. Phosphorylation of the multidrug resistance associated protein gene encoded protein P190. Biochemistry 1995; 34: 3338-43.
- Ma L, Pratt SE, Cao J, Dantzig AH, Moore RE, Slapak CA. Identification and characterization of the canine multidrug resistance-associated protein. Mol Cancer Ther 2002; 1: 1335-42.
- Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. Blood 2003; 101: 2368-73.
- Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. Blood 2000; 96: 1070-9.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. Cancer Res 2001; 61: 3458-64.
- Marquardt D, Center MS. Drug transport mechanisms in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin: evidence for nuclear drug accumulation and redistribution in resistant cells. Cancer Res 1992; 52: 3157-63.
- Marquardt D, McCrone S, Center MS. Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: detection of resistance-associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to the deduced sequence of P-glycoprotein. Cancer Res 1990; 50: 1426-30.
- Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. Cell 2003; 114: 241-53.
- McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. J Biol Chem 1999; 274: 23541-8.
- Meresse P, Dechaux E, Monneret C, Bertounesque E. Etoposide: discovery and medicinal chemistry. Curr Med Chem 2004; 11: 2443-66.
- Minderman H, Suvannasankha A, O'Loughlin KL, Scheffer GL, Scheper RJ, Robey RW, et al. Flow cytometric analysis of breast cancer resistance protein expression and function. Cytometry 2002; 48: 59-65.
- Mirski SE, Cole SP. Multidrug resistance-associated antigens on drug-sensitive and -resistant human tumour cell lines. Br J Cancer 1991; 64: 15-22.
- Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. Cancer Res 1999; 59: 8-13.
- Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. Int J Cancer 2004; 109: 238-46.

- Mogi M, Yang J, Lambert JF, Colvin GA, Shiojima I, Skurk C, et al. Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. J Biol Chem 2003; 278: 39068-75.
- Mohaghegh P, Karow JK, Brosh Jr RM, Jr., Bohr VA, Hickson ID. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. Nucleic Acids Res 2001; 29: 2843-9.
- Morassutti C, Scaggiante B, Xodo LE, Dapas B, Paroni G, Tolazzi G, et al. Reduction of mdr1 gene amplification in human multidrug-resistant LoVo DX cell line is promoted by triple helix-forming oligonucleotides. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 1999; 9: 261-70.
- Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell 1989; 59: 521-9.
- Morrow CS, Peklak-Scott C, Bishwokarma B, Kute TE, Smitherman PK, Townsend AJ. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. Mol Pharmacol 2006; 69: 1499-505.
- Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: current status and controversies. Oncology (Williston Park) 2004; 18: 837-44, 847; discussion 847-50, 853-4.
- Muller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, et al. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 13033-7.
- Nakagawa M, Schneider E, Dixon KH, Horton J, Kelley K, Morrow C, et al. Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res 1992; 52: 6175-81.
- Nies AT, Konig J, Pfannschmidt M, Klar E, Hofmann WJ, Keppler D. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2001; 94: 492-9.
- Nikitina T, Woodcock CL. Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. J Cell Biol 2004; 166: 161-5.
- Nishiyama M, Horichi N, Mazouzi Z, Bungo M, Saijo N, Tapiero H. Can cytotoxic activity of anthracyclines be related to DNA damage? Anticancer Drug Des 1990; 5: 135-9.
- Ohnishi T, Taki T, Hiraga S, Arita N, Morita T. In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. Biochem Biophys Res Commun 1998; 245: 319-24.
- Ohyashiki K, Iwama H, Tauchi T, Shimamoto T, Hayashi S, Ando K, et al. Telomere dynamics and genetic instability in disease progression of chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2000; 40: 49-56.
- Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. Leukemia 1997; 11: 190-4.
- Opresko PL, Cheng WH, Bohr VA. Junction of RecQ helicase biochemistry and human disease. J Biol Chem 2004a; 279: 18099-102.
- Opresko PL, Otterlei M, Graakjaer J, Bruheim P, Dawut L, Kolvraa S, et al. The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. Mol Cell 2004b; 14: 763-74.
- Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. J Biol Chem 2002; 277: 41110-9.

- Ozvegy C, Litman T, Szakacs G, Nagy Z, Bates S, Varadi A, et al. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 285: 111-7.
- Paul S, Breuninger LM, Tew KD, Shen H, Kruh GD. ATP-dependent uptake of natural product cytotoxic drugs by membrane vesicles establishes MRP as a broad specificity transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 6929-34.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, et al. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. Science 1996; 271: 1126-8.
- Pauly M, Kayser I, Schmitz M, Ries F, Hentges F, Dicato M. The human mdr1 (multidrugresistance) gene harbours a long homopyrimidine.homopurine sequence next to a cluster of Alu repeated sequences in intron 14. Gene 1995; 153: 299-300.
- Peklak-Scott C, Townsend AJ, Morrow CS. Dynamics of glutathione conjugation and conjugate efflux in detoxification of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide: contributions of glutathione, glutathione S-transferase, and MRP1. Biochemistry 2005; 44: 4426-33.
- Peng KC, Cluzeaud F, Bens M, Van Huyen JP, Wioland MA, Lacave R, et al. Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. J Histochem Cytochem 1999; 47: 757-68.
- Pommier RF, Vetto JT, Lee JT, Johnston KM. Synchronous non-small cell lung cancers. Am J Surg 1996; 171: 521-4.
- Priebsch A, Rompe F, Tonnies H, Kowalski P, Surowiak P, Stege A, et al. Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. Oligonucleotides 2006; 16: 263-74.
- Ptasznik A, Urbanowska E, Chinta S, Costa MA, Katz BA, Stanislaus MA, et al. Crosstalk between BCR/ABL oncoprotein and CXCR4 signaling through a Src family kinase in human leukemia cells. J Exp Med 2002; 196: 667-78.
- Qian YM, Song WC, Cui H, Cole SP, Deeley RG. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. J Biol Chem 2001; 276: 6404-11.
- Quattrone A, Papucci L, Morganti M, Coronnello M, Mini E, Mazzei T, et al. Inhibition of MDR1 gene expression by antimessenger oligonucleotides lowers multiple drug resistance. Oncol Res 1994; 6: 311-20.
- Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, et al. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. Cancer Res 1998; 58: 5850-8.
- Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. Cancer Res 2000; 60: 47-50.
- Raggers RJ, van Helvoort A, Evers R, van Meer G. The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. J Cell Sci 1999; 112 (Pt 3): 415-22.
- Ramu A, Glaubiger D, Fuks Z. Reversal of acquired resistance to doxorubicin in P388 murine leukemia cells by tamoxifen and other triparanol analogues. Cancer Res 1984; 44: 4392-5.
- Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. Nat Rev Cancer 2005; 5: 172-83.
- Riehm H, Biedler JL. Cellular resistance to daunomycin in Chinese hamster cells in vitro. Cancer Res 1971; 31: 409-12.

- Ringpfeil F, Lebwohl MG, Christiano AM, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 6001-6.
- Riordan JR, Ling V. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. Pharmacol Ther 1985; 28: 51-75.
- Riou JF, Gomez D, Mergny JL, Guittat L, Paterski R, Chenais B, et al. [Regulation of telomeres length: making the telomeres accessible?]. Bull Cancer 2005; 92: 13-22.
- Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood M, et al. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. Br J Cancer 2003; 89: 1971-8.
- Robey RW, Medina-Perez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, et al. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. Clin Cancer Res 2001; 7: 145-52.
- Rocchi E, Khodjakov A, Volk EL, Yang CH, Litman T, Bates SE, et al. The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun 2000; 271: 42-6.
- Roche-Lestienne C, Mahon FX, Preudhomme C. [Origin of resistance to Imatinib mesylate: lessons learned from this experience]. Med Sci (Paris) 2004; 20: 1125-30.
- Roninson IB. Molecular mechanism of multidrug resistance in tumor cells. Clin Physiol Biochem 1987; 5: 140-51.
- Rooney M, Kish J, Jacobs J, Kinzie J, Weaver A, Crissman J, et al. Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin. Cancer 1985; 55: 1123-8.
- Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 429-33.
- Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 10700-5.
- Rowley JD. Identification of the constant chromosome regions involved in human hematologic malignant disease. Science 1982; 216: 749-51.
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. Nat Genet 1999; 22: 352-5.
- Salloukh HF, Laneuville P. Increase in mutant frequencies in mice expressing the BCR-ABL activated tyrosine kinase. Leukemia 2000; 14: 1401-4.
- Saso R, Kulkarni S, Mitchell P, Treleaven J, Swansbury GJ, Mehta J, et al. Secondary myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia following mitoxantrone-based therapy for breast carcinoma. Br J Cancer 2000; 83: 91-4.
- Sattler M, Verma S, Shrikhande G, Byrne CH, Pride YB, Winkler T, et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. J Biol Chem 2000; 275: 24273-8.
- Scaggiante B, Morassutti C, Tolazzi G, Michelutti A, Baccarani M, Quadrifoglio F. Effect of unmodified triple helix-forming oligodeoxyribonucleotide targeted to human multidrug-resistance gene mdr1 in MDR cancer cells. FEBS Lett 1994; 352: 380-4.

- Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, et al. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 1159-69.
- Scheffer GL, Kool M, Heijn M, de Haas M, Pijnenborg AC, Wijnholds J, et al. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. Cancer Res 2000a; 60: 5269-77.
- Scheffer GL, Maliepaard M, Pijnenborg AC, van Gastelen MA, de Jong MC, Schroeijers AB, et al. Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. Cancer Res 2000b; 60: 2589-93.
- Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. Nat Med 1995; 1: 578-82.
- Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, et al. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Cancer Res 1993; 53: 1475-9.
- Schimke RT. Gene amplification in cultured animal cells. Cell 1984; 37: 705-13.
- Schinkel AH, Roelofs EM, Borst P. Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. Cancer Res 1991; 51: 2628-35.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the bloodbrain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell 1994; 77: 491-502.
- Schneider E, Horton JK, Yang CH, Nakagawa M, Cowan KH. Multidrug resistanceassociated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. Cancer Res 1994; 54: 152-8.
- Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, et al. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. Nat Med 1999; 5: 1048-51.
- See YP, Carlsen SA, Till JE, Ling V. Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide. Biochim Biophys Acta 1974; 373: 242-52.
- Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M, Yamakawa M. The in vitro and in vivo effects of 2-(4morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. Clin Cancer Res 2002; 8: 1957-63.
- Shafran A, Ifergan I, Bram E, Jansen G, Kathmann I, Peters GJ, et al. ABCG2 harboring the Gly482 mutation confers high-level resistance to various hydrophilic antifolates. Cancer Res 2005; 65: 8414-22.
- Shapiro AB, Ling V. The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein. Acta Physiol Scand Suppl 1998; 643: 227-34.
- Shiozawa K, Oka M, Soda H, Yoshikawa M, Ikegami Y, Tsurutani J, et al. Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. Int J Cancer 2004; 108: 146-51.
- Skovsgaard T. Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res 1978; 38: 1785-91.
- Slapak CA, Mizunuma N, Kufe DW. Expression of the multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein in doxorubicin-selected human myeloid leukemia cells. Blood 1994; 84: 3113-21.

- Slupianek A, Gurdek E, Koptyra M, Nowicki MO, Siddiqui KM, Groden J, et al. BLM helicase is activated in BCR/ABL leukemia cells to modulate responses to cisplatin. Oncogene 2005; 24: 3914-22.
- Slupianek A, Schmutte C, Tombline G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, et al. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. Mol Cell 2001; 8: 795-806.
- Smith CA, Smith G, Wolf CR. Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism. Eur J Cancer 1994; 30A: 1921-35.
- Sparreboom A, Gelderblom H, Marsh S, Ahluwalia R, Obach R, Principe P, et al. Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. Clin Pharmacol Ther 2004; 76: 38-44.
- Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. Embo J 2001; 20: 5532-40.
- Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Int J Biochem Cell Biol 2005; 37: 720-5.
- Stavropoulos DJ, Bradshaw PS, Li X, Pasic I, Truong K, Ikura M, et al. The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. Hum Mol Genet 2002; 11: 3135-44.
- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia 2004; 18: 189-218.
- Stierle V, Laigle A, Jolles B. The reduction of P-glycoprotein expression by small interfering RNAs is improved in exponentially growing cells. Oligonucleotides 2004; 14: 191-8.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000; 279: R1495-503.
- Sun H, Johnson DR, Finch RA, Sartorelli AC, Miller DW, Elmquist WF. Transport of fluorescein in MDCKII-MRP1 transfected cells and mrp1-knockout mice. Biochem Biophys Res Commun 2001; 284: 863-9.
- Sung P. Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. J Biol Chem 1997a; 272: 28194-7.
- Sung P. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. Genes Dev 1997b; 11: 1111-21.
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. J Biol Chem 2003; 278: 22644-9.
- Takada T, Suzuki H, Gotoh Y, Sugiyama Y. Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state of Akt in polarized cells. Drug Metab Dispos 2005; 33: 905-9.
- Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. Blood 2005; 106: 1154-63.
- Tannock IF. Tumor physiology and drug resistance. Cancer Metastasis Rev 2001; 20: 123-32.
- Terashima I, Koyama K, Kohda K. Chemical characteristics of complexes of O6,9dimethylguanine with cis-platin and debenzylation rates of O6-benzylguanines. Nucleic Acids Symp Ser 1993: 23-4.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 7735-8.
- Thoma BS, Vasquez KM. Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair. Mol Carcinog 2003; 38: 1-13.

- Thomas JE, Venugopalan M, Galvin R, Wang Y, Bokoch GM, Vlahos CJ. Inhibition of MG-63 cell proliferation and PDGF-stimulated cellular processes by inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase. J Cell Biochem 1997; 64: 182-95.
- Thomas M, Suwa T, Yang L, Zhao L, Hawks CL, Hornsby PJ. Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells. Neoplasia 2002; 4: 493-500.
- Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. Mol Biol Cell 2006; 17: 955-65.
- Tothova E, Kafkova A, Fricova M, Benova B, Kirschnerova G, Tothova A. Imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon alpha. Neoplasma 2005; 52: 63-7.
- Tsai HJ, Huang WH, Li TK, Tsai YL, Wu KJ, Tseng SF, et al. Involvement of topoisomerase III in telomere-telomere recombination. J Biol Chem 2006; 281: 13717-23.
- Turhan A. [Imatinib mesylate: a major breakthrough in the treatment of chronic myelogenous leukemia]. Med Sci (Paris) 2003; 19: 667-8.
- van der Bliek AM, Borst P. Multidrug resistance. Adv Cancer Res 1989; 52: 165-203.
- Van Luyn MJ, Muller M, Renes J, Meijer C, Scheper RJ, Nienhuis EF, et al. Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1. Int J Cancer 1998; 76: 55-62.
- Versantvoort CH, Bagrij T, Wright KA, Twentyman PR. On the relationship between the probenecid-sensitive transport of daunorubicin or calcein and the glutathione status of cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP). Int J Cancer 1995a; 63: 855-62.
- Versantvoort CH, Broxterman HJ, Bagrij T, Scheper RJ, Twentyman PR. Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. Br J Cancer 1995b; 72: 82-9.
- Versantvoort CH, Schuurhuis GJ, Pinedo HM, Eekman CA, Kuiper CM, Lankelma J, et al. Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells. Br J Cancer 1993; 68: 939-46.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem 1994; 269: 5241-8.
- Volk EL, Rohde K, Rhee M, McGuire JJ, Doyle LA, Ross DD, et al. Methotrexate crossresistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. Cancer Res 2000; 60: 3514-21.
- Watt PM, Hickson ID, Borts RH, Louis EJ. SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 1996; 144: 935-45.
- Weisberg E, Griffin JD. Mechanisms of resistance imatinib (STI571) in preclinical models and in leukemia patients. Drug Resist Updat 2001; 4: 22-8.
- Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. J Exp Med 1996; 183: 2471-9.
- Weng NP, Palmer LD, Levine BL, Lane HC, June CH, Hodes RJ. Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging. Immunol Rev 1997; 160: 43-54.
- Wenz C, Enenkel B, Amacker M, Kelleher C, Damm K, Lingner J. Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. Embo J 2001; 20: 3526-34.
- Wheeler C, Rader R, Kessel D. Membrane alterations associated with progressive adriamycin resistance. Biochem Pharmacol 1982; 31: 2691-3.

- Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, et al. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. Nat Med 1997; 3: 1275-9.
- Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, et al. Multidrugresistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 7476-81.
- Wright SR, Boag AH, Valdimarsson G, Hipfner DR, Campling BG, Cole SP, et al. Immunohistochemical detection of multidrug resistance protein in human lung cancer and normal lung. Clin Cancer Res 1998; 4: 2279-89.
- Wu L, Davies SL, North PS, Goulaouic H, Riou JF, Turley H, et al. The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. J Biol Chem 2000; 275: 9636-44.
- Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase stimulates the activity of human topoisomerase IIIalpha. Nucleic Acids Res 2002; 30: 4823-9.
- Wu X, Maizels N. Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. Nucleic Acids Res 2001; 29: 1765-71.
- Xu-Welliver M, Kanugula S, Pegg AE. Isolation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O6-benzylguanine. Cancer Res 1998; 58: 1936-45.
- Yanada M, Naoe T. Imatinib combined chemotherapy for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: major challenges in current practice. Leuk Lymphoma 2006; 47: 1747-53.
- Yang CH, Schneider E, Kuo ML, Volk EL, Rocchi E, Chen YC. BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells. Biochem Pharmacol 2000; 60: 831-7.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 1997; 275: 1129-32.
- Yang Y, Chen Y, Zhang C, Huang H, Weissman SM. Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. Exp Cell Res 2002; 277: 201-9.
- Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, Cole SP, Deeley RG, Gerlach JH. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. Clin Cancer Res 1999; 5: 673-80.
- Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drugefflux pump. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 8822-6.
- Zamber CP, Lamba JK, Yasuda K, Farnum J, Thummel K, Schuetz JD, et al. Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. Pharmacogenetics 2003; 13: 19-28.
- Zeng H, Bain LJ, Belinsky MG, Kruh GD. Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. Cancer Res 1999; 59: 5964-7.
- Zhou R, Wang Y, Gruber A, Larsson R, Castanos-Velez E, Liliemark E. Topoisomerase IImediated alterations of K562 drug resistant sublines. Med Oncol 1999; 16: 191-8.
- Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, de Lange T. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. Mol Cell 2003; 12: 1489-98.

Annexe

PUBLICATIONS

C. Douarre, D. Gomez, H. Morjani, JM Zahm, MF. O'donohue, L. Eddabra, P. Mailliet, JF. Riou & C. Trentesaux. Overexpression of Bcl-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to long-term senescence. *Nucleic Acids Res.* 2005 Apr 14;33(7):2192-203.

N. Aouali, L. Eddabra, J. Macadré & H. Morjani. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2005 Oct;56(1):61-70.

L. Eddabra, P. Cornillet-Lefèbvre, T. Wenner, T. Baranek, P. Nguyen, JF. Riou, & H. Morjani. Arginine 482 to glycine mutation in the breast cancer resistance protein ABCG2 confers high-level resistance to etoposide. (*Soumis à Int J Oncl*).

L. Eddabra, P. Cornillet-Lefèbvre, T. Wenner, T. Baranek, C. Douarre, MF. O'Donohue, H. El Btaouri, P. Nguyen, JF. Riou & H. Morjani. Imatinib mediates post-transcriptional down-regulation of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2 via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. (*Soumis à Oncol Rep*).

6- N. Aouali, C. Dumontet, H. El Btaouri, L. Eddabra, G. Rath, S. Malagarie-Cazenave, L. Martiny, T. Levade & H. Morjani. Accumulation of lactosylceramide and overexpression of a PSC833-resistant P-glycoprotein in multidrug-resistant human sarcoma cells (*soumis à FEBS Letters*)

COMMUNICATION ORALES ET ECRITES

J. M. Zahm, M. Millot, O. Bajolet, M. Merten, L. Eddabra, C. Hologne, N. Bonnet & E. Puchelle. Time-lapse videomicroscopy of bacteria and airway epithelial cell interactions. *European respiratory society congress, Stockholm 2002, 14-18 Septembre, Résumé publié dans Eur Respir J* 2002; 20: Suppl. 38, 483s.

L. Eddabra, A. Dupont, J. Macadré, P. Nguyen, H. Morjani & P. Cornillet-Lefebvre. Quantification de l'expression des gènes MDR par la RT-PCR quantitative en temps réel. *Congrès international de biochimie de Marrakech. 3-6 Mai 2004.*

J. Macadre, N. Aouali, L. Eddabra & H. Morjani. La protéine ABC " multidrug-resistance associated protein " est responsable du transport actif de la mitoxantrone dans les cellules de carcinome mammaire humain. *Congrès international de biochimie de Marrakech. 3-6 Mai 2004.*

L. Eddabra, P. Cornillet-Lefèbvre, G. Simon, A. Dupont, P. Nguyen & H. Morjani. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) induit une résistance à l'étoposide dans les cellules tumorales humaines. *Congrès Annuel et Forum Jeunes Chercheurs de la société française de biochimie et biologie moléculaire (SFBBM). Nantes 2005, 24-26 octobre.*

C. Douarre, D. Gomez, H. Morjani, JM Zahm, MF. O'donohue, L. Eddabra, P. Mailliet, JF. Riou & C. Trentesaux. Altération du simple-brin télomérique et modification par Bcl-2 de l'apoptose induites par le 12459, un ligand de l'ADN G-quadruplex. *Cinquième rencontre de Figeac*, *5 - 10 Octobre 2005*.

H. Morjani, J. Macadre, C. Douarre, L. Eddabra, D. Gomez, T. Wenner, C. Trentesaux & JF.
Riou. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de télomérase : ligands G-quadruplex. *Congrès international de biochimie. Agadir (Maroc) 6-9 Mai 2006.*

L. Eddabra, P. Cornillet-Lefèbvre, T. Wenner, T. Baranek, C. Douarre, MF. O'Donohue, H. El Btaouri, P. Nguyen, JF. RiouH. & Morjani. L'imatinib régule l'expression de la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) au niveau post-transcriptionnel dans les cellules de leucémie myéloïde chronique K562. *Eurocancer 2006, 19ème édition, Paris 27-29 Juin.*

J. Macadré, T. Wenner, L. Eddabra, T. Jolly, JF. Riou & H. Morjani. Résistance à l'activité antipriliferative du ligand G-quareuplex 2,6-pyridines-dicarboxamide 360A inhibiteur de télomérase dans une lignée de carcinome bronchique A549. *Eurocancer 2006, 19ème édition, Paris 27-29 Juin.*

C. Douarre, T Wenner, D. Gomez, H. Morjani, L. Eddabra, P. Mailliet, JF. Riou & C. Trentesaux. Altération du simple brin télomérique et modulation par le Bcl2 de l'apoptose induite par le 1249, un ligand de l'ADN G-quareplex. *Eurocancer 2006, 19ème édition, Paris 27-29 Juin.*

Lahcen EDDABRA

Expression et fonctions de protéines impliquées dans la résistance et la sensibilité aux agents anticancéreux : Nouveaux substrats des protéines ABC et nouvelles cibles de l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique Th. Univ. Reims : 2007

RESUME :

La résistance multiple ou multidrug-resistance (MDR), est un obstacle au traitement des tumeurs solides et des leucémies. C'est un phénomène complexe qui fait appel à de multiples mécanismes cellulaires. Souvent, une surexpression des protéines de la famille ABC (Pgp, MRP1 et BCRP, est observée dans les cellules résistantes. Ces protéines assurent le transport actif des médicaments anticancéreux. La modulation de ce phénotype et la recherche de nouvelles cibles constituent aujourd'hui un enjeu majeur dans la lutte contre le cancer.

Le travail de cette thèse est organisé en quatre parties : les deux premières concernent le rôle de deux protéines MDR (MRP1 et BCRP) dans la résistance à deux inhibiteurs de la topoisomérase II (mitoxantrone et étoposide respectivement). Les résultats obtenus montrent que la BCRP joue un rôle dans la résistance à l'étoposide et qu'une altération de la reconnaissance de l'étoposide par la BCRP est observée quand l'acide aminé 482 (arginine) est substitué par la thréonine ou la glycine. De même, nous montrons que la MRP1 est impliquée dans la résistance à la mitoxantrone. La sélection d'une lignée résistante MCF7/MGG en présence de mitoxantrone et de GG918 (inhibiteur de la Pgp et BCRP) montre que cette lignée surexprime la MRP1 en présentant une résistance vis-à-vis de ce médicament. Cette résistance est accompagnée d'une diminution de l'accumulation cellulaire de la mitoxantrone, modulée par la BSO (inhibiteur de la synthèse de glutathion). Dans la troisième partie, nous avons étudié l'effet de l'imatinib (inhibiteur de la tyrosine kinase BCR-ABL) sur l'expression de la BCRP. Les résultats obtenus suggèrent une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la BCRP par l'imatinib via la voie PI3K/AKT. Enfin, la dernière partie porte sur l'effet de l'imatinib sur l'expression de la télomérase et protéines partenaires dans les cellules de leucémie myéloïde chronique. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'expression de hTERT, TRF2, Topo IIIa, RAD51 et BLM dans les cellules promyélocytaires HL60 transfectées par BCR-ABL. Le traitement des cellules K562 par l'imatinib induit une diminution de l'expression de ces protéines sauf TRF2 dont l'expression augmente. Ces résultats suggèrent une régulation de l'expression des gènes codant pour ces protéines par BCR-ABL d'une part et que l'imatinib, via l'inhibition des voies de signalisation contrôlées par BCR-ABL, contribue aussi à une régulation négative de l'expression de hTERT et autres protéines partenaires (impliquées dans l'allongement et structure du télomère).

MOTS-CLES : Multirésistance aux médicaments, transporteurs ATP Binding Cassette, Leucémie myéloïde chronique, Imatinib, Télomère

JURY:

Rapporteurs :	Monsieur le professeur Jean Pierre Marie (Paris)
	Monsieur le docteur Jean Bénard (Villejuif)
Examinateurs :	Monsieur le professeur Jean François Riou (Reims)
	Monsieur le docteur Jean Louis Mergny (Paris)
Directeur de thèse :	Monsieur le docteur Hamid Morjani (Reims)

ADRESSE DE L'AUTEUR : 14, esplanade Paul Cézanne 51100 Reims