

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

ANNÉE 2002 — THÈSE N° 169

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'EXPRESSION DU PHÉNOTYPE MDR DANS LES ESPÈCES HUMAINE ET CANINE.

THÈSE

Présentée à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD – LYON I
(Médecine – Pharmacie)
et soutenue publiquement le 04 octobre 2002
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

MUSSET Stéphane
né le 12 juin 1973
à *Bar-le-Duc (55)*



ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

ANNÉE 2002 — THÈSE N° 169

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'EXPRESSION DU PHÉNOTYPE MDR DANS LES ESPÈCES HUMAINE ET CANINE.

THÈSE

Présentée à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD – LYON I
(Médecine – Pharmacie)
et soutenue publiquement le 04 octobre 2002
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

MUSSET Stéphane
né le 12 juin 1973
à *Bar-le-Duc* (55)



DÉPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur : Professeur J.-F. CHARY

Le 1^{er} mars 2002

DÉPARTEMENT	PREX	PR1	PR2	MC	Contractuel, Associé & IPAC	APRC	Chargés de consult et d'enseignement
DÉPART. SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale Pathologie infectieuse Parasitologie & Maladie parasitaires Qualité et Sécurité des Aliments Législation & Jurisprudence		Y. RICHARD M. PRAVE C. CHAUVE G. CHANTEGRELET	 A. LACHERETZ G. BOURDOISEAU F. DEMONT A. LACHERETZ	A. KODJO D. GREZEL 80% J. VIALARD MP CALLAIT L. ZENNER C. VERNOZY A. GONTHIER	J. BOUVET (MCC) M. ARTOIS (PRA)		
DÉPART. DES ANIMAUX DE COMPAGNIE Anatomie Chirurgie et Anesthésiologie Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie Médecine interne Imagerie médicale		E. CHATELAIN J.P. GENEVOIS J.P. MAGNOL J.P. COTARD C. FOURNEL	T. ROGER D. FAU J.L. CADORÉ	M.A. BERTHELET S. SAWAYA D. RÉMY T. MARCHAL L. CHABANNE P. BARTHEZ	 G. CHANOIT (MCC) S. JUNOT (MCC) D. WATRELOT-VIRIEUX (MCC) M.F. PERRON-LEPAGE (MCC) I. BUBLOT 50% (MCC) A. JONGH-ARAGON 50% (MCC)	 C. CAROZZO F. PONCE C. ESCRIOU	 N. DISS C. ROUX R. PARIAUT C. DECOSNE-JUNOT M. HOGONNARD
DÉPART. DES PRODUCTIONS ANIMALES Zootechnie, Ethologie & Economie rurale Nutrition et alimentation Biol. & Patho de la reproduction Patho animaux de production		M. FRANCK J.P. DESCHANEL F. BADINAND P. BEZILLE	 M. RACHAIL-BRETIN T. ALOGINOUBA	D. GRANCHER L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON P. GUERIN S. MARTINOT R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND	A. DERNBURG (MCC) D. LAURENT (MCA)	L. MOUNIER	 S. BUFF N. GIRAUD P. DEBARNOT D. LAURENT
DÉPART. SCIENCES BIOLOGIQUES Physiologie/thérapeutique Biophysique/Biochimie Génétique et Biologie moléculaire Pharmacie/Toxicologie Législation du Médicament Bio-Mathématiques Langues	P. DELATOUR G. LORGUE	R. BOIVIN F. GARNIER G. KECK	E. BENOIT F. GRAIN P. JAUSSAUD	J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN 90% T. BURONFOSSE V. LAMBERT P. BERNY P. SABATIER M.I. DELIGNETTE 80% K. CHALVET-MONFRAY	 C. FARMER (IPAC) A. FAVIER (IPAC)		
DÉPART. HIPPIQUE Pathologie équine Clinique équine Expertise nécropsique		O. LEPAGE	J.L. CADORÉ C. FLEURY	A. LEBLOND A. BENAMOU-SMITH	E. CAUVIN (MCA)		

À Monsieur le Professeur SALLES
de la Faculté de Médecine de Lyon,

qui nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et
d'accepter la présidence du jury de notre thèse.

Hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur CHABANNE
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,

qui nous a accueilli en « 5^{ème} année » et nous a proposé ce travail.

Sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur CADORÉ
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,

qui nous a honoré en acceptant de juger notre travail et par sa
passion à nous transmettre son savoir.

En témoignage de notre profonde reconnaissance et admiration.

Au Docteur Frédérique PONCE
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,

pour ses conseils et son aide.

Sincères remerciements.

À CLAIRE

Mon Amour.

À MES PARENTS

L'avenir de leurs enfants a été pour eux une priorité. Je les remercie pour leur bonté, leur abnégation et leur tendresse.

Trouvez ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

À MA SOEUR

Qui a suivi les traces de son grand frère ! Bon courage.

À PAPI & MAMIE

Pour leur présence réconfortante.

À PÉPÈRE & MÉMÈRE

Votre souvenir m'accompagnera toujours.

À TOUTE MA FAMILLE

Actuelle et future...

À MES AMIS

Charlotte, Frisket pour toutes ces parties de « coinche »...
Cap'taine Fifi, pour son accueil au SVI !
Pala, sur qui on peut toujours compter.
Fiat & Christelle, dont l'accueil est toujours chaleureux.

Et tous les autres...

Sommaire

SOMMAIRE.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES	11
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ENCADRÉS.....	13
LISTE DES FIGURES	15
INTRODUCTION.....	19
I. RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE ET PHÉNOTYPE MDR.....	21
I.1. CONCEPT DE RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE.....	21
I.2. AGENTS CYTOTOXIQUES IMPLIQUÉS	22
I.3. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE.....	24
II. GLYCOPROTÉINE P ET RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE.....	49
II.1. HISTORIQUE	49
II.2. ALTÉRATIONS DES LIGNÉES CELLULAIRES MDR	50
II.3. GLYCOPROTÉINE P ET PHÉNOTYPE MDR CLASSIQUE.....	56
II.4. IMPORTANCE DE LA GLYCOPROTÉINE P DANS LA RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE	66
III. GLYCOPROTÉINE P : BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, RELATION STRUCTURE- FONCTION ET BIOCHIMIE	71
III.1. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET STRUCTURE DE LA GLYCOPROTÉINE P	71
III.2. RELATION STRUCTURE-FONCTION ET SITES DE LIAISON.....	95
III.3. BIOCHIMIE DE LA GLYCOPROTÉINE P.....	104
IV. GLYCOPROTÉINE P : RÔLE PHYSIOLOGIQUE ET IMPLICATION EN CANCÉROLOGIE CLINIQUE.....	119
IV.1. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA GLYCOPROTÉINE P.....	119
IV.2. EXPRESSION DE LA GLYCOPROTÉINE P PAR LES TISSUS TUMORAUX ET VALEUR PRONOSTIQUE.....	130
IV.3. RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DES GÈNES <i>MDR</i>	141

IV.4. MODULATION DU PHÉNOTYPE MDR ET POSSIBILITÉS DE TRAITEMENT	152
CONCLUSION	161
ANNEXE 1 LES PHASES DE L'ESSAI THÉRAPEUTIQUE	163
ANNEXE 2 QUELQUES MÉDICAMENTS MAJEURS EN CHIMIOTHÉRAPIE.....	165
ANNEXE 3 LA GLYCOPROTÉINE P CHEZ LE CHIEN.....	171
ANNEXE 4 MÉTHODES DE DÉTECTION EXPÉRIMENTALE DE LA GLYCOPROTÉINE P	177
GLOSSAIRE	183
TABLE DES MATIÈRES.....	187
BIBLIOGRAPHIE.....	193

Liste des abréviations utilisées

- § ABC : « *ATP binding cassette* »
- § ADN : acide désoxyribonucléique.
- § AGAT : O⁶-alkylguanine-ADN-alkyltransférase.
- § AMM : autorisation de mise sur le marché.
- § ARN : acide ribonucléique.
- § ARNm : ARN messager.
- § ARNp : ARN polymérase.
- § ARNr : ARN ribosomaux.
- § ARNt : ARN de transfert.
- § BCNU : carmustine (DCI), agent anticancéreux (voir Annexe 2, en page 165).
- § CCRF-CEM : lignée cellulaire lymphoïde humaine.
- § CFTR (pour « *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* ») : voir Glossaire.
- § CHL (pour « *chinese hamster lung* ») : poumon de hamster chinois (*Cricetulus griseus*).
- § CHO (pour « *chinese hamster ovary* ») : ovaire de hamster chinois (*Cricetulus griseus*).
- § CH^R : cellules résistantes à la colchicine isolées par LING et THOMSON [237], en 1974.
- § CIC : concentration intracellulaire.
- § CNITV : Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires.
- § DNR^R : cellules résistantes à la daunorubicine.
- § DOX : doxorubicine (=adriamycine) (voir Annexe 2, en page 165).
- § EEC : espace extracellulaire.
- § EIC : espace intracellulaire.
- § GSH : glutathion réduit.
- § GSSG : glutathion oxydé (glutathion bisulfure).
- § GST : glutathion-S-transférase.
- § HAT : histone acétyltransférase.
- § HDAC : histone désacétylase.
- § HeLa : cellules Helen Lansing (voir Glossaire).
- § HSE : « *heat shock element* ».
- § HSF : « *heat shock transcription factors* ».
- § HSR (pour « *homogeneously staining region* ») : Région de coloration homogène (de l'ADN).
- § K562 ; K562/DOX : cellules K562 (voir Glossaire).
- § KB : cellules KB (voir Glossaire).

- § **kb** : kilobases.
- § **kDa** : kilodaltons.
- § **LAL** : leucémie aiguë lymphoïde.
- § **LAM** : leucémie aiguë myéloïde.
- § **LLC** : leucémie lymphoïde chronique.
- § **LM** : lymphome malin.
- § **LMC** : leucémie myéloïde chronique.
- § **LMNH** : lymphome malin non-Hodgkinien.
- § **LRP** : lung resistance related protein (aussi appelée MVP).
- § **M** : molaire (voir Glossaire).
- § **m-AMSA** : amsacrine (N-[4-(9-acridinylamino)-3-méthoxyphényl]méthanesulfonamide)
- § **MAPk** (pour « *mitogen-activated protein kinase* ») : protéine kinase impliquée dans la signalisation cellulaire.
- § **MED-1** : pour « *multiple start site element downstream* ».
- § **mol** : mole (voir Glossaire).
- § **MRP** (pour « *multidrug resistance-associated protein* ») : protéine associée à la résistance multidrogue.
- § **MVP** (pour « *major vault protein* ») : Protéine « Vault ».
- § **pb** : paires de bases.
- § **PCR** : « *polymerase chain reaction* » ou « amplification en chaîne par polymérase » (ACP) (voir Glossaire).
- § **PKA** : protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique.
- § **PKC** : protéine kinase C.
- § **PMEA** : ou adéfovir PRÉVÉONND (9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine).
- § **RP/xxx** : résistance pléiotropique médiée par « xxx » (voir tableau 4 – abréviations utilisées pour les différents types de résistance pléiotropique, en page 27).
- § **RT-PCR** : « *reverse transcriptase polymerase chain reaction* » (voir Annexe 4, en page 177).
- § **SDS-PAGE** (pour « *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis* ») : gel utilisé pour l'électrophorèse des protéines.
- § **TSA** : trichostatin A (inhibiteur général et spécifique des HDAC).
- § **VAD** : Protocole de chimiothérapie utilisant la vincristine, l'adriamycine (= doxorubicine) et la dexamétasone.
- § **VCR** : vincristine.
- § **VIH** : virus de l'immunodéficience humaine.

Liste des tableaux

Tableau 1 – Anticancéreux et résistance croisée.....	22
Tableau 2 – Chimiorésistance de deux lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois.....	23
Tableau 3 – Médicaments anticancéreux impliqués selon la protéine responsable de la résistance.....	24
Tableau 4 – Abréviations utilisées pour les différents types de résistance pléiotropique.....	27
Tableau 5 – Expression de la MRP par les tissus cancéreux humains.....	33
Tableau 6 – La famille de gènes MRP.....	34
Tableau 7 – Les trois sous-familles de transporteurs ABC connues pour leur association avec la résistance pléiotropique.....	38
Tableau 8 – Détection d'une surexpression de la glycoprotéine P par différentes lignées cellulaires multichimiorésistantes.....	59
Tableau 9 – Résistance pléiotropique et degré d'amplification d'un fragment d'ADN de 1,1 kb dans différentes lignées cellulaires.....	63
Tableau 10 – Chimiorésistance, expression du gène MDR1 et de la glycoprotéine P dans des lignées cellulaires humaines KB multichimiorésistantes et des cellules transformantes.....	65
Tableau 11 – Classes de gènes amplifiés et surexprimés dans la lignée cellulaire CH ^F C5 d'ovaire de hamster chinois.....	66
Tableau 12 – La famille multigénique MDR.....	72
Tableau 13 – Position des segments transmembranaires de la glycoprotéine P.....	78
Tableau 14 – Liste des mutations de la glycoprotéine P chez l'homme, la souris et le hamster qui affecte la spécificité de substrat*.....	100
Tableau 15 – Substrats et modulateurs de la glycoprotéine P.....	105
Tableau 16 – Comparaison de la distribution tissulaire de la glycoprotéine P et de MRP1 chez le chien et chez l'homme.....	120
Tableau 17 – Immunomarquage des tissus sains chez le chien.....	121
Tableau 18 – Agents réversants du phénotype MDR.....	153
Tableau 19 – Réversion de la résistance pléiotropique in vivo (modèles murins).....	155
Tableau 20 – Effets potentiels de la modulation de la résistance pléiotropique sur les tissus normaux exprimant la glycoprotéine P. Incidence sur la pharmacocinétique des agents anticancéreux.....	159
Tableau 21 – Étapes de la découverte de quelques agents anticancéreux.....	165
Tableau 22 – Les antimétabolites.....	166
Tableau 23 – Les inhibiteurs de topoisomérases.....	167
Tableau 24 – Agents intercalant, électrophile et scindants.....	168
Tableau 25 – Les poisons du fuseau.....	169
Tableau 26 – Comparaison de l'immunomarquage de la gp-P sur des tissus néoplasiques canins avec trois anticorps.....	173
Tableau 27 – Épitopes reconnus et isoformes de la glycoprotéine P.....	178
Tableau 28 – Spécificité de séquence de l'anticorps MRK16.....	179
Tableau 29 – Séquences des acides aminés de la glycoprotéine P canine.....	180

Liste des encadrés

Encadré 1 – Les cholestases familiales fibrinogènes (PFIC).....	73
Encadré 2 – Transcription génique : quelques rappels.....	142

Liste des figures

Figure 1 – Éléments pouvant contribuer au phénomène de résistance pléiotropique.....	25
Figure 2 – Différences entre la vascularisation d'un tissu normal et celle d'un tissu tumoral.....	29
Figure 3 – Concentrations en oxygène et en médicament dans une région de tumeur solide.....	30
Figure 4 – Structure des organites « Vaults ».....	40
Figure 5 – Rôle possible de la LRP dans la chimiorésistance.....	40
Figure 6 – Effets de différents taux de mort cellulaire sur l'homéostasie cellulaire.....	46
Figure 7 – Taux d'assimilation de la colchicine en fonction de la résistance relative.....	52
Figure 8 – Accumulation de daunorubicine observée en fluorescence.....	53
Figure 9 – Détection de la glycoprotéine P dans des lignées résistantes à la daunorubicine.....	57
Figure 10 – Détection immunochimique de la glycoprotéine P dans des lignées daunorubicine-résistantes.....	57
Figure 11 – Structure de la vinblastine, de la ³ H-NABV et de la ¹²⁵ I-NASV.....	61
Figure 12 – Amplification de cinq classes de gènes dans neuf lignées cellulaires multichimiorésistantes.....	67
Figure 13 – Modèle structural de la glycoprotéine P humaine déduit de l'analyse de son profil d'hydrophatie.....	77
Figure 14 – Sites de glycosylation potentiels de la glycoprotéine P.....	78
Figure 15 – Organisation possible des domaines transmembranaires de la glycoprotéine P.....	79
Figure 16 – Schéma structural de la glycoprotéine P déduit des études de traduction in vitro en présence de microsomes.....	80
Figure 17 – Élaboration d'une glycoprotéine P « sans cystéine ».....	82
Figure 18 – Structure de l'alanine et de la cystéine.....	83
Figure 19 – Biotinylation et structure de la biotine.....	83
Figure 20 – Positions d'insertion de cystéines dans la glycoprotéine P.....	84
Figure 21 – Différents modèles proposés pour la topologie membranaire de la glycoprotéine P.....	86
Figure 22 – Structure de la glycoprotéine P en microscopie électronique.....	87
Figure 23 – Modèle de structure tridimensionnelle de la glycoprotéine P.....	88
Figure 24 – Arrangements proposés des 12 segments transmembranaires de la glycoprotéine P.....	89
Figure 25 – Modèle structural des doubles tonneaux b pour la glycoprotéine P.....	90
Figure 26 – Mutations ponctuelles de la glycoprotéine P.....	97
Figure 27 – Structure moléculaire de quelques composés utilisés pour le marquage de photoaffinité.....	102
Figure 28 – Localisation approximative des sites de liaison aux substrats de la glycoprotéine P.....	103
Figure 29 – Effets du vérapamil et de la progestérone sur la concentration intracellulaire de daunorubicine et l'activité ATPase de la glycoprotéine P.....	107
Figure 30 – Structures du vérapamil et de la vinblastine.....	107
Figure 31 – Structure de la progestérone.....	108
Figure 32 – Structures du vanadate et du phosphate inorganique.....	111
Figure 33 – Modèle de cycle catalytique pour la glycoprotéine P.....	115
Figure 34 – Mécanismes d'actions possibles de la glycoprotéine P.....	117
Figure 35 – Corrélation entre expression de gp-P intestinale et concentration plasmatique de digoxine.....	122
Figure 36 – Induction de l'expression de la gp-P par la rifampicine.....	122
Figure 37 – Vue schématique d'un capillaire cérébral.....	133
Figure 38 – Expression de la glycoprotéine P par le tissu cérébral sain et tumoral.....	134
Figure 39 – Promoteur et séquences régulatrices d'amont du gène MDR1.....	144
Figure 40 – Représentation fonctionnelle simplifiée de la glycoprotéine P.....	152
Figure 41 – Localisation des épitopes reconnus par les anticorps C219, C494 et C32.....	178

Étude bibliographique
de l'expression du phénotype MDR
dans l'espèce humaine et canine.

INTRODUCTION

Le cancer par l'importance du nombre de personnes qu'il atteint constitue un problème majeur de santé publique. Les tumeurs bénignes peuvent être distinguées du cancer au sens strict : une *tumeur bénigne* est caractérisée par un aspect bien limitée, éventuellement par une capsule. Elle reproduit l'aspect du tissu d'origine, il n'y a aucun envahissement local, il n'y a pas de métastase à distance. Au contraire, un *cancer* s'oppose à la tumeur bénigne, car il est mal limité, bouleverse l'aspect du tissu d'origine, l'envahit localement et donne des métastases à distance.

La survenue dans un organisme d'une tumeur cancéreuse (oncogénèse) est liée à l'émergence d'un clone cellulaire échappant aux lois qui régissent la prolifération et la cohabitation cellulaire. La cellule cancéreuse se caractérise par deux propriétés fondamentales :

9 la capacité à se reproduire au delà des limites fixées par le renouvellement naturel du tissu auquel elle appartient (perte de l'inhibition de contact) ;

9 le pouvoir de coloniser des territoires tissulaires normalement réservés à d'autres catégories cellulaires.

L'anomalie responsable de la transformation cancéreuse, virale ou non, est transmissible par division cellulaire et consiste en une altération majeure de l'information génétique, c'est à dire une mutation de l'ADN.

Les trois types de traitement en cancérologie sont : la *chirurgie*, la *radiothérapie* et la *chimiothérapie*. La première activité anticancéreuse d'une drogue a été mise en évidence au cours de la deuxième guerre mondiale : l'exposition accidentelle à du gaz moutarde (précurseur de la moutarde à l'azote) a entraîné des syndromes aplasiques avec thrombopénie. En 1942, pour la première fois, une courte rémission chez un malade porteur de lymphome a été observée. A partir de 1943, la découverte de nouveaux agents anticancéreux a été de plus en plus rapide.

La **chimiothérapie** est l'utilisation de médicaments interférant dans le métabolisme et la vie cellulaire et qui, de ce fait, sont cytotoxiques : c'est par ce mécanisme que la chimiothérapie permet d'inhiber la croissance tumorale. Le terme de chimiothérapie paraît en lui-même mal adapté : on devrait parler de médicaments anticancéreux.

La chimiothérapie occupe désormais une place centrale dans le traitement des cancers puisqu'elle a pour objet non seulement de réduire le volume de la masse tumorale primaire, mais aussi d'éliminer la maladie circulante et métastatique. Cependant, en dépit du

développement des traitements peu de cancers avancés sont curables par la seule chimiothérapie.

Le nombre important de médicaments anticancéreux et l'importance des réponses obtenues devraient permettre de guérir tous les cancers. Or, il n'en est rien, très rapidement va s'installer une **résistance aux médicaments**. Dans son expression clinique, la chimiorésistance peut se définir comme la capacité des cellules cancéreuses à survivre à l'exposition d'agents cytotoxiques lorsqu'ils sont administrés à la dose maximale tolérable pour les tissus normaux.

Dans certains cas, une résistance multiple peut s'établir vis à vis de différents agents anticancéreux : c'est la **résistance pléiotropique** ou « *multidroque* ». L'objectif de notre travail a tout d'abord été de mettre en évidence, chez le chien, l'existence d'une protéine (la « *glycoprotéine P* ») souvent rencontrée chez l'homme lors de résistance pléiotropique. L'existence d'une telle protéine chez le chien permettrait l'utilisation de cette espèce en tant que modèle d'étude, plus particulièrement dans le cas du lymphome malin canin. Cette protéine a été mise en évidence par différents auteurs durant la réalisation de notre travail (III.1.1.1 Famille multigénique *MDR*, en page 71 et Annexe 3 : La glycoprotéine P chez le chien, en page 171). Nous nous sommes donc orientés vers une étude bibliographique des connaissances concernant la résistance pléiotropique et la glycoprotéine P chez l'homme et chez le chien.

Dans ce travail, nous définirons tout d'abord le phénomène de résistance pléiotropique, pour nous intéresser ensuite à la place du phénotype MDR dit « *classique* » (faisant intervenir la glycoprotéine P). Dans une troisième partie nous présenterons l'état actuel des connaissances concernant la biochimie de la glycoprotéine P et son mécanisme d'action, puis nous exposerons l'implication de cette glycoprotéine P en cancérologie.

I. RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE ET PHÉNOTYPE MDR

I.1. Concept de résistance pléiotropique

Le développement empirique des associations thérapeutiques a permis d'incontestables progrès dans le traitement des cancers, mais il reste de nombreuses situations d'échec [18, 27, 268] :

9 Les tumeurs épithéliales primitives ou métastatiques comme les cancers du rein, du foie, du colon ainsi que les tumeurs pulmonaires à petites cellules, sont souvent d'emblée majoritairement réfractaires au traitement. Cette **résistance** est définie comme : **naturelle**, **de novo** ou encore **intrinsèque**.

9 Dans le cas des tumeurs où l'efficacité de la chimiothérapie est la plus nette (principalement les tumeurs hématologiques), l'obtention d'une rémission complète est de façon significative, marquée par son caractère temporaire. Lors de rechutes, le traitement est généralement inefficace. Cette **résistance** est définie comme : **acquise**.

Depuis la découverte des premières substances anticancéreuses, de nombreux travaux de recherche ont eu pour but l'identification des mécanismes responsables de chimiorésistance. C'est à partir de cultures cellulaires *in vitro*, cultivées en présence d'anticancéreux que les biologistes ont identifié des mécanismes de résistance cellulaire [27].

Historiquement, le premier mécanisme identifié est l'hyperproduction de la dihydrofolate réductase, enzyme cible du méthotrexate : la cellule cancéreuse répond à l'intoxication médicamenteuse par une hyper-production de la cible [349].

La notion de **résistance pléiotropique** ou MDR (« *multidrug resistance*») est née des travaux déjà anciens de BIEDLER et RIEHM [31]. Dans cette étude, les auteurs démontrent l'existence d'une résistance croisée entre la dactinomycine et d'autres composés chimiques.

D'un point de vue théorique, la résistance des cellules à plusieurs agents toxiques de structure et de mécanisme d'action différents peut s'expliquer [18] :

9 par l'addition de **différents mécanismes** de résistance, chacun étant spécifique de l'un des agents cytotoxiques employés ;

9 ou par l'existence **d'un seul mécanisme** pouvant rendre compte de la résistance des cellules à plusieurs agents antitumoraux.

Ce sont ces mécanismes que nous désignons sous le terme de résistance pléiotropique et que nous allons détailler.

La **résistance pléiotropique** est donc la faculté que possèdent certaines cellules à présenter une résistance croisée à des agents cytotoxiques de structures différentes. Ces agents peuvent posséder différents mécanismes d'action. [18, 141]

I.2. Agents cytotoxiques impliqués

Les anticancéreux affectés par la résistance pléiotropique sont nombreux, mais la fréquence de leur implication dans le phénomène de résistance croisée (voir tableau 1, ci-dessous) ainsi que les cibles moléculaires visées par ces agents cytotoxiques sont variables. Citons par exemple [419] :

- 9 le *fuseau* pour les alcaloïdes de la pervenche et la colchicine ;
- 9 la synthèse de l'ADN et de l'ARN pour la dactinomycine ;
- 9 la *topoisomérase II* pour les anthracyclines et les épipodophyllotoxines ;
- 9 l'*ADN* pour le melphalan.

Tableau 1 – Anticancéreux et résistance croisée
(d'après GERLACH et al. [131])

Résistance croisée		
Fréquente	Moins fréquente	Rare ou non décrite
Anthracyclines Vinca-alcaloïdes Épipodophyllotoxines Dactinomycine Paclitaxel Maytansine	Agents alkylants (melphalan, moutardes à l'azote, mitomycine) Méthotrexate	Bléomycine Cisplatine

Un des seuls points communs de ces médicaments est d'être des substances lipophiles d'origine naturelle : anthracyclines (doxorubicine par exemple), poisons du fuseau (vincristine et vinblastine, dactinomycine) [27]. Généralement, ces molécules sont amphiphiles [367] et possèdent au moins un cycle aromatique, leur masse moléculaire est comprise entre 100 et 2000 Da. Bien que la résistance pléiotropique semble être peu

discriminante, des changements mineurs de la structure moléculaire des substances concernées peuvent modifier la **résistance relative**¹ [22].

Les lignées cellulaires MDR montrent des différences de résistance croisée en fonction des médicaments. Le tableau 2, ci-dessous, illustre ceci par 2 exemples. Habituellement, le niveau de résistance obtenu est plus élevé vis à vis de la molécule sélectionnante. Cette règle n'est toutefois pas sans exceptions. Par exemple, la résistance relative de la lignée cellulaire CH^RC5 d'ovaire de hamster chinois — sélectionnée pour leur résistance par la colchicine (180 fois) — est plus élevée vis à vis de la gramicidine (environ 5000 fois), molécule structurellement éloignée de la colchicine, alors qu'elle est plus faible vis à vis du colcémide (16 fois), composé structurellement analogue à la colchicine [131]. Le phénomène conduisant à une augmentation de la chimiosensibilité est appelé **sensibilité collatérale**. Un tel phénomène est aussi observé avec les anesthésiques locaux, certains stéroïdes et l'acronycine [237].

Tableau 2 – Chimiorésistance de deux lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois
(d'après LING *et al.* [236])

Molécule	Résistance relative	
	CH ^R C5 (sélectionnée par colchicine)	DNR ^R 51 (sélectionnée par daunorubicine)
Colchicine	180	25
Puromycine	100	38
Daunorubicine	76	41
Paclitaxel	20	5
Vinblastine	30	22
Émétine	29	11
Doxorubicine	25	30
Melphalan	4-15	Non testé
Désoxycorticostérone	0,1	Non testé
1-déshydrotestostérone	0,1	1
Acronycine	<0,06	0,6
Triton [®] X-100	0,3	Non testé

¹ Résistance relative : elle est calculée par la concentration de médicaments nécessaire pour inhiber la croissance (réduction de 50% en 48 heures) de la lignée cellulaire résistante rapportée à la concentration nécessaire requise pour la même inhibition de la lignée cellulaire souche. La résistance croisée est définie par des valeurs supérieures à 1 et la sensibilité collatérale par des valeurs inférieures à 1.

La résistance croisée peut aussi varier entre des lignées cellulaires sélectionnées à partir de la même lignée parentale et avec le même anticancéreux. Ce phénomène laisse supposer qu'un « facteur chance » est impliqué dans l'obtention du spectre de résistance croisée [22, 237].

La sensibilité aux composés hydrophiles comme le sulfate de bléomycine et le cisplatine est généralement inchangée et, inversement, des lignées cellulaires sélectionnées avec des agents alkylants (composés hydrophiles) ne présentent pas de résistance croisée à la doxorubicine ou la vincristine (composés lipophiles) [419].

Selon le type de résistance rencontrée, les substances impliquées sont différentes (voir tableau 3, ci-dessous).

