

Université de Reims - Champagne Ardenne
UFR Pharmacie

Année 2008

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DE REIMS - CHAMPAGNE ARDENNE**
Spécialité : Biochimie – Biologie moléculaire

Soutenue confidentiellement le 15 décembre 2008

Par

Grégory GATOULLAT

**Stratégies de sensibilisation de cellules tumorales
résistantes à la chimiothérapie : induction d'anticorps,
utilisation de flavonoïdes**

Laboratoire de Biochimie – IFR53 Biomolécules
UFR Pharmacie de Reims

Membres du jury

Rapporteurs :	Pr Jean-François Bernaudin	Paris VI
	Pr Ollivier Legrand	Paris VI
Examineurs :	Pr Claudie Madoulet	Reims
	Dr Hamid Morjani	Reims
Directeur de thèse :	Pr Claudie Madoulet	

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame le Professeur Claudie MADOULET pour gentillesse, sa bonne humeur, sa générosité et son dynamisme et sa disponibilité à tout instant. Vous m'avez fait confiance et soutenu pendant ces quatre années, je vous en suis très reconnaissant.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Docteur Hamid MORJANI d'avoir non seulement accepté d'examiner ma thèse mais aussi pour sa sympathie.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Jean-François BERNAUDIN ainsi qu'à Monsieur le Professeur Ollivier LEGRAND pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Un grand merci à Emilie BALASSE et à Johann ODOT pour leurs précieux conseils, pour leur aide et pour leur gentillesse.

Un petit clin d'œil à tous les amis de thèse, DEA et des années antérieures...

A mes parents, mon frère et ma sœur, sans qui je n'en serai pas la aujourd'hui.

Enfin, un grand MERCI à Elise pour son soutien et sa présence à tout instant...

RESUME

La surexpression de la P-glycoprotéine (P-gp), codée par les gènes *mdr1/3*, est l'une des principales causes de l'établissement de la résistance aux traitements anticancéreux dans de nombreux cancers. Ainsi de nombreuses stratégies visant à inhiber l'efflux de drogues médié par la P-gp ont été développées.

Dans ce travail, la réversion de l'activité de la P-gp, a été réalisée par deux approches différentes, l'une basée sur la production d'anticorps, l'autre faisant appel à l'utilisation de flavonoïdes isolés à partir de la luzerne (*Medicago sativa*).

Nous avons montré que des anticorps dirigés spécifiquement contre la P-gp restaurent la sensibilité des cellules leucémiques murines P388 résistantes vis-à-vis de la doxorubicine. Ces anticorps sont induits par l'immunisation de souris avec des liposomes présentant des peptides synthétiques dérivés de boucles extracellulaires de la P-gp à leur surface grâce à des chaînes PEGylées. Ces anticorps, incubés avec des cellules P388 résistantes, potentialisent l'effet de la doxorubicine en augmentant son accumulation intracellulaire. De plus, l'immunisation avec une telle préparation liposomale permet d'améliorer l'efficacité du traitement chimiothérapeutique et d'augmenter la survie des souris ayant reçu l'injection de cellules P388 résistantes.

Au cours d'un screening bioguidé de l'extrait foliaire de luzerne, plusieurs métabolites possédant des activités anticancéreuses ont été isolés. La médicarpine et le millepurpan, deux isoflavonoïdes, exercent une activité cytotoxique aussi bien dans les cellules P388 sensibles et résistantes à la doxorubicine en induisant une apoptose caspase-dépendante. Lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations non toxiques, les deux composés potentialisent l'effet d'agents anticancéreux en inhibant l'activité de la P-gp sans modifier son expression.

Mots clés : P-glycoprotéine, résistance « multidrogue », immunisation, anticorps, luzerne, flavonoïdes.

PUBLICATIONS

BALASSE E, ODOT J, **GATOUILLAT G**, ANDRY MC, MADOULET C.
Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles.
Int J Pharm 2008; 353 (1-2): 131-138.

GATOUILLAT G, ODOT J, BALASSE E, NICOLAU C, TOSI PF, HICKMAN DT, LÓPEZ-DEBER MP, MADOULET C.
Immunization with liposome-anchored pegylated peptides modulates doxorubicin sensitivity in P-glycoprotein-expressing P388 cells.
Cancer Lett 2007; 257 (2): 165-171.

PERRIN L, **GATOUILLAT G**, BALASSE E, ODOT J, NICOLAU C, TOSI PF, MADOULET C.
Induction of autoantibodies to murine P-glycoprotein: consequences on drug sensitivity in MDR cancer cells and on the expression of mdr genes in organs.
Biochem Biophys Res Commun 2007; 358 (1): 325-330.

PARTICIPATION A UN OUVRAGE

Grégory GATOUILLAT, Claudie MADOULET.
Chemosensibilization.
Encyclopedia of Cancer, 2nd Edition.
Springer.

COMMUNICATIONS

BALASSE E, **GATOUILLAT G**, ODOT J, ANDRY MC, MADOULET C.
A preliminary study of the adjuvant capacity of hydroxyethylstarch microparticles in the induction of anti-melanoma immune responses.
présenté au Congrès Skin and Formulation, Paris, 2007.

GATOUILLAT G, BALASSE E, ODOT J, MADOULET C.
Induction d'anticorps anti-P-glycoprotéine après immunisations de souris avec des peptides PEGylés : Rôle sur la réversion de la multidrogue résistance et la survie des animaux
Poster présenté au Forum des Jeunes Chercheurs de l'IFR53, Reims, 2007.

BALASSE E, GATOUILLAT G, ODOT J, ANDRY MC, MADOULET C.

Les propriétés adjuvantes des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon sur l'activation des cellules T helper. Application en immunothérapie anti-mélanome.

présenté au Congrès Eurocancer, Paris, 2006.

BALASSE E, GATOUILLAT G, ROULLIN G, ANDRY MC, MADOULET C.

Stratégies de lutte contre le mélanome B16R par injection de protéines solubles vectorisées par des microcapsules d'hydroxyéthyl amidon.

présenté au Congrès Eurocancer, Paris, 2005.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principaux mécanismes cellulaires responsables de l'établissement de la résistance des cellules tumorales	11
Figure 2. Modèle structural de la P-gp humaine	16
Figure 3. Structure de la P-gp en microscopie électronique	17
Figure 4. Représentation schématique de la P-gp	17
Figure 5. Modèle proposé pour le cycle catalytique de la P-gp	22
Figure 6. Modèles proposés pour le mécanisme d'action de la P-gp	23
Figure 7. Structure des principaux transporteurs ABC	26
Figure 8. Structure de la doxorubicine	36
Figure 9. Structure de la vinblastine	37
Figure 10. Structure du vérapamil	38
Figure 11. Protocole d'immunisations des souris et prélèvements de sang	41
Figure 12. Obtention de 4 extraits bruts à partir de l'EFL	44
Figure 13. Purification des composés de la fraction To-1	45
Figure 14. Protocole de chimiothérapie mis en place après l'inoculation des tumeurs	54
Figure 15. Effet de la DOX (a) et de la VBL (b) sur la viabilité des cellules P388 et P388/DOX	62
Figure 16. Expression de la P-gp dans les lignées P388 et P388/DOX	63
Figure 17. Effet du VPL sur la cytotoxicité de la DOX dans les cellules P388/DOX	64
Figure 18. Expression des gènes codant pour la P-gp dans les lignées P388 et P388/DOX	64
Figure 19. Représentation des peptides PEGylés (A) et palmitoylés (B) insérés dans des liposomes	66
Figure 20. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp2 et mpp2	68
Figure 21. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp1, Lp2 et Lp4	69

Figure 22. Fluorescence indirecte émise par les cellules P388 et P388/DOX incubées avec le sérum récupéré à J15 des souris immunisées avec Lp1, Lp2, Lp4 ou avec des liposomes vides (Lp0)	70
Figure 23. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA	72
Figure 24. Quantités d'IgG spécifiques de chaque peptide dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA	73
Figure 25. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA 80 jours après la troisième immunisation	74
Figure 26. Fluorescence indirecte émise par les cellules P388 et P388/DOX incubées avec le sérum récupéré à J15 des souris immunisées avec Lp124, Lp124/MPLA ou avec des liposomes vides (Lp0)	74
Figure 27. Détection de la P-gp dans les lignées P388 et P388/DOX avec l'anticorps monoclonal JSB-1 et le sérum Lp124	75
Figure 28. Suivi du poids des souris immunisées avec les différentes préparations	76
Figure 29. Signes d'alopecie observés chez une souris immunisées avec la préparation Lp1	76
Figure 30. Etude histologique des organes des souris ayant reçu des injections de sérum physiologique, d'alum ou de la préparation Lp124	78
Figure 31. Détail d'un granulome retrouvé au niveau du foie	79
Figure 32. Effet des sérums Lp1, Lp2 et Lp4 et du vérapamil (VPL ; 3 µM) sur la toxicité de la DOX sur les cellules P388/DOX	80
Figure 33. Effet des sérums Lp124, Lp124/MPLA sur la toxicité de la doxorubicine sur les cellules P388/DOX	81
Figure 34. Effet des sérums Lp1, Lp2, Lp4 et du VPL sur l'accumulation intracellulaire de DOX	82
Figure 35. Effet des sérums Lp124, Lp124/MPLA et du VPL sur l'accumulation intracellulaire de DOX	83
Figure 36. Influence de l'immunisation avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA sur la survie des souris ayant reçu une injection de cellules P388/DOX et un traitement chimiothérapeutique	84
Figure 37. Principales classes de polyphénols	93
Figure 38. Structure de base des flavonoïdes	94

Figure 39. Les différentes classes de flavonoïdes au sens strict	95
Figure 40. Les différentes classes d'isoflavonoïdes	95
Figure 41. Signalisation de l'apoptose	97
Figure 42. Luzerne (<i>Medicago Sativa L.</i>)	99
Figure 43. Cytotoxicité des extraits toluène et MtBE sur les cellules P388 (a,c) et P388/DOX (b,d)	103
Figure 44. Modifications morphologiques induits par les extraits toluène et MtBE	105
Figure 45. Analyse de la fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées avec 100 µg/ml d'extrait toluène ou MtBE	106
Figure 46. Détection des cellules apoptotiques par cytométrie en flux	107
Figure 47. Effet de l'extrait Toluène sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP dans les cellules P388 et P388/DOX	108
Figure 48. Effet de l'extrait MtBE sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP dans les cellules P388 et P388/DOX	109
Figure 49. Analyse de la fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées la fraction EFL-To-1	111
Figure 50. Métabolites isolés dans la fraction EFL-To-1	113
Figure 51. Cytotoxicité de la médicarpine et du millepurpan sur les cellules P388 et P388/DOX	115
Figure 52. Détection de l'apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan	117
Figure 53. Effet de la médicarpine (a) et du millepurpan (b) sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP	118
Figure 54. Effet de la médicarpine sur l'expression de protéines impliquées dans la signalisation apoptotique	120
Figure 55. Effet du millepurpan sur l'expression de protéines impliquées dans la signalisation apoptotique	121
Figure 56. La médicarpine et le millepurpan restaurent l'apoptose induite par la doxorubicine dans les cellules P388/DOX	123
Figure 57. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP	124

Figure 58. Effet de la médicarpine (a) et du millepurpan (b) sur la toxicité de la doxorubicine dans les cellules P388/DOX	126
Figure 59. Effet de la médicarpine (a) et du millepurpan (b) sur la toxicité de la vinblastine dans les cellules P388/DOX	127
Figure 60. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur la toxicité de la doxorubicine dans les cellules P388	128
Figure 61. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur l'accumulation de doxorubicine dans les cellules P388/DOX	129
Figure 62. Effet du vérapamil sur la cytotoxicité de la médicarpine et du millepurpan sur les cellules P388/DOX	130
Figure 63. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur l'expression de la P-gp dans les cellules P388/DOX	131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Principales substances anticancéreuses impliquées ou non dans le phénomène de MDR	9
Tableau II. La famille multigénique MDR	14
Tableau III. Quelques substrats transportés par la P-gp	19
Tableau IV. Substances pharmacologiques inhibant l'activité de la P-gp	30
Tableau V. Séquences des peptides palmitoylés et PEGylés	39
Tableau VI. Préparation des liposomes	40
Tableau VII. Composition des vaccins des différents groupes d'immunisation	41
Tableau VIII. Oligonucléotides utilisés pour les analyses en PCR	47
Tableau IX. Anticorps monoclonaux utilisés en western blot	50
Tableau X. Principaux anticorps monoclonaux spécifiques de la P-gp	58
Tableau XI. Sensibilité des cellules P388 et P388/DOX vis-à-vis de la DOX et de la VBL	63
Tableau XII. Quelques flavonoïdes et autres composés polyphénoliques inhibant l'activité et/ou l'expression de la P-gp	99
Tableau XIII. Cytotoxicité des différents extraits obtenus à partir de l'EFL (IC ₅₀ en µg/ml)	102
Tableau XIV. Cytotoxicité des différentes fractions obtenues à partir de la fraction toluène (IC ₅₀ en µg/ml)	111
Tableau XV. Cytotoxicité des métabolites purifiés à partir de la fraction toluène (IC ₅₀ en µM)	114

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC ATP-Binding Cassette	DOX Doxorubicine
AcOEt Acétate d'Ethyle	DMSO Diméthyl Sulfoxyde
ADN Acide Désoxyribonucléique	dNTP désoxynucléotide Triphosphate
ADP Adénosine Diphosphate	DTT Dithiothréitol
Alum Hydroxyde d'aluminium	EDTA : Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid
APAF-1 Apoptotic Protease Activating Factor 1	EFL Extrait Foliaire de Luzerne
ARN Acide Ribonucléique	FADD Fas Associated Death Domain
ATP Adénosine Triphosphate	FITC Fluorescéine Isothiocyanate
BET Bromure d'Ethidium	HPLC High Performance Liquid Chromatography
BCRP Breast Cancer Resistance Protein	HRP Horseradish peroxidase
BuOH Butanol	IgG Immunoglobuline G
CAD Caspase-Activated DNase	LPS Lipopolysaccharide
CCM Chromatographie sur couche mince	LRP Lung Resistance Protein
DMPC Dimyristoylphosphatidylcholine	MDR MultiDrug Resistance
DMPG Dimyristoylphosphatidylglycérol	MPLA Monophosphoryl Lipid A

MRP Multidrug Resistance Protein	PARP Poly(ADP-Ribose) polymérase
MtBE Methyl tert-butyl ether	PEG-DSPE Polyethylene Glycol - Disteroylphosphoethanolamine
MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	PTP Permeability Transition Pore
NBD Nucleotide Binding Domain	RIPA Radio-Immunoprecipitation Assay
PBS Phosphate-Buffered Saline	SDS Sodium Dodecyl Sulfat
P-gp P-Glycoprotéine	TNFα Tumor Necrosis Factor α
PKC Protéine Kinase C	TRAIL Tumor necrosis factor)-Related Apoptosis- Inducing Ligand
PMSF Phenylmethylsulphonyl Fluoride	VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine
RMN Résonance Magnétique Nucléaire	VLC Vaccum Liquid Chromatography
RPMI Roswell Park Memorial Institute	
RT-PCR Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction	
SVF Sérum de Veau Foetal	
TMD Transmembrane Domain	
VBL Vinblastine	
VPL Vérapamil	
PAGE Polyacrylamide Gel Electrophoresis	

Sommaire

SOMMAIRE	p1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
LA RESISTANCE PLEÏOTROPIQUE AUX AGENTS ANTICANCEREUX OU LE PHENOMENE DE « MULTIDRUG RESISTANCE » (MDR)	p8
I. Le phénotype MDR des cellules tumorales	p8
II. Mécanismes cellulaires responsables de la résistance aux drogues	p10
III. Les principaux transporteurs responsables de l'établissement de la MDR	p12
III.1. La P-glycoprotéine (P-gp)	p13
III.1.1. Structure et fonction de la P-gp	p14
III.1.1.1. Les différentes isoformes de la P-gp	p14
III.1.1.2. Structure de la P-gp	p15
III.1.1.3. Modification post-traductionnelles de la P-gp	p18
III.1.1.3.1. Glycolysation	p18
III.1.1.3.2. Phosphorylation	p18
III.1.1.4. Transport et substrats de la P-gp	p19
III.1.1.5. Couplage entre l'activité ATPase, la liaison et le transport du substrat	p20
III.1.1.6. Mécanisme d'action de la P-gp	p22
III.2. Autres transporteurs impliqués dans l'établissement du phénotype MDR	p23
III.2.1. MRP (Multidrug Resistance associated Protein)	p23
III.2.2. BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)	p25
III.2.3. LRP (Lung Resistance-related Protein)	p25
IV. Expression et rôle physiologique de la P-gp dans les tissus normaux	p26
V. Importance clinique de l'expression de la P-gp dans les cancers humains	p27
VI. Modulation de la MDR médiée par la P-gp	p28
VI.1. Réversion de la MDR par chimiosensibilisation des cellules tumorales résistantes	p28
VI.1.1. Modulateurs de première génération	p28
VI.1.2. Modulateurs de seconde génération	p29
VI.1.3. Modulateurs de troisième génération	p29
VI.2. Amélioration de la sélectivité de libération des drogues cytotoxiques	p30
VI.3. Altération de l'expression du gène <i>MDR1</i>	p31
VII. Autres stratégies	p31
MATERIELS ET METHODES	p33
I. Systèmes biologiques	p34

I.1. Lignées cellulaires	p34
I.2. Conditions de culture	p35
I.3. Modèle animal	p35
II. Effecteurs pharmacologiques	p36
II.1. La doxorubicine	p36
II.2. La vinblastine	p37
II.3. Le vérapamil	p37
III. Mise au point d'un vaccin contenant des peptides dérivés de la P-gp présentés par des liposomes	p38
III.1. Synthèse des peptides palmitoylés et PEGylés dérivés de la P-gp	p38
III.2. Préparation des liposomes	p39
III.3. Reconstitution des peptides dans les liposomes	p39
III.4. Protocole d'immunisations et prélèvements de sang	p40
IV. Recherche et identification de métabolites secondaires à partir de feuilles de luzerne	p42
IV.1. Obtention des extraits foliaires de luzerne	p42
IV.2. Extraction et fractionnement de l'EFL	p42
IV.3. Fractionnement de l'extrait brut « toluène » et purification des composés contenus dans la fraction « To-1 »	p43
V. Analyses <i>in vitro</i>	p45
V.1. RT-PCR	p45
V.1.1. Extraction des ARN totaux	p45
V.1.2. Synthèse et amplification de l'ADN complémentaire	p46
V.2. Analyse de la réponse immunitaire par dot-blot	p48
V.2.1. Préparation des antigènes et dépôt sur membrane de nitrocellulose	p48
V.2.2. Immunodétection	p48
V.3. Western blot	p49
V.3.1. Obtention des extraits cellulaires	p49
V.3.2. Electrophorèse SDS-PAGE, transfert et immunodétection	p49
V.4. Mesure de la viabilité cellulaire par le test au 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	p50
V.5. Marquage de l'ADN au Hoechst 33342	p51
V.6. Analyse de la fragmentation de l'ADN	p52
V.6.1. Extraction d'ADN	p52
V.6.2. Electrophorèse des fragments d'ADN	p52
V.7. Analyse par cytométrie en flux	p53
V.7.1. Etude de la réactivité des sérums avec les cellules	p53

V.7.2. Analyse du contenu intracellulaire en ADN	p53
V.7.3. Mesure de l'accumulation intracellulaire en DOX	p54
VI. Analyses in vivo	p54
VI.1. Evaluation <i>in vivo</i> l'efficacité du vaccin en association avec une chimiothérapie	p54
VI.2. Etude anatomo-pathologique des organes des souris	p55
VI.2.1. Inclusion des organes en bloc de paraffine	p55
VI.2.2. Coloration à l'Hématéine – Phloxine – Safran (HPS)	p56
PREMIERE PARTIE	
SENSIBILISATION DES CELLULES TUMORALES MULTIDRUG-RESISTANTES PAR L'INDUCTION D'ANTICORPS CIBLES CONTRE LA P-GLYCOPROTEINE	p57
Introduction	p58
Résultats	p62
I. Caractérisation des lignées cellulaires P388 et P388/DOX	p62
I.1. Sensibilité des cellules vis-à-vis de substances anticancéreuses	p62
I.2. Détermination du mécanisme impliqué dans la résistance des cellules P388/DOX	p63
I.2.1. Analyse par western blot de l'expression de la P-gp	p63
I.2.2. Expression des gènes <i>mdr1</i> et <i>mdr3</i>	p65
II. Induction d'anticorps dirigés contre des peptides dérivés des boucles extracellulaires de la P-gp	p65
II.1. Présentation des peptides dérivés de la P-gp à la surface des liposomes	p65
II.2. Influence du type d'ancrage des peptides aux liposomes sur la synthèse d'anticorps dirigés contre les peptides	p67
II.3. Immunogénicité des peptides mPEGp1, mPEGp2 et mPEGp4 ancrés aux liposomes administrés individuellement	p68
II.4. Induction de la synthèse d'anticorps par l'injection de liposomes contenant les 3 peptides	p71
II.5. Evaluation de la toxicité induite par l'injection du vaccin	p75
II.5.1. Suivi comportemental et observations des souris immunisées	p75
II.5.2. Etude histologique des organes des souris immunisées	p77
II.6. Conclusions	p77

III. Evaluation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'activité anti-MDR des anticorps induits	p79
III.1. Effet des anticorps induits sur la cytotoxicité de la doxorubicine	p79
III.1.1. Etude des sérums Lp1, Lp2 et Lp4	p79
III.1.2. Etude des sérums Lp124 et Lp124/MPLA	p80
III.2. Effet des anticorps induits sur l'accumulation intracellulaire de doxorubicine	p81
III.2.1. Etude des sérums Lp1, Lp2 et Lp4	p81
III.2.2. Etude des sérums Lp124 et Lp124/MPLA	p82
III.3. Effet <i>in vivo</i> de l'immunisation avec Lp2, Lp124 et Lp124/MPLA sur l'efficacité de la chimiothérapie contre les cellules P388/DOX	p83
III.4. Conclusions	p85
Discussion	p86
 SECONDE PARTIE	
SENSIBILISATION DES CELLULES MULTIDRUG-RESISTANTES PAR DES FLAVONOÏDES EXTRAITS DES FEUILLES DE LUZERNE	p92
Introduction	p93
Résultats	p101
I. Recherche de métabolites à activité antiproliférative par un fractionnement bioguidé de l'extrait foliaire de luzerne (EFL)	p101
I.1. Effet des différents extraits obtenus à partir des EFL sur la viabilité cellulaire	p102
I.2. Cytotoxicité et apoptose induites par les extraits toluène et MtBE	p102
I.2.1. Effet des extraits sur la viabilité des cellules P388 et P388/DOX	p102
I.2.2. Induction de l'apoptose par les extraits toluène et MtBE	p104
I.2.2.1. Changements morphologiques nucléaires	p104
I.2.2.2. Analyse de la fragmentation de l'ADN	p105
I.2.2.3. Mesure de l'apoptose par cytométrie en flux	p106
I.2.2.4. Activation de la caspase-3 et clivage de PARP	p107
I.3. Fractionnement de l'extrait toluène et recherche de métabolites à activité antiproliférative contenus dans la fraction EFL-To-1	p110
I.3.1. Effet des différentes fractions obtenues à partir de l'extrait toluène sur la viabilité cellulaire	p110
I.3.2. Purification et identification des métabolites de la fraction EFL-To-1	p112
I.4. Conclusions	p114
II. Etude de deux isoflavonoïdes isolés à partir de la fraction EFL-To-1 : médicarpine et millepurpan	p114

II.1. Cytotoxicité et apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan	p114
II.1.1. Effet sur la viabilité des cellules P388 et P388/DOX	p114
II.1.2. Induction de l'apoptose	p116
II.1.3. L'apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan fait intervenir des facteurs de la famille Bcl-2	p119
II.2. Chimiosensibilisation des cellules P388/DOX par la médicarpine et le millepurpan	p122
II.2.1. Effet sur l'apoptose induite par la doxorubicine	p122
II.2.2. Effet sur la cytotoxicité induite par la doxorubicine et la vinblastine	p125
II.2.3. Effet sur l'accumulation intracellulaire de doxorubicine et l'expression de la P-gp	p128
II.3. Conclusions	p131
DISCUSSION	p132
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES	p139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p142

Rappels bibliographiques

La résistance pléiotropique aux agents anticancéreux ou phénomène de « Multidrug Resistance » (MDR)

L'utilisation de la chimiothérapie dans le traitement des cancers est limitée par le développement de cellules tumorales résistantes. Cette résistance peut survenir à l'égard de drogues cytotoxiques utilisées individuellement, la cause de ce phénomène étant attribuée à l'altération des cibles intracellulaires de ces drogues. Mais, elle peut également survenir vis-à-vis de nombreuses drogues différentes auxquelles les cellules n'ont jamais été exposées auparavant et qui n'ont aucune relation de structure ou de fonction [Gottesman et Pastan, 1993]. Cette forme de résistance, appelée « MultiDrug Resistance » (MDR), constitue le principal obstacle dans le traitement chimiothérapeutique de nombreux cancers humains (carcinomes du colon, du rein et du sein, leucémies, myélomes multiples, etc...).

La résistance peut exister d'emblée. Un grand nombre de cancers présentent en effet une résistance intrinsèque aux drogues cytotoxiques mais elle peut également être induite par un traitement chimiothérapeutique : les cellules tumorales acquièrent une résistance multiple lors de la mise en place du traitement.

Les cellules tumorales de phénotype MDR accumulent beaucoup moins de drogues cytotoxiques que les cellules sensibles, ce qui, le plus souvent, semble dû à un efflux accru des drogues vers le milieu extracellulaire. La concentration intracellulaire en agents anticancéreux reste ainsi en dessous d'une concentration létale.

Les cellules cancéreuses peuvent devenir résistantes par différents mécanismes, mais la principale cause de l'apparition de la MDR est liée à la surexpression de la P-glycoprotéine, une protéine membranaire glycosylée de 170 kDa, à la surface des cellules.

I. Le phénotype MDR des cellules tumorales

La première lignée devenue résistante *in vitro* aux drogues anticancéreuses apparaît dans les années 1970. Les travaux pionniers de Danø et de Juliano et Ling ont permis de mettre en évidence une altération physiologique (réduction de l'accumulation intracellulaire des drogues) corrélée à une modification biochimique (augmentation de l'expression d'une protéine membranaire) à partir de cellules résistantes sélectionnées en présence de colchicine [Danø, 1973 ; Juliano et Ling, 1976]. Les cellules de phénotype MDR sont résistantes vis-à-vis d'agents cytotoxiques couvrant largement l'arsenal thérapeutique anticancéreux. Ces

drogues ont en commun une origine naturelle et un caractère lipophile, mais elles ont des cibles différentes au niveau de la cellule : les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine) agissant au niveau de l'ADN, les *vinca* alcaloïdes (vincristine, vinblastine) et les alcaloïdes (colchicine) au niveau de la formation du fuseau mitotique, ou encore les épipodophyllotoxines (étoposide, téniposide) qui inhibent l'ADN topoisomérase II. A ces molécules peuvent être ajoutés d'autres agents anticancéreux tels que le paclitaxel ou le topotécan, les analogues de peptides hydrophobes toxiques (gramicidine D, valinomycine) et des inhibiteurs transcriptionnels (actinomycine D) (tableau I).

Tableau I. Principales substances anticancéreuses impliquées ou non dans le phénomène de MDR

Inhibiteurs des microtubules
Vinca alcaloïdes : Vincristine, Vinblastine, Vindésine, Vinorelbine Taxanes : Paclitaxel, Docetaxel
Antimétabolites
Antifolates : Méthotrexate, Trimetrexate et Ralitrexed Analogues des pyrimidines : 5-Fluorouracile, Capecitabine, Eniluracile, Cytosine-arabinoside, Gemcitabine Analogues des purines : 6-Mercaptopurine, 6-Thioguanine, Fludarabine, Cladribine
Agents alkylants et apparentés
Moutardes azotées : Cyclophosphamide, Ifosfamide, Melphalan, Chlorambucil Aziridines : Thiotépa, Mitomycine C Alkyls sulfonates : Busulphan Nitrosourées : Carmustine, lomustine, MéthylCCNU Hydrazines et triazines : Procarbazine, Dacarbazine, Temozolomide Dérivés du platine : Cisplatine, Carboplatine, Oxaliplatine
Inhibiteurs des topoisomérases
Epipodophyllotoxines : Etoposide, Téniposode Camptothécine et analogues : Camptothécine, Irinotécan, Topotécan Anthracyclines et composés voisins : Doxorubicine, Epirubicine, Daunorubicine, Mitoxantrone, Actinomycine D, Aclarubicine
Autres molécules

Ce phénotype, largement étudié *in vitro* grâce aux lignées cellulaires résistantes, est caractérisé par :

- Une résistance croisée des cellules tumorales aux agents anticancéreux : des lignées cellulaires sélectionnées avec une drogue développent également une résistance vis-à-vis d'un large spectre de composés n'ayant aucune relation de structure ou de fonction [Danø, 1972] ;
- Une diminution de l'accumulation intracellulaire des drogues : les cellules résistantes accumulent beaucoup moins de drogues que leurs homologues sensibles [Danø, 1973];
- La surexpression d'une glycoprotéine membranaire impliquée dans le transport des drogues, expulsant celles-ci hors de la cellule [Juliano et Ling, 1976].

II. Mécanismes cellulaires responsables de la résistance aux drogues

Les cellules tumorales sont capables de devenir résistantes à un grand nombre de composés toxiques ayant des structures ou des modes d'action très différents. Malgré la grande diversité des drogues et la variabilité existant entre les types cellulaires, les phénomènes de résistance restent invariants [Hayes et Wolf, 1990].

Les cellules cancéreuses, de par leur capacité à muter, sont génétiquement hétérogènes. De plus, l'exposition de ces cellules à des agents toxiques exerce une sélection au niveau de leur capacité à survivre en présence de ces drogues. Ainsi, dans une population de cellules cancéreuses exposées à des agents chimiothérapeutiques, plusieurs mécanismes responsables de la résistance multidrogue seront susceptibles de se mettre en place. Ce phénomène est qualifié de résistance multidrogue multifactorielle.

L'action des antinéoplasiques sur leur cible moléculaire peut être modulée à différents niveaux (Figure 1) :

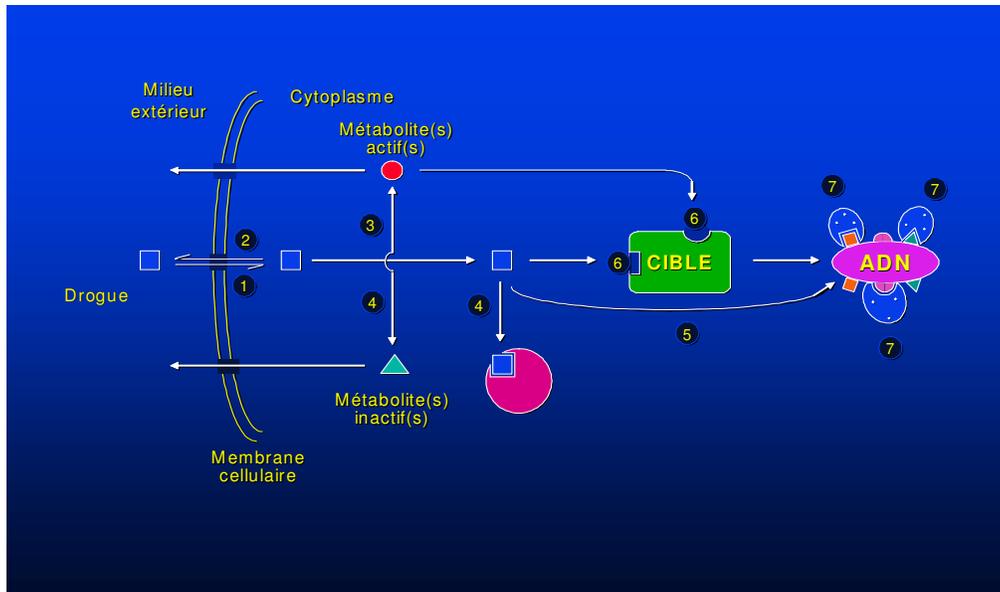


Figure 1. Principaux mécanismes cellulaires responsables de l'établissement de la résistance des cellules tumorales (Charcosset, 1991).

(1) Diminution de la pénétration intracellulaire des médicaments. Il s'agit d'un mécanisme de résistance très fréquent provoqué par l'altération quantitative ou qualitative des systèmes de transporteurs. Par exemple, La résistance au méthotrexate peut survenir en conséquence à une mutation affectant les transporteurs des folates [Longo-Sorbello et Bertino, 2001].

(2) Augmentation de l'efflux des médicaments. L'efflux énergie-dépendant de la drogue hors de la cellule représente le moyen principal permettant de diminuer la concentration en drogue en dessous d'une concentration efficace. C'est le mécanisme de résistance aux agents anticancéreux le plus fréquemment rencontré. La résistance aux drogues résulte généralement de la surexpression de pompes à efflux ATP-dépendantes ayant une large spécificité d'action [Gottesman, 2002]. Ces pompes font partie de la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) partageant des homologies de séquence ou de structure entre eux.

(3) Dégradation d'une enzyme de métabolisation du médicament. Les analogues nucléosidiques sont des composés très utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Cependant, ces composés ne sont pas actifs en tant que tels, ils doivent être activés à l'intérieur des cellules. Ainsi, la résistance à ces composés peut être due à une activité réduite des différentes

étapes de l'activation se traduisant par une quantité insuffisante de drogue activée. La cytosine arabino-side (Ara-C), un analogue de la désoxycytidine, doit subir plusieurs phosphorylations successives pour se trouver sous sa forme active. Le mécanisme majeur de résistance est une diminution de l'activité désoxycytidine kinase assurant la première étape de phosphorylation.

(4) Inactivation du médicament. La surexpression de la glutathion-S-transférase (GST) joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques, et en particulier dans la transformation métabolique de nombreux agents anticancéreux en les convertissant en composés faiblement toxiques et excrétables. L'augmentation de l'activité du système GST et l'augmentation intracellulaire du glutathion ont été associées à la résistance à différents agents anticancéreux [Tew, 1994 ; Meijer *et al.*, 1992].

(5) Surexpression de la cible du médicament. Certaines cibles cellulaires des drogues peuvent être surexprimées de sorte qu'une faible fraction de la cible puisse assumer son rôle cellulaire. Par exemple, la dihydrofolate réductase (DHFR), cible des antifolates tels que le méthotrexate, peut être surexprimée pour surpasser l'effet cytotoxique des composés anticancéreux [Frei *et al.*, 1984]. La thymidylate synthase, cible du 5-fluorouracile peut également être surexprimée [Chauffert *et al.*, 1999].

(6) Altérations qualitatives de la cible du médicament. Les cellules peuvent devenir résistantes aux inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II tels que la doxorubicine ou l'étoposide grâce à des mutations du gène codant pour la topoisomérase II [Drake *et al.*, 1987].

(7) Entrave à la mort cellulaire. Un des principaux mécanismes d'action des drogues anticancéreuses consiste à induire la mort cellulaire programmée ou apoptose. Les cellules tumorales peuvent devenir résistantes à l'apoptose par l'augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN ou la surexpression des protéines telles que Bcl-2 impliquées dans la survie cellulaire.

III. Les principaux transporteurs responsables de l'établissement de la MDR

L'efflux énergie-dépendant de la drogue hors de la cellule représente le moyen principal permettant de diminuer la concentration en drogue en dessous d'une concentration

efficace. C'est le mécanisme de résistance aux agents anticancéreux le plus fréquemment rencontré. Il peut être spécifique d'une drogue ou d'un type de drogue mais il conduit généralement à des phénomènes de résistance croisée pouvant atteindre de forts niveaux. Ainsi, les composés inducteurs de ce type de résistance sont variés, sans relation structurale ou fonctionnelle entre eux.

La résistance aux drogues résulte généralement de l'expression de pompes à efflux ATP-dépendantes ayant une large spécificité d'action [Gottesman, 2002]. Ces pompes font partie de la superfamille des transporteurs ABC (ATB Binding Cassette) partageant des homologies de séquence ou de structure entre eux. A ce jour, 48 gènes codant pour des transporteurs ABC ont été identifiés et divisés en 7 sous-familles (ABCA à ABCG) en fonction des homologies de séquence et de l'organisation des différents domaines [Dean *et al.*, 2001]. Les données actuelles indiquent qu'au moins 12 transporteurs ABC appartenant à trois sous-familles différentes jouent un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses en culture [Szakacs *et al.*, 2006].

Parmi les transporteurs ABC impliqués dans la MDR, la P-glycoprotéine a été définie comme étant le principal élément responsable de l'induction d'une résistance pléiotropique aux agents anticancéreux [Ambudkar *et al.*, 2003]. Cette pompe, encore appelée « multidrug transporter », est effectivement surexprimée dans de nombreuses cellules tumorales et est responsable de l'efflux des drogues hors de ces cellules, provoquant une diminution de la quantité intracellulaire de drogues [Ueda *et al.*, 1987]. D'autres pompes à efflux telles que la MRP, la BCRP ou la LRP ont plus récemment été impliquées dans le phénotype MDR.

III.1. La P-glycoprotéine (P-gp)

La plupart des cellules tumorales acquièrent une résistance multiple aux drogues cytotoxiques grâce à l'expression de la P-glycoprotéine (P-gp). De ce fait, celle-ci fût le premier transporteur responsable de l'efflux de drogues identifié dans des cellules tumorales résistantes, et reste aujourd'hui le mécanisme de résistance le mieux caractérisé.

Les premières analyses biochimiques effectuées sur des lignées cellulaires MDR suggèrent une altération quantitative d'une ou plusieurs protéines de la membrane plasmique [Juliano et Ling, 1976]. Une phosphoglycoprotéine de 170 kDa, la P-gp (nommée ainsi en

raison de son rôle dans la perméabilité membranaire aux drogues), fût désignée comme étant responsable de la diminution de l'accumulation de drogues dans les cellules résistantes par rapport à leurs homologues sensibles. Elle fût ensuite isolée puis purifiée [Riordan *et al.*, 1979].

III.1.1. Structure et fonction de la P-gp

III.1.1.1. Les différentes isoformes de la P-gp

Les travaux de Ueda *et al.* ont montré que la P-gp était codée par le gène *MDR1* [Ueda *et al.*, 1986], localisé sur le chromosome 7 humain [Fojo *et al.*, 1986]. D'autres études ont permis de mettre en évidence qu'il n'existe pas un gène *MDR* mais une famille de gènes *MDR* amplifiés dans les cellules résistantes [Roninson *et al.*, 1986]. Malgré l'existence d'une forte homologie de séquence (supérieure à 70%) entre les protéines codées par les gènes *MDR* [Devine *et al.*, 1991 ; Van der Blik et Borst, 1989], Ces protéines sont classées en 3 groupes (tableau II) :

- La classe I comprend les P-gp codées par le gène humain *MDR1*, le gène murin *mdr1a* (ou *mdr3*) [Gros *et al.*, 1986a] et le gène *Pgp1* du hamster [Hsu *et al.*, 1989] ;
- La classe II comprend les P-gp codées par le gène murin *mdr1b* (ou *mdr1*) [Gros *et al.*, 1986b] et le gène *Pgp2* du hamster [Endicott *et al.*, 1987] ;
- La classe III comprend les P-gp codées par le gène humain *MDR2/3* [Van der Blik *et al.*, 1987], le gène murin *mdr2* [Gros *et al.*, 1988] et le gène *Pgp3* du hamster [Ng *et al.*, 1989].

Tableau II. La famille multigénique MDR

	Classe I	Classe II	Classe III
Homme	<i>MDR1</i>	-	<i>MRD2/3</i>
Souris	<i>mdr1a</i> (<i>mdr3</i>)	<i>mdr1b</i> (<i>mdr1</i>)	<i>mdr2</i>
Hamster	<i>Pgp1</i>	<i>Pgp2</i>	<i>Pgp3</i>

La surexpression des P-gp des classes I et II est capable de conférer le phénotype MDR [Devault *et al.*, 1990 ; Gros *et al.*, 1986c ; Ueda *et al.*, 1987] contrairement aux

glycoprotéines de la classe III [Gros *et al.*, 1988 ; Schinkel *et al.*, 1991]. De nombreux travaux basés sur l'utilisation de souris knockout pour l'un ou les 2 gènes ont montré que le gène *mdr1a* ne compensait pas d'une manière significative la perte du gène *mdr1b*, ce qui suggère que ce dernier joue un rôle prépondérant dans l'expression de la P-gp chez la souris [Schinkel, 1997]. Le gène *MDR2/3* code quant à lui pour un transporteur de la phosphatidylcholine exprimé dans le foie dont la fonction principale est d'exporter des phospholipides dans la bile [Ruetz et Gros, 1994]. Cette fonction est également attribuée au gène *mdr2* présent chez la souris.

Un autre transporteur apparenté à la P-gp, la glycoprotéine BSEP (Bile Salt Export Pump), également appelé SP-gp (Sister Of P-gp) en raison de son homologie avec le produit du gène *MDR1*, a été associé à la MDR. Chez le rat, la transfection du gène *Bsep* induit une résistance modérée au paclitaxel mais pas à d'autres anticancéreux [Hooiveld *et al.*, 2001], ce qui suggère que le rôle de ce transporteur dans l'établissement du phénotype MDR est limité. Néanmoins, le transporteur BSEP, localisé principalement au niveau du foie, joue un rôle prépondérant dans l'excrétion des sels biliaires car l'inactivation du gène *Bsep* induit le développement de cholestases intrahépatiques [Wang *et al.*, 2001].

III.1.1.2. Structure de la P-gp

En 1986, le séquençage de l'ADN des gènes MDR et l'analyse de ces séquences a permis d'établir la structure primaire de la P-gp et de proposer un modèle structural [Chen *et al.*, 1986 ; Gerlach *et al.*, 1986 ; Gros *et al.*, 1986b]. L'ADNc humain est transcrit en un ARNm de 4,5 kb codant pour une protéine constituée de 1280 acides aminés, de poids moléculaire de 140 kDa.

L'analyse de la séquence montre que la P-gp est constituée de deux moitiés fortement homologues de 610 acides aminés reliées par une séquence de 60 acides aminés peu conservée. Un modèle de la topologie de la P-gp reposant sur l'analyse du profil d'hydropathie a été proposé [Gros *et al.*, 1986b ,Chen *et al.*, 1986]. Dans ce modèle, chaque moitié de la P-gp est divisée en deux régions (Figure 2) :

- une région N-terminale possédant une faible homologie de séquence avec la région N-terminale de l'autre moitié de la P-gp ;

-
- une région C-terminale fortement homologue d'une moitié à l'autre. Ces deux régions C-terminales forment chacune une large boucle cytoplasmique.

Chaque moitié comporte :

- six segments transmembranaires formés d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes reliés entre par des boucles extracellulaires parfois très courtes et des boucles intracellulaires plus longues.
- un domaine ABC (ATP-Binding Cassette) ou NBD (Nucleotide Binding Domain). Chaque domaine NBD renferme un site consensus contenant des motifs conservés caractéristiques des transporteurs ABC intervenant dans la fixation de l'ATP : les motifs Walker A et B, la région C (également appelée signature ou motif LSGGQ) et les boucles D, H et Q. Un nouveau motif commun à tous les transporteurs ABC, la boucle A contenant un acide aminé aromatique conservé, a été identifié comme étant essentiel à la fixation de l'ATP [Ambudkar *et al.*, 2006a].

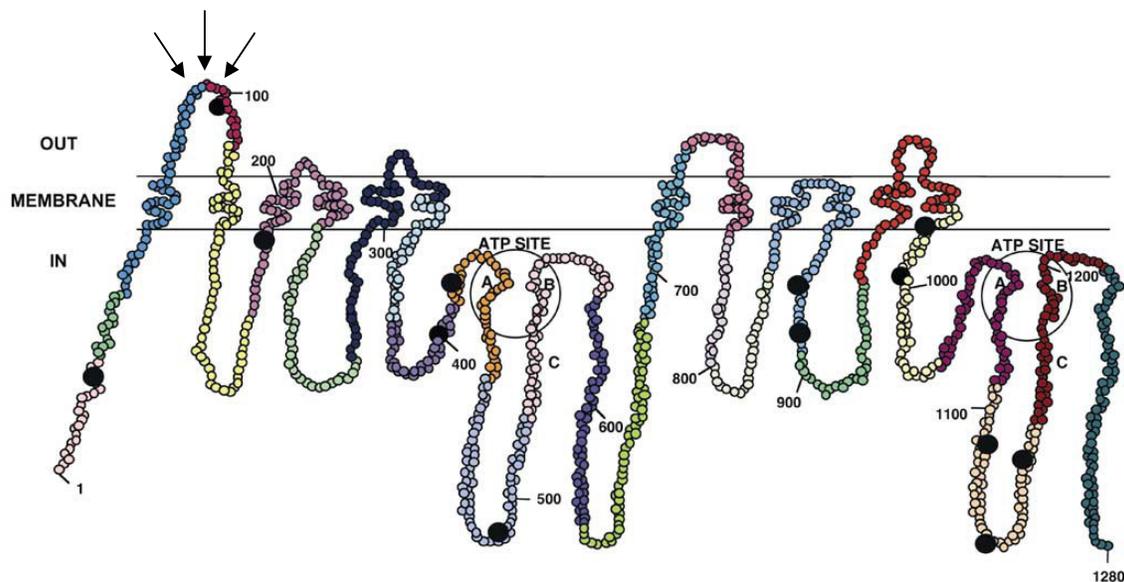


Figure 2. Modèle structural de la P-gp humaine (Ambudkar *et al.*, 2003). Les 3 sites de N-glycosylation sont indiqués par des flèches.

Ce modèle structural a été confirmé par des expériences de mutagenèse dirigée menées par Loo et Clarke [Loo et Clarke, 1995a ; Loo et Clarke, 1999a].

Une image tridimensionnelle obtenue par microscopie électronique avec une résolution de 2,5 nm montre un cylindre d'environ 10 nm de diamètre et d'une hauteur de 8 nm (figures 3 et 4) [Rosenberg *et al.*, 1997]. Vue du côté extracellulaire, la P-gp est circulaire avec un large pore d'un diamètre de 5 nm. Ce pore est nettement plus petit du côté cytoplasmique. Ainsi, les différents domaines transmembranaires sont agencés de manière à former un entonnoir, avec une extrémité élargie du côté extracellulaire permettant de transporter les drogues vers le milieu extracellulaire [Loo et Clarke, 2001a].

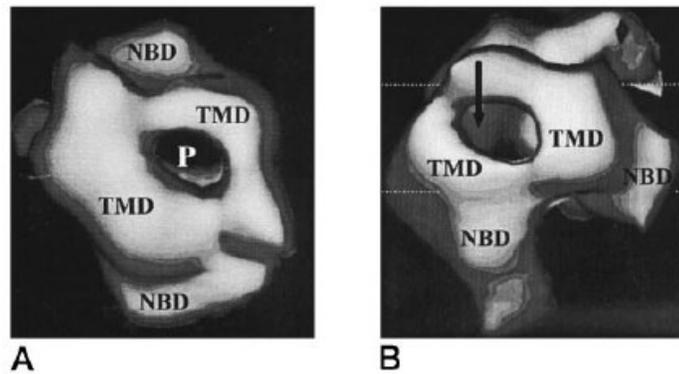


Figure 3. Structure de la P-gp en microscopie électronique (Rosenberg *et al.*, 1997).
A : vue perpendiculaire à la surface de la membrane ; B : vue de profil (P : pore, TMD : domaines transmembranaires, NBD : sites de liaison aux nucléotides. Les lignes pointillées blanches représentent la position approximative de la membrane lipidique).

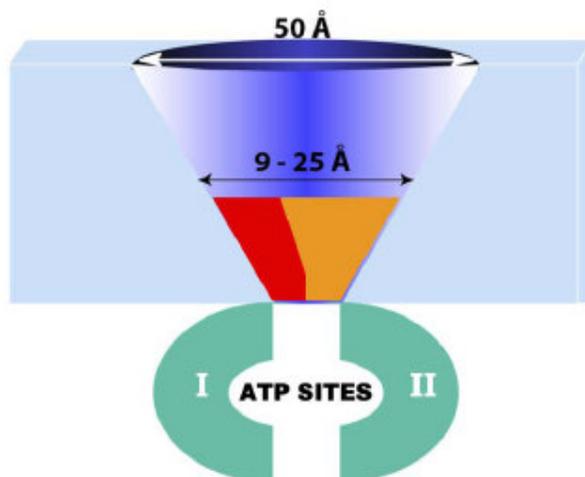


Figure 4. Représentation schématique de la P-gp (Ambudkar *et al.*, 2006b).

III.1.1.3. Modification post-traductionnelles de la P-gp

Une large variété de masses moléculaires (130 – 200 kDa) a tout d'abord été rapportée par les premières études basées sur la migration de la P-gp, mais il a été démontré qu'une telle hétérogénéité était due aux conditions expérimentales [Endicott et Ling, 1989]. Les séquences d'ADNc isolées chez la souris indiquent une masse moléculaire pour la P-gp d'environ 140 kDa [Chen *et al.*, 1986 ; Gros *et al.*, 1986b]. Les masses moléculaires les plus élevées de la P-gp résultent de modifications post-traductionnelles, les principales étant la glycosylation et la phosphorylation.

III.1.1.3.1. Glycolysation

La P-gp est synthétisée sous la forme d'un précurseur non glycosylé d'une masse moléculaire de 120 – 140 kDa qui subit ensuite une maturation. La forme glycosylée de la P-gp a une masse moléculaire variant de 130 à 180 kDa selon le type cellulaire et l'espèce considérés. Chez l'homme, il a été démontré que la P-gp était N-glycosylée sur des résidus asparagine présents dans la première boucle extracellulaire [Schinkel *et al.*, 1993a]. Bien que la structure primaire de la P-gp prédise plusieurs sites de glycosylations, il semble que seule la moitié N-terminale soit glycosylée [Germann, 1996 ; Loo et Clarke, 1995b].

Si l'absence de glycosylation de la P-gp ne semble altérer ni son activité [Germann 1996 ; Robert, 1994], ni le profil de résistance des cellules, elle diminue la fréquence d'obtention des lignées résistantes, ce qui suggère que cette glycosylation est indispensable à la maturation et l'acheminement de la P-gp vers la membrane plasmique [Loo et Clarke, 1999b].

III.1.1.3.2. Phosphorylation

La phosphorylation de la P-gp a été observée dans de nombreuses lignées cellulaires et murines. Contrairement à la P-gp mature, le précurseur de 140 kDa n'est pas phosphorylé. Ceci indique que la phosphorylation de la P-gp est accomplie par des kinases associées à la membrane plasmique [Germann, 1996]. La phosphorylation de la P-gp par la PKC a été

démontrée sur plusieurs lignées cellulaires résistantes [Aftab *et al.* 1994 ; Chambers *et al.* 1990].

La localisation des sites de phosphorylation a été étudiée [Chambers *et al.*, 1994 ; Chambers *et al.*, 1993]. Malgré la présence de nombreux sites potentiels de phosphorylation, quatre résidus sérine sont phosphorylés [Germann, 1996]. Ces quatre sites sont situés dans le domaine « linker » reliant les deux moitiés homologues de la P-gp.

Après avoir longtemps pensé que la phosphorylation de la P-gp pouvait jouer un rôle dans la régulation de son activité de pompe à efflux, il a été démontré que la phosphorylation médiée par la PKC ne régule pas le transport des drogues [Goodfellow *et al.*, 1996].

III.1.1.4. Transport et substrats de la P-gp

La P-gp est capable de transporter des drogues ayant des structures très diverses électriquement neutres ou portant une charge positive tels que la doxorubicine, la vinblastine ou le taxol, mais également d'autres substances (tableau III).

Tableau III. Quelques substrats transportés par la P-gp (Ambudkar *et al.* 1999 ; Litman *et al.*, 2001).

Substances anticancéreuses
Vinca alcaloïdes (Vinblastine, Vincristine) ; Anthracyclines (Doxorubicine, Daunorubicine, Epirubicine) ; Epipodophyllostoxines (Etoposide, Teniposide) ; Paclitaxel ; Actinomycine D ; Topotécan ; Mitomycine C, Mitoxantrone
Autres agents cytotoxiques
Colchicine ; Bromure d'éthidium ; Puromycine
Peptides
Valinomycine ; Gramicidine D ; N-Acetyl-leucyl-leucyl-norleucine
Inhibiteurs de la protéase du VIH
Ritonavir ; Indinavir ; Saquinavir
Fluorophores
Rhodamine ; Hoechst 33342 ; Calcéïne-AM
Antihistaminiques
Féxofénadine, Cétirizine

De nombreux travaux s'appuyant sur des expériences de mutagenèse dirigée et de marquage de photo-affinité ont permis d'identifier différents domaines de la P-gp interagissant avec ses substrats. Les deux moitiés N- et C-terminales de la P-gp contribuent à la formation du site de liaison du substrat. Celui-ci fait effectivement intervenir des acides aminés de plusieurs domaines transmembranaires, notamment les domaines TM1, 4, 6, 7, 1, 11, et 12 ainsi que les boucles extracellulaires 3 et 6 [Loo et Clarke, 2001b ; Loo *et al.*, 2006, Sharom, 1997, Greenberger, 1993 ; Greenberger *et al.*, 1991].

Le transport des substrats par la P-gp fait intervenir des modifications conformationnelles (détectables par l'utilisation d'anticorps monoclonaux sensibles à la conformation [Nagy *et al.*, 2001 ; Nagy *et al.*, 2004]) induites par l'hydrolyse de l'ATPase et la liaison du substrat. Ce couplage entre les activités de transport et ATPase nécessite une interaction entre les 2 parties homologues de la P-gp [Loo et Clarke, 1994]. Hrycyna *et al.* ont démontré que la délétion du domaine linker reliant ces deux domaines aboutit à la production d'une protéine membranaire exprimée à un niveau similaire à celui de la protéine sauvage, mais n'est fonctionnelle ni pour le transport, ni pour l'activité ATPase [Hrycyna *et al.*, 1998a]. Ceci indique qu'une interaction entre les deux parties de la P-gp ainsi que la présence des deux domaines de liaison aux nucléotides sont nécessaires à son fonctionnement.

III.1.1.5. Couplage entre l'activité ATPase, la liaison et le transport du substrat

Des études réalisées à l'aide d'analogues non hydrolysables de l'ATP ainsi que des inhibiteurs de la fonction ATPase tels que le vanadate ont permis de mettre en évidence que l'activité de transport de la P-gp est indissociable de son activité ATPase [Germann et Chambers, 1998 ; Hamada et Tsuruo, 1988 ; Horio *et al.*, 1988].

La P-gp possède deux sites de liaisons à l'ATP situés du côté C-terminal de chaque moitié homologue. La substitution d'acides aminés dans l'un ou l'autre de ces sites entraîne une inactivation du transporteur, montrant que la présence des deux sites de liaison à l'ATP est essentielle pour l'activité de transport de la P-gp [Azzaria *et al.*, 1989 ; Loo et Clarke, 1995]. Bien qu'ils soient tous deux capables d'hydrolyser l'ATP, les deux sites n'hydrolysent pas l'ATP de façon simultanée [Hrycyna *et al.*, 1998b]. Il est également important de noter

que l'activité ATPase de la P-gp est augmentée lors de la liaison à son substrat [Senior *et al.*, 1995, Sauna et Ambudkar, 2001].

Sur la base de ces résultats, plusieurs modèles décrivant le cycle catalytique de la P-gp ont été proposés. Le modèle décrit par Ambudkar *et al.* basé sur un ensemble de données [Sauna et Ambudkar, 2000 ; Sauna et Ambudkar, 2001 ; Sauna *et al.*, 2002] propose qu'il existe deux sites de liaison du substrat ayant des affinités différentes, et que le transport de ce substrat nécessite l'hydrolyse de deux molécules d'ATP (Figure 5) :

- 1- Le substrat se lie à la P-gp au niveau du site à forte affinité et une première molécule d'ATP se lie au niveau d'un des deux sites de liaison des nucléotides ;
- 2- L'hydrolyse de l'ATP permet le déplacement du substrat vers le site à faible affinité ;
- 3- Le phosphate inorganique provenant de l'hydrolyse de l'ATP est libéré, ce qui libère le substrat de la P-gp ;
- 4- L'ADP se dissocie du complexe et l'affinité de la P-gp pour le substrat reste faible ;
- 5- Une seconde molécule d'ATP se lie à l'autre site de liaison ;
- 6- L'ATP est hydrolysé, mais l'affinité pour le substrat reste faible ;
- 7- Le phosphate inorganique est libéré ;
- 8- La dissociation de l'ADP permet le retour de la P-gp à sa conformation initiale, présentant une forte affinité pour le substrat.

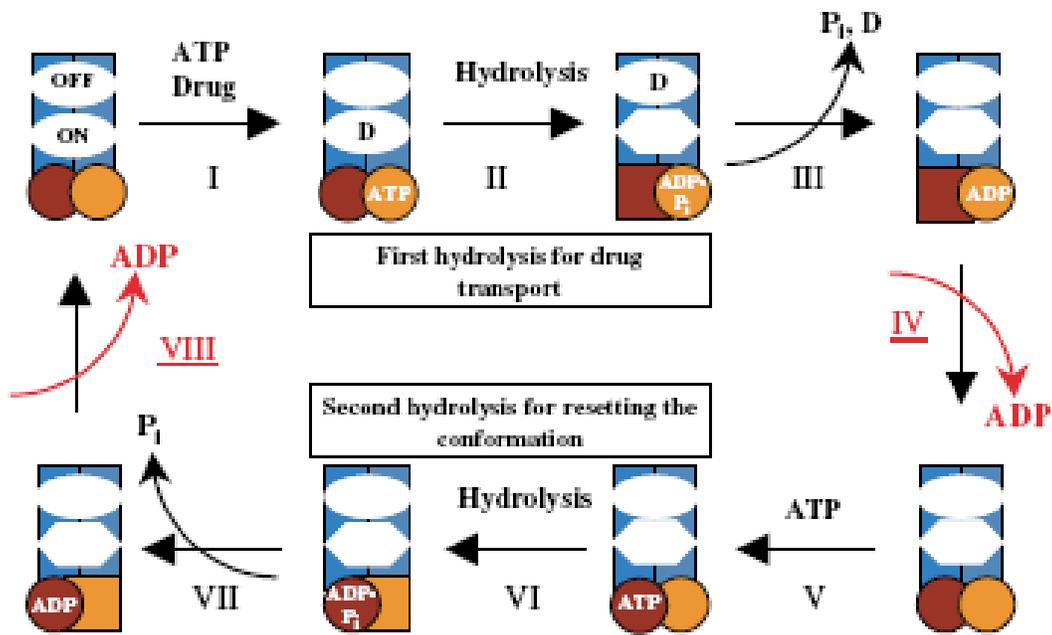


Figure 5. Modèle proposé pour le cycle catalytique de la P-gp (Ambudkar *et al.*, 2003). Les sites « ON » et « OFF » représentent respectivement les sites à forte et à faible affinité pour le substrat. Le site hexagonal décrit le site « ON » avec une affinité réduite pour le substrat. Les cercles représentent les sites de liaison pour l'ATP, les carrés montrent les sites ATP ayant une faible affinité.

III.1.1.6. Mécanisme d'action de la P-gp

Le mécanisme moléculaire par lequel la P-gp diminue la concentration intracellulaire des agents anticancéreux dans les cellules MDR a été largement étudié, mais il n'a jamais été clairement élucidé à ce jour. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été avancées.

La majorité des drogues transportées par la P-gp étant hydrophobes, elles seraient donc détectées par la P-gp lors de leur diffusion à travers la membrane plasmique, avant même qu'elles n'atteignent le cytoplasme. La P-gp jouerait un rôle « d'aspirateur hydrophobe » dont la fonction primaire serait de détecter et expulser les composés hydrophobes directement dans la bicouche lipidique [Ambudkar *et al.*, 1999]. Cependant, toutes les drogues transportées par la P-gp ne sont pas hydrophobes ; les composés hydrosolubles seraient donc captés dans l'environnement cytoplasmique de la P-gp (Figure 6). D'autres modes d'action de la P-gp ont été suggérés. Elle pourrait fonctionner comme une « flippase », en déplaçant les drogues du feuillet interne de la bicouche lipidique vers le

feuillet externe, leur permettant de diffuser dans le milieu extracellulaire [Higgins et Gottesman, 1992]. La P-gp pourrait également être responsable de l'altération du potentiel électrique membranaire et du pH intracellulaire pouvant aboutir à la perturbation du niveau intracellulaire de drogues [Wadkins et Roepe, 1997]. Cependant, la variation de ces paramètres n'a pas été constatée dans toutes les lignées cellulaires MDR surexprimant la P-gp.

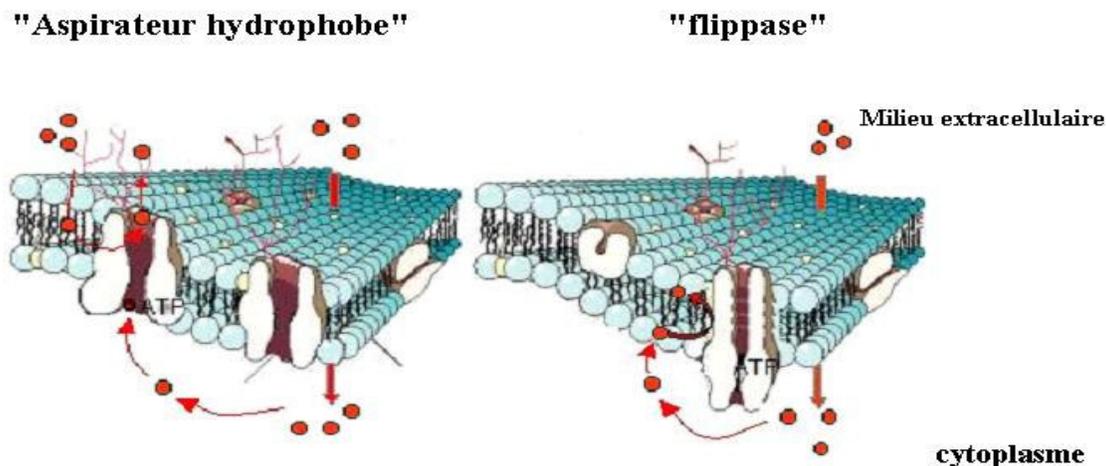


Figure 6. Modèles proposés pour le mécanisme d'action de la P-gp

III.2. Autres transporteurs impliqués dans l'établissement du phénotype MDR

III.2.1. MRP (Multidrug Resistance associated Protein)

Après la découverte de la P-gp et la preuve de son expression dans de nombreux cancers humains, de nombreux travaux ont montré qu'un grand nombre de cancers MDR exprimait rarement la P-gp. Plusieurs lignées cellulaires sélectionnées avec différentes drogues présentaient un phénotype de résistance similaire à celui conféré par la P-gp en l'absence de sa surexpression [Cole *et al.*, 1991].

En 1992, Cole *et al.* ont découvert un second type de protéine capable de transporter des drogues à partir des cellules H69AR, une lignée cellulaire humaine « multidrug résistante » sélectionnée pour sa résistance à la doxorubicine, isolée à partir d'un cancer de poumon à petites cellules [Cole *et al.*, 1992]. Cette protéine a été appelée MRP (Multidrug Resistance associated Protein). L'analyse de la séquence protéique de la MRP a permis de la classer parmi les transporteurs ABC. Neuf isoformes différentes ont été identifiées (MRP1 à MRP9), mais la plupart des études menées à ce jour ont été réalisées sur la MRP1. Cette glycoprotéine de 190 kDa est, du point de vue structural, similaire à la P-gp. Elle est constituée d'une partie qualifiée de « P-gp-like » (contenant 12 domaines transmembranaires et 2 domaines NBD) présentant à son extrémité N-terminale, une extension formant 5 domaines transmembranaires. Même si la topologie de la MRP1 est semblable à celle de la P-gp, les 2 protéines ne présentent que 15% d'homologie entre elles [Keppler *et al.*, 1998]. D'autres membres de la famille des MRP possèdent une structure similaire à celle de la MRP1, notamment MRP2, MRP3, MRP6 et MRP7, alors que MRP4 et MRP5 sont amputées de l'extension N-terminale (Figure 7).

Contrairement à la P-gp, MRP1 transporte des composés chargés négativement incluant des drogues anticancéreuses hydrophobes, mais elle transporte préférentiellement ces drogues lorsqu'elles sont conjuguées au glutathion ou lorsqu'elles sont modifiées par glycosylation, sulfatation ou glucuronylation [Jedlitschky *et al.*, 1994]. Elle peut également transporter ces drogues par un mécanisme de co-transport avec le glutathion réduit [Loe *et al.*, 1998].

Les MRP sont exprimées dans de nombreux cancers, leur conférant ainsi une protection contre des drogues cytotoxiques, mais elles le sont également dans la plupart des tissus normaux humains, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle physiologique, notamment dans l'excrétion des leucotriènes C₄, [Leier *et al.*, 1994] médiateurs de l'inflammation, de conjugués entrant dans la composition des sels biliaires, des métabolites naturels (17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide)) [Loe *et al.*, 1996] ou dans la diffusion de toxines telles que l'aflatoxine B₁ [Loe *et al.*, 1997].

III.2.2. BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)

Un troisième transporteur ABC capable de transporter des drogues anticancéreuses, appelé BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), MXR (Mitoxantrone-Resistance Protein) ou encore ABC-P (ABC Placentaire), a été identifié en 1998 par Doyle *et al.* dans des cellules d'adénocarcinome mammaire sélectionnées pour leur résistance à la doxorubicine (MCF-7/Adr/Vp) et qui présentaient une résistance croisée pour la mitoxantrone [Doyle *et al.*, 1998]. Contrairement à la P-gp et à la MRP1, BCRP est un demi transporteur de 72 kDa qui ne possède qu'un seul domaine NBD suivi par un domaine comprenant 6 segments transmembranaires, mais elle fonctionne sous forme d'homodimères ou d'homotétramères [Xu *et al.*, 2004] (Figure 7).

La surexpression de BCRP est associée à de hauts niveaux de résistance à l'égard de nombreux agents anticancéreux incluant les anthracyclines, la mitoxantrone et les camptothécines [Doyle et Ross, 2003 ; Kubawata *et al.* 2001], mais elle est également capable de transporter diverses molécules organiques sous forme ou non de conjugués [Chen *et al.*, 2003].

La BCRP est naturellement exprimée dans plusieurs organes, en particulier, le placenta, les intestins, le foie ou le cerveau où elle joue un rôle important dans l'absorption, la distribution et l'élimination de drogues toxiques ou de substances endogènes.

III.2.3. LRP (Lung Resistance-related Protein)

Bien qu'elle ne fasse pas partie de la famille des transporteurs, LRP (Lung Resistance-related Protein), une protéine de 110 kDa, est souvent associée à la résistance aux drogues. Elle est exprimée dans différents cancers et de nombreuses lignées cellulaires, et sa surexpression prédit généralement une mauvaise réponse à la chimiothérapie [Scheper *et al.*, 1993 ; Izquierdo *et al.*, 1996]. LRP a été identifiée comme étant une protéine de voûte majeure des cellules, présente dans des structures ribonucléoprotéiques qui seraient impliquées dans le transport nucléo-cytoplasmique [Scheffer *et al.*, 1995]. Bien que leur rôle physiologique reste mal compris, les protéines de voûte pourraient conférer aux cellules, une résistance aux drogues en redistribuant ces drogues à distance de leurs cibles.

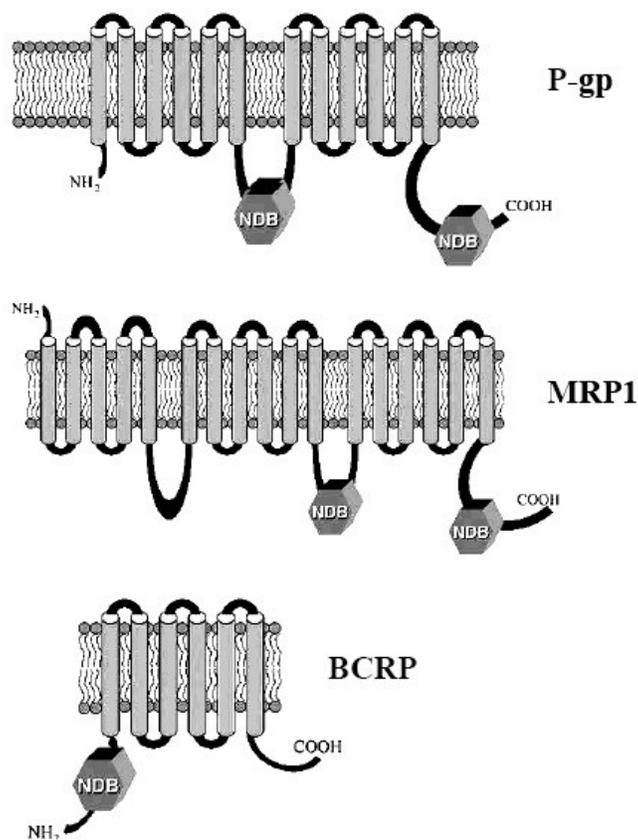


Figure 7. Structure des principaux transporteurs ABC (Scotto, 2003).

IV. Expression et rôle physiologique de la P-gp dans les tissus normaux

L'utilisation d'anticorps monoclonaux (MRK16, C219...) ou la détection des ARNm spécifiques de la P-gp a permis de mettre en évidence, l'expression de cette pompe à efflux dans de nombreux tissus sains humains, lui suggérant un rôle physiologique encore mal compris à l'heure actuelle [Fojo *et al.*, 1987 ; Thiebaut *et al.*, 1987 ; Cordon-Cardo *et al.*, 1990]. Des expériences de knock-out des gènes *mdr* chez la souris permettent néanmoins d'avancer de nombreuses hypothèses quant au rôle naturel de la P-gp [Borst et Schinkel, 1996 ; Schinkel *et al.*, 1994].

Des hauts niveaux d'expression de la P-gp sont détectés dans la muqueuse du tractus gastro-intestinal, où elle permettrait de limiter l'absorption de composés toxiques. Dans les

reins et le foie, la P-gp serait responsable de l'excrétion de xénobiotiques et de métabolites naturels dans la bile et l'urine, alors que dans la corticosurrénale, elle participerait à l'excrétion d'hormones stéroïdes. L'expression de la P-gp au niveau du placenta, de testicules et des ovaires a également été rapportée et pourrait intervenir dans la protection du fœtus et des gonades contre les xénobiotiques. Elle jouerait, en outre, un rôle particulièrement important au niveau du cerveau : son expression à la surface luminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux permet de limiter l'accumulation de substances pharmacologiques dans le cerveau, et participe ainsi au rôle de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [de Boer *et al.*, 2003 ; Löscher et Potschka, 2005]. La P-gp participe également à l'élimination des peptides d'amyloïde β qui s'accumulent dans les espaces extracellulaires du cerveau chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer en le transportant à travers la BHE [Lam *et al.*, 2001 ; Cirrito *et al.*, 2005]. La P-gp a enfin été retrouvée au niveau des cellules hématopoïétiques, aussi bien au niveau des cellules souches de la moëlle osseuse CD34⁺, dans lesquelles elle participerait à la résistance lors d'une chimiothérapie, que dans des cellules différenciées telles que les lymphocytes T CD8⁺ où elle serait impliquée dans la fonction effectrice cytotoxique de ces cellules et dans la sécrétion de cytokines [Chaudhary et Roninson, 1991 ; Chaudhary *et al.*, 1992 ; Gupta *et al.*, 1992].

V. Importance clinique de l'expression de la P-gp dans les cancers humains

Si la P-gp est exprimée modérément dans différents tissus, elle est en revanche surexprimée (par amplification du gène *mdr1* dans les lignées cellulaires cancéreuses ou par augmentation transcriptionnelle dans les tumeurs) dans de nombreux cancers humains affectant divers organes tels que les ovaires, le sein, le poumon, les surrénales, le rein, le colon ou le cerveau, mais aussi dans les cancers hématologiques, notamment les lymphomes ou les leucémies [Fojo *et al.*, 1987]. Elle est en effet détectée dans les cellules leucémiques d'un tiers des patients atteints d'une leucémie myéloïde aiguë lors du diagnostic et chez 50% des patients lors d'épisodes de rechutes [Han *et al.*, 2000, Consoli *et al.*, 2002].

De nombreuses preuves montrent maintenant que la P-gp joue un rôle important dans la résistance aux drogues utilisées dans les protocoles de chimiothérapie antitumorale. Les niveaux d'expression de la P-gp sont effectivement suffisamment élevés dans la plupart des cas pour conférer une résistance significative aux drogues. De plus, l'induction de l'expression de la P-gp dans les cellules tumorales est souvent corrélée à une mauvaise

réponse à la chimiothérapie, ce qui conditionne en grande partie le choix du traitement à adopter.

VI. Modulation de la MDR médiée par la P-gp

La découverte des différents transporteurs impliqués dans le phénomène de MDR a permis de susciter un vif intérêt dans la recherche de stratégies de réversion de la MDR. Celles-ci se sont essentiellement concentrées sur la mise au point de divers outils visant à inhiber l'activité ou l'expression de la P-gp, le principal acteur de la résistance aux drogues anticancéreuses.

VI.1. Réversion de la MDR par chimiosensibilisation des cellules tumorales résistantes

Les agents « réversants » exercent leurs effets par différents modes d'action, notamment en entrant en compétition avec la drogue au niveau du site de fixation de la P-gp. D'autres modèles suggèrent la présence de sites distincts au niveau de la P-gp. Les modulateurs pourraient ainsi agir par un mécanisme autre que l'inhibition compétitive. Certains modulateurs, notamment ceux qui sont transportés par la P-gp et qui agissent de manière compétitive vis-à-vis du substrat, stimulent l'activité ATPase de la P-gp alors que d'autres vont agir en interférant avec l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au transport du substrat.

VI.1.1. Modulateurs de première génération

La réversion du phénotype MDR fût décrite dès 1981 par Tsuruo *et al.* en utilisant un inhibiteur des canaux calciques, le vérapamil en association avec la vincristine sur des cellules leucémiques P388 résistantes [Tsuruo *et al.*, 1981]. Celui-ci potentialise effectivement l'action des drogues et restaure la sensibilité des cellules tumorales. Cette propriété de réversion du vérapamil est également partagée par d'autres inhibiteurs des canaux calciques. Le vérapamil est un substrat de la P-gp qui inhibe le transport d'agents anticancéreux d'une manière compétitive sans interférer avec le cycle catalytique de la P-gp [Schepard *et al.*, 1998].

A ce jour, de nombreuses autres molécules ayant des propriétés pharmacologiques très diverses sont capables de moduler le phénotype MDR (tableau IV). La cyclosporine A, un immunosuppresseur utilisé couramment lors de transplantation d'organes, reste, avec le vérapamil, l'un des modulateurs de la MDR les plus étudiés. Elle est capable de sensibiliser les cellules résistantes en interagissant aussi bien avec la reconnaissance du substrat qu'avec l'hydrolyse de l'ATP [Watanabe *et al.*, 1997].

Cependant, l'utilisation clinique de ces modulateurs dits de première génération a rapidement été abandonnée. Ils sont capables de réverser le phénotype MDR avec l'apparition d'une toxicité importante liée à leur fonction pharmacologique.

VI.1.2. Modulateurs de seconde génération

Des modulateurs de seconde génération présentant une toxicité réduite ont donc été synthétisés. Ces composés sont généralement des analogues structuraux des molécules citées précédemment. Ainsi, des composés tels que le dexvérapamil ou le SDZ PSC 833 (analogue non immunosuppresseur de la cyclosporine A) présentent une efficacité accrue en combinaison avec la doxorubicine, la vincristine ou le taxol par rapport à leurs analogues d'origine naturelle [Pirker *et al.*, 19909 ; Demeule *et al.*, 1999]. Ces composés peuvent cependant perturber la pharmacocinétique des drogues en agissant sur les P-gp et les autres transporteurs ABC présents au niveau des tissus sains.

VI.1.3. Modulateurs de troisième génération

Plusieurs inhibiteurs de la P-gp dits de troisième génération (XR9576, VX-710, LY 335979, etc.) ont été développés récemment grâce à des études basées sur des études de relations structure/activité de la P-gp et sont actuellement en cours d'essais cliniques [Szakacs *et al.* 2006 ; Sandler *et al.*, 2004 ; Ghandi *et al* Cancer 2007 ; Pusztai *et al.*, 2005]. La comparaison des structures de nombreux composés présentant une activité d'inhibition de la P-gp vise à définir la structure du pharmacophore idéal indispensable à la conception de nouveaux composés plus spécifiques et par conséquent plus efficaces.

Tableau IV. Substances pharmacologiques inhibant l'activité de la P-gp

Classe Pharmacologique	exemples
Anti-arythmiques	<i>quinidine, amiodarone, propafénone</i>
Antibiotiques	<i>céphalosporines</i>
Antihistaminiques	<i>terfénadine, azélastine</i>
Anti-hypertenseurs	<i>réserpine</i>
Statines	<i>atorvastatine, simvastatine, lovastatine</i>
Antimalariens	<i>quinine, quinacrine, méfloquine</i>
Inhibiteurs des canaux calciques	<i>vérapamil, dextvérpamil, nicardipine, azidopine</i>
Antagonistes de la calmoduline	<i>trifluoropérazine, chlorpromazine</i>
Immunosuppresseurs	<i>cyclosporine A, SDZ PSC 833, staurosporine, rapamycine</i>
Neuroleptiques	<i>phénotiazine, fluoxétine, haloperidol</i>
Inhibiteurs de kinases	<i>Staurosporine, CPG41251, Saflingol</i>
Inhibiteurs synthétiques	<i>MS 209, GF 120918, XR 9576, VX-710, LY 335979</i>
Stéroïdes	<i>progesterone, tamoxifène, testostérone</i>
Alcaloïdes	<i>cyclopamine, tétrandrine, fangchinoline</i>

VI.2. Amélioration de la sélectivité de libération des drogues cytotoxiques

La réversion de la MDR par chimiosensibilisation présente une efficacité limitée en raison du manque de sélectivité de distribution des agents bloquant la P-gp. Ceux-ci peuvent aussi bien exercer leur effet au niveau des P-gp présentes à la surface des cellules tumorales qu'au niveau des P-gp présentes dans les tissus sains. D'autres approches ont été mises au point afin d'améliorer le ciblage du tissu tumoral.

Les liposomes, des vésicules de faible diamètre, peuvent s'extravaser facilement dans les tissus tumoraux où les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins sont moins jointives que dans les tissus normaux. L'encapsulation des agents anticancéreux dans ces

liposomes pourrait ainsi augmenter la sélectivité de libération de ces drogues au niveau de la tumeur et réduire l'accumulation et la toxicité des drogues dans les tissus sains. Des études *in vivo* montrent qu'une régression tumorale peut être observée lorsque la doxorubicine est véhiculée par des liposomes alors que la doxorubicine seule n'a aucun effet [Cabanès *et al.*, 1998]. Cependant, dans les tumeurs exprimant des hauts niveaux de résistance, l'utilisation des liposomes ne semble pas capable d'inhiber la MDR d'une manière significative. D'autres résultats encourageants ont été obtenus en co-administrant le PSC 833 et de la doxorubicine liposomale afin d'améliorer la sélectivité de libération de la drogue et de l'agent bloquant la P-gp [Krishna *et al.*, 2000].

VI.3. Altération de l'expression du gène *MDR1*

Bien que la résistance MDR des lignées cellulaires résulte le plus souvent d'une amplification du gène *MDR1*, la surexpression de la P-gp peut aussi avoir une origine transcriptionnelle. La régulation de l'expression de la P-gp est très complexe et impliquerait des mécanismes distincts dans les tissus sains et les cellules cancéreuses [Scotto, 2003].

L'utilisation de technologies permettant de réguler sélectivement l'expression du gène *MDR1* fondées sur l'utilisation d'ARN inhibiteurs, notamment des oligonucléotides anti-sens, des ribozymes *hammerhead* (ARN dotés d'une activité enzymatique) [Kaszubiak *et al.* 2007 ; Nadali *et al.* 2007] et de petits ARN interférents (siRNA), a donné des résultats contrastés, une régulation du gène *MDR1* suffisante s'étant montrée être difficile à atteindre. La répression transcriptionnelle demeure, néanmoins, une nouvelle stratégie très prometteuse qui, non seulement serait hautement spécifique, mais aussi permettrait de prévenir l'expression de la P-gp durant la progression du cancer.

VII. Autres stratégies

Bien que de nombreuses substances pharmacologiques ont été testées, aucune ne s'est avérée être utilisable en clinique en raison de leur toxicité inhérente à leur fonction première. Ainsi, en parallèle au développement d'inhibiteurs synthétiques de la P-gp, d'autres stratégies ont été imaginées. D'une part, l'utilisation de molécules présentant une affinité importante pour la P-gp tels que les anticorps constituerait une approche permettant de cibler la P-gp avec une haute spécificité. D'autre part, des composés possédant de multiples effets

biologiques sont également étudiés à l'heure actuelle, notamment les composés polyphénoliques, qui ont montré de nombreux effets bénéfiques, en particulier par leur capacité à interférer avec la carcinogenèse et les mécanismes de résistance. Ces deux points seront développés dans la suite de ce travail.

Matériels et Méthodes

I. Systèmes biologiques

I.1. Lignées cellulaires

➤ P388

Les cellules P388 ont été fournies par le docteur Ghanem Atassi (Laboratoires Servier, Courbevoie, France). Cette lignée est à l'origine d'une leucémie monocytique expérimentale induite originellement chez une souris de souche DBA/2 par exposition au méthylchloranthrène.

➤ L1210

La lignée leucémique lymphocytaire murine a été établie en 1949 à partir d'une tumeur induite par le méthylchloranthrène chez une souris femelle de 8 mois de souche DBA.

➤ K562

La lignée humaine leucémique K562 a été établie en 1970 à partir d'une effusion pleurale d'une femme de 53 ans atteinte d'une leucémie myéloïde chronique. Ces cellules possèdent le chromosome de Philadelphie portant le gène de fusion Bcr-Abl.

➤ B16

La lignée cellulaire B16 provient d'une tumeur mélanique développée chez une souris de souche C57BL/6.

➤ MCF7

Cette lignée a été établie en 1970 à partir d'une effusion pleurale d'une femme de 69 ans de type caucasien souffrant d'un adénocarcinome mammaire métastatique. Ces cellules expriment des récepteurs d'estrogènes nucléaires.

Pour chaque lignée décrite précédemment, une sous-lignée résistante à la doxorubicine a été sélectionnée en cultivant les cellules en présence de concentrations croissantes de doxorubicine.

I.2. Conditions de culture

Les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 enrichi en L-glutamine (Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Invitrogen) préalablement décomplémenté (1 heure à 56°C). La résistance des cellules est entretenue en ajoutant 1 µM de doxorubicine (Teva Classics®, Paris, France) au milieu complet de croissance pour toutes les lignées résistantes exceptée la lignée B16/DOX qui est entretenue en présence de 0,5 µM de DOX.

Les cellules en suspension sont cultivées à une densité initiale de 10^5 cellules/ml dans des flacons de cultures de 25 cm² (Nunclon) contenant 8 ml de milieu complet de croissance. Elles sont maintenues en culture dans un incubateur à 37°C, en atmosphère saturée en humidité contenant 5% de CO₂. Tous les 3 jours, les cellules en phase exponentielle de croissance sont observées au microscope inversé à contraste de phase, comptées à l'aide de lames de comptage (Glasstic® Slide 10, Kova®), et transférées dans du milieu de culture frais.

Les cellules adhérentes B16R sontensemencées à une concentration de $6 \cdot 10^4$ cellules par ml dans une boîte de culture de 25 cm² sous un volume de 5 ml de milieu. Lorsque les cellules parviennent à 80% de confluence, elles sont lavées avec du PBS (Invitrogen), puis détachées par ajout de 0,5 ml de trypsine. Après ajout de 4,5 ml de milieu contenant 10% de SVF, les cellules sont comptées puis réensemencées dans du milieu frais.

La viabilité cellulaire est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan 0,4% (Invitrogen). Pour cela, un volume de bleu trypan est mélangé à un volume de suspension cellulaire. Le bleu trypan est exclu des cellules vivantes qui restent incolores, alors que les cellules mortes, perméables au colorant, apparaissent colorées en bleu.

Toutes les manipulations sont effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical. Avant chaque expérience, les lignées cellulaires résistantes sont cultivées dans du milieu de croissance dépourvu en doxorubicine pendant 10 jours.

I.3. Modèle animal

Les souris utilisées dans toutes les expériences sont des femelles hybrides B6D2F1 d'haplotype H2^b/H2^d âgées de 6 semaines, d'un poids moyen de 20 g (Iffa Credo, L'Arbresle, France). Elles résultent du croisement entre des femelles de la souche C57Bl/6 d'haplotype

H2^b et des mâles de la souche DBA/2 d'haplo type H2^d. Elles sont stabulées une semaine avant les expérimentations en atmosphère constante (température : 21 ± 2°C ; humidité relative : 65 ± 15% ; cycles de 12 heures de lumière de jour et 12 heures de nuit alternés) à l'animalerie de la faculté de pharmacie de Reims. Une alimentation standardisée (U.A.R. ; Vилleмоisson sur orge, France) et de l'eau du robinet sont données *ad-libitum*.

II. Effecteurs pharmacologiques

II.1. La doxorubicine

La doxorubicine ou adriamycine (MM = 580 g/mol) est un antibiotique antinéoplasique isolé en 1969 à partir d'une culture de *Streptomyces peucetius var. caesius*. Le noyau anthraquinonique de cette anthracycline est couplé à un groupe oligosaccharidique constitué d'un sucre positionné en C7 (figure 8).

La solution mère (10⁻³ M) est reconstituée à partir d'une solution injectable de chlorhydrate de doxorubicine à 2 mg/ml (Teva[®] Classics, Paris ; PM = 579,98). Les différentes dilutions de doxorubicine sont préparées extemporanément dans du milieu de culture ou dans une solution de NaCl 0,9%.

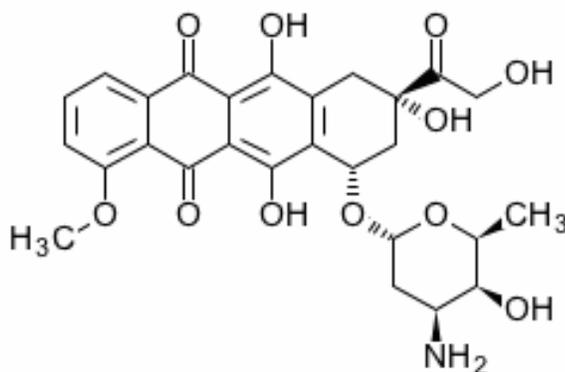


Figure 8. Structure de la doxorubicine

II.2. La vinblastine

La vinblastine est un vinca alcaloïde. Elle a été extraite pour la première fois d'une plante de la famille des Apocynacées, *Vinca Rosea Linn.*, ou *Catharanthus Roseus G. Donn.*, la pervenche de Madagascar. La molécule possède une structure dimérique unissant un noyau catharanthine (la velbanamine) à un noyau vindoline par deux atomes de carbone (figure 9). La solution mère de vinblastine est préparée en dissolvant 10 mg de sulfate de vinblastine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France ; PM = 909,1 g/mole) sous forme de poudre lyophilisée dans 1 ml d'eau stérile. Cette solution est répartie en aliquotes de 500 μ l et conservée à -20°C .

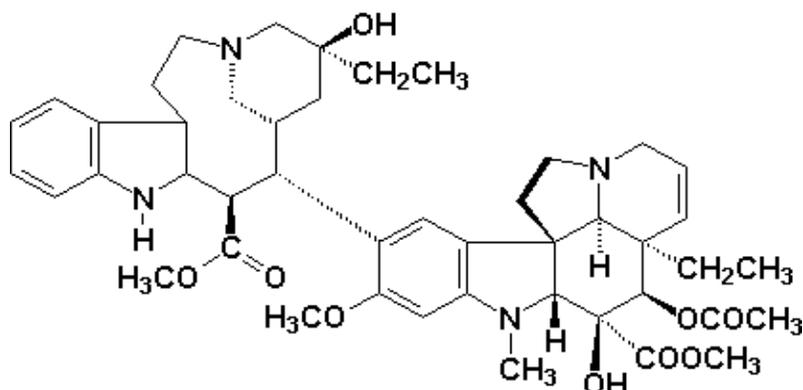


Figure 9. Structure de la vinblastine

II.3. Le vérapamil

Le vérapamil (figure 10), un dérivé synthétique de la papavérine, fait partie de la famille des phénylalkamines composée de deux groupes diméthoxyphényls séparés par une liaison aza 5-heptane. Au cours de cette étude, le vérapamil sera utilisé non pas comme antagoniste des canaux calciques mais pour sa capacité à réverser la MDR.

Le vérapamil sous sa forme chlorhydrate (Sigma ; PM = 491,1) est préparé à une concentration de 40 μ M dans du DMSO (Sigma) et sera utilisé à une concentration de 3 μ M en tant que modulateur de référence de la MDR.

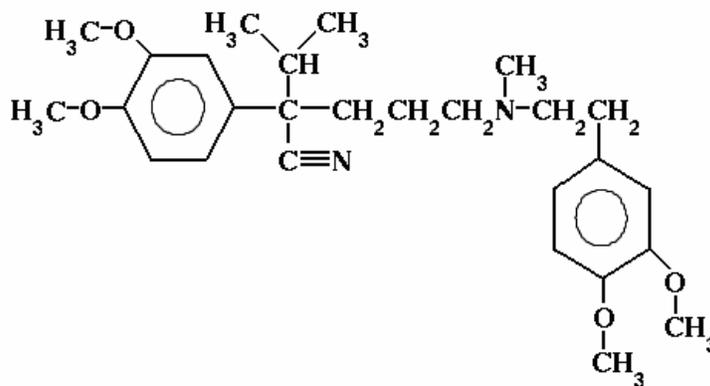


Figure 10. Structure du vérapamil

III. Mise au point d'un vaccin contenant des peptides dérivés de la P-gp présentés par des liposomes

III.1. Synthèse des peptides palmitoylés et PEGylés dérivés de la P-gp

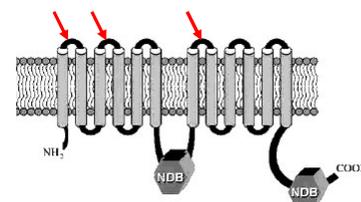
Trois séquences peptidiques dérivées des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la P-gp murine ont été synthétisées et nous ont été fournies par la société AC Immune, Lausanne. Ces séquences ont été précédemment décrites (Tosi *et al.*, 1995) et sont utilisées avec des modifications. Leur potentiel immunogène a été évalué par des analyses tridimensionnelles de modélisation moléculaire réalisées par le Pr. Manuel Dauchez (CNRS UMR 6237, Reims).

La synthèse des peptides a été réalisée par la chimie Fmoc (fluoren-9-methoxycarbonyl) en phase solide (sur résine). Les peptides ont ensuite été couplés à des chaînes d'acide palmitique ou à des chaînes de poly(éthylène) glycol liées à un lipide, le 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (PEG-DSPE) au niveau de 2 résidus lysine situés à chaque extrémité des peptides (Muhs *et al.*, 2007). Les peptides PEGylés présentent un ratio global monoPEG/diPEG de 70/30 (PM monoPEG = 5735 ± 213 Da ; PM diPEG = 9324 ± 227 Da). Les peptides palmitoylés et PEGylés ont été purifiés et soumis à un contrôle de qualité par HPLC, puis lyophilisés et conservés à -20°C . Les séquences de chaque peptide sont détaillées dans le tableau V.

Les peptides sont reconstitués dans un mélange chloroforme : méthanol : éthanol (1 : 1 : 1) afin d'obtenir une concentration de 5 mg/ml. Les tubes contenant les différents peptides sont centrifugés pour éliminer les éventuels amas ou autres débris et sont conservés à 4°C .

Tableau V. Séquences des peptides palmitoylés et PEGylés. La localisation des peptides 1, 2 et 4, sont indiquées par des flèches rouges au niveau de la structure de la P-gp.

Peptide	Séquence
mPEGp1	Ac-K(PEG-DSPE)GNMTDSFTKAEASILPSIK(PEG-DSPE)G
mPEGp2	Ac-K(PEG-DSPE)KVLTSFTNKELQAYAKK(PEG-DSPE)G
mPEGp4	Ac-K(PEG-DSPE)SRDDDHETKRQNCNK(PEG-DSPE)G
mPALMp2	K(PALM)K(PALM)GKVLTSFTNKELQAYAKGK(PALM)K(PALM)G



III.2. Préparation des liposomes

Les substances impliquées dans la composition des liposomes sont autant que possible d'origine synthétique pour éviter les possibilités de contamination par des endotoxines, prions ou virus. Les liposomes sont constitués de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) et de cholestérol. Le DMPC et le DMPG sont fournis sous forme d'ampoule contenant 2,5 ml de solution à la concentration de 10 mg/ml dans du chloroforme. Le cholestérol se présente sous forme de poudre qui est dissoute dans un mélange chloroforme/méthanol (v/v) de manière à obtenir une concentration de 10 mg/ml.

Le DMPC, le DMPG et le cholestérol sont mélangés dans les proportions molaires respectives 0,9 : 0,1 : 0,7. Ces 3 constituants proviennent de la société Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, Etats-Unis). Le monophosphoryl lipide A (MPLA, 10 mg/ml dans un mélange chloroforme : méthanol : éthanol (1 : 1 : 1) ; List Biologicals, Campbell, Californie, Etats-Unis), un adjuvant connu pour accroître la réponse immunitaire, est ajouté à une concentration de 40 µg par µmole de phospholipides. Le mélange lipidique est ensuite bien homogénéisé au vortex.

III.3. Reconstitution des peptides dans les liposomes

Les liposomes sont préparés le jour de la première immunisation et, afin de minimiser les variations de composition du vaccin au sein d'un groupe de souris, un pool de liposomes est préparé pour l'ensemble des immunisations d'un même lot d'animaux.

Le tableau VI montre les quantités des différents constituants nécessaires à la préparation des liposomes pour les 3 immunisations d'un même lot de 4 souris.

Tableau VI. Préparation des liposomes

Constituant	Volume	Quantité
DMPC	1,900 ml	19 mg (66% en volume)
DMPG	0,210 ml	2,1 mg (7% en volume)
Cholestérol	0,780 ml	7,8 mg (27% en volume)
Total	2,890 ml	28,9 mg
MPLA (facultatif)	0,120 ml	1,2 mg

Cette composition donne 28,9 mg de liposomes à laquelle on ajoute 1 mg de peptides PEGylés ou palmitoylés (200 µl de la solution mère à 5 mg/ml) :

- 1 mg de peptide lorsqu'un seul peptide est ajouté à la préparation
- 0,33 mg de chaque peptide lorsque les 3 peptides sont mélangés ensemble

Après homogénéisation, les solvants sont évaporés sous un dessiccateur à vide puis le film lipidique formé sur la paroi du tube est dissous dans du PBS stérile (4,7 ml par tube) et homogénéisé fortement pour la remise en suspension. Le contenu de chaque tube (soit 4,7 ml) est divisé en 6 tubes de 750 µl qui seront conservés à -20°C, l'étape de congélation-décongélation ne modifiant en rien les caractéristiques immunogènes du vaccin.

Avant chaque injection, les suspensions de liposomes contenant les peptides sont décongelées à température ambiante, et 200 µl d'alum 1,3% stérile (Alhydrogel®, Brenntag Biosector, Frederikssund, Danemark) sont ajoutés.

III.4. Protocole d'immunisations et prélèvements de sang

Les souris reçoivent par voie intrapéritonéale, 3 injections de 200 µl de préparation vaccinale espacées de 15 jours.

Plusieurs lots d'animaux ont été constitués afin d'étudier les différents antigènes injectés aux souris seules ou en combinaison (Tableau VII). Un groupe d'animaux a été immunisé avec une formulation contenant du MPLA afin de déterminer le rôle de cet adjuvant sur l'induction d'anticorps dirigés contre les peptides. D'autres groupes d'animaux immunisés

avec des liposomes vides (sans peptides) ou du sérum physiologique ont été immunisés comme témoins. Afin d'étudier le rôle de l'alum, un autre groupe de souris a reçu 3 injections contenant 500 µg d'alum.

Tableau VII. Composition des vaccins des différents groupes d'immunisation

Groupe	Composition du vaccin
contrôle	Sérum physiologique
Alum	500 µg d'alum
Lp0	DMPC, DMPG, cholestérol, alum
Lp1	DMPC, DMPG, cholestérol, mPEGp1, alum
Lp2	DMPC, DMPG, cholestérol, mPEGp2, alum
Lp4	DMPC, DMPG, cholestérol, mPEGp4, alum
Lp124	DMPC, DMPG, cholestérol, mPEGp1, mPEGp2, mPEGp4, alum
Lp124/MPLA	DMPC, DMPG, cholestérol, mPEGp1, mPEGp2, mPEGp4, MPLA, alum
mpp2	DMPC, DMPG, cholestérol, mPALMp2, alum

Des prélèvements de sang sont effectués au niveau de la veine de la queue des animaux. Ces échantillons sont centrifugés (14 000 rpm, 5 min, 4°C) et le sérum est ainsi dissocié du reste du sang et sera conservé à 4°C pendant 4 jours au maximum (figure 11).

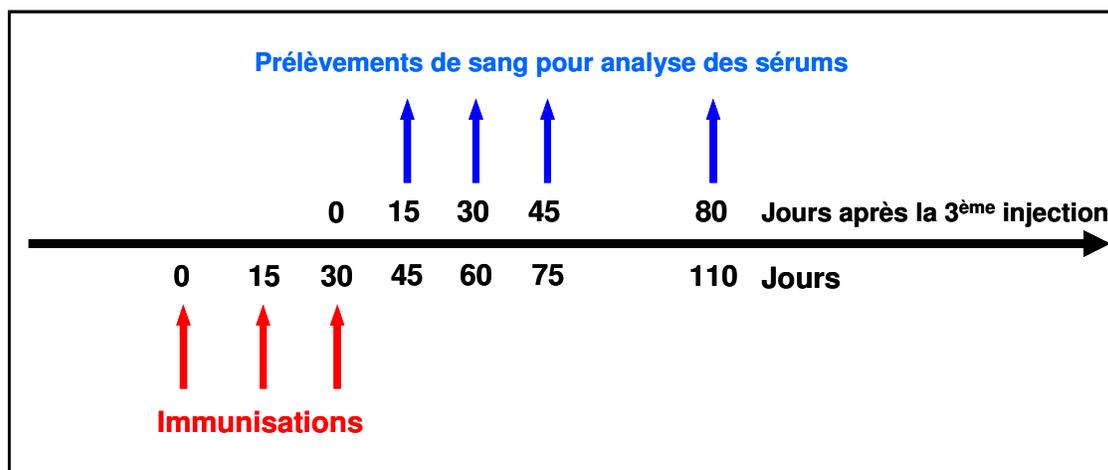


Figure 11. Protocole d'immunisations des souris et prélèvements de sang.

IV. Recherche et identification de métabolites secondaires à partir de feuilles de luzerne

L'ensemble du processus de fractionnement et de purification a été réalisé au sein du laboratoire de pharmacognosie (UMR CNRS 6229) par l'équipe dirigée par le Pr Catherine Lavaud.

IV.1. Obtention des extraits foliaires de luzerne

Les extraits foliaires de luzerne (EFL), fournis par la société PROLIVIM, sont des concentrés protéiques de feuilles de luzerne contenant, sous un volume très réduit, tous les éléments nutritifs nécessaires à une bonne nutrition. Ils sont obtenus à partir d'un procédé industriel décrit ci-dessous.

La luzerne est fauchée, broyée et pressée pour obtenir un jus vert qui sera ajusté à pH 8,5. Ce jus est ensuite porté à une température de 90°C par injection de vapeur. Les protéines précipitées entraînent avec elles les pigments, les vitamines liposolubles, les lipides et les minéraux. Une centrifugation sépare ensuite le coagulum du sérum brun résiduel. Ce coagulum est séché sur lit fluidisé puis compacté en granulés ou miettes.

L'EFL utilisé se présente sous forme de granulés de couleur verte. Il a été fourni par la société PROLIVIM. Cet extrait est enrichi d'un antioxydant, l'acide ascorbique (500 mg/kg).

IV.2. Extraction et fractionnement de l'EFL

L'EFL sous forme de poudre verte (2 kg) est mis en macération pendant 22 heures dans un mélange acétone/H₂O (60 :40) puis lixivié sur 17 heures. Le lixiviat est concentré à environ 10 litres, puis ce concentré aqueux est soumis à une extraction liquide-liquide successivement avec 10 litres de toluène, de méthyl-t-butyl ether (MtBE), d'acétate d'éthyl (AcOEt) et de butanol (ButOH). Les phases organiques de chaque fraction sont évaporées à sec et pesées : extrait au toluène : 9,5 g, extrait au MtBE : 4,9 g, extrait à l'AcOEt : 10 g, extrait au BuOH : 26 g. La phase aqueuse restante est concentrée sous vide puis congelée et lyophilisée (65 g) (figure 12).

IV.3. Fractionnement de l'extrait brut « toluène » et purification des composés contenus dans la fraction « To-1 »

Huit grammes de l'extrait au toluène sont filtrés sur silice greffée C₁₈ en phase inverse en réalisant une chromatographie liquide sous vide. L'élution est réalisée avec un gradient MeOH-H₂O et 4 fractions sont recueillies : EFL-To-1 (1,7 g ; gradient MeOH-H₂O 6:4), EFL-To-2 (2,7 g ; gradient MeOH-H₂O 8:2), EFL-To-3 (1,3 g ; gradient MeOH-H₂O 9:1) et EFL-To-4 (3,4 g ; gradient MeOH-H₂O 10:0).

La fraction To-1 est ensuite fractionnée par chromatographie sur colonne de silice en phase normale, avec l'éluant CH₂Cl₂-cyclohexane puis avec le mélange CHCl₃-MeOH (100:0 à 0:100). Des fractions de 80 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CHCl₃-MeOH (95:5).

➤ La fraction [43-46] éluee par le mélange CH₂Cl₂-MeOH (99:1) permet l'isolement du mélange des composés 4 et 5 (9,8 mg) par cristallisation dans le MeOH.

➤ La fraction [16-24] éluee par le même système de solvant est purifiée par plaque préparative dans CHCl₃ pour donner le composé 8 (10 mg).

➤ La fraction [31-25] éluee par CHCl₃ 100% puis purifiée par HPLC semi-préparative dans le système de solvant (ACN/H₂O) allant de 35 à 50% pendant 20 min permet d'isoler le composé 7 (15,9 mg).

➤ La fraction [26-30] éluee par CHCl₃ à 100% est l'objet d'une purification par chromatographie sur colonne de silice normale avec l'éluant CH₂Cl₂-MeOH (100:0 à 0:100). Les fractions de 25 ml sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CH₂Cl₂-MeOH (98:2).

Ensuite, la fraction [17-26] éluee par CH₂Cl₂ à 100% subit une purification par chromatographie sur colonne de silice en phase inverse en utilisant l'éluant MeOH-H₂O (40:60 à 100:0). Des fractions de 13 ml sont recueillies puis regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant CH₂Cl₂-MeOH (98:2).

➤ La fraction [19] éluee par le même mélange de solvant puis faisant l'objet d'une CCM sur plaque préparative dans le solvant CH₂Cl₂-MeOH (99:1) permet la purification finale du composé 3 (38 mg).

➤ La fraction [9-11] éluée par le même mélange MeOH-H₂O (50:50) fait l'objet d'une purification par HPLC semi-préparative dans le système de solvant (ACN/H₂O) isocratique à 25% permet l'isolement des 2 composés 6 (13,4 mg) et 2 (3,6 mg).

➤ La fraction [28-29] éluée par le mélange MeOH-H₂O (70:30) est passée sur une CCM sur plaque préparative dans le solvant CH₂Cl₂-MeOH (98:2) permet d'obtenir le composé 1 (10 mg) (figure 13).

La structure de ces 8 composés a été déterminée grâce à l'analyse des spectres de RMN, de masse, d'ultraviolet, d'infrarouge et à la mesure des pouvoirs rotatoires.

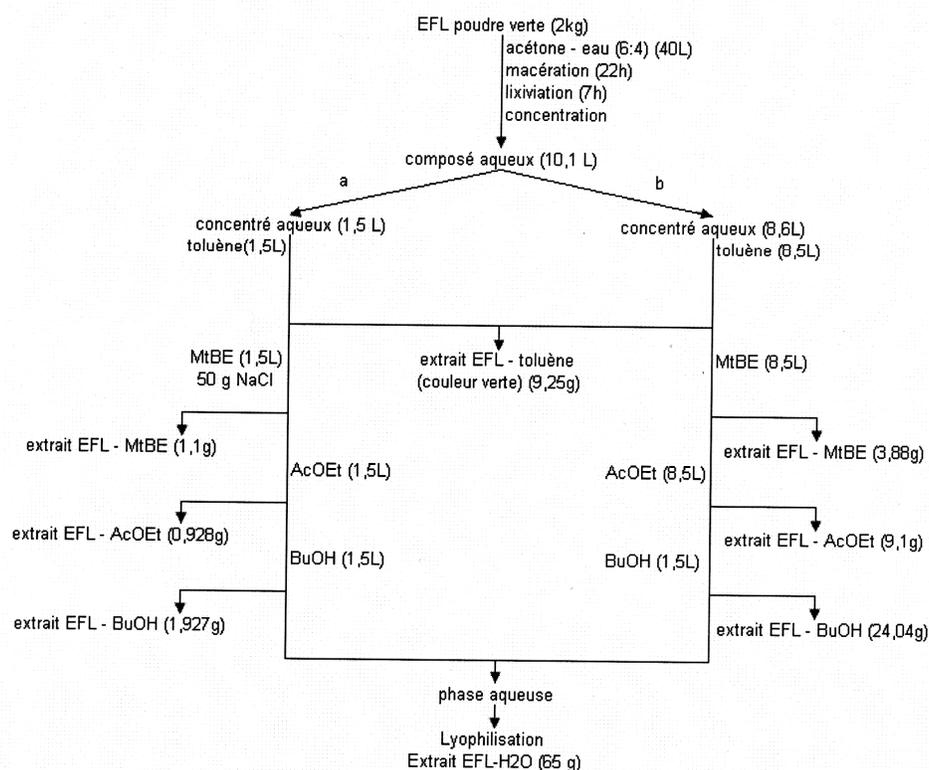


Figure 12. Obtention de 4 extraits bruts à partir de l'EFL

Les différents extraits et les composés purifiés sont solubilisés dans du DMSO aux concentrations respectives de 100 mg/ml et 30 mM. Dans chaque expérience, ils sont dilués extemporanément dans du milieu de culture aux concentrations indiquées. La concentration de DMSO dans le milieu de culture n'excède jamais 0,5% et n'a aucune incidence sur la

croissance cellulaire. Dans les expériences témoins, une quantité égale de DMSO est ajoutée au milieu de culture.

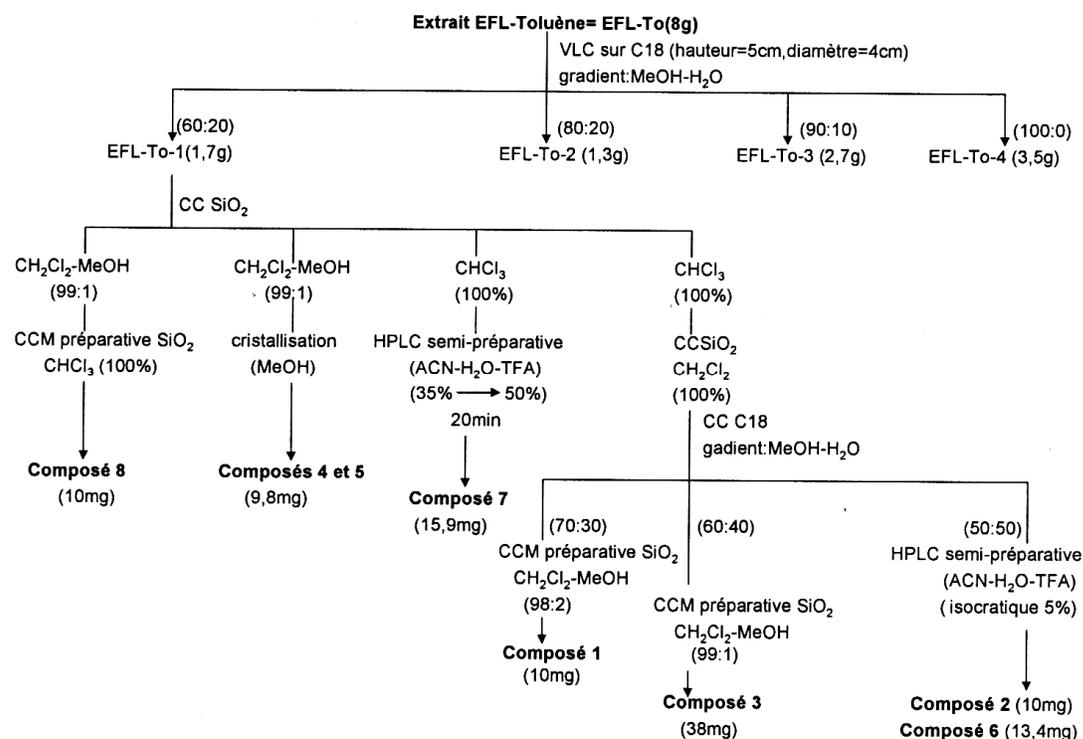


Figure 13. Purification des composés de la fraction To-1

V. Analyses *in vitro*

V.1. RT-PCR

V.1.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN a été réalisée à l'aide du kit d'extraction RNeasy® (Qiagen) basé sur une technique d'extraction d'ARN qui combine les propriétés de liaison sélective d'une membrane de gel de silice avec une centrifugation. Six cent microlitres de tampon de lyse composé d'isothiocyanate de guanidine (Tampon RLT) et de β -mercaptoéthanol sont mélangés à 5.10^6 cellules ou à un prélèvement tissulaire. Les échantillons sont broyés à l'ultraturax puis homogénéisés délicatement pendant 1 min par retournement afin de casser

l'ADN génomique et réduire la viscosité du lysat. Les échantillons sont centrifugés (3,5 min, 1500 rpm) et 600 µl d'éthanol à 70° sont ajoutés au surnageant, l'addition d'éthanol permettant d'ajuster les conditions de liaison à la colonne. 700 µl du lysat sont ensuite déposés sur la colonne. L'ARN sera fixé à la membrane de gel de silice. La fixation est facilitée par une centrifugation de 45 secondes à 10000 rpm. Trois lavages permettent d'éliminer les contaminants. La membrane est lavée successivement avec 700 µl de tampon RW1, deux fois avec 500 µl de tampon RPE, centrifugée pendant 45 secondes à 10000 rpm et 2,5 minutes à 15000 rpm respectivement. L'ARN total est élué avec 50 µl d'eau stérile RNase free par une centrifugation de 1,5 min à 10000 rpm puis est dosé à 260 et 280 nm au spectrophotomètre. Les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à la transcription inverse. La qualité de l'ARN est contrôlée sur gel d'agarose à 2% après coloration au bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant fluorescent sous UV.

V.1.2. Synthèse et amplification de l'ADN complémentaire

La RT-PCR est réalisée avec le kit SuperScriptTM Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen).

La transcription inverse de l'ARNm en ADNc est effectuée sur 1 µg d'ARN total dans le mélange réactionnel contenant les éléments suivants :

1 µl d'ARN

1 µl de dNTP 100 mM

1 µl de DTT 100 mM

1 µl de Tampon 5x (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

1 µl de Reverse Transcriptase à 200 U/µl

1 µl de Random Hexanucléotides (Boehringer)

qsp 20 µl avec de l'eau distillée

La transcription inverse est faite sur un thermocycleur (HYBRID Sprint), 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 45°C, 15 secondes à 70°C puis à 4°C. Le matériel est ensuite récupéré, dilué avec 480 µl d'eau distillée puis stocké à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Les 404 paires de bases (pb) de l'ADNc de cellules ou d'organes congelés de souris codant pour les gènes *mdr1* et *mdr3* ont été amplifiées par PCR, en utilisant les amorces

décrites dans le tableau VIII, dans le tampon suivant :

- 2,5 µl de Tampon 10x Taq DNA polymérase
- 0,2 µl (1 unité) de Taq DNA polymérase
- 1 µl (10 mM) de dNTP
- 5 µl de la solution contenant l'ADNc
- 1 µl (50 pmoles) de primers sens et anti-sens
- 2,5 mM de MgCl₂
- qsp 25 d'eau distillée

Tableau VIII. Oligonucléotides utilisés pour les analyses en PCR

Gènes	Séquences des oligonucléotides	Température	Nombre de cycles
<i>mdr1</i>	S 5'TGCTTATGGATCCCAGAGTGAC3'	61°C	40
	AS 5'TTGGTGAGGATCTCTCCGGCT3'		
<i>mdr3</i>	S 5'GAAAGATGGTGA ACTATGCC3'	63°C	40
	AS 5'TTACCAAAAAGTGGCCCACTA3'		
<i>18S rRNA</i>	S 5'GCGAATTCCTGCAGTAGCATATGCTTG3' AS 5'GGAAGCTTAGAGGAGCGAGCGACCAAAGG3'	55 – 65°C	41

Un cycle PCR comprend :

- une étape de dénaturation (94°C, 2 min)
- une étape d'hybridation (en fonction des amorces, 1 min)
- une étape d'élongation (72°C, 1 min)

Après une élongation finale de 7 min à 72°C, les produits de PCR sont additionnés d'un tampon de charge, puis déposés sur un gel d'agarose (Invitrogen) à 2% contenant du BET. La migration se fait dans un tampon TBE 0,5x (45 mM Tris-Borate pH8, 1 mM EDTA) pendant 35 min à 90 Volts.

V.2. Analyse de la réponse immunitaire par dot-blot

V.2.1. Préparation des antigènes et dépôt sur membrane de nitrocellulose

Les peptides palmitoylés et PEGylés ainsi que le MPLA sous forme lyophilisé sont reconstitués dans un mélange de chloroforme/méthanol/éthanol (1 :1 :1) à une concentration de 1 mg/ml. Cent microlitres de chaque solution de peptides et de MPLA sont prélevés. Les solvants organiques sont évaporés et le film lipidique résultant est réhydraté avec 200 µl de PBS de manière à obtenir une concentration de 0,5 mg/ml. Cent nanogrammes de chacun de ces lipopeptides et 30 ng de MPLA contenus dans 2 µl sont déposés sur des membranes de nitrocellulose et sont adsorbés pendant 30 min.

V.2.2. Immunodétection

Les membranes de nitrocellulose sont saturées avec 3 ml de solution de blocage (PBS pH 7,4, Lait écrémé 5%, Tween 20 0,1%) pendant 1 h. Les membranes sont ensuite incubées avec 2,5 µl de sérum murin dans 2 ml de tampon de lavage (PBS pH 7,4, Lait 0,5%, Tween 20 0,1%) pendant 2 h. Après trois lavages, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (GAM-IgG-HRP, Uptima, Interchim, Montluçon, France) dilué au 1/2500^{ème} dans 3 ml de tampon de lavage puis sont lavées 2 fois avec 3 ml de tampon de lavage et 2 fois avec 3 ml de PBS. Un substrat chimioluminescent pour la peroxydase (Uptilight HRP chemiluminescent substrate, Uptima) est déposé à la surface des membranes (500 µl) pendant 1 min puis les membranes sont égouttées et placées entre 2 films plastiques dans une cassette froide. Les membranes sont immédiatement exposées en autoradiographie. La lumière émise résultant de la réaction d'oxydation du luminol par la peroxydase est collectée sur des films CL X-posure (Pierce®) avec des temps variants de quelques secondes à 10 min selon l'importance du signal. Le film photo est scanné et analysé par densitométrie (Typhoon, Amersham Biosciences).

Les titres en anticorps sont estimés grâce à une gamme de dilutions d'IgG murines purifiées (Uptima).

V.3. Western blot

V.3.1. Obtention des extraits cellulaires

Dix millions de cellules sont récupérées et centrifugées (1200 g, 10 min, 4°C). Le culot cellulaire est lavé 2 fois dans 10 ml de PBS glacé (Invitrogen) puis la suspension cellulaire est centrifugée comme précédemment. Après avoir retiré le surnageant, le culot de cellules est repris dans du tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 0,5% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS ; Sigma) additionné d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma) et de 0,5 mM de PMSF (Sigma) pendant 15 minutes dans la glace. Le lysat est passé au travers d'une aiguille afin d'aider à la solubilisation. Le lysat obtenu est centrifugé (15 000 g, 20 minutes, 4°C) afin d'éliminer les débris. Le surnageant contenant les protéines est recueilli, aliquoté puis conservé à -20°C. Les protéines contenues dans chaque échantillon sont dosées par la méthode de Bradford et les concentrations sont déterminées à partir d'une gamme étalon de sérum albumine bovine (Sigma).

V.3.2. Electrophorèse SDS-PAGE, transfert et immunodétection

Une quantité égale de protéines est mélangée avec du tampon d'échantillon 4x (NuPAGE® LDS Sample Buffer, InVitrogen) et du tampon réducteur 10x (NuPAGE® Sample Reducing Agent, InVitrogen). Les échantillons (20 µl) ainsi que les marqueurs de poids moléculaire (10 µl ; Amersham Biosciences) sont déposés sur un gel précoulé de polyacrylamide d'un gradient 4-12% (Invitrogen). La migration s'effectue pendant 35 min à 200 Volts dans du tampon de migration (NuPAGE® MES SDS Running Buffer 20x, Invitrogen). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) à l'aide d'un appareil de transfert (Invitrogen). Le transfert est réalisé pendant 1h à 35 Volts dans du tampon de transfert (NuPAGE® Transfer Buffer, InVitrogen ; 10% méthanol). L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration pendant 5 min de la membrane avec une solution de rouge ponceau S (Sigma) permettant de visualiser les protéines. Après un rinçage dans de l'eau distillée, la membrane est saturée dans une solution de blocage (fournie par le kit Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection Kit, Invitrogen) pendant 30 min à température ambiante. Après 2 rinçages, la membrane est incubée pendant 1 h avec l'anticorps primaire approprié (tableau IX) ou avec l'immun sérum dilué au 1 :1000^{ème}

dans la solution de lavage. Après 3 lavages, la membrane est incubée avec la solution d'anticorps secondaire (fournie par le kit Western Breeze) conjugué à la phosphatase alcaline pendant 30 min. La membrane est encore lavée 2 fois avec la solution de lavage et 2 fois avec de l'eau distillée, puis la solution contenant le substrat de la phosphatase alcaline est déposée sur la membrane pendant 5 min à l'obscurité. La membrane est égouttée, couverte d'un film plastique, puis exposée en cassette à un film photographique CL X-posure (Pierce®) pendant 1 à 10 min selon l'intensité du signal. L'analyse densitométrique est effectuée grâce à l'utilisation du logiciel Image J. L'intensité des bandes correspondant à chaque protéine est normalisée par rapport à celle de l'actine.

Tableau IX. Anticorps monoclonaux utilisés en western blot

Anticorps	Clone	Dilution	Fournisseur
Actine	C-2	1 :700	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-2	10C2	1:700	Beckman Coulter
Bcl-X_L	2H12	1:700	Beckman Coulter
Bax	6A7	1:700	Beckman Coulter
Caspase 3	T46L	1:700	Santa Cruz Biotechnology
PARP-1	5A5	1:700	Santa Cruz Biotechnology
P-gp	JSB-1	1:750	Protéogenix

V.4. Mesure de la viabilité cellulaire par le test au 3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT)

Le principe de ce test repose sur la capacité des deshydrogénases mitochondriales à convertir le MTT en un précipité pourpre de formazan par clivage du cycle tétrazolium. Après dissolution de ce précipité, l'absorbance est lue et est corrélée au nombre de cellules vivantes.

Les cellules cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de SVF 10% sont ensemencées dans les puits d'une plaque 96 puits (Nunc) à une densité de 5 000 cellules par puits dans un volume de 100 µl. Un volume égal de milieu complet de culture contenant les composés ou extraits à tester et/ou les différents agents chimiosensibilisants aux concentrations indiquées est ajouté dans les puits appropriés. Les cellules sont ensuite laissées à 37°C ; 5% CO₂ pendant la durée indiquée. A la fin du temps de culture, 20 µl de

MTT (Sigma) dissout dans du PBS à une concentration de 2,5 mg/ml (pH 7,2) sont ajoutés à chaque puits puis les cellules sont remises à l'étuve pendant 3 h. Les cellules sont alors centrifugées (1000 rpm, 20 min), le surnageant est aspiré, et le dépôt cristallin de formazan est dissout par addition de 200 µl de DMSO (Gibco). Une attente supplémentaire de 10 min à l'obscurité assure la dissolution totale des cristaux.

La mesure de la densité optique à 540 nm, longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale du formazan, ainsi qu'une correction à 640 nm sont effectués automatiquement grâce à un lecteur de microplaques (Multiskan Ascent, Labsystems). Chaque mesure est effectuée en triplicate.

Le pourcentage de la viabilité cellulaire en présence ou non d'agent révertant (vérapamil ou anticorps induits) est déterminé par le calcul suivant : moyenne des absorbances des puits traités / moyenne des absorbances des puits témoins x 100.

V.5. Marquage de l'ADN au Hoechst 33342

Des évènements tels que la condensation et la fragmentation de la chromatine qui surviennent au cours de l'apoptose peuvent être visualisés en colorant l'ADN des cellules avec du Hoechst 33342 qui se lie à l'ADN.

Après leur traitement pendant la durée indiquée, les cellules sont récupérées puis lavées dans du PBS. Après centrifugation (1000 g, 5 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans 40 µL de paraformaldéhyde 4% contenant 1% de Triton X-100 (Sigma) pendant 10 minutes. Le paraformaldéhyde permet de fixer les cellules alors que le Triton X-100 permet de percer la membrane plasmique, ce qui facilite l'entrée du Hoechst. Les cellules sont ensuite déposées sur une lame qui est cytospinée (700 rpm, 5 min). Une goutte de Hoechst 33342 à une concentration de 0,5 µg/ml (Molecular Probes) est déposée sur le dépôt cellulaire. La lame est laissée 15 minutes à l'obscurité avant d'être rincée à l'eau. Quelques gouttes de milieux de montage sont ajoutées avant de déposer une lamelle. Celle-ci est collée avec du vernis à ongles. La lame est ainsi prête pour l'observation au microscope à fluorescence ou à contraste de phase et peut être conservée plusieurs jours à 4°C.

V.6. Analyse de la fragmentation de l'ADN

Lors de l'apoptose, des endonucléases sont activées et catalysent le clivage de l'ADN entre les nucléosomes, des complexes protéiques autour desquels s'enroulent l'ADN sur environ 180 pb. Ainsi la migration des fragments d'ADN des cellules apoptotiques permet de mettre en évidence un profil de dégradation de l'ADN en « barreau d'échelles », constitué de fragments de multiples de 180 pb, une caractéristique des cellules en apoptose.

V.6.1. Extraction d'ADN

Après leur traitement pendant la durée indiquée, les cellules sont récupérées puis lavées dans du PBS. Après centrifugation (1000 g, 5 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans 90 µl de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100), vortexées puis laissées 15 minutes dans la glace. L'ARN est dégradé en ajoutant 10 µl de RNase A (Sigma) à 1 mg/ml pendant 1 h à 37°C. Les protéines associées à l'ADN sont hydrolysées par ajout de 5 µl de protéinase K (Sigma) à 20 mg/ml pendant 1 h à 37°C. Les extraits sont ensuite centrifugés (15 000 g, 15 min, 4°C) et le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un nouveau tube. La précipitation de l'ADN est réalisée en ajoutant au surnageant 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C. Après une nuit à -20°C, les tubes sont de nouveau centrifugés (15 000 g, 15 min, 4°C). Le culot d'ADN est rincé avec 500 µl d'éthanol 70% et séché à l'air avant d'être dissout dans 20 µl de tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

V.6.2. Electrophorèse des fragments d'ADN

Après avoir dosé dans l'UV chaque solution d'ADN par la mesure de l'absorbance à 260 nm et vérifié leur pureté (rapport DO260nm/DO280nm compris entre 1,8 et 2), 1 µg d'ADN contenu dans 20 µl de tampon TE sont déposés sur un gel contenant 1,2% d'agarose et du bromure d'éthidium. La migration dure 30 minutes. Les fragments d'ADN sont directement visualisés en lumière UV grâce à la présence de BET qui s'intercale entre les bases de l'ADN et qui est visible sous UV.

V.7. Analyse par cytométrie en flux

V.7.1. Etude de la réactivité des sérums avec les cellules

La réactivité des anticorps induits avec la P-gp a été déterminée par marquage immunofluorescent indirect des cellules P388R.

Les cellules P388R (10^5 cellules) sont incubées pendant une heure dans du milieu RPMI/SVF 10% contenant 10% de sérum des souris des différents lots récupérés 15 jours après la dernière immunisation, sous un volume final de 100 μ l. Trois lavages avec 1 ml de PBS/SVF 2% sont ensuite effectués (centrifugation 200g, 10 min, température ambiante). Le surnageant est éliminé puis 100 μ l de PBS/SVF 2% contenant l'anticorps secondaire (anti IgG de souris couplé à la fluorescéine-isothiocyanate, FITC) dilué au 1/100^{ème} sont mis en présence des cellules P388R pendant 30 minutes. Un dernier lavage au PBS/SVF 2% et 2 lavages au PBS filtré sont effectués avant l'analyse par cytométrie de flux (FACSAria, Becton Dickinson). Pour chaque échantillon, l'analyse est effectuée sur 100 000 cellules. Les longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximales du FITC sont respectivement de 490 nm et 523 nm. Les résultats sont exprimés en unités de fluorescence, proportionnelles à la quantité d'anticorps fixés à la surface des cellules.

V.7.2. Analyse du contenu intracellulaire en ADN

Lors de l'apoptose, les corps apoptotiques vont contenir une quantité d'ADN inférieure à 2n. De ce fait, après un marquage à l'iodure de propidium qui est un intercalant de l'ADN, ces cellules émettent une fluorescence réduite et produisent un pic SubG1. Après leur traitement, 500 000 cellules sont prélevées et centrifugées (1000 rpm, 5 min, 4°C). Après deux lavages au PBS, les cellules sont perméabilisées dans 1 ml d'éthanol froid à 70% et placées à 4°C toute la nuit. Puis, elles sont à nouveau centrifugées et lavées dans du PBS. Le culot est alors repris dans 1 ml de PBS contenant à 100 mg de RNase A (Sigma) et 50 μ g d'iodure de propidium (Molecular Probes). Après incubation à l'obscurité et à 37°C pendant 30 min, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACScalibur, Becton Dickinson). Après exclusion des débris, l'analyse de fluorescence de 10000 évènements permet de quantifier la proportion de cellules ayant un contenu en ADN inférieur à 2n. Ces cellules sont considérées comme apoptotiques.

V.7.3. Mesure de l'accumulation intracellulaire en DOX

L'activité des différents modulateurs de la résistance (sérum, composés isolés) a également été évaluée par la mesure de l'accumulation intracellulaire de la DOX dans les cellules P388/DOX.

La doxorubicine possède dans sa structure un noyau tétracyclique qui lui confère un spectre de fluorescence caractéristique avec une longueur d'onde d'excitation de 470 nm et une longueur d'onde d'émission de 585 nm. La fluorescence émise par la doxorubicine, lorsqu'elle est excitée, peut ainsi être détectée par cytométrie en flux.

Cent mille cellules P388/DOX sont incubées dans du RPMI/SVF 10% à 37°C pendant 1h30 en présence des différents modulateurs avant l'ajout de 1 µM de doxorubicine. Après 1h, les cellules sont centrifugées (200g, 10 min, température ambiante) puis remises en suspension dans 200 µl PBS/SVF 2% (200 µl) et analysées par cytométrie en flux (FACS Aria) (longueur d'onde excitation : 470 nm, longueur d'onde d'émission : 585 nm). Pour chaque échantillon, l'analyse est effectuée sur 100 000 cellules. Le vérapamil (3 µM) a été utilisé dans les mêmes conditions en tant que modulateur de référence.

VI. Analyses *in vivo*

VI.1. Evaluation *in vivo* de l'efficacité du vaccin en association avec une chimiothérapie

Afin d'évaluer le potentiel des anticorps induits à restaurer *in vivo* la sensibilité des cellules P388 chimiorésistantes à un traitement chimiothérapeutique, 10⁶ cellules P388/DOX dans 200 µl de sérum physiologique ont été inoculées par voie intrapéritonéale chez les souris pré-immunisées avec les différentes préparations vaccinales 7 semaines après la dernière immunisation. Une chimiothérapie à base de doxorubicine (5,5 mg/kg) et de vinblastine (2,5 mg/kg) est instaurée dès le lendemain de l'injection des tumeurs. Le protocole d'injections est présenté dans la figure 14. Pendant toute la durée du traitement, un suivi du comportement, de l'aspect et du poids des souris est effectué.

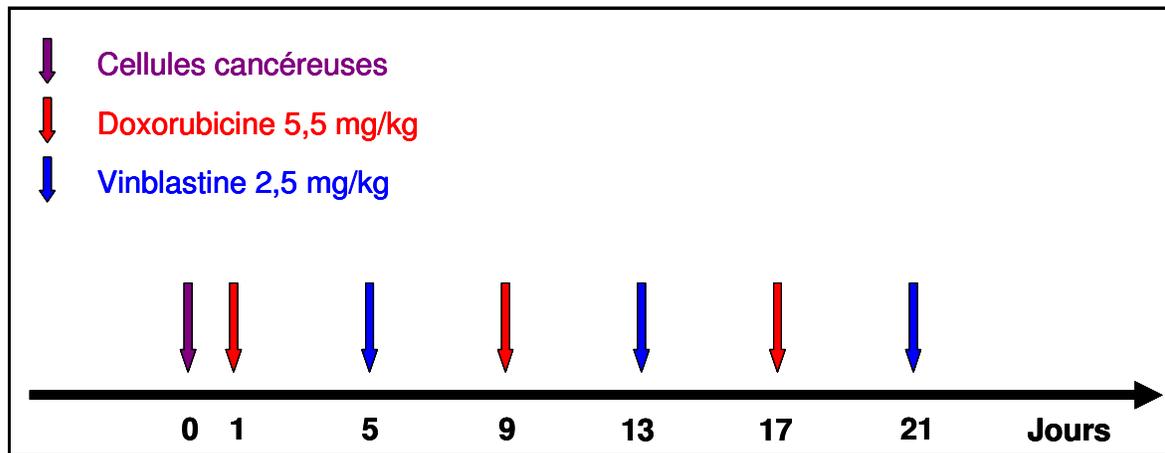


Figure 14. Protocole de chimiothérapie mis en place après l'inoculation des tumeurs. Au jour 0, les souris reçoivent une injection de 10^6 cellules P388R par voie *i.p.*, puis de la doxorubicine (5,5 mg/kg) et de la vinblastine (2,5 mg/kg) sont injectées aux jours 1, 9, 17 et 5, 13, 21 respectivement.

VI.2. Etude anatomo-pathologique des organes des souris

Les études histologiques ont été réalisées au Laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques (Pr Marie-Danièle Diebold) du CHU de Reims.

VI.2.1. Inclusion des organes en bloc de paraffine

Les souris sont sacrifiées et les organes qui expriment naturellement la P-gp (reins, glandes surrénales, pancréas, rate, foie, cœur, poumon, ovaire) sont prélevés et fixés dans du formol 10% pH 7,4 pendant 18 heures environ.

Les organes fixés sont coupés en 2, puis sont progressivement déshydratés par passages successifs dans des solutions alcooliques de plus en plus concentrées jusqu'à ce que toute l'eau des tissus et du milieu de fixation ait été soustraite et que l'échantillon soit totalement imprégné d'alcool absolu:

alcool 80% (30 min) → alcool 95% (30 min) → alcool 95% (30 min) → alcool 95% (45 min)
 → alcool 100% (45 min) → alcool 100% (1h) → alcool 100% (1h).

L'alcool est ensuite remplacé par un solvant organique, le xylène (2 bains d'1 heure), dans lequel peuvent se dissoudre à la fois l'alcool et la paraffine chauffée à une température dépassant juste son point de fusion (56°C) (2 bains d'1 heure). L'échantillon est alors immergé dans un moule contenant de la paraffine puis celle-ci est solidifiée à température ambiante.

La paraffine sert de support à l'échantillon et permet de réaliser des coupes de 2 à 7 µm, sans déformer la structure ni l'architecture cellulaire grâce à un microtome. Les coupes sont ensuite étalées sur des lames de verre superfrost, séchées 25 minutes à 55°C puis placées dans un automate à coloration (DRS 60A Bayer Diagnostics) où la paraffine est enlevée à l'aide d'un solvant organique, le xylène (2 bains de 10 minutes).

Les coupes sont alors réhydratées en utilisant des solutions alcooliques de plus en plus concentrées (par exemple alcool 100% → alcool 90%, 2 bains de 2 minutes au moins) et rincées à l'eau distillée pendant 30 secondes. Quand la réhydratation est complète, les coupes sont colorées par la coloration Hématéine – Phloxine – Safran.

VI.2.2. Coloration à l'Hématéine – Phloxine – Safran (HPS)

L'utilisation de 3 colorants sur la même préparation, l'hémalum de Mayer ou hématéine (bleu), la phloxine (rouge) et le safran (jaune) est la méthode la plus courante de coloration des tissus biologiques. Ces 3 colorants permettent de mettre en évidence respectivement les noyaux cellulaires, le cytoplasme, et le collagène présent dans la matrice extracellulaire.

Les coupes sont incubées dans l'hémalum de Mayer pendant 3 minutes. Après un rinçage de 30 secondes à l'eau courante, les lames sont différenciées dans un bain d'acide-alcool (500 ml d'alcool 95% mélangés à 25% d'acide chlorhydrique) de 15 secondes et rincées à nouveau dans un bain d'eau distillée. Les lames sont colorées 2 minutes avec de la phloxine B. Un rinçage de 30 secondes est ensuite réalisé dans un bain d'acide acétique à 0,2%. Les lames sont déshydratées dans des bains successifs de 30 secondes d'alcool 70, 95 et 100% puis colorées par du safran en solution alcoolique (5 à 10 secondes). Les lames sont à nouveau rincées avec de l'alcool 100% pendant 30 secondes puis avec du xylène pendant 1 minute et sont séchées dans l'automate 20 minutes environ puis sont montées à l'Eukitt dans une colleuse de lamelles (Shandon).

Première partie

*Sensibilisation des cellules tumorales
multidrug-resistantes par l'induction
d'anticorps ciblés contre
la P-glycoprotéine*

Introduction

La recherche d'inhibiteurs de la P-gp menée depuis plusieurs décennies a révélé qu'une multitude de molécules possédant des structures diverses sont capables de moduler son activité *in vitro*. Les différents essais cliniques réalisés ont montré que la plupart de ces modulateurs ont une efficacité limitée. En effet, leur dose maximale utilisable *in vivo* est rapidement atteinte en raison de l'apparition d'effets toxiques dus à leur activité pharmacologique première.

Face à ces problèmes de toxicité, de nouvelles approches visant à cibler plus spécifiquement la P-gp ont été développées. Parmi ces approches, la manipulation du système immunitaire et l'utilisation d'anticorps ciblant la P-gp représentent un moyen d'obtenir des outils de réversion hautement spécifiques. Ainsi, de nombreux anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement des épitopes intracellulaires ou extracellulaires de la P-gp ont été générés *in vitro* (tableau X). Ces anticorps furent dans un premier temps utilisés pour détecter l'expression de la P-gp dans les cellules et les tissus (Kartner N *et al.*, 1985, Thiebaut F *et al.*, 1987), puis de nombreuses études ont montré qu'ils pouvaient inhiber son activité.

Tableau X. Principaux anticorps monoclonaux spécifiques de la P-gp.

Anticorps monoclonal	Epitope	Référence
265/F4	extracellulaire	Lathan <i>et al.</i> , 1985
C219	intracellulaire	Kartner <i>et al.</i> , 1985
MRK16	extracellulaire	Hamada et Tsuruo, 1986
JSB-1	intracellulaire	Scheper <i>et al.</i> , 1988
HYB-612	intracellulaire	Meyers <i>et al.</i> , 1989
HYB-241	intracellulaire	Meyers <i>et al.</i> , 1989
HYB-195	intracellulaire	Meyers <i>et al.</i> , 1989
C494	intracellulaire	Georges <i>et al.</i> , 1990
UIC2	extracellulaire	Mechetner et Roninson, 1992
4E3	intracellulaire	Arceci <i>et al.</i> , 1993
MM12.10	extracellulaire	Romagnoli <i>et al.</i> , 1999

En 1986, les travaux de Tsuruo *et al.* montrent que l'anticorps monoclonal MRK16, reconnaissant un épitope extracellulaire de la P-gp [Vasudevan *et al.*, 1998] potentialise l'accumulation intracellulaire ainsi que la toxicité de la vincristine et de l'actinomycine D dans les cellules K562 exprimant la P-gp et inhibe la formation de tumeurs chez la souris en association avec une chimiothérapie [Hamada et Tsuruo, 1986]. La conjugaison de l'anticorps MRK16 à une toxine bactérienne permettant de diriger spécifiquement l'action de la toxine contre les cellules MDR exprimant la P-gp présente une cytotoxicité plus importante vis-à-vis des cellules MDR que des cellules tumorales sensibles [Fitzgerald *et al.*, 1987]. L'anticorps MRK16 a également été couplé à des liposomes contenant une drogue cytotoxique afin d'améliorer l'interaction des liposomes avec les cellules tumorales exprimant la P-gp [Matsuo *et al.*, 2001]. D'autres anticorps monoclonaux, notamment l'anticorps UIC2, ainsi que des fragments recombinants d'anticorps monoclonaux ont été développés et utilisés avec succès pour inhiber l'efflux de drogues médié par la P-gp [Mechetner et Roninson, 1992 ; Heike *et al.*, 2001]. Les anticorps monoclonaux modulant le transport des agents anticancéreux reconnaissent généralement des épitopes extracellulaires de la P-gp. Cependant, l'anticorps C219, qui reconnaît un épitope intracellulaire, est capable de moduler l'activité ATPase de la P-gp nécessaire au transport de ses substrats [Kokubu *et al.*, 1997].

Bien que de nombreux anticorps reconnaissant la P-gp aient été générés *in vitro* à partir d'hybridomes, très peu d'études ont rapporté l'utilisation d'approches immunothérapeutiques ciblant la P-gp. Il a été montré que l'immunisation avec des peptides dérivés des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la P-gp murine présentés par des liposomes induisent une réponse immunitaire humorale contre les peptides 2 et 4 uniquement (Tosi *et al.*, 1995). Ces anticorps sont capables d'augmenter l'accumulation de doxorubicine dans des cellules L1210 multidrug-resistantes exprimant la P-gp, et d'amplifier sa cytotoxicité. Par la suite, des travaux menés au sein de notre laboratoire ont montré que les anticorps induits par l'immunisation avec des peptides dérivés des 3 mêmes boucles extracellulaires et ancrés à la surface de liposomes par des chaînes palmitoylées restaurent la sensibilité à la doxorubicine *in vitro* et *in vivo* (Pawlak-Roblin *et al.*, 2004) sans modifier l'expression du gène *mdr1* dans les organes exprimant naturellement la P-gp (Perrin *et al.*, 2007).

Au cours de cette première partie, nous avons induit la synthèse d'anticorps contre les peptides dérivés des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la P-gp. Comme l'induction d'une réponse immunitaire humorale contre un antigène dépend fortement de la présentation de

celui-ci au système immunitaire par un système de présentation et/ou un adjuvant, nous avons étudié l'influence du système d'ancrage des peptides à la surface des liposomes. Deux types d'ancrage ont été utilisés : d'une part, la palmitoylation, qui consiste à greffer une (des) chaîne(s) constituées de 16 atomes de carbones aux deux extrémités du peptide, et d'autre part la PEGylation, où le peptide est alors conjugué à une ou plusieurs chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG).

La PEGylation est un procédé consistant à fixer de manière covalente des groupements PEG de masse moléculaire variable à des polypeptides ou d'autres molécules thérapeutiques. Elle est utilisée afin de modifier les propriétés pharmacocinétiques de ces molécules. La liaison du PEG aboutit à la formation d'un composé de taille importante (en fonction du degré de polymérisation des sous-unités éthylène glycol) qui possède par conséquent une clairance rénale diminuée et un temps de circulation augmenté [Caliceti et Veronese, 2003]. De plus, des études menées sur des groupes PEG en solution révèlent que chaque sous-unité éthylène glycol s'associe avec plusieurs molécules d'eau. Cette affinité du PEG pour l'eau permet d'obtenir des molécules PEGylées qui se comportent comme des composés qui sont cinq à dix fois plus volumineux qu'une protéine soluble ayant une masse moléculaire similaire [Caliceti et Veronese, 2003]. Ainsi, la présence du polymère associé aux molécules d'eau forme un bouclier qui protège la molécule d'intérêt des dégradations enzymatiques, d'une clairance rénale rapide et de la reconnaissance par le système immunitaire. Plusieurs protéines PEGylées sont utilisées comme médicaments, notamment l'interféron $\alpha 2b$ (PegIntron ®, Pegasys ®) [Ahn et Flamm, 2004, Keam et Cvetkovic, 2004] et l'asparaginase (Oncaspar®) [Hawkins *et al.*, 2004] dans le traitement de l'hépatite C et des leucémies, respectivement. D'autres molécules telles que l'insuline [Hinds et Kim, 2002] ou la camptothécine (Prothécan ®) [Greenwald *et al.*, 2003] possèdent une demi-vie augmentée tout en conservant leur activité biologique lorsqu'elles sont PEGylées.

Les poids moléculaires des PEG utilisés dans des applications biomédicales sont généralement compris entre quelques centaines à environ 20 000 daltons.

Cependant, les protéines et peptides PEGylés présentent une immunogénicité fortement réduite [Veronese et Mero, 2008]. Il a été effectivement montré que l'immunisation avec un peptide synthétique dérivé du récepteur de l'acétylcholine et conjugué à une chaîne PEG diminue la réponse anticorps, aboutissant à un état de tolérance vis-à-vis du récepteur non conjugué dans un modèle expérimental de myasthénie auto-immune [Atassi *et al.*, 1992].

Ce manque d'immunogénicité peut être comblé en intégrant le conjugué PEG-peptide dans la membrane de liposome. La réponse anticorps dirigée contre un anticorps monoclonal est supérieure lorsque celui est ancré à la surface de liposomes par une chaîne PEG [Harding *et al.*, 1997]. De plus, il a été montré que les liposomes stabilisés stériquement par l'insertion de chaînes PEG (connus sous le nom de liposomes « furtifs ») présentent un temps de circulation augmenté par rapport à des liposomes ne contenant pas de PEG [Immordino *et al.*, 2006, Allen *et al.*, 1991]. Ces chaînes PEG jouent un rôle de barrière stérique, empêchant l'interaction des liposomes avec les opsonines plasmatiques. Ainsi, les liposomes furtifs sont éliminés moins rapidement par les cellules phagocytaires mononucléées [Du *et al.*, 1997].

Afin d'optimiser la production d'anticorps anti-P-gp, nous avons étudié l'effet d'un adjuvant, le monophosphoryle lipide A (MPLA) sur l'intensité de la réponse humorale. Le MPLA est un adjuvant dérivé du lipopolysaccharide (LPS) de *Salmonella minnesota* R595. La portion du LPS appelée lipide A a longtemps été utilisée comme un puissant adjuvant mais sa toxicité élevée a limité son utilisation clinique. L'excision d'un groupement phosphate et d'un acide gras du lipide A a permis d'obtenir le MPLA qui possède une toxicité fortement diminuée tout en ayant conservé les propriétés adjuvantes du lipide A [Baldrick *et al.*, 2002]. Plusieurs vaccins utilisant le MPLA comme adjuvant ont été testés en essais cliniques contre des infections parasitaires ou virales qui nécessitent le développement d'une réponse immunitaire de type Th1 [Stoute *et al.*, 1998, Jones et Cunningham, 2004]. De plus, le MPLA s'est également révélé être un puissant stimulateur de la réponse immunitaire humorale [Caglar *et al.*, 2005, Nevens *et al.*, 2006].

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet des ces anticorps sur la sensibilité des cellules P388 multidrug-resistantes vis-à-vis de la doxorubicine. L'effet des anticorps induits par l'immunisation avec des préparations liposomales présentant séparément chaque peptide a également été étudié afin de déterminer l'efficacité de chacun des trois peptides.

Résultats

I. Caractérisation des lignées cellulaires P388 et P388/DOX

I.1. Sensibilité des cellules vis-à-vis des substances anticancéreuses

Les cellules P388/DOX ont été sélectionnées en exposant la lignée parentale P388 à des concentrations croissantes de DOX. Ainsi, nous avons, dans un premier temps, étudié l'effet de la DOX sur la viabilité des deux lignées utilisées au cours de cette étude par un test au MTT. La DOX induit une diminution rapide de la viabilité des cellules P388 ($IC_{50} = 60$ nM) alors qu'elle n'a aucun effet sur la viabilité des cellules P388/DOX à des concentrations allant jusqu'à $1 \mu\text{M}$ ($IC_{50} = 6,1 \mu\text{M}$) (tableau XI, Figure 15a). Les cellules P388/DOX se caractérisent par une résistance 200 fois plus importante vis-à-vis de la DOX par rapport aux cellules P388. Nous pouvons également remarquer que les cellules P388/DOX présentent également une résistance à la vinblastine (VBL), une autre substance anticancéreuse à laquelle elles n'ont jamais été exposées (tableau XI, Figure 15b).

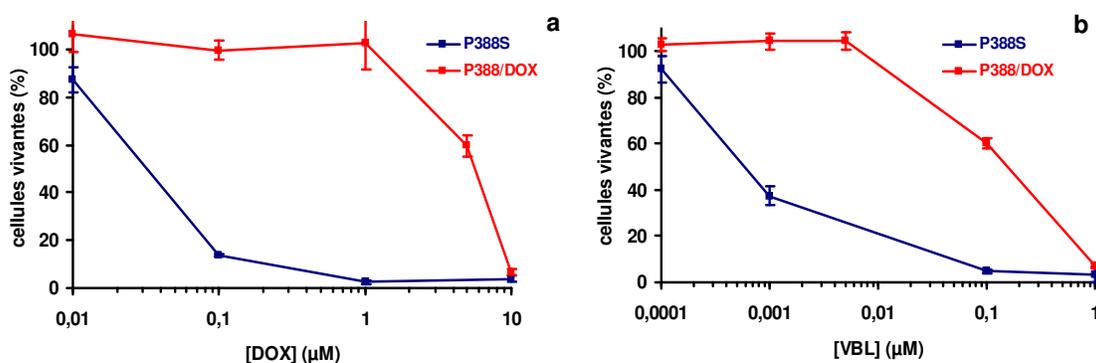


Figure 15. Effets de la DOX (a) et de la VBL (b) sur la viabilité des cellules P388 et P388/DOX. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes ($10^{-9} - 10^{-4}$ M) de DOX et VBL pendant 72 h puis la viabilité cellulaire est évaluée grâce au test au MTT. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ET de 3 expériences réalisées en triplicatas.

Tableau XI. Sensibilité des cellules P388 et P388/DOX vis-à-vis de la DOX et de la VBL

	IC ₅₀ (nM)	
	P388	P388/DOX
DOX	30 ± 2,1	6100 ± 94
VBL	0,51 ± 0,37	210 ± 8,7

I.2. Détermination du mécanisme impliqué dans la résistance des cellules P388/DOX

I.2.1. Analyse par western blot de l'expression de la P-gp

La MDR est un phénomène multifactoriel. De nombreux mécanismes sont en effet responsables de l'établissement de cette résistance, le mécanisme le plus communément rencontré étant la surexpression de la P-gp à la surface des cellules. La DOX et la VBL étant deux substrats de la P-gp, nous avons recherché son expression dans les cellules P388 et P388/DOX par la technique de western blot. Aucune protéine n'est détectée dans les cellules P388 alors que l'anticorps monoclonal JSB-1 reconnaissant spécifiquement la P-gp permet de mettre en évidence une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 170 kDa (Figure 16). La résistance des cellules P388/DOX vis-à-vis de la DOX et de la VBL est donc imputable à la surexpression de la P-gp.

L'effet du vérapamil (VPL) sur la sensibilité de la DOX dans les cellules P388/DOX permet de confirmer l'implication de la P-gp dans la résistance de ces cellules. Le VPL restaure effectivement la sensibilité des cellules résistantes vis-à-vis de la DOX, l'IC₅₀ de la DOX dans les cellules résistantes étant diminuée de 15 fois en présence de VPL (Figure 17).

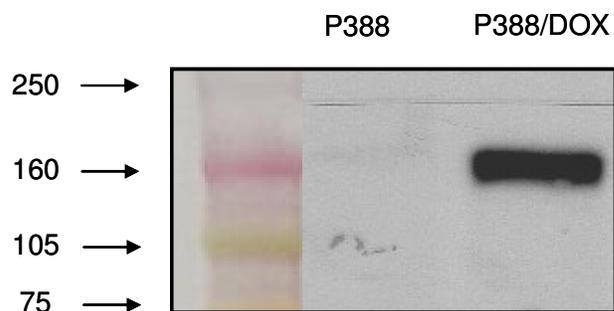


Figure 16. Expression de la P-gp dans les lignées P388 et P388/DOX. Après extraction des protéines et SDS-PAGE, la P-gp a été identifiée par western blot en utilisant l'anticorps monoclonal JSB-1.

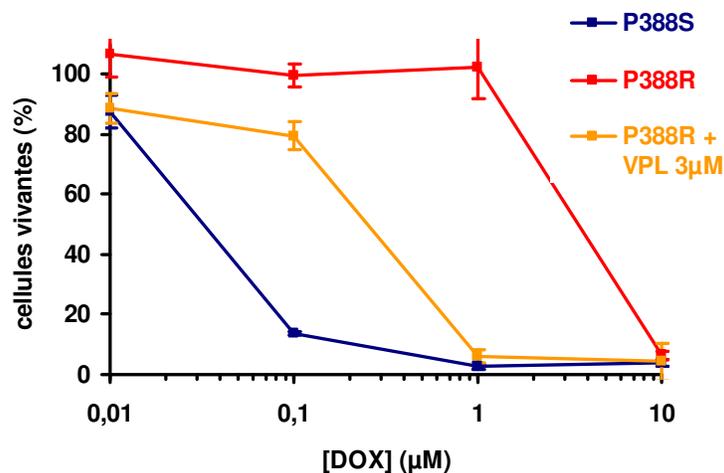


Figure 17. Effet du VPL sur la cytotoxicité de la DOX dans les cellules P388/DOX. Les cellules sont incubées en présence ou non de 3 µM de VPL et de concentrations croissantes de DOX pendant 72h puis la viabilité cellulaire est évaluée grâce au test au MTT. Chaque valeur correspond à la moyenne ± ET de 3 expériences réalisées en triplicate.

I.2.2. Expression des gènes *mdr1* et *mdr3*

La P-gp est, chez la souris, codée par les gènes *mdr1* et *mdr3*. Nous avons donc recherché quel était le gène responsable de la P-gp dans les cellules P388/DOX. L'analyse des ARN totaux par RT-PCR montre que le gène *mdr3* est largement surexprimé dans les cellules P388/DOX alors que les niveaux d'expression du gène *mdr1* sont similaires dans les 2 lignées cellulaires (Figure 18). Ainsi, le gène *mdr3* murin est responsable de la surexpression de la P-gp à l'origine de la résistance des cellules P388/DOX.

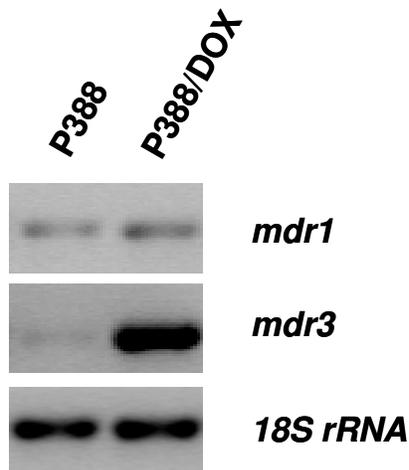


Figure 18. Expression des gènes codant pour la P-gp dans les lignées P388 et P388/DOX. Les ARN totaux ont été extraits et l'expression des gènes *mdr1* et *mdr3* a été analysée par RT-PCR.

II. Induction d'anticorps dirigés contre des peptides dérivés des boucles extracellulaires de la P-gp

II.1. Présentation des peptides dérivés de la P-gp à la surface des liposomes

Dans le but de développer une stratégie d'immunothérapie visant à inhiber l'activité de la P-gp, des épitopes de la P-gp murine ont été sélectionnés afin d'induire la synthèse d'anticorps dirigés contre ces peptides. Ces épitopes sont dérivés des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 reliant chacune 2 domaines transmembranaires consécutifs de la P-gp ; il est donc nécessaire de présenter ces peptides synthétiques dans une conformation similaire à des épitopes présents dans les boucles extracellulaires de la P-gp.

Les peptides ont été insérés dans la membrane des liposomes par l'intermédiaire de deux types de chaînes d'ancrage, des chaînes PEGylées ou palmitoylées.

Dans le cas des peptides PEGylés (appelés mPEG), une chaîne PEGylée a été greffée de manière covalente à chaque extrémité du peptide via un résidu lysine. Ces chaînes sont constituées de 77 sous-unités d'éthylène glycol et sont liées à un lipide, le DSPE, permettant l'insertion du complexe peptide-PEG-DSPE dans la membrane du liposome (Figures 19A et C). La taille du polymère constitué d'éthylène glycol implique que le peptide se trouve relativement éloigné de la surface du liposome.

Dans le cas des peptides palmitoylés (mpp), l'ancrage à la membrane du liposome est effectué par 2 chaînes d'acide palmitique liées de manière covalente à des résidus lysine (Figures 19B et D). Contrairement à la chaîne PEG, l'acide palmitique a une faible taille et, de ce fait, le peptide tétrapalmitoylé se trouve beaucoup plus proche de la surface du liposome que le peptide PEGylé.

II.2. Influence du type d'ancrage des peptides aux liposomes sur la synthèse d'anticorps dirigés contre les peptides

Les deux systèmes d'ancrage décrits précédemment diffèrent essentiellement par leur taille et présentent donc les peptides de manière différente à la surface des liposomes. La capacité des deux systèmes de présentation antigénique à induire la synthèse d'anticorps a été évaluée. La quantité d'immunoglobulines présentes dans les sérums des souris immunisées avec des préparations liposomales contenant des peptides PEGylés (Lp2) ou palmitoylés (mpp2) a été mesurée par dot-blot.

L'immunisation des souris avec le peptide dérivé de la boucle 2 résulte en l'apparition d'anticorps (Figure 20). Cependant, la quantité d'IgG est beaucoup plus élevée quand le peptide est ancré au liposome par des espaceurs PEG que lorsqu'il est présenté par des chaînes palmitoylées. L'immunisation avec la préparation mpp2 induit l'apparition d'une faible quantité d'anticorps 15 jours après la dernière immunisation qui devient difficilement décelable à 45 jours. Au contraire, la préparation Lp2 induit une quantité plus élevée d'IgG à J15 qui diminue à J30 et tend à se stabiliser à J45.

Ainsi, l'ancrage des peptides aux liposomes par des espaceurs PEG favorise l'établissement d'une réponse immunitaire humorale contre ces peptides. Dans la suite de ce travail, seuls les peptides PEGylés seront utilisés pour l'obtention d'anticorps.

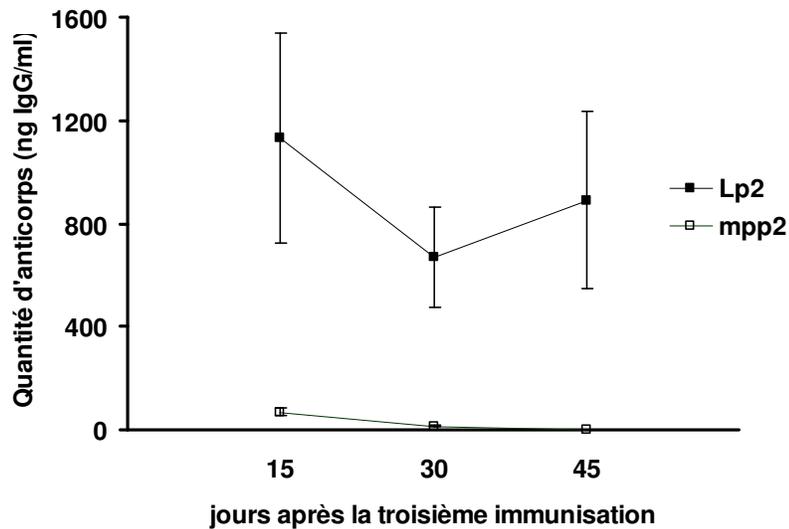


Figure 20. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp2 et mpp2. Après 3 immunisations espacées de 15 jours, le sérum des animaux est collecté et analysé par dot-blot. Chaque point correspond à la moyenne \pm ET des sérums des 4 souris de chaque groupe.

II.3. Immunogénicité des peptides mPEGp1, mPEGp2 et mPEGp4 ancrés aux liposomes administrés individuellement

L'immunogénicité des 3 peptides sélectionnés liés aux liposomes par des espaceurs PEG a été analysée par dot-blot. L'immunisation avec le peptide mPEGp2 (Lp2) induit la plus forte production d'anticorps, et cette réponse est stable pendant au moins 45 jours après la troisième injection (Figure 21). La préparation contenant l'antigène mPEGp1 (Lp1) induit au contraire une réponse IgG qui diminue progressivement jusqu'à J45. La préparation Lp4 contenant l'antigène mPEGp4 est la moins immunogène puisque les anticorps anti-mPEGp4 ne sont plus détectables à J30.

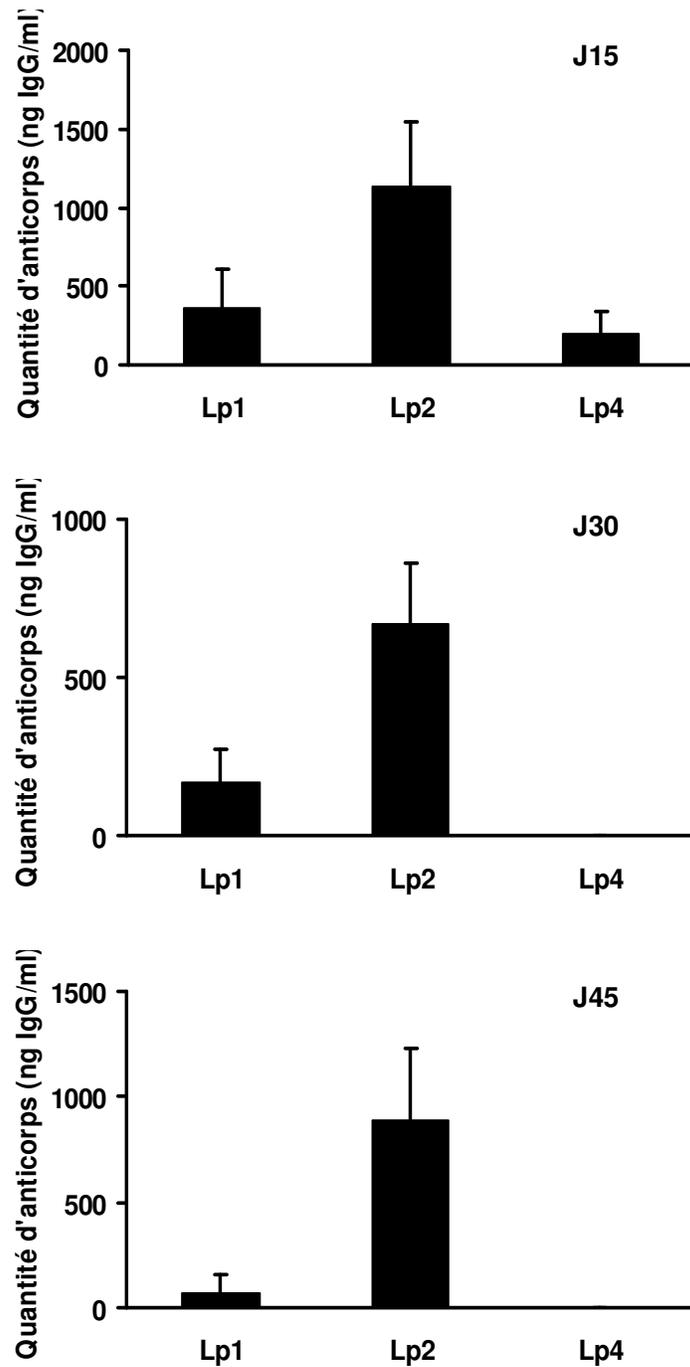


Figure 21. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp1, Lp2 et Lp4. Le sérum de chaque souris est récupéré 15, 30 et 45 jours après la dernière immunisation. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ET des sérums des 4 souris de chaque groupe. Les souris des groupes Lp1, Lp2 et Lp4 sont immunisées avec des préparations de liposomes contenant respectivement les peptides mPEGp1, mPEGp2 et mPEGp4.

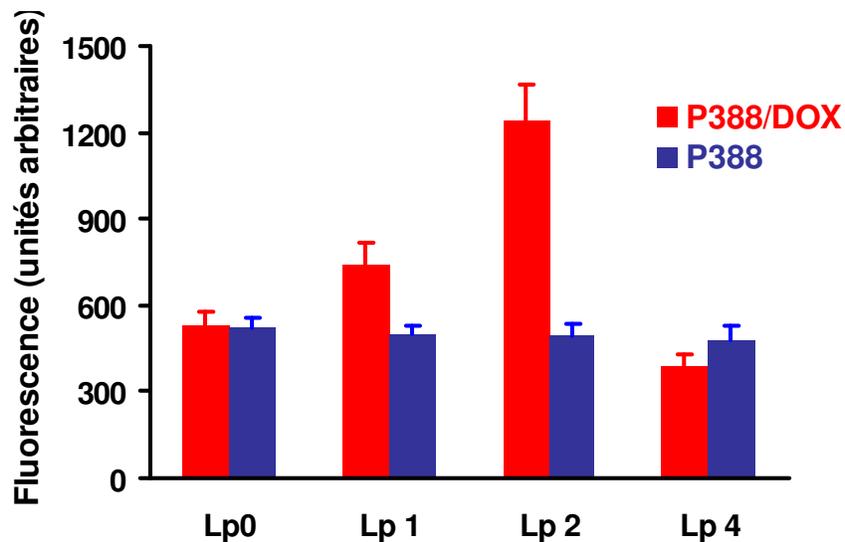


Figure 22. Fluorescence indirecte émise par les cellules P388 et P388/DOX incubées avec le sérum récupéré à J15 des souris immunisées avec Lp1, Lp2, Lp4 ou avec des liposomes vides (Lp0). La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ET (n=4).

L'incubation des sérums collectés 15 jours après la dernière injection avec les cellules P388 et P388/DOX a été réalisée afin d'évaluer la réactivité des anticorps induits avec les 2 lignées cellulaires. La fluorescence émise par l'anticorps secondaire a été mesurée par cytométrie en flux. L'incubation des cellules P388/DOX avec le sérum Lp4 ne montre pas de différence de réactivité en comparaison avec le sérum Lp0 (Figure 22).

Lorsque les cellules P388/DOX sont incubées avec les sérums Lp1 et Lp2, la fluorescence émise par les cellules est augmentée respectivement de 1,4 et 2,4 fois par rapport au témoin. L'incubation des sérums Lp1, Lp2 ou Lp4 avec les cellules P388 résulte en une réactivité similaire à celle observée en incubant les cellules P388/DOX avec le sérum Lp0, suggérant que les anticorps induits sont spécifiques de la P-gp.

Ces résultats sont corrélés avec les quantités d'anticorps trouvées dans les différents sérums et montrent lorsque les 3 peptides sont administrés individuellement, le peptide mPEGp2 est le peptide le plus immunogène.

II.4. Induction de la synthèse d'anticorps par l'injection de liposomes contenant les 3 peptides

Lorsque les 3 peptides mPEGp1, mPEGp2 et mPEGp4 sont ajoutés ensemble à la préparation de liposomes (Lp124), la quantité totale d'anticorps sécrétée est similaire à celle obtenue par l'immunisation avec le peptide mPEGp2 seul (Figure 23). L'ajout de MPLA, un adjuvant connu pour stimuler la réponse immunitaire (Lp124/MPLA), a pour effet d'accroître la synthèse d'anticorps dirigés contre les 3 peptides. Dans les 2 cas, une réponse anticorps équivalente est observée contre chacun des 3 peptides (Figure 24) alors que le peptide mPEGp2 injecté seul induisait une réponse anticorps supérieure à celles induites par les peptides mPEGp1 et mPEGp4. Il est cependant difficile d'interpréter ces différences car la quantité de peptide mPEGp2 diffère lorsqu'il est ajouté seul ou avec les 2 autres peptides à la préparation de liposomes.

L'immunisation avec Lp124 induit une réponse anticorps soutenue dans le temps. La quantité d'IgG est en effet stable pendant au moins 80 jours après la troisième immunisation (Figure 25). L'effet du MPLA semble être bref car l'intensité de la réponse anticorps des souris du lot Lp124/MPLA a considérablement diminué entre J45 et J80.

Lorsque les sérums Lp124 et LP124/MPLA sont incubés avec les cellules P388, aucune différence dans l'émission de fluorescence n'est observée par rapport au sérum Lp0 (Figure 26). Alors que l'immunisation avec Lp124/MPLA induisait une quantité d'anticorps plus élevée que l'immunisation avec Lp124, la fluorescence émise par les cellules P388/DOX incubées en présence du sérum Lp124/MPLA n'est pas augmentée par rapport à celle des cellules P388/DOX incubées avec le sérum Lp124. Ces résultats montrent que le MPLA, bien qu'il amplifie la réponse immunitaire humorale, génère des anticorps ayant une affinité moindre pour la P-gp par rapport aux anticorps induits en son absence.

La Figure 27 montre que le sérum Lp124 est capable de détecter par western blot une protéine de taille similaire à celle détectée par l'anticorps monoclonal JSB-1, confirmant que les anticorps induits par l'immunisation avec Lp124 sont spécifiques de la P-gp.

Le décalage observé entre la bande révélée avec l'anticorps JSB-1 et celle obtenue avec le sérum Lp124 pourrait être due à une perte de la partie glycosylée de la P-gp pouvant survenir lors du processus d'extraction.

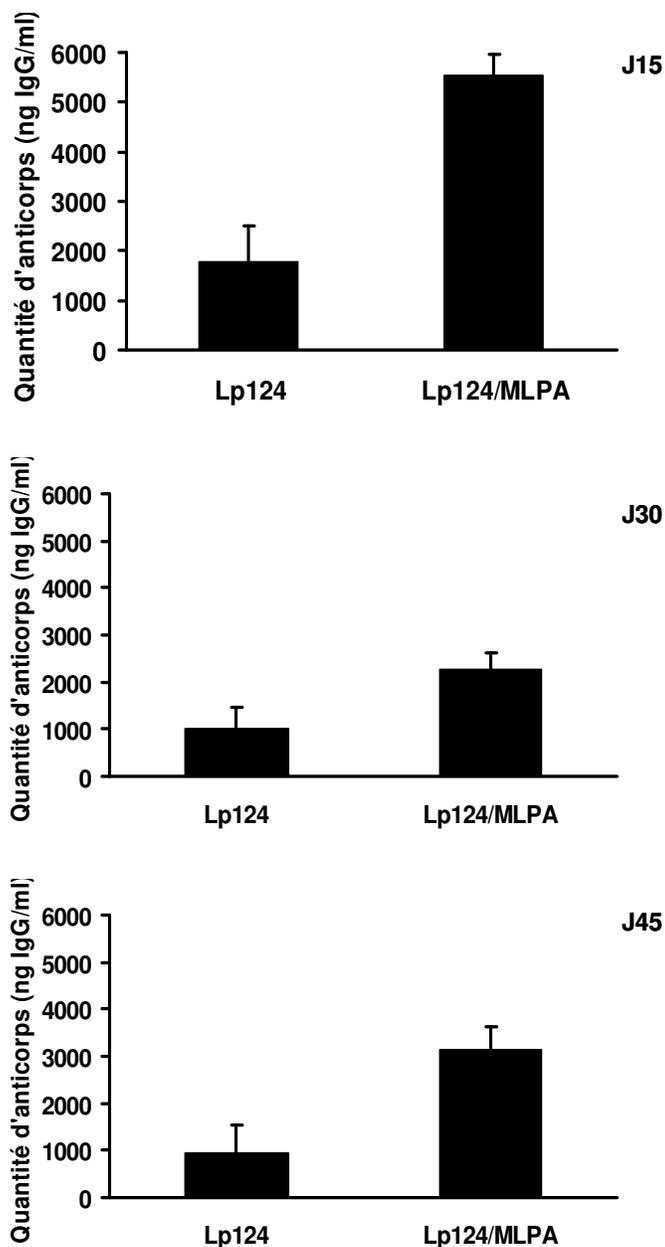


Figure 23. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ET des sérums des 4 souris de chaque groupe.

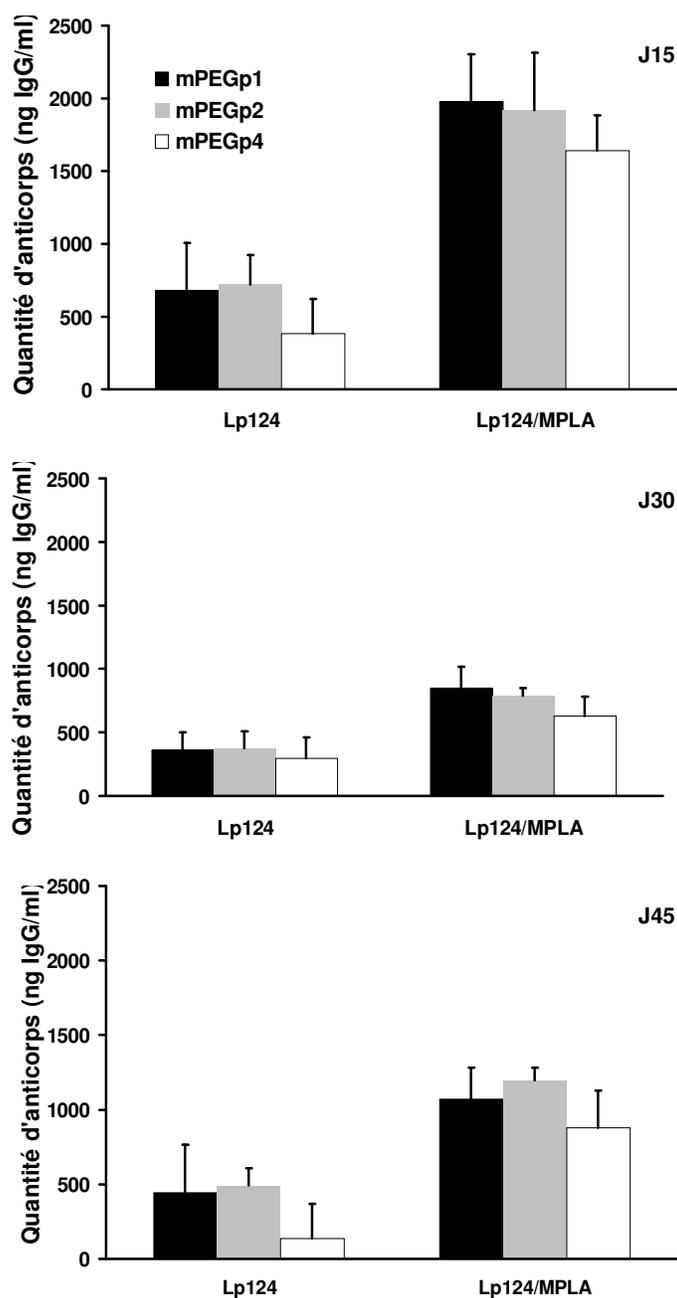


Figure 24. Quantités d'IgG spécifiques de chaque peptide dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ET des sérums des 4 souris de chaque groupe.

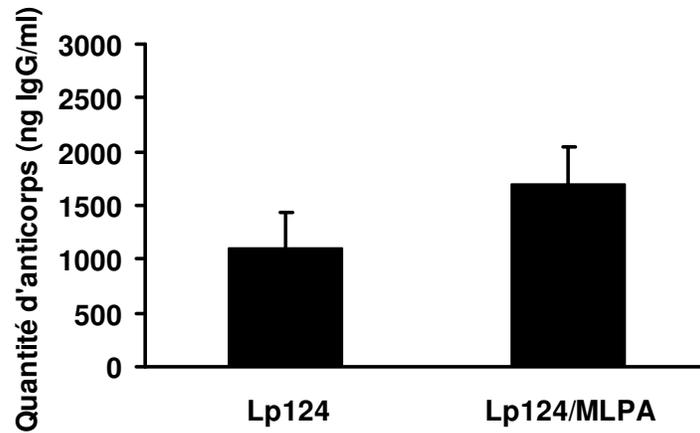


Figure 25. Quantités d'IgG dans le sérum des souris immunisées avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA 80 jours après la troisième immunisation. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ET des sérums des 4 souris de chaque groupe.

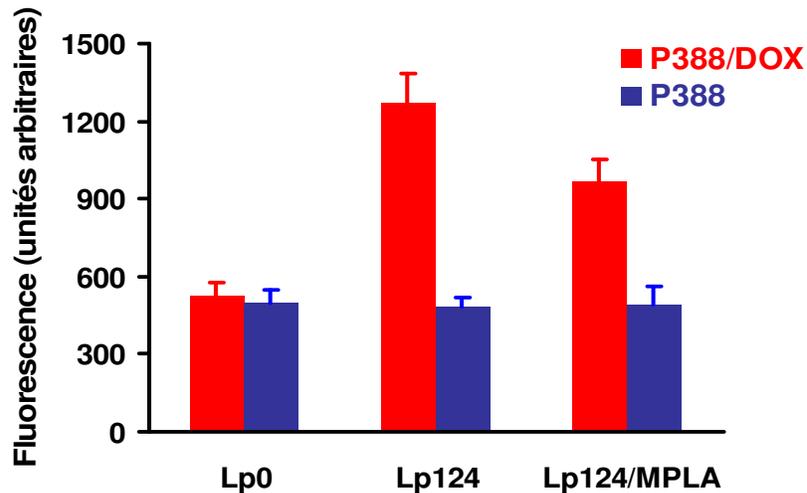


Figure 26. Fluorescence indirecte émise par les cellules P388 et P388/DOX incubées avec le sérum récupéré à J15 des souris immunisées avec Lp124, Lp124/MPLA ou avec des liposomes vides (Lp0). Chaque valeur correspond à la moyenne \pm ET (n=4).

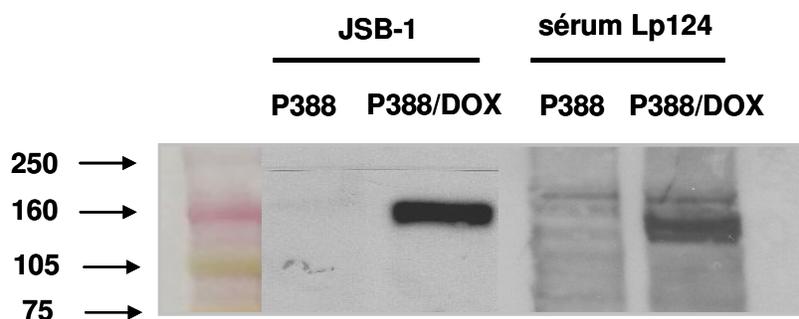


Figure 27. Détection de la P-gp dans les lignées P388 et P388/DOX avec l’anticorps monoclonal JSB-1 et le sérum Lp124.

II.5. Evaluation de la toxicité induite par l’injection du vaccin

II.5.1. Suivi comportemental et observations des souris immunisées

Pendant toute la durée de l’étude, un suivi du poids ainsi que du comportement des souris immunisées avec les différentes préparations vaccinales a été mis en place. Ces observations ont montré que les animaux, quelque soit leur groupe ne présentent ni de trouble dans leur comportement, ni de signes d’alerte et s’alimentent normalement. Ainsi, comme le montre la Figure 28, aucune perte de poids n’a été observée au sein des différents groupes.

Cependant, des signes d’alopécies ont été observés chez les animaux des différents groupes d’immunisation (Figure 29). Ces pertes de poils ont été attribuées à la présence d’alum dans la constitution du vaccin car des signes d’alopécie similaires ont été observés chez des souris immunisées avec 500 µg d’alum alors que des souris ayant reçu des injections de sérum physiologique ne présentent aucun signe de perte de poils.

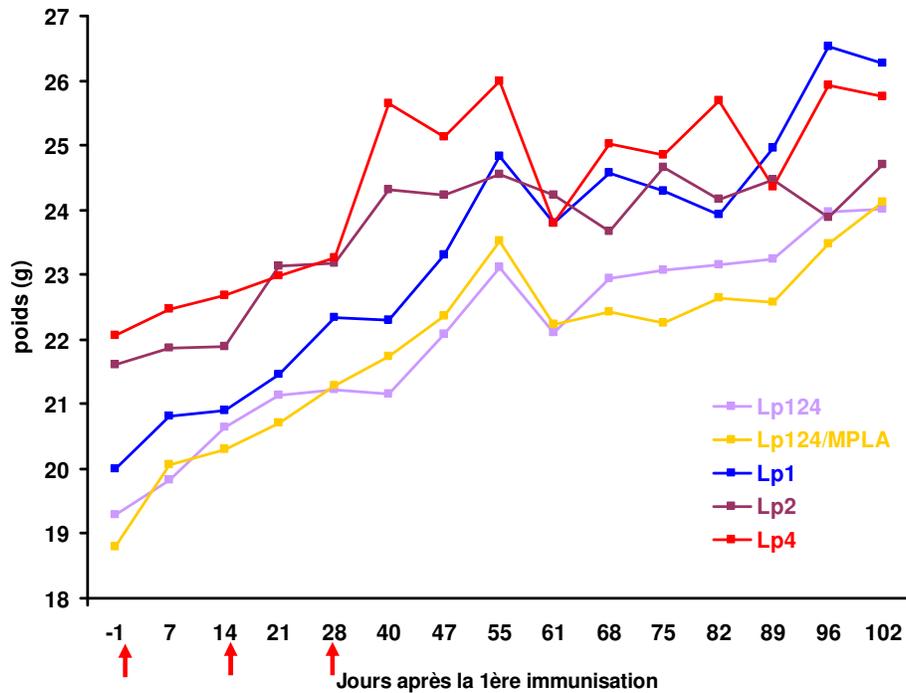


Figure 28. Suivi du poids des souris immunisées avec les différentes préparations. Les flèches rouges indiquent les immunisations.



Figure 29. Signes d'alopecie observés chez une souris immunisées avec la préparation Lp1. Des signes similaires ont été observés dans les autres groupes ainsi que chez les animaux ayant reçu des injections d'alum, mais pas chez les animaux ayant reçu du sérum physiologique.

II.5.2. Etude histologique des organes des souris immunisées

Afin de déterminer si l'injection du vaccin induit d'éventuelles lésions inflammatoires au niveau des organes des souris immunisées, une étude histologique a été réalisée sur les organes des souris ayant reçu des injections de sérum physiologique, d'alum ou de la préparation Lp124.

La coloration HPS des organes révèle la présence de granulomes au niveau des glandes surrénales, de la rate, du pancréas et des ovaires, et plus rarement au niveau du foie des souris immunisées avec la préparation Lp124 (Figure 30) ainsi que chez les souris des autres groupes d'immunisation. Ces granulomes sont exclusivement trouvés dans le péritoine et non l'intérieur des organes. Dans la rate, en plus des granulomes intrapéritonéaux, des cellules géantes infiltrées de type macrophagique (notées par les flèches) ont été retrouvées. Ces granulomes correspondent à des amas de cellules de type épithélioïde composés majoritairement de macrophages. Dans le foie des granulomes de taille importante présentant un aspect granuleux et un centre nécrotique ont été observés (Figure 31).

De telles lésions ont été identifiées dans les différents organes des souris immunisées avec de l'alum uniquement, alors qu'elles n'ont pas été retrouvées chez les animaux qui ont reçu des injections de sérum physiologique. Ceci suggère que l'apparition de granulomes chez les souris immunisées avec les différentes préparations vaccinales est imputable à la présence d'alum dans la composition du vaccin.

II.6. Conclusions

Cette première partie montre qu'il est possible de générer des anticorps spécifiques de la P-gp par des immunisations avec des peptides synthétiques dérivés des boucles extracellulaires de la P-gp présentés à la surface de liposomes. L'alum, qui est ajouté comme adjuvant à la composition du vaccin, est cependant responsable de l'apparition de lésions granulomateuses au niveau des organes des animaux immunisés.

Après avoir testé l'influence du mode d'ancrage des peptides aux liposomes, il en ressort que l'ancrage des peptides à une chaîne de poids moléculaire élevé, le PEG, améliore l'immunogénicité de ces peptides en comparaison avec une chaîne de poids moléculaire plus faible, l'acide palmitique.

Les 3 peptides PEGylés étudiés présentent des immunogénicités variables lorsqu'ils sont injectés individuellement. Le peptide mPEGp2 induit en effet une réponse IgG élevée et durable dans le temps en comparaison avec les peptides mPEGp1 et mPEGp4. Lorsqu'ils sont ajoutés simultanément à la préparation, une réponse IgG équivalente dirigée contre les 3 peptides est observée. Le MPLA amplifie la réponse IgG mais ne semble pas produire des anticorps ayant une plus grande affinité pour la P-gp.

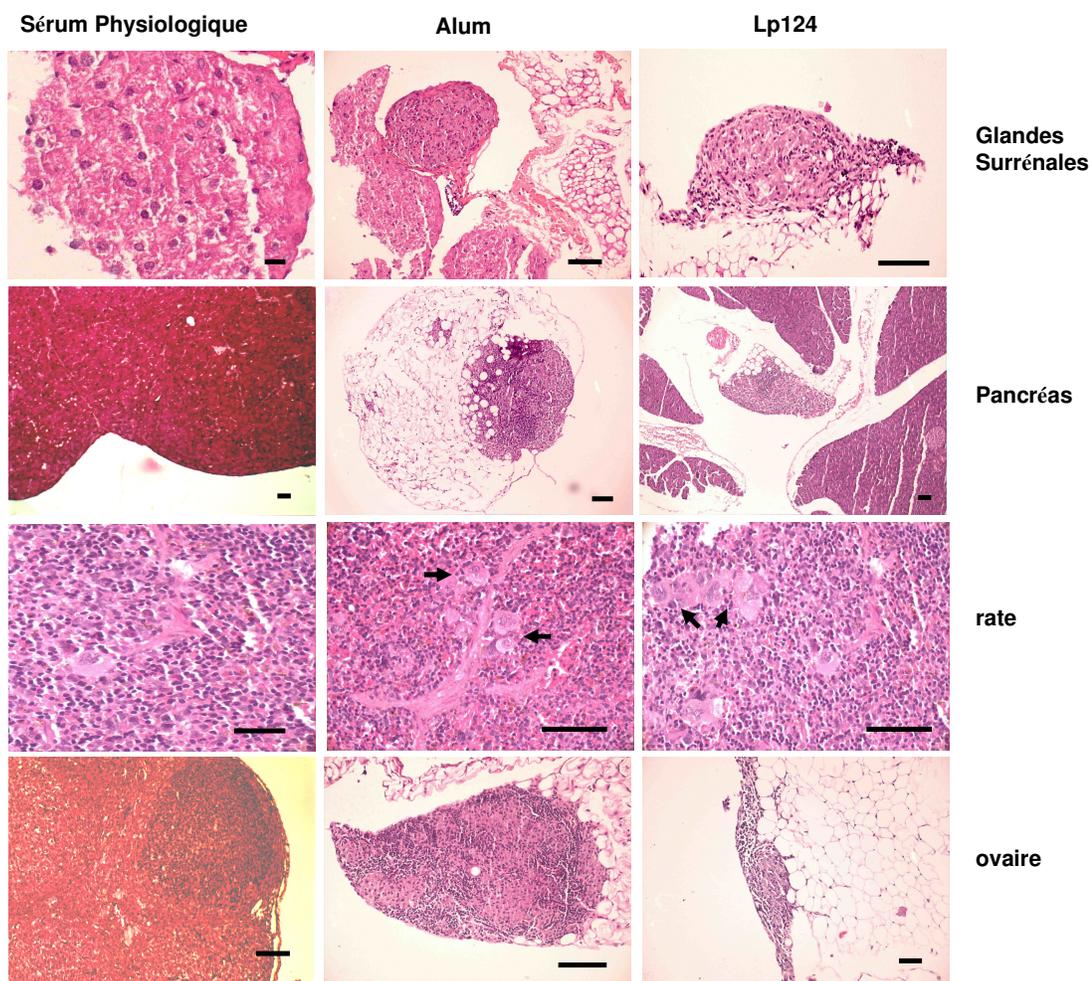


Figure 30. Etude histologique des organes des souris ayant reçu des injections de sérum physiologique, d'alum ou de la préparation Lp124. Les souris ont été sacrifiées 2 mois après la 3^{ème} immunisation. Les organes ont été fixés dans du formol puis les coupes ont été soumises à une coloration HPS. Barre d'échelle : 100 µm.

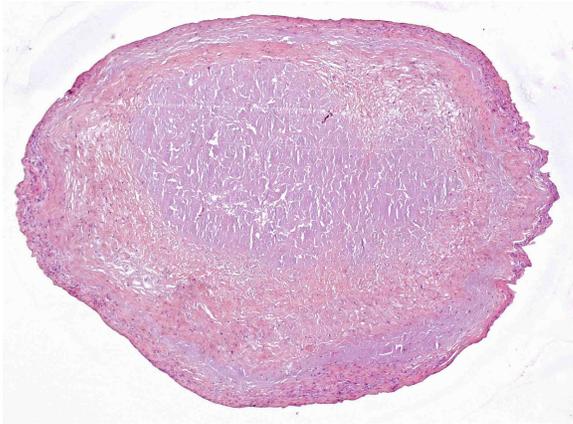


Figure 31. Détail d'un granulome retrouvé au niveau du foie (grossissement x 5).

III. Evaluation *in vitro* et *in vivo* de l'activité anti-MDR des anticorps induits

III.1. Effet des anticorps induits sur la cytotoxicité de la doxorubicine

III.1.1. Etude des sérums Lp1, Lp2 et Lp4

Au cours de cette partie, nous avons cherché à déterminer si les anticorps dirigés contre les épitopes de la P-gp étaient capables d'inhiber l'activité de pompe à efflux de la P-gp. Ainsi, nous avons analysé la capacité des sérums Lp1, Lp2 et Lp4 contenant chacun des anticorps dirigés contre un épitope spécifique à restaurer la sensibilité des cellules P388/DOX vis-à-vis de la DOX.

Après incubation avec les différents sérums et du VPL, les cellules P388/DOX ont été incubées avec des concentrations de DOX pendant 48h puis la viabilité cellulaire est déterminée par un test MTT. La Figure 32 montre que l'incubation des cellules avec les sérums ou le VPL seul n'a aucune incidence sur la croissance cellulaire. La préincubation avec les sérums Lp1 et Lp4 n'améliore pas la toxicité de la DOX en comparaison avec le traitement à la DOX seule.

A l'inverse, l'incubation avec le sérum Lp2 potentialise l'effet cytotoxique de la DOX. A la concentration de 0,5 μM de DOX, la viabilité cellulaire diminue de 26% avec l'ajout du sérum Lp2. Le pourcentage de cellules mortes passe de 31% avec un traitement à 1 μM de DOX à 49% quand le sérum Lp2 est associé au traitement. L'inhibition de croissance induite par 2,5 μM de DOX augmente de 28% en présence du sérum Lp2.

Cependant, l'activité chimiosensibilisante du sérum Lp2 reste inférieure à celle du VPL puisque le traitement DOX 0,5 μM + VPL permet de diminuer la viabilité cellulaire de 87%, et quasiment la totalité des cellules sont mortes en présence de 1 et 2,5 μM de DOX.

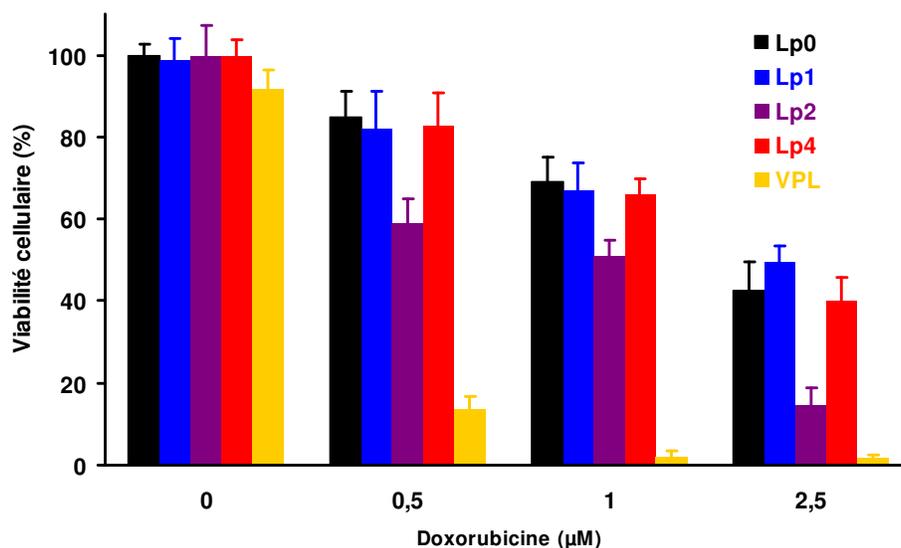


Figure 32. Effet des sérums Lp1, Lp2 et Lp4 et du vérapamil (VPL ; 3 μM) sur la toxicité de la DOX sur les cellules P388/DOX. Les cellules ont été incubées avec les sérums (3 μl) ou VPL (3 μM) avant d'être exposées à différentes concentrations de DOX pendant 48h. La viabilité cellulaire est déterminée par le test MTT. Chaque valeur représente la moyenne \pm ET de 3 expériences réalisées en triplicate.

III.1.2. Etude des sérums Lp124 et Lp124/MPLA

De même que pour les sérums Lp1, Lp2 et Lp4, l'incubation des cellules P388/DOX avec les sérums Lp124 et Lp124/MPLA ne modifie pas leur viabilité (Figure 33). L'incubation des cellules avec le sérum Lp124 a pour conséquence de potentialiser l'effet cytotoxique de la DOX. En présence de 0,5 μM de DOX, la viabilité cellulaire passe de 85% en l'absence du sérum à 57% lorsque les cellules sont exposées au sérum. A 1 μM de DOX, l'addition du sérum Lp124 induit une diminution de la viabilité cellulaire de 34%, et à 2,5 μM , l'activité chimiosensibilisante du sérum Lp124 devient aussi efficace que celle du VPL.

Des résultats similaires ont été obtenus quand le sérum a été préalablement chauffé 1h à 56°C. Ceci suggère que l'incubation du sérum avec les cellules résistantes induit une

augmentation de la cytotoxicité de la DOX par un mécanisme qui ne fait pas intervenir le système du complément.

Bien que l'immunisation avec Lp124/MPLA génère une quantité d'IgG supérieure à celle induite par l'immunisation avec Lp124, l'activité du sérum Lp124/MPLA reste inférieure à celle du sérum Lp124. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle, la spécificité des anticorps induits prime sur leur quantité.

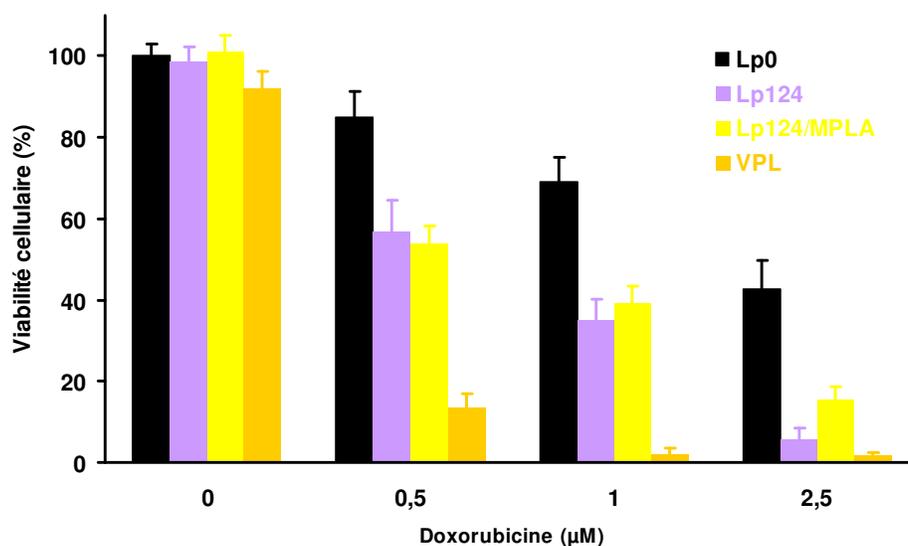


Figure 33. Effet des sérums Lp124, Lp124/MPLA sur la toxicité de la doxorubicine sur les cellules P388/DOX. Chaque valeur représente la moyenne \pm ET de 3 expériences réalisées en triplicate.

III.2. Effet des anticorps induits sur l'accumulation intracellulaire de doxorubicine

III.2.1. Etude des sérums Lp1, Lp2 et Lp4

Afin de déterminer si l'activité chimiosensibilisante des anticorps induits est associée à l'inhibition de l'activité de la P-gp, nous avons étudié l'influence des sérums sur l'accumulation de DOX à l'intérieur des cellules P388/DOX.

La mesure par cytométrie en flux de la fluorescence intracellulaire émise par la DOX montre que la préincubation des cellules avec le sérum induit une augmentation 15,5 fois plus importante de la quantité intracellulaire de DOX par rapport à la préincubation avec le sérum

contrôle (Figure 34). Cette activité reste légèrement inférieure à celle du VPL. Le sérum Lp1 induit une augmentation de l'incorporation de DOX plus modérée que le sérum Lp2 alors que le sérum Lp4 n'a aucun effet.

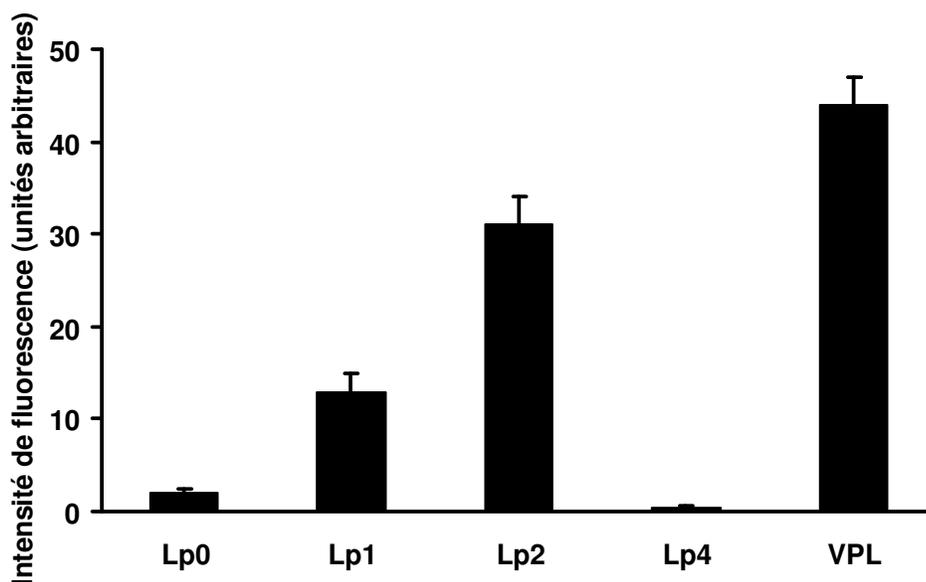


Figure 34. Effet des sérums Lp1, Lp2, Lp4 et du VPL sur l'accumulation intracellulaire de DOX. Après incubation avec les différents sérums (10%) ou le VPL (3 μ M) pendant 30 min, les cellules P388/DOX sont mises en présence pendant 1h de DOX (1 μ M), lavées et la fluorescence émise par la DOX est mesurée par cytométrie en flux. Chaque valeur représente la moyenne \pm ET de 3 expériences réalisées en triplicate.

II.2.2. Etude des sérums Lp124 et Lp124/MPLA

La Figure 35 montre que le sérum Lp124 induit une forte augmentation de l'accumulation de DOX dans les cellules P388/DOX (augmentation de 23 fois de l'intensité de fluorescence par rapport au témoin) et a une action comparable à celle du VPL. Nous pouvons constater que l'incubation avec le sérum Lp124/MPLA n'apporte pas d'amélioration dans l'inhibition de l'efflux de la P-gp en comparaison au sérum Lp124 alors que la quantité d'anticorps contenus dans le sérum Lp124/MPLA est plus élevée.

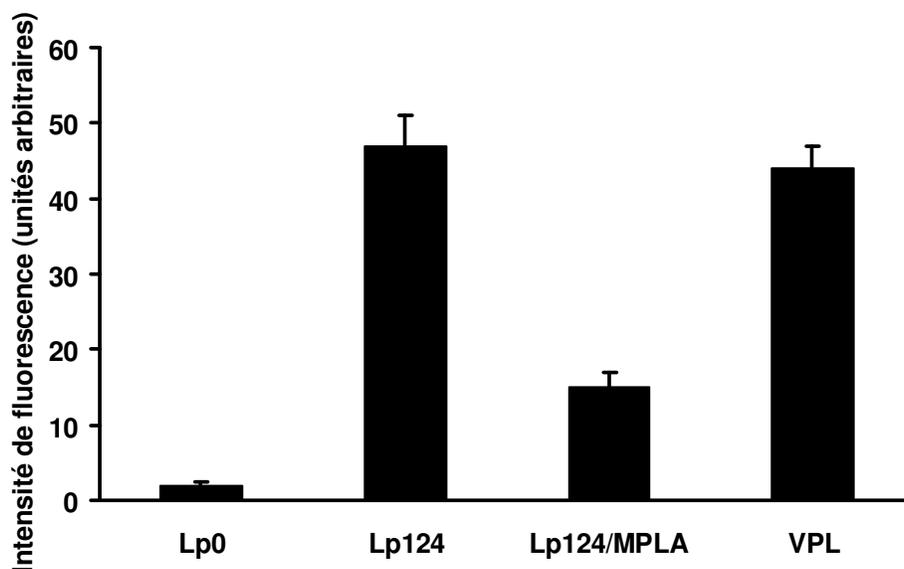


Figure 35. Effet des sérums Lp124, Lp124/MPLA et du VPL sur l'accumulation intracellulaire de DOX. Chaque valeur représente la moyenne \pm ET de 3 expériences réalisées en triplicate.

III.3. Effet *in vivo* de l'immunisation avec Lp2, Lp124 et Lp124/MPLA sur l'efficacité de la chimiothérapie contre les cellules P388/DOX

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle amélioration de l'efficacité de la chimiothérapie par les anticorps induits par l'immunisation avec les peptides PEGylés dérivés de la P-gp, des souris préalablement immunisées avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA ont reçu l'injection de 10^6 cellules P388/DOX. Le lendemain débute un traitement par chimiothérapie à base de doxorubicine et de vinblastine.

Lorsque les souris ont été immunisées avec des liposomes vides (Lp0), la durée de vie moyenne est de 24 jours, les constituants des liposomes se comportant comme des éléments inertes dans le cadre de notre étude (Figure 36).

De manière surprenante, l'immunisation avec la préparation Lp2 n'améliore pas la survie des animaux (durée de vie moyenne de 24,5 jours), bien que le sérum Lp2 possède un effet chimiosensibilisant *in vitro*.

Dans le groupe des souris immunisées avec la préparation Lp124, nous pouvons constater une augmentation de la durée de vie moyenne de 20 jours par rapport au groupe témoin, ce qui correspond à une amélioration de la survie de 83%. La souris qui a développé le plus faible taux d'anticorps est morte après 27 jours alors que toutes les autres souris de ce groupe sont mortes après le 30^{ème} jour.

Dans le groupe des souris immunisées avec Lp124/MPLA, la durée de vie moyenne est de 27 jours. Tous les animaux sont morts entre le 22^{ème} et le 31^{ème} jour, excepté une souris qui n'a développé aucun signe pathologique et qui a survécu plus de 80 jours après l'inoculation des cellules tumorales. Cette singularité peut être assimilée à un cas de rémission spontanée non expliquée également observée chez quelques patients.

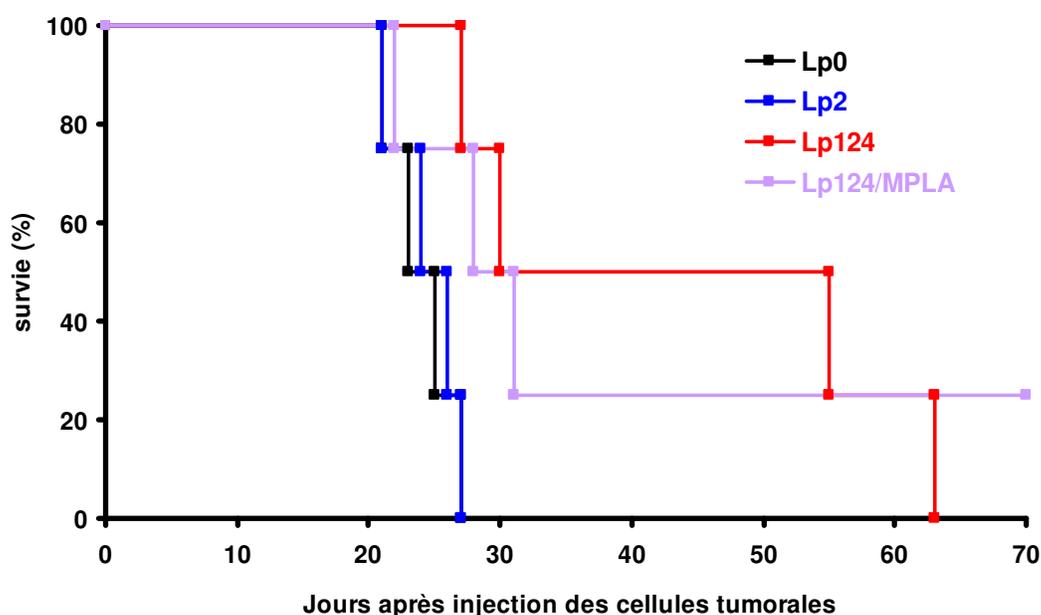


Figure 36. Influence de l'immunisation avec les préparations Lp124 et Lp124/MPLA sur la survie des souris ayant reçu une injection de cellules P388/DOX et un traitement chimiothérapeutique. Cinq semaines après la troisième immunisation, les souris reçoivent par voie intrapéritonéale 10^6 cellules P388/DOX (↑), un traitement à base de DOX (5,5 mg/kg) (↑) et de VBL (2,5 mg/kg) (↑) est mis en place. L'expérience a été reproduite 2 fois.

III.4. Conclusions

La génération d'anticorps dirigés contre des fragments des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la P-gp, induite par la préparation Lp124, potentialise l'efficacité *in vitro* ainsi qu'*in vivo* de la chimiothérapie contre les cellules P388 résistantes exprimant la P-gp. Une accumulation accrue de substances anticancéreuses dans les cellules P388/DOX, provoquée par l'inhibition de l'activité, de la P-gp semble être à l'origine de l'amélioration de l'efficacité du traitement.

De tels effets ont été observés *in vitro* avec l'induction d'anticorps ciblés uniquement contre la seconde boucle extracellulaire de la P-gp, mais ces anticorps perdent leur efficacité *in vivo*.

Cependant, la génération d'anticorps dirigés contre la P-gp associée à une chimiothérapie n'apporte pas une protection totale contre les cellules leucémiques puisque tous les animaux meurent.

Discussion

Depuis plus de trente ans, avec la mise en évidence de la P-gp et du phénomène de MDR associé, de nombreuses stratégies dont le but est d'inhiber ou de contourner la résistance des cellules tumorales à divers agents anticancéreux ont été proposées.

La chimiothérapie reste le traitement de première importance chez les personnes atteintes d'un cancer. Cependant, son efficacité est souvent limitée par le développement d'une résistance, le plus souvent due à l'expression de la P-gp. De nombreux composés possédant des fonctions pharmacologiques diverses se sont révélées être capables d'inhiber l'activité de la P-gp. Ces molécules ont généralement une demi-vie courte et inhibent l'activité de la P-gp en entrant en compétition avec le substrat, ce qui aboutit à leur expulsion hors des cellules. Ainsi, l'utilisation clinique de telles molécules nécessite l'administration de doses importantes qui est associée à l'apparition d'effets toxiques dus à la fonction primaire de ces substances. Ceci justifie qu'un faible nombre de chimiosensibilisateurs ont atteint les essais cliniques.

L'objectif de ce travail consiste à développer une approche immunothérapeutique visant à inhiber *in vivo* l'activité de la P-gp dans un modèle utilisant une sous-lignée résistante établie en exposant les cellules leucémiques murines P388 à des concentrations croissantes de DOX. Cette lignée présente une résistance croisée à la VBL, une drogue à laquelle les cellules P388/DOX n'ont jamais été exposées, l'une des caractéristiques de la MDR [Gottesman *et al.*, 2001]. Une étude par western-blot a révélée que la résistance à ces deux agents anticancéreux était imputable à l'expression de la P-gp, elle-même due à la surexpression du gène *mdr3/mdr1b* dans les cellules P388 résistantes alors qu'elle n'est pas détectée dans leurs homologues sensibles. L'implication du gène *mdr1b* dans l'expression de la P-gp par les cellules P388 a déjà été décrite précédemment [Raymond *et al.*, 1990].

D'autres stratégies alternatives à l'utilisation des chimiosensibilisateurs ont été développées. L'inhibition de l'activité de la P-gp par des anticorps monoclonaux spécifiques a été rapportée. L'anticorps monoclonal UIC2 reconnaît un épitope extracellulaire de la P-gp humaine. Cet épitope semble être conformation-dépendant car la réactivité de l'anticorps UIC2 avec la P-gp est augmentée lors de l'interaction entre la P-gp et son substrat [Mechetner *et al.*, 1997]. Il fait intervenir plusieurs boucles extracellulaires, notamment la boucle

extracellulaire 1, car la délétion d'une vingtaine d'acides aminés dans cette boucle provoque la perte de liaison de l'anticorps UIC2 à la P-gp [Schinkel *et al.*, 1993]. Un autre anticorps monoclonal, MRK16, reconnaît un épitope extracellulaire discontinu impliquant les boucles extracellulaires 1 et 4 de la P-gp [Vasudevan *et al.*, 1998]. Ces deux anticorps inhibent l'efflux et potentialisent la cytotoxicité de médicaments dans des cellules exprimant la P-gp. Cependant, il est difficile de déterminer avec précision l'épitope reconnu par ces anticorps, et donc les séquences précises impliquées dans l'inhibition de l'activité de la P-gp.

Dans notre étude, des peptides synthétiques dérivés des boucles extracellulaires 1, 2 et 4 de la P-gp ont été synthétisés afin de générer des anticorps. Les peptides seuls étant rapidement dégradés *in vivo*, ils ont été couplés à des liposomes, un vecteur qui, en outre, permet de reconstituer l'environnement membranaire de ces peptides.

Des travaux réalisés précédemment au sein de notre laboratoire ont montré que l'ancrage des ces peptides aux liposomes par des chaînes palmitoylées induit la synthèse d'anticorps capables d'inhiber l'activité de la P-gp [Pawlak *et al.*, 2004 ; Perrin *et al.*, 2007]. Cette stratégie visant à rompre la tolérance immunitaire vis-à-vis d'un peptide du soi s'est également avérée être efficace dans un modèle murin mimant la maladie d'Alzheimer. L'immunisation avec des peptides d'amyloïde β tétrapalmitoylés ancrés à des liposomes induit la synthèse d'anticorps capables de solubiliser les dépôts fibrillaires d'amyloïde β responsables de la pathologie [Nicolau *et al.*, 2002].

La reconnaissance de ces peptides synthétiques par le système immunitaire implique que ces peptides aient une conformation similaire à celle des épitopes présents dans la structure de la P-gp. Ces épitopes sont en effet dérivés de « boucles » extracellulaires qui possèdent une structure imposée par des contraintes qu'exercent les domaines transmembranaires adjacents. Il est donc nécessaire de reproduire au mieux la conformation de ces peptides au niveau de la membrane liposomale. Nous avons par conséquent étudié l'influence de deux systèmes d'ancrage des peptides - la chaîne palmitoylée ayant une masse moléculaire relativement faible et le PEG ayant une masse moléculaire plus conséquente - sur l'immunogénicité des peptides.

Dans notre étude, l'analyse de la réponse IgG contre le peptide dérivé de la seconde boucle extracellulaire montre que la présentation du peptide à la surface du liposome par des chaînes PEG améliore son immunogénicité. Le fait que les liposomes stabilisés stériquement par des chaînes PEG présentent un temps de circulation prolongé par rapport à des liposomes

sans PEG [Harding *et al.*, 1997 ; Papahadjopoulos *et al.*, 1991 ; Immordino *et al.*, 2006] et, par conséquent, stimulent le système immunitaire d'une manière prolongée pourrait expliquer cette observation. La différence d'immunogénicité des peptides PEGylés et palmitoylés pourrait également être due à l'influence de l'ancrage des peptides sur leur conformation. Muhs *et al.* ont montré qu'un peptide dérivé de l'amyloïde β ancré aux liposomes par des chaînes palmitoylées présente une conformation majoritairement constituée de feuillets β alors que le même peptide ancré aux liposomes par des espaceurs PEG possède plutôt une conformation de type « random coil », un type de structure plus souvent associé à des boucles présentes entre deux hélices ou feuillets [Muhs *et al.*, 2007]. Dans leur étude, le peptide palmitoylé induit une meilleure réponse anticorps. De plus, ces anticorps reconnaissant des structures en feuillets β possèdent une efficacité thérapeutique plus importante dans un modèle expérimental murin de la maladie d'Alzheimer, ce qui est bénéfique car la structure des protéines d'amyloïde β évolue d'une conformation en hélices α dans leur forme soluble vers une conformation en feuillets β lorsqu'elles s'agrègent pour former des plaques séniles retrouvées chez les patients malades. Ainsi, la conformation du peptide dépend en grande partie de sa nature. Dans notre étude, l'ancrage aux liposomes avec des espaceurs PEG pourrait présenter les peptides (dérivés de boucles reliant des domaines transmembranaires en hélice α) dans une conformation qui est plus favorable à l'induction d'une réponse anticorps.

L'immunisation avec les peptides PEGylés mPEGp1, mPEGp2 et mPEGp4 induit des réponses anticorps variables. Le peptide mPEGp2 s'est révélé être le plus immunogène alors qu'une très faible réponse a été observée avec le peptide mPEGp4. Le peptide mPEGp1 a, quant à lui, donné une réponse anticorps intermédiaire. Le degré de la réponse anticorps induite par chaque peptide est globalement corrélé à la capacité des sérums à inhiber *in vitro* l'activité de la P-gp. L'incubation des cellules P388/DOX avec le sérum Lp2 induit une augmentation de l'accumulation intracellulaire de la DOX ce qui a pour effet de potentialiser la cytotoxicité de la DOX. Ceci suggère que le ciblage de la seconde boucle extracellulaire de la P-gp grâce à des anticorps spécifiques pourrait inhiber efficacement l'activité de la pompe. L'importance cette boucle dans l'activité de la P-gp a déjà été mise en évidence car l'insertion d'un épitope dans la boucle conduit à la perte de fonction de la P-gp [Kast *et al.*, 1995]. Les boucles extracellulaires 1 et 4 semblent également être impliquées dans l'activité de transport de la P-gp. Ces deux boucles forment en effet, une partie de l'épitope de l'anticorps monoclonal MRK16, lui-même capable d'inhiber l'efflux des médicaments hors des cellules exprimant la P-gp [Mickisch *et al.*, 1992 ; Iwahashi *et al.*, 1993]. Un fragment recombinant

provenant d'un anticorps qui réagit spécifiquement avec la première boucle extracellulaire est capable d'inhiber l'activité de la P-gp et, ainsi, de réverser le phénotype MDR [Haus-Cohen *et al.*, 2004]. Cependant, dans notre étude, l'incubation des cellules P388/DOX avec les sérums Lp1 et Lp4 ne potentialise pas l'effet cytotoxique de la DOX, même si une légère augmentation de la quantité intracellulaire de DOX a été observée en présence du sérum Lp1. Ce manque d'activité est vraisemblablement dû à une quantité trop faible d'anticorps présents dans le sérum. Le fait que la PEGylation des peptides n'ait pas été totalement standardisée (ratio diPEG/monoPEG = 70/30) pourrait avoir une influence sur l'intensité de la réponse anticorps. L'optimisation de la PEGylation pourrait ainsi permettre d'améliorer l'efficacité de la préparation vaccinale.

L'immunisation avec la préparation de liposomes contenant les 3 peptides PEGylés (Lp124) déclenche une réponse anticorps élevée et durable dans le temps. Cette réponse a une intensité comparable à celle induite par l'immunisation avec le peptide mPEGp2 seul (Lp2). Cependant, le sérum Lp124 a montré une efficacité accrue par rapport au sérum Lp2 quant à la potentialisation de l'effet cytotoxique de la DOX ainsi que son accumulation à l'intérieur des cellules P388/DOX. La diversité des épitopes ciblés par les anticorps du sérum Lp124 pourrait permettre de neutraliser l'activité de la P-gp avec une efficacité plus importante que lorsqu'un seul site de la pompe est ciblé.

Le mécanisme par lequel les anticorps induits exercent leur effet inhibiteur sur l'activité de la P-gp reste incertain. Néanmoins, plusieurs hypothèses peuvent être proposées. Les anticorps pourraient inhiber l'efflux de DOX en se liant à la P-gp, obstruant ainsi le pore formé par la P-gp. Leur liaison à la pompe pourrait également bloquer l'interaction de la drogue avec la P-gp requise pour le transport du substrat. Il a en effet été montré qu'un analogue photoréactif du taxol interagissait avec une région de la P-gp faisant intervenir la quatrième boucle extracellulaire [Wu *et al.*, 1998]. Enfin, la liaison des anticorps pourrait provoquer le blocage des modifications conformationnelles de la P-gp qui surviennent lors de son fonctionnement, inhibant ainsi le transport du substrat. Contrairement aux résultats d'Iwahashi *et al.* montrant que l'anticorps MRK16 administré seul peut tuer des cellules de carcinome du colon MDR [Iwahashi *et al.*, 1993], nous avons montré que les anticorps induits ne possèdent pas d'activité cytotoxique intrinsèque. Ainsi, le mécanisme de « cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps » ne semble pas être responsable de l'activité des anticorps.

L'ajout de MPLA à la préparation Lp124 induit une forte augmentation de la réponse anticorps. Bien qu'il exerce son activité adjuvante par une stimulation prédominante de l'immunité de type Th1 [Golkar *et al.*, 2007], le MPLA serait capable de stimuler aussi bien la voie Th1 que la voie Th2 intervenant respectivement dans la mise en place des réponses immunitaires cellulaire et humorale [Vernacchio *et al.*, 2002 Vaccine ; Sasaki *et al.*, 1997 Infect Immun]. Cependant, l'activité chimiosensibilisante du sérum Lp124/MPLA n'est pas augmentée par rapport à celle du sérum Lp124. Ainsi, même si le MPLA stimule la synthèse d'anticorps dirigés contre les épitopes de la P-gp, ces anticorps pourraient avoir une affinité plus faible pour la P-gp et seraient par conséquent moins efficaces pour neutraliser son activité. La préparation Lp124 ne contenant pas de MPLA semble donc être la plus efficace pour générer les anticorps anti-P-gp les plus actifs.

L'immunisation avec la préparation contenant les peptides PEGylés ancrés aux liposomes et adsorbés dans de l'alum ne fait pas apparaître chez les animaux de signes de toxicité majeurs. Les animaux immunisés ne présentent pas de troubles comportementaux et s'alimentent normalement. Cependant, des signes d'alopécie et d'inflammation se manifestant par l'apparition de granulomes au niveau des organes situés au contact de la zone d'injection ont été observés. Ces effets non désirables ont été attribués à la présence de l'alum dans la composition du vaccin car ils ont été observés aussi bien chez les animaux immunisés avec les différents vaccins que chez les animaux ayant reçu des injections d'alum. Plusieurs cas d'apparition de lésions granulomateuses ont été rapportés à la suite d'injections contenant de l'alum. [Bordet *et al.*, 2001 ; Valtulini *et al.*, 2005]. Ces granulomes sont généralement constitués de macrophages dans lesquels des débris d'aluminium ont été identifiés [Ono *et al.*, 2005].

Aucun symptôme auto-immun n'a été observé, bien que la P-gp soit exprimée dans de nombreux organes où elle joue un rôle physiologique. L'absence de reconnaissance de la P-gp par les anticorps dans ces organes pourrait être due au fait que la P-gp est principalement localisée au niveau apical des cellules canaliculaires impliquées dans l'excrétion de métabolites et des xénobiotiques [Thiebaut *et al.*, 1987].

Enfin, nous avons testé l'effet *in vivo* de l'immunisation avec les différentes préparations vaccinales. Le modèle d'ascite généré par l'injection intra-péritonéale de cellules MDR telles que les cellules P388/DOX a souvent été utilisé pour juger de l'efficacité des

modulateurs de la MDR [Tsuruo *et al.*, 1983; Tsuruo *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 2005]. Les différents modulateurs chimiques ayant été testés *in vivo* potentialisent l'effet de la chimiothérapie avec des efficacités plus ou moins importantes. Des améliorations de 49 et 25% de la survie des animaux ayant reçu une injection *i.p.* de cellules P388 MDR ont été observées suite à un traitement combinant respectivement le composé S9788 (un dérivé de triazinoaminopiperidine) et un dérivé de la tétrandrine avec une chimiothérapie conventionnelle [Pierré *et al.*, 1992 ; Wang *et al.*, 2005]. Dans notre étude, l'immunisation avec la préparation Lp124 permet d'améliorer l'efficacité du traitement par chimiothérapie. Ceci est démontré par l'augmentation de 83% de la durée de vie moyenne des animaux immunisés par rapport à celle des animaux ayant reçu une chimiothérapie. L'immunisation avec Lp2 et Lp124/MPLA n'a, au contraire, pas d'effet chimiosensibilisateur, bien que le sérum Lp2 ait montré une activité *in vitro*. Ceci confirme que la préparation Lp124 contenant les 3 peptides sans addition de MPLA permet de générer les anticorps les plus efficaces.

Cependant, l'éradication complète des tumeurs n'a pas lieu quelle que soit la préparation utilisée, et tous les animaux ont succombé suite à l'injection des cellules P388/DOX. Le fait que la réactivité de l'anticorps UIC2 augmente en présence de substrats de la P-gp a montré qu'il existe plusieurs états conformationnels de la P-gp [Mechetner *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 2001]. Ainsi, la neutralisation incomplète de la P-gp pourrait être due à l'existence de différents états conformationnels de la P-gp à la surface des cellules tumorales. Une certaine conformation de la P-gp favoriserait la fixation des anticorps alors qu'une autre pourrait masquer les épitopes cibles, empêchant la liaison des anticorps.

La quantité d'anticorps pourrait également expliquer l'absence de neutralisation complète de la P-gp. La quantité d'anticorps générée pourrait être insuffisante pour bloquer la totalité des pompes. Une nouvelle série d'immunisations réalisée après l'inoculation des tumeurs pourrait restimuler la synthèse d'anticorps. Cependant, l'effet myélosuppresseur de la DOX rend cette solution difficilement concevable.

Une autre stratégie visant à optimiser l'activité des anticorps consiste à administrer un modulateur chimique. Il a effectivement été démontré que l'anticorps UIC2 administré seul réagit avec seulement 20 à 50% des P-gp alors que l'administration simultanée d'UIC2 et de cyclosporine A permet d'une part de réduire considérablement la dose de modulateur et d'autre part de parvenir à une neutralisation complète de la P-gp [Goda *et al.*, 2007].

Seconde partie

Sensibilisation des cellules multidrug- résistantes par des flavonoïdes extraits des feuilles de luzerne

Introduction

Les composés polyphénoliques constituent un des groupes de métabolites les plus importants du règne végétal. Ce sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont souvent liés à des sucres pour les rendre hydrosolubles. Dix grandes classes de molécules basées sur leur structure, et plus de 8000 composés ont été décrits [Bravo L, 1998, Manach C *et al.*, 2004]. De nombreuses études épidémiologiques suggèrent que la consommation de fruits et légumes est corrélée avec une incidence réduite des cancers et des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Ces effets bénéfiques ont été attribués à la présence des composés phénoliques [Terry P *et al.*, 2001, Manach *et al.*, 2005]. Les polyphénols les plus abondamment trouvés chez les plantes sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes (Figure 37) [Yang *et al.*, 2001].

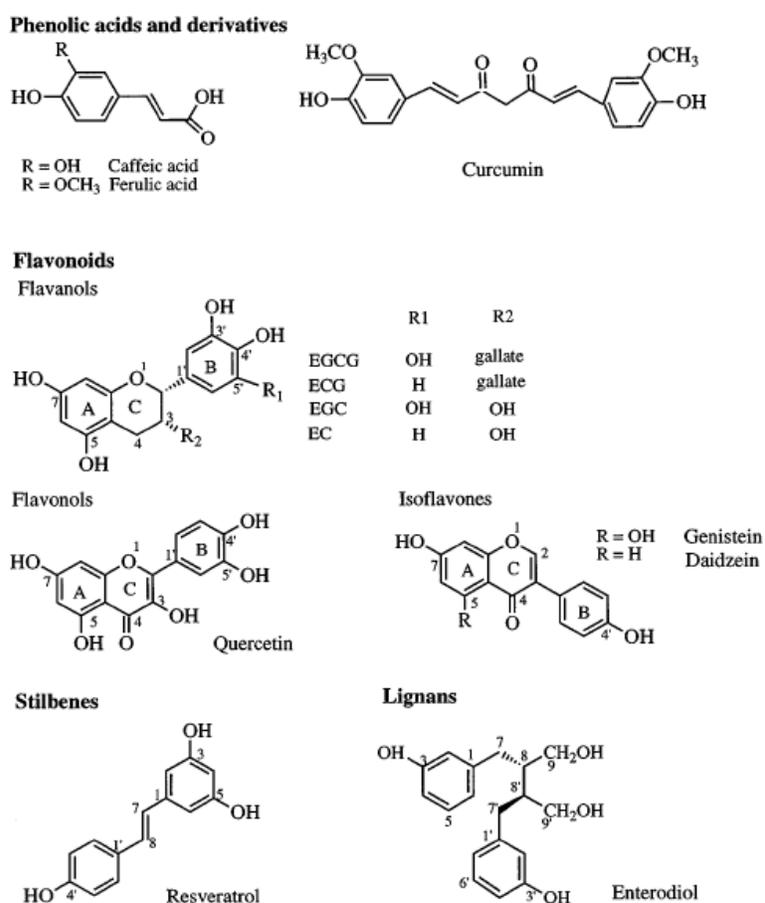


Figure 37. Principales classes de polyphénols

Les flavonoïdes représentent environ 60% des polyphénols contenus dans l'alimentation. Plus de 6500 flavonoïdes ont été décrits et partagent tous un squelette carboné diphenylpropane commun (C6-C3-C6), c'est-à-dire deux cycles benzènes liés par une chaîne linéaire de trois carbones (Figure 38). La diversité des composés est due à la nature des substituants présents au niveau de chaque cycle (hydroxylation, méthylation, prénylation, glycosylation) [Bruneton J, 1999].

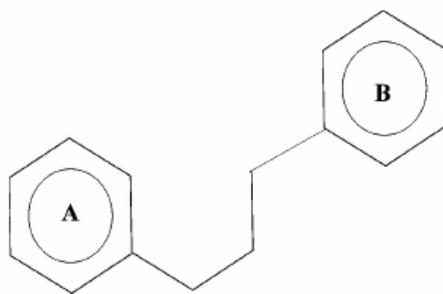


Figure 38. Structure de base des flavonoïdes

Ils peuvent être ainsi divisés et classifiés en plusieurs sous-groupes. Les flavonoïdes au sens strict regroupent les flavones, flavonols, flavonones, flavan-3-ols, chalcones, aurones et flavyliums (Figure 39). A l'exception des chalcones et aurones, la chaîne en C3 des flavonoïdes forment un hétérocycle oxygéné (cycle C). Les isoflavonoïdes comprennent les isoflavones, isoflavonones, isoflavanes, roténoïdes, ptérocarpanes, 3-arylcoumarines, coumestanes et coumaronochromones (Figure 40). Ils sont presque spécifiques des fabacées. La similitude de structure des flavonoïdes et notamment des isoflavonoïdes avec le 17- β -estradiol leur a valu le nom de « phytoestrogènes ». De ce fait, ils possèdent une activité estrogénique (ou anti-estrogénique) [Dixon, 2004].

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la physiologie des plantes. Ils sont responsables de la pigmentation et du parfum et sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes. Ils interviennent également dans la défense de la plante contre les prédateurs, ou des agents pathogènes, notamment les ptérocarpanes qui possèdent une activité antifongique importante [Jiménez-González *et al.*, 2008].

Etant présents dans tout le règne végétal, on retrouve les flavonoïdes dans tous les produits alimentaires d'origine végétale tels que les fruits, les légumes, le cacao, le thé ainsi que les plantes médicinales. Depuis une décennie, une attention croissante a été portée sur les effets bénéfiques des flavonoïdes en raison de leurs multiples activités biologiques : anti-

inflammatoires, anti-oxydantes, antibiotiques, anti-estrogénique et anticancéreuses [Bravo, 1998].

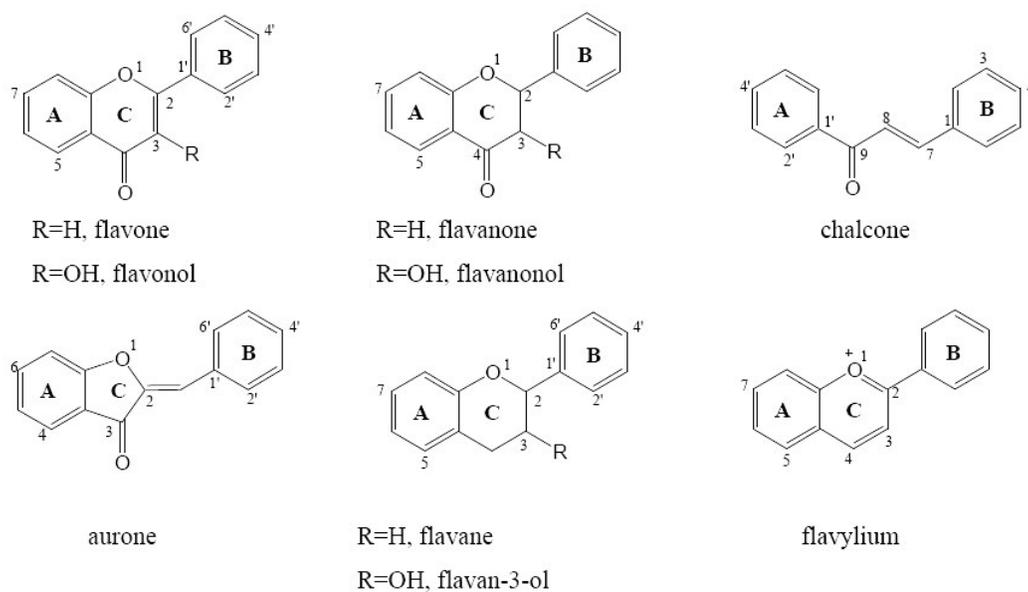


Figure 39. Les différentes classes de flavonoïdes au sens strict

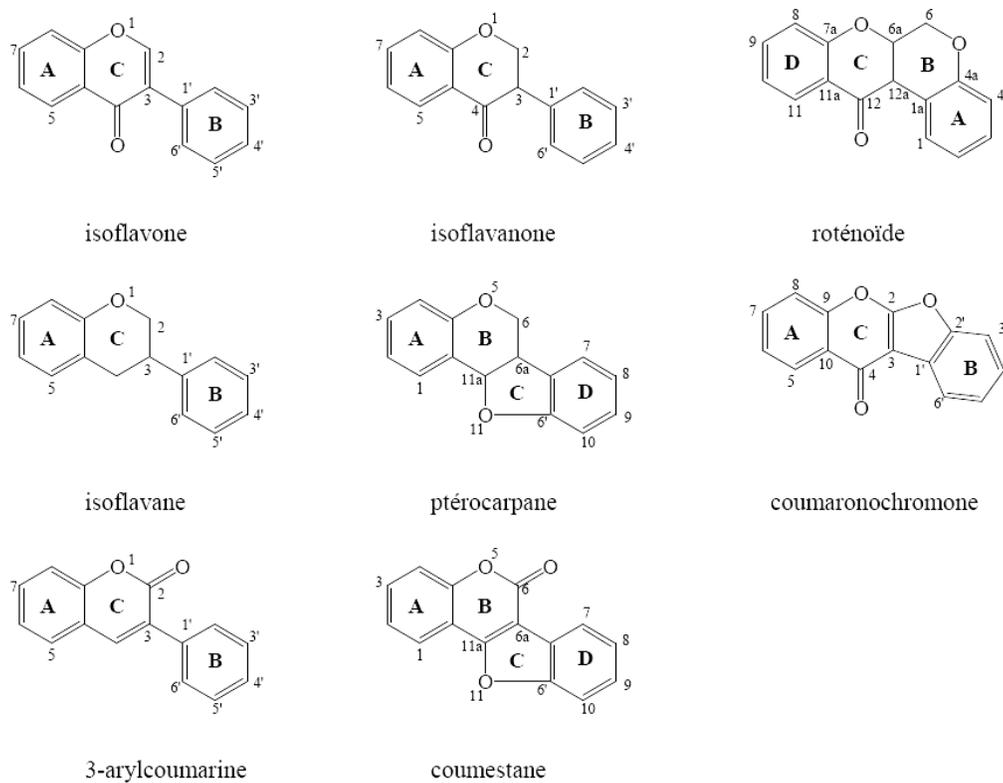


Figure 40. Les différentes classes d'isoflavonoïdes

Les propriétés anticancéreuses des flavonoïdes ont dans un premier temps été attribuées à leur activité anti-oxydante. Les espèces réactives de l'oxygène générées au cours du métabolisme peuvent causer des dommages dans l'ADN et l'accumulation de ces dégâts non réparés serait un élément critique dans le développement des cancers ainsi que d'autres pathologies [Wilson *et al.*, 2003]. Les flavonoïdes sont capables de prendre en charge les radicaux libres grâce à leurs nombreux groupes hydroxyles [Lien *et al.*, 1999, Noroozi *et al.*, 1998]. Plus récemment, il a été montré qu'ils pouvaient inhiber la carcinogenèse en interférant au niveau de l'initiation, de la promotion et de la progression tumorale, notamment par l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition des cyclooxygénases, l'inhibition de l'invasion et l'angiogenèse ainsi que l'induction de l'apoptose dans les cellules tumorales [Ramos S *et al.*, 2007], tout en protégeant les cellules normales [Garg *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2008] .

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique impliqué dans le développement de l'organisme et l'homéostasie cellulaire au cours de laquelle se manifestent des événements morphologiques (condensation de la chromatine, bourgeonnement du cytoplasme conduisant à la formation de corps apoptotiques) et biochimiques (activation des trans-glutaminases, des caspases, perte de l'asymétrie membranaire et externalisation des phosphatidylsérines, diminution du potentiel membranaire mitochondrial, clivage internucléosomal de l'ADN, clivage de l'enzyme de réparation PARP) [Allen *et al.*, 1997].

Le processus apoptotique peut être divisé en 3 phases successives. La phase d'initiation peut être déclenchée par divers stimuli tels que les radiations ionisantes, une carence en facteurs de croissance, des drogues cytotoxiques ou des cytokines. La phase de décision est l'étape au cours de laquelle les différents signaux de mort ou de survie sont intégrés par la cellule et orientés vers la mort ou la survie en fonction de l'état physiologique et de l'environnement. Contrairement aux deux premières étapes, la phase d'exécution est irréversible et fait intervenir les effecteurs de l'apoptose qui clivent de nombreux substrats, aboutissant à la mort de la cellule.

Il existe deux voies principales dans l'induction de l'apoptose : une voie extrinsèque médiée par les récepteurs et une voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie (Figure 41). Une autre voie impliquant les céramides a également été décrite [Kolesnick et Krönke, 1998].

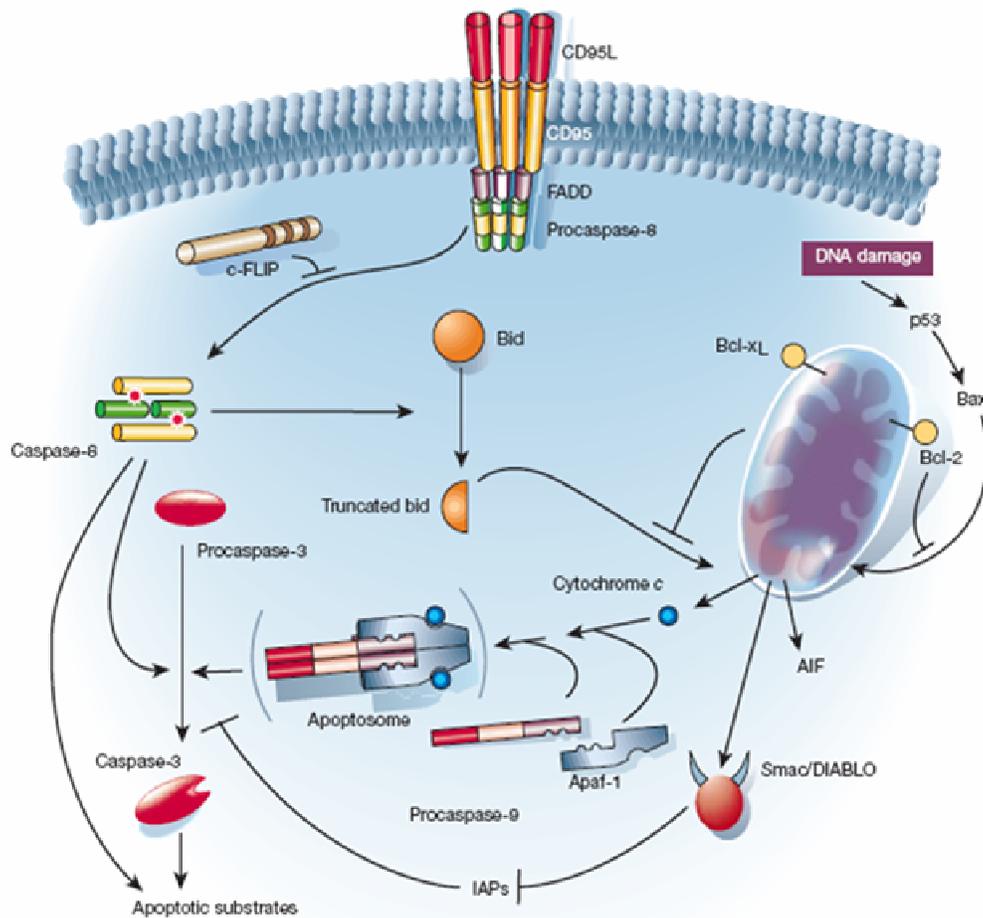


Figure 41. Signalisation de l'apoptose (Hengartner, 2000)

La voie extrinsèque est médiée par les récepteurs de la superfamille du $TNF\alpha$. Ceux-ci sont activés par des ligands naturels ($TNF\alpha$, TRAIL, Fas, etc.) et possèdent un domaine intracellulaire de mort permettant leur liaison avec des protéines adaptatrices telles que FADD. La formation de ce complexe recrute les caspases initiatrices 8/10 qui, lorsqu'elles sont activées, activent à leur tour les caspases effectrices 3/7.

La voie intrinsèque fait intervenir la perméabilisation de la membrane mitochondriale ayant pour but la libération du cytochrome c. Une fois dans le cytosol, celui-ci se lie au dATP, à APAF-1 et la caspase 9 pour former l'apoptosome, un complexe responsable de l'activation des caspases effectrices. Cette voie est régulée par différents facteurs, en particulier par les protéines de la famille Bcl-2. Celles-ci partagent des homologies de structure, les domaines BH (Bcl-2 Homology). Certains membres tels que Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 ou Bcl-w ont une

activité anti-apoptotique alors que d'autres membres tels que Bax, Bak ont un effet pro-apoptotique. D'autres protéines pro-apoptotiques possèdent uniquement le domaine BH3 (« BH3-only proteins) et peuvent servir de liaison entre les voies intrinsèques et extrinsèques (Bid, Bim, Bik, Bad, etc.) [Strasser *et al.*, 2000, Kuwana et Newmeyer, 2003].

Dans certaines cellules, appelées cellules de type I, la quantité de caspase 8 activée par la voie des récepteurs est suffisante pour initier l'apoptose alors que dans les cellules de type II, la quantité de caspase 8 est trop faible et le signal apoptotique est amplifié par induction de la voie mitochondriale. Dans ce cas, la caspase 8 clive Bid qui est transloqué vers la mitochondrie et interagit avec les protéines pro-apoptotiques pour induire la libération du cytochrome c, ainsi que d'autres facteurs induisant l'apoptose (AIF, Smac/DIABLO, EndoG, etc.).

De nombreux travaux ont démontré qu'une grande variété de flavonoïdes et d'extraits de plantes pouvaient induire l'apoptose [Ramos *et al.*, 2007, Thatte *et al.*, 2000, Ruan *et al.*, 2006]. Etant donné leur grande variété de cibles intracellulaires, leurs effets sont divers, mais ils agissent souvent en inhibant l'expression ou l'activité des protéines anti-apoptotiques et/ou en augmentant celle des protéines pro-apoptotiques [Pellechia et Reed, 2004, Ramos, 2007]. Ils peuvent aussi amplifier l'effet apoptotique des drogues cytotoxiques dans les cellules tumorales [Garg *et al.*, 2005, Yang JY *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2008]. Dans les cellules devenues résistantes, notamment celles qui expriment la P-gp, les flavonoïdes restaurent la sensibilité à ces agents, et peuvent agir au niveau de l'expression et/ou de l'activité de la pompe.

Plusieurs flavonoïdes se sont montrés capables d'inhiber l'efflux de drogues médié par la P-gp, avec une efficacité plus ou moins importante [Di Pietro *et al.*, 2002, Morris et Zhang, 2006, tableau XII]. Des études de relation structure/activité ont mis en évidence que la double liaison C₂-C₃, ainsi que l'hydroxylation des carbones 3 et 5 étaient des éléments structuraux importants pour l'interaction avec le domaine NBD2 de la P-gp [Boumendjel *et al.*, 2002]. A partir de ces données, il a été conclu que les flavones, flavonols et chalcones sont les plus actifs. De plus, l'insertion du cycle B en C₂ est plus favorable que lorsque le cycle est lié au C₃ du cycle C, ce qui suggère que les isoflavonoïdes interagissent avec la P-gp avec une faible affinité. Cependant, des études ont montré que plusieurs isoflavonoïdes dont la génistéine et la biochanine A augmentaient la rétention de drogues dans des cellules

tumorales exprimant la P-gp [Castro et Altenberg, 2007, Zhang et Morris, 2003, Limtrakul *et al.*, 2005].

Tableau XII. Quelques flavonoïdes et autres composés polyphénoliques inhibant l'activité et/ou l'expression de la P-gp

Composés polyphénoliques
Flavonoïdes Génistéine [Castro et Altenberg, 1997], Quercétine, Kaempférol [Limtrakul <i>et al.</i> , 2005], Tricine [Jeong <i>et al.</i> , 2007], CJY [Ji et He, 2007], Biochanine A, Morine, Phlorétine, Silymarine [Zhang et Morris, 2003], Chalcones [Ivanova <i>et al.</i> , 2008]
Acides Phénoliques Curcumin [Chearwae <i>et al.</i> , 2004, Choi <i>et al.</i> , 2008], Tetrahydrocurcumin [Limtrakul <i>et al.</i> , 2007], Capsaïcine, Gingérol [Nabekura <i>et al.</i> , 2005]
Lignanes Schisandrol [Fong <i>et al.</i> , 2007], Gomisine A [Wan <i>et al.</i> , 2006]
Autres Honokiol [Xu <i>et al.</i> , 2006]

La luzerne (*Medicago sativa* L, Figure 42) est une plante très cultivée en Champagne-Ardenne (environ 600 000 hectares). Cette plante légumineuse de la famille des Fabacées est aujourd'hui majoritairement destinée à l'alimentation animale.



Figure 42. Luzerne (*Medicago Sativa* L.)

Néanmoins, les effets bénéfiques des extraits de feuilles de luzerne (EFL) sont connus depuis environ 1500 ans. En médecine traditionnelle, elle a été utilisée pour traiter les problèmes digestifs et rénaux. Elle est également connue pour ses propriétés anti-anémiques, anti-diabétiques et sa capacité à faire baisser la cholestérolémie et la triglycéridémie [Esper *et al.*, 1987, Malinow *et al.*, 1980, Molgaard *et al.*, 1987, Swanston-Flatt *et al.*, 1990]. La forte teneur en protéines (50 à 55%), minéraux, vitamines et acides gras poly-insaturés font de ces extraits foliaires un supplément nutritionnel utilisé avec succès dans les populations touchées par la malnutrition.

Malgré l'identification à partir des feuilles de luzerne de nombreux métabolites secondaires possédant des activités potentiellement anticancéreuses, l'effet antitumoral des EFL n'a jamais été étudié. Dans un précédent travail, nous avons mis en évidence les effets antitumoraux d'autres polyphénols tels que le résvératrol (en cours de soumission) et le curcumin [Odot *et al.*, 2004]. Nous avons initié un travail permettant de déterminer si ces EFL exercent un effet inhibiteur sur la croissance de lignées cellulaires tumorales sensibles et multidrug-résistantes. Dans un second temps, un « screening » bio-guidé, basé sur la cytotoxicité des sous-fractions obtenues à partir de l'EFL, a été mené afin d'isoler des composés potentiellement cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales, et en particulier des cellules résistantes exprimant la P-gp.

Résultats

I. Recherche de métabolites à activité antiproliférative par un fractionnement bioguidé de l'extrait foliaire de luzerne (EFL)

I.1. Effet des différents extraits obtenus à partir des EFL sur la viabilité cellulaire

Un premier fractionnement de l'EFL réalisé à l'aide de solvants de polarité croissante a permis d'obtenir 5 extraits. La cytotoxicité de ces extraits a été dans un premier temps évaluée grâce au test au MTT sur un ensemble de lignées cellulaires tumorales sensibles et résistantes à la DOX. Les résultats sont regroupés dans le tableau XIII.

Quelle soit la lignée cellulaire utilisée, les extraits les moins polaires (c'est-à-dire toluène et MtBE) possèdent les activités anti-prolifératives les plus efficaces. Les IC_{50} pour l'extrait toluène sont comprises entre 17 et 105 $\mu\text{g/ml}$ sur l'ensemble des lignées cellulaires testées, alors que les IC_{50} pour l'extrait MtBE sont comprises entre 48 et 145 $\mu\text{g/ml}$. Avec les autres extraits de polarité plus importante (AcOEt, BuOH et H_2O), les IC_{50} sont supérieures à 150 $\mu\text{g/ml}$ pouvant aller jusqu'à plus de 400 $\mu\text{g/ml}$.

D'une manière générale, les extraits toluène et MtBE semblent agir sur la viabilité cellulaire avec une efficacité plus grande sur les lignées leucémiques P388, K562 et L1210 que sur le mélanome B16 et le carcinome mammaire MCF7.

Il existe une différence des IC_{50} entre les cellules sensibles et résistantes à la doxorubicine et plus particulièrement dans les cellules leucémiques aussi bien murines P388, L1210 qu'humaines K562. Cependant, il est encore, à ce stade, difficile d'interpréter ces variations du fait de diversité et la quantité des métabolites contenus dans chaque fraction.

Tableau XIII. Cytotoxicité des différents extraits obtenus à partir de l'EFL (IC₅₀ en µg/ml)

	Extrait Toluène	Extrait MtBE	Extrait AcOEt	Extrait BuOH	Extrait H ₂ O
B16	70 ± 3,1	85 ± 6,5	195 ± 13,9	> 250	> 400
B16/DOX	90 ± 5,9	145 ± 9,5	171 ± 21,1	ND	ND
MCF7	81 ± 7,8	108 ± 4,6	203 ± 15,6	ND	ND
MCF7/DOX	105 ± 9,5	100 ± 6,7	163 ± 12,6	180 ± 11,4	ND
P388	48,5 ± 4,2	79,5 ± 4,8	182 ± 21,5	> 250	> 400
P388/DOX	71 ± 5,1	63 ± 3	> 250	> 300	> 400
K562	45 ± 2,4	38 ± 2,1	220 ± 13,3	> 300	> 350
K562/DOX	17 ± 1,9	130 ± 10,3	287 ± 28	> 350	> 350
L1210	29,5 ± 3,2	48,5 ± 6,1	152 ± 9,7	ND	ND
L1210/DOX	62 ± 4,1	71 ± 3,2	235 ± 12,6	ND	ND

Les différentes lignées cellulaires sont incubées en présence de concentrations croissantes de chaque extrait pendant 72h puis la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT. Chaque valeur correspond à la moyenne ± ET de 3 expériences réalisées en triplicatas. ND : non déterminé.

I.2. Cytotoxicité et apoptose induites par les extraits toluène et MtBE

I.2.1. Effet des extraits sur la viabilité des cellules P388 et P388/DOX

La cytotoxicité des extraits toluène et MtBE a été étudiée plus précisément sur la lignée P388 et son homologue résistante P388/DOX. Les extraits toluène et MtBE induisent une diminution de la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante (Figure 43). Dans les cellules P388, l'IC₅₀ de l'extrait toluène diminue de 82 µg/ml au bout de 24h à 48,5 µg/ml après 72h d'incubation (Figure 43a). Dans les cellules P388/DOX, l'effet temps-dépendant de

l'incubation avec l'extrait toluène est moins accentuée, l'IC₅₀ variant peu entre 24 et 72h (respectivement 76, 72,5 et 71 µg/ml) après 1, 2 et 3 jours d'incubation, Figure 43b).

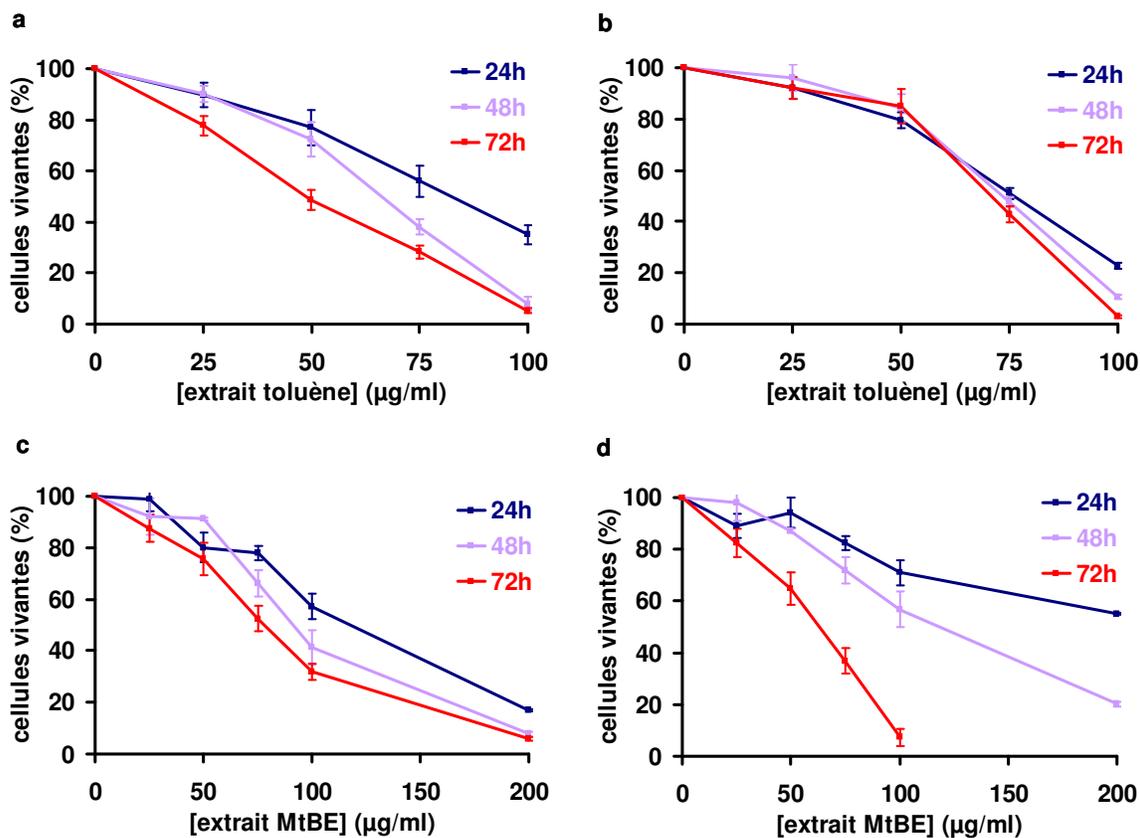


Figure 43. Cytotoxicités des extraits toluène et MtBE sur les cellules P388 (a,c) et P388/DOX (b,d). Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de chaque extrait pendant différentes périodes puis la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT.

Après 3 jours de culture, l'IC₅₀ de l'extrait toluène est plus faible en présence des cellules P388 que de leurs homologues résistantes.

L'incubation avec l'extrait MtBE induit également une cytotoxicité temps dépendante. L'IC₅₀ passe de 119 µg/ml au bout de 24h à 79,5 µg/ml après 72h d'incubation pour les cellules P388 (Figure 43c). Contrairement à l'extrait toluène, la cytotoxicité induite par l'extrait MtBE dans les cellules résistantes est fortement affectée par la période d'incubation. L'IC₅₀ est en effet supérieure à 200 µg/ml au bout de 24h puis diminue considérablement après 48 et 72h (respectivement 119 et 63 µg/ml, Figure 43d).

I.2.2. Induction de l'apoptose par les extraits toluène et MtBE

La plupart des extraits de plantes ayant montré une activité pro-apoptotique sur les cellules tumorales, nous avons déterminé si les extraits toluène et MtBE obtenus à partir des feuilles de luzerne étaient également capables d'induire l'apoptose. Pour cela, différentes approches ont été utilisées : changements morphologiques, analyse de la fragmentation de l'ADN et du contenu en ADN des cellules, et analyse de l'activation de la caspase 3 et du clivage de PARP.

I.2.2.1. Changements morphologiques nucléaires

Dans un premier temps, des modifications de la morphologie nucléaire induites par les extraits toluène et MtBE ont été recherchées par coloration de l'ADN au Hoechst 33342. Observées en fluorescence, les cellules non traitées présentent un noyau et une répartition homogène de la chromatine (Figure 44). Lorsque les cellules sont traitées avec 100 µg/ml d'extrait toluène ou MtBE, elles présentent des modifications caractéristiques de l'apoptose, c'est-à-dire la fragmentation du noyau ainsi que la condensation de la chromatine. Ce phénomène est observable dans les cellules P388 aussi bien sensibles que résistantes.

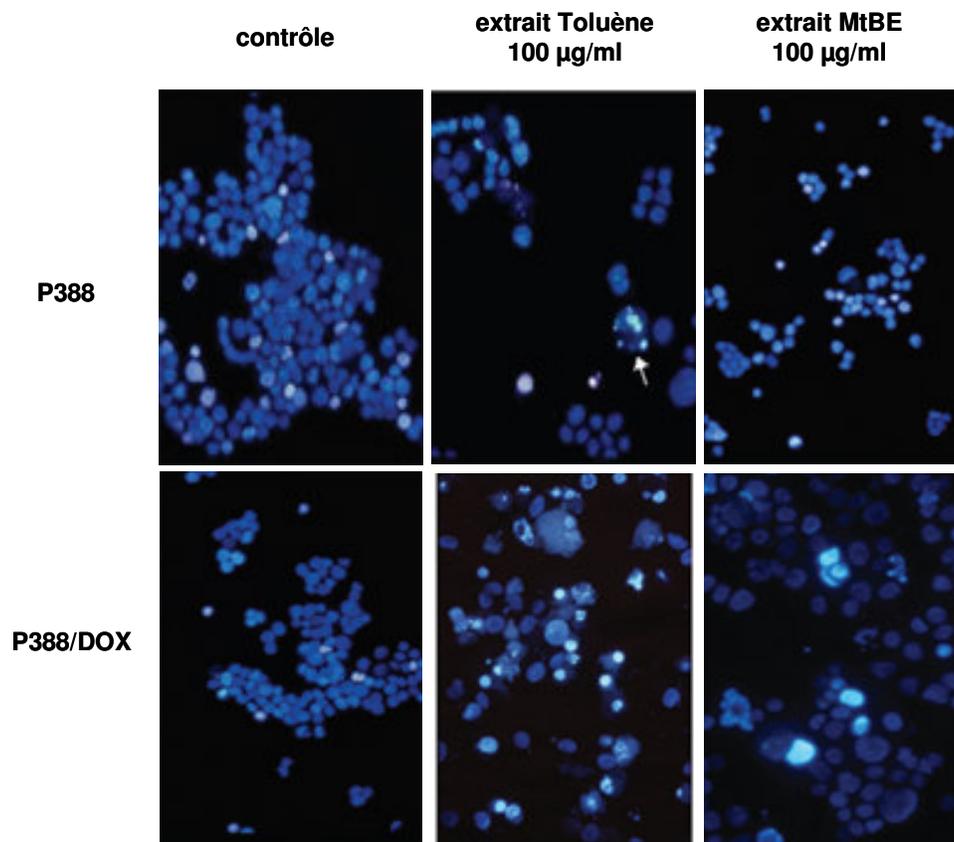


Figure 44. Modifications morphologiques induites par les extraits toluène et MtBE. Après l'incubation pendant 48h avec 100 µg/ml d'extrait toluène ou MtBE, les cellules sont déposées sur une lame, fixées au paraformaldéhyde puis colorées au Hoechst 33342 et observées avec un microscope à fluorescence.

I.2.2.2. Analyse de la fragmentation de l'ADN

La fragmentation internucléosomique de l'ADN est une autre caractéristique biochimique de l'apoptose. Après traitement avec 100 µg/ml d'extrait toluène ou MtBE, l'ADN génomique des cellules est extrait et analysé par électrophorèse en gel d'agarose. La Figure 45 montre que les cellules P388 sensibles ou résistantes non traitées possèdent un ADN de haut poids moléculaire, donc non fragmenté alors que les cellules exposées aux extraits toluène et MtBE présentent un profil d'ADN en barreaux d'échelles caractéristiques des cellules apoptotiques. L'intensité des bandes correspondant aux fragments de petite taille dans les cellules traitées pendant 48 heures par rapport aux cellules traitées pendant 24 heures

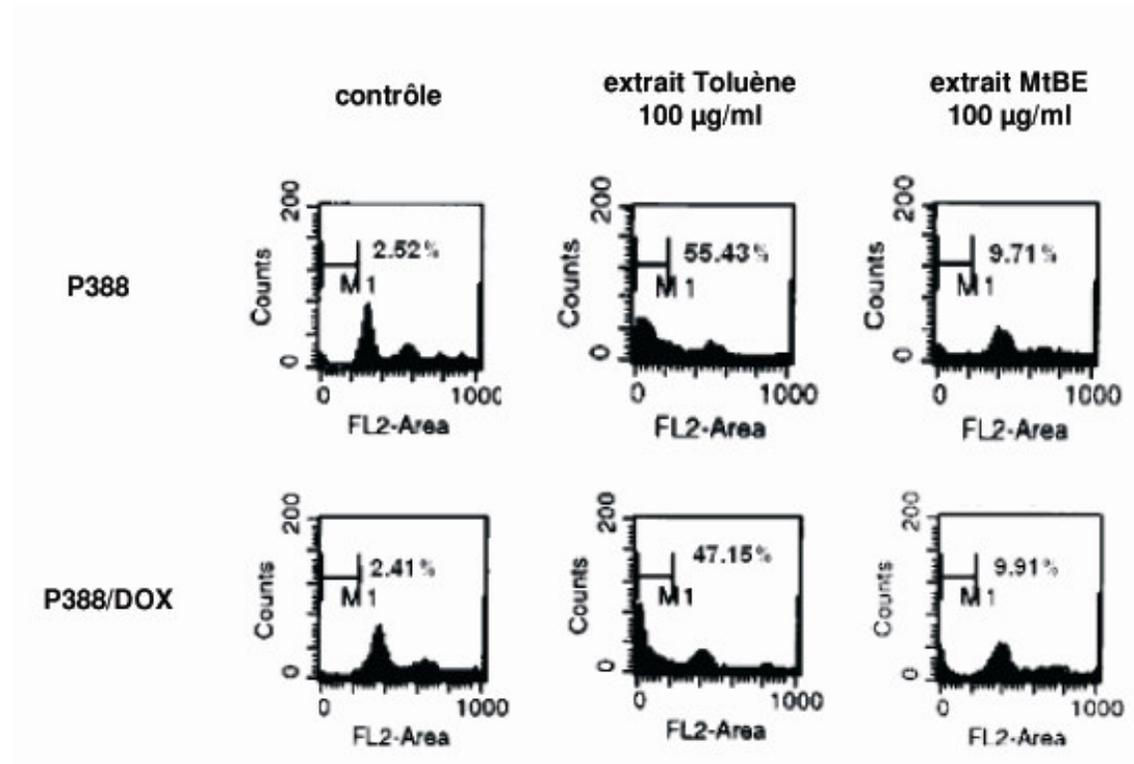


Figure 46. Détection des cellules apoptotiques par cytométrie en flux. Après 48h de traitement, les cellules sont fixées puis marquées avec 50 µg/ml d'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux. Les cellules ayant une quantité d'ADN inférieure à 2n (subG1) sont définies comme apoptotiques. Le pourcentage indique leur nombre.

I.2.2.4. Activation de la caspase-3 et clivage de PARP

L'apoptose induite par de nombreux extraits de plantes implique la voie faisant intervenir les caspases qui activent des nucléases responsables de la fragmentation de l'ADN et qui clivent de nombreuses protéines telles que PARP. Nous avons donc recherché si les extraits toluène et MtBE provenant de l'EFL impliquent l'activation de la caspase 3 effectrice et le clivage de PARP. L'analyse par western blot des extraits protéiques traités avec les 2 extraits montre une diminution d'expression de la forme inactive de la caspase 3 (Figures 47 et 48). Cette diminution d'expression de la procaspase 3 augmente avec la concentration de chaque extrait ainsi qu'avec le temps d'incubation, aussi bien dans la lignée cellulaire P388 sensible que dans la lignée résistante.

Le traitement avec les deux extraits induit également l'apparition du fragment de 85 kDa de PARP dans les deux lignées cellulaires.

Ces résultats montrent que les extraits toluène et MtBE provenant de l'EFL induisent l'apoptose dans les cellules P388 et P388/DOX de manière caspase-dépendante.

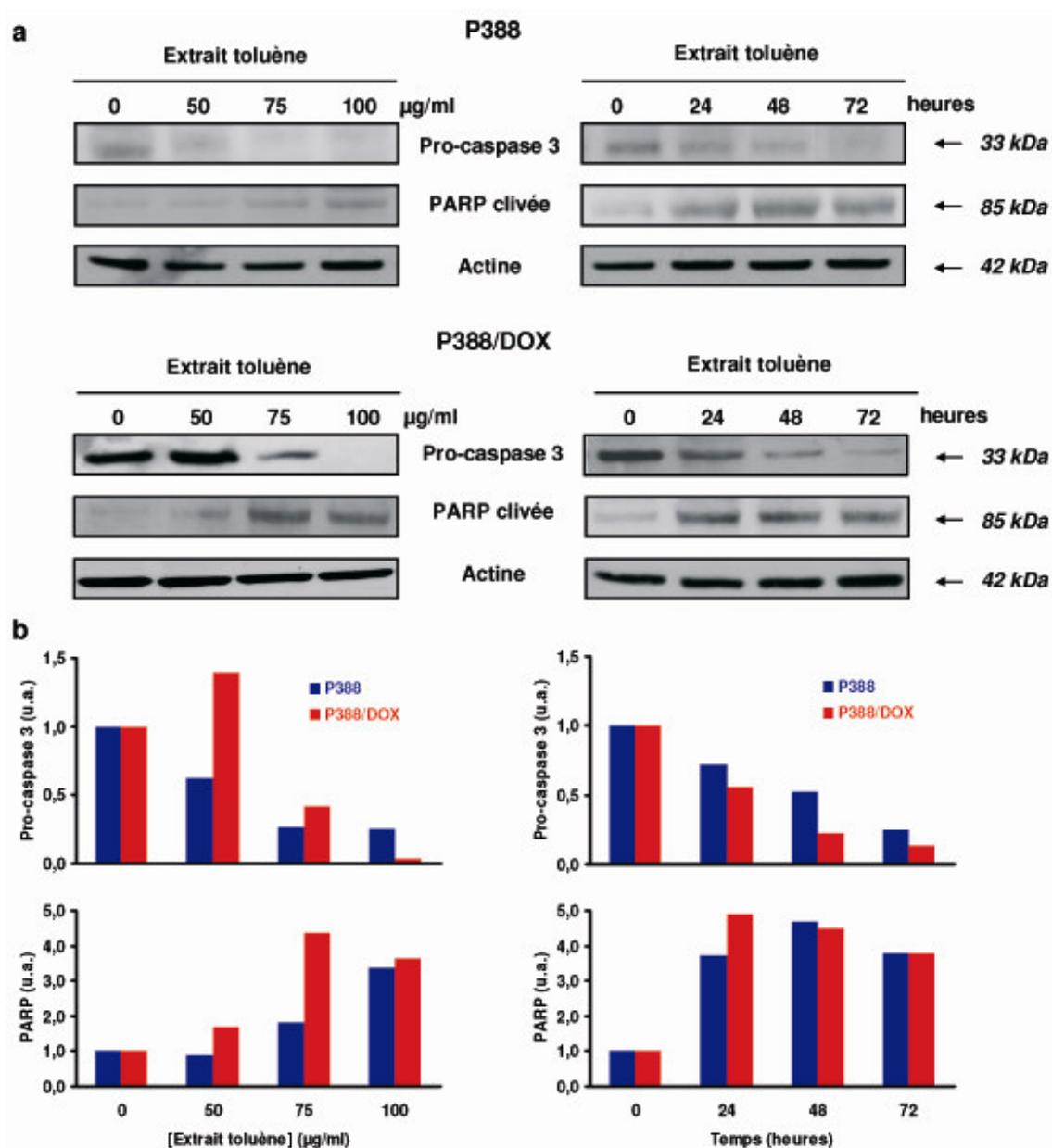


Figure 47. Effets de l'extrait Toluène sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP dans les cellules P388 et P388/DOX. Après le traitement des cellules, les protéines sont extraites et séparées par SDS-PAGE. (a) Analyse par western blot de l'expression de la pro-caspase 3 et du fragment de 85 kDa de PARP après traitement des cellules avec des concentrations croissantes d'extrait toluène ou 75 µg/ml d'extrait pendant 24, 48 ou 72h, (b) Quantification par densitométrie des bandes correspondant aux deux protéines.

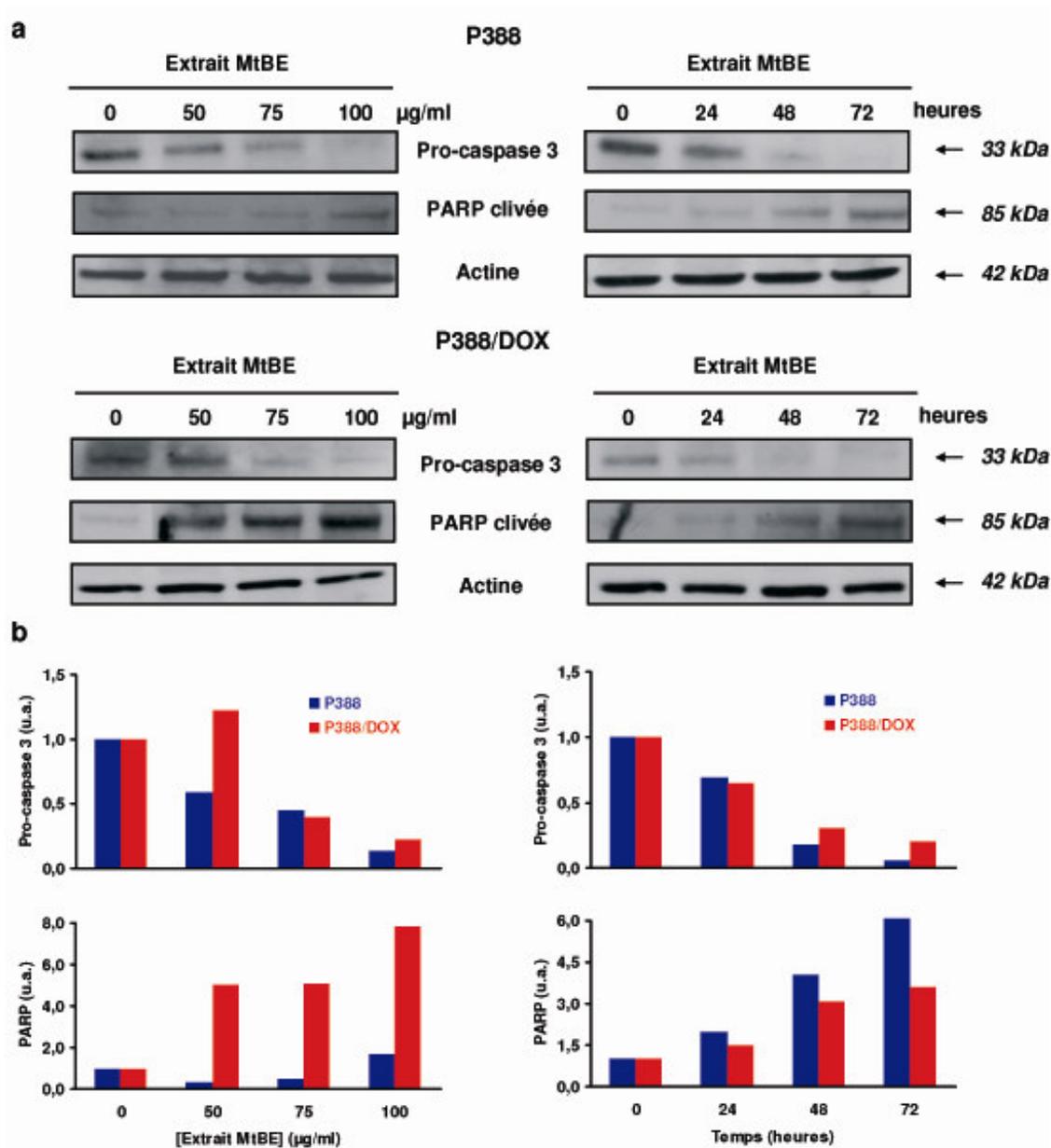


Figure 48. Effets de l'extrait MtBE sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP dans les cellules P388 et P388/DOX. Après le traitement des cellules, les protéines sont extraites et séparées par SDS-PAGE. (a) Analyse par western blot de l'expression de la pro-caspase 3 et du fragment de 85 kDa de PARP après traitement des cellules avec des concentrations croissantes d'extrait MtBE ou 75 µg/ml d'extrait pendant 24, 48 ou 72h, (b) Quantification par densitométrie des bandes correspondant aux deux protéines.

I.3. Fractionnement de l'extrait toluène et recherche de métabolites à activité antiproliférative contenus dans la fraction EFL-To-1

I.3.1. Effet des différentes fractions obtenues à partir de l'extrait toluène sur la viabilité cellulaire

Dans le but de « screener » l'ensemble des extraits isolés, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'extrait toluène. Avant d'identifier les composés contenus dans cet extrait, un premier fractionnement par chromatographie liquide sous vide a permis d'isoler 4 fractions.

L'effet de ces 4 fractions sur la viabilité de plusieurs lignées cellulaires a d'abord été évalué par le test MTT. Le tableau XIV montre que les fractions To-1 et To-2 sont celles qui présentent les IC_{50} les plus intéressantes sur l'ensemble des lignées testées. Ces 2 fractions ont des IC_{50} comprises entre 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ selon la lignée cellulaire considérée alors que celles des fractions To-3 et to-4 sont au delà de 100 $\mu\text{g/ml}$. Il faut cependant noter que, quelle que soit la lignée cellulaire, les IC_{50} de ces 4 fractions restent supérieures à celles obtenues avec l'extrait toluène brut. Les IC_{50} des fractions To-1 et To-2 sont légèrement plus faibles dans les cellules P388 et L1210 sensibles que dans les lignées résistantes correspondantes alors qu'elles sont quasiment équivalentes dans les cellules K562 et K562/DOX

Nous avons donc décidé d'étudier la fraction To-1. Après avoir vérifié qu'elle induisait l'apoptose dans les cellules P388 (Figure 49), nous avons recherché quelles étaient les molécules responsables de cette activité anticancéreuse.

Tableau XIV. Cytotoxicité des différentes fractions obtenues à partir de la fraction toluène (IC₅₀ en µg/ml)

	EFL-To-1	EFL-To-2	EFL-To-3	EFL-To-4
P388S	63 ± 1,4	51 ± 4,9	>100	>200
P388R	100 ± 2,4	69 ± 1,4	>200	>200
K562S	75,2 ± 5	75,5 ± 4,3	>150	ND
K562R	84 ± 6,8	66 ± 6,1	>200	ND
L1210S	66,7 ± 6,7	47,5 ± 3,1	92,5 ± 6,9	>200
L1210R	84 ± 5,3	91,5 ± 1,7	176,5 ± 9,8	>200

Après traitement des cellules pendant 72h avec des concentrations croissantes de chaque fraction, la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT. Chaque valeur correspond à la moyenne ± ET de 3 expériences réalisées en triplicatas. ND : non déterminé.

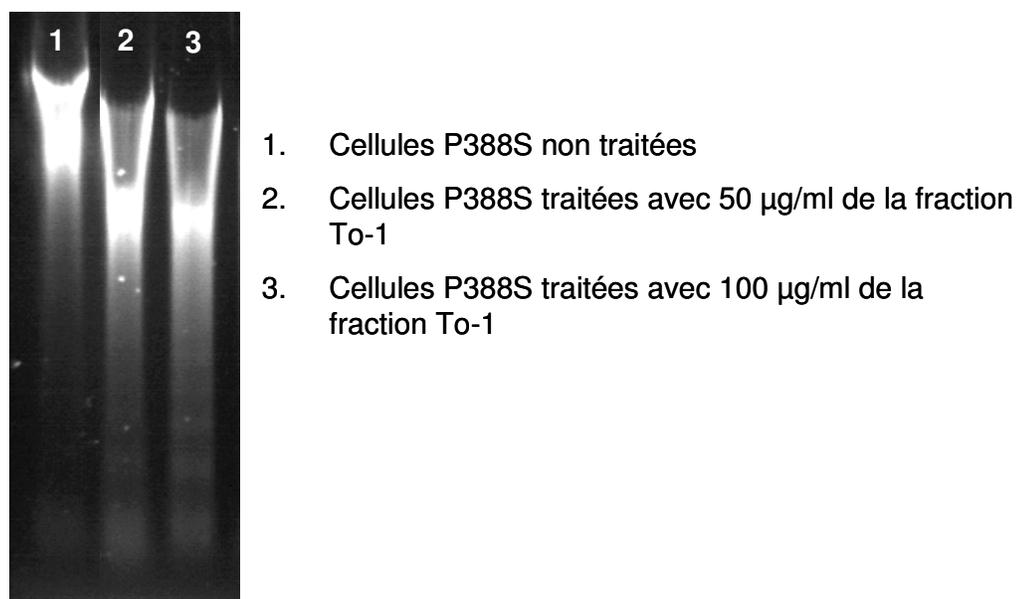


Figure 49. Analyse de la fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées par la fraction EFL-To-1. Après 48h de traitement des cellules avec 50 ou 100 µg/ml de la fraction To-1, l'ADN génomique des cellules est extrait puis soumis à une électrophorèse en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Le gel est observé sous UV.

I.3.2. Purification et identification des métabolites de la fraction EFL-To-1

L'analyse phytochimique effectuée sur la fraction To-1 par diverses techniques (chromatographies, HPLC, cristallisation) a permis d'isoler 8 composés. L'analyse des spectres RMN, UV et IR ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire a permis d'élucider la structure de ces métabolites. Parmi ces 8 composés de structure connue, 5 sont de nature phénoliques et 3 sont de nature terpénique (Figure 50).

Parmi les composés phénoliques, 2 ptérocarpanes ont été identifiés : le 3-hydroxy-9-methoxyptérocarpan, connu sous le nom de médicarpine, et le 4,9-dihydroxy-3,10-dimethoxyptérocarpan, également appelé mélilotocarpan E. Ces 2 métabolites diffèrent uniquement par la nature de leurs substituants en positions 3, 4, 9 et 10. Trois autres flavonoïdes ont été identifiés. Il s'agit du millepurpan, un isoflavane, et 2 flavones isolés en mélange, la tricine et le chrysoériole, qui diffèrent uniquement par la présence d'un groupement méthoxylé supplémentaire en position 3' sur le cycle B de la tricétine.

Les 3 autres composés non phénoliques sont la 3-hydroxy- β -ionone, et 2 métabolites qui ne diffèrent que par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3, l'isololiolide ou épiloliolide et le dihydroactinodiolide.

La cytotoxicité de chaque composé a été évaluée par le test MTT et les IC_{50} pour chaque composé sont regroupées dans le tableau XV. Les différents flavonoïdes isolés présentent des IC_{50} variables comprises entre 20 et 100 μ M. Les IC_{50} plus faibles sont obtenues pour le mélilotocarpan E et le mélange tricine/chrysoériole sur les cellules P388 (respectivement 22,5 μ M et 6,6 μ g/ml, ce qui correspond à une concentration de l'ordre de 20 μ M). Bien que sa structure soit très proche de celle du mélilotocarpan E, la médicarpine présente une IC_{50} quatre fois plus élevée. Cependant, l' IC_{50} de la médicarpine est quasiment similaire dans les cellules P388 sensibles et résistantes, tout comme pour le millepurpan, alors que les IC_{50} pour le mélilotocarpan E et le mélange tricine/chrysoériole obtenues avec les cellules résistantes sont environ 2 et 5 fois plus élevées par rapport à celles obtenues dans les cellules sensibles.

Les 3 composés non phénoliques isolés présentent des IC_{50} supérieures à 200 μ M.

La suite de ce travail sera consacrée à l'étude des propriétés anticancéreuses de la médicarpine et du millepurpan uniquement, le mélilotocarpan E ayant été obtenu en trop faible quantité et les deux flavones, tricine et chrysoériole, n'ayant pas été séparées.

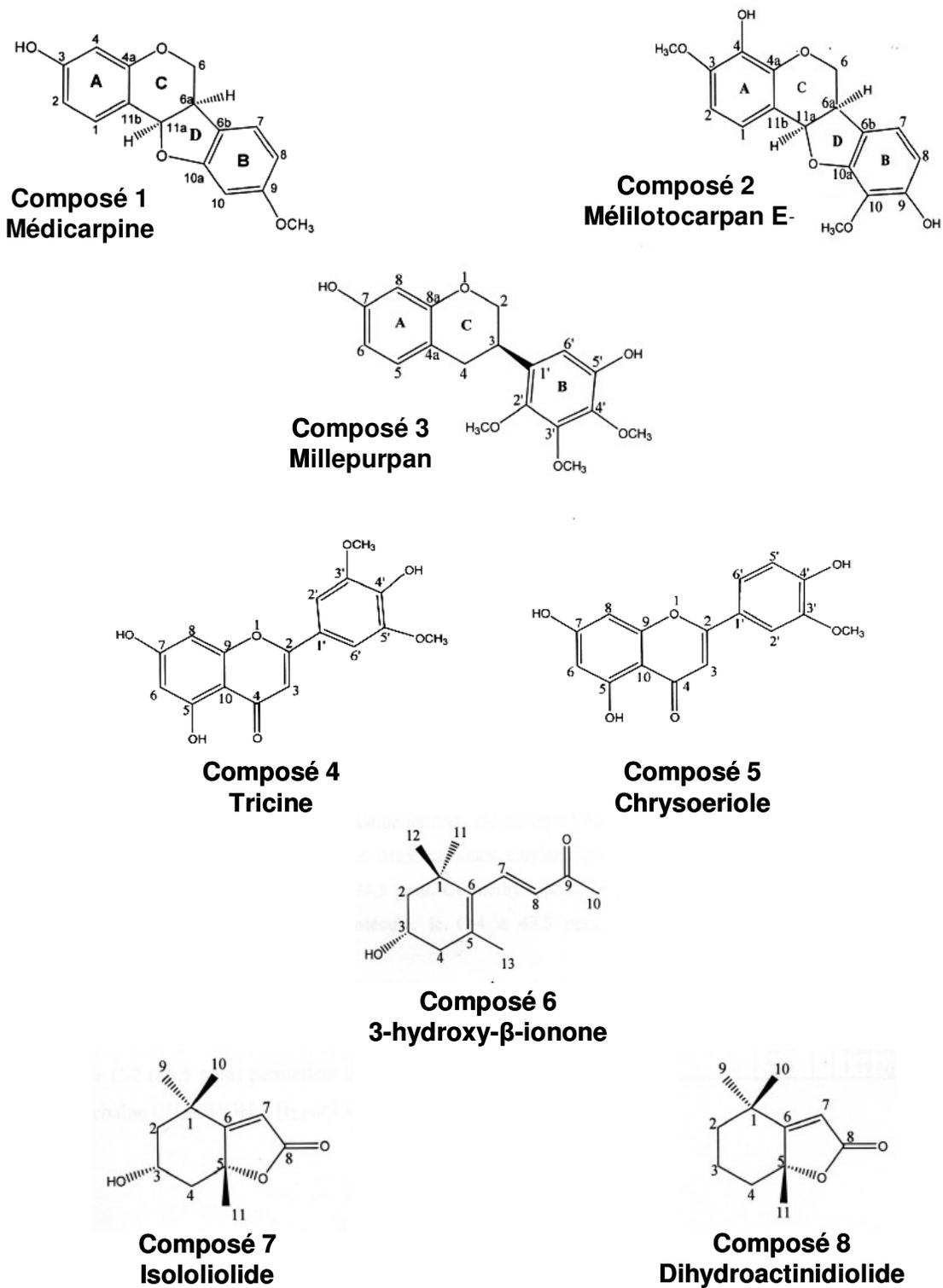


Figure 50. Métabolites isolés dans la fraction EFL-To-1

Tableau XV. Cytotoxicité des métabolites purifiés à partir de la fraction toluène (IC₅₀ en µM)

	Médicarpine	Métilotocarpan E	Millepurpan	Tricine / Chrysoériole ^a
P388	88,3 ± 6,8	22,5 ± 4,3	53,7 ± 9,5	6,6 ± 1,9
P388/DOX	90,5 ± 4,1	47,8 ± 4,2	68,9 ± 4,3	31,2 ± 7,2

Après traitement des cellules pendant 72h avec des concentrations croissantes de chaque métabolite, la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT. Chaque valeur correspond à la moyenne ± ET de 3 expériences réalisées en triplicatas. ^a IC₅₀ en µg/ml. ^b L'indice de résistance correspond au rapport des IC₅₀ respectives des cellules sensibles et résistantes.

I.4. Conclusions

Dans notre recherche de métabolites doués d'activités anticancéreuses dans l'EFL, nous avons mis en évidence un effet antiprolifératif et apoptotique des extraits toluène et MtBE. Le fractionnement de l'extrait toluène a permis d'identifier 3 composés terpéniques ainsi que 5 flavonoïdes. Ces derniers présentent des IC₅₀ intéressantes contre de nombreuses lignées cellulaires tumorales sensibles et résistantes.

II. Etude de deux isoflavonoïdes isolés à partir de la fraction EFL-To-1 : médicarpine et millepurpan

II.1. Cytotoxicité et apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan

II.1.1. Effet sur la viabilité des cellules P388 et P388/DOX

Il est maintenant bien établi que la plupart des flavonoïdes possèdent, à des concentrations plus ou moins importantes, une activité cytotoxique contre les cellules tumorales. Nous avons donc vérifié par le test MTT si les deux isoflavonoïdes que nous avons sélectionnés exercent un tel effet sur les cellules P388 et P388/DOX.

La Figure 51a montre que la médicarpine et le millepurpan induisent une diminution de la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante. La médicarpine a une IC₅₀ comparable dans les deux lignées (respectivement 88,3 µM et 90,5 µM dans les cellules P388 et

P388/DOX). Dans les cellules sensibles, l'IC₅₀ du millepurpan est de 53,7 μM alors qu'elle est de 68,9 μM dans les cellules résistantes.

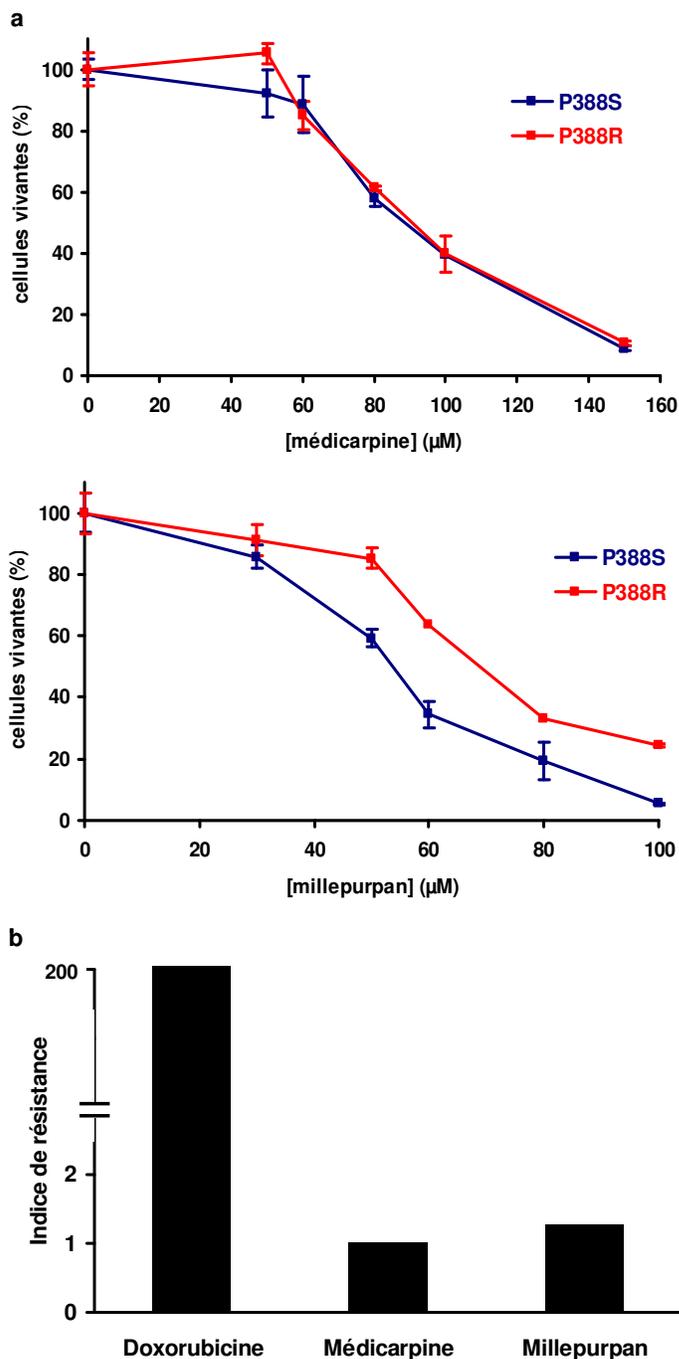


Figure 51. Cytotoxicité de la médicarpine et du millepurpan sur les cellules P388 et P388/DOX. (a) Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de chaque composé pendant 72h puis la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT. Chaque valeur correspond à la moyenne ± ET de 4 expériences réalisées en triplicatas, (b) L'indice de résistance est obtenu par le rapport (IC₅₀ P388/DOX) / (IC₅₀ P388).

Les indices de résistance obtenus pour la médicarpine et le millepurpan sont proches de 1 (respectivement 1,02 et 1,28), ce qui montre que ces 2 composés agissent avec une efficacité égale dans les cellules P388 sensibles et résistantes (Figure 51b). La doxorubicine, qui a un effet fortement réduit sur les cellules résistantes présente un indice de résistance proche de 200.

II.1.2. Induction de l'apoptose

Afin de déterminer le mécanisme responsable de la mort cellulaire induite par les deux composés dans les deux lignées cellulaires, des événements survenant au cours de l'apoptose ont été recherchés.

Lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations cytotoxiques (respectivement 90 et 70 μ M pour la médicarpine et le millepurpan), les deux flavonoïdes déclenchent la fragmentation de l'ADN aussi bien dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes (Figure 52a). De plus, le nombre de particules hypodiploïdes est fortement augmenté par le traitement des deux lignées avec chaque composé (Figure 52b), ce qui montre que la médicarpine et le millepurpan semblent exercer leur effet cytotoxique en induisant l'apoptose.

Pour confirmer l'effet pro-apoptotique des 2 composés, l'activation de la caspase 3 ainsi que le clivage de PARP ont été recherchés. Le traitement avec la médicarpine induit une diminution progressive de la forme inactive de la caspase 3 au cours du temps dans les deux lignées (Figure 53a) alors que l'effet du millepurpan sur l'activation de la caspase 3 est quasiment maximal dès 24 heures de traitement (Figure 53b). En parallèle à l'activation de la caspase 3, l'apparition progressive du fragment de 85 kDa de PARP est observée dans les deux lignées après 48 heures de traitement avec les deux composés. Ces résultats montrent que la médicarpine et le millepurpan induisent l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP aussi bien dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes.

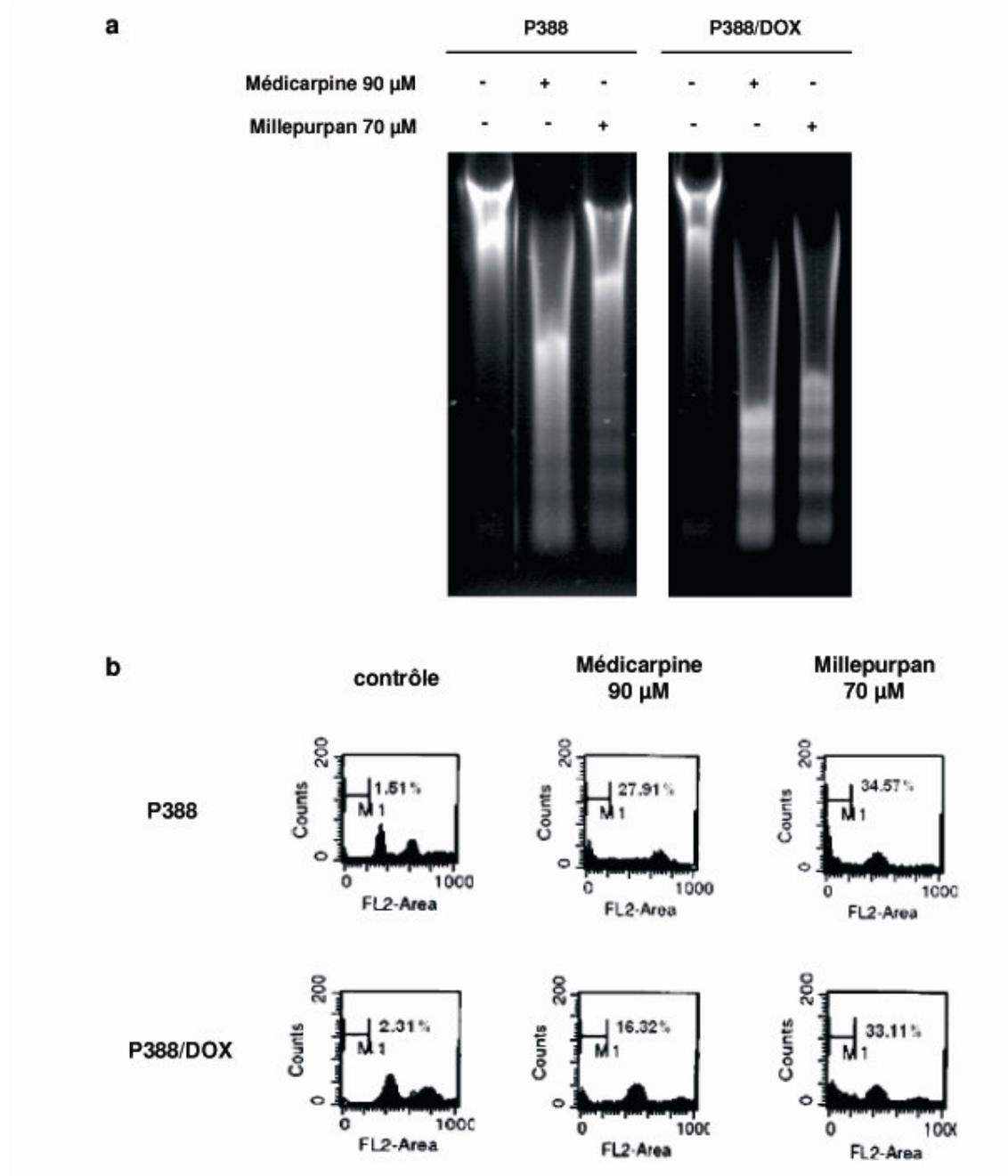


Figure 52. Détection de l'apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan. (a) Analyse de la fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées avec chaque composé pendant 48 heures, (b) Détection des cellules apoptotiques par cytométrie en flux. Les cellules dont la quantité d'ADN est inférieure à $2n$ sont définies comme apoptotiques. Le pourcentage indique leur nombre.

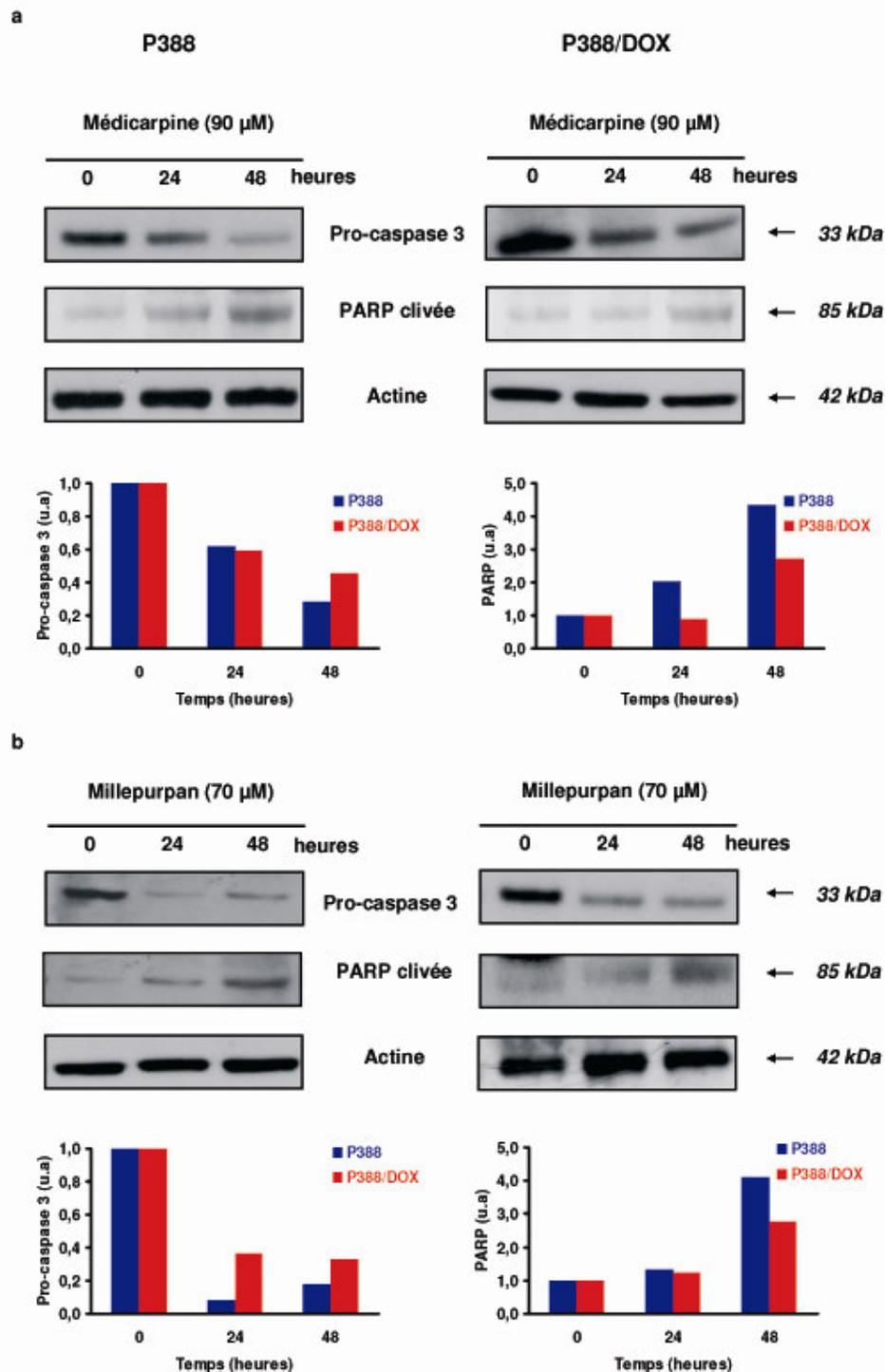


Figure 53. Effet de la médicarpine (a) et du millepurpan (b) sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP. Après le traitement des cellules, les protéines sont extraites et séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose. L'expression de chaque protéine est analysée par western blot. Chaque bande est quantifiée par densitométrie.

II.1.3. L'apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan fait intervenir des facteurs de la famille Bcl-2

Une étude par western blot de certains facteurs jouant un rôle important dans la régulation de l'apoptose nous a permis de déterminer les mécanismes mis en jeu lors du traitement des cellules avec chaque composé.

La Figure 54 montre que l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 est réduite après 48 heures de traitement avec la médicarpine dans les deux lignées cellulaires. De même, l'expression de Bcl-X_L, une autre protéine inhibitrice de l'apoptose, diminue alors que l'expression de Bax, une protéine pro-apoptotique, est augmentée.

Au contraire, comme le montre la Figure 55, l'expression de Bax est peu modifiée par le millepurpan. En effet, le traitement des cellules avec le millepurpan n'a aucune incidence sur l'expression de Bax après 24 heures et une faible diminution de l'expression de Bax est observée à 48 heures. Cependant, l'expression de Bcl-X_L est fortement réduite dans les cellules sensibles et résistantes après 48 heures de traitement. L'expression de Bcl-2 est fortement diminuée après 48h dans les cellules P388. En revanche, cette diminution d'expression est visible seulement à 24 heures dans les cellules résistantes car le niveau de Bcl-2 ne diminue pas à 48 heures.

L'ensemble de ces résultats montre que l'apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan est dépendante de l'activation des caspases et fait intervenir la voie mitochondriale impliquant plusieurs membres de la famille Bcl-2.

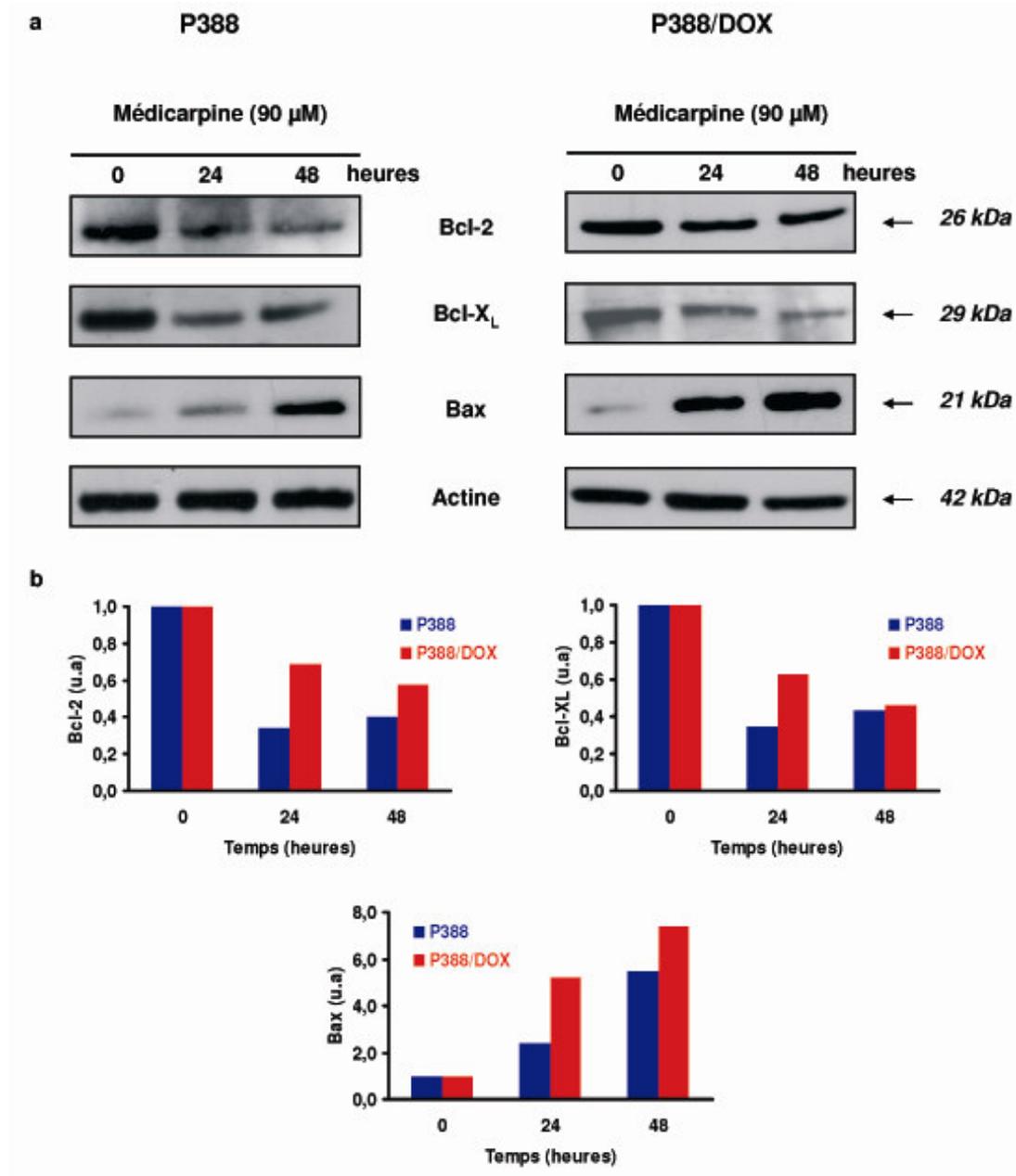


Figure 54. Effet de la médicarpine sur l'expression de protéines impliquées dans la signalisation apoptotique. (a) L'expression de chaque protéine est analysée par western blot, (b) Quantification par densitométrie des bandes correspondant à chaque protéine.

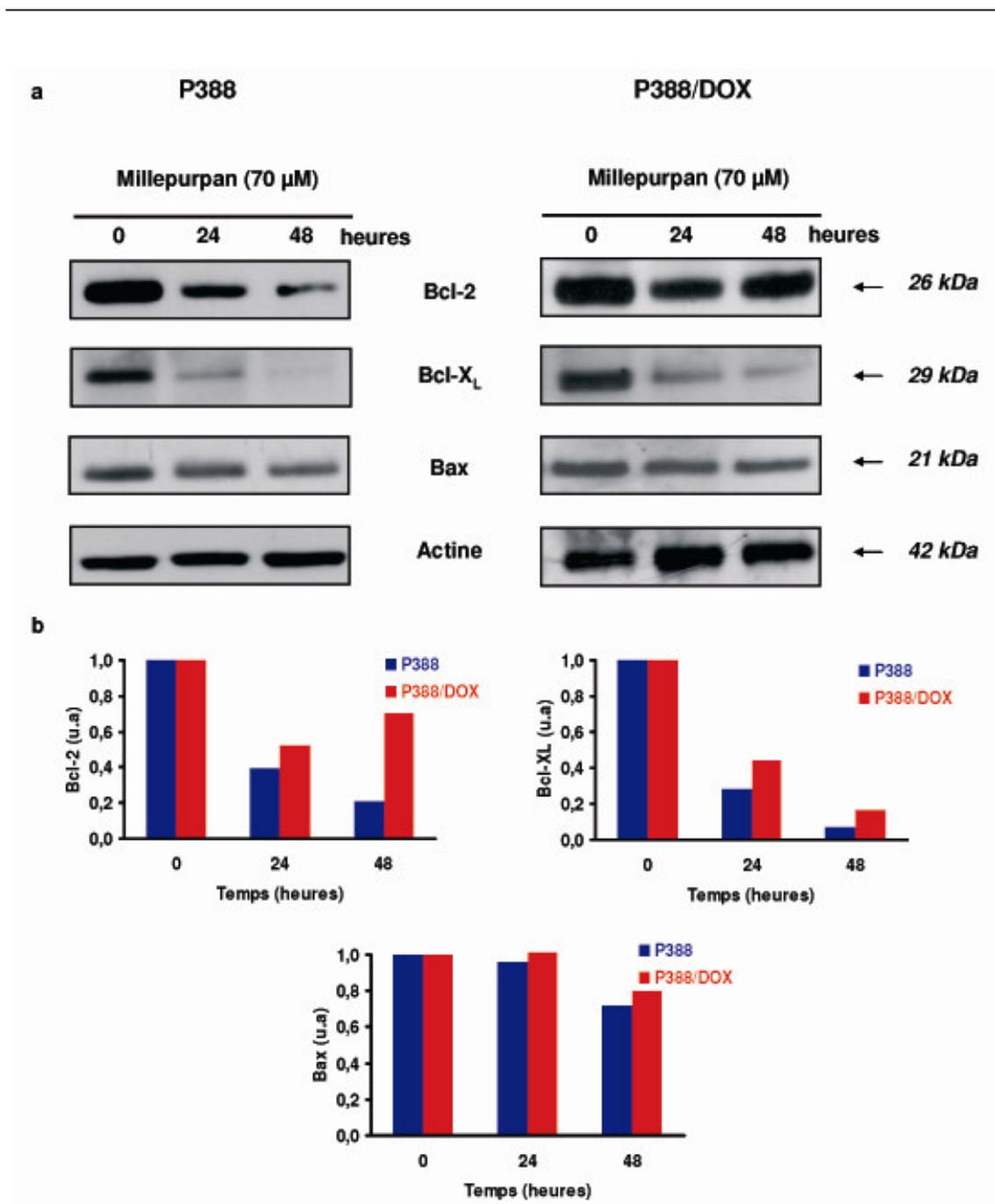


Figure 55. Effet du millepurpan sur l'expression de protéines impliquées dans la signalisation apoptotique. (a) L'expression de chaque protéine est analysée par western blot, (b) Quantification par densitométrie des bandes correspondant à chaque protéine.

II.2. Chimiosensibilisation des cellules P388/DOX par la médicarpine et le millepurpan

II.2.1. Effet sur l'apoptose induite par la doxorubicine

Les flavonoïdes possèdent de multiples effets biologiques, et de nombreux composés sont capables d'inhiber la résistance aux agents anticancéreux induite par la surexpression de la P-gp dans les cellules tumorales. Nous avons par conséquent recherché si la médicarpine et le millepurpan possèdent de telles activités.

Pour cela, une concentration non ou faiblement toxique de chaque flavonoïde sera utilisée afin de s'assurer que les effets observés ne seront pas dus à leur cytotoxicité. Ainsi, pour étudier leurs effets sur l'apoptose induite par la DOX, la médicarpine sera utilisée à une concentration de 60 μ M, et le millepurpan à 40 μ M. A ces concentrations, les 2 composés tuent moins de 10% de cellules P388/DOX.

La plupart des agents anticancéreux exercent leurs effets en induisant l'apoptose dans les cellules tumorales. La Figure 56 montre que la DOX provoque la mort cellulaire programmée dans les cellules P388, par la formation de complexes ternaires stables avec l'ADN et la topoisomérase II. L'analyse par western blot permet de mettre en évidence l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP, et confirme l'effet apoptotique de la DOX (Figure 57). En revanche, tous ces événements survenant au cours de l'apoptose ne sont pas détectés dans les cellules P388 qui sont résistantes à la DOX. Cependant, le traitement des cellules résistantes avec la DOX en présence de la médicarpine ou du millepurpan permet de provoquer la fragmentation de l'ADN en barreau d'échelles, ainsi que l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP. Ces résultats démontrent que la médicarpine et le millepurpan sont capables de restaurer l'apoptose dans les cellules P388/DOX.

	P388		P388/DOX			
doxorubicine	-	+	-	+	+	+
médicarpine	-	-	-	-	+	-
millepurpan	-	-	-	-	-	+

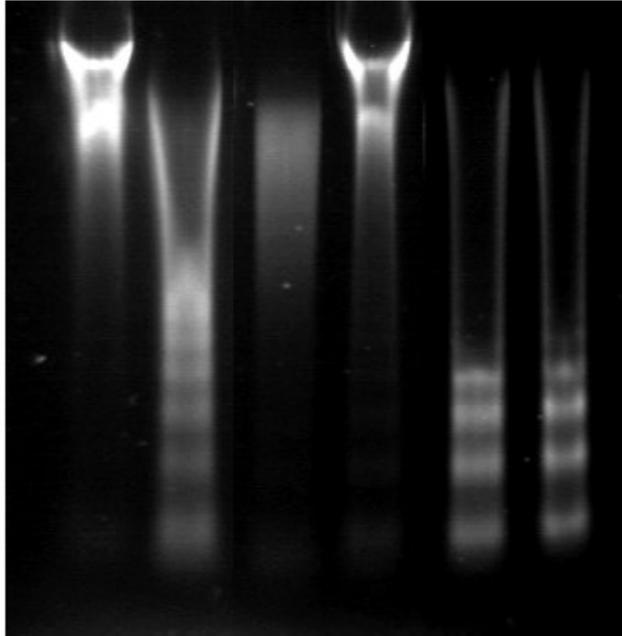


Figure 56. La médicarpine et le millepurpan restaurent l'apoptose induite par la doxorubicine dans les cellules P388/DOX. Les cellules sont incubées en présence de DOX (30 nM et 3 μ M dans les cellules sensibles et résistantes) et/ou de médicarpine (60 μ M) et de millepurpan (40 μ M). Après extraction, l'ADN subit une migration sur gel d'agarose contenant du BET.

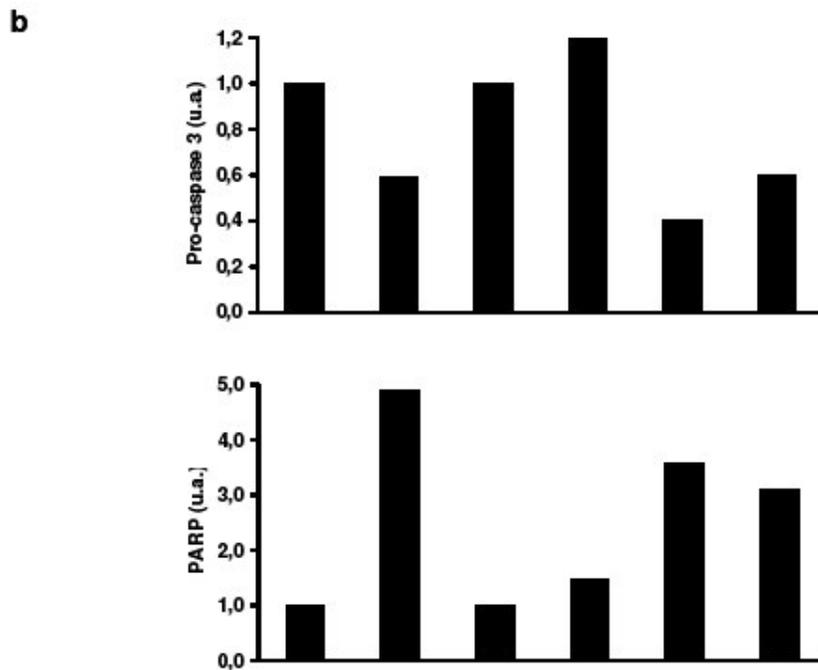
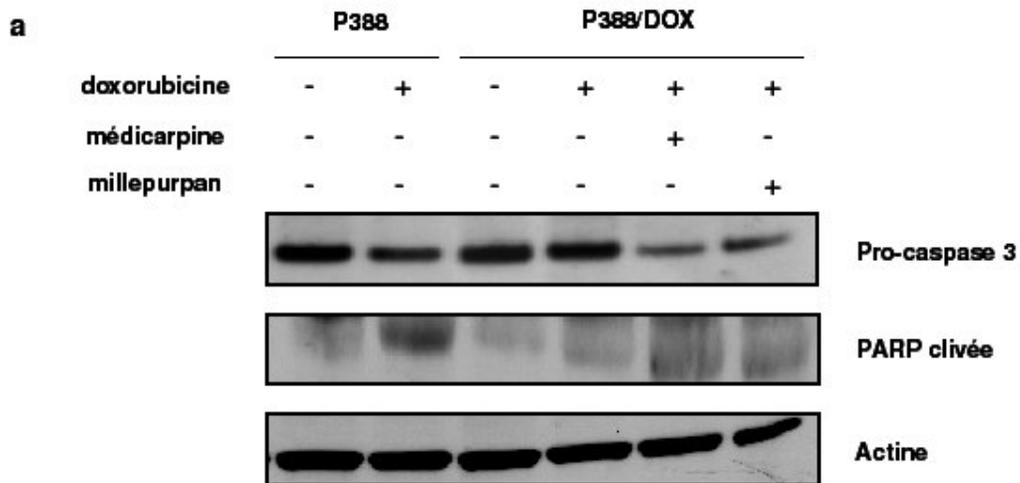


Figure 57. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur l'activation de la caspase 3 et le clivage de PARP. (a) Analyse par western blot, (b) Analyse par densitométrie des bandes correspondant à chaque protéine.

II.2.2. Effet sur la cytotoxicité induite par la doxorubicine et la vinblastine

Comme ces deux composés sont capables de rétablir l'apoptose de la DOX dans les cellules résistantes, nous avons vérifié s'ils étaient capables d'améliorer l'effet cytotoxique de la DOX dans ces cellules. Les cellules P388/DOX ont été incubées avec des concentrations croissantes de DOX en présence ou non de médicarpine, de millepurpan ou de VPL pendant 72 heures et la viabilité cellulaire a été évaluée par test MTT.

Lorsque les cellules sont traitées avec la médicarpine, la toxicité de la DOX est augmentée (Figure 58a). L' IC_{50} de la DOX est de 6,5 μ M dans les cellules P388/DOX incubées uniquement en présence de DOX, alors qu'elle est de 2,8 μ M lorsque la médicarpine est ajoutée au milieu de culture. Le millepurpan a un effet similaire à celui de la médicarpine puisque l' IC_{50} de la DOX est de 2,4 μ M dans les cellules traitées avec la DOX et le millepurpan (Figure 58b). L'activité des 2 composés reste cependant inférieure à celle du VPL, car l' IC_{50} de la DOX n'est que de 0,5 μ M en présence du modulateur de référence. Il convient de rappeler que le VPL, à la concentration de 3 μ M ne peut être utilisé en clinique en tant que révertant de la résistance induite par la P-gp compte tenu de sa cytotoxicité.

La Figure 59 montre que les deux composés améliorent également l'efficacité de la VBL. En effet, l' IC_{50} de la DOX est augmentée respectivement de 9 et 8,4 fois en présence de médicarpine et de millepurpan. Ces résultats montrent que les deux flavonoïdes potentialisent l'effet cytotoxique de la DOX et de la VBL dans les cellules P388 résistantes exprimant la P-gp.

Nous avons également étudié, l'effet des deux composés sur la toxicité de la DOX dans les cellules P388 sensibles. A la concentration de 60 μ M, la médicarpine n'influence pas l'effet de la DOX (Figure 60). Une légère augmentation de la cytotoxicité de la DOX est observée en présence de millepurpan. Ceci peut être attribué à la toxicité intrinsèque de ce composé car à la concentration de 40 μ M, environ 25% des cellules meurent sous l'effet du millepurpan (Figure 51a).

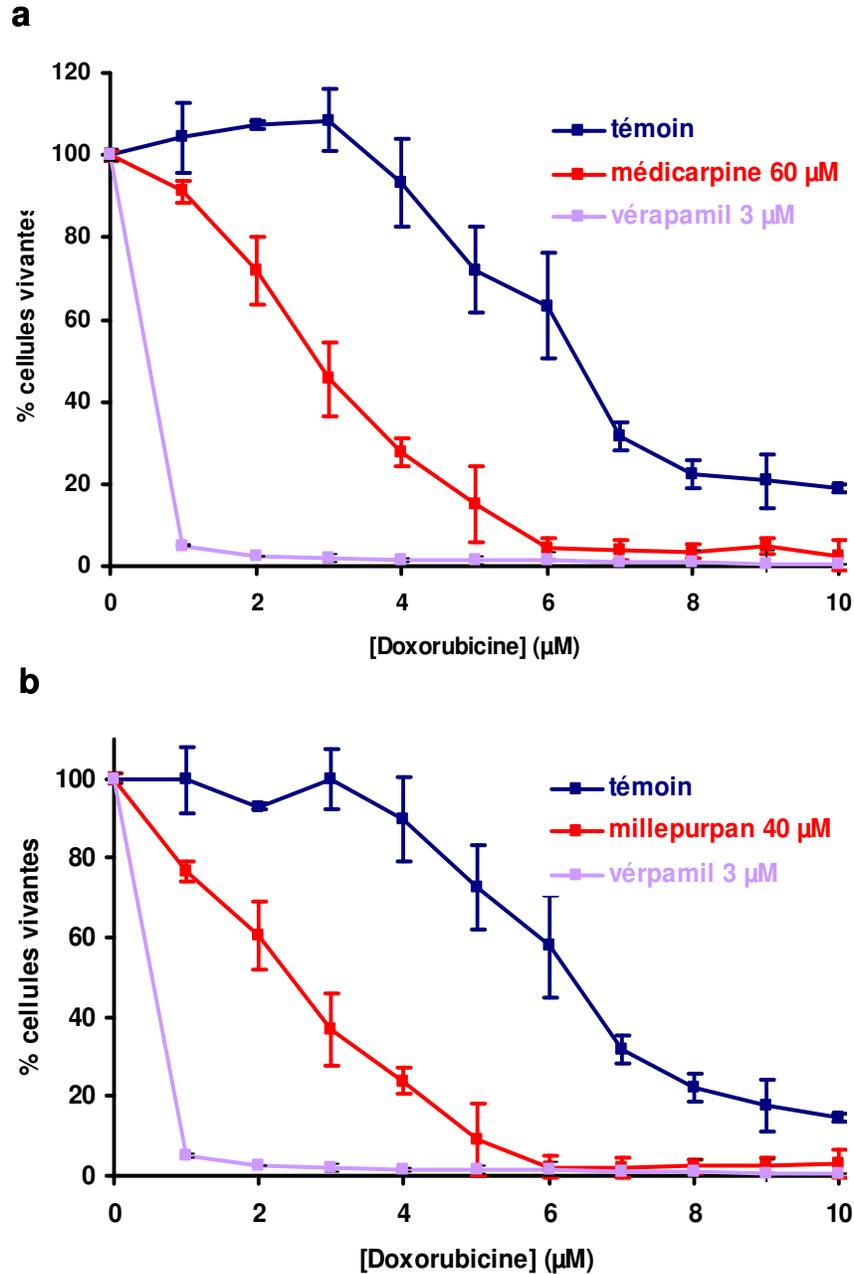


Figure 58. Effet de la médicarpine (a) et du millepurpan (b) sur la toxicité de la doxorubicine dans les cellules P388/DOX. Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de DOX pendant 72h en présence ou non de chaque composé ou de VPL puis la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT.

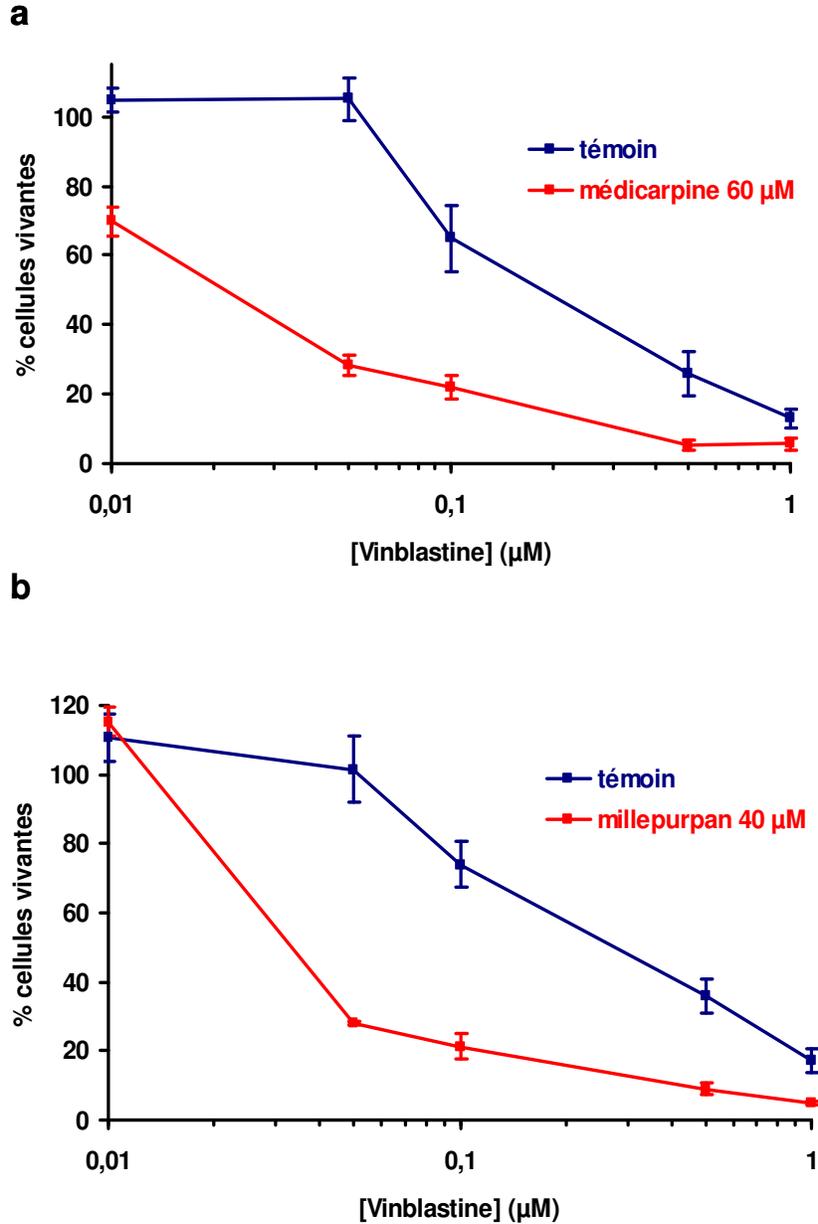


Figure 59. Effet de la médicarpine (a) et du millepurpan (b) sur la toxicité de la vinblastine dans les cellules P388/DOX. Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de VBL pendant 72h en présence ou non de chaque composé puis la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT.

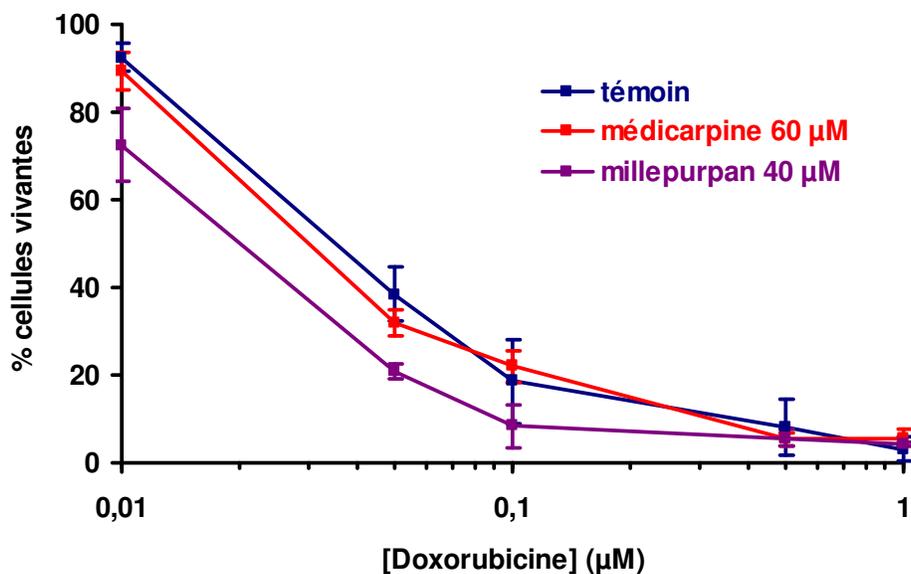


Figure 60. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur la toxicité de la doxorubicine dans les cellules P388. Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de DOX pendant 72h en présence ou non de chaque composé ou de VPL puis la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT.

II.2.3. Effet sur l'accumulation intracellulaire de doxorubicine et l'expression de la P-gp

Les flavonoïdes capables de moduler la résistance aux anticancéreux des cellules tumorales exprimant la P-gp peuvent, selon leur structure, exercer leur effet soit en interagissant directement avec la P-gp et bloquer le transport des drogues, soit en bloquant l'expression du gène *mdr1* au niveau transcriptionnel. Comme cette propriété n'a jamais été étudiée pour la médicarpine et le millepurpan, nous avons recherché par quel mécanisme ces 2 isoflavonoïdes amélioreraient l'efficacité de la DOX dans les cellules résistantes.

Afin de déterminer si les 2 composés agissent sur l'activité de la P-gp, la cytométrie en flux a été utilisée pour mesurer l'accumulation de DOX dans les cellules P388/DOX. Lorsque les cellules sont traitées avec chaque composé, la quantité de DOX retenue est supérieure à celle observée dans les cellules non traitées (Figure 61). Cependant, leur effet reste inférieur à celui du VPL.

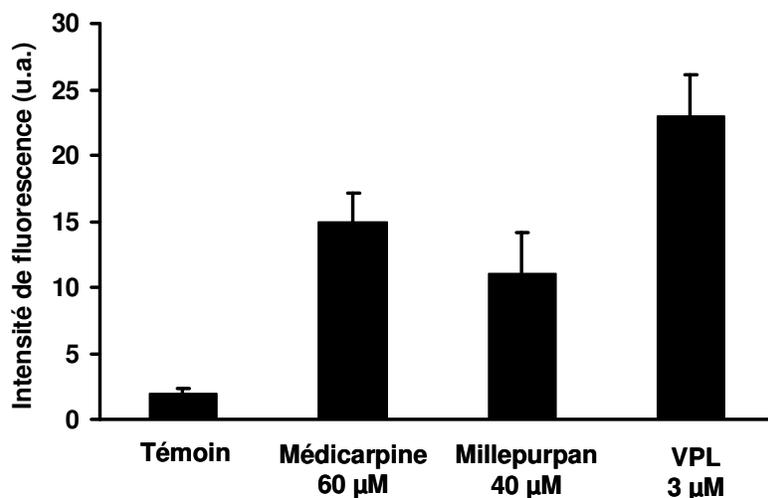


Figure 61. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur l'accumulation de doxorubicine dans les cellules P388/DOX. Les cellules sont incubées en présence de chaque composé pendant 1h30 puis la DOX (1 µM) est ajoutée. Après 1h, les cellules sont lavées et la fluorescence émise par la DOX est mesurée par cytométrie en flux.

La courbe effet/dose de ces deux composés sur les cellules P388/DOX n'est pas modifiée par l'ajout de vérapamil. L'IC₅₀ de la médicarpine et du millepurpan ne sont pas modifiées en présence de cet inhibiteur de la P-gp (Figure 62), ce qui suggère que les deux isoflavonoïdes ne seraient pas des substrats de la P-gp, et par conséquent ne seraient pas transportés par celle-ci. Ces résultats sont corrélés au fait que les indices de résistance calculés précédemment pour les deux composés sont proches de 1. Ceci montre que ces deux isoflavonoïdes pourraient inhiber l'activité de la P-gp sans être transportés par la pompe, mais en interagissant avec un site différent du site de liaison du substrat.

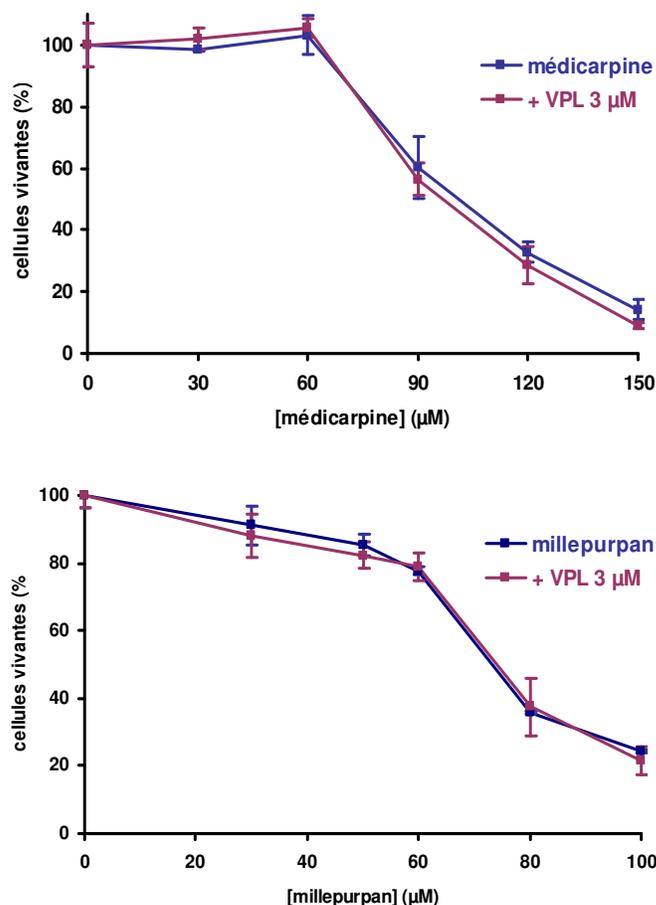


Figure 62. Effet du vérapamil sur la cytotoxicité de la médicarpine et du millepurpan sur les cellules P388/DOX. Les cellules sont incubées en présence de concentrations croissantes de chaque composé pendant 72h en présence ou non de 3 μM de VPL puis la viabilité cellulaire est estimée grâce au test MTT.

Nous avons également recherché l'expression de la P-gp dans les cellules traitées avec la médicarpine et le millepurpan pour déterminer si la potentialisation de l'effet de la DOX par les 2 composés était due à une modification de l'expression du transporteur. Comme le montre la Figure 63, l'expression de la P-gp n'est pas modifiée dans les cellules traitées avec chacun des 2 composés pendant 72 heures de traitement, ce qui indique que les effets des 2 composés sur la réversion de la résistance sont uniquement dus à l'inhibition de l'activité de la P-gp.

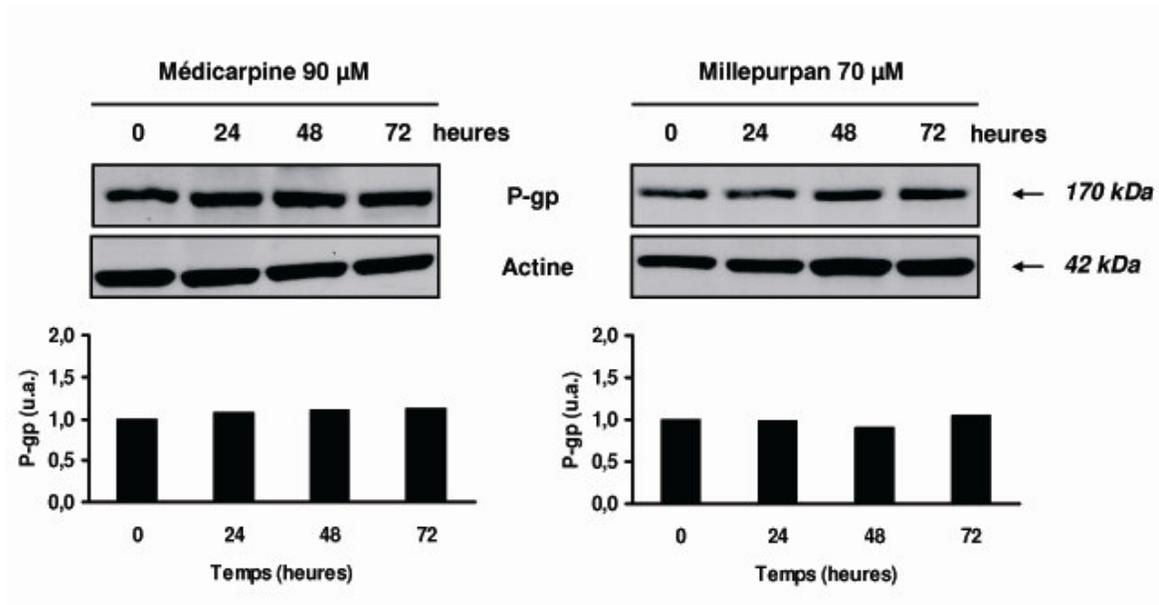


Figure 63. Effet de la médicarpine et du millepurpan sur l'expression de la P-gp dans les cellules P388/DOX. Les cellules sont incubées en présence de chaque composé pendant 24, 48 ou 72 heures, puis l'expression de la P-gp est analysée par western blot. Chaque bande est quantifiée par densitométrie.

II.3. Conclusions

La médicarpine et le millepurpan possèdent plusieurs activités antitumorales. A une concentration proche de l'IC₅₀, ces deux isoflavonoïdes induisent l'apoptose aussi bien dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes, alors qu'une concentration non toxique module l'activité de la P-gp sans en modifier l'expression.

Discussion

De nombreux extraits de plantes ainsi que des composés polyphénoliques issus de notre alimentation possèdent des effets bénéfiques pour l'organisme, en particulier, un effet cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales tout en protégeant les tissus sains, et une capacité à réverser la résistance aux agents anticancéreux. Par conséquence, une multitude d'extraits végétaux ont fait l'objet de travaux ayant pour but d'identifier les métabolites responsables de leurs activités antioxydantes et anticancéreuses.

La luzerne est une plante encore aujourd'hui principalement destinée à l'alimentation animale, bien qu'elle soit connue et utilisée pour ses propriétés bénéfiques depuis des siècles. Récemment, ses propriétés nutritives lui ont permis d'être utilisée comme supplément nutritionnel sous forme d'extrait foliaire chez des populations touchées par la malnutrition. D'autres études menées sous le contrôle du Pr Eric Bertin, nutritionniste au CHU de Reims, ont montré que la consommation d'EFL restaurait le taux de lymphocytes CD4⁺ chez des sujets porteurs du VIH, mais de faire reculer l'anémie et diminuer le taux des protéines de l'inflammation (résultats non publiés). Des études préliminaires menées par notre laboratoire en collaboration avec le laboratoire de bactériologie (Pr Christophe De Champs) du CHU de Reims démontrent que les EFL inhibent la prolifération des souches sensibles et résistantes de *Staphylococcus aureus*.

Malgré l'existence de plusieurs publications portant sur l'identification des métabolites secondaires de la luzerne, ses propriétés anticancéreuses n'ont jamais été étudiées. Un premier fractionnement de l'EFL à l'aide de solvants organiques de polarité croissante a permis d'obtenir 5 extraits dont la cytotoxicité a été évaluée sur plusieurs lignées humaines et murines, sensibles et résistantes à la DOX. Ces extraits présentent une efficacité différente selon les lignées cellulaires testées, mais dans tous les cas, l'activité cytotoxique la plus élevée est obtenue avec les extraits les moins polaires, c'est-à-dire les extraits toluène et MtBE. Les extraits les plus polaires obtenus à partir d'autres plantes telles que *Angelica sinensis* ou *Iris tectorum* présentent l'activité cytotoxique la plus élevée [Cheng *et al.*, 2004 ; Fang *et al.*, 2008], ce qui suggère que ces extraits contiennent les molécules qui possèdent les activités anticancéreuses les plus intéressantes. Pour chaque extrait, il existe des différences

entre l'activité obtenue sur une lignée et celle obtenue sur la lignée résistante correspondant. Ceci pourrait être dû à la nature des composés contenus dans chaque extrait.

Les extraits toluène et MtBE induisent une cytotoxicité dose-dépendante et temps-dépendante dans les cellules P388 et P388/DOX.

Même si les IC₅₀ sont légèrement différentes entre les deux lignées cellulaires, les deux extraits induisent l'apoptose dans les deux lignées cellulaires, comme de nombreux autres extraits étudiés [Yang *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2006]. L'apoptose joue un rôle central dans le contrôle de la prolifération cellulaire et, par conséquent, représente une bonne stratégie dans le traitement des cancers. Dans notre étude, l'effet pro-apoptotique des deux extraits a été mis en évidence par la condensation de la chromatine visualisée par le marquage de l'ADN au Hoechst 33342, la fragmentation de l'ADN en barreau d'échelles ou par la détection de particules hypodiploïdes traduisant la formation de corps apoptotiques. Le clivage de l'enzyme de réparation de l'ADN, PARP, en un fragment de 85 kDa qui survient au cours de l'apoptose a également été observé dans les deux lignées. L'apoptose induite par les deux extraits provenant de l'EFL fait intervenir la voie des caspases, comme cela a été décrit pour d'autres extraits de plantes [Cheng *et al.*, 2004, Hsu *et al.*, 2008 ; Sarath *et al.*, 2007]. Nous avons effectivement observé un effet temps et dose-dépendant du clivage de la procaspase 3 pour libérer la sous-unité active qui clive à son tour de nombreux substrats, notamment la nucléase CAD responsable de la fragmentation de l'ADN ou la protéine PARP.

Etant donné les propriétés pro-apoptotiques des extraits toluène et MtBE, nous avons recherché des molécules possédant des effets cytotoxiques aussi bien dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes. Comme il nous a été impossible d'étudier tous les extraits, nous avons privilégié la fraction toluène. Parmi les 4 fractions obtenues par VLC à partir de l'extrait toluène, les fractions To-1 et To-2 possèdent l'activité cytotoxique la plus élevée. Cependant, l'activité cytotoxique n'est pas augmentée dans ces sous-fractions par rapport à la fraction toluène, ce qui suggère qu'une synergie d'activité pourrait exister entre les composés contenus dans l'extrait toluène. La présence de nombreux composés aux cibles et activités multiples permettrait d'accroître l'effet cytotoxique.

La recherche des métabolites contenus dans la fraction To-1 a permis d'identifier 3 terpènes et 5 flavonoïdes. La 3-hydroxy- β -ionone a déjà été isolée à partir d'autres plantes, notamment *Phaseolus vulgaris* où elle intervient dans l'inhibition de croissance de l'hypocotyle induite par la lumière [Kato-Nogushi, 1993]. L'épiloliolide et le dihydroactinidiolide sont des lactones provenant de la dégradation du β -carotène

[Sommerburg *et al.*, 2003, Sinninghe-Damsté Pure et Koopmans, 1997]. L'épiloliolide possède un effet inhibiteur sur l'activité des prostaglandines [Sadhu *et al.*, 2006]. Les tests de cytotoxicité réalisés sur les cellules P388 montrent que ces 3 métabolites ne possèdent pas d'effet cytotoxique. Au contraire, les flavonoïdes présentent des IC₅₀ intéressantes qui varient selon leur structure.

Deux ptérocarpanes ont été isolés, la médicarpine et le mélilotocarpan E, isolé pour la première fois à partir de *Medicago sativa*. Malgré leur similitude de structure, la cytotoxicité de ces deux composés diffère fortement. Dans des études comparant plusieurs ptérocarpanes, il a été établi que l'activité cytotoxique contre des lignées cellulaires tumorales est d'autant plus élevée que le nombre de substituants méthoxy est important [Li *et al.*, 2008], ce qui justifie le fait que le mélilotocarpan soit plus efficace que la médicarpine. Par ailleurs, la prénylation des ptérocarpanes augmente leur activité anti-mitotique [Militao *et al.*, 2007].

Le millepurpan est un isoflavane. Dans une étude de structure/activité de plusieurs isoflavanes extraits du propolis, les auteurs suggèrent que l'activité cytotoxique augmente avec le nombre de groupes méthoxy [Li *et al.*, 2008]. Cependant, la comparaison avec le millepurpan, qui ne fait pas partie de cette étude mais qui possède dans sa structure plus de groupes méthoxy que les composés testés est difficile car les lignées cellulaires sont différentes, et l'activité cytotoxique est fortement dépendante de la lignée utilisée.

Enfin, deux flavones ont été identifiées, la tricine et le chrysoériole, déjà isolée à partir de *Medicago sativa* [Stochmal *et al.*, 2001], et connus pour posséder des propriétés anticancéreuses. Le chrysoériole inhibe le métabolisme du benzo[a]pyrène, un carcinogène [Liu YL *et al.*, 1992] et la tricine inhibe la croissance des cellules MDA-MB-468 de cancer du sein [Cai *et al.*, 2004], bloque la carcinogenèse en inhibant les cyclooxygénases [Cai *et al.*, 2005] et inhibe la résistance à la DOX dans les cellules MCF-7 exprimant la P-gp [Jeong *et al.*, 2007].

La médicarpine a été identifiée à partir de nombreuses plantes, notamment *Medicago sativa* [Spencer *et al.*, 1991] où elle joue le rôle de phytoalexine. Elle est synthétisée en réponse à des agressions bactériennes, fongiques ou en réponse aux rayonnements UV. Elle est également responsable du phénomène d'autotoxicité de la luzerne [Miller *et al.*, 1988]. Des études récentes ont montré qu'elle exerçait un effet cytotoxique contre les cellules cancéreuses, avec une efficacité variable selon la lignée cellulaire considérée (IC₅₀ de 11 µM dans les cellules de carcinome du colon 26-L5 [Li *et al.*, 2008] à plus de 100 µM dans les cellules de carcinome KB [Ngamrojanavanich *et al.*, 2007]. Dans les cellules leucémiques

HL-60, l'IC₅₀ de la médicarpine (22,3 µg/ml, soit environ 83 µM) est similaire à celle que nous avons obtenu avec la lignée leucémique P388 [Militao *et al.*, 2007].

Le millepurpan, déjà également isolé à partir de la luzerne [Spencer *et al.*, 1991] n'a pratiquement jamais été étudié. Ici, nous avons mis en évidence pour la première fois, l'effet cytotoxique de ce composé sur des cellules cancéreuses.

Ces deux isoflavonoïdes agissent avec la même efficacité dans les cellules P388 et leurs homologues résistantes (indice de résistance proche de 1), contrairement à la DOX ou d'autres agents anticancéreux qui deviennent inactifs quand les cellules acquièrent une résistance due à la surexpression de la P-gp. Comme ils ne seraient pas transportés par la P-gp hors de la cellule, ils peuvent agir avec la même efficacité sur les cellules sensibles et résistantes.

Les analyses de fragmentation d'ADN de cytométrie en flux, d'activation de la caspase 3 et du clivage de PARP indiquent toutes que la cytotoxicité induite par les deux composés est due à l'induction de l'apoptose. Liu *et al.* [2002] ont montré que la médicarpine pouvait induire l'apoptose. Dans les cellules HL-60, l'effet cytotoxique de la médicarpine est provoqué à la fois par l'induction de l'apoptose et de la nécrose [Militao *et al.*, 2006]. Bien que le millepurpan soit capable d'inhiber la promotion tumorale induite par le virus Epstein-Barr [Ito *et al.*, 2000], aucune étude n'a montré qu'il possède une activité pro-apoptotique.

L'apoptose induite par la médicarpine et le millepurpan implique la voie mitochondriale, régulée par les protéines de la famille Bcl-2. Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-X_L résident au niveau de la membrane mitochondriale. Bcl-X_L peut également se trouver sous forme soluble dans le cytosol [Hsu *et al.*, 1997]. En l'absence de stimulus, elles inhibent la libération du cytochrome C dans le cytosol. Leur liaison aux protéines pro-apoptotiques Bax ou Bak empêche l'oligomérisation de ces dernières permettant la libération du cytochrome C [Antonsson B *et al.*, 1997]. Nos résultats montrent que la médicarpine et le millepurpan induisent une diminution d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L. Wu *et al.* [2004] ont montré que la diminution d'expression de Bcl-2 était corrélée à l'inhibition de la localisation nucléaire de NfκB dans les cellules HeLa traitées avec un flavonol glycosylé, le kaempférol-7-O-β-D-glucoside. Ainsi, la médicarpine et le millepurpan pourraient agir en inhibant l'activité transcriptionnelle de NfκB sur Bcl-2 et Bcl-X_L, ces deux gènes étant tous deux régulés par NfκB [Catz et Johnson, 2001, Khoshnan *et al.*, 2000]. Par ailleurs, l'expression de Bax est augmentée par la médicarpine alors que le millepurpan n'a quasiment aucun effet sur l'expression de Bax. Dans les deux cas, le rapport

protéines pro-apoptotiques/anti-apoptotiques est augmenté et Bcl-2 et Bcl-X_L n'exercent plus leur effet inhibiteur. Comme moins d'hétérodimères Bax/Bcl-2 et Bax/ Bcl-X_L sont présents dans la cellule, les protéines Bax sont transloquées vers la membrane mitochondriale et constituent des homo-oligomères pouvant se comporter comme des canaux ioniques. La haute conductance créée au niveau de la membrane active les canaux voltage-dépendants PTP responsables de la libération du cytochrome C et d'autres facteurs induisant l'apoptose [Antonsson B, 2004].

En plus de séquestrer les protéines pro-apoptotiques, Bcl-2 et Bcl-X_L possèdent une activité anti-apoptotique intrinsèque en formant des canaux ioniques au niveau de la membrane mitochondriale externe [Minn *et al.*, 1997, Schendel *et al.*, 1997]. Bcl-X_L possède effectivement une homologie de structure avec des toxines bactériennes capables de s'insérer dans les membranes [Muchmore *et al.*, 1996]. Bcl-2 peut contrôler la perméabilité mitochondriale en agissant sur les PTP [Marzo *et al.*, 1998]. Ainsi, la diminution d'expression des protéines anti-apoptotiques provoquée par la médicarpine et le millepurpan permet l'induction de la cascade apoptotique.

La surexpression de la P-gp dans les cellules tumorales constitue une entrave à l'induction de l'apoptose induite par les agents anticancéreux tels que la DOX. Dans nos cellules P388 résistantes, la DOX a un effet beaucoup plus faible que dans les cellules sensibles et n'induit pas l'apoptose à une concentration 100 fois plus importante que celle induisant l'apoptose des cellules sensibles. A des concentrations non toxiques, la médicarpine et le millepurpan restaurent l'apoptose et potentialisent la cytotoxicité induite par la DOX, mais aussi par la VBL, dans les cellules résistantes. Cependant, les deux composés n'augmentent pas la toxicité de la DOX dans les cellules sensibles, ce qui suggère qu'ils pourraient interférer avec l'activité de la P-gp. Compte tenu des multiples effets biologiques des flavonoïdes, nous avons recherché si la médicarpine et le millepurpan possédaient une telle activité.

L'étude de l'activité modulatrice de la MDR des flavonoïdes a donné des résultats contradictoires. Yeh *et al.*, ont montré que des flavonols tels que la quercétine et le kaempférol stimulaient l'efflux de DOX [Phang *et al.*, 1993, Critchfield *et al.*, 1994]. En revanche, ces mêmes composés sensibilisaient des cellules multidrug-résistantes exprimant la P-gp à la DOX. [Scambia *et al.*, 1994, Limtrakul *et al.*, 2005]. Les isoflavonoïdes ont également été considérés comme étant inactifs, mais cette conclusion a été infirmée. Nos résultats montrent que la médicarpine et le millepurpan augmentent la quantité de DOX

retenue dans les cellules résistantes en inhibant l'activité de la P-gp. De plus, le VPL n'induit pas de modification dans la cytotoxicité des deux isoflavonoïdes, ce qui montre qu'ils ne seraient pas transportés par la P-gp et ne seraient pas des substrats de la pompe. Par conséquent, ils ne se fixeraient pas au niveau du site de liaison de la DOX pour entrer en compétition avec elle, mais ils se fixeraient sur d'autres sites. Il a été montré que de nombreux flavonoïdes interagissent avec les domaines NBD (en mimant la partie adénosine de l'ATP) et les domaines de liaison des stéroïdes de la P-gp et inhibent son activité ATPase [Conseil *et al.*, 1998, Zhang et Morris, 2003].

L'augmentation de la cytotoxicité de la DOX par les deux composés n'est pas due à une diminution d'expression de la P-gp. Ceci est en accord avec d'autres résultats montrant que les flavonols diminuent à la fois, l'activité et l'expression de la P-gp alors que les isoflavones modulent la quantité intracellulaire des drogues en inhibant uniquement sa fonction [Limtrakul *et al.*, 2005]. Zhang et Morris [2003] ont montré que la biochanine A, un isoflavonoïde, inhibe le transport de la P-gp sans altérer son expression.

Nous avons montré pour la première fois qu'un ptérocarpane et un isoflavane pouvaient inhiber l'activité de la P-gp. Même si des études comparant de nombreuses structures ont rapporté que les isoflavonoïdes n'ont pas ou peu d'effet inhibiteur sur l'activité de la P-gp, nos résultats, ainsi que d'autres travaux, montrent qu'ils peuvent moduler l'activité de la P-gp. Plusieurs études établissant des relations structure/activité visent à optimiser l'activité des flavonoïdes [Di Pietro *et al.*, 2002 ; Boumendjel *et al.*, 2002]. Dans le cas des isoflavonoïdes, le remplacement de l'atome d'oxygène du cycle C par un atome d'azote dans le 5,7-diméthoxyisoflavone permet d'augmenter son effet inhibiteur sur le transport de la rhodamine 123 par la P-gp [Hadjeri *et al.*, 2003]. L'ajout d'un substituant contenant un dérivé pipérazine (comprenant deux atomes d'azote) sur un squelette flavone ou flavonone permet d'obtenir des composés plus efficaces que le VPL [Ferté *et al.*, 1999]. Ceci suggère que la présence d'un atome d'azote serait un des éléments requis pour obtenir l'activité modulatrice optimale. D'autres inhibiteurs hautement spécifiques de la P-gp actuellement en phase III d'essais cliniques tels que le zosuquidar agissant à des concentrations inférieures à 1 μM possèdent également un groupe pipérazine [Tang *et al.*, 2008].

Ainsi, la synthèse de dérivés de la médicarpine, dont la structure est similaire à celle des stéroïdes, pourrait aboutir à des composés semblables au tamoxifène, un puissant modulateur de l'activité de la P-gp [Kirk *et al.*, 1994, Callaghan et Higgins, 1995].

Le fait que les flavonoïdes inhibent l'activité de la P-gp dans les cellules cancéreuses soulève le problème des interactions flavonoïdes/médicaments dans les tissus sains. La P-gp est présente dans la barrière intestinale et limite l'entrée des xénobiotiques [Evans, 2000]. Par conséquent, la consommation de fruits et légumes ainsi que d'extraits de plantes riches en flavonoïdes pourraient perturber la pharmacocinétique des médicaments. Le jus de pamplemousse, d'orange, les herbes utilisées comme remèdes ou des flavonoïdes purifiés tels que la génistéine altèrent effectivement la pharmacocinétique et la disponibilité des médicaments [Honda *et al.*, 2004, Kiani et Imam, 2007, Zhou *et al.*, 2004 ; Li et Choi, 2007]. De plus, les modulateurs de la P-gp peuvent aussi inhiber les enzymes du cytochrome P450 (CYP3A4) qui interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques, et prolongent l'effet de ceux-ci [Schuetz *et al.*, 1996]. Cependant, certains flavonoïdes qui inhiberaient la P-gp n'auraient aucun effet sur CYP3A4 [Takanaga *et al.*, 2000].

Ainsi, des études *in vivo* semblent nécessaires pour évaluer la cytotoxicité des flavonoïdes. Des essais cliniques réalisés en phase I et II suggèrent qu'ils présenteraient peu de toxicité [Fornier *et al.*, 2007 ; Thomasset *et al.*, 2007] et seraient de bons candidats associés ou non à des agents chimiothérapeutiques dans le traitement des cancers [Ren *et al.*, 2003].

Conclusions - Perspectives

En conclusion, au cours de ce travail, nous avons montré d'une part que des peptides ancrés à la surface des liposomes par des PEG sont capables de mimer les boucles extracellulaires de la P-gp et d'induire la production d'anticorps. L'immunisation avec une telle préparation permet d'accroître l'efficacité du traitement chimiothérapeutique contre des cellules leucémiques murines résistantes. La recherche des épitopes reconnus précisément dans ces peptides par les anticorps permettra d'optimiser leur activité.

Ainsi, il semble concevable de mettre au point un vaccin permettant de cibler la P-gp afin de prévenir la résistance aux agents anticancéreux, l'expression de la P-gp dans les cancers étant difficilement prévisible, ce qui conditionne fortement la réponse au traitement.

Il semble difficile d'effectuer une immunisation à grande échelle. Cependant, ce concept de vaccination à visée anticancéreuse se développe actuellement, notamment avec la commercialisation d'un vaccin contre le papilloma virus afin de prévenir le cancer du col de l'utérus.

La P-gp étant naturellement exprimée dans de nombreux organes, des études complémentaires sont en cours par une Société Suisse afin d'évaluer l'absence de cytotoxicité, même si nous avons montré que des souris immunisées ne présentent aucun symptôme liés à la vaccination (Therapeutic vaccine targeted against P-glycoprotein 170 for inhibiting multidrug resistance in the treatment of cancers ; Madoulet *C. et al.* Brevet, assigned U.S. application no. 10/902,276).

D'autre part, nous avons montré que deux flavonoïdes extraits des feuilles de luzerne, la medicarpine et le millepurpan, induisent la mort cellulaire des cellules leucémiques murines sensibles et résistantes. De plus, lorsqu'ils sont utilisés à des doses non toxiques, ces deux composés potentialisent l'effet d'agents anticancéreux dans les cellules exprimant la P-gp.

Ces résultats, avec de nombreuses autres études menées sur différents flavonoïdes, montrent que ces composés polyphénoliques constituent une classe de métabolites prometteuse dans la recherche de nouveaux agents anticancéreux. Les flavonoïdes, naturels ou modifiés, possèdent de multiples effets au niveau des différentes étapes de la carcinogénèse,

ainsi que sur la résistance aux anticancéreux, avec une toxicité extrêmement réduite. Certains flavonoïdes sont actuellement évalués dans des essais cliniques.

Dans notre étude, des fractions brutes issues de l'EFL, riches en métabolites possédant des activités anticancéreuses, se sont également montrées actives sur les cellules résistantes.

De nombreuses données épidémiologiques ont montré que la consommation régulière de fruits et légumes, ainsi que l'utilisation d'extraits de plantes réduisent fortement l'incidence des cancers. Cependant, de nombreuses plantes sont connues et utilisées depuis très longtemps pour leurs propriétés curatives. L'EFL, de par sa richesse en nutriment, vitamines oligo-éléments et flavonoïdes, possède des propriétés nutritionnelles et thérapeutiques intéressantes qui méritent d'être développées.

Dans cette étude, plusieurs composés doués d'activités anticancéreuses ont été identifiés dans la fraction To-1. Ainsi, le screening des autres fractions devrait permettre d'identifier d'autres métabolites dont les effets anticancéreux seront également étudiés.

Références bibliographiques

A

AFTAB DT, YANG JM, HAIT WN.

Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-glycoprotein) by protein kinase C in multidrug resistant MCF-7 cells.
Oncol Res 1994; 6 (2): 59-70.

AHN J, FLAMM S.

Peginterferon-alpha(2b) and ribavirin.
Expert Rev Anti Infect Ther 2004; 2 (1): 17-25.

ALLEN TM, HANSEN C, MARTIN F, REDEMANN C, YAU-YOUNG A.

Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo.
Biochim Biophys Acta 1991; 1066 (1): 29-36.

ALLEN RT, HUNTER WJ 3RD, AGRAWAL DK.

Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis.
J Pharmacol Toxicol Methods 1997 Jun;37(4):215-28.

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

Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 361-398.

AMBUDKAR SV, KIMCHI-SARFATY C, SAUNA ZE, GOTTESMAN MM.

P-glycoprotein: from genomics to mechanism.
Oncogene 2003; 22 (47): 7468-7485.

AMBUDKAR SV, KIM IY, XIA D, SAUNA ZE.

The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding.
FEBS Lett 2006a; 580 (4): 1049-1055.

AMBUDKAR SV, KIM IW, SAUNA ZE.

The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1).
Eur J Pharm Sci 2006b ; 27 (5): 392-400.

ANTONSSON B, CONTI F, CIAVATTA A, MONTESSUIT S, LEWIS S, MARTINOU I, BERNASCONI L, BERNARD A, MERMOD JJ, MAZZEI G, MAUNDRELL K, GAMBALE F, SADOUL R, MARTINOU JC.

Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2.
Science 1997; 277 (5324): 370-372.

ANTONSSON B.

Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways.
Moll Cell Biochem 2004; 256/257: 141-155.

ARCECI RJ, STIEGLITZ K, BRAS J, SCHINKEL A, BAAS F, CROOP J.
Monoclonal antibody to an external epitope of the human mdr1 P-glycoprotein.
Cancer Res 1993; 53 (2): 310-317.

ATASSI MZ, RUAN KH, JINNAI K, OSHIMA M, ASHIZAWA T.
Epitope-specific suppression of antibody response in experimental autoimmune myasthenia
gravis by a monomethoxypolyethylene glycol conjugate of a myasthenogenic synthetic
peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89 (13): 5852-5856.

AZZARIA M, SCHURR E, GROS P.
Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the mdr1 gene
abolish its ability to confer multidrug resistance.
Mol Cell Biol 1989 ; 9 (12): 5289-5297.

B

BALDRICK P, RICHARDSON D, ELLIOTT G, WHEELER AW.
Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant.
Regul Toxicol Pharmacol 2002; 35 (3): 398-413.

BORDET AL, MICHENET P, COHEN C, ARBION F, EKINDI N, BONNEAU C,
KERDRAON R, COVILLE M.
Post-vaccination granuloma due to aluminium hydroxide.
Ann Pathol 2001; 21 (2): 149-152.

BORST P, SCHINKEL AH.
What have we learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes?
Eur J Cancer 32A (6): 985-990.

BOUMENDJEL A, DI PIETRO A, DUMONTET C, BARRON D.
Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-
glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance.
Med Res Rev 2002; 22 (5): 512-529.

BRAVO L.
Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.
Nutr Rev 1998; 56 (11): 317-333.

BRUNETON J.
Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes médicinales, 3ème éd., Editions médicales
internationales, Cachan 1999 : 1120 p.

C

CABANES A, TZEMACH D, GOREN D, HOROWITZ AT, GABIZON A.
Comparative study of the antitumor activity of free doxorubicin and polyethylene glycol-
coated liposomal doxorubicin in a mouse lymphoma model.
Clin Cancer Res 1998; 4 (2): 499-505.

-
- CAGLAR K, AYBAY C, ATAUGLU H.
Effect of monophosphoryl lipid A on antibody response to diphtheria toxin and its subunits.
APMIS 2005; 113 (4): 256-263.
- CAI H, HUDSON EA, MANN P, VERSCHOYLE RD, GREAVES P, MANSON MM, STEWARD WP, GESCHER AJ.
Growth-inhibitory and cell cycle-arresting properties of the rice bran constituent triclin in human-derived breast cancer cells in vitro and in nude mice in vivo.
Br J Cancer 2004; 91 (7): 1364-1371.
- CAI H, AL-FAYEZ M, TUNSTALL RG, PLATTON S, GREAVES P, STEWARD WP, GESCHER AJ.
The rice bran constituent triclin potently inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in ApcMin mice.
Mol Cancer Ther 2005; 4 (9): 1287-1292.
- CALICETI P, VERONESE FM.
Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates.
Adv Drug Deliv Rev 2003; 55 (10): 1261-1277.
- CALLAGHAN R, HIGGINS CF.
Interaction of tamoxifen with the multidrug resistance P-glycoprotein.
Br J Cancer 1995; 71 (2): 294-299.
- CASTRO AF, ALTENBERG GA.
Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein.
Biochem Pharmacol 1997 ;53 (1): 89-93.
- CATZ SD, JOHNSON JL.
Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer.
Oncogene 2001; 20 (50): 7342-7351.
- CHAMBERS TC, McAVOY EM, JACOBS JW, EILON G.
Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells.
J Biol Chem 1990; 265 (13): 7679-7686.
- CHAMBERS TC, POHL J, RAYNOR RL, KUO JF.
Identification of specific sites in human P-glycoprotein phosphorylated by protein kinase C.
J Biol Chem 1993; 268 (7): 4592-4595.
- CHAMBERS TC, POHL J, GLASS DB, KUO JF.
Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein.
Biochem J 1994; 299 (Part 1): 309-315.
- CHARCOSSET JY.
Biologie des cancers. Ed. ellipses.

-
- CHAUDHARY PM, RONINSON IB.
Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells.
Cell 1991; 66 (1): 85-94.
- CHAUDHARY PM, MECHETNER EB, RONINSON IB.
Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes.
Blood 1992; 80 (11): 2735-2739.
- CHAUFFERT B, CORREIA M, SERGENT C.
Actualités sur les mécanismes de chimiorésistance.
Bull Cancer 1999 ; 86 (1) : 97-103.
- CHEARWAE W, ANUCHAPREEDA S, NANDIGAMA K, AMBUDKAR SV, LIMTRAKUL P.
Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II, and III purified from Turmeric powder.
Biochem Pharmacol 2004; 68 (10): 2043-2052.
- CHEN CJ, CHIN JE, UEDA K, CLARK DP, PASTAN I, GOTTESMAN MM, RONINSON IB.
Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells.
Cell 1986; 47 (3): 381-389.
- CHEN ZS, ROBEY RW, BELINSKY MG, SHCHAVELEVA I, REN XO, SUGIMOTO Y, ROSS DD, BATES SE, KRUEH GD.
Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17 β -estradiol 17-(β -D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport.
Cancer Res 2003; 63 (14): 4048-4054.
- CHENG YL, CHANG WL, LEE SC, LIU YG, CHEN CJ, LIN SZ, TSAI NM, YU DS, YEN CY, HARN HJ.
Acetone extract of *Angelica sinensis* inhibits proliferation of human cancer cells via inducing cell cycle arrest and apoptosis.
Life Sci 2004; 75 (13): 1579-1594.
- CHOI BH, KIM CG, LIM Y, SHIN SY, LEE YH.
Curcumin down-regulates the multidrug-resistance *mdr1b* gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF kappa B pathway.
Cancer Lett 2008; 259 (1): 111-118.
- CIRRITO JR, DEANE R, FAGAN AM, SPINNER ML, PARSADANIAN M, FINN MB, JIANG H, PRIOR JL, SAGARE A, BALES KR, PAUL SM, ZLOKOVIC BV, PIWNICAWORMS D, HOLTZMAN DM.
P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model.
J Clin Invest 2005; 115 (11): 3285-3290.

COLE SPC, CHANDA ER, DICKE FP, GERLACH JH, MIRSKI SEL.
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 topoisomerases II.
Cancer Res 1991; 51 (13): 3345-3352.

COLE SPC, BHARDWAJ G, GERLACH JH, MACKIE JE, GRANT CE, ALMQUIST KC, STEWART AJ, KURZ EU, DUNCAN AMW, DEELEY RG.
Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.
Science 1992; 258 (5088): 1650-1654.

CONSEIL G, BAUBICHON-CORTAY H, DAYAN G, JAULT JM, BARRON D, DI PIETRO A.
Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein.
Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95 (17): 9831-9836.

CONSOLI U, SANTONOCITO A, STAGNO F, FIUMARA P, PRIVITERA A, PARISI G, GIUSTOLISI GM, PAVONE B, PALUMBO GA, DI RAIMONDO F, MILONE G, GUGLIELMO P, GIUSTOLISI R.
Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia.
Br J Haematol 2002; 116 (4): 774-780.

CORDON-CARDO C, O'BRIEN JP, BOCCIA J, CASALS D, BERTINO JR, MELAMED MR.
Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues.
J. Histochem. Cytochem 1990; 38 (): 1277-1287.

CRITCHFIELD JW, WELSH CJ, PHANG JM, YEH GC.
Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT-15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism.
Biochem Pharmacol 1994; 48 (7): 1437-1445.

D

DANØ K.
Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor in vivo.
Cancer Chemother Rep 1972; 56 (6): 701-708.

DANØ K.
Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim Biophys Acta 1973; 323 (3): 466-483.

DEAN M, RZHETSKY A, ALLIKMETS R.
The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily.
Genome Res 2001; 11 (7) 1156-1166.

DE BOER AG, VAN DER SANDT IC, GAILLARD PJ.

The role of drug transporters at the blood-brain barrier.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003; 43: 629-656.

DEMEULE M, LAPLANTE A, SEPEHR-ARAÉ A, BEAULIEU E, AVERILL-BATES D, WENGER RM, BÉLIVEAU R.

Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites.

Biochem Cell Biol 1999; 77 (1): 47-58.

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 (4):1652-1663.

DEVINE SE, HUSSAIN A, DAVIDE JP, MELERA PW.

Full length and alternatively spliced pgp1 transcripts in multidrug-resistant Chinese hamster lung cells.

J Biol Chem 1991; 266 (7):4545-4555.

DI PIETRO A, CONSEIL G, PÉREZ-VICTORIA JM, DAYAN G, BAUBICHON-CORTAY H, TROMPIER D, STEINFELS E, JAULT JM, DE WET H, MAITREJEAN M, COMTE G, BOUMENDJEL A, MARIOTTE AM, DUMONTET C, MCINTOSH DB, GOFFEAU A, CASTANYS S, GAMARRO F, BARRON D.

Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters.

Cell Mol Life Sci 2002; 59 (2): 307-322.

DIXON RA.

Phytoestrogens.

Annu Rev Plant Biol 2004; 55: 225-261.

DOYLE LA, YANG W, ABRUZZO LV, KROGMANN T, GAO Y, RISHI AK, ROSS DD.

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

Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95 (26): 15665-15670.

DOYLE LA, ROSS DD.

Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistant protein (BCRP/ABCG2).

Oncogene 2003; 22 (47): 7340-7358.

DRAKE FH, ZIMMERMAN JP, McCABE FL, BARTUS HF, PER SR, SULLIVAN DM, ROSS WE, MATTERN MR, JOHNSON RK, CROOKE ST, MIRABELLI CK.

Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant p388 leukemia cells: evidence for two forms of the enzyme.

J Biol Chem 1987; 262 (34): 16739-16747.

DU H, CHANDAROY P, HUI SW.

Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion.

Biochim Biophys Acta 1997; 1326 (2): 236-248.

E

ENDICOTT JA, JURANKA PF, SARANGI F, GERLACH JH, DEUCHARS KL, LING V.
Simultaneous expression of two P-glycoprotein genes in drug-sensitive chinese hamster ovary cells.

Mol Cell Biol, 1987; 7 (11): 4075-4081.

ENDICOTT JA, LING V.

The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance.

Ann Rev Biochem 1989; 58: 137-171.

ESPER E, BARICHELLO AW, CHAN EK, MATTS JP, BUCHWALD H.

Synergistic lipid-lowering effects of alfalfa meal as an adjuvant to the partial ileal bypass operation.

Surgery 1987; 102 (1): 39-51.

EVANS AM.

Influence of dietary components on the gastrointestinal metabolism and transport of drugs.

Ther Drug Monit 2000; 22 (1): 131-136.

F

FANG R, HOUGHTON PJ, HYLANDS PJ.

Cytotoxic effect of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines

J Ethnopharmacol 2008; 118 (2): 257-263.

FERTÉ J, KÜHNEL JM, CHAPUIS G, ROLLAND Y, LEWIN G, SCHWALLER MA.

Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: synthesis, pharmacological activity, and structure-activity relationships.

J Med Chem 1999; 42 (3): 478-489.

FITZGERALD DJ, WILLINGHAM MC, CARDARELLI CO, HAMADA H, TSURUO T, GOTTESMAN MM, PASTAN I.

A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells.

Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84 (12) 4288-4292.

FOJO A, LEBO R, SHIMIZU N, CHIN JE, RONINSON IB, MERLINO GT, GOTTESMAN MM, PASTAN I.

Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7.

Somat Cell Mol Genet 1986; 12 (4): 415-420.

FOJO AT, UEDA K, SLAMON DJ, POPLACK DG, GOTTESMANN MM, PASTAN I.

Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987; 84 (3): 265-269.

FONG WF, WAN CK, ZHU GY, CHATTOPADHYAY A, DEY S, ZHAO Z, SHEN XL.

Schisandrol A from *Schisandra chinensis* reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by affecting Pgp-substrate complexes.

Planta Med 2007; 73 (3): 212-220.

FORNIER MN, RATHKOPF D, SHAH M, PATIL S, O'REILLY E, TSE AN, HUDIS C, LEFKOWITZ R, KELSEN DP, SCHWARTZ GK.

Phase I dose-finding study of weekly docetaxel followed by flavopiridol for patients with advanced solid tumors.

Clin Cancer Res 2007; 13 (19): 5841-5846.

FREI E, ROISOVOSKY A, WRIGHT JE, CUCCHI CA, LIPPKE JA, ERVIN TJ, JOLIVAT J, HASELTINE WA.

Development of methotrexate resistance in a human squamous cell carcinoma of the head and neck in culture.

Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81 (9): 2873-2877.

G

GARG AK, BUCHHOLZ TA, AGGARWAL BB.

Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols.

Antioxid Redox Signal 2005; 7 (11-12): 1630-1647.

GEORGES E, BRADLEY G, GARIEPY J, LING V.

Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies.

Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87 (1): 152-156.

GERLACH JH, ENDICOTT JA, JURANKA PF, HENDERSON G, SARANGI F, DEUCHARS KL, LING V.

Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance.

Nature 1986; 324 (6096): 485-489.

GERMANN UA.

P-glycoprotein – A mediator of multidrug resistance in tumour cells.

Eur J Cancer 1996; 32A (6): 927-944.

GERMANN UA, CHAMBERS TC.

Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein.

Cytotechnology 1998; 27: 31-60.

GODA K, FENYVESI F, BACSÓ Z, NAGY H, MÁRIÁN T, MEGYERI A, KRASZNAI Z, JUHÁSZ I, VECSENYÉS M, SZABÓ G JR.

Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody.

J Pharmacol Exp Ther 2007; 320 (1): 81-88.

GOLKAR M, SHOKRGOZAR MA, RAFATI S, MUSSET K, ASSMAR M, SADAIE R, CESBRON-DELAUW MF, MERCIER C.

Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against Toxoplasma chronic infection in mice.

Vaccine 2007; 25 (21): 4301-4011.

GOODFELLOW HR, SARDINI A, RUETZ S, CALLAGHAN R, GROS P, McNAUGHTON PA, HIGGINS CF.

Protein kinase C-mediated phosphorylation does not regulate drug transport by the human multidrug resistance P-glycoprotein.

J Biol Chem 1996; 271 (23):13668-13674.

GOTTESMAN MM, PASTAN I.

Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.

Annu Rev Biochem 1993; 62: 385-427.

GOTTESMAN MM, FOJO T, BATES SE

Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.

Nat Rev Cancer 2002; 2 (1): 48-58.

GOTTESMAN MM.

Mechanisms of cancer drug resistance.

Annu Rev Med 2002; 53: 615-627.

GREENBERGER LM, LISANTI CJ, SILVA JT, HORWITZ SB.

Domain mapping of the photoaffinity drug-binding sites in P-glycoprotein encoded by mouse *mdr1b*.

J Biol Chem 1991; 266 (31): 20744-20751.

GREENBERGER LM.

Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12.

J Biol Chem 1993; 268 (15):11417-11425.

GREENWALD RB, CHOE YH, MCGUIRE J, CONOVER CD.

Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates.

Adv Drug Deliv Rev 2003; 55 (2): 217-250.

GROS P, CROOP J, RONINSON IB, VARSHAVSKY A, HOUSMAN DE.

Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant cells.

Proc Natl Acad Sci USA 1986a; 83 (2): 337-341.

GROS P, CROOP J, HOUSMAN DE.

Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins.

Cell 1986b; 47 (3): 371-380.

GROS P, BEN NERIAH YB, CROOP JM, HOUSMAN DE.

Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance.

Nature 1986c; 323 (6090): 728-731.

GROS P, RAYMOND M, BELL J, HOUSMAN DE.

Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family.

Mol Cell Biol 1988; 8 (7): 2770-2778.

GUPTA S, KIM CH, TSURUO T, GOLLAPUDI S.

Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a human functionally active efflux pump, in human CD8⁺ T cells: a role in cytotoxic effector function.

J Clin Immunol 1992; 12 (6): 451-458.

H

HADJERI M, BARBIER M, RONOT X, MARIOTTE AM, BOUMENDJEL A, BOUTONNAT J.

Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues.

J Med Chem 2003; 46 (11): 2125-2131.

HAMADA H, TSURUO T.

Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies.

Proc Natl Acad Sci USA 1986; USA 83 (20): 7785-7789.

HAMADA H, TSURUO T.

Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase.

J Biol Chem 1988; 263 (3):1454-1458.

HAN K, KAHNG J, KIM M, LIM J, KIM Y, CHO B, KIM HK, MIN WS, KIM CC, LEE KY, KIM BK, KANG CS.

Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia.

Acta Haematol 2000; 104 (4): 174-180.

HARDING JA, ENGBERS CM, NEWMAN MS, GOLDSTEIN NI, ZALIPSKY S.

Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes.

Biochim Biophys Acta 1997; 1327 (2): 181-192.

HAUS-COHEN M, ASSARAF YG, BINYAMIN L, BENHAR I, REITER Y.

Disruption of P-glycoprotein anticancer drug efflux activity by a small recombinant single-chain Fv antibody fragment targeted to an extracellular epitope.

Int J Cancer 2004; 109 (5): 750-758.

HAWKINS DS, PARK JR, THOMSON BG, FELGENHAUER JL, HOLCENBERG JS, PANOSYAN EH, AVRAMIS VI.

Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia.

Clin Cancer Res 2004; 10 (16): 5335-5341.

HAYES JD, WOLF CR.

Molecular mechanisms of drug resistance.

Biochem J 1990; 272 (2): 281-295.

HENTGARTNER MO.

The biochemistry of apoptosis.

Nature 2000; 407: 770-776.

HEIKE Y, KASONO K, KUNISAKI C, HAMA S, SAIJO N, TSURUO T, KUNTZ DA, ROSE DR, CURIEL DT.

Overcoming multi-drug resistance using an intracellular anti-MDR1 sFv.

Int J Cancer 2001; 92 (1): 115-122.

HIGGINS CF, GOTTESMAN MM.

Is the multidrug transporter a flippase ?

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

HINDS KD, KIM SW.

Effects of PEG conjugation on insulin properties.

Adv Drug Deliv Rev 2002; 54 (4): 505-530.

HOOIVELD GJ, VAN MONTFOORT JE, MEIJER DK, MÜLLER M.

Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport.

Eur J Pharm Sci 2001; 12 (4): 525-543.

HONDA Y, USHIGOME F, KOYABU N, MORIMOTO S, SHOYAMA Y, UCHIUMI T, KUWANO M, OHTANI H, SAWADA Y.

Effects of grapefruit juice and orange juice components on P-glycoprotein- and MRP2-mediated drug efflux.

Br J Pharmacol 2004; 143 (7): 856-864.

HORIO M, GOTTESMAN MM, PASTAN I.

ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells.

Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85 (10): 3580-3584.

LIMAN 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 (7): 931-959.

HRYCYNA CA, AIRAN LE, GERMANN UA, AMBUDKAR SV, PASTAN I, GOTTESMAN MM.

Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport.

Biochemistry 1998a; 37 (39): 13660-13673.

HRYCYNA CA, RAMACHANDRA M, AMBUDKAR SV, KO YH, PEDERSEN PL, PASTAN I, GOTTESMAN MM.

Mechanism of action of human P-glycoprotein ATPase activity. Photochemical cleavage during a catalytic transition state using orthovanadate reveals cross-talk between the two ATP sites.

J Biol Chem 1998b; 273 (27): 16631-16634.

HSU SC, LU JH, KUO CL, YANG JS, LIN MW, CHEN GW, SU CC, LU HF, CHUNG JG.
Crude extracts of *Solanum lyratum* induced cytotoxicity and apoptosis in a human colon adenocarcinoma cell line (colo 205).
Anticancer Res 2008; 28(2A): 1045-1054.

HSU SI, LOTHSTEIN L, HORWITZ SB.
Differential overexpression of three *mdr* gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique *mdr* genes.
J Biol Chem 1989; 264 (20):12053-12062.

HSU YT, WOLTER KG, YOULE RJ.
Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis.
Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94 (8): 3668-3672.

I

IWAHASHI T, OKOCHI E, ARIYOSHI K, WATABE H, AMANN E, MORI S, TSURUO T, ONO K.
Specific targeting and killing activities of anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK16 directed against intrinsically multidrug-resistant human colorectal carcinoma cell lines in the nude mouse model.
Cancer Res 1993; 53 (22): 5475-5482.

IMMORDINO ML, DOSIO F, CATTEL L.
Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential.
Int J Nanomedicine 2006; 1(3): 297-315.

ITO C, ITOIGAWA M, TAN HT, TOKUDA H, YANG MOU X, MUKAINAKA T, ISHIKAWA T, NISHINO H, FURUKAWA H.
Anti-tumor-promoting effects of isoflavonoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis.
Cancer Lett 2000; 152 (2):187-192.

IVANOVA A, BATOVSKA D, ENGI H, PARUSHEV S, OCSOVSZKI I, KOSTOVA I, MOLNAR J.
MDR-reversal activity of chalcones.
In Vivo 2008; 22 (3): 379-384.

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 (3): 191-197.

J

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 (18): 4833-4836.

JEONG YH, CHUNG SY, HAN AR, SUNG MK, JANG DS, LEE J, KWON Y, LEE HJ, SEO EK.
P-glycoprotein inhibitory activity of two phenolic compounds, (-)-syringaresinol and triclinic acid from *Sasa borealis*.
Chem Biodivers 2007; 4 (1): 12-16.

JI BS, HE L.
CJY, an isoflavone, reverses P-glycoprotein-mediated multidrug-resistance in doxorubicin-resistant human myelogenous leukaemia (K562/DOX) cells.
J Pharm Pharmacol 2007; 59 (7): 1011-1015.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ L, ÁLVAREZ-CORRAL M, MUÑOZ-DORADO M, RODRÍGUEZ-GARCÍA I.
Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties.
Phytochem Rev 2008; 7: 125-154.

JONES CA, CUNNINGHAM AL.
Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease.
Herpes 2004; 11 (1): 12-17.

JULIANO RL, LING V.
A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.
Biochim Biophys Acta 1976; 455 (1): 152-162.

K

KABAWATA S, OKA M, SHIOZAWA K, TSUKAMOTO K, NAKATOMI K, SODA H, FUKUDA M, IKEGAMI Y, SUGAHARA K, YAMADA Y, KAMIHIRA S, DOYLE LA, ROSS DD, KOHNO S.
Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun 2001; 280 (5): 1216-1223.

KARTNER N, EVERNDEN-PORELLE D, BRADLEY G, LING V.
Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies.
Nature 1985; 316 (6031): 820-823.

KAST C, CANFIELD V, LEVENSON R, GROS P.
Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3.
Biochemistry 1995; 34 (13): 4402-4411.

-
- KASZUBIAK A, HOLM PS, LAGE H.
Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes.
Int J Oncol 2007; 31 (2): 419-430.
- KATO-NOGUCHI H
Occurrence of a growth inhibitor, 3-hydroxy- β -ionone, in seven cultivars of *Phaseolus vulgaris* and its role in light-induced growth inhibition.
Phytochemistry 1993; 36 (2): 273-275.
- KEAM SJ, CVETKOVIĆ RS.
Peginterferon-alpha-2a (40 kD) plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C mono-infection.
Drugs 2008; 68 (9): 1273-1317.
- KEPPLER D, LEIER I, JEDLITSCHKY G, KONIG J.
ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2.
Chem Biol Interact 1998; 111-112: 153-161.
- KHOSHANAN A, TINDELL C, LAUX I, BAE D, BENNETT B, NEL AE.
The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes.
J Immunol 2000; 165 (4): 1743-1754.
- KIANI J, IMAM SZ.
Medicinal importance of grapefruit juice and its interaction with various drugs.
Nutr J 2007; doi:10.1186/1475-2891-6-33.
- KIM YH, LEE DH, JEONG JH, GUO ZS, LEE YJ.
Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway.
Biochem Pharmacol 2008; 75 (10): 1946-1958.
- KIRK J, SYED SK, HARRIS AL, JARMAN M, ROUFOGALIS BD, STRATFORD IJ, CARMICHAEL J.
Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pure anti-oestrogens and novel tamoxifen derivatives.
Biochem Pharmacol 1994; 48 (2): 277-285.
- KOKUBU N, COHEN D, WATANABE T.
Functional modulation of ATPase of P-glycoprotein by C219, a monoclonal antibody against P-glycoprotein.
Biochem Biophys Res Commun 1997; 230 (2): 398-401.
- KOLESNICK RN, KRÖNKE M.
Regulation of ceramide production and apoptosis.
Annu Rev Physiol 1998; 60: 643-665.

KRISHNA R, ST-LOUIS M, MAYER LD.

Increased intracellular drug accumulation and complete chemosensitization achieved in multidrug resistant solid tumors by coadministering valspodar (PSC833) with sterically stabilized liposomal doxorubicin.

Int J Cancer 2000; 85 (1): 131-141.

KUWANA T, NEWMAYER DD.

Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis.

Curr Opin Cell Biol 2003; 15 (6): 691-699.

L

LAM FC, LIU R, LU P, SHAPIRO AB, RENOIR JM, SHAROM FJ, REINER PB.

Beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein.

J Neurochem 2001; 76 (4): 1121-1128.

LATHAN B, EDWARDS DP, DRESSLER LG, VON HOFF DD, MCGUIRE WL.

Immunological detection of Chinese hamster ovary cells expressing a multidrug resistance phenotype.

Cancer Res 1985; 45 (10): 5064-5069.

LEE DH, SZCZEPANSKI M, LEE YJ.

Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells.

Biochem Pharmacol 2008; 75 (12): 2345-2355.

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 compounds.

J Biol Chem 1994; 269 (45): 27807-27810.

LI F, AWALE S, TEZUKA Y, KADOTA S.

Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship.

Bioorg Med Chem 2008; 16 (10): 5434-5440.

LI X, CHOI JS.

Effect of genistein on the pharmacokinetics of paclitaxel administered orally or intravenously in rats.

Int J Pharm 2007; 337 (1-2): 188-193.

LIEN EJ, REN SJ, BUI HUH, WANG RB.

Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants.

Free Rad Biol Med 1999; 26 (3-4): 285-294.

LIMTRAKUL P, KHANTAMAT O, PINTHA K.

Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin.

J Chemother 2005; 17 (1): 86-95.

-
- LIMTRAKUL P, CHEARWAE W, SHUKLA S, PHISALPHONG C, AMBUDKAR SV.
Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin.
Mol Cell Biochem 2007; 296 (1-2): 85-95.
- LIU J, LI Y, REN W, HU WX.
Apoptosis of HL-60 cells induced by extracts from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*.
Cancer Lett 2006; 232 (1): 133-140.
- LIU YL, HO DK, CASSADY JM, COOK VM, BAIRD WM.
Isolation of potential cancer chemopreventive agents from *Eriodictyon californicum*.
J Nat Prod 1992 ; 55 (3): 357-363.
- LIU ZL, TANAKA S, HORIGOME H, HIRANO T, OKA K.
Induction of apoptosis in human lung fibroblasts and peripheral lymphocytes in vitro by Shosaiko-to derived phenolic metabolites.
Biol Pharm Bull 2002; 25 (1): 37-41.
- LOE DW, ALMQUIST KC, COLE SP, DEELEY RG.
ATP-dependent transport 17 β -estradiol 17-(β -D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids.
J Biol Chem 1996; 271 (16): 9683-9689.
- LOE DW, STEWART RK, MASSEY DE, DEELEY RG, COLE SP.
ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene.
Mol Pharmacol 1997; 51 (6): 1034-1051.
- LOE DW, DEELEY RG, COLE SP.
Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathion.
Cancer Res 1998; 58 (22): 5130-5136.
- LONGO-SORBELLO GS, BERTINO JR.
Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials.
Haematologica 2001; 86 (2): 121-127.
- LOO TW, CLARKE DM.
Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides.
J Biol Chem 1994; 269 (10): 7750-7755.
- LOO TW, CLARKE DM.
Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein.
J Biol Chem 1995a; 270 (2): 843-848.

LOO TW, CLARKE DM.

P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones.

J Biol Chem 1995b; 270 (37): 21839-21844.

LOO TW, CLARKE DM.

Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques.

Biochim Biophys Acta 1999a; 1461 (2): 315-325.

LOO TW, CLARKE DM.

The human multidrug resistance is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy.

FASEB J 1999b; 13 (13): 1724-1732.

LOO TW, CLARKE DM.

Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers.

J Biol Chem 2001a; 276 (40): 36877-36880.

LOO TW, CLARKE DM.

Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil.

J Biol Chem 2001b; 276 (18):14972-14979.

LOO TW, BARTLETT MC, CLARKE DM.

Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket.

Biochem J 2006; 399(2): 351-359.

LOSCHER W, POTSCSKA H.

Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family.

J Am Soc Exp Neurother 2005; 2 (1): 86-98.

M

MALINOW MR, MCLAUGHLIN P, STAFFORD C.

Alfalfa seeds: effects on cholesterol metabolism.

Experientia 1980; 36 (5): 562-564.

MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ L.

Polyphenols: food sources and bioavailability.

Am J Clin Nutr 2004; 79 (5): 727-747.

MANACH C, MAZUR A, SCALBERT A.

Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases.

Curr Opin Lipidol 2005; 16 (1): 77-84.

MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, SUSIN SA, BEUTNER G, BRDICZKA D, RÉMY R, XIE ZH, REED JC, KROEMER G.

The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins.

J Exp Med 1998; 187 (8): 1261-1271.

MATSUO H, WAKASUGI M, TAKANAGA H, OHTANI H, NAITO M, TSURUO T, SAWADA Y.

Possibility of reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16, a monoclonal antibody to P-glycoprotein.

J Control Release 2001; 77 (1-2): 77-86.

MECHETNER EB, RONINSON IB.

Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody.

Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89 (13): 5824-5828.

MECHETNER EB, SCHOTT B, MORSE BS, STEIN WD, DRULEY T, DAVIS KA, TSURUO T, RONINSON IB.

P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity.

Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94 (24):12908-12913.

MEIJER C, MULDER NH, TIMMER-BOSSCHA H, SLUITER WJ, MEERSMA GJ, de VRIES EG.

Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds.

Cancer Res 1992; 52 (4): 6885-6889.

MEYERS MB, RITTMANN-GRAUER L, O'BRIEN JP, SAFA AR.

Characterization of monoclonal antibodies recognizing a Mr 180,000 P-glycoprotein: differential expression of the Mr 180,000 and Mr 170,000 P-glycoproteins in multidrug-resistant human tumor cells.

Cancer Res 1989; 49 (12): 3209-3214.

MICKISCH GH, PAI LH, GOTTESMAN MM, PASTAN I.

Monoclonal antibody MRK16 reverses the multidrug resistance of multidrug-resistant transgenic mice.

Cancer Res 1992; 52 (16): 4427-4432.

MILITÃO GC, DANTAS IN, PESSOA C, FALCÃO MJ, SILVEIRA ER, LIMA MA, CURI R, LIMA T, MORAES MO, COSTA-LOTUFO LV.

Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells.

Life Sci 2006; 78 (20): 2409-2417.

MILITÃO GC, PINHEIRO SM, DANTAS IN, PESSOA C, DE MORAES MO, COSTA-LOTUFO LC, LIMA MA, SILVEIRA ER.

Bioassay-guided fractionation of pterocarpan from roots of *Harpalyce brasiliensis* Benth.

Bioorg Med Chem. 2007; 15 (21): 6687-6691.

MILLER RW, LEIMAN RK, POWELL RG.
Germination and growth inhibitors of alfalfa
J Nat Prod 1988; 51 (2): 328-330.

MINN AJ, VÉLEZ P, SCHENDEL SL, LIANG H, MUCHMORE SW, FESIK SW, FILL M, THOMPSON CB.
Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes.
Nature 1997; 385 (6614): 353-357.

MOLGAARD J, VON SCHENCK H, OLSSON AG.
Alfalfa seeds lower low density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B concentrations in patients with type II hyperlipoproteinemia.
Atherosclerosis 1987; 65 (1-2): 173-179.

MORRIS ME, ZHANG S.
Flavonoid-drug interactions: effects on ABC transporters.
Life Sci 2006; 78: 2116-2130.

MUCHMORE SW, SATTLER M, LIANG H, MEADOWS RP, HARLAN JE, YOON HS, NETTESHEIM D, CHANG BS, THOMPSON CB, WONG SL, NG SL, FESIK SW.
X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death.
Nature 1996; 381 (6580): 335-341.

MUHS A, HICKMAN DT, PIHLGREN M, CHUARD N, GIRIENS V, MEERSCHMAN C, VAN DER AUWERA I, VAN LEUVEN F, SUGAWARA M, WEINGERTNER MC, BECHINGER B, GREFERATH R, KOLONKO N, NAGEL-STEGER L, RIESNER D, BRADY RO, PFEIFER A, NICOLAU C.
Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice.
Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104 (23): 9810-9815.

N

NABEKURA T, KAMIYAMA S, KITAGAWA S.
Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function.
Biochem Biophys Res Commun 2005; 327 (3): 866-870.

NADALI F, POURFATHOLLAH AA, ALIMOGHADDAM K, NIKOUGOFTAR M, ROSTAMI S, DIZAJI A, AZIZI E, ZOMORODIPOUR A, GHAVAMZADEH A.
Multidrug resistance inhibition by antisense oligonucleotide against MDR1/mRNA in P-glycoprotein expressing leukemic cells.
Hematology 2007; 12 (5): 393-401.

NAGY H, GODA K, ARCECI R, CIANFRIGLIA M, MECHETNER E, SZABÓ G JR.
P-Glycoprotein conformational changes detected by antibody competition.
Eur J Biochem 2001; 268(8): 2416-2420.

NAGY H, GODA K, FENYVESI F, BASCÓ Z, SZILASI M, KAPPELMAYER J, LUSTYIK G, CIANFRIGLIA M, SZABÓ G JR.

Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies.

Biochem Biophys Res Commun 2004; 315(4): 942-949.

NEVENS F, ZUCKERMAN JN, BURROUGHS AK, JUNG MC, BAYAS JM, KALLINOWSKI B, RIVAS EF, DUVOUX C, NEUHAUS P, SALIBA F, BUTI M, ZARSKI JP, PONS F, VANLEMMENS C, HAMTIAUX V, STOFFEL M.

Immunogenicity and safety of an experimental adjuvanted hepatitis B candidate vaccine in liver transplant patients.

Liver Transpl 2006; 12 (10): 1489-1495.

NGAMROJANAVANICH N, LOONTAISONG A, PENGPREECHA S, CHERDSHEWASART W, PORNPAAKAKUL S, PUDHOM K, ROENGSUMRAN S, PETSOM A.

Cytotoxic constituents from *Butea superba* Roxb.

J Ethnopharmacol 2007; 109 (2): 354-358.

NG WF, SARANGI F, ZASTAWNY RL, VEINOT-DREBOT L, LINGV.

Identification of members of the P-glycoprotein multigene family.

Mol Cell Biol 1989; 9 (3): 1224-1232.

NICOLAU C, GREFERATH R, BALABAN TS, LAZARTE JE, HOPKINS RJ.

A liposome-based therapeutic vaccine against beta -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99 (4): 2332-2337.

NOROOZI M, ANGERSON WJ, LEAN ME.

Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes.

Am J Clin Nutr 1998; 67 (6): 1210-1218.

O

ODOT J, ALBERT P, CARLIER A, TARPIN M, DEVY J, MADOULET C.

In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells.

Int J Cancer 2004; 111 (3): 381-387.

ONO T, GOTO K, TAKAGI S, IWASAKI S, KOMATSU H.

Sclerosing effect of OC-108, a novel agent for hemorrhoids, is associated with granulomatous inflammation induced by aluminum.

P

PAPAHADJOPOULOS D, ALLEN TM, GABIZON A, MAYHEW E, MATTHAY K, HUANG SK, LEE KD, WOODLE MC, LASIC DD, REDEMANN C, MARTIN FJ

Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy.

Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (24): 11460-11464.

PAWLAK-ROBLIN C, TOSI PF, PERRIN L, DEVY J, VENTEO L, ALBERT P, NICOLAU C, MADOULET C.

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

Eur J Cancer 2004; 40 (4): 606-613.

PELLECCHIA M, REED JC.

Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by natural polyphenols: new avenues for cancer chemoprevention and chemotherapy.

Curr Pharm Des 2004; 10 (12): 1387-1398.

PERRIN L, GATOULLAT G, BALASSE E, ODOT J, NICOLAU C, TOSI PF, MADOULET C.

Induction of autoantibodies to murine P-glycoprotein: consequences on drug sensitivity in MDR cancer cells and on the expression of mdr genes in organs.

Biochem Biophys Res Commun 2007; 358 (1): 325-330.

PHANG JM, POORE CM, LOPACZYNSKA J, YEH GC.

Flavonol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells.

Cancer Res 1993; 53 (24): 5977-5981.

PIERRE A, DUNN TA, KRAUS-BERTHIER L, LEONCE S, SAINT-DIZIER D, REGNIER G, DHAINAUT A, BERLION M, BIZZARI JP, ATASSI G.

In vitro and in vivo circumvention of multidrug resistance by Servier 9788, a novel triazinoaminopiperidine derivative.

Invest New Drugs 1992; 10 (3): 137-148.

PIRKER R, KEILHAUER G, RASCHACK M, LECHNER C, LUDWIG H.

Reversal of multidrug resistance in human KB cell lines by structural analogs of verapamil.

Int J Cancer 1990; 45 (): 916-919.

PUSZTAI L, WAGNER P, IBRAHIM N, RIVERA E, THERIAULT R, BOOSER D, SYMMANS FW, WONG F, BLUMENSCHEN G, FLEMING DR, ROUZIER R, BONIFACE G, HORTOBAGYI GN.

Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma.

Cancer 2005; 104 (4): 682-691.

R

RAMOS S.

Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention.

J Nutr Biochem 2007; 18 (7): 427-442.

RAYMOND M, ROSE E, HOUSMAN DE, GROS P.

Physical mapping, amplification, and overexpression of the mouse mdr gene family in multidrug-resistant cells.

Mol Cell Biol 1990; 10 (4): 1642-1651.

REN W, QIAO Z, WANG H, ZHU L, ZHANG L.

Flavonoids: promising anticancer agents.

Med Res Rev 2003; 23 (4): 519-534.

RIORDAN JR, LING V.

Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability.

J Biol Chem 1979; 254 (24): 12701-12705.

ROBERT J.

Structure et fonction de la glycoprotéine.

Bull Cancer 1994; 81 (5): 400-408.

ROMAGNOLI G, POLONI F, FLEGO M, MORETTI F, DI MODUGNO F, CHERSI A, FALASCA G, SIGNORETTI C, CASTAGNA M, CIANFRIGLIA M.

Epitope mapping of the monoclonal antibody MM12.10 to external MDR1 P-glycoprotein domain by synthetic peptide scanning and phage display technologies.

Biol Chem 1999; 380 (5): 553-559.

RONINSON IB, CHIN JE, CHOI KG, GROS P, HOUSMAN DE, FOJO A, SHEN DW, GOTTESMAN MM, PASTAN I.

Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83 (12):4538-4542.

ROSENBERG MF, CALLAGHAN R, FORD RC, HIGGINS CF.

Structure of the multidrug resistant P-glycoprotein to 2,5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis.

J Biol Chem 1997; 272 (16): 10685-10694.

RUAN WJ, LAI MD, ZHOU JG.

Anticancer effects of Chinese herbal medicine, science or myth?

J Zhejiang Univ Sci B 2006; 7 (12): 1006-1014.

RUETZ S, GROS P.

Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene.

Cell 1994; 77 (7): 1071-1081.

S

SADHU SK, OKUYAMA E, FUJIMOTO H, ISHIBASHI M.

Diterpenes from *Leucas aspera* inhibiting prostaglandin-induced contractions.

J Nat Prod 2006 ; 69 (7): 988-994.

SANDLER A, GORDON M, DE ALWIS DP, POULIQUEN I, GREEN L, MARDER P, CHAUDHARY A, FIFE K, BATTIATO L, SWEENEY C, JORDAN C, BURGESS M, SLAPAK CA.

A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced

malignancy.

Clin Cancer Res 2004; 10 (10): 3265-3272.

SARATH VJ, SO CS, WON YD, GOLLAPUDI S.

Artemesia princeps var orientalis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells.

Anticancer Res 2007; 27(6B): 3891-3898.

SASAKI S, TSUJI T, HAMAJIMA K, FUKUSHIMA J, ISHII N, KANEKO T, XIN KQ, MOHRI H, AOKI I, OKUBO T, NISHIOKA K, OKUDA K.

Monophosphoryl lipid A enhances both humoral and cell-mediated immune responses to DNA vaccination against human immunodeficiency virus type 1.

Infect Immun 1997; 65 (9): 3520-3528.

SAUNA ZE, AMBUDKAR SV.

Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein.

Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97 (6): 2515-2520.

SAUNA ZE, AMBUDKAR SV.

Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes.

J Biol Chem 2001; 276 (15):11653-11661.

SAUNA ZE, MULLER M, PENG XH, AMBUDKAR SV.

Importance of the conserved Walker B glutamate residues, 556 and 1201, for the completion of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein (ABCB1).

Biochemistry 2002; 41 (47):13989-4000.

SCAMBIA G, RANELLETTI FO, PANICI PB, DE VINCENZO R, BONANNO G, FERRANDINA G, PIANTELLI M, BUSSA S, RUMI C, CIANFRIGLIA M, ET AL.

Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target.

Cancer Chemother Pharmacol 1994; 34 (6): 459-464.

SCHEFFER GL, WIJNGAARD PL, FLENS MJ, IZQUIERDO MA, PINEDO HM, MEIJER CJ, CLEVERS HC, SCHEPER RJ.

The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein.

Nat Med 1995; 1 (6): 578-582.

SCHENDEL SL, XIE Z, MONTAL MO, MATSUYAMA S, MONTAL M, REED JC.

Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2.

Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94 (10): 5113-5118.

SCHEPER RJ, BULTE JW, BRAKKEE JG, QUAK JJ, VAN DER SCHOOT E, BALM AJ, MEIJER CJ, BROXTERMAN HJ, KUIPER CM, LANKELMA J, ET AL.

Monoclonal antibody JSB-1 detects a highly conserved epitope on the P-glycoprotein associated with multi-drug-resistance.

Int J Cancer 1988; 42 (3): 389-394.

SCHEPER RJ, BROXTERMAN HJ, SCHEFFER GL, KAAIJK P, DALTON WS, VAN HEIJNINGEN TH, VAN KALKEN CK, SLOVAK ML, DE VRIES EG, VAN DER VALK P et al.

Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.

Cancer Res 1993; 53 (7): 1475-1479.

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 (10): 2628-2635.

SCHINKEL AH, KEMP S, DOLLE M, RUDENKO G, WAGENAAR E.

N-glycosylation and deletions mutants of the human MDR1 P-glycoprotein

J Biol Chem 1993a; 268 (10): 7474-7481.

SCHINKEL AH, ARCECI RJ, SMIT JJ, WAGENAAR E, BAAS F, DOLLÉ M, TSURUO T, MECHETNER EB, RONINSON IB, BORST P.

Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein.

Int J Cancer 1993; 55 (3): 478-484.

SCHINKEL AH, SMIT JJ, VAN TELLINGEN O, BEIJNEN JH, WAGENAAR E, VAN DEEMTER L, MOL CA, VAN DER VALK MA, ROBANUS-MAANDAG EC, TE RIELE HP, et al.

Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs.

Cell 1994; 77 (4): 491-502.

SCHINKEL AH.

The physiological function of P-glycoproteins.

Sem Cancer Biol 1997; 8 (3): 161-170.

SCHUETZ EG, BECK WT, SCHUETZ JD.

Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells.

Mol Pharmacol 1996; 49 (2): 311-318.

SCOTTO KW.

Transcriptional regulation of ABC drug transporters.

Oncogene 2003; 22 (47): 7496-7511.

SENIOR AE, AL-SHAWI MK, URBATSCH IL.

The catalytic cycle of P-glycoprotein.

FEBS Lett 1995; 377 (3): 285-289.

SHAROM FJ.

The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs?

J Membrane Biol 1997; 160 (3): 161-175.

SHEPARD RL, WINTER MA, HSAIO SC, PEARCE HL, BECK WT, DANTZIG AH.
Effect of modulators on the ATPase activity and vanadate nucleotide trapping of human P-glycoprotein.
Biochem Pharmacol 1998; 56 (6): 719-727.

SINNINGHE-DAMSTÉ JS, KOOPMANS MP.
The fate of carotenoids in sediments: An overview.
Pure Appl Chem 1997; 69 (10): 2067-2074.

SOMMERBURG O, LANGHANS CD, ARNHOLD J, LEICHSENRING M, SALERNO C, CRIFÒ C, HOFFMANN GF, DEBATIN KM, SIEMS WG.
Beta-carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid--a model for neutrophil-derived degradation.
Free Radical Biol Med 2003; 35 (11): 1480-1490.

SPENCER GF, JONES BE, PLATTNER RD, BARNEKOW DE, BRINEN LS, CLARDY J.
A pterocarpan and two isoflavans from alfalfa
Phytochemistry 1991; 30(12): 4147-4149.

STOCHMAL A, SIMONET AM, MACIAS FA, OLESZEK W.
Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts.
J Agric Food Chem 2001; 49 (11): 5310-5314.

STOUTE JA, KESTER KE, KRZYCH U, WELLDE BT, HALL T, WHITE K, GLENN G, OCKENHOUSE CF, GARCON N, SCHWENK R, LANAR DE, SUN P, MOMIN P, WIRTZ RA, GOLEND A C, SLAOUI M, WORTMANN G, HOLLAND C, DOWLER M, COHEN J, BALLOU WR.
Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine.
J Infect Dis 1998; 178 (4): 1139-1144.

STRASSER A, O'CONNOR L, DIXIT VM.
Apoptosis signaling.
Annu Rev Biochem 2000; 69: 217-245.

SWANSTON-FLATT SK, DAY C, BAILEY CJ, FLATT PR.
Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice.
Diabetologia 1990; 33 (8): 462-464.

SZAKACS G, PATERSON JK, LUDWIG JA, BOOTH-GENTHE C, GOTTESMAN MM.
Targeting multidrug resistance in cancer.
Nat Rev Drug Discov 2006; 5 (3): 219-234.

T

TAKANAGA H, OHNISHI A, YAMADA S, MATSUO H, MORIMOTO S, SHOYAMA Y, OHTANI H, SAWADA Y.

Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4.

J Pharmacol Exp Ther 2000; 293 (1): 230-236.

TANG R, FAUSSAT AM, PERROT JY, MARJANOVIC Z, COHEN S, STORME T, MORJANI H, LEGRAND O, MARIE JP.

Zosuquidar restores drug sensitivity in P-glycoprotein expressing acute myeloid leukemia (AML).

BMC Cancer 2008, doi:10.1186/1471-2407-8-51.

TERRY P, GIOVANNUCCI E, MICHELS KB, BERGKVIST L, HANSEN H, HOLMBERG L, WOLK A.

Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer.

J Natl Cancer Inst 2001; 93 (7): 525-533.

TEW KD.

Glutathione-associated enzymes in anticancer drugs resistance

Cancer Res 1994; 54 (16): 4313-4320.

THATTE U, BAGADEY S, DAHANUKAR S.

Modulation of programmed cell death by medicinal plants.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2000; 46 (1): 199-214.

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 USA 1987; 84 (21):7735-7738.

THOMASSET SC, BERRY DP, GARCEA G, MARCZYLO T, STEWARD WP, GESCHER AJ.

Dietary polyphenolic phytochemicals--promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties.

Int J Cancer 2007; 120 (3): 451-458.

TOSI PF, RADU D, NICOLAU C.

Immune response against the murine mdri protein induced by vaccination with synthetic lipopeptides in liposomes.

Biochem Biophys Res Commun 1995; 212 (2): 494-500.

TSURUO T, IIDA H, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y.

Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil.

Cancer Res 1981; 41 (5): 1967-1972.

TSURUO T, IIDA H, NOJIRI M, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y.

Circumvention of vincristine and Adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers.

Cancer Res 1983; 43 (6): 2905-2910.

TSURUO T, IIDA H, KITATANI Y, YOKOTA K, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y.
Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells.
Cancer Res 1984; 44 (10): 4303-4307.

U

UEDA K, CORNWELL MM, GOTTESMAN MM, PASTAN I, RONINSON IB, LING V, RIORDAN JR.
The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein.
Biochem Biophys Res Commun 1986; 141 (3): 956-962.

UEDA K, CARDARELLI C, GOTTESMAN MM, PASTAN I.
Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine.
Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84 (9): 3004-3008.

V

VALTULINI S, MACCHI C, BALLANTI P, CHEREL Y, LAVAL A, THEAKER JM, BAK M, FERRETTI E, MORVAN H.
Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs.
Vaccine 2005 ; 23 (30): 3999-4004.

VAN DER BLIEK AM, BAAS F, TEN HOUTE DE LANGE T, KOOIMAN PM, VAN DER VELDE-KOERTS T, BORST P.
The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver.
EMBO J 1987 ; 6 (11): 3325-3331.

VAN DER BLIEK, BORST P.
Multidrug resistance.
Adv Cancer Res 1989; 52: 165-203.

VASUDEVAN S, TSURUO T, ROSE DR.
Mode of binding of anti-P-glycoprotein antibody MRK-16 to its antigen. A crystallographic and molecular modeling study.
J Biol Chem 1998; 273 (39): 25413-25419.

VERNACCHIO L, BERNSTEIN H, PELTON S, ALLEN C, MACDONALD K, DUNN J, DUNCAN DD, TSAO G, LAPOSTA V, ELDRIDGE J, LAUSSUCQ S, AMBROSINO DM, MOLRINE DC.
Effect of monophosphoryl lipid A (MPL) on T-helper cells when administered as an adjuvant with pneumococcal-CRM197 conjugate vaccine in healthy toddlers.
Vaccine 2002; 20 (31-32): 3658-36567.

VERONESE FM, MERO A.
The Impact of PEGylation on Biological Therapies.
BioDrugs 2008; 22 (5): 315-329.

W

WADKINS RM, ROEPE PD.

Biophysical aspects of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.
Int Rev Cyt 1997; 171, 121-165.

WAN CK, ZHU GY, SHEN XL, CHATTOPADHYAY A, DEY S, FONG WF.

Gomisin A alters substrate interaction and reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in HepG2-DR cells.
Biochem Pharmacol 2006; 72 (7): 824-837.

WANG FP, WANG L, YANG JS, NOMURA M, MIYAMOTO K.

Reversal of P-glycoprotein-dependent resistance to vinblastine by newly synthesized bisbenzylisoquinoline alkaloids in mouse leukemia P388 cells.
Biol Pharm Bull 2005; 28 (10): 1979-1982.

WANG R, SALEM M, YOUSEF IM, TUCHWEBER B, LAM P, CHILDS SJ, HELGASON CD, ACKERLEY C, PHILLIPS MJ, LING V.

Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis.
Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98 (4): 2011-2016.

WATANABE T, KOKUBU N, CHARNICK SB, NAITO M, TSURUO T, COHEN D.

Interaction of cyclosporin derivatives with the ATPase activity of human P-glycoprotein.
Br J Pharmacol 1997; 122 (2): 241-248.

WILSON DM 3RD, SOFINOWSKI TM, MCNEILL DR.

Repair mechanisms for oxidative DNA damage.
Front Biosci 2003 ; 8: d963-681.

WU Q, BOUNAUD PY, KUDUK SD, YANG CP, OJIMA I, HORWITZ SB, ORR GA.

Identification of the domains of photoincorporation of the 3'- and 7-benzophenone analogues of taxol in the carboxyl-terminal half of murine mdr1b P-glycoprotein.
Biochemistry 1998; 37 (32): 11272-11279.

X

XU D, LU Q, HU X.

Down-regulation of P-glycoprotein expression in MDR breast cancer cell MCF-7/ADR by honokiol.
Cancer Lett 2006; 243 (2): 274-280.

XU J, LIU Y, YANG Y, BATES S, ZHANG JT.

Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2.
J Biol Chem 2004; 279 (19): 19781-19789.

XU W, LIU J, LI C, WU HZ, LIU YW.

Kaempferol-7-O-beta-D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner.
Cancer Lett 2008; 264 (2): 229-240.

Y

YANG CS, LANDAU JM, HUANG MT, NEWMARK HL.

Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.
Annu Rev Nutr 2001; 21: 381-406.

YANG HS, CHEN CS, CHANG WH, LU FJ, LAI YC, CHEN CC, HSEU TH, KUO CT, HSEU YC.

Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*.
Cancer Lett 2006; 231 (2): 215-227.

YANG JY, DELLA-FERA MA, RAYALAM S, AMBATI S, BAILE CA.

Enhanced pro-apoptotic and anti-adipogenic effects of genistein plus guggulsterone in 3T3-L1 adipocytes.
Biofactors 2007; 30 (3): 159-169.

Z

ZHANG S, MORRIS ME.

Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport.
J Pharmacol Exp Ther 2003; 304 (3): 1258-1267.

ZHOU S, LIM LY, CHOWBAY B.

Herbal modulation of P-glycoprotein.
Drug Metab Rev 2004; 36 (1): 57-104.

Stratégies de sensibilisation de cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie : induction d'anticorps, utilisation de flavonoïdes.

La surexpression de la P-glycoprotéine (P-gp) est l'une des principales causes de l'établissement de la résistance aux traitements anticancéreux. De nombreuses stratégies visant à inhiber l'efflux de drogues médié par la P-gp ont été développées.

Dans ce travail, la réversion de l'activité de la P-gp, a été réalisée par deux approches différentes, l'une basée sur la production d'anticorps, l'autre faisant appel à l'utilisation de flavonoïdes isolés à partir de la luzerne.

Nous avons montré que des anticorps dirigés spécifiquement contre la P-gp restaurent la sensibilité des cellules leucémiques murines P388 résistantes vis-à-vis de la doxorubicine. Ces anticorps sont induits par l'immunisation de souris avec des liposomes présentant des peptides synthétiques dérivés de boucles extracellulaires de la P-gp à leur surface grâce à des chaînes PEGylées. Ces anticorps, incubés avec des cellules P388 résistantes, potentialisent l'effet de la doxorubicine en augmentant son accumulation intracellulaire. De plus, l'immunisation avec une telle préparation permet d'améliorer l'efficacité du traitement chimiothérapeutique et d'augmenter la survie des souris ayant reçu l'injection de cellules P388 résistantes.

Au cours d'un screening bioguidé de l'extrait foliaire de luzerne, plusieurs métabolites possédant des activités anticancéreuses ont été isolés. La medicarpine et le millepurpan, deux isoflavonoïdes, exercent une activité cytotoxique aussi bien dans les cellules P388 sensibles et résistantes à la doxorubicine en induisant une apoptose caspase-dépendante. Lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations non toxiques, les deux composés potentialisent l'effet d'agents anticancéreux en inhibant l'activité de la P-gp sans modifier son expression.

Mots clés : P-glycoprotéine, résistance « multidrogue », immunisation, anticorps, luzerne, flavonoïdes.

Sensitization of chemoresistant tumor cells by induction of antibodies and use of flavonoids.

Overexpression of P-glycoprotein (P-gp) encoded by the *mdr1/3* genes is one of the main cause for the establishment of resistance toward anticancer treatments in many cancers. Therefore, numbers of strategies aiming at inhibiting P-gp-mediated drug efflux have been developed.

In this work, the reversal of P-gp activity was achieved by the induction of antibodies and the use of flavonoids isolated from alfalfa (*Medicago sativa*).

On the one hand, we showed that specific anti-P-gp antibodies restore doxorubicin sensitivity in mouse leukaemia P388 cells. These antibodies were elicited by immunization with liposome-anchored PEGylated peptides derived from P-gp extracellular loops, mimicking P-gp extracellular loops. Incubation of resistant P388 cells with the elicited antibodies potentialized doxorubicin cytotoxicity by enhancing its intracellular accumulation. Moreover, immunization with the liposomal vaccine improved the efficacy of chemotherapeutic treatment and prolonged life span of mice challenged with resistant P388 cells.

On the other hand, during a bio-guided fractionation of alfalfa leaf extract, several metabolites possessing anticancer properties have been isolated. Isoflavonoids medicarpin and millepurpan exhibited cytotoxic activity against sensitive as well as resistant P388 cells by inducing caspase dependent-apoptosis. When they were used at subtoxic concentrations, the two compounds the cytotoxicity of anticancer agents by blocking P-gp activity without modifying its expression.

Keywords: P-glycoprotein, Multidrug resistance, immunization, antibodies, alfalfa, flavonoids.