Tableau 3 – Médicaments anticancéreux impliqués selon la protéine responsable de la résistance
(d'après VOLM M. [428])

	Doxorubicine	Colchicine	Dactinomycine	Daunorubicine	Étoposide	Mitomycine	Ténioposide	Vinblastine	Vincristine	Vindésine	Chlorambucil	Cisplatine	Cyclophosphamide	Melphalan	Mitoxantrone	Nitroso-urée	Amsacrine	Fluoro-uracil	Méthotrexate	Procarbazine	
Glycoprotéine P	ü	ü	ü	ü	ü	ü	ü	ü	ü	ü											
Glutathion S-transférase	ü		ü		ü						ü	ü	ü	ü	ü	ü					
Topoisomérase	ü		ü		ü		ü								ü		ü				
Thymidylate synthétase	ü											ü						ü	ü		
Métallothionéine	ü										ü	ü		ü							
Dyhydrofolate réductase																			ü		
O6-alkylguanine-ADN-transférase													ü			ü					ü

I.3. Mécanismes de résistance pléiotropique

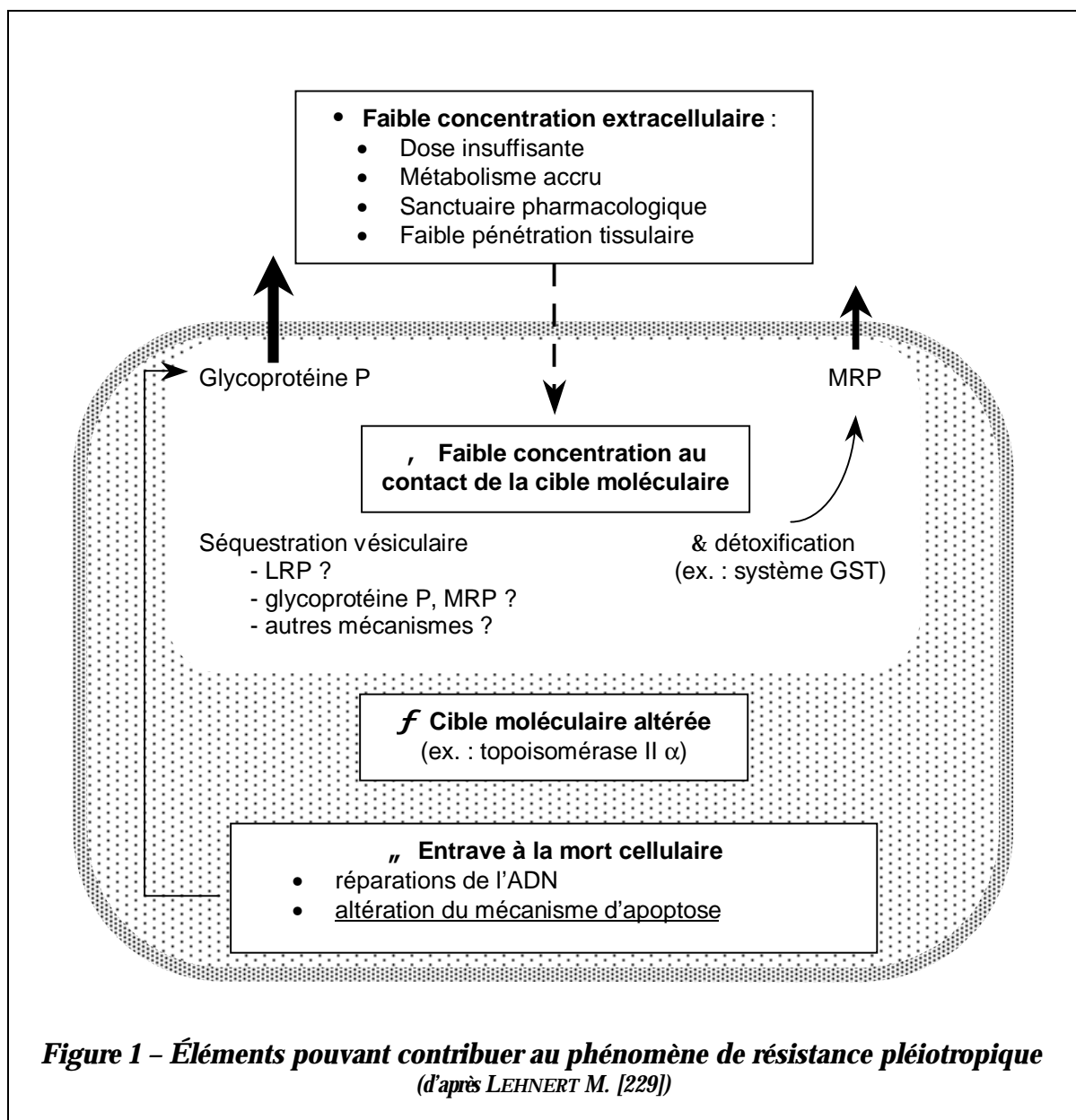
Lors du traitement d'un patient avec un agent cytotoxique, l'objectif pharmacologique est de délivrer une quantité maximale d'agent actif à proximité de la cible moléculaire visée

afin d'induire la mort des cellules cancéreuses. L'action des antinéoplasiques sur leur cible moléculaire peut être modulée à différentes étapes (figure 1, ci-dessous) [229] :

9 **En amont de la cible moléculaire** • , : par une réduction de la disponibilité de composé actif, aussi bien au niveau intracellulaire qu'extracellulaire.

9 **Au moment de l'interaction avec la cible moléculaire** f : par une diminution de la disponibilité de la cible empêchant ainsi le médicament de produire des dommages suffisants.

9 **En aval de la cible moléculaire** „ : par une réduction ou une suppression de l'effet létal des dommages moléculaires provoqués par l'anticancéreux.



Les différents mécanismes de résistance pléiotropique identifiés à ce jour peuvent concerner [15, 18, 27, 61, 229] :

- Le métabolisme activateur ou inactivateur des agents cytotoxiques , (ex. : système glutathion/ glutathion-S-transférase) ;
- Des modifications des protéines ou enzymes cibles f , entraînant une diminution de leur sensibilité aux agents cytotoxiques ;
- Une augmentation de l'activité de réparation de l'ADN „ ;
- Une régulation négative du signal de mort cellulaire en aval de l'interaction drogue / cible „ ;
- Une séquestration vésiculaire des antinéoplasiques , (surexpression de la LRP « *Lung Resistance Protein* ») ;
- Le transport transmembranaire , (ex. : glycoprotéine P, MRP).

Différentes études ont montré que tous ces mécanismes peuvent être rencontrés chez l'homme et que certains ont été associés à de mauvais résultats thérapeutiques [12, 20, 55, 141, 186, 205, 231, 295, 305, 425].

Le tableau 4 (en page 27) reprend les abréviations proposées par LEHNERT [229] et leurs traductions que nous utiliserons dans ce travail pour désigner les différents mécanismes de résistance pléiotropique.

Il existe des divergences à propos de l'utilisation du sigle MDR (« *multidrug resistance* »). Ce sigle, seul, ne devrait être utilisé que pour désigner un phénotype permettant une résistance croisée à de multiples substances différentes par leur structure, **sans** impliquer de mécanisme de résistance en particulier.

Les termes apoptosis-MDR et clinical-MDR sont introduits par LEHNERT [229].

Tableau 4 – Abréviations utilisées pour les différents types de résistance pléiotropique
(adapté d'après LEHNERT M. [229])

Abréviations	Mécanisme	Caractéristiques
Pgp-MDR RP/gp-P	Surexpression du gène <i>MDR1</i> .	Résistance à des médicaments d'origine naturelle dont la structure et le mécanisme d'action diffèrent. Réduction de l'accumulation de médicament due à un pompage actif. La réversion est possible par des composés tels que le vérapamil ou la ciclosporine.
MRP-MDR RP/MRP	Surexpression de la protéine MRP.	Phénotype de résistance similaire à RP/gp-P mais résistance aux taxanes plus faible. Les cations amphiphiles doivent être conjugués avant le transport. Faible activité des inhibiteurs habituels de la glycoprotéine P.
LRP-MDR RP/LRP	Surexpression de la protéine LRP	Séquestration vésiculaire des xénobiotiques ?
Topo II-MDR RP/TopoII	Diminution de la teneur en topoisomérase II α ou de son activité.	Résistance uniquement vis à vis des médicaments ayant pour cible la topoisomérase II (médicaments différant par leur structure mais non par leur fonction).
GSH-MDR RP/GSH	Augmentation de la teneur en GSH et/ou augmentation de l'activité du système GSH S-transférase.	Résistance à : melphalan, cyclophosphamide, chlorambucil, BCNU, thiotépa (et peut-être d'autres composés comme le cisplatine ou la doxorubicine). Augmentation de la phase II du métabolisme de ces composés.
Apoptosis-MDR RP/apoptose	Altération du mécanisme d'apoptose.	Résistance à la plupart (voire tous ?) des agents cytotoxiques.
Clinical-MDR RP/clinique	Elle peut être multifactorielle ; des mécanismes extracellulaires sont possibles.	Résistance clinique à de multiples agents cytotoxiques qui diffèrent par leur structure et, éventuellement, par leur fonction.

I.3.1. Résistance en amont de la cible moléculaire

Pratiquement tous les agents cytotoxiques concernés par le phénomène de résistance pléiotropique pénètrent dans les cellules cancéreuses par diffusion passive au travers de la membrane plasmique, selon un gradient de concentration [229].

En conséquence, la concentration extracellulaire est le déterminant majeur de la pénétration cellulaire des antinéoplasiques. Différents facteurs peuvent empêcher l'obtention d'une concentration adéquate en substance active, nous pouvons les répartir en facteurs tissulaires, membranaires ou cytoplasmiques.

I.3.1.1. Facteurs tissulaires

Pour de nombreuses tumeurs, la relation entre dose et activité clinique d'un agent cytotoxique a déjà été démontrée. Pourtant, nous savons d'après des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques qu'une même dose peut entraîner des concentrations plasmatiques ou des effets secondaires très variables selon les patients.

Une des raisons de cette variabilité est la différence de métabolisme hépatique selon les médicaments. Cette variabilité pouvant être due, par exemple, au polymorphisme d'enzymes telles que les cytochromes P450 ou les glutathion S-transférases (GST) [376].

Cependant, d'autres facteurs peuvent intervenir. En effet, la physiologie d'une cellule cancéreuse est très différente selon qu'elle se trouve au sein d'une tumeur solide ou dans un flacon de culture [41]. La vascularisation tumorale conditionne, de façon plus ou moins homogène, l'accès des médicaments aux cellules cancéreuses. Les médicaments doivent franchir de multiples barrières (anatomiques ou physiologiques) de diffusion : l'endothélium, les couches cohérentes de cellules cancéreuses et la pression interstitielle élevée, par exemple [61, 394].

a. Barrière hémato-encéphalique [27, 229,353]

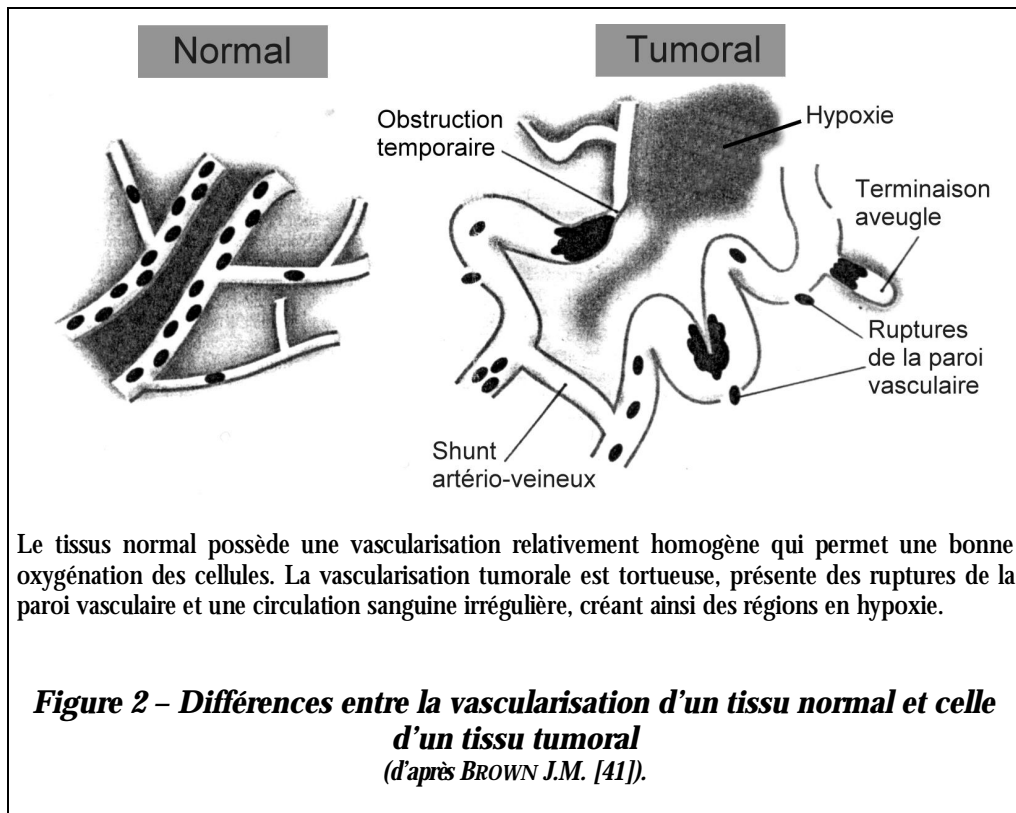
De nombreux médicaments anticancéreux ne sont pas capables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, le système nerveux central (SNC) est habituellement considéré comme un « sanctuaire pharmacologique » : les médicaments anticancéreux ne peuvent pas pénétrer. Il est donc possible que des cancers connus pour être nettement chimiosensibles, tels que les leucémies aiguës ou les lymphomes malins ne répondent pas à un traitement anticancéreux systémique lors d'une localisation dans le SNC. SCHINKEL *et al.* [353] a montré, chez la souris, que la glycoprotéine P, codée par le gène murin *mMdr1a* (voir III.1.1.1 Famille multigénique *MDR*, en page 71), tient un rôle important dans la protection du SNC vis à vis des toxiques, incluant les agents cytotoxiques tels que la vinblastine.

<p>Dans ce cas, ce sont des propriétés tissulaires intrinsèques qui empêche l'agent anticancéreux d'atteindre une concentration suffisante à proximité de la cible.</p>

b. *Vascularisation et tissu interstitiel [229]*

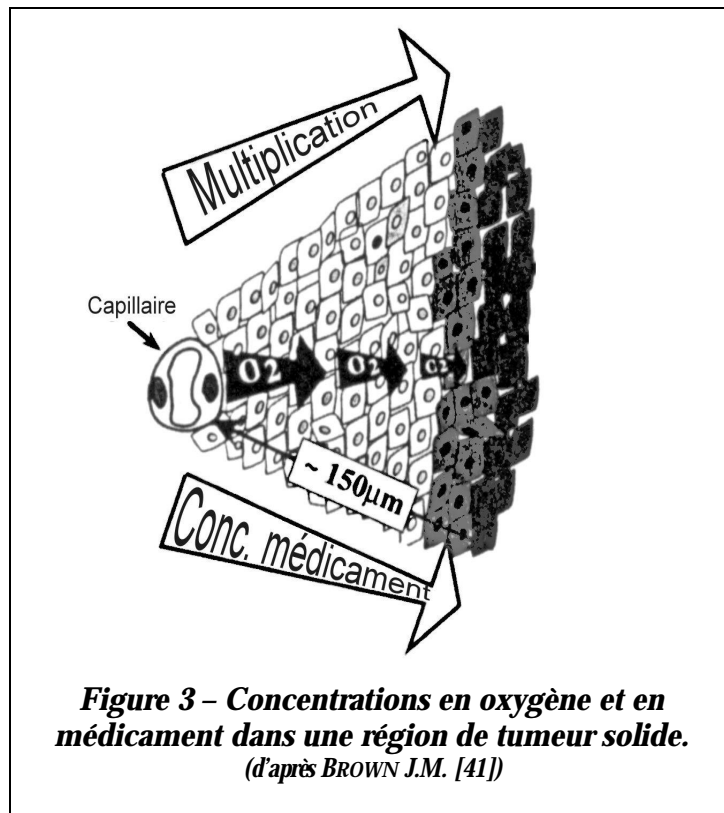
Ces deux facteurs peuvent intervenir particulièrement dans le cas des tumeurs solides [394]. Après avoir quitté les vaisseaux capillaires de la tumeur, le médicament anticancéreux doit atteindre les cellules tumorales par diffusion passive.

La tumeur peut être **faiblement vascularisée**, augmentant ainsi la distance entre les capillaires et les cellules tumorales (figure 2, ci-dessous).



Le tissu interstitiel peut être riche en **structures denses** comme le collagène ; c'est le cas par exemple de certains carcinomes ou du tissu cicatriciel (après une radiothérapie ou une chirurgie).

Dans ces deux cas, **l'obtention d'une concentration suffisante à proximité de la cible est plus difficile** (figure 3, en page 30).



Toutefois, les capacités de diffusion tissulaires des médicaments employés interviennent aussi [376] : le fluoro-uracil (5 FU) et le cisplatine pénètrent mieux dans une tumeur solide que des molécules plus grosses et ionisées telles que les anthracyclines ou les alcaloïdes de la pervenche.

Les tumeurs de la face et du cou sont un exemple des effets négatifs que peut avoir la difficulté de pénétration des médicaments anticancéreux sur les résultats de la chimiothérapie. Si la chimiothérapie est effectuée avant tout traitement local, on observe un taux de réponse au traitement de plus de 90 %, avec un nombre significatif de rémissions complètes. À l'opposé, chez des patients présentant une rechute tumorale dans une zone préalablement traitée par chirurgie ou radiothérapie (i.e. une zone cicatricielle), le taux de réponse à un même protocole de chimiothérapie est d'environ 20 à 30 % [331].

Dans ces deux derniers cas, les **propriétés tissulaires** à l'origine de la chimiorésistance ne sont pas inhérentes au tissu — comme dans le cas de la barrière hémato-encéphalique — mais **résultent de modifications liées à la présence de la tumeur.**

I.3.1.2. Facteurs membranaires

La première ligne de défense que les agents anticancéreux peuvent rencontrer au moment de leur pénétration dans les cellules tumorales est la présence de pompes transmembranaires telles que la glycoprotéine P ou la MRP (« *Multidrug Resistance-associated Protein* »). La présence de ces glycoprotéines confère le phénotype MDR.

a. *Glycoprotéine P*

L'effet de pompes transmembranaires comme la glycoprotéine P, est déterminé principalement par deux variables [229] :

9 La **densité de la glycoprotéine P** dans la membrane cellulaire et son activité dépendant de facteurs tels que la production cellulaire d'ATP ou de l'état de phosphorylation de la glycoprotéine P (voir III.1.3.2. Modifications post-traductionnelles, en page 92).

9 La **quantité de molécules médicamenteuses** à extraire de la cellule, dépendant principalement de la concentration extracellulaire. Cependant, quelle que soit la densité de la glycoprotéine P, il a été montré qu'au-delà d'une certaine concentration extracellulaire, une quantité suffisante d'agent anticancéreux s'accumule dans le cytoplasme et induit la cytolyse cellulaire.

In vivo, les taux de surexpression de la glycoprotéine P sont ordinairement faibles en comparaison avec ceux des lignées cellulaires expérimentales exprimant la glycoprotéine P. En conséquence, des différences plutôt mineures de concentration extracellulaire en agent anticancéreux peuvent déterminer si la glycoprotéine P est capable d'empêcher la mort cellulaire.

b. *MRP («Multidrug Resistance-associated Proteins »)*

La glycoprotéine P n'est pas toujours détectée dans les lignées cellulaires présentant un phénotype MDR évident, caractérisé par un efflux actif des anthracyclines et des *vinca-alcaloïdes* [61, 222].

Par exemple, dans l'espèce humaine, la lignée cellulaire H69AR de tumeur pulmonaire sélectionnée par la doxorubicine est résistante à beaucoup d'anticancéreux mais n'exprime pas la glycoprotéine P. En 1992, COLE *et al.* [71] ont isolé à partir de la lignée H69AR l'ADNc correspondant à l'ARNm surexprimé par cette lignée. Une protéine membranaire, la MRP

codée par un gène localisé sur la bande p13.1 du chromosome 16 (*MRP1*), est désignée comme responsable de la résistance pléiotropique de cette lignée.

Une étude de GRANT *et al.* [144] utilisant la transgénèse démontre que la surexpression de cette protéine confère aux cellules transfectées un phénotype de résistance pléiotropique.

≈ Protéine MRP ou MRP1

La protéine MRP1, d'une masse moléculaire de 190 kDa, est composée de 1531 acides aminés [241]. Elle appartient, comme la glycoprotéine P, à la *superfamille ABC des transporteurs membranaires consommateurs d'ATP*¹ [61, 230, 322, 444]. Les travaux de ZAMAN *et al.* [448] montrent que la MRP1 est remarquablement similaire à la glycoprotéine P :

9 Elle provoque, comme la glycoprotéine P, une résistance à des médicaments hydrophobes.

9 La MRP1 est principalement retrouvée dans la membrane plasmique [118]. Elle est aussi présente dans celle du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi.

9 La diminution de concentration intracellulaire induite par la MRP1 peut être annulée par une perméabilisation de la membrane plasmique.

9 La MRP1 peut augmenter l'efflux des médicaments des cellules.

Ainsi, la MRP1 agit comme un transporteur membranaire pompant les médicaments contre le gradient de concentration. Ce transport est un transport actif utilisant l'ATP [448] comme dans le cas de la glycoprotéine P.

Une corrélation fortement positive a été observée entre l'expression de la MRP1 et celle de la glycoprotéine P [434]. La MRP1 serait exprimée à des taux faibles par de nombreux tissus humains normaux [295]. Cette protéine est présente dans le placenta, les testicules, les muscles squelettiques, le cœur, les monocytes et le foie [222].

L'expression de cette protéine par des tissus tumoraux humains a été étudiée par NOOTER *et al.* [295]. Les auteurs ont réparti les échantillons (n=350) en 3 groupes selon l'intensité de l'expression de la protéine MRP1 (voir tableau 5, en page 33). Dans cette étude, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre une hyperexpression de la protéine MRP1 et le fait que les patients aient subi une chimiothérapie préalable.

¹ Voir Glossaire, en page 183.

Tableau 5 – Expression de la MRP par les tissus cancéreux humains
(d'après NOOTER K. [295])

<p>Groupe 1 <i>Forte expression de la MRP, fréquemment</i></p>	<p>Leucémie lymphoïde chronique Leucémie à prolymphocyte</p>
<p>Groupe 2 <i>Forte expression de la MRP, occasionnellement</i></p>	<p>Carcinome épidermoïde œsophagien Carcinome pulmonaire à grandes cellules Leucémie myéloïde aiguë</p>
<p>Groupe 3 <i>Faible expression de la MRP généralement</i></p>	<p>Leucémie à tricholeucocytes Leucémie myéloïde chronique Lymphome malin non-Hodgkinien Myélome multiple Leucémie lymphoïde aiguë Sarcomes des tissus mous</p>

Étant donné la différence entre les séquences codant ces protéines — l'homologie entre la protéine MRP et la glycoprotéine P n'est que de 15% [71, 144] —, le spectre de chimiorésistance dû à ces deux protéines est remarquablement similaire. Ces 2 protéines peuvent induire une chimiorésistance aux anthracyclines (doxorubicine et doxorubicine), aux alcaloïdes de la pervenche (vincristine et vinblastine) [302] et aux épipodophyllotoxines (étoposide et téniposide) [222].

Il existe néanmoins des différences remarquables entre la glycoprotéine P et la MRP1 :

9 l'efflux des anticancéreux dû à la MRP1 n'est pas inhibé par le vérapamil ou la ciclosporine alors qu'il est inhibé par le probénécide [426] ;

9 le paclitaxel ne serait pas concerné par la résistance liée à l'expression du gène *MRP1* [40]. En revanche, la MRP1 est capable de transporter des molécules telles que le méthotrexate ou l'arsenite [36].

L'expression uniforme de la protéine MRP1 par les tissus humains normaux incite à penser que la MRP1 possède un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire. Il a été démontré que la protéine MRP1 est une pompe transmembranaire énergie dépendante permettant de transporter le leucotriène C4 conjugué au glutathion [188, 230, 290], évoquant un rôle de détoxification cellulaire.

ZAMAN *et al.* [449] montrent que le glutathion est nécessaire à l'élimination cellulaire de la daunorubicine par la protéine MRP1. Différentes études [230, 290] démontrent que la surexpression du gène *MRP1* dans les cellules tumorales entraîne une augmentation ATP-

dépendante de l'élimination des dérivés conjugués au glutathion. Ces différentes études permettent de définir la protéine MRP1 comme une pompe GS-X (pour « *Glutathione S-conjugate export* ») [180, 181]. La pompe GS-X est une pompe ATP-dépendante permettant l'efflux d'anions organiques, tels que les leucotriènes, le glutathion oxydé (GSSG) et les conjugués du glutathion. Cette pompe a un rôle physiologique important dans l'inflammation, les stress oxydatifs, le métabolisme des xénobiotiques et la chimiorésistance [179, 180, 181].

La MRP1 serait aussi responsable de la séquestration délétère des médicaments anticancéreux dans des organites cellulaires tels que l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique [40].

≈ Famille de protéines MRP

Il sera découvert par la suite que le gène *MRP1* [230] possède des gènes homologues. Nous parlerons donc d'une famille de gène *MRP*. Cette famille de gène comporte au moins 7 membres (voir tableau 6, ci-dessous) : *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP4*, *MRP5*, *MRP6* et *MRP7* [35, 217, 241]. Deux nouveaux membres ont identifiés très récemment correspondant aux protéines MRP8 et MRP9 [241]. Ces deux protéines sont encore mal connues.

Tableau 6 – La famille de gènes MRP
(adapté d'après KUWANO M. [222])

Gène	Protéine	Localisation chromosomique	Taille (kb)	Expression
<i>MRP1</i>	MRP1	16p13.1	6,5	Testicule, muscle squelettique, cœur, langue
<i>MRP2</i>	MRP2	10q24	6,5-7	Foie, duodénum, (rein) ¹
<i>MRP3</i> [409, 450]	MRP3	17q22	6,6	Foie, duodénum, surrénales, colon, prostate, (pancréas)
<i>MRP4</i> [228]	MRP4	13q32	6,5	(pancréas, muscles squelettiques, langue, reins, vessie)
<i>MRP5</i> [271, 437]	MRP5	3q25-26	7	Glande mammaire, muscle squelettique, pancréas, hypothalamus
<i>MRP6</i> [218, 317]	MRP6	16p13.1	6,5-7	Foie, reins, (Pancréas)
<i>MRP7</i> [36, 198]	MRP7	6p21	?	Cœur, foie, muscle squelettique, reins

¹ les parenthèses indiquent une faible expression

Ä Protéine MRP2

La protéine **MRP2** [217] a tout d'abord été connue sous le nom de transporteur d'anion organique multispécifique (cMOAT « *canalicular Multispecific Organic Anion Transporter*»), présent dans les canalicules hépatiques.

Cette protéine est impliquée dans l'excrétion hépatobiliaire d'un grand nombre d'anions organiques et sa spécificité de substrats est très similaire à celle de la MRP1 [189]. La MRP2 est indispensable à la sécrétion de la bilirubine conjuguée dans les canalicules biliaires. Des mutations du gènes **MRP2** sont à l'origine du syndrome de Dubin-Johnson¹ [346]. Cette protéine posséderait un rôle dans la chimiorésistance vis à vis de divers antinéoplasiques comme le cisplatine, l'étoposide, la vincristine et le méthotrexate [437].

Ä Protéine MRP3

Cette protéine est aussi un transporteur d'anion organique multispécifique [219] mais, de toutes les protéines MRP, la **MRP3** est celle qui est la plus proche homologue de la protéine MRP1 [219, 346]. Une étude de YOUNG *et al.* [444], réalisée sur des cellules de cancer pulmonaires issues de patients humains, a démontré la corrélation entre la chimiorésistance à la doxorubicine et l'expression des protéines MRP1 et MRP3. Cette étude n'a pas démontré de corrélation entre chimiorésistance et expression des protéines MRP2, MRP4 et MRP5.

Différentes études [219, 450] ont confirmé l'implication de la MRP3 dans la chimiorésistance, notamment à l'étoposide, la vincristine et le méthotrexate [437].

Ä Protéine MRP4

Concernant les protéines **MRP4** et MRP5, il n'a pas été trouvé de modification majeure dans leur expression sur les cellules résistantes à la doxorubicine ou au cisplatine [217]. Toutefois, de récentes études [354, 437] ont décrit une implication de ces protéines dans le transport d'analogues de nucléosides [346]. SHUETZ *et al.* [354] ont décrit l'existence d'un rôle de la MRP4 dans la résistance à des antiviraux comme le PMEA (ou adéfovir), le PMEG ou l'AZT, bien connus pour leur utilisation dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

¹ Le syndrome de Dubin-Johnson est un ictère héréditaire de l'adulte à bilirubine principalement conjuguée. Cette maladie est totalement bénigne.

LEE *et al.* [228] ont récemment étudié le profil de chimiorésistance lié à la protéine MRP4. Leur étude confirme la résistance au PMEPA. Ces auteurs ont mis en évidence que, suite à une exposition de courte durée au méthotrexate, la transfection du gène *MRP4* provoque une chimiorésistance à ce composé. En revanche, cette résistance n'est pas constatée lorsque l'exposition au méthotrexate ou à d'autres agents cytotoxiques naturels (anthracyclines, étoposides, *vinca-alkaloïdes*, paclitaxel) est continue.

Le rôle de la protéine MRP4 dans la résistance au méthotrexate est confirmé récemment par CHEN *et al.* [64].

Ä Protéine MRP5

MCALEER *et al.* [271] ont décrit une corrélation significative entre la surexpression de la protéine MRP5 et une résistance faible à des composés comme le CdCl₂ ou l'antimonyl-tartrate de potassium [271, 346]. WIJNHOLDS [437] a récemment démontré que MRP5 était un transporteur multispécifique d'anions organiques (MOAT) ayant le pouvoir remarquable de provoquer une résistance aux analogues de bases azotées ou de nucléotides. La protéine MRP5 peut entraîner une chimiorésistance à des médicaments anticancéreux comme la 6-mercaptopurine et à des antiviraux comme la PMEPA. La fonction physiologique de la MRP5 n'est toujours pas connue.

Ä Protéine MRP6

D'après KOOL *et al.* [218], la protéine MRP6 n'aurait pas de rôle dans la chimiorésistance et serait seulement co-exprimée avec la MRP1 dont le gène est proche de celui de codant la MRP6 (voir tableau 7, en page 38). Récemment, il a été découvert que des mutations du gène *MRP6* étaient responsables du *pseudoxanthoma elasticum*, une maladie du tissu conjonctif. Cette protéine est structurellement très proche de la MRP1 (environ 62%) [317].

Ä Protéine MRP7 [167, 241]

Dans la nomenclature HUGO (pour « *Human Gene Nomenclature Committee*»), indiquée dans le tableau 7, en page 38, cette protéine correspond à la protéine ABCC10 et non pas à la protéine ABCC7. Cette protéine est encore mal connue, cependant, KAO *et al.* [198] viennent de cloner un ADNc (de 4,5 kDa) correspondant au gène *mrp7* de la souris. L'étude de l'inactivation de ce gène chez la souris devrait apporter des informations concernant les fonctions physiologiques de la MRP7.

c. *MXR* (« *MitoXantrone Resistance protein* »)

Récemment, un nouveau gène codant une protéine capable de transporter des médicaments a été découvert simultanément par trois laboratoires :

9 DOYLE *et al.* [104] ont nommé cette protéine BCRP (« *Breast Cancer Resistance Protein* »).

9 ALLIKMENTS *et al.* [6] ont localisé, dans l'espèce humaine, ce gène en position chromosomique 4q22 et ont cloné ce gène à partir de placentas ; les auteurs ont nommé *ABCP* (pour « transporteur ABC Placentaire ») le produit de ce gène.

9 MIYAKE *et al.* [283] ont isolé ce gène à partir d'une lignée cellulaire humaine de carcinome du colon hautement résistante au mitoxantrone ; le gène a été appelé *MXR* (pour « *MitoXantrone Resistance-associated gene* »).

Nous utiliserons cette dernière appellation puisque ce gène *MXR* est exprimé dans d'autres tissus que le tissu mammaire ou le placenta. Le gène *MXR* code une protéine membranaire composée de 655 acides aminés et d'un poids moléculaire de 72,1 kDa [241].

Les protéines membranaires impliquées dans le phénomène de résistance pléiotropique sont donc nombreuses. Le tableau 7, en page 38, récapitule les informations importantes sur ces différentes protéines.

Tableau 7 – Les trois sous-familles de transporteurs ABC connues pour leur association avec la résistance pléiotropique
(d'après LITMAN et al. [241] et KUWANO M. [222])

Membre	Nomenclature HUGO	Autres noms	Locus	Acides aminés	Expression tissulaire et cellulaire	Principaux substrats	Maladie associée
MDR1	ABCB1	PGY1, P-gp	7q21	1280	Cortex de la surrénale, tubules rénaux, barrière hémato-encéphalique, membrane apicale	Nombreux médicaments hydrophobes, amphiphiles	résistance pléiotropique
MDR3	ABCB4	PGY3, MDR2/MDR3	7q21.1	1279	Foie, membrane apicale	Phosphatidylcholine	Cholestases familiales fibrinogènes
MRP1	ABCC1	MRP, GS-X	16p13.1	1531	Langue, testicule, muscle squelettique	Anions organiques, conjugués du glutathion (LTC4)	résistance pléiotropique ?
MRP2	ABCC2	cMOAT	10q24	1545	Foie, tube digestif, (rein), membrane apicale	Anions organiques, cisplatine, glucuronides	Syndrome de Dubin-Johnson
MRP3	ABCC3	cMOAT2, MLP2, MOAT-D	17q21.3	1527	Foie, colon, (pancréas), surrénales, prostate	Glucuronides, sels biliaires	?
MRP4	ABCC4	MOAT-B	13q31	1325	Prostate, langue, pancréas, testicule, ovaires, vésicule biliaire, (vessie)	Anions organiques, PMEA	?
MRP5	ABCC5	SMRP, MOAT-C	3q27	1437	Tissus mammaire, muscles squelettique, pancréas, hypothalamus	Anions organiques, analogues de nucléotides, conjugués du glutathion	?
MRP6	ABCC6	ARA, MLP1, MOAT-E	16p13.1	1503	Foie, rein, (pancréas), membrane basale et apicale	Peptides anioniques (BQ-123)	Pseudoxanthoma elasticum
MRP7 [167]	ABCC10	EST182763	6p21	1513	?	?	?
MXR	ABCG2	BCRP, ABCP	4q22	655	Placenta, foie, tube digestif, membrane apicale	Mitoxantrone, autres médicaments hydrophobes, amphiphiles	résistance pléiotropique

I.3.1.3. Facteurs cytoplasmiques

Différents mécanismes cytoplasmiques permettant de réduire la quantité de médicament actif atteignant la cible moléculaire ont été identifiés. Nous pouvons compter parmi ces mécanismes : la séquestration vésiculaire et les modifications du métabolisme inactivateur.

a. Séquestration vésiculaire (protéine LRP/MVP)

Certains auteurs ont isolé des lignées cellulaires résistantes qui, bien que présentant un phénotype MDR, n'étaient associées ni à l'expression de glycoprotéine P ni à celle de MRP [29, 348]. Dans ces cellules résistant aux agents anticancéreux de la « famille MDR », on a pu isoler une nouvelle protéine de 110 kDa. Cette protéine a été appelée « *Lung Resistance related Protein* » (LRP) puisqu'elle a été isolée dans une lignée cellulaire de cancer pulmonaire. Le gène codant la protéine LRP est situé sur le chromosome 16, à proximité du gène codant la protéine MRP1 (position 16p11.2 et 16p13.1, respectivement) [282].

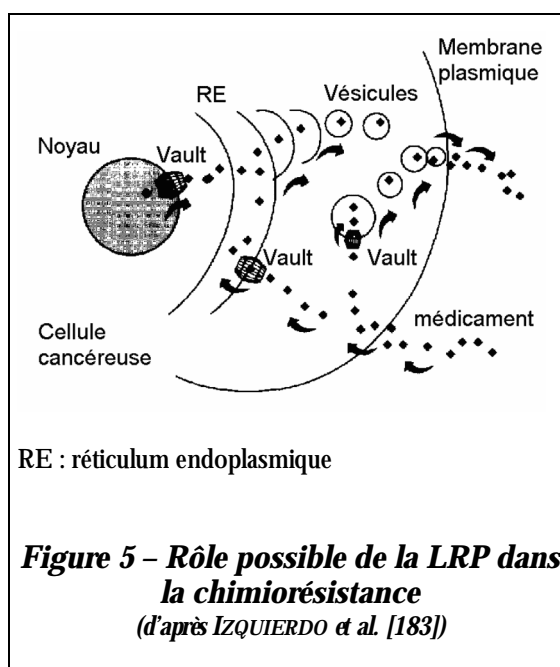
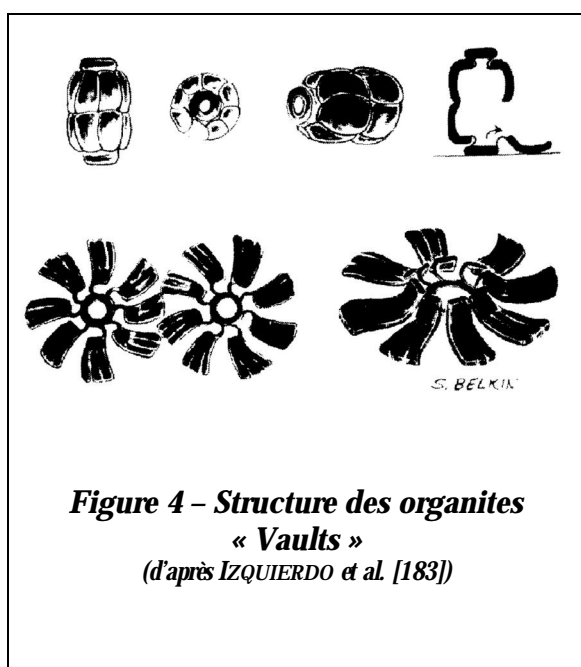
Dans la plupart des lignées cellulaires *MDR* exprimant cette protéine, la distribution intracellulaire des médicaments est altérée par rapport à celle rencontrée dans les lignées cellulaires homologues chimiosensibles [40, 137]. En utilisant des composés fluorescents tels que les anthracyclines ou le mitoxantrone, il est possible de constater un déplacement de la fluorescence du noyau vers le cytoplasme et une ponctuation de fluorescence correspondant aux vésicules cytoplasmiques. Le mécanisme précis responsable de l'accumulation de molécules dans ces vésicules n'est pas encore connu mais la protéine LRP pourrait être impliquée [348].

Une surexpression de la LRP est souvent rencontrée dans les lignées cellulaires MDR MRP-positives [348], mais a aussi été détectée dans des lignées cellulaires exprimant la glycoprotéine P [229]. Néanmoins, la glycoprotéine P ou la MRP pourrait aussi intervenir dans le mécanisme de séquestration vésiculaire [40, 137].

SCHEFFER *et al.* [347] ont découvert que cette protéine LRP était en fait la principale protéine « Vault » (ou MVP pour « *Major Vault Protein* »). Les « Vaults » forment des organites cellulaires découverts assez récemment (1986). Ces protéines MVP doivent leur nom (« Vaults ») à leur morphologie qui fait penser à la voûte d'une cathédrale [185]. Ces organites

sont des ribonucléoprotéines de très grande taille se trouvant majoritairement dans le cytoplasme mais aussi dans la membrane nucléaire et à proximité des complexes du pore nucléaire [183]. Ils sont composés de deux parties symétriques (figure 4, ci-dessous).

Les plus haut taux d'expression de ces MVP sont retrouvés dans les tissus qui sont exposés de façon chronique aux xénobiotiques (épithélium des voies respiratoires, tractus digestif et kératinocytes), dans les macrophages et dans la glande corticosurrénale [185]. La LRP/MVP semble donc être impliquée dans les transports nucléocytoplasmiques ; en « emprisonnant » les médicaments, elle permettrait leur élimination cellulaire [27, 184] (figure 5, ci-dessous).



Ainsi, le mécanisme de **séquestration vésiculaire réduit la concentration de molécules médicamenteuses en contact avec la cible moléculaire** sans affecter la concentration cellulaire globale. Une étude [101] a mis en évidence qu'une exocytose de ces vésicules était possible, mécanisme permettant bien entendu une diminution de la concentration cellulaire globale.

Cependant, une récente étude de LOETCHUTINAT *et al.* [247] ne confirme pas le rôle de ce mécanisme dans la chimiorésistance et indique que la séquestration vésiculaire ne contribue pas à la diminution de la sensibilité des cellules multichimiorésistantes K562 aux anthracyclines.

b. *Modification du métabolisme inactivateur*

Les molécules présentes dans le cytoplasme sont soumises à des modifications métaboliques telles que la **glucuronidation** ou la **conjugaison avec le glutathion par l'intermédiaire du système GST** (glutathion-S-transférase). Le glutathion est un des principaux composés soufrés de la cellule pouvant jouer un rôle protecteur contre certains composés toxiques endogènes et exogènes. Il peut diminuer l'activité cytotoxique de certaines molécules (comme les anthracyclines) en se liant à celles-ci [18]. Par ailleurs, il peut intervenir dans des réactions d'oxydoréductions ainsi que dans la détoxification des radicaux libres [396].

Dans certaines conditions (composés électrophiles, substrats endogènes), la liaison glutathion-molécule peut être augmentée par la glutathion-S-transférase, formant ainsi une association stable. Les GST sont des enzymes existant à l'état d'homodimères et d'hétérodimères. Différentes isoenzymes peuvent être concernées selon les lignées cellulaires résistantes et les médicaments intéressés [18].

Le surcroît d'activité du système GST et l'augmentation de concentration cellulaire en glutathion ont été associés à la résistance à différents agents anticancéreux [396] :

- 9 les agents alkylants de la famille des « moutardes à l'azote » tels que le melphalan ou le cyclophosphamide [278] ;
- 9 des composés tels que le thiotépa et le BCNU ;
- 9 les anthracyclines ou le cisplatine [277].

D'autres enzymes de ce type sont susceptibles d'augmenter le métabolisme inactivateur des agents toxiques. Ainsi, une augmentation d'activité de la **glutathion peroxydase** confère aux cellules une résistance à l'adriamycine. [18]

I.3.2. Résistance par modification de la cible moléculaire

Le mécanisme de résistance pléiotropique que nous allons évoquer ici, contrairement aux précédents, ne fait pas intervenir la concentration en principe actif. Ce mécanisme met en jeu des modifications de la cible moléculaire pouvant être qualitatives ou quantitatives.

La thymidilate synthase, enzyme clé permettant la production des nucléotides thymidilés nécessaires à la synthèse de l'ADN, en est un exemple. Cette enzyme, cible moléculaire du 5-fluoro-uracile, peut être surexprimée (modification quantitative) ou subir des mutations (modification qualitative) rendant instable le complexe formé avec le médicament anticancéreux [61]

Un autre exemple de ce mécanisme de résistance est la résistance aux agents ayant pour cible la topoisomérase II, que nous appellerons **topo II-MDR**.

I.3.2.1. Rôle de la topoisomérase II [272]

La topoisomérase II, aussi appelée gyrase, est une enzyme capable de contrôler et de modifier les états topologiques de l'ADN. Cette activité est possible grâce à la création de coupures transitoires de l'ADN. Les différentes étapes de cette modification de l'ADN sont les suivantes [431] :

- 9 la topoisomérase II se lie à l'ADN de façon non covalente ;
- 9 l'ADN est clivé et lié de façon covalente par ses deux extrémités 5' aux deux sous-unités de l'enzyme ;
- 9 les coupures sont ensuite refermées par formation de liaisons phosphodiester 5'P-3'OH.

La topoisomérase II est donc impliquée dans les processus de surenroulement, relaxation, caténation et décaténation de l'ADN. Son rôle exact n'est que partiellement connu. Elle semble impliquée dans la réplication, les échanges de chromatides sœurs, la transcription et la séparation des chromosomes après la mitose. L'activité de cette enzyme apparaît corrélée à l'état prolifératif des cellules [161].

Certains agents anticancéreux intercalants comme l'adriamycine et les ellipticines, de même que la m-AMSA ou les épipodophylotoxines ont pour cible la topoisomérase II [244]. Ces substances auraient un effet cytotoxique en stabilisant la liaison de l'enzyme avec l'ADN, formant ainsi un "*complexe clivable*". La stabilisation du complexe clivable est traduite sous forme de cassures sur l'ADN après traitement par des agents dénaturants (SDS, sarcosyl), l'addition de détergent permettant de dissocier les deux sous-unités de l'enzyme.

I.3.2.2. Résistance cellulaire envers les poisons des topoisomérases [320]

Il semble exister deux formes distinctes de résistance cellulaire envers les poisons des topoisomérases, l'une quantitative et l'autre qualitative.

a. *Résistance quantitative [390]*

Il a été décrit que la quantité de topoisomérase II est liée au stade de prolifération des cellules. Ainsi, les cellules quiescentes ont une plus faible quantité d'enzymes, elles forment donc moins de complexes clivables et sont donc moins sensibles.

b. *Résistance qualitative [56]*

Dans ce deuxième cas, c'est l'activité de la topoisomérase II qui est modifiée et en conséquence la quantité de complexes clivables formés. L'existence d'une modification de la capacité à former le complexe clivable entraîne un profil de résistance croisée qui peut potentiellement concerner tous les agents reconnus comme étant des inhibiteurs de la topoisomérase II.

Ce profil de résistance est souvent nommé résistance pléiotropique "*atypique*" puisqu'il s'agit de cellules présentant un phénotype de résistance pléiotropique dû à une modification autre que l'efflux des agents cytotoxiques hors de la cellule par l'intermédiaire de la glycoprotéine P.

I.3.3. **Résistance en aval de la cible moléculaire**

Malgré la réussite de l'induction de dégradations de la cible moléculaire, le traitement anticancéreux peut encore être mis en échec par la mise en œuvre de mécanismes de résistance en aval de la cible moléculaire. Ces mécanismes peuvent agir en augmentant l'activité de réparation de l'ADN, en augmentant la tolérance aux lésions induites par les médicaments ou par régulation négative du signal de mort cellulaire.

I.3.3.1. *Augmentation de l'activité de réparation de l'ADN*

Une augmentation de l'activité de réparation de l'ADN peut entraîner l'apparition d'une résistance non spécifique aux agents qui interagissent directement avec l'ADN comme les dérivés du platine ou les agents alkylants [27, 229].

a. *Exemple des agents alkylants*

La résistance aux alkylants était classiquement attribuée au glutathion et à l'expression des enzymes qui interviennent dans la synthèse de ce métabolite soufré. La littérature récente

n'évoque pratiquement plus ce mécanisme, d'autant que toutes les tentatives faites en clinique pour agir sur cette résistance en inhibant la synthèse du glutathion ont été des échecs [61].

Le système de réparation des lésions d'alkylation peut mettre en jeu soit un système d'excision des bases alkylées soit un système de transfert des lésions alkylées sur une protéine suicide faisant intervenir, la O⁶-alkylguanine-ADN-alkyltransférase (AGAT), par exemple [229].

Cette protéine répare les adduits en position « O⁶ » de la guanine et la résistance aux alkylants paraît très liée à l'hyperexpression de cette protéine. Le gène codant l'AGAT est sous la dépendance de la protéine kinase C [33].

L'AGAT peut être inhibée par la O⁶-benzylguanine active chez l'homme. Cependant des mutants de l'AGAT résistants à cet inhibiteur sont déjà décrits [441].

Une augmentation des systèmes de réparation a pu être décrite comme responsable de la résistance aux moutardés à l'azote ainsi qu'au melphalan.

b. Exemple des dérivés du platine [61]

Ces médicaments agissent directement sur l'ADN en se liant par des liaisons covalentes à des bases puriques adjacentes (adduits) et créant ainsi des ponts intra- ou inter-brins. Ces modifications provoquent des distorsions de l'ADN qui perturbent la machinerie de réplication, ralentissent ou arrêtent le cycle cellulaire et induisent l'apoptose.

Le système NER (« *Nucleotide Excision Repair* ») semble être le mécanisme prédominant qui excise les adduits cisplatine-ADN. Les modifications de conformation de l'ADN provoquées par les adduits sont reconnues par un complexe protéique (XPA-RPA), les brins de l'ADN sont déroulés par deux hélicases puis coupés : un tronçon de 27-29 nucléotides est ainsi excisé. La zone d'ADN transitoirement monocaténaire est protégée de l'action des nucléases par des protéines avant d'être réparée par des ADN polymérases δ ou ϵ et reliée par une ligase.

I.3.3.2. Tolérance accrue aux lésions de l'ADN [61]

Nous évoquerons ici le déficit de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR pour « *mismatch repair* »). Celui-ci a été mis en cause dans la résistance au cisplatine et aux alkylants [2]. Physiologiquement, ce système permet de réparer les mauvais appariements des bases nucléiques en excisant la partie concernée du brin d'ADN anormal.

Les protéines MMR reconnaissent aussi les distorsions locales provoquées par les adduits de cisplatine mais l'étape d'excision et de réparation ne se fait pas ; la cellule s'arrête en phase G2 de la mitose et enclenche un processus d'apoptose dépendant de la protéine p53 (voir I.3.3.3 ci-dessous). Si les protéines MMR sont absentes ou non fonctionnelles, la réplication de l'ADN se poursuit, on parle alors d'une résistance par tolérance accrue aux adduits.

I.3.3.3. Régulation négative du signal de mort cellulaire

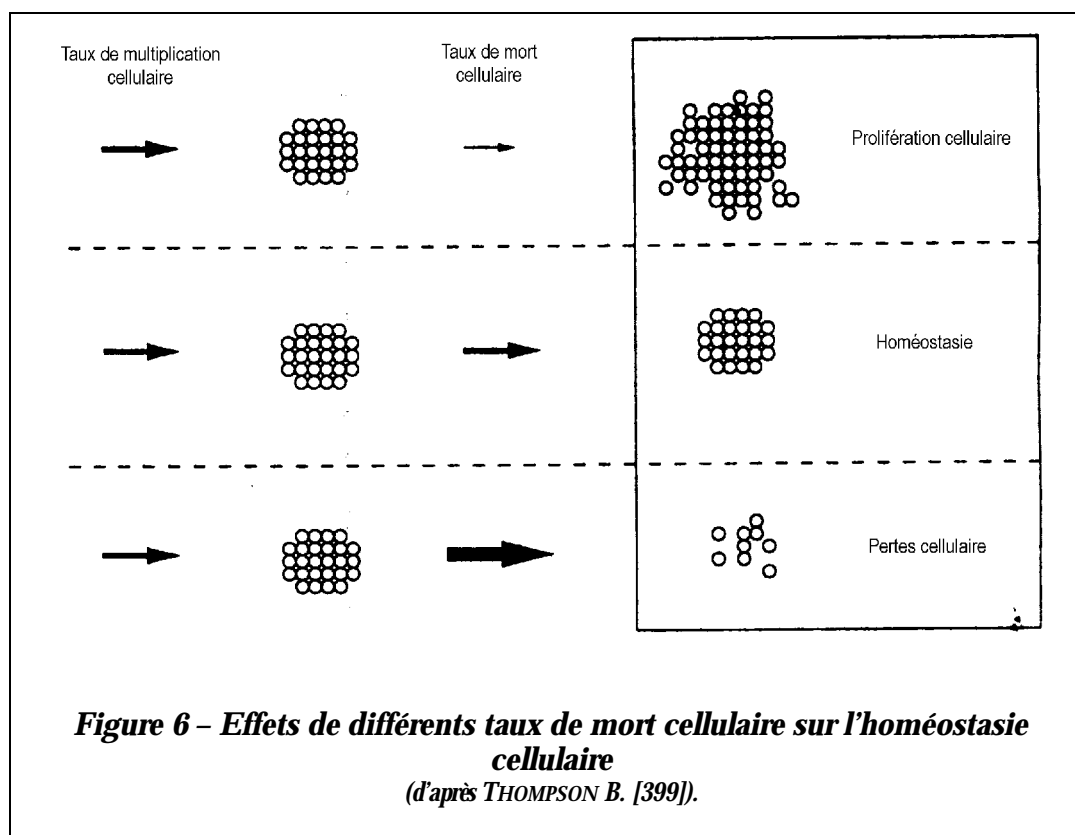
Parmi les cas où une concentration cellulaire d'anticancéreux suffisante est atteinte, le mécanisme de résistance mettant en jeu le phénomène de mort cellulaire programmée semble être le plus important [229, 261, 399].

a. *Apoptose ou mort cellulaire programmée : quelques rappels [399]*

Dans toutes lignées cellulaires, le contrôle du nombre de cellules est déterminé par un équilibre entre la multiplication cellulaire et la mort cellulaire. La figure 6, en page 46, montre qu'en l'absence de modification du taux de multiplication cellulaire, des changements dans le taux de mort cellulaire peuvent induire une prolifération cellulaire ou une perte cellulaire.

Les cellules différenciées des organismes pluricellulaires paraissent être toutes capables d'induire leur propre mort au travers d'un programme intégré de mort cellulaire. Lorsqu'il est activé, ce programme de mort cellulaire initie une forme de mort cellulaire caractéristique : **l'apoptose**. De nombreux facteurs intrinsèques ou extrinsèques peuvent modifier cette apoptose.

La mort cellulaire par apoptose présente des caractéristiques différentes d'une nécrose cellulaire classique. La nécrose cellulaire est une forme pathologique de mort cellulaire induite par des dommages cellulaires graves, elle est caractérisée par un gonflement et une lyse cellulaire rapide. L'apoptose est déterminée par une « auto-digestion » contrôlée de la cellule à l'aide de protéases endogènes. Une perte des fonctions mitochondriales a aussi été constatée.



b. *Mort cellulaire et prolifération cellulaire tumorale*

Les cellules d'une grande variété de tumeurs humaines ont des capacités d'apoptose plus faibles en réponse à des stimuli physiologiques. Ceci est encore plus évident pour les métastases tumorales [399].

Les travaux majeurs concernant l'apoptose ont porté sur l'oncogène *myc*, l'oncogène *bcl2* et le gène suppresseur *p53*. Des niveaux élevés d'expression du gène *bcl2* préviennent la cellule de la mort : la protéine *bcl2* apparaît fonctionner comme un régulateur négatif au sein d'une étape de la cascade biologique qui conduit à l'apoptose [27]. Grâce aux souris transgéniques, un autre acteur du processus de mort apoptotique a été identifié : le gène suppresseur de tumeur *p53* [262]. Ce gène suppresseur *p53* semble essentiel aux cellules afin d'induire l'apoptose en réponse à des dégradations génétiques [227]. La défectuosité de l'apoptose induite par une inactivation du gène *p53* peut induire des tumeurs chimiorésistantes et laisse penser que l'état du gène *p53* peut être un facteur décisif de la réponse tumorale au traitement [261]. Une étude concernant des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique [107] établit que la mutation du gène *p53* peut être associée à un pronostic sombre indépendamment de l'expression du gène MDR1.

L'hypoxie et l'acidose des régions centrales tumorales hypovascularisées provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et favorisent l'émergence de cellules résistantes par le biais d'une activité réduite de la protéine p53 [61].

Des expériences réintroduisant le gène *p53* dans sa forme naturelle permettent de rétablir la chimiosensibilité aux anticancéreux [126].

Les mécanismes pouvant entraîner une résistance pléiotropique sont donc nombreux. Le terme de phénotype MDR s'applique préférentiellement à l'ensemble des mécanismes conduisant à une résistance multidrogue et celui de « phénotype MDR classique » est apparu pour désigner le phénotype des lignées cellulaires exprimant la glycoprotéine P.

II. GLYCOPROTÉINE P ET RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE

II.1. Historique

Le phénotype MDR classique (résistance liée à la glycoprotéine P) est le mécanisme de résistance pléiotropique qui a été mis en évidence le premier, dans les années 70, sur différentes lignées de cellules cancéreuses rendues résistantes *in vitro* à des médicaments antinéoplasiques d'origine naturelle comme les alcaloïdes de la pervenche ou les anthracyclines [31, 237]. Cette résistance à de multiples anticancéreux a été appelée **résistance pléiotropique** [31, 87] ; les termes *résistance multidrogue* ou *multichimiorésistance* sont aussi utilisés. Un tel phénotype est fréquemment exprimé par les cellules de mammifères lorsqu'elles sont sélectionnées pour leur résistance à des médicaments anticancéreux [419, 61, 131].

Les recherches sur la résistance pléiotropique ont suivi plusieurs directions [131]. Les principaux travaux ont concerné :

- 9 la recherche d'une origine génétique à ce phénomène de résistance ;
- 9 la diminution de concentration intracellulaire ;
- 9 le facteur pronostic de l'expression du phénotype MDR.

II.1.1. Origine de cette résistance

La complexité du phénotype MDR a orienté les recherches vers une origine génétique de ce type de résistance [201, 237]. Le phénotype MDR est-il dû à une modification génétique unique ou à plusieurs modifications indépendantes ?

En 1970, BIEDLER et RIEHM [31] décrivent une association entre la chimiorésistance et des anomalies du caryotype.

En 1974, LING [237] suggère que plusieurs allèles et/ou gènes soient à l'origine de la résistance pléiotropique.

II.1.2. Diminution de la concentration intracellulaire [206]

Dès 1968, KESSEL [207], établit une relation entre la chimiorésistance et la diminution de la concentration intracellulaire. Cette étude réalisée sur des cellules de leucémie murine

montre que la concentration intracellulaire des cellules résistantes atteint prématurément (en moins de 30 min) son maximum puis diminue ensuite rapidement.

En 1973, DANØ [88] décrit un efflux actif de différents agents cytotoxiques (anthracyclines et alcaloïdes de la pervenche) à partir de cellules tumorales murines de Ehrlich. Cet efflux actif peut expliquer la diminution de l'accumulation intracellulaire de ces composés. Il proviendrait d'une pompe transmembranaire énergie dépendante.

La diminution de concentration intracellulaire est alors reconnue comme la signature des lignées cellulaires multidrogues résistantes [32, 319].

II.1.3. Facteur pronostic du phénotype MDR

Il a été supposé que l'expression du phénotype MDR par des cellules cancéreuses pouvait être un facteur négatif limitant le succès clinique d'une chimiothérapie. L'implication clinique n'a d'abord été que supposée puisque, théoriquement, le groupe de cellules tumorales acquérant le phénotype MDR est un groupe de cellules malignes isolées. Ainsi, ce groupe de cellules isolées présentant une résistance aux médicaments couramment utilisés dans le traitement du cancer peut ne pas avoir de répercussion *in vivo* [131].

Il est donc essentiel de savoir si le phénotype MDR est aussi exprimé par des cellules tumorales *in vivo* et si ce phénomène joue un rôle important dans la réponse globale à la chimiothérapie anticancéreuse.

II.2. Altérations des lignées cellulaires MDR

Étant donné le large spectre de composés concernés par la résistance pléiotropique, il n'est pas étonnant qu'une multitude de changements aient été observés dans les lignées cellulaires MDR. Ces changements peuvent inclure des modifications [131] :

- 9 de la morphologie cellulaire ;
- 9 des caractéristiques de croissance cellulaire ;
- 9 du potentiel néoplasique des cellules.

En principe, pour être efficaces, les médicaments employés en chimiothérapie doivent traverser la membrane cellulaire. Ainsi, les premières études concernant les altérations

rencontrées dans les lignées cellulaires présentant le phénotype MDR ont porté sur le transport membranaire des médicaments.

II.2.1. Transports membranaires

Les cellules de phénotype MDR sont capables de se multiplier en présence d'une concentration médicamenteuse mortelle pour les cellules sensibles. Dans la compréhension du mécanisme qui permet à ces cellules de continuer à se multiplier, l'étude de la concentration intracellulaire en médicaments dans ces cellules est très intéressante. Celle-ci peut-être mesurée en plaçant les cellules en présence du médicament à étudier suffisamment longtemps pour qu'un équilibre s'établisse (c'est à dire quand la pénétration cellulaire est égale à la fuite cellulaire). Des études concernant différentes lignées cellulaires ont régulièrement mis en évidence une diminution de la concentration intracellulaire dans les lignées multichimiorésistantes par rapport aux lignées sensibles [47, 206, 207, 316, 319].

Cette diminution de concentration intracellulaire peut avoir plusieurs origines [373] :

- 9 une diminution du flux entrant ;
- 9 une augmentation du flux sortant ;
- 9 une distribution cellulaire modifiée ;
- 9 une combinaison de ces mécanismes.

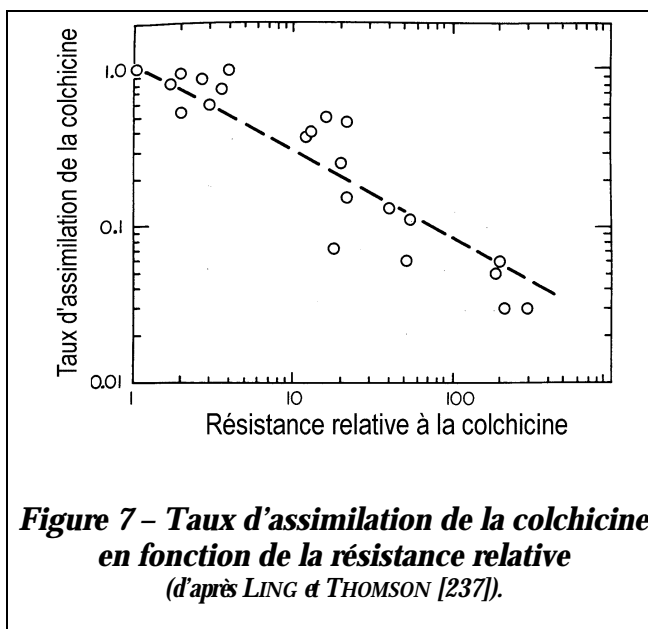
II.2.1.1. Mesures de flux entrant

La mesure du flux entrant d'une substance dans une cellule est théoriquement simple. Il suffit de placer des cellules n'ayant pas été en contact avec le composé étudié dans un milieu contenant une concentration moyenne de ce composé, puis de prélever des échantillons cellulaires à intervalles réguliers. Il est ainsi possible de déterminer l'augmentation de concentration intracellulaire en fonction du temps de contact. En pratique cette mesure est compliquée par différents facteurs comme [131] :

- 9 l'adsorption des molécules à la membrane cellulaire ;
- 9 la nécessité de faire les mesures rapidement, avant que l'équilibre entre le milieu intracellulaire et extracellulaire se fasse ;
- 9 la difficulté rencontrée pour déterminer les concentrations initiales (très faibles).

Les premières études [31, 47, 88] de mesure de flux entrant ont montré que lorsque les mesures étaient faites dans les premières secondes, le flux entrant des lignées cellulaires multidrogues résistantes était plus faible que celui des lignées sensibles.

En 1974, une étude de LING et THOMSON [237] sur des lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois (CHO pour « *Chinese Hamster Ovary* ») a démontré une forte corrélation négative entre le taux relatif d'assimilation de colchicine tritiée (^3H -colchicine) et le taux de chimiorésistance (figure 7, ci-contre). Deuxièmement, cette étude met en évidence l'absence de modification de l'activité de liaison aux protéines cytoplasmiques de la colchicine. Troisièmement, les lignées colchicine-résistantes utilisées présentent une



résistance croisée à des médicaments de structure différente et ayant différentes cibles moléculaires. Une autre caractéristique de ces lignées cellulaires est qu'elles ne présentent pas de résistance plus prononcée à la colcémide qui est un analogue de la colchicine se fixant aux mêmes sites. Enfin, l'addition d'un détergent (procédé qui favorise l'augmentation de la perméabilité membranaire) potentialise à la fois la cytotoxicité de la colchicine et son assimilation par les cellules mutantes.

Ces quatre observations permettent aux auteurs de conclure, comme BIEDLER et RIEHM en 1970 [31], que la chimiorésistance observée sur cette lignée cellulaire CHO est probablement due à une **modification cellulaire entraînant une diminution de la perméabilité membranaire**

II.2.1.2. Mesures de flux sortant

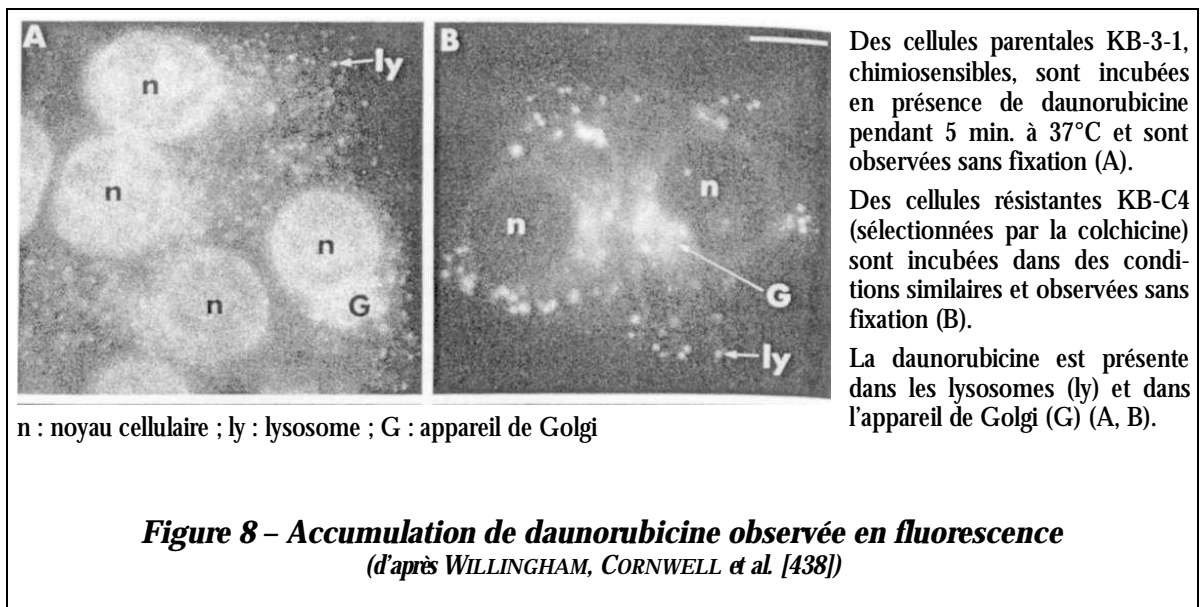
La mesure de la fuite cellulaire des médicaments est théoriquement facile à réaliser en procédant de la façon suivante [131] :

- 9 incubation des cellules dans une solution de concentration moyenne jusqu'à obtention de l'équilibre ;

9 rincer les cellules ;

9 prélever un échantillon cellulaire à intervalle régulier et mesurer la diminution de concentration intracellulaire en fonction du temps.

Une des difficultés pratiques rencontrées est la façon de procéder au rinçage des cellules ; idéalement, celui-ci doit être instantané afin de déterminer le flux sortant initial de façon précise. Ceci est impossible. De plus, cette méthode de mesure suppose que la distribution intracellulaire des anticancéreux est identique dans les cellules résistantes et les cellules sensibles. Or, différentes études [137, 438] ont montré depuis que la distribution intracellulaire des anticancéreux était modifiée dans les cellules exprimant une résistance pléiotropique [229]. Les molécules utilisées lors de ces études sont des composés fluorescents, tels que les anthracyclines ou le méthotrexate. Il est possible d'observer ainsi dans les cellules multichimiorésistantes un décalage de la fluorescence du noyau vers le cytoplasme et une distribution ponctuée de la fluorescence correspondant au compartiment vésiculaire cytoplasmique (figure 8, ci-dessous).



Les informations les plus intéressantes concernant l'efflux cellulaire ont été fournies par des études faisant intervenir l'énergie cellulaire. Dans les années soixante-dix, différentes études [88, 177, 356, 374] ont mis en évidence une augmentation significative de la concentration intracellulaire lorsque des inhibiteurs de la production d'énergie cellulaire sont ajoutés à un milieu de culture dépourvu de source d'énergie. Cette augmentation de concentration intracellulaire, bien que plus importante dans les cellules chimiorésistantes,

existe aussi dans les cellules sensibles. Si du glucose est additionné au milieu de culture, la concentration intracellulaire de l'agent anticancéreux diminue plus rapidement dans les cellules MDR [177].

KESSEL *et al.* [208] montrent sur des cellules de leucémie murines P388 que la diminution de concentration intracellulaire est liée à un efflux actif de ce composé.

La résistance pléiotropique n'est donc pas due à une diminution du flux cellulaire entrant. Les différentes études menées conduisent à proposer l'existence d'une **pompe transmembranaire énergie-dépendante à l'origine d'une augmentation de l'efflux cellulaire.**

II.2.2. Modifications biochimiques

Différentes altérations des cellules MDR peuvent être constatées [419], mais la modification la plus caractéristique est la surexpression de la glycoprotéine P [367].

Les modifications peuvent concerner les protéines membranaires ou cytoplasmiques, les glycosylations, les phosphorylations ou la structure lipidique de la membrane cellulaire.

II.2.2.1. Protéines membranaires et cytoplasmiques, glycosylations, phosphorylations

En 1976, JULIANO et LING [194] avaient déjà constaté, sur une lignée cellulaire CHO résistante à la colchicine, une augmentation de la quantité de différentes protéines de haute masse moléculaire. Les protéines d'une masse moléculaire de 139 kDa et de 95–100 kDa présentaient les pics d'augmentation les plus marquants alors que les protéines de 55–65 kDa subissaient une augmentation plus faible. GARMAN et CENTER [127], dans une étude sur des lignées cellulaires pulmonaires de hamster chinois (HT-1), décrivent une augmentation de la quantité de protéines de 120 kDa mais une diminution quantitative des protéines de 100 kDa.

Parallèlement à la surexpression de la glycoprotéine P, BECK *et al.* [24], en 1979, ont mis en évidence — sur des lignées cellulaires humaines lymphoïdes (CCRF-CEM) — une diminution de la quantité des glycoprotéines d'une masse moléculaire comprise entre 75 et 85 kDa. Une autre étude [314], sur des cellules KB de carcinome humain, révèle une diminution du nombre de glycoprotéines membranaires de 72 à 75 kDa en corrélation avec le niveau de résistance pléiotropique.

Des modifications sont aussi constatées dans la production des protéines cytoplasmiques [419]. La modification la plus caractéristique est l'augmentation de la quantité d'une protéine cytoplasmique d'une masse moléculaire de 19–20 kDa constatée sur des cellules de souris et de hamster chinois résistantes à la vincristine [280, 281].

En 1970, une étude de KESSEL D. [206] sur des cellules de leucémie murine (L5178Y) met en évidence des différences de composition et d'activité enzymatique accompagnant la sélection pour la résistance à la dactinomycine. L'activité des glycosidases de la lignée résistante (L5178Y/D) est significativement plus faible que celle de la lignée L5178Y. Différentes études décrivent des variations de la glycosidation ou de la phosphorylation des protéines dans les lignées multichimiorésistantes [419].

II.2.2.2. Structure lipidique de la membrane cellulaire

De légères variations de la structure lipidique de la membrane cellulaire et de sa fluidité ont été observées [436]. Différentes études ont montré des modifications de la glycosylation des glycolipides membranaires [419]. Des modifications de la composition lipidique ont été décrites en association avec le phénotype MDR, notamment une augmentation des lipides membranaires tels que le cholestérol, les glycosphingolipides et la sphingomyéline [223].

La concentration de cholestérol membranaire pourrait avoir un rôle dans la résistance pléiotropique [15]. La quantité de cholestérol présent dans la membrane cellulaire influe en effet sur sa structure : une augmentation de cette quantité de cholestérol entraîne une rigidification de la membrane à l'origine d'une modification des propriétés d'échanges transmembranaires [17]. En 1995, DUDEJA *et al.* [105] ont démontré qu'une diminution expérimentale de la fluidité membranaire induit une réversion du phénotype MDR. Le développement de la résistance pléiotropique pourrait donc être dû, en partie, à des modifications de la concentration du cholestérol membranaire qui, en modifiant la fluidité membranaire, interférerait avec la diffusion de substances telles que la vincristine [300]. MAZZONI et TRAVE [270] ont décrit une association entre l'expression du phénotype MDR et une modification de l'homéostasie du cholestérol.

PALLARÉS-TRUJILLO *et al.* [300] suggèrent une corrélation entre l'augmentation de la quantité de cholestérol et la diminution de la concentration intracellulaire médicamenteuse entraînant ainsi un niveau de résistance plus élevé des cellules MDR.

Une très récente étude [102] indique de façon certaine que l'insertion expérimentale de glycoprotéines P purifiée dans une bicouche lipidique (liposomes) entraîne une déstabilisation de celle-ci.

II.3. Glycoprotéine P et phénotype MDR classique

II.3.1. Surexpression de la glycoprotéine P

II.3.1.1. Découverte de la glycoprotéine P

En 1975, LING [235] met en évidence une glycoprotéine présente dans la membrane de cellules CHO mutantes colchicine-résistantes (CH^R) et qui n'est pas exprimée par les cellules parentales. L'auteur propose un mécanisme de résistance à la colchicine faisant intervenir des protéines, telles que cette nouvelle glycoprotéine, qui modifierait la perméabilité membranaire.

C'est en 1976 que JULIANO et LING [194] identifient la glycoprotéine P, protéine membranaire de 170 kDa, exprimée par une lignée cellulaire d'ovaire de hamster chinois résistante à la colchicine (CH^R). Cette glycoprotéine, appelée glycoprotéine P (P pour « *permeability* ») permettrait de moduler la perméabilité cellulaire vis à vis des médicaments. En 1977, CARLSEN *et al.* [48] évoquent la possibilité que la modulation de perméabilité cellulaire soit due à la phosphorylation d'un minimum de deux glycoprotéines de haut poids moléculaire.

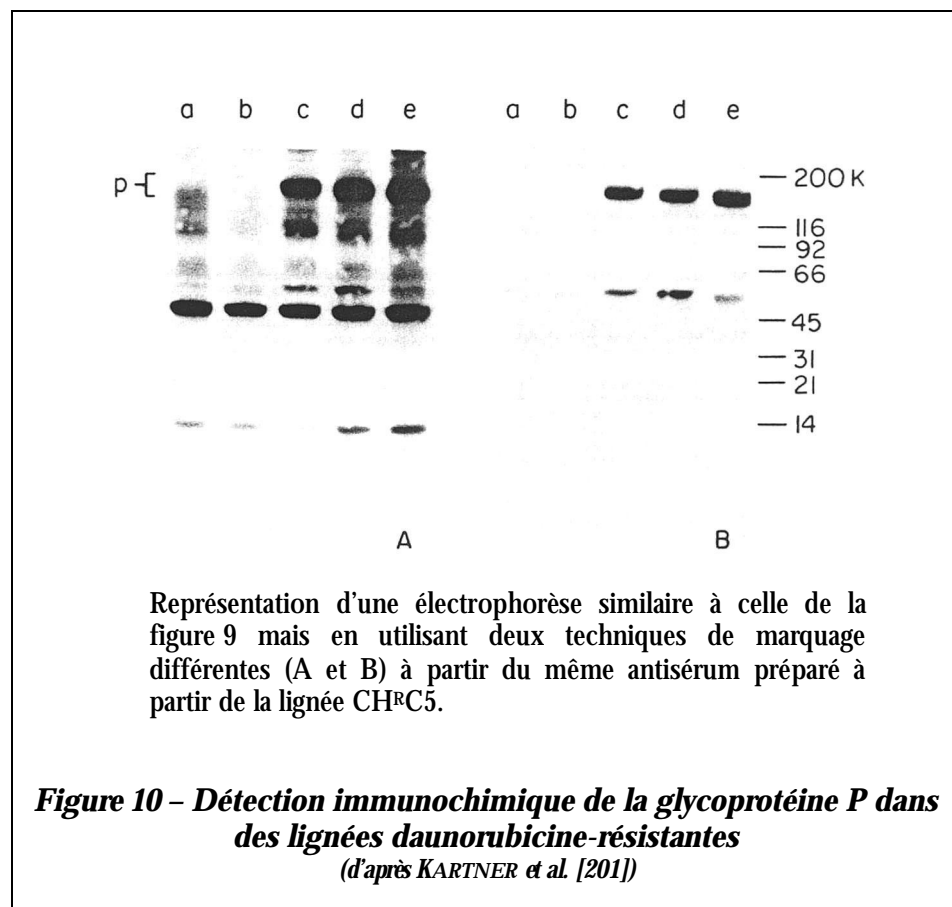
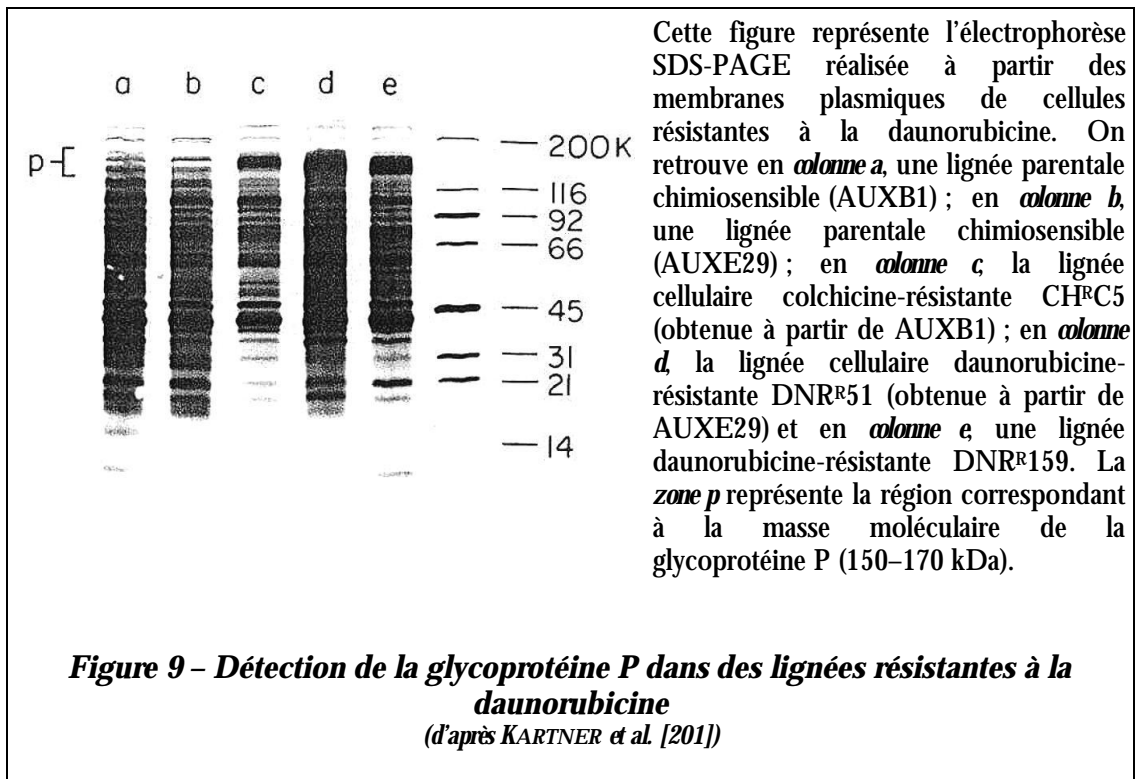
II.3.1.2. Corrélation entre la surexpression de glycoprotéine P et le phénotype MDR classique

Dans les années qui ont suivi la découverte de la glycoprotéine P, des altérations cellulaires telles que cette surexpression de glycoprotéines membranaires ont ensuite été décrites sur :

9 des lignées cellulaires de poumon de hamster chinois (CHL pour « *Chinese Hamster Lung* ») résistantes à la dactinomycine [303] ;

9 des lignées cellulaires lymphoïdes humaines (CCRF-CEM) résistantes aux alcaloïdes de la pervenche [24] ;

9 des lignées cellulaires CHL résistantes à la doxorubicine [127, 201] (figures 9 et 10, en page 57).



Parmi les nombreuses modifications biochimiques et physiologiques en relations avec le phénotype MDR, la surexpression de glycoprotéines P se détache particulièrement. Les recherches se sont donc focalisées sur la surexpression de la glycoprotéine P essentiellement pour deux raisons :

9 La résistance pléiotropique était un phénomène impliquant apparemment des transports membranaires. Une protéine membranaire telle que la glycoprotéine P associée au phénotype MDR peut donc être impliquée dans le mécanisme de chimiorésistance.

9 La glycoprotéine P pourrait être utilisée en tant que marqueur de surface afin d'identifier les cellules de phénotype MDR.

Initialement plusieurs lignées cellulaires MDR semblaient ne pas surexprimer la glycoprotéine P [314], nous savons maintenant que cette absence n'était qu'apparente. L'absence de détection était souvent due aux difficultés techniques [131] :

9 les glycoprotéines P ont tendance à s'agréger dans les pores du gel d'électrophorèse SDS-PAGE ;

9 la migration des glycoprotéines P est fortement dépendante des conditions d'électrophorèse.

Une fois ces difficultés de détection admises, la surexpression de la glycoprotéine P s'est avérée être la propriété la plus constante des cellules multichimiorésistantes [131]. D'après des travaux de KARTNER et LING, la masse moléculaire mesurée pour la glycoprotéine P peut varier entre 140 et 220 kDa selon la méthode d'électrophorèse SDS-PAGE utilisée [131]. La masse moléculaire de 170 kDa a été obtenue en utilisant une électrophorèse SDS-PAGE modifiée par FAIRBANKS [113, 131]. La spécificité et la sensibilité de la détection de la glycoprotéine P ont ensuite été améliorées par l'utilisation d'anticorps monoclonaux [199].

CENTER [49] démontre, en 1983, que la résistance de lignées cellulaires CHL est liée à la présence d'une glycoprotéine de 180 kDa. Ses résultats laissent penser que l'activité biologique de cette glycoprotéine est hautement dépendante de son état de phosphorylation. Le tableau 8, en page 59, liste les différents types cellulaires où la glycoprotéine P a été mise en évidence à l'aide d'informations concernant sa masse moléculaire et d'anticorps monoclonaux.

Tableau 8 – Détection d'une surexpression de la glycoprotéine P par différentes lignées cellulaires multichimiorésistantes
(d'après Gerlach *et al.* [131])

Type cellulaire		Cytotoxiques	Référence
<i>Hamster chinois</i>			
CHO	Fibroblastes	Colchicine	LING et THOMSON[237], KARTNER <i>et al.</i> [199]
CHO	Fibroblastes	Daunorubicine	KARTNER <i>et al.</i> [199, 200, 201]
CHO	Fibroblastes	Auréomycine	LING <i>et al.</i> [236]
CHEF	Fibroblastes	Vincristine	KARTNER <i>et al.</i> [199]
DC-3F		Dactinomycine	BIEDLER et RIEHM [31]
V79		Doxorubicine	GERLACH <i>et al.</i> [131]
<i>Hamster doré</i>			
Cl ₂ TSV ₅	SV40 modifiée	Dactinomycine	KARTNER <i>et al.</i> [199]
<i>Souris</i>			
Cellules L	Fibroblastes	Colchicine	KARTNER <i>et al.</i> [199]
S180	Sarcome	Doxorubicine	SIEGFRIED <i>et al.</i> [368], KARTNER <i>et al.</i> [199]
B16	Mélanome	Doxorubicine	GERLACH <i>et al.</i> [131]
UV-2237	Fibrosarcome	Doxorubicine	KARTNER <i>et al.</i> [199]
P388	Leucémie	Doxorubicine, vinblastine, dactinomycine	SHOEMAKER <i>et al.</i> [366]
<i>Homme</i>			
CCRF-CEM	Leucémie	Vinblastine	BECK <i>et al.</i> [24], KARTNER <i>et al.</i> [199]
RPMI 8226	Myélome	Doxorubicine	GERLACH <i>et al.</i> [131]
MES-SA	Sarcome	Doxorubicine	GERLACH <i>et al.</i> [131]
HeLa/KB	Carcinome	Colchicine	AKIYAMA <i>et al.</i> [4], GERLACH <i>et al.</i> [131]

L'expression concomitante de la glycoprotéine P avec la résistance pléiotropique (figures 9 et 10, en page 57) par différentes lignées cellulaires a conduit à penser que la glycoprotéine P modifie la perméabilité de la membrane cellulaire et entraîne ainsi une diminution de la concentration intracellulaire [201, 235, 236].

La quantité de glycoprotéine P détectée dans les lignées cellulaires sélectionnées pour leur résistance est systématiquement corrélée avec le niveau de chimiorésistance [131]. La glycoprotéine P peut être détectée en faible quantité sur des cellules sensibles [199] ; toutefois, le taux de glycoprotéine P exprimée par les différentes lignées cellulaires multichimiorésistantes testées est toujours plus élevé que celui des cellules parentales sensibles [131].

En 1982, DEBENHAM [92] démontre que la transfection d'ADN obtenu à partir de cellules CHO résistantes à la colchicine peut conférer le phénotype MDR à des

cellules L murines chimiosensibles. La glycoprotéine P peut être détectée dans la membrane plasmique de ces cellules transfectées.

Ces différents résultats sont compatibles avec une relation entre la surexpression de la glycoprotéine P et le phénotype de résistance pléiotropique. Ils ne permettent pas de savoir si cette expression de glycoprotéine P est responsable du phénotype MDR ou si elle n'est que secondaire au phénotype de résistance pléiotropique développée par ces cellules.

II.3.1.3. Implication de la glycoprotéine dans le phénotype MDR classique

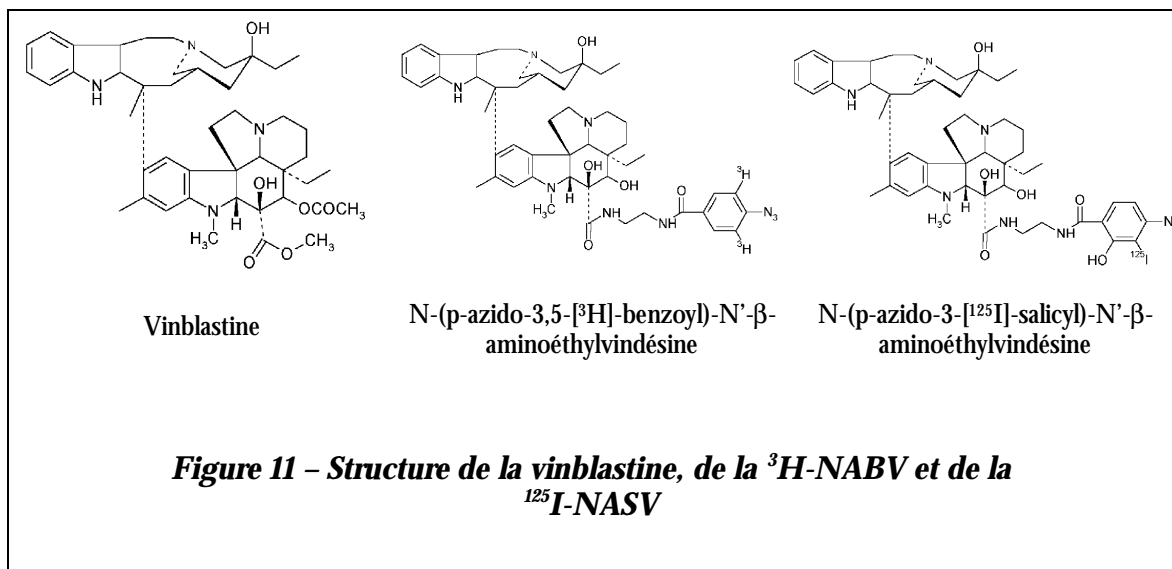
Différentes pistes ont permis de démontrer le rôle de la glycoprotéine dans la résistance pléiotropique classique.

a. Capacité de transport de la glycoprotéine P

Les travaux de CORNWELL *et al.* [76] ont permis de démontrer qu'il existait une augmentation de la liaison entre des agents cytotoxiques (vinblastine et la vincristine) et la membrane des cellules multichimiorésistantes. La membrane des cellules multichimiorésistantes subissent aussi une augmentation d'expression de la glycoprotéine P. Ces résultats laissent penser que la glycoprotéine P est à l'origine de l'augmentation d'agrégation membranaire de vincristine et de vinblastine.

La capacité de la glycoprotéine P à se lier avec des médicaments a été démontrée en 1986 par SAFA *et al.* [338] en utilisant le marquage de photoaffinité (voir III.2.2. Marquage de photoaffinité, en page 101). Les auteurs ont utilisé des analogues photoactifs et radioactifs de la vinblastine (figure 11, en page 61). Les résultats de cette étude montrent qu'il existe un transport de ces analogues par la glycoprotéine P. Une glycoprotéine d'une masse moléculaire comprise entre 150 et 180 kDa est aussi détectée sur les cellules chimiorésistantes alors que les cellules chimiosensibles ne sont pas marquées.

Ces résultats, confirmés par d'autres études [77, 78, 143], permettent de conclure à une **implication directe de la glycoprotéine P** dans l'apparition ou l'entretien du phénotype de résistance pléiotropique **en tant que transporteur membranaire.**



b. Fonction ATPase de la glycoprotéine P

L'analyse de la séquence en acides aminés la glycoprotéine P indique qu'elle possède deux sites de liaisons aux nucléotides similaires à ceux trouvés sur les protéines bactériennes de transports [62, 130, 149]. GERLACH *et al.* [130] pensent ainsi que la glycoprotéine P fonctionne comme une pompe membranaire qui permet le transport actif des molécules hors de la cellule.

L'utilisation d'ATP photoactif (8-azido- α -[³²P]ATP) a permis à CORNWELL *et al.* [79] de confirmer la présence de sites de transport de l'ATP. La présence de tels sites est compatible avec un transport actif de composés cytotoxiques. L'activité ATPase de la glycoprotéine P est démontrée en 1988 par HAMADA et TSURUO [158]. Les auteurs ont utilisé des cellules leucémiques K562 résistantes à la doxorubicine et ont développé une technique expérimentale permettant d'isoler la glycoprotéine P en conservant son activité enzymatique. Ils ont ainsi pu mesurer l'activité ATPase de la glycoprotéine P purifiée.

Cette découverte permet d'établir une **relation directe entre la surexpression de la glycoprotéine P et la résistance pléiotropique** qui est énergie dépendante (voir II.2.1.2. Mesures de flux sortant, en page 52).

c. Réversion du phénotype MDR par des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine P

En 1986, HAMADA et TSURUO [157] ont élaboré des anticorps monoclonaux, MRK16 et MRK17, à partir de cellules leucémiques résistantes à la doxorubicine (K562/DOX). Ces deux anticorps, dirigés contre la *glycoprotéine P*, sont capables d'inhiber le phénotype MDR des cellules K562/DOX. L'anticorps monoclonal MRK16 module le transport de vincristine et de dactinomycine tandis que MRK17 inhibe la croissance des cellules chimiorésistantes.

Ces résultats indiquent que la *glycoprotéine P est impliquée*, directement ou indirectement, dans le mécanisme de transport des médicaments et dans la multiplication des lignées cellulaires multichimiorésistantes.

II.3.2. Amplification génique dans les cellules présentant le phénotype MDR

II.3.2.1. Modifications caryotypiques

Les cellules multichimiorésistantes présentent souvent des signes caryotypiques d'amplification génique [419, 367] :

9 chromosomes minuscules doubles [21, 281] ;

9 régions de coloration homogène (HSR pour « *Homogeneously Staining Regions* ») [154, 281].

Dans ces lignées de cellules multichimiorésistantes sélectionnées pour leur résistance acquise, le nombre de chromosomes minuscules doubles ainsi que la longueur des HSR est corrélé à l'intensité de chimiorésistance. Les lignées cellulaires MDR réversées perdent les signes de cette amplification génique. Ces différentes observations permettent de penser que la **résistance pléiotropique est la conséquence de la surexpression d'une ou de plusieurs protéines issue de gènes amplifiés** [419].

II.3.2.2. Gènes amplifiés

Les gènes impliqués ont d'abord été identifiés comme des séquences d'ADN de nature inconnue amplifiées dans les lignées cellulaires multichimiorésistantes [122, 328].

En 1984, une étude de RONINSON *et al.* [329], sur des cellules de hamster chinois, met en évidence la corrélation entre l'amplification de plusieurs séquences d'ADN et la résistance pléiotropique (voir tableau 9, ci-dessous). Le fragment d'ADN amplifié n'est pas détecté dans les lignées cellulaires LZ reversées (réversion obtenue après croissance prolongée en absence de doxorubicine). La disparition du fragment d'ADN amplifié apparaît conjointement avec la disparition de la résistance pléiotropique dans ces cellules. Les auteurs en concluent que l'amplification de cette séquence d'ADN est à l'origine du phénotype MDR dans ces lignées cellulaires (LZ et C5). La nature de la protéine codée par le(s) gène(s) amplifié(s) n'est pas encore connue ; la glycoprotéine P ainsi qu'une glycoprotéine cytoplasmique d'une masse moléculaire de 19 kDa sont évoquées.

Tableau 9 – Résistance pléiotropique et degré d'amplification d'un fragment d'ADN de 1,1 kb dans différentes lignées cellulaires (d'après RONINSON *et al.* [329])

Lignée cellulaire	Résistance relative		Amplification du fragment de 1,1 kb
	<i>Doxorubicine</i>	<i>Colcémide</i>	
V79	1	1	1
77A	5	7	5
LZ	3000	436	60
Mutant reverse LZ	7		10
CHO/AUX B1	1	1	1
C5	150	280	20

RIORDAN *et al.* (1985) [318] parviennent à isoler une séquence d'ADNc codant la glycoprotéine P à partir de cellules KB de carcinome humain multichimiorésistantes. Les auteurs utilisent alors cette ADNc comme sonde moléculaire et montrent que, dans cette lignée cellulaire, le gène codant la glycoprotéine P est amplifié.

En 1986, GROS *et al.* [150] isolent une séquences d'ADN d'environ 120 kb amplifiées à la fois dans les lignées cellulaires LZ et C5. Cette région contient une unité de transcription, appelée *mdr*, codant un ARNm d'environ 5 kb. L'expression de cet ARNm est corrélée avec

l'apparition d'une résistance pléiotropique dans les lignées cellulaires étudiées. Ces résultats permettent de penser que l'ARNm identifié joue un rôle dans le mécanisme de résistance pléiotropique commun aux lignées LZ et C5. La taille de cet ARNm permet de supposer qu'il code une protéine d'une masse moléculaire de 170 kDa.

Une étude de RONINSON *et al.* [330] rapporte que deux séquences d'ADN amplifiées dans les lignées cellulaires KB multichimiorésistantes sont homologues au gène *mdr* du hamster chinois. Une première séquence, appelée *MDR1*, est amplifiée dans toutes les lignées cellulaires sélectionnées pour leur résistance à la colchicine, à la vinblastine et à la doxorubicine. L'amplification de la deuxième séquence, appelée *MDR2*, n'a pas été détectée. Cette séquence *MDR2* ne semble pas amplifiée systématiquement dans les lignées cellulaires multichimiorésistantes.

L'expression du gène *MDR1* est corrélée avec l'expression de la résistance pléiotropique dans cinq lignées cellulaires humaines, d'origine différente et sélectionnées par trois anticancéreux différents [363]. Une étude utilisant l'ADN de cellules KB de carcinome humain montre la possibilité de transférer le phénotype de résistance pléiotropique à des cellules murines NIH 3T3 [364]. Ce type de résultats a aussi été obtenu en transférant l'ADN de cellules multichimiorésistantes LZ de hamster à des cellules murines LTA [152]. Ce gène *MDR1* est donc fortement suspecté d'être à l'origine d'un mécanisme de résistance pléiotropique commun aux différentes lignées cellulaires humaines étudiées.

C'est une étude de GROS *et al.* [148] qui démontrera, sur les lignées cellulaires de hamster C5 et LZ, que l'expression d'un seul membre de la famille de gènes *mdr* est suffisante pour conférer le phénotype de résistance pléiotropique. Les auteurs ont isolé de l'ADNc à partir des cellules chimiosensibles de la lignée cellulaire de hamster LZ. L'ADNc obtenu a été transfectées dans des cellules issues d'une lignée cellulaire chimiosensible de hamster (LR73). Ces cellules LR73 sont devenues à leur tour chimiorésistantes démontrant ainsi que l'expression du gène isolé par les auteurs permet d'induire le phénotype de résistance pléiotropique. Le fait que la transfection ait été réalisée à partir d'ADNc de *cellules sensibles* conduit à penser que c'est l'augmentation de l'expression de la famille génique *mdr* qui est à l'origine du mécanisme de résistance pléiotropique et non pas une mutation de celui-ci.

Il existe donc une famille de gènes *MDR* [150, 330] et l'expression d'un seul membre de cette famille génique, le gène *MDR1*, confère le phénotype de résistance pléiotropique [148].

II.3.3. Conclusion

La preuve de l'implication de la glycoprotéine P dans le phénotype MDR classique a été apportée par une étude de UEDA *et al.* [412] sur des cellules KB de carcinome humain. Dans cette étude, les auteurs confirment que l'expression du gène *MDR1* est corrélée avec le degré de résistance pléiotropique (voir tableau 10, ci-dessous). De plus, il est démontré que des sondes d'ADNc issues de la glycoprotéine P humaine présentent des réactions d'hybridation croisée avec de l'ADNc issu du gène *MDR1*.

Ces résultats démontrent que le gène *MDR1* code la glycoprotéine P et ainsi, que cette protéine est responsable de l'apparition de la résistance pléiotropique *in vitro*.

Tableau 10 – Chimiorésistance, expression du gène *MDR1* et de la glycoprotéine P dans des lignées cellulaires humaines KB multichimiorésistantes et des cellules transformantes
(d'après UEDA *et al.* [412])

Lignée cellulaire	Agent sélectionnant	Résistance à la doxorubicine (a)	Expression du gène <i>MDR1</i> (b)	Expression de la glycoprotéine P
KB-3-1	Lignée parentale	1	ND	ND
KB-8	Colchicine	1,1 (c)	1	ND
KB-8-5	Colchicine	3,2	3	+/-
KB-8-5-11	Colchicine	40	80	++
KB-C1	Colchicine	160	270	+++
KB-C1-R1	Mutant réversé	3	1	ND
KB-V1	Vinblastine	420	320	++++
KB-V1-R2	Mutant réversé	1	NM	ND
KB-A1	Doxorubicine	97	270	+++
KB-A1-R3	Mutant réversé	2	NM	ND
NIH-T2-C.7	Colchicine	50	340	++

- (a) Résistance relative à la doxorubicine comparée à lignée parentale KB-3-1. Ces lignées cellulaires sont aussi chimiorésistantes à d'autres anticancéreux
 (b) Niveaux d'expression relatifs à la lignée KB-8. ND = Non détecté, NM = non mesuré.
 (c) Bien que la résistance à la doxorubicine de cette lignée cellulaire soit faiblement augmentée, cette augmentation est reproductible et la lignée KB-8 est aussi chimiorésistante à la colchicine (2,1), à la vinblastine (1,2) et à la dactinomycine (1,5).

II.4. Importance de la glycoprotéine P dans la résistance pléiotropique

Les différentes études cherchant à mettre en évidence la surexpression d'ARNm ont permis d'isoler des ADNc provenant de différents gènes amplifiés dans la lignée cellulaire CH⁵C5 d'ovaire de hamster chinois (voir tableau 11, ci-dessous) [419]. Ces gènes sont différents de la famille de gènes codant la glycoprotéine P à en juger par la longueur des ARNm, par l'absence d'hybridation croisée et par leur séquence [420]. Ces six classes de gène, en incluant les gènes codant la glycoprotéine P (appelés dans ce contexte par les auteurs gène de « classe 2 »), sont regroupées dans une région d'une taille de 1500 kb du génome du hamster [420].

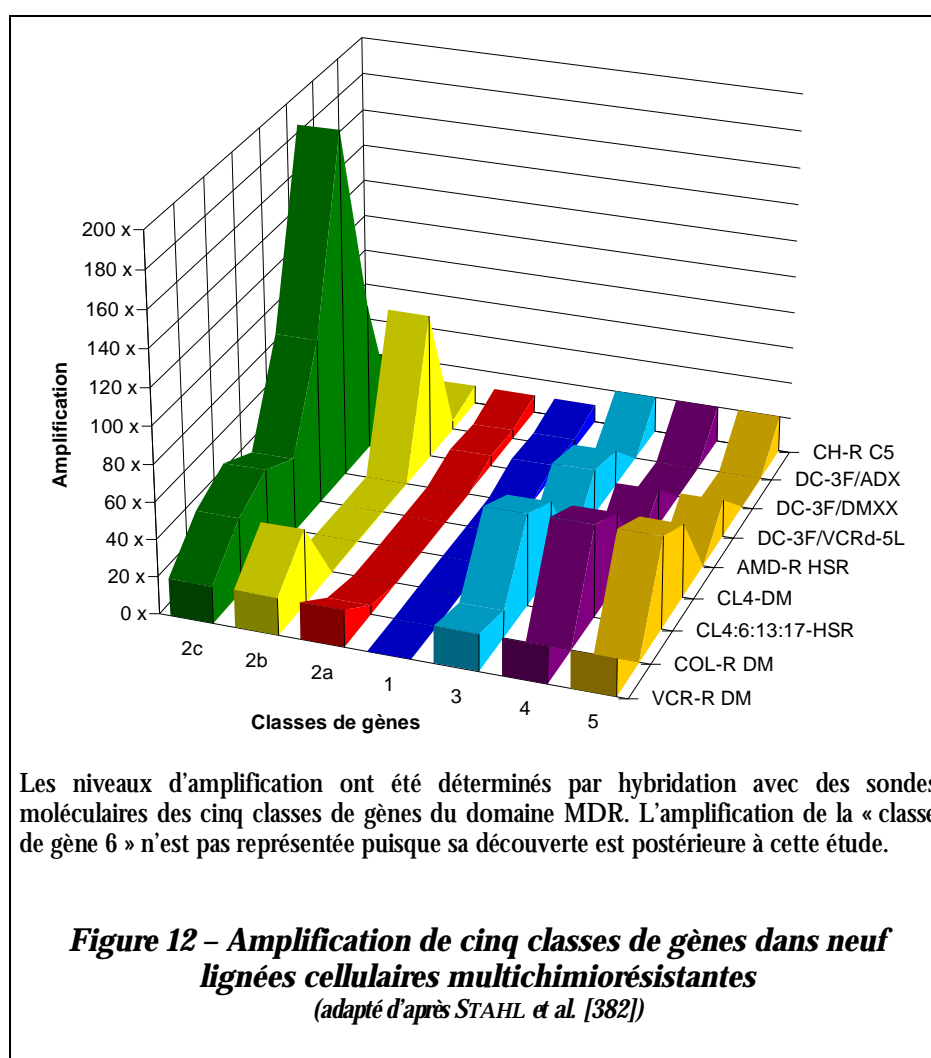
Tableau 11 – Classes de gènes amplifiés et surexprimés dans la lignée cellulaire CH^RC5 d'ovaire de hamster chinois
(d'après VAN DER BLIEK et BORST [419])

Classe de gène	ARNm	Degré d'amplification	Nature du gène
1	750	10	–
2a	–	10	<i>pgp3</i>
2b	4500	10	<i>pgp2</i>
2c	4500	30	<i>pgp1</i>
3	3200	30	–
4	1000/2600	30	Sorcine
5	3600	30	–
6	2600	30	–

Une amplification différentielle de ces classes de gènes a été observée sur des cellules CHL multichimiorésistantes [89] ainsi que sur des cellules tumorales SEWA de souris sélectionnée avec différents antimétabolites [382]. Chaque lignée cellulaire présente une répartition de coamplification différentes (figure 12, en page 67). Le rôle central de la glycoprotéine P dans ces lignées MDR est souligné par le fait que les « gènes de classe 2 » sont les seuls à être amplifiés et surexprimés de façon constante par les différentes lignées cellulaires étudiées.

Les gènes codant la glycoprotéine P sont surexprimés dans la majorité des lignées cellulaires MDR *in vitro* et cette surexpression est corrélée au degré de chimiorésistance [200, 318, 363]. Toutefois, nous savons maintenant que des lignées cellulaires MDR peuvent ne pas exprimer la glycoprotéine P [16, 71] et que d'autres protéines sont capables d'induire un phénotype de multichimiorésistance.

Bien que le degré de contribution de la glycoprotéine P à la chimiorésistance *in vivo* soit encore mal compris (principalement en raison des échecs cliniques de réversion du phénotype MDR), différentes études ont montré que l'expression de la glycoprotéine P *in vivo* était fréquente [241].



La signification fonctionnelle de la surexpression de glycoprotéine P a été étudiée par des expériences de transfection génique [92, 324] (voir II.3.1.2, en page 56). Ces études montrent que les cellules transfectées avec de l'ADN de cellules multichimiorésistantes

présentent une chimiorésistance plus élevée que celles transfectées avec l'ADN des cellules chimiosensibles. De plus, les cellules transfectées avec l'ADN des lignées multichimiorésistantes surexpriment la glycoprotéine P.

Le rôle fonctionnel de la glycoprotéine P a aussi été conforté par le fait que la mutation d'un seul acide aminé de cette protéine est capable d'induire une altération du profil de multichimiorésistance des lignées cellulaires MDR humaines [69]. Cette mutation modifie la spécificité de liaison et de transport de la glycoprotéine P mutée [339].

Les expériences les plus probantes ont été celles qui ont utilisé la transfection d'ADNc codant la glycoprotéine P à l'aide de vecteur d'expression [81, 148, 155, 411]. En 1987, UEDA *et al.* [411] élaborent de l'ADNc à partir du gène *MDR1* et démontrent que la transfection et l'expression de cette ADNc est suffisante pour conférer le phénotype MDR aux cellules transfectées. Ce transfert de chimiorésistance est démontré à la fois sur des cellules murines (NIH 3T3) et sur des cellules humaines (KB-3-1). La chimiorésistance acquise par transfection est, comme la chimiorésistance acquises par sélection médicamenteuse, réversée par le vérapamil [81]. Toutefois, les variations considérables de résistances relatives constatées par les auteurs permettent de supposer l'existence d'autres facteurs, tels que l'expression d'autres protéines ou des modifications de la glycoprotéine P, pouvant moduler le phénotype MDR.

Ces études de transfection, bien que démontrant un rôle fonctionnel du gène *MDR1*, ne permettent pas d'éliminer la possibilité que la multichimiorésistance *in vitro* soit un phénomène multifactoriel dont l'expression du gène *MDR1* ne serait qu'une des composantes [328]. Cette hypothèse est supportée par le fait que de nombreuses modifications biochimiques et enzymatiques sont constatées dans les lignées cellulaires multichimiorésistantes (voir II.2.2. Modifications biochimiques, en page 54) [116, 288]. En particulier, l'utilisation de la sélection médicamenteuse afin d'isoler les transfectants *MDR1* peut avoir entraîné la sélection d'autres mécanismes à l'origine de la résistance de ces lignées cellulaires.

GUILD *et al.* [155] ont apporté les premières preuves permettant d'affirmer que la sélection médicamenteuse n'est pas indispensable à l'acquisition du phénotype MDR. Ces auteurs ont transfecté des cellules murines chimiosensibles NIH 3T3 avec le gène murin *mdr1* et ont cloné les transfectants avec et sans sélection médicamenteuse. La plupart des transfectants n'ayant pas subi de sélection présentent des niveaux de chimiorésistance élevés.

Toutefois ces niveaux de chimiorésistances sont moins élevés que ceux des transfectants ayant subi une sélection médicamenteuse. Bien que ces différences puissent être expliquées par des taux d'expression variables des ARNm *mdr1*, il n'est pas exclu que des mécanismes autres que ceux faisant intervenir la glycoprotéine P aient été « activés » par la sélection médicamenteuse [68].

En 1991, CHOI *et al.* [68] mènent une expérience similaire à celle de GUILD *et al.* mais utilisent un anticorps monoclonal (MRK16) afin de marquer les différents clones obtenus. Les auteurs mettent ainsi en évidence une corrélation entre la densité de glycoprotéine P et le degré de chimiorésistance que les clones aient subi ou non une sélection médicamenteuse. Ces résultats indiquent que l'expression de glycoprotéines P sur la surface cellulaire est un déterminant suffisant du niveau de multichimiorésistance.

L'expression de la glycoprotéine P permet donc de conférer le phénotype MDR et semble être un *événement nécessaire et suffisant* à l'expression de ce phénotype. Ce mécanisme de résistance n'exclut en rien l'existence d'autres mécanismes pouvant participer à l'apparition du phénotype MDR.

III. GLYCOPROTÉINE P : BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, RELATION STRUCTURE-FONCTION ET BIOCHIMIE

III.1. Biologie moléculaire et structure de la glycoprotéine P

Différentes approches (voir II.3.2 et II.4) ont permis d'isoler de l'ADNc *MDR* et d'identifier le gène *MDR1*. Les différentes études menées ont permis de mettre en évidence qu'il n'existe pas *un* gène *MDR* mais une *famille de gènes MDR* (voir II.3.2.2 Gènes amplifiés, en page 63) [142]. Ces différents gènes MDR codent différentes isoformes de la glycoprotéine P.

III.1.1. Diversité des glycoprotéines P

La nomenclature utilisée pour les différents gènes et protéines est assez variée : les termes de gènes *MDR* ou *ABC* sont utilisés (voir tableau 7, en page 38).

III.1.1.1. Famille multigénique *MDR*

Cette famille de gène comprend deux membres chez l'homme [330] et trois membres chez les rongeurs [82] (voir tableau 12, en page 72).

Malgré l'existence d'une forte homologie de séquence (> 70%) des glycoprotéines P codées par les différents gènes *MDR* [98, 419], ces glycoprotéines sont réparties en deux [133] ou en trois [424] classes suivant les auteurs. Dans ce travail, nous utiliserons la répartition en trois classes. La surexpression des glycoprotéines P des classes I et II est capable de conférer le phénotype de résistance pléiotropique [97, 148, 411] contrairement aux glycoprotéines de la classe III [153, 352] :

9 La classe I comprend les glycoprotéines codées par le gène humain *MDR1*, le gène murin *mMdr1a*¹ (*m* pour « *mouse*») [172] et le gène *Pgp1* de hamster [150].

9 La classe II comprend les glycoprotéines codées par le gène murin *mMdr1b* (ou *Mdr1*) [149] et le gène *Pgp2* [109] de hamster.

¹ Les gènes murins *mMdr1b* et *mMdr1a* ont d'abord été appelé, respectivement, *Mdr1* et *Mdr3*, mais ont été renommés dès qu'il a été découvert que ces gènes codaient tout deux une glycoprotéine P capable de conférer le phénotype de résistance pléiotropique [196].

9 La classe III est composée des glycoprotéines codées par le gène humain *MDR2* (ou *MDR3*) — découvert par VAN DER BLIEK *et al* [418] — que nous appellerons *MDR2/3* dans la suite de ce travail, le gène murin *mMdr2* et le gène de hamster *Pgp3* [292].

STEINGOLD *et al*. [385] ont mis en évidence l'existence chez le chien d'un gène homologue au gène *MDR1*. Celui-ci présente une homologie de 93% avec le gène humain *MDR1*, de 74% avec le gène *MDR2* et de 90% avec les gènes *mMdr1a* de la souris et du hamster. Nous appellerons ce gène *cMdr1*.

Tableau 12 – La famille multigénique MDR

	Classe I	Classe II	Classe III
Homme	<i>MDR1</i> (<i>PGY1</i> ou <i>ABCB1</i>)	∅	<i>MDR2/3</i> (<i>PGY3</i> ou <i>ABCB4</i>)
Hamster [292]	<i>Pgp1</i>	<i>Pgp2</i>	<i>Pgp3</i>
Souris	<i>mMdr1a</i> (<i>mdr3</i>)	<i>mMdr1b</i> (<i>mdr1</i>)	<i>mMdr2</i>
Rat [369]	<i>rMdr1a</i> (<i>Pgp1</i>)	<i>rMdr1b</i> (<i>Pgp2</i>)	<i>rMdr2</i>
Chien	<i>cMdr1</i>		

Les différentes expériences de clonage et de transfection de ces différents gènes (voir II.4. Importance de la glycoprotéine P dans la résistance pléiotropique, en page 66) ont permis de démontrer l'importance de certains gènes *MDR* dans l'apparition du phénotype de résistance pléiotropique. Chez le rat, les gènes *Pgp1* et *Pgp2* possèdent une homologie de séquence plus importante entre eux qu'avec le gène *Pgp3*; il est probable que ces deux gènes soient issus de la duplication d'un gène ancestral n'ayant pas eu lieu chez les primates [292].

III.1.1.2. Glycoprotéine PGY3

La glycoprotéine PGY3 est une glycoprotéine P de classe III. Elle est codée par le gène *MDR2/3*. Ce gène est très lié au gène *MDR1* (que ce soit chez l'homme ou la souris) : ils sont tous deux localisés sur le bras long du chromosome 7 [120] en position q21.1 pour *MDR1* [46]

et q21.3 pour *MDR2/3* [212]. Le gène *MDR2/3* ne possède pas de rôle dans la résistance pléiotropique.

La PGY3 murine, codée par le gène *mMdr2*, est exprimée pratiquement exclusivement dans le foie, particulièrement dans la membrane du pôle apical des cellules des canalicules biliaires [44, 375]. Dès 1993, SMIT *et al.* [375] ont évoqué un rôle de cette protéine PGY3 dans la sécrétion biliaire de la phosphatidylcholine [108]. Les auteurs pensent que cette protéine pourrait être impliquée dans le transport des phospholipides et fonctionnerait comme une flippase. Des preuves du rôle de la PGY3 en tant que phosphatidylcholine-translocase ont été apportées en 1994 par une étude de RUETZ et GROS [333] utilisant un analogue photoactif de la phosphatidylcholine. Cette protéine est donc impliquée dans la sécrétion des lipides biliaires [298].

Une étude de DE VREE *et al.* [91] a mis en évidence que les malades atteints de cholestase familiale fibrinogène (voir encadré 1, ci-contre) présentaient une mutation du gène *MDR2/3* et une absence de la protéine PGY3.

Les résultats de l'étude menée par DE VREE *et al.* permettent de conclure à une *implication de la protéine PGY3 dans les cholestases familiales fibrinogènes de type 3*. L'absence de la protéine PGY3 (aussi appelée PFIC-3 par certains auteurs) entraîne donc une forte diminution de la concentration biliaire en phospholipides (lécithines). Or les phospholipides présents dans la bile permettent d'atténuer l'effet détergent de celle-ci, l'absence de phospholipides se manifeste donc par une augmentation de l'effet détergent et augmente ainsi la toxicité de la bile pour les ductules biliaires [91, 136].

Encadré 1 – Les cholestases familiales fibrinogènes (PFIC)

Les cholestases familiales fibrinogènes (ou PFIC pour « *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis* ») sont un ensemble de maladies du foie dont il existe 3 différents types [91] :

- les PFIC de type 1 dont l'origine serait un défaut dans la *synthèse des sels biliaires* ;
- les PFIC de type 2 (aussi appelé *maladie de Byler*) dont l'origine serait un défaut dans la *sécrétion des sels biliaires* — le taux d'activité des γ -glutamyl-transférases sériques (γ -GT) n'est pas modifié chez ces malades — ;
- les PFIC de type 3 dont l'origine est une diminution de la *sécrétion des phospholipides biliaires* sans modification de la sécrétion des sels biliaires [212] — le taux d'activité des γ -GT sériques est normal et des lésions hépatiques histologiques (inflammation portale et prolifération des canaux biliaires) sont observées.

III.1.1.3. Glycoprotéine BSEP/SPGP

Lors de sa découverte, en 1995, par CHILDS *et al.* [65], le gène codant cette glycoprotéine a tout d'abord été nommé *Spgp* (pour « *Sister of P-Glycoprotein* »). Dans cette étude, l'expression de ce gène se révèle être limitée au foie. Cette expression peut être mise en évidence sur foie normal chez le rat et chez le porc. La protéine *Spgp*, d'une masse moléculaire d'environ 160 kDa [132], est reconnue par l'anticorps C219 [65]. Le haut niveau d'expression de la *Spgp* dans le foie laisse supposer aux auteurs que cette glycoprotéine possède une fonction importante dans ce tissu.

a. *Fonction physiologique*

La *Spgp* a été isolée à partir d'ADNc pleine-longueur chez le rat [132] et la souris [224]. En transfectant des cellules Sf9 d'insecte (à l'aide d'un vecteur viral) avec de l'ADNc de rat, GERLOFF *et al.* [132] ont été les premiers à démontrer que la *Spgp* fonctionnait comme une pompe ATPase des sels biliaries : la *Bsep* pour « *Bile Salt Export Pump* ». Cette protéine *Bsep* est exprimée essentiellement, si ce n'est uniquement, dans le foie par les canalicules biliaries. GERLOFF *et al.* voient en cette protéine *Spgp* la principale pompe permettant la sécrétion canaliculaire de sels biliaries chez les mammifères, et peut-être la seule.

Cette conclusion sera renforcée par l'étude de STRAUTNIEK *et al.* [388] qui met en évidence que le gène codant la SPGP est muté chez les personnes atteintes de cholestases familiales fibrinogènes de type 2 (PFIC-2) ou *maladie de Byler*. Ce syndrome concerne les jeunes enfants et il est caractérisé par une très faible concentration de sels biliaries dans la bile, une concentration plasmatique élevée en sels biliaries et une activité normale des γ -glutamyltranspeptidases (γ -GT). Les patients atteints de PFIC-2 ont une *sécrétion* d'acides biliaries inférieurs à 1% des valeurs usuelles et la BSEP/SPGP n'est pas détectée par immunomarquage chez ces patients [187]. **Les résultats de ces travaux apportent les preuves que la SPGP est la pompe permettant la sécrétion des sels biliaries (BSEP).** La protéine SPGP est donc renommée BSEP ou BSEP/SPGP en rapport avec cette fonction.

Récemment, une étude sur la souris [432] démontre que l'inactivation du gène murin *Spgp* induit l'apparition d'une cholestase intrahépatique. Cependant, les souris dont le gène *Spgp* est inactivé ont une cholestase moins sévère que les malades atteints de PFIC-2. Ces résultats démontrent donc que la *Spgp/Bsep* permet la sécrétion des sels biliaries mais qu'il existe probablement un autre système de transport permettant leur sécrétion dans la bile.

b. Rôle dans la résistance pléiotropique

Étant donné la forte homologie (50–70 %) [65, 132, 211, 212] entre la glycoprotéine P (PGY1) codée par le gène *MDR1* et la protéine BSEP, il est logique de penser que cette dernière pourrait jouer un rôle dans la résistance pléiotropique.

Il a été montré chez le rat que la transfection du gène *Bsep* (ou ABCB11) induisait une faible résistance au paclitaxel mais pas à d'autres anticancéreux impliqués dans la résistance pléiotropique [166]. Cette résistance au paclitaxel peut être réversée par les agents réversants de la glycoprotéine P [66]. Des résultats similaires ont été démontrés sur la souris par LECUREUR *et al.* [224]. Les auteurs ont évalué l'activité de transport de la protéine Bsep murine en utilisant des cellules transfectées. Seul l'efflux de vinblastine était légèrement augmenté dans les cellules transfectées alors qu'aucun efflux n'a été constaté concernant la vincristine. Cette étude est la première à révéler que la Bsep transporte des composés différents de la PGY1.

Ces résultats indiquent que **la protéine Bsep ne joue probablement pas un rôle important dans l'élimination des xénobiotiques.**

Parmi les différentes isoformes de la glycoprotéine P, seule la glycoprotéine P codée par le gène *MDR1* semble être impliquée dans l'apparition d'un phénotype de résistance pléiotropique. Nous nous intéresserons donc principalement à cette protéine PGY1.

III.1.2. Structure de la glycoprotéine P (PGY1)

III.1.2.1. Analyse de séquence du gène *MDR1*

En 1986, le séquençage d'ADNc des gènes *MDR*, puis l'analyse de cette séquence, a permis de connaître la structure primaire de la glycoprotéine P et de proposer un modèle structural [62, 130, 149]. L'ADNc humain code une protéine de **1280 acides aminés**.

L'analyse de séquence indique que la glycoprotéine P est constituée de **deux moitiés fortement homologues** (43% d'homologie) de 610 acides aminés chacune et qui sont reliées par une séquence de liaison d'environ 60 acides aminés. Cette dernière région est très peu conservée entre les espèces.

Chaque moitié de la glycoprotéine P présente en son extrémité C-terminal un **site de liaison aux nucléotides** comprenant les séquences consensus A et B décrites par WALKER *et al.* [430].

La présence de ces sites de fixation est à l'origine d'une homologie avec de nombreuses autres protéines de transport énergie-dépendantes. Cette « super-famille » de protéines est la « super-famille » ABC (pour « *ATP binding cassette*»), elle comprend au moins 40 membres chez les bactéries. On retrouve aussi des protéines de cette famille chez le *Plasmodium falciparum* et le gène *CFTR*¹ fait aussi partie de cette famille [19]. Des gènes similaires ont été trouvés chez divers organismes primitifs, les insectes ou divers micro-organismes [19].

Le gène *MDR1* codant la glycoprotéine P est **composé de 28 exons** dont 14 codent la première moitié de la protéine et 13 la seconde [312]. L'homologie de séquence entre les deux moitiés de la glycoprotéine P a tout d'abord fait supposer à différents auteurs [62, 130, 149] que le gène *MDR1* s'était formé suite à la duplication d'un gène primitif.

En 1990, CHEN *et al.* [63] ont étudié l'organisation génomique du gène *MDR1*. Dans la plupart des cas connus de duplication de gène la position des introns dans chaque moitié est conservée, or dans cette étude les auteurs n'ont découvert qu'une très faible conservation de la position des introns dans les deux moitiés de la glycoprotéine P. Seuls les introns codant les sites de liaison à l'ATP sont fortement conservés [312]. Les résultats des travaux de CHEN *et al.* laissent penser que la glycoprotéine P résulte d'une fusion de gènes codant deux protéines analogues mais ayant évolués indépendamment. Une autre possibilité est que les introns aient subi des déplacements importants après la duplication génique [312].

III.1.2.2. Topologie de la glycoprotéine P

a. *Modèle proposé à partir de l'analyse du profil d'hydrophatie de la glycoprotéine P*

Ce modèle est issu de deux études indépendantes réalisées par GROS *et al.* [149] et par CHEN *et al.* [62], utilisant chacune une méthode d'analyse différente : les méthodes de KYTE-DOOLITTE et de EISENBERG [38].

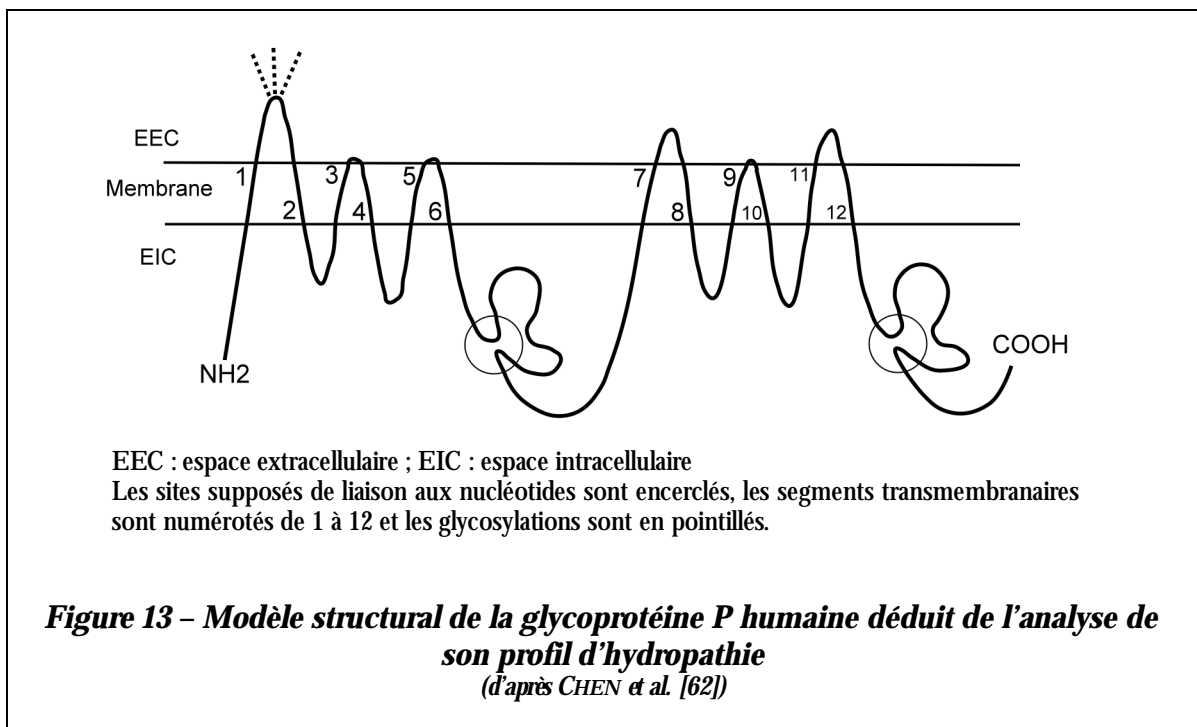
¹ Le gène *CFTR* code la protéine de même nom ; la mutation de ce gène est responsable de la mucoviscidose.

Dans ce modèle, **chaque moitié** de la glycoprotéine P est **divisée en deux régions** :

9 une **région N-terminal** possédant une très faible homologie de séquence avec la région N-terminal de l'autre moitié de la glycoprotéine P ;

9 une **région C-terminal** fortement homologue d'une moitié à l'autre. Ces deux régions C-terminal forment, chacune, une large boucle intracytoplasmique correspondant à un site de liaison à l'ATP.

Dans chaque moitié, six segments composés d'une vingtaine d'acides aminés exclusivement hydrophobes (GLY, ALA, VAL, LEU, ILE, PHE) ont été identifiés comme des segments transmembranaires. Ces segments transmembranaires sont reliés par des boucles extracellulaires parfois très courtes et par des boucles intracellulaires plus longues (figure 13, ci-dessous).

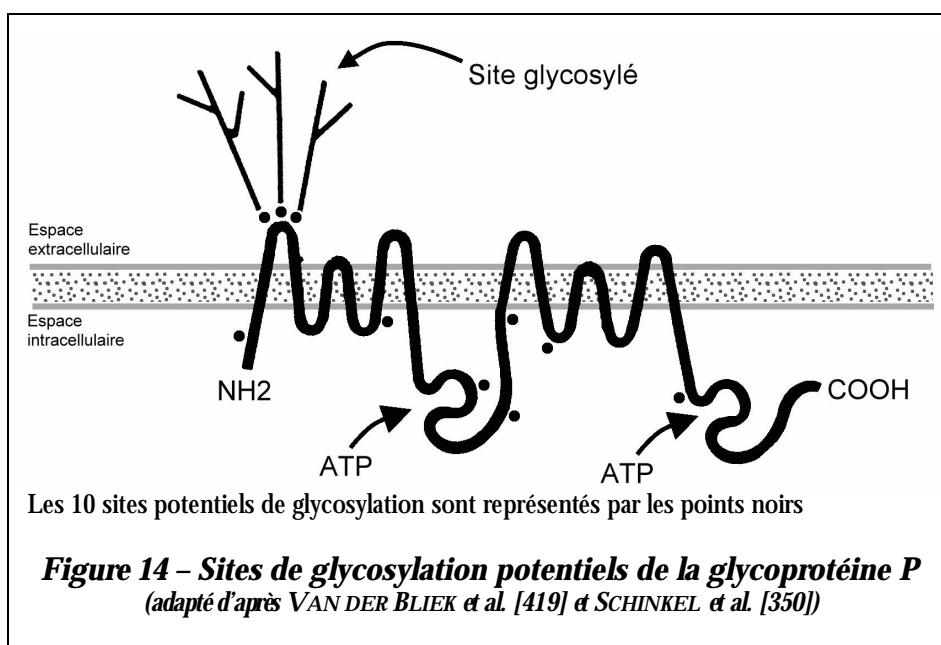


Les segments transmembranaires de ce modèle structural ont été établis à l'aide d'un algorithme décrit par EISENBERG *et al.* [106]. La position de ces segments transmembranaires est indiquée dans le tableau 13, en page 78.

Tableau 13 – Position des segments transmembranaires de la glycoprotéine P
(d'après CHEN et al. [62])

Segments transmembranaires	Acides aminés	Segments transmembranaires	Acides aminés
TM 1	52–72	TM 7	711–731
TM 2	120–140	TM 8	757–777
TM 3	189–209	TM 9	833–853
TM 4	216–236	TM 10	854–874
TM 5	297–317	TM 11	937–957
TM 6	326–346	TM 12	974–994

Bien que la glycoprotéine P contienne 10 sites permettant une glycosylation (figure 14, ci-dessous), seule la première boucle extracytoplasmique de la moitié N-terminale semble être glycosylée au niveau de 3 des 10 sites de glycosylation potentiels [323].



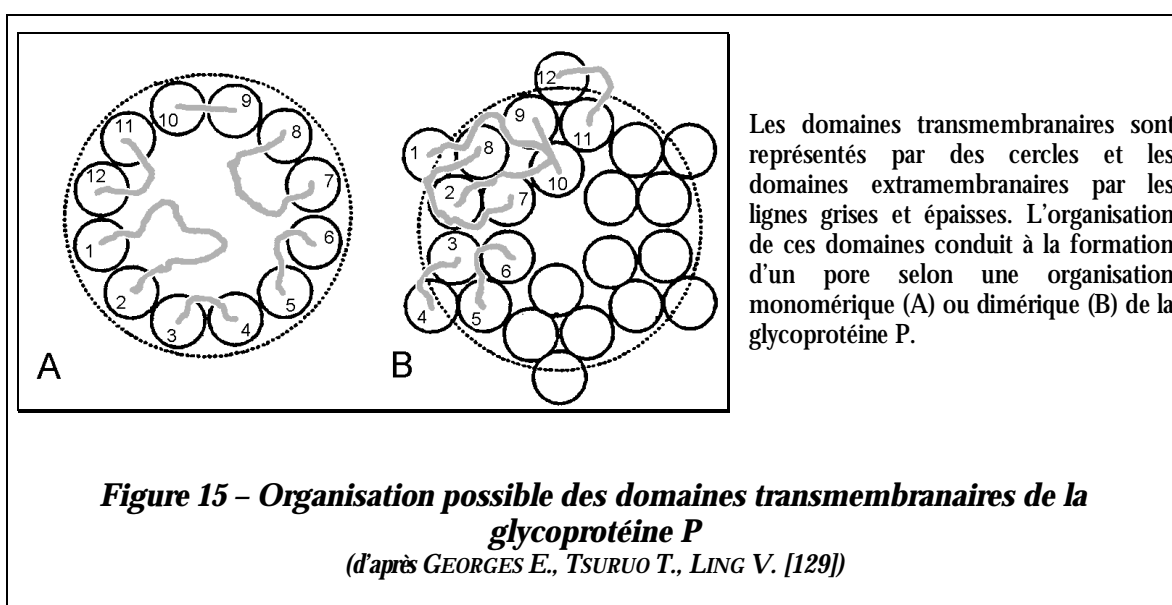
Ce modèle de la glycoprotéine P avec 12 segments transmembranaires (TM1–TM12) est soutenu expérimentalement par les résultats de plusieurs études. Des études utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes permettent d'identifier :

9 en région intracytoplasmique, les segments C-terminal et N-terminal [128, 199, 443] ainsi que les deux sites de liaison à l'ATP [133, 199].

9 en position extracellulaire, les première et quatrième boucles supposées extracellulaires dans le modèle de CHEN *et al.* [70, 129].

La position extracellulaire supposée de la première boucle glycosylée a été confirmée par des expériences de mutagenèse dirigée sur les sites de glycosylation de cette boucle [350].

L'ensemble pourrait former un *pore* au travers de la membrane plasmique et servir de *canal* aux médicaments anticancéreux (figure 15, ci-dessous).



Cependant, le nombre de segments transmembranaires et leurs positions ont été discutés et d'autres modèles pour la topologie de la glycoprotéine P ont été proposés.

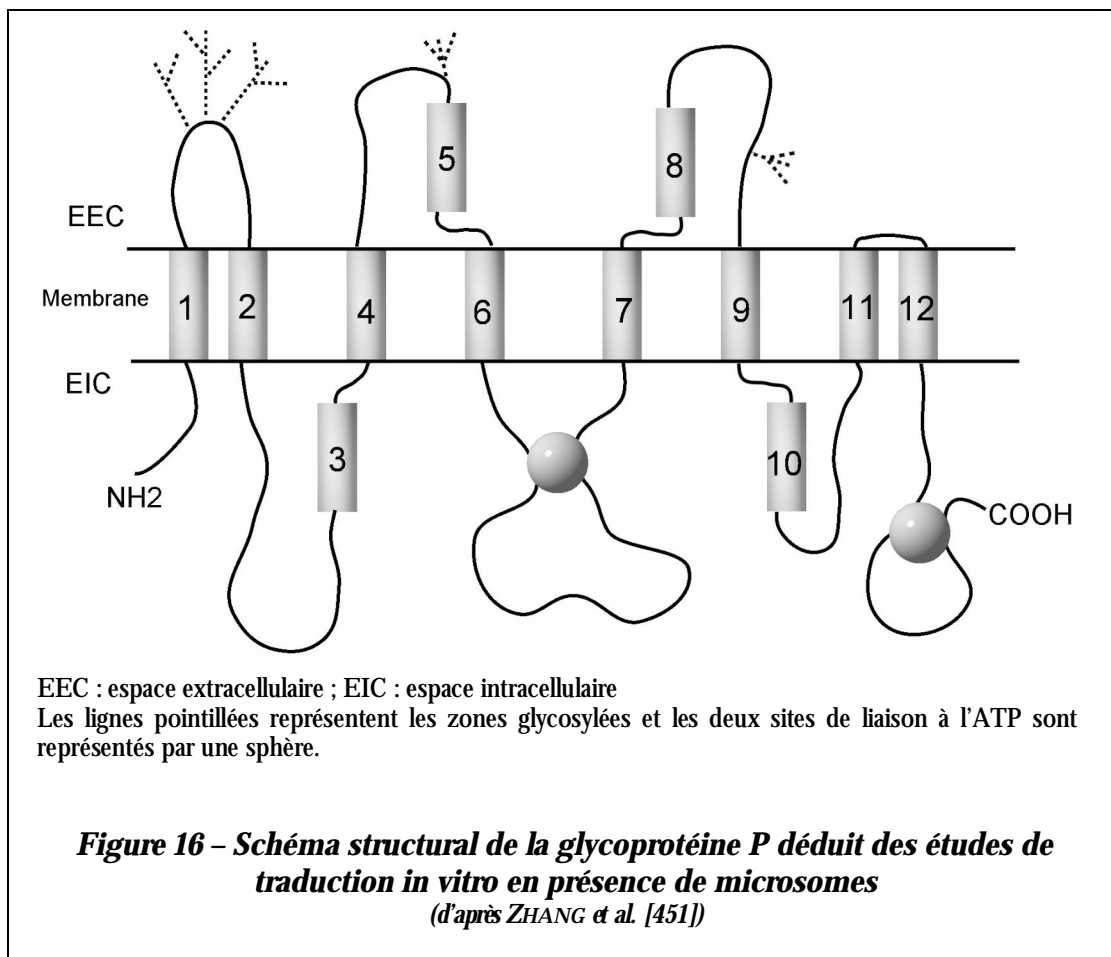
- b. Modèles basés sur l'analyse *in vitro* de glycoprotéine P tronquée

≈ Modèle '4+4'

ZHANG *et al.* [451, 452] ont essayé de vérifier que les segments supposés transmembranaires se trouvaient bien dans la membrane plasmique et que les boucles extra- et intracellulaires étaient bien dans les localisations attendues. Les auteurs ont analysé des glycoprotéines tronquées (en utilisant des protéases) d'abord traduites *in vitro* et transloquées dans des microsomes : les parties synthétisées en localisation endoluminale (inaccessibles aux protéases) se retrouveront logiquement en position extracellulaire et les parties extraluminales

en position intracellulaire. Une première étude de ces auteurs concernait la moitié C-terminal de la protéine [452], une autre étude concernait la moitié N-terminal [451].

Dans les deux cas, les résultats de ces études indiquent que la topologie de la glycoprotéine P n'est pas celle du modèle proposé initialement : les domaines transmembranaires TM3 et TM10 seraient en fait intracytoplasmiques et les domaines TM5 et TM8 extracytoplasmiques (figure 16, ci-dessous). Les auteurs ont aussi mis en évidence la présence de deux autres sites de glycosylation sur la glycoprotéine P murine codée par le gène *mMdr1b* : sur la boucle située entre TM8 et TM9 [452] et celle située entre TM4 et TM5 [451].



≈ Modèle '6+4'

L'expression de glycoprotéines P tronquées et fusionnées à un marqueur génétique dans des oocytes de *Xenopus* a été étudiée par différents auteurs [370, 371, 372]. Les auteurs suggèrent un modèle comprenant 6 domaines transmembranaires pour la moitié N-terminal de la protéine et 4 pour la moitié C-terminal (figure 21, en page 86).

≈ Autres modèles

Des expériences [25, 30] permettant l'expression du gène *mMdr1b* par des bactéries *Escherichia coli* laissent penser :

9 que la moitié N-terminal de la glycoprotéine P traverse effectivement la membrane plasmique 6 fois mais d'une façon différente de celle qui est présentée par le modèle de la figure 13 (en page 77) [30] ;

9 que le domaine TM7 peut être composé de deux régions traversant la membrane plasmique, positionnant ainsi la moitié C-terminal de la glycoprotéine P asymétriquement à la moitié N-terminal [25] (figure 21-D, en page 86).

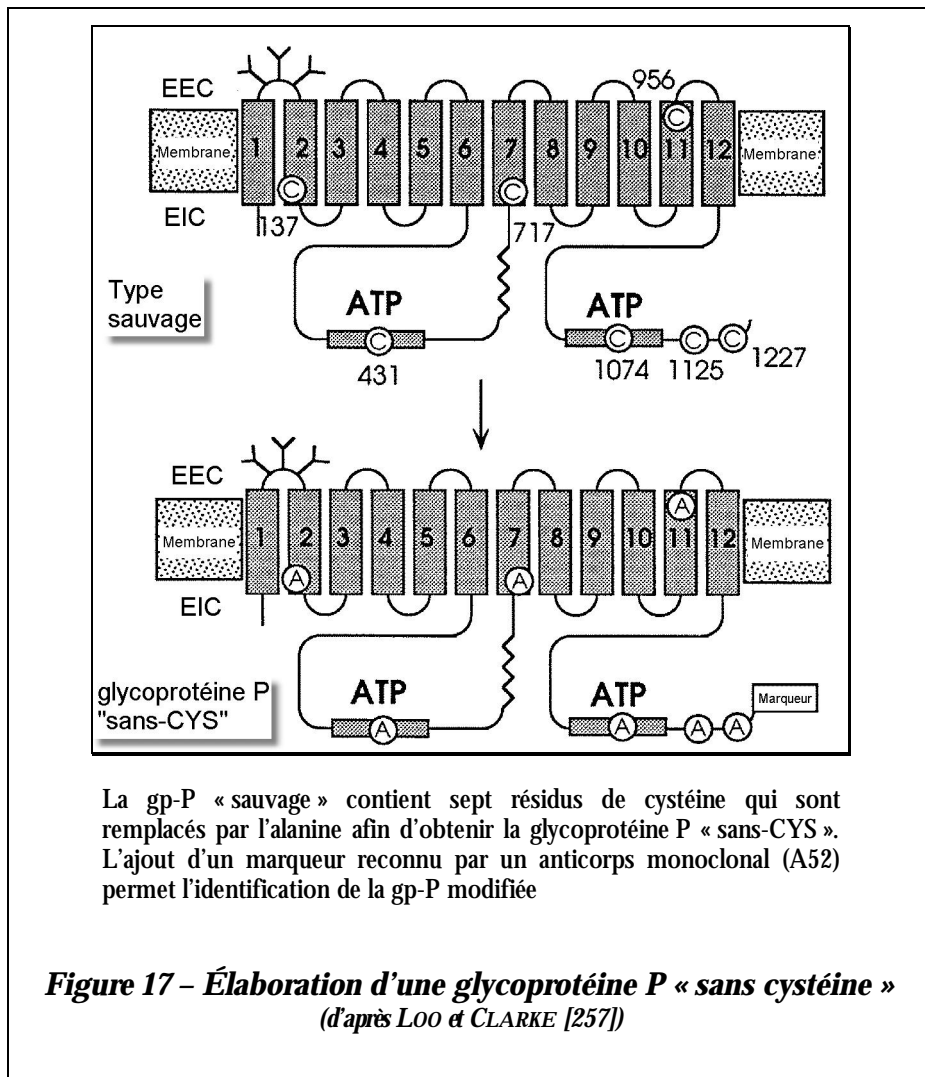
Toutes ces méthodes utilisant des glycoprotéines P tronquées sont donc en faveur d'un modèle structural de la glycoprotéine P différent de celui qui est déduit de l'analyse du profil d'hydropathie (figure 13).

c. *Modèles basés sur l'insertion de marqueurs in vivo*

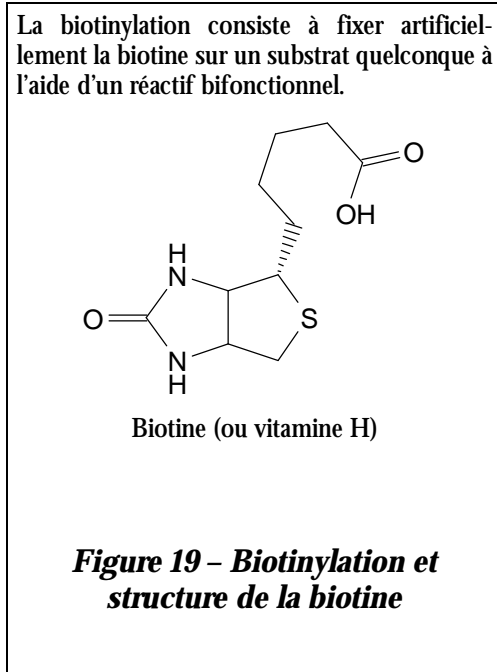
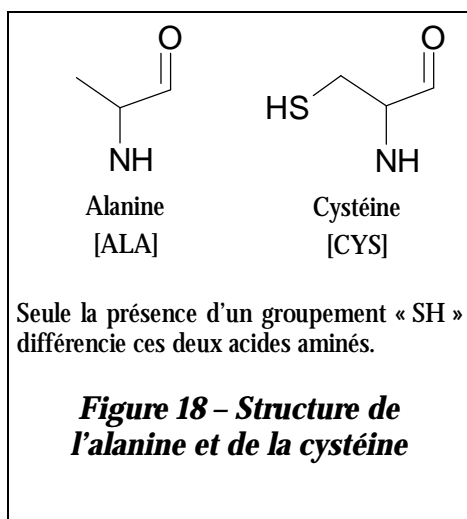
Dans ces études, de l'ADNc pleine-longueur mutant est exprimé dans des cellules de mammifères et des *marqueurs* sont insérés et identifiés à l'aide d'anticorps spécifiques d'épitope ou de réactifs de marquage [203].

≈ Glycoprotéines P mutantes dépourvues de cystéine

LOO et CLARKE [252] ont synthétisé des glycoprotéines P humaines dépourvues de cystéine (CYS) en utilisant de l'ADNc dont les codons CYS ont été remplacés par des codons codant l'alanine (figure 17, en page 82). Ces deux acides aminés ont une structure voisine (figure 18, en page 83). Les auteurs ont vérifié que ces modifications n'altèrent pas la capacité de la glycoprotéine P à conférer le phénotype de résistance pléiotropique. Un épitope reconnu par l'anticorps monoclonal A52 a été ajouté à l'extrémité C-terminal de la protéine (voir figure 17, en page 82) pour permettre d'identifier l'expression de la glycoprotéine P mutante « sans-cystéine ». L'ajout de 10 résidus histidine à cette même extrémité permet de faciliter la purification de cette gp-P-A52.

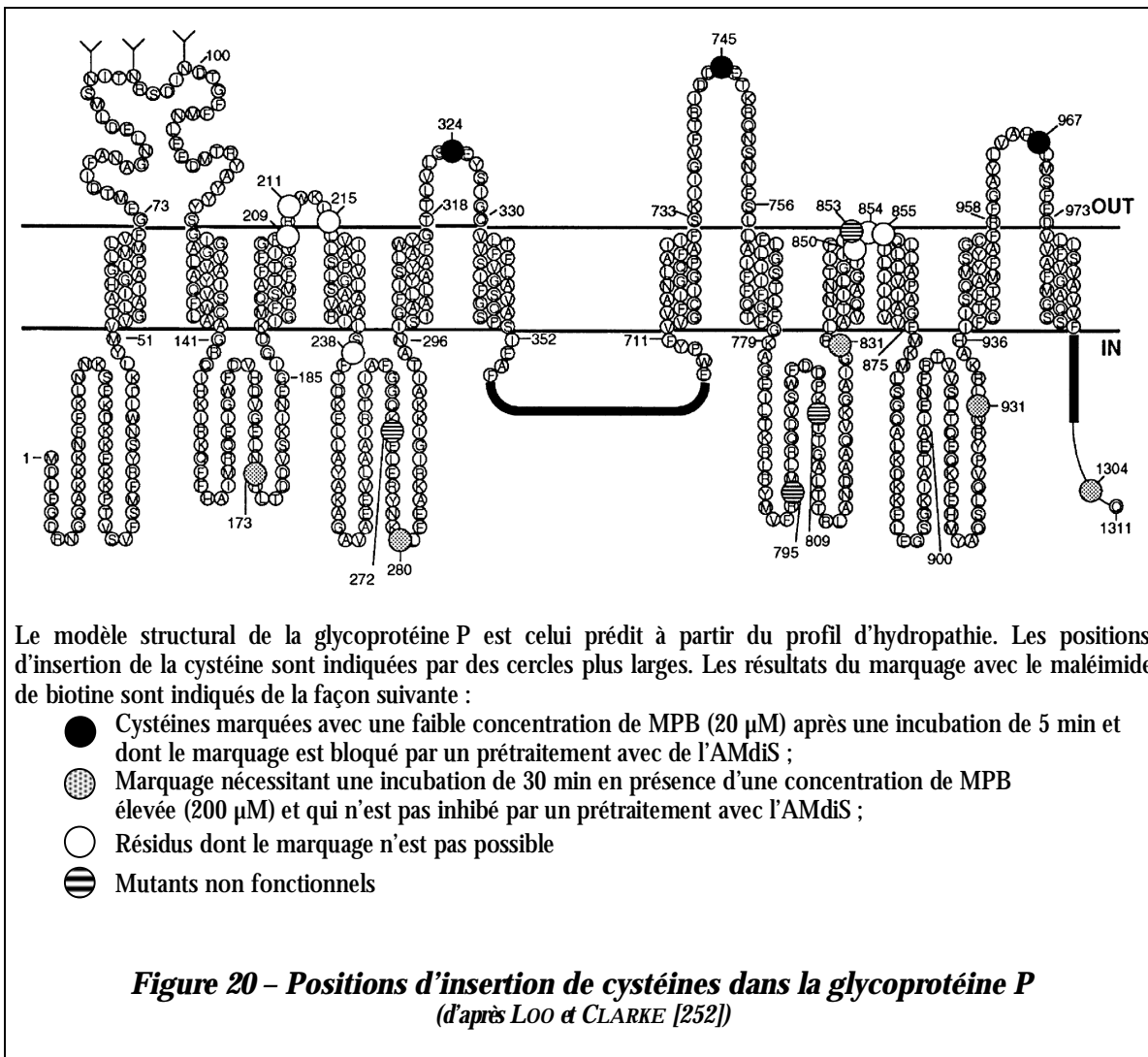


Les auteurs ont ensuite réintroduit la cystéine à des positions choisies dans les boucles supposées extra- ou intracellulaires. Ces positions sont représentées sur la figure 20, en page 84. La topologie de la glycoprotéine P peut ainsi être étudiée en utilisant des réactifs spécifiques du groupement « thiol » de la cystéine et capables ou non de traverser la membrane cellulaire : l'acide 4-acétamido-4'-maléimidylstilbène-2,2'-disulfonique (AMdiS) qui ne traverse pas les membranes et le 3-(N-maléimidylpropionyl)biocytine (MPB) pouvant être révélé par chimiluminescence et pouvant traverser les membranes s'il est utilisé à de fortes concentrations. Le MPB permet une biotinylation de la cystéine et un prétraitement avec l'AMdiS empêche la biotinylation des résidus de cystéines ayant été en contact avec ce produit.



Cette étude montre qu'en présence d'une faible concentration de MPB et sans prétraitement avec l'AMdiS, les résidus cystéine insérés dans les boucles reliant les domaines TM5–TM6, TM7–TM8 ou TM11–TM12 (supposées extracellulaires) sont biotinylés. De plus cette biotinylation est **inhibée** par un prétraitement avec l'AMdiS. Ces résultats permettent de penser que ces résidus sont en position **extracellulaire**.

Par contre, si l'insertion de résidus cystéine a lieu en positions 173, 280, 831, 931 et 1304 (boucles IC2, IC3, IC4 et IC5), la biotinylation (figure 19, ci-dessus) nécessite une concentration plus élevée de MPB et elle **n'est pas inhibée** par un prétraitement avec l'AMdiS. Ces données indiquent que ces résidus sont en position **intracellulaire**.



≈ Insertion d'épitope

La topologie de la moitié N-terminal de la glycoprotéine P a été étudiée par KAST *et al.* en 1995 [202]. Ces auteurs ont inséré un épitope contenant une partie de l'hémagglutinine du virus de la grippe en plusieurs positions. Seule la topologie des glycoprotéines P **fonctionnelles** ainsi produites est étudiée par les auteurs. Les épitopes insérés aux positions 161 et 376 correspondent à une localisation intracellulaire alors que les marqueurs insérés aux positions 101 et 320 sont détectés du côté extracellulaire de la membrane plasmique.

Les résultats de cette étude indiquent donc que les boucles séparant les domaines TM1-TM2 et TM5-TM6 sont extracellulaires alors que la boucle reliant les régions TM2-TM3 et celle située en aval de TM6 sont intracellulaires. Ces données sont compatibles avec un modèle à six segments transmembranaires de la moitié N-terminal de la glycoprotéine P

possédant une région glycosylée extracellulaire (TM1–TM2) et un site de liaison à l'ATP intracellulaire (en aval du domaine TM6).

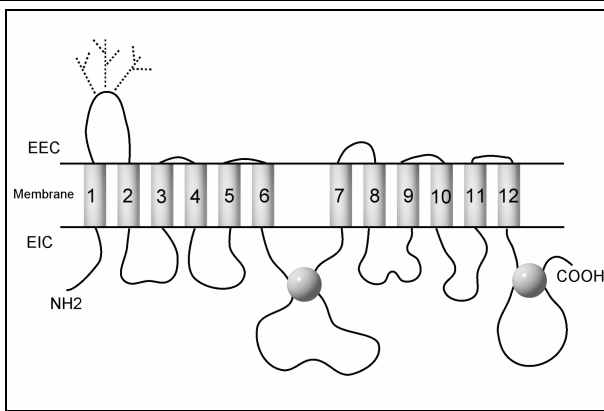
Dans une autre étude [203], les auteurs ont utilisé ce même procédé pour localiser une autre série de boucles de la glycoprotéine P. Ainsi, les segments reliant les domaines TM4–TM5, TM10–TM11 et en aval du domaine TM12 correspondent à des régions intracellulaires et les segments reliant TM7–TM8, TM9–TM10 et TM11–TM12 à des régions extracellulaires.

Ces différentes études, utilisant l'insertion de marqueurs dans la séquence de la glycoprotéine P, confirment donc le modèle déduit de l'analyse du profil d'hydrophatie de cette protéine.

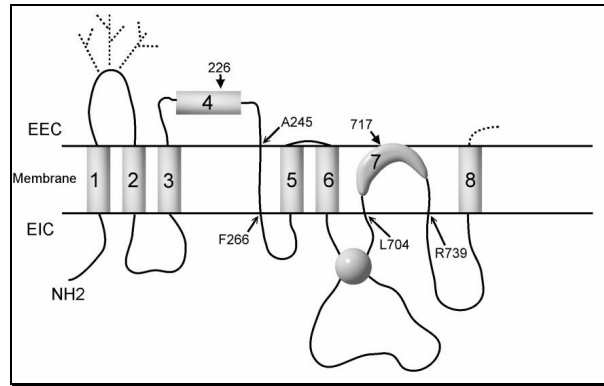
d. Conclusion

Comme nous venons de le voir les différentes méthodes employées pour déterminer la topologie de la glycoprotéine P ont abouti à des modèles différents (figure 21, en page 86). Étant donné que les domaines membranaires de la glycoprotéine P sont responsables de la reconnaissance et de l'interaction avec ses différents substrats et inhibiteurs [146], il est important de connaître sa topologie.

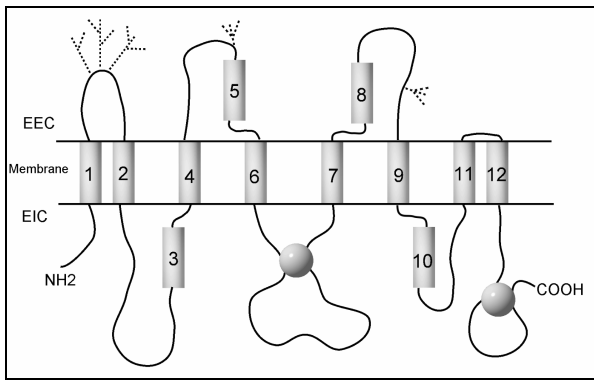
Une explication possible de ces découvertes contradictoires est que tous ces différents modèles peuvent être présents dans la membrane cellulaire mais en faible quantité [257]. Une autre explication peut être que les différentes topologies trouvées soient liées à des stades fonctionnels différents de la glycoprotéine P [453]. Dans certains modèles, la troisième boucle supposée intracytoplasmique (reliant TM8–TM9) apparaît être extracytoplasmique et glycosylée. Cependant, il semble que seule la glycoprotéine P répondant au modèle structural '6+6' permette une interaction avec les substrats de la glycoprotéine P [254].



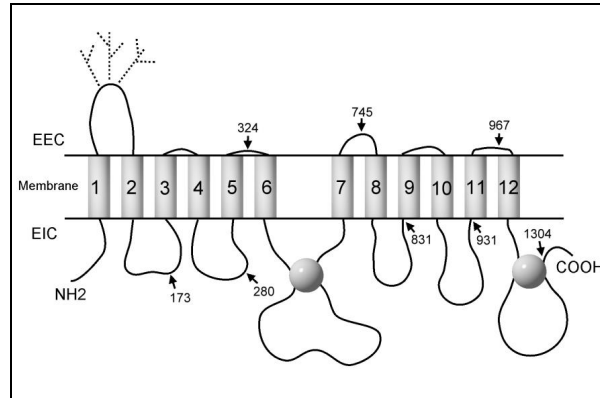
A – Modèle '6+6' basé sur le profil d'hydrophatie



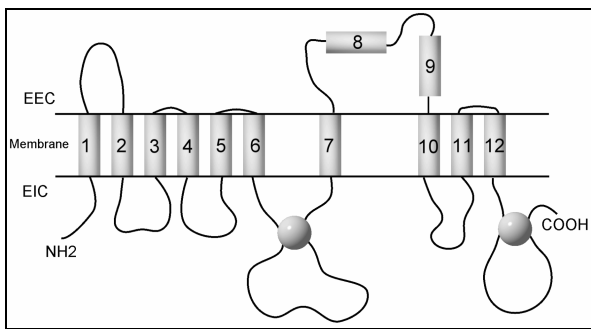
D – Modèle proposé par BÉJA et BIBI [25]



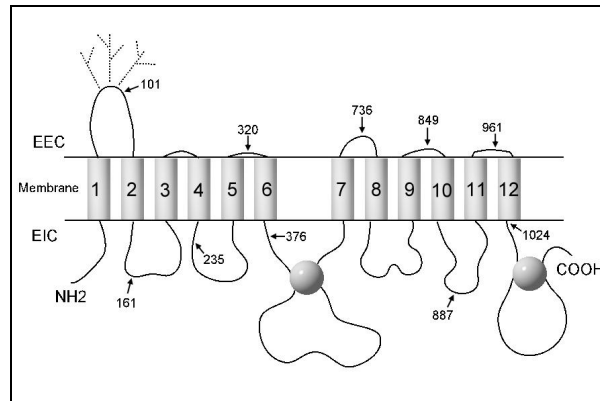
B – Modèle '4+4' proposé par ZHANG *et al.* [451]



E – Modèle proposé par LOO et CLARKE [252]



C – Modèle '6+4' proposé par SKACH *et al.* [370, 371, 372]

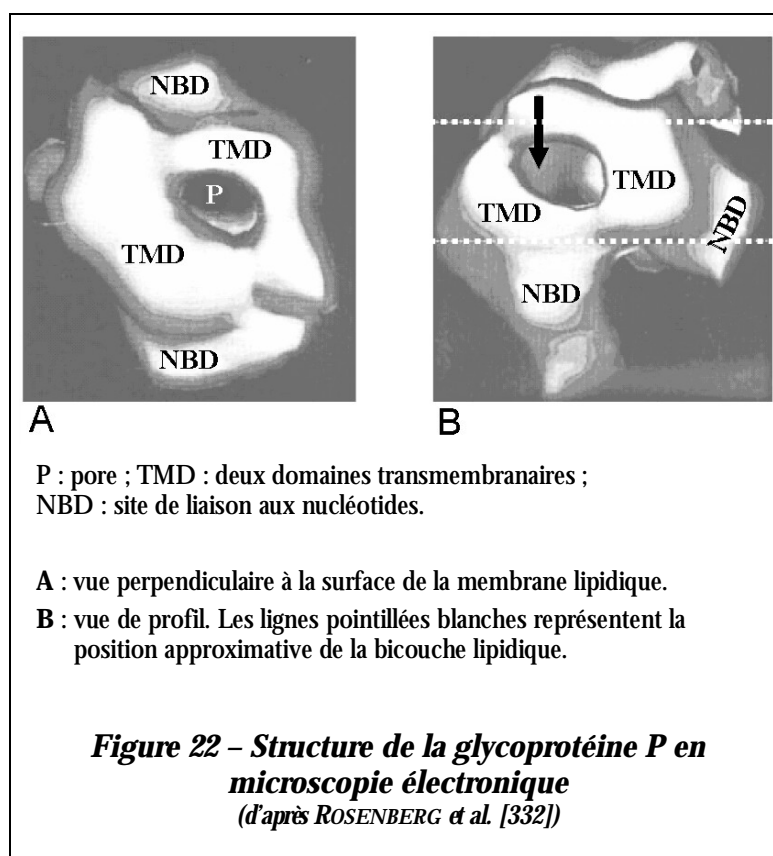


F – Modèle proposé par KAST *et al.* [203]

Figure 21 – Différents modèles proposés pour la topologie membranaire de la glycoprotéine P

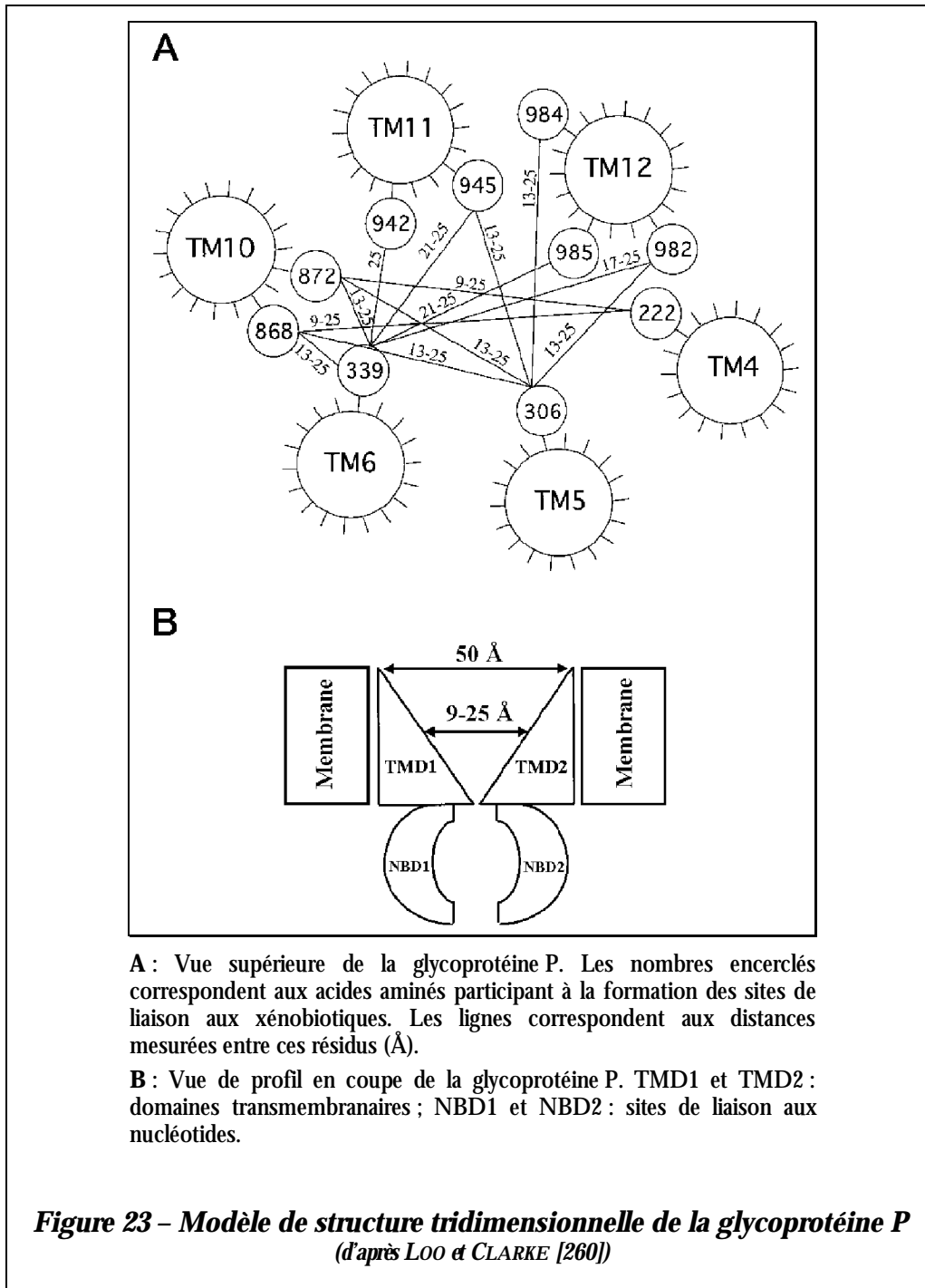
La première étude utilisant la microscopie électronique pour déterminer la structure tridimensionnelle de la glycoprotéine P a été effectuée en 1997 par ROSENBERG *et al.* [332]. La résolution utilisée était de 2,5 nm. Les auteurs ont présenté un premier modèle structural tridimensionnel pour la glycoprotéine P (figure 22, ci-dessous). Ce modèle est entièrement compatible avec le modèle '6+6' dont les moitiés de la glycoprotéine P forment un canal central.

La structure visualisée en microscopie électronique (figure 22, ci-dessous) représente un « cylindre » d'environ 10 nm de diamètre et d'une hauteur de 8 nm. Vue du côté extracellulaire, la glycoprotéine P est circulaire avec un large pore d'un diamètre de 5 nm. Ce pore est nettement plus petit du côté cytoplasmique. Dans une récente étude [260], LOO et CLARKE ont étudié les dimensions de la région permettant la liaison aux médicaments (figure 23, en page 88).



La structure observée en microscopie électronique est compatible avec la présence de sites de liaisons aux médicaments du côté cytoplasmique et un fonctionnement de type « flippase » de la glycoprotéine P [332]. La glycoprotéine P étant un membre de la superfamille de transporteurs ABC, il n'est pas impensable que cette structure représente un modèle

général pour ces transporteurs. Cette architecture avec un large pore sur la face extracellulaire est tout à fait adaptée à l'élimination de substances très différentes en taille avec seulement quelques modifications mineures du « portail » en face intracellulaire [332].

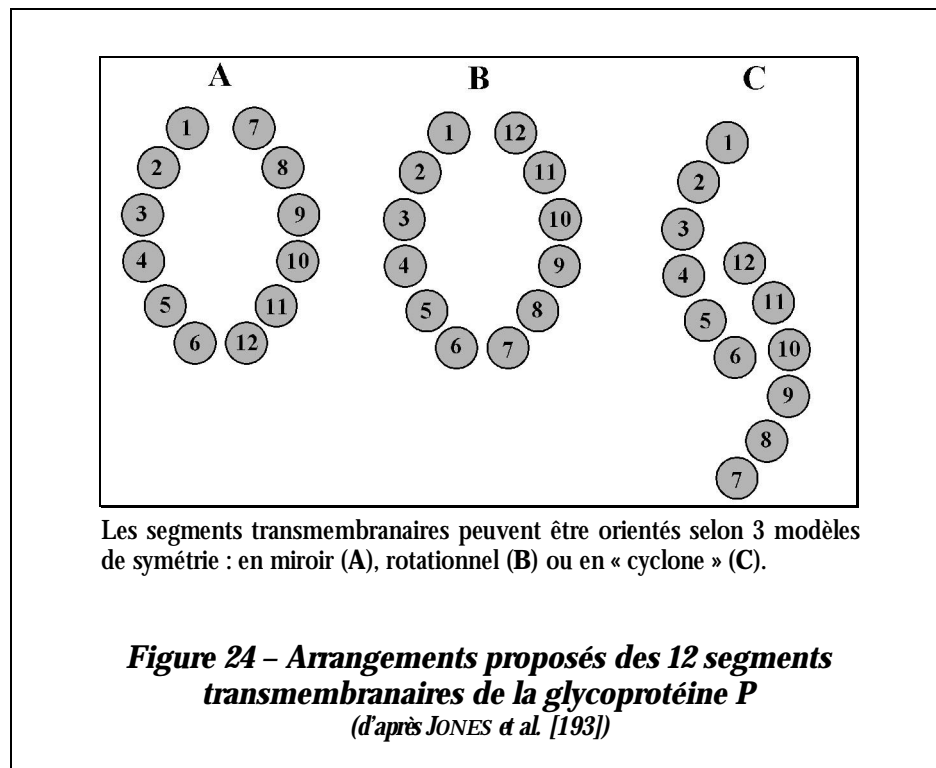


Actuellement, le modèle structural de la glycoprotéine P le plus « adopté » est le modèle '6+6' constitué de 12 hélices α et de structures β [193]. Cependant, cette structure secondaire est discutée et la proportion d'hélices α et de structures β varie selon les études : le

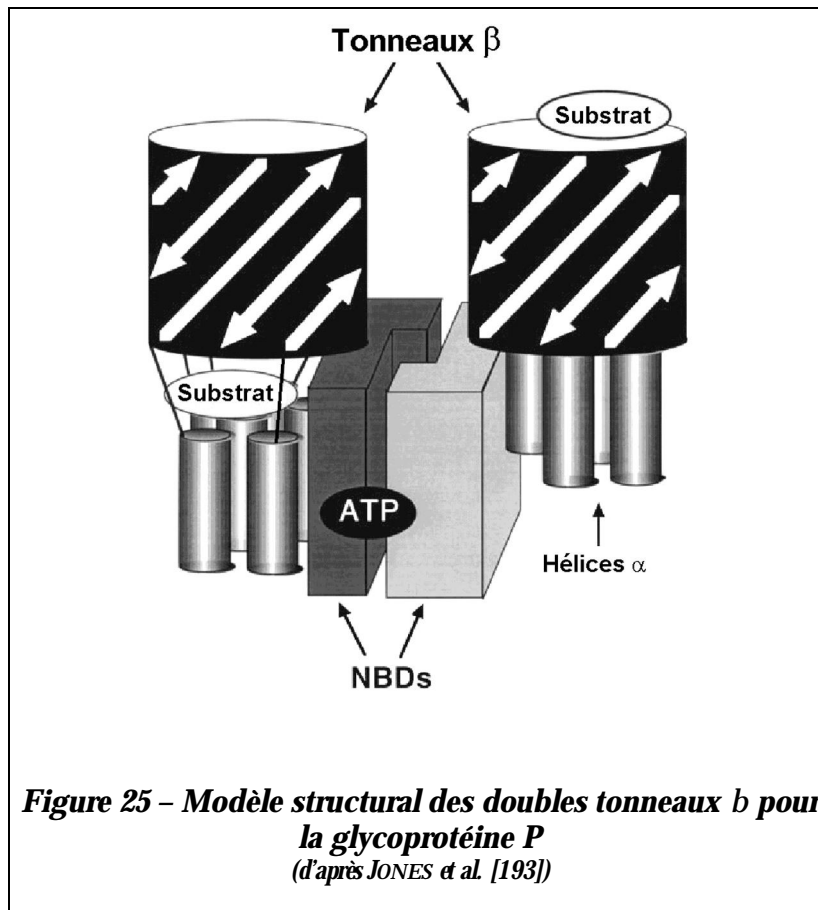
modèle « classique » est confirmé par les études utilisant la spectroscopie de dichroïsme circulaire [103] mais est infirmé par les études de spectroscopie infrarouge par transformation de FOURIER [380].

Une autre question est celle du positionnement des différents segments transmembranaires les uns par rapport aux autres : différents arrangements sont proposés (figure 24, ci-dessous).

L'étude des liaisons covalentes formées entre des résidus de cystéines insérés dans la structure de la glycoprotéine P permettent de savoir que le segment TM6 est proche des segments TM10, TM11 et TM12 et que le segment TM12 est proche des segments TM4, TM5 et TM6 [258]. Selon que l'organisation de la glycoprotéine P est monomérique ou multimérique certains de ces arrangements peuvent être adoptés ou non. Or, différents types d'organisation (monomérique, dimérique, oligomérique) de la glycoprotéine P ont aussi été mis en évidence [253, 395]. De plus, il est aussi possible que des changements de conformation interviennent lors de la liaison des substrats à la glycoprotéine P [395] ; le positionnement d'un segment par rapport à un autre peut ainsi évoluer selon que la glycoprotéine P est liée ou non à un substrat.



JONES *et al.* [193] pensent que les segments transmembranaires hydrophobes pourraient ne pas être des hélices α et proposent un modèle structural où la protéine formerait deux pores transmembranaires constitués par deux « tonneaux β ¹ » (figure 25, ci-dessous). Actuellement, aucune conformation n'a été confirmée avec certitude [102].



Très récemment, DIOCIAIUTI *et al.* [102] sont parvenus à purifier la glycoprotéine P et à l'insérer dans la bicouche lipidique de liposomes. Ils ont étudié la structure de la glycoprotéine P avec des techniques de microscopie électronique en transmission (MET) et de microscopie à force atomique (MFA). Dans cette étude la glycoprotéine P n'apparaît que sous la forme de monomères.

¹ Les tonneaux β sont des repliements β se présentant sous la forme d'un feuillet refermé sur lui-même, c'est à dire d'un tonneau dans lequel le premier brin est connecté au dernier par des liaisons H.

III.1.3. Biosynthèse et modifications post-traductionnelles

III.1.3.1. Biosynthèse de la glycoprotéine P

Conformément avec la fonction de pompe ATPase permettant l'efflux d'une large variété d'agents cytotoxiques, les études d'immunocytochimie ont démontré que la glycoprotéine P chez l'homme était située principalement dans la membrane plasmique à la surface des cellules multichimiorésistantes [439]. De faibles quantités de glycoprotéines P ont aussi été trouvées sur des organelles comme l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique.

Cette localisation membranaire à la surface cellulaire a aussi été trouvée lors d'études avec des systèmes d'expression hétérologues tels que le système cellules d'insectes–baculovirus ou la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, dans ces systèmes, une grande partie des glycoprotéines P recombinantes est présente dans les membranes intracellulaires (appareil de Golgi ou enveloppe nucléaire). Il a été suggéré que cela soit lié à une incapacité de ces systèmes à permettre une maturation correcte de cette protéine exogène [111]. L'addition de glycérol en guise de « substance chimique chaperonne » permet d'ailleurs d'augmenter le taux d'expression de glycoprotéine P à la surface cellulaire de *S. cerevisiae* [115].

Actuellement, encore peu d'informations sur la biosynthèse de la glycoprotéine P et sa migration vers la surface cellulaire sont disponibles. LOO et CLARKE [248] ont constaté que des glycoprotéines P ayant subis des mutations de la région TM7 n'étaient pas capables de conférer le phénotype MDR et que leur masse moléculaire était d'environ 150 kDa (170 kDa pour la glycoprotéine P « sauvage »). Ces auteurs ont mis en évidence que la forme immature de ces glycoprotéines P mutantes était associée avec la calnexine qui est une protéine chaperonne. Seules les formes immatures des glycoprotéines P « sauvages » sont capables de se séparer de la calnexine et d'être ainsi dirigée vers la surface cellulaire ; les formes mutantes restent liées à la calnexine, ne quittent pas le réticulum endoplasmique et sont dégradées. Ces résultats laissent penser que la glycoprotéine P subit ainsi un « contrôle de qualité » par l'intermédiaire d'une protéine chaperonne, la calnexine [248].

La calnexine serait impliquée dans le rapprochement des deux moitiés de la glycoprotéine P alors qu'une autre protéine chaperonne, la Hsc70, participerait à celui des deux sites de liaison à l'ATP [250].

Une étude récente a démontré que la glycoprotéine P n'est pas fonctionnelle immédiatement après sa biosynthèse [255]. L'étude des différentes étapes nécessaires à sa

maturation et de leur inhibition possible permet d'envisager des solutions thérapeutiques nouvelles contre la résistance pléiotropique liée à la glycoprotéine P.

Très récemment, LUCIANI *et al.* [263] ont mis en évidence, sur des cellules lymphoïdes, que la polarisation de l'expression glycoprotéine P dans la cellule est corrélée avec celle de la famille de protéines ERM (Ezrin/Radixin/Moesin). De plus, un traitement avec des oligonucléotides antisens de ces protéines restaure la chimiosensibilité des cellules exprimant la glycoprotéine P en corrélation avec une inhibition de l'efflux médicamenteux et de l'association actine/glycoprotéine P, ainsi qu'avec une redistribution cellulaire de la glycoprotéine P. Ces résultats laissent penser que l'association de la glycoprotéine P avec l'actine cytosquelettique — par l'intermédiaire des protéines ERM — est une étape clé dans le développement du phénotype MDR des cellules lymphoïdes.

III.1.3.2. Modifications post-traductionnelles

Une large variété de masses moléculaires (130–200 kDa) a tout d'abord été rapportée par les premières études se basant sur la migration de la glycoprotéine P sur le gel d'électrophorèse. Il a été démontré qu'une telle hétérogénéité pouvait provenir des conditions expérimentales [110]. Les séquences d'ADNc pleine-longueur isolées chez la souris et l'homme indiquent une masse moléculaire d'environ 140 kDa pour la glycoprotéine P [62, 149]. Les masses moléculaires les plus élevées de glycoprotéines P matures résultent de modifications post-traductionnelles. Ces modifications incluent au minimum des glycosylations et des phosphorylations [110].

a. *Glycosylation de la glycoprotéine P*

La glycoprotéine P est synthétisée sous la forme d'un précurseur non glycosylé d'une masse moléculaire de 120–140 kDa qui subit ensuite une maturation avec une durée de demi-vie ($t_{1/2}$) de 1–2 heures chez l'homme et de 20–30 min chez la souris [315]. La forme mature de la glycoprotéine P a une masse moléculaire de 130–180 kDa selon le type cellulaire et l'espèce dans laquelle elle est exprimée. RICHERT *et al.* [315] ont montré que la glycoprotéine P était N-glycosylée. Chez l'homme, il a été démontré que la glycoprotéine P est glycosylée aux positions suivantes : ASN91, ASN94 et ASN99 [350] (figure 14, en page 78). Il semble que seule la moitié N-terminal de la glycoprotéine P soit glycosylée [133, 250].

La glycosylation de la glycoprotéine P n'a suscité que peu d'étude puisque différentes études ont montré que cette glycosylation semblait ne pas avoir d'effet sur son activité [110,

133, 323]. Cependant, une étude de SCHINKEL *et al* [350] en 1993 a permis de montrer que même si l'absence de glycosylation n'altère pas le niveau de résistance ni le profil de résistance croisée, elle réduit de façon importante l'efficacité avec laquelle des lignées résistantes peuvent être obtenues par sélection. Ce qui indique que cette glycosylation est essentielle pour une mise en place correcte et une bonne stabilité de la glycoprotéine P. Une autre étude montrera que la déglycosylation de la glycoprotéine P diminue son activité concernant la daunorubicine [220].

Nous savons maintenant que cette glycosylation est indispensable au processus de maturation de la glycoprotéine P et que, sans glycosylation, la glycoprotéine P ne peut pas être acheminée à la surface cellulaire [255].

b. *Phosphorylation de la glycoprotéine P*

è **La glycoprotéine P est phosphorylée**

La phosphorylation de la glycoprotéine P a été évoquée très tôt dans l'étude du phénotype de résistance pléiotropique [48]. Cette phosphorylation a été observée dans de nombreuses lignées cellulaires chez l'homme ou les rongeurs. Les glycoprotéines P recombinantes sont, elles-aussi, phosphorylées [133]. Le rôle de la phosphorylation de la glycoprotéine P et l'identification des protéines kinases impliquées a été très étudié, en particulier parce que les mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation ont été supposés être à l'origine de la régulation de l'activité d'efflux de la glycoprotéine P [48, 49, 156] ; propriété qui offrirait une cible potentielle pour le développement de modulateurs du phénotype de multichimiorésistance.

è **Protéines kinases impliquées**

Puisque le précurseur de la glycoprotéine P ($M = 140$ kDa) n'est pas phosphorylé et que la glycoprotéine P mature est intégrée dans la membrane plasmique, les protéines kinases agissant à ce niveau sont probablement impliquées [133]. La phosphorylation *in vitro* de la glycoprotéine P par la protéine kinase C (PKC) [334] a été démontrée sur des cellules multichimiorésistantes humaines KB-V1, des glycoprotéines P partiellement purifiées et des glycoprotéines P recombinantes [3, 51, 50].

è Importance de la phosphorylation sur l'activité de la glycoprotéine P

Une première approche pour évaluer le rôle de la phosphorylation de la glycoprotéine P a été d'étudier la corrélation entre les taux et/ou l'activité des protéines kinases dans les cellules MDR, la chimiorésistance relative de ces cellules et la concentration intracellulaire médicamenteuse [133]. Ces études ont montré qu'une brève exposition de la glycoprotéine P aux esters de phorbol (activateurs de la protéine kinase C) [334] augmente son niveau de phosphorylation [51], diminue la concentration intracellulaire médicamenteuse [54] et accroît la chimiorésistance de nombreuses lignées cellulaires [446].

Inversement, le traitement des cellules multidrogues résistantes avec des inhibiteurs des protéines kinases (staurosporine par exemple) [334] diminue le niveau de phosphorylation de la glycoprotéine P et accroît l'accumulation intracellulaire des cytotoxiques [54, 265]. Ces données sont en faveur d'un rôle important de la phosphorylation de la glycoprotéine P dans la régulation de sa fonction d'efflux cellulaire.

Toutefois, les activateurs et inhibiteurs des protéines kinases utilisés dans ces différentes études ne sont pas très spécifiques et peuvent avoir des effets variables rendant les interprétations difficiles. La staurosporine, par exemple, peut avoir des effets opposés sur le taux d'expression des ARNm *MDR1* selon sa concentration et le type cellulaire étudié [59]. Ainsi, les modulateurs des protéines kinases peuvent altérer le phénotype de résistance pléiotropique [133] :

9 soit de façon indépendante ;

9 soit en plus de leurs effets sur l'état de phosphorylation de la glycoprotéine P par une interaction directe avec la glycoprotéine P en bloquant son activité de transport ;

9 soit en modifiant l'importance de l'expression du gène *MDR1*.

Certains composés, comme le safinol, sont capables d'inhiber la phosphorylation de la glycoprotéine P sans compétition directe au niveau du site de liaison des médicaments et sans affecter le taux d'expression de la glycoprotéine P [335]. Ceci prouve que la modification de l'état de phosphorylation à elle seule permet la modulation du phénotype MDR.

La localisation des sites phosphorylés été étudié [52, 53] (figure 26, en page 97). Malgré la présence de nombreux sites potentiels de phosphorylation, un maximum de quatre sites (SER661, SER667, SER671, SER683) sont effectivement phosphorylés par les différentes protéines kinases [133]. Ces quatre sites phosphorylés sont situés dans la séquence de liaison

de la glycoprotéine P. Certains ont évoqué un possible rôle de « mini-domaine régulateur (*mini regulatory domain*) » pour cette région.

è Conclusion

Cependant, des études plus récentes [135, 344] indiquent que la phosphorylation de cette zone ne jouerait pas un rôle essentiel dans la multichimiorésistance liée à la glycoprotéine P.

De nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle de cette phosphorylation dans la régulation de l'activité « canal chlore » de la glycoprotéine P [176, 423].

Après avoir longtemps pensé que la phosphorylation de la glycoprotéine P avait un rôle important dans son activité d'efflux médicamenteux, différentes études ont montré que cette phosphorylation intervient dans le **transport des ions chlores par la glycoprotéine P**. Cependant, le **rôle de la phosphorylation concernant la multichimiorésistance reste à éclaircir** [176].

III.2. Relation structure-fonction et sites de liaison

À partir des données initiales obtenues dès 1986, de nombreux travaux ont été entrepris pour comprendre le fonctionnement de la glycoprotéine P. La principale question posée a d'emblée concerné la spécificité : comment une protéine est-elle capable de reconnaître et de prendre en charge des *substrats* de structure aussi variée ? Une autre question a concerné la cinétique du transport et les différences éventuelles entre transport des médicaments anticancéreux et transport des modulateurs de la résistance pléiotropique [323]. Comment est utilisé l'ATP dans le mécanisme de transport ?

De nombreuses études, faisant appel à des approches génétiques ou biochimiques, ont été effectuées pour tenter de répondre à ces questions.

III.2.1. Analyses mutationnelles de la glycoprotéine P

III.2.1.1. Mutations spontanées

Le séquençage de différents ADNc *MDR1* humains a permis de révéler qu'il existait des variations polymorphiques des régions codantes sans répercussions sur la fonction de la glycoprotéine P [69, 210]. Toutefois, différentes autres mutations affectant la spécificité de la glycoprotéine P ont été décrites (figure 26, en page 25) [69, 83].

a. Mutation *GLY185-VAL185*

Cette mutation, où la glycine est remplacée par la valine en position 185, est la première à avoir été décrite, en 1988, par CHOI *et al* [69] sur une lignée cellulaire multichimiorésistante (KB-C1) sélectionnée par la colchicine. Cette mutation modifie la spécificité de la glycoprotéine P : le transport de la colchicine est augmenté alors que le transport de vinblastine et de dactinomycine est diminué. Ces résultats laissent penser que cet acide aminé, situé dans la **première boucle intracellulaire**, joue un rôle important en ce qui concerne le site de liaison aux médicaments de la glycoprotéine P. La glycine permettrait la formation d'une structure tertiaire que ne permettrait pas la valine [83]. Les recherches effectuées afin de comprendre cette modification de spécificité ont abouti à des conclusions divergentes.

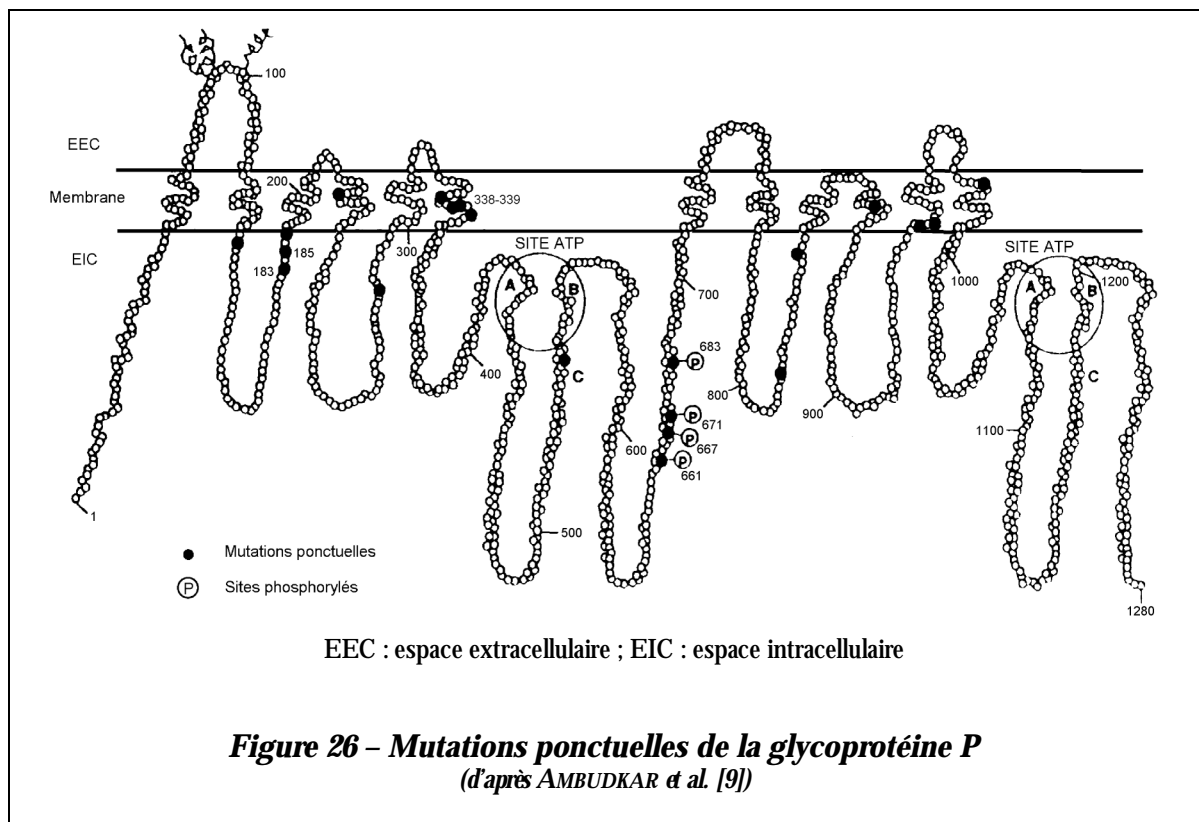
Dans une publication de SAFA *et al* [339] il est rapporté que chez les mutants VAL185 l'augmentation du transport de colchicine et la diminution du transport de vinblastine sont accompagnées d'une diminution du marquage de photoaffinité par les analogues de la colchicine et d'une augmentation du marquage par les analogues de la vinblastine. Les auteurs en concluent que *cette mutation n'affecte pas la liaison initiale* des médicaments mais la façon dont les molécules sont libérées à l'extérieur de la cellule.

Cependant, en 1992, une étude de BRUGGEMANN *et al* [42] met en évidence que la vinblastine inhibe de façon plus importante le marquage de photoaffinité des mutants VAL185 que le marquage des protéines GLY185, suggérant que *cette mutation affecte la liaison initiale* des médicaments avec la glycoprotéine P [143].

b. Mutations GLY338-ALA338 et ALA339-PRO339

DEVINE *et al* [99] ont détecté ces mutations du domaine TM6 de la glycoprotéine P dans des cellules de hamster chinois sélectionnées pour leur haut niveau de résistance à la dactinomycine. Ces mutations sont survenues dans des lignées cellulaires avec une amplification et une expression très importantes des gènes *mdr*. Ces mutations sont responsables de la diminution de chimiorésistance envers de nombreux composés alors que la résistance à la dactinomycine reste normale [99].

Les résultats de cette étude impliquent fortement le domaine TM6 dans le mécanisme de reconnaissance et d'efflux des médicaments.



III.2.1.2. Mutations expérimentales

De nombreuses approches expérimentales ont été entreprises pour tenter de comprendre le mécanisme d'action de la glycoprotéine P. Parmi ces études, celles étudiant les mutants de la glycoprotéine P sont les plus largement utilisées. Généralement ces mutants ont été produits soit par sélection médicamenteuse *in vivo* soit par des techniques de mutagenèse

dirigée [9, 133, 143]. Il est possible de distinguer trois catégories de glycoprotéines P mutantes :

9 • les mutants biosynthétisés dont la maturation moléculaire est défectueuse ;

9 , les mutants qui affectent la spécificité de substrat de la glycoprotéine P ;

9 \mathcal{f} les mutants qui ont perdu la fonction de transporteur.

a. *Mutation SER941-PHE941*

Cette mutation a été introduite expérimentalement par GROS *et al.* [151] dans le domaine TM11 des glycoprotéines P codées par les gènes *mMdr1a* (en position 939) et *mMdr1b* (en position 941). La substitution de la sérine par la phénylalanine dans ce domaine transmembranaire altère de façon importante le profil de chimiorésistance des mutants. La chimiorésistance à la vinblastine est très faiblement altérée alors qu'elle est fortement diminuée concernant la colchicine et la doxorubicine. Le domaine TM11 aurait donc un rôle important dans la reconnaissance et/ou le transport de ces différentes molécules.

b. *Mutation ASN183-SER183*

CURRIER *et al.* [83] ont travaillé sur les mutations concernant la première boucle intracytoplasmique (IC1) de la glycoprotéine P puisque la séquence génétique codant cette boucle est hautement conservée au sein de la famille multigénique *MDR*. Or, dans le cas du gène *MDR2/3* — ne conférant pas le phénotype de résistance pléiotropique —, cette séquence présente des différences par rapport aux autres gènes *MDR*. L'étude de ces auteurs montre l'importance de la boucle IC1 dans le mécanisme de résistance pléiotropique.

Les gènes *MDR2/3* et *mdr2* codent, par exemple, la sérine en position 183 alors que les autres gènes codent l'asparagine. Le remplacement de l'asparagine en position 183 de la glycoprotéine P codée par le gène *MDR1* par la sérine, associée à la mutation GLY185/VAL185, provoque une augmentation de la résistance à la vinblastine et à la dactinomycine (diminuée lors de la mutation GLY185/VAL185 seule) sans diminuer la résistance à la colchicine (augmentée lors de la mutation GLY185/VAL185 seule). Ces résultats sont compatibles avec une interaction des médicaments avec la glycoprotéine P en deux sites différents mais pouvant éventuellement se chevaucher.

c. Mutations concernant les sites de liaison à l'ATP

Des mutations ont aussi été effectuées concernant les deux sites de liaisons à l'ATP. La substitution de la glycine par l'alanine en positions 431 ou 1073 et de la lysine par l'arginine en position 432 ou 1074 de la glycoprotéine P codée par le gène *mMdr1b* entraîne une perte totale de la fonction de transport alors que la liaison avec de l'ATP photoactif reste possible [143]. Cependant, lorsque la lysine est remplacée par la méthionine (aux mêmes positions) dans le cas du gène humain *MDR1*, une faible activité de transport est conservée et la liaison d'ATP photoactif est diminuée [143].

III.2.1.3. Conclusion

De nombreuses autres mutations de la glycoprotéine P ont depuis été identifiées (voir tableau 14, en page 100) chez les mammifères. Ces mutations sont majoritairement localisées dans les domaines TM5, TM6, TM11 et TM12 mais sont aussi trouvées dans les boucles intracellulaires (IC) et extracellulaires (EC) (figure 26, en page 97). KAST *et al.* [202], par exemple, ont remarqué que des mutations ponctuelles dans les boucles EC2 et IC2 sont à l'origine d'une perte de l'activité de transport de la glycoprotéine P. Des mutations dans le segment TM1 peuvent aussi altérer la spécificité de substrat de la glycoprotéine P [391, 392].

Puisque la glycoprotéine P est composée de deux parties homologues, une question importante a été soulevée par les analyses mutationnelles : les deux moitiés agissent-elles ensembles ou de façon indépendante ? La transfection d'ADNc codant chaque moitié de la glycoprotéine P dans des cellules NIH3T3 ne confère pas le phénotype MDR bien que l'expression de chaque moitié soit détectée sous une forme stable [249]. Cependant, l'expression de ces deux moitiés de la glycoprotéine P dans le système baculovirus/cellules d'insectes (Sf9) permet une activité ATPase qui peut être stimulée par la présence de substances médicamenteuses. Cette activité n'est détectable que si les deux moitiés sont exprimées ensembles, suggérant ainsi que le couplage des activités de transport et ATPase nécessite une interaction entre les deux parties de la glycoprotéine P [249].

Tableau 14 – Liste des mutations de la glycoprotéine P chez l'homme, la souris et le hamster qui affecte la spécificité de substrat*
(d'après AMBUDKAR *et al.* [9])

Mutations**	Région	Source d'ADNc	Mutations	Région	Source d'ADNc
H61R, F, K, M, W, Y	TM 1	<i>MDR1</i>	G338A, A339P	TM 6	<i>Pgp1</i>
G64R	TM 1	<i>MDR1</i>	A339P	TM 6	<i>Pgp1</i>
L65R	TM 1	<i>MDR1</i>	G341V	TM 6	<i>MDR1</i>
Aa 78-97	EC 1	<i>MDR1</i>	K536R, Q	Site ATP	<i>MDR1</i>
Q128H	TM 2	<i>mMdr1b</i>	ERGA -> DKGT (aa 522-525)	Site ATP	<i>mMdr1b</i>
R138H	IC 1	<i>mMdr1b</i>	T578C	Site ATP	<i>mMdr1b</i>
Q139H, R	IC 1	<i>mMdr1b</i>	G812V	IC 4	<i>MDR1</i>
Q141V	IC 1	<i>MDR1</i>	G830V	IC 4	<i>MDR1</i>
Q145H	IC 1	<i>mMdr1b</i>	P866A	TM 10	<i>MDR1</i>
E155G, K	IC 1	<i>mMdr1b</i>	F934A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
F159I	IC 1	<i>mMdr1b</i>	G935A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
D174G	IC 1	<i>mMdr1b</i>	I936A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
S 176G, P	IC 1	<i>mMdr1b</i>	F938A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
K177I	IC 1	<i>mMdr1b</i>	S939A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
N179S	IC 1	<i>mMdr1b</i>	S939F	TM 11	<i>mMdr1b</i>
N183S/G185V	IC 1	<i>MDR1</i>	S941F	TM 11	<i>mMdr1a</i>
G183D	IC 1	<i>mMdr1b</i>	T941A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
G185V	IC 1	<i>MDR1</i>	Q942A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
G187V	IC 1	<i>MDR1</i>	A943G	TM 11	<i>mMdr1b</i>
A192T	TM 3	<i>mMdr1b</i>	Y946A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
F204S	EC 2	<i>mMdr1b</i>	S948A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
W208G	EC 2	<i>mMdr1b</i>	Y949A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
K209E	EC 2	<i>mMdr1b</i>	C952A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
L210I	TM 4	<i>mMdr1b</i>	F953A	TM 11	<i>mMdr1b</i>
T211P	TM 4	<i>mMdr1b</i>	F983A	TM 12	<i>MDR1</i>
I214T	TM 4	<i>mMdr1b</i>	L975A, V981A, F983A	TM 12	<i>MDR1</i>
P223A	TM 4	<i>MDR1</i>	M986A, V988A, Q990A, V991A	TM 12	<i>MDR1</i>
G288V	IC 2	<i>MDR1</i>	V981A, F983A	TM 12	<i>MDR1</i>
I299M, T319S, L322I, G324K, S351N	TM 5, EC 3, IC 3	<i>MDR1</i>	L975A, F983A	TM 12	<i>MDR1</i>
F335A	TM 6	<i>MDR1</i>	L975A, V981A	TM 12	<i>MDR1</i>
V338A	TM 6	<i>MDR1</i>	F978A	TM 12	<i>MDR1</i>

* aa : acide aminé ; EC : boucle extracellulaire ; IC : boucle intracellulaire ; TM : domaine transmembranaire

** La nomenclature à une lettre des acides aminés est utilisée. Le nombre représente la position de l'acide aminé dans la séquence primaire (exemple : G185V = glycine substituée par la valine en position 185)

HRYCYNA *et al.* [170] ont démontré que la délétion de la partie centrale (34 acides aminés) de la séquence de liaison de la glycoprotéine P humaine aboutit à la production d'une protéine membranaire exprimée à un niveau similaires de celui de la protéine sauvage. En revanche, cette protéine n'est pas fonctionnelle, ni pour le transport ni pour l'activité ATPase. Par ailleurs, le remplacement de la partie déléetée par un peptide d'une longueur de 17 acides aminés, sans homologie avec la séquence remplacée mais considéré flexible d'après sa structure secondaire permet de restaurer les fonctions connues de la glycoprotéine P [170].

Ces différents résultats incitent à penser qu'une **interaction entre les deux parties de la glycoprotéine P est nécessaire à son fonctionnement** et que la présence d'une séquence de liaison flexible est suffisante pour permettre une interaction appropriée entre les deux moitiés.

La plupart des mutations qui aboutissent à des glycoprotéines P non fonctionnelles et une maturation moléculaire adéquate sont en rapport avec les régions correspondants aux sites de liaison avec l'ATP. Les expériences de mutagenèse dirigée [251, 415] touchant à la séquence consensus de ces sites de liaison permettent de penser que les deux sites de liaison sont essentiels à un fonctionnement correct de la glycoprotéine P. La caractérisation biochimique des glycoprotéines P humaines et du hamster ont permis de conclure que [9] :

- 9 les deux sites sont capables d'hydrolyser l'ATP, mais pas simultanément ;
- 9 la stœchiométrie de l'hydrolyse d'ATP par la glycoprotéine P est de 1 mol d'ATP/mol de glycoprotéine P [415] ;
- 9 la liaison des substances médicamenteuses et l'hydrolyse de l'ATP sont intimement liées.

Ainsi, ces différentes analyses mutationnelles nous permettent de penser que **les deux parties de la glycoprotéine P humaine interagissent** pour former un unique canal transporteur et que les **principaux sites de liaison avec les médicaments se situent dans les domaines TM5–TM6 et TM11–12** ou à proximité.

Il est aussi évident que **les deux sites de liaison à l'ATP sont nécessaires** pour un fonctionnement correct de la molécule et qu'une interaction entre les sites de liaisons à l'ATP et les domaines permettant la liaison des médicaments est essentielle pour le transport des substances médicamenteuses [9].

III.2.2. Marquage de photoaffinité

Une technique qui a été très utile pour l'étude de la glycoprotéine P est celle du marquage de photoaffinité. Des composés photoactifs peuvent être obtenus à partir des principaux substrats de la glycoprotéine P, médicaments anticancéreux ou modulateurs du phénotype MDR [323]. Différents composés photoactifs (figure 27, en page 102) peuvent ainsi révéler une liaison avec la glycoprotéine P ; le fragment de la glycoprotéine P peut alors

être identifié par séquençage ou à l'aide d'anticorps spécifiques de certains fragments de la protéine.

La liaison d'un composé transporté par la glycoprotéine P avec celle-ci a été démontrée la première fois en utilisant la vinblastine tritiée [76] qui se lie à des préparations membranaires provenant de cellules multichimiorésistantes. La liaison « directe » à la glycoprotéine P a été démontrée à l'aide du marquage de photoaffinité avec des analogues photoactifs de la vinblastine [78, 338].

Le marquage de photoaffinité est une technique spécifique car il peut être inhibé par un excès des différents substrats cytotoxiques de la glycoprotéine P ou par des agents non cytotoxiques, comme le vérapamil, qui sont capables de réverser le phénotype MDR [78]. Depuis ces premières études, un grand nombre de substrats et d'analogues de substrats de la glycoprotéine P ont été identifiés : l'azidopine [443], le vérapamil [336], l'iodomycine [43], la colchicine [339], l'azidoprazosine [146], le forskolin [287] et la ciclosporine A [124].

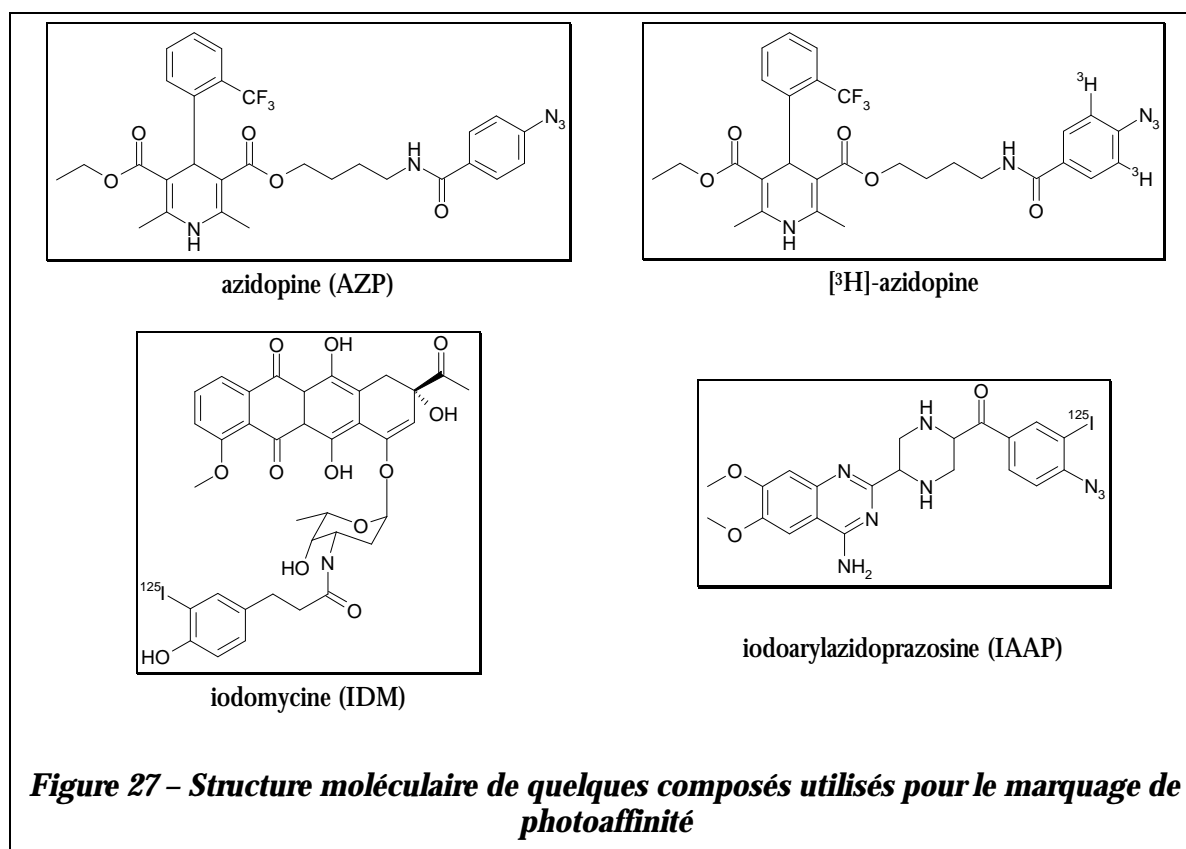
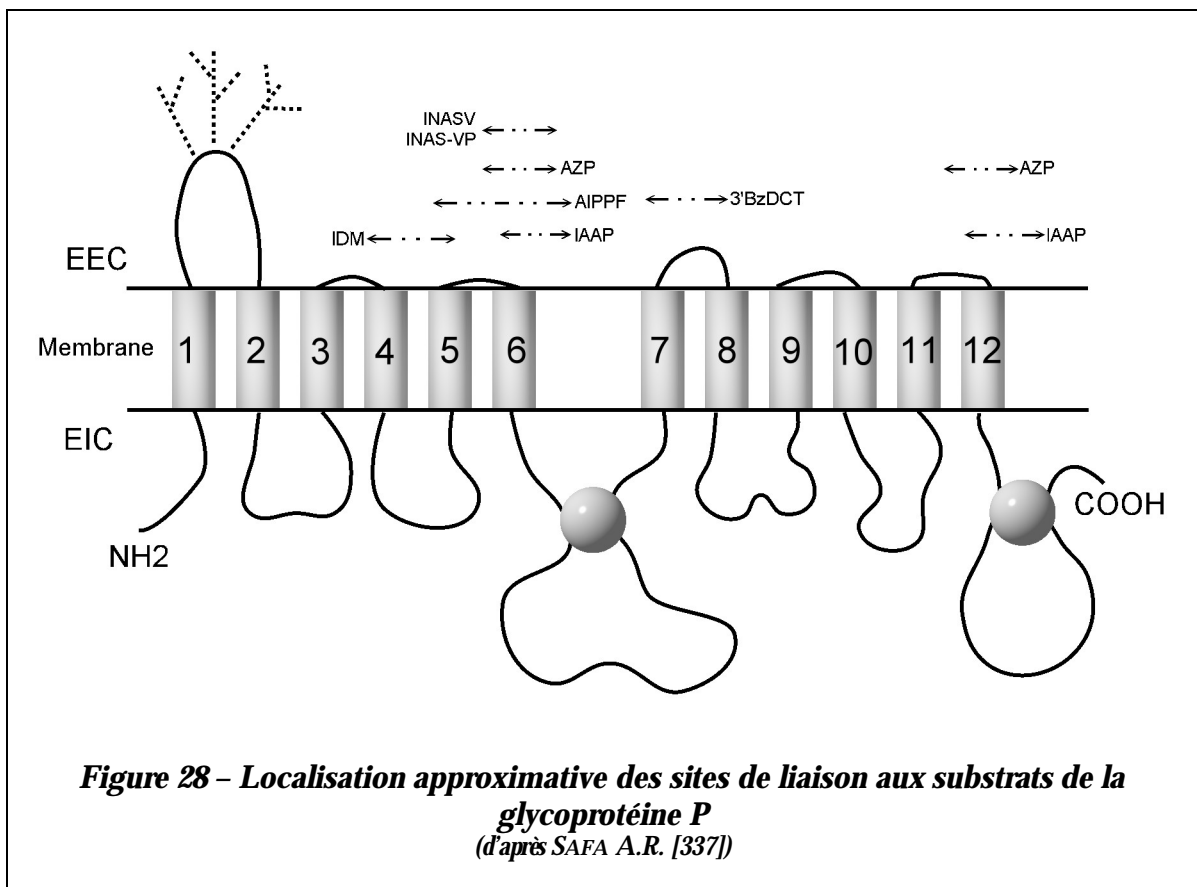


Figure 27 – Structure moléculaire de quelques composés utilisés pour le marquage de photoaffinité

Différentes découvertes ont été faites avec ces composés photoactifs. Un site de liaison en partie C-terminal de la glycoprotéine P murine a été révélé par l'utilisation de [³H]-azidopine, alors que deux sites sont marqués par ce composé sur la glycoprotéine P

humaine [42, 143]. La présence de ces sites (un ou plus en région N-terminal et en région C-terminal) a été confirmée sur la glycoprotéine P murine en utilisant l'azidoprazosine [145, 146]. L'utilisation de protéases a permis de localiser ces régions comme proches des segments TM5–TM6 et TM11–TM12 [42, 146]. Une digestion protéolytique plus poussée combinée à l'utilisation d'un analogue photoactif du forskolin permet de situer ces sites plus précisément dans les domaines TM5 et TM11 ainsi que dans, ou juste en aval, les domaines TM6 et TM12 [145, 286].

Les **segments transmembranaires 5, 6, 11 et 12 ainsi que les boucles EC3 et EC6 (reliant les segments TM5–TM6 et TM11–TM12) sont donc des sites majeurs d'interaction (liaison et transport) avec les substrats de la glycoprotéine P**. Ces données, confirmant les informations obtenues à l'aide des analyses mutationnelles, ne permettent cependant pas de savoir si ce(s) site(s) sont autonomes ou interdépendants. C'est une étude de DEY *et al.* [100], utilisant un analogue photoactif de la prazosine ($[^{125}\text{I}]$ -iodoarylazidoprazosine), qui démontrera que ces deux domaines des parties C-terminal et N-terminal de la glycoprotéine P font partie d'au minimum deux sites indépendants de liaison aux médicaments.



Ces différentes études de marquage de photoaffinité sont en faveur d'un modèle structural de la glycoprotéine P dont les deux moitiés « s'associent » pour former un unique canal de transport. **La présence de plusieurs sites de liaisons aux médicaments est aussi démontrée.**

III.2.3. Conclusion

Récemment, WU *et al.* [440] ont montré que les segments transmembranaires 7 et 8 sont marqués avec des analogues photoactifs du paclitaxel. Le segment TM9 permet aussi, en coopération avec le segment TM6, la liaison des médicaments [378]. Des études récentes identifient trois, voire quatre sites de liaisons sur la glycoprotéine P du hamster [178, 269]. Cette notion de sites multiples est maintenant admise [387]. Ces sites pourraient posséder différentes configurations avec des différences d'affinité.

Une interaction de type allostérique serait possible entre ces différents sites [269]. LOO et CLARKE [259] ont démontré, très récemment, que la liaison d'un substrat pouvait induire un changement de conformation des segments transmembranaires.

III.3. Biochimie de la glycoprotéine P

III.3.1. Substances reconnues par la glycoprotéine P

Une des caractéristiques frappantes de la glycoprotéine P est le nombre de composés différents reconnus par celle-ci. Ces composés n'ont comme principale propriété commune que le fait d'être lipophiles. Par exemple, la glycoprotéine P n'est pas capable de conférer de chimiorésistance au méthotrexate, composé hydrophile. Cependant, le méthotrexate pénètre principalement dans la cellule par l'intermédiaire d'un transporteur et il a été démontré que la glycoprotéine P pouvait entraîner une résistance au méthotrexate si les cellules présentent une déficience de ce transporteur [90]. Ces résultats peuvent laisser penser que la glycoprotéine P pourrait interagir avec des composés hydrophiles pénétrant par diffusion passive.

Les caractéristiques moléculaires requises afin qu'une molécule soit reconnue et transportée par la glycoprotéine P ne sont toujours pas bien connues. Concernant les anthracyclines, il semble que la présence d'un groupement azoté basique protonable facilite l'efflux [125].

Ces dix dernières années la liste des substances reconnues s'est considérablement allongée : à partir des substances décrites initialement – comme les alcaloïdes de la pervenche et les anthracyclines – nous sommes parvenus à une vaste liste (voir tableau 15, ci-dessous) comprenant des agents anticancéreux sans relation de structure, des antiviraux utilisés dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (ou VIH) [94, 209] et des groupements fluorescents (ou *fluorophores*) [241].

Tableau 15 – Substrats et modulateurs de la glycoprotéine P
(d'après LITMAN et al. [241])

Substrats de la glycoprotéine P		Modulateurs de la glycoprotéine P	
Anthracyclines [43] Daunorubicine Doxorubicine Épirubicine	Épipodophyllotoxines [294] Étoposide [301] Téniposide	Inhibiteurs calciques Vérapamil [406] Diltiazem [405]	Hormones Progestérone [416] Spironolactone Tamoxifène [238]
Vinca-alcaloïdes Vinblastine [169] Vincristine [119] Vinorelbine [365] Vindésine	Inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules Colchicine [119] Paclitaxel [224] Docétaxel	Antagoniste de la calmoduline [407] Trifluopérazine Chlorpromazine Triflupromazine Fluphénazine Pimozide	Peptides hydrophobes Ciclosporine A [95] SDZ PSC 833 Valinomycine [115] Gramicidine D [216]
Anthracènes Bisantrène Mitoxantrone [282]	Antibiotiques peptidiques Dactinomycine [168] Gramicidine D	Antihypertenseurs Résérpine Propranolol	Antihistaminiques Prométhazine Terfénadine
Dérivés de la camptothécine CPT-11 Topotécane	Inhibiteurs de la protéase virale [209] Ritonavir Saquinavir Indinavir	Antiarythmiques [404] Quinidine Amiodarone Propafénone	Antimalariens Méfloquine Quinine [438]
Fluorophores [165] Calcéine acétoxyméthyl (calcéine-AM) [391] Fluo-3-AM Fura-2-AM Rhodamine Hoechst 33342/33258 [216]		Autres composés Amitriptyline (antidépresseur) Dipyridamole (anticoagulant) [233] Fucidine (antibiotique) GF120918 (composé de synthèse) [393] N-acétyl daunorubicine (analogue d'anthracyclines) Staurosporine (antagoniste de la PKC) [54]	

Parmi ces différents composés il est intéressant de savoir quand un composé est substrat et quand il est inhibiteur de la pompe transmembranaire. En effet, plusieurs approches ont été utilisées : une possibilité est de définir comme substrat les composés qui sont « pompés » par un transporteur ABC alors qu'une autre possibilité est de définir des

substrats « catalytiques », c'est à dire des composés stimulant l'activité ATPase du transporteur [241]. De la même façon un inhibiteur de ces transporteurs peut être défini comme une substance inhibant l'efflux d'autres composés (que ce soit par un mécanisme compétitif ou non-compétitif) ou comme une substance qui diminue l'activité ATPase d'un transporteur comme la glycoprotéine P.

En supposant que l'activité catalytique ayant lieu au niveau du site ATPase est directement couplée à la fonction de transport de la glycoprotéine P, il est logique de penser que des inhibiteurs de l'activité ATPase sont aussi des inhibiteurs de la fonction de transport et inversement. Nous allons voir au travers de deux exemples que cela n'est pas toujours aussi évident.

è Exemple du vérapamil

Le vérapamil est le premier composé ayant été identifié comme chimiosensibilisateur de la multichimiorésistance liée à la glycoprotéine P [406]. Nous savons de façon certaine que le vérapamil inhibe la fonction de transport de la glycoprotéine P et qu'il induit une augmentation de l'accumulation intracellulaire de différents agents cytotoxiques comme les anthracyclines ou les alcaloïdes de la pervenche [438] (figure 29-A, en page 107). En revanche, le vérapamil est aussi un des meilleurs activateurs de la fonction ATPase de la glycoprotéine P [159] (figure 29-B, en page 107).

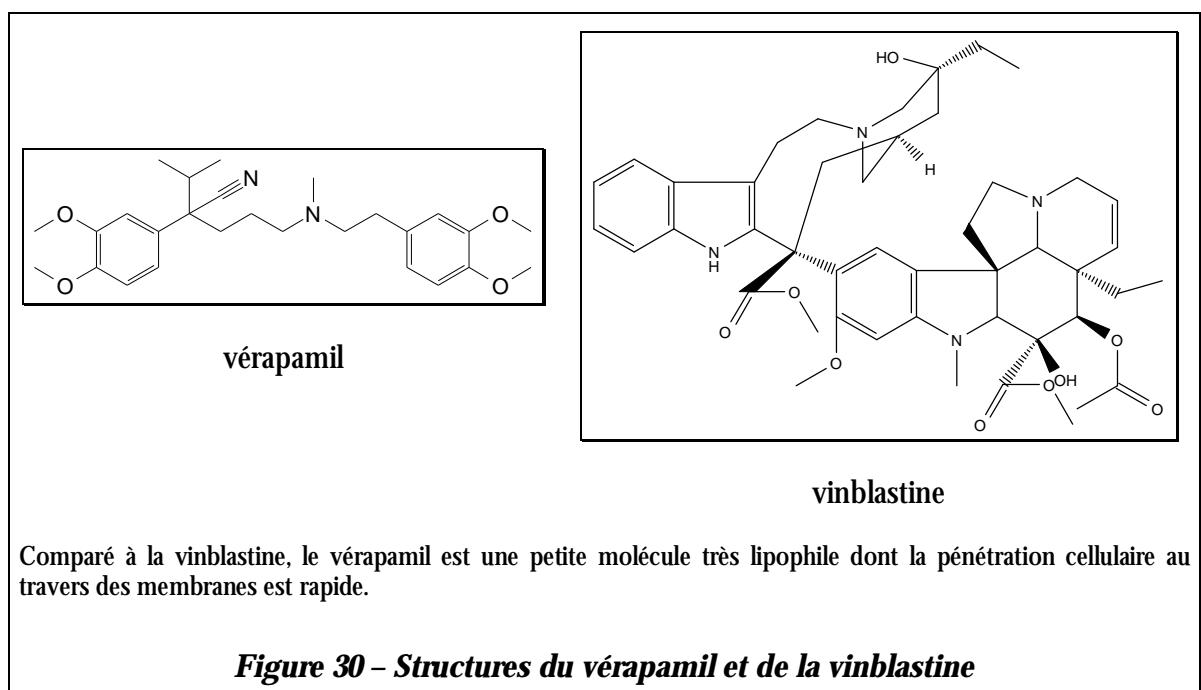
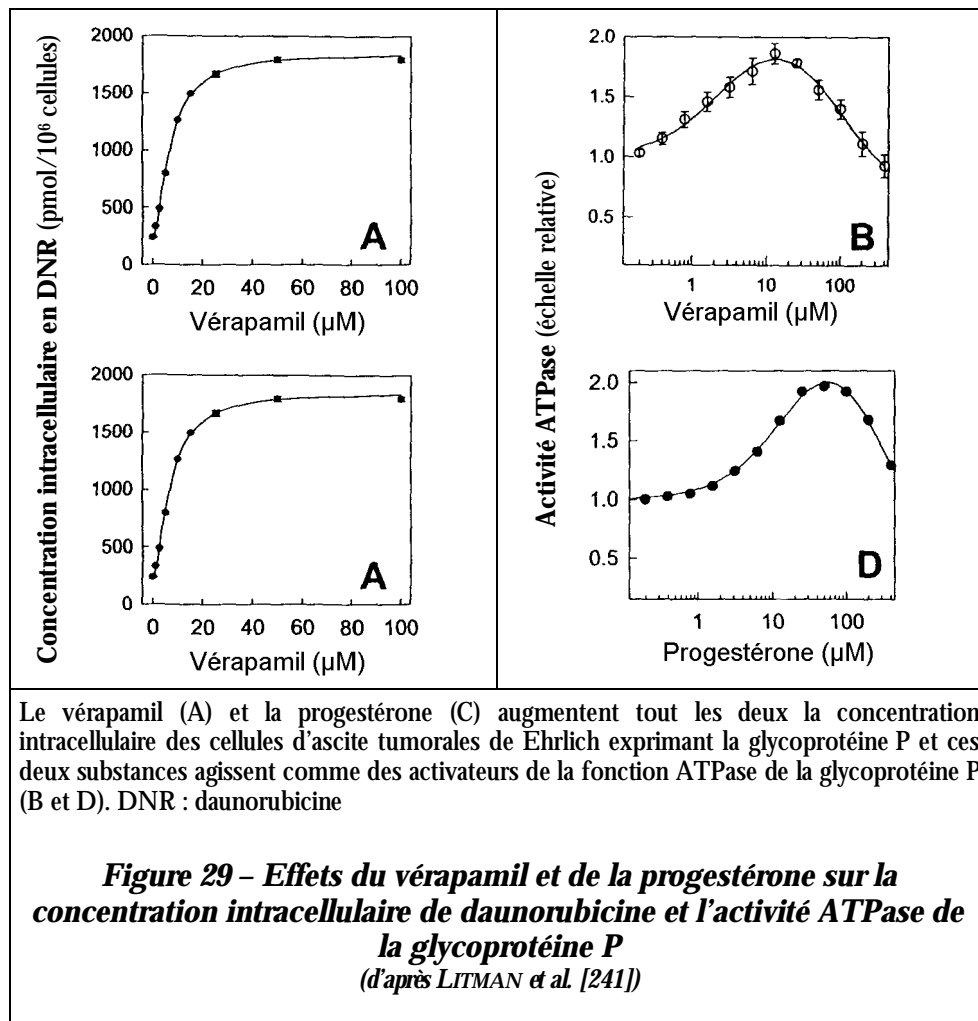
Plusieurs explications peuvent être apportées à cette apparente contradiction [241] :

9 le vérapamil peut agir comme un découpleur de l'activité de transport rendant ainsi inactive l'activité ATPase sur le transport des molécules ;

9 le vérapamil peut aussi agir comme un substrat compétitif, le transport de vérapamil entrant ainsi en compétition avec celui des autres substances.

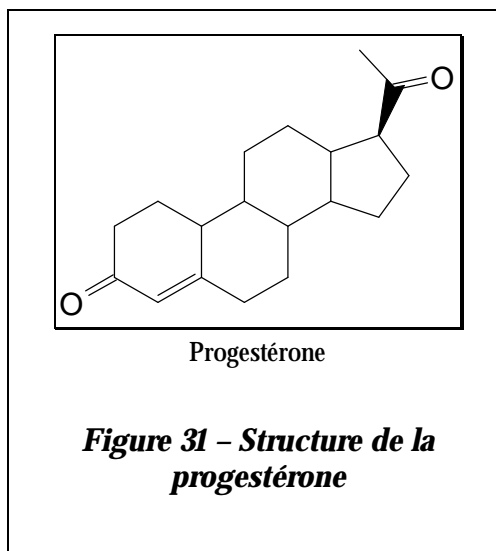
Peu d'études ont été menées sur le transport du vérapamil par la glycoprotéine P et les résultats obtenus sont contradictoires : le vérapamil est tantôt vu comme substrat [232] ou pas [357]. Contrairement à des molécules comme la vinblastine, le vérapamil est une petite molécule très lipophile et il diffuse ainsi très rapidement au travers des membranes (figure 30, en page 107). Le vérapamil peut ainsi être un substrat de la glycoprotéine P, être évacué vers l'espace extracellulaire et pénétrerait immédiatement après son efflux à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène pourrait expliquer que dans de nombreuses études aucun efflux net n'est mis en évidence. Ainsi le vérapamil pénétrerait aussi rapidement qu'il est évacué et l'activité

ATPase de la glycoprotéine P serait vaine, subissant un découplage avec l'activité de transport des autres substrats [112].



è Exemple de la progestérone

Cette hormone (figure 31, ci-dessus) a été décrite comme un activateur de l'activité ATPase (figure 29-C et D, en page 107) mais pas comme substrat de la glycoprotéine P [241]. Pourquoi ce substrat « catalytique » n'est pas identifié clairement comme substrat transporté ? Probablement pour les mêmes raisons que dans le cas du vérapamil : la progestérone diffuse, pour les mêmes raisons que le vérapamil, très rapidement au travers des membranes lipidiques.



è Conclusion

Les substances interagissant avec la glycoprotéine P peuvent alors être réparties en quatre catégories :

9 **Classe 1, les agonistes** : ces composés sont à la fois des activateurs de la fonction ATPase et des substrats transportés par la glycoprotéine P. On retrouve dans cette catégorie des substances qui diffusent lentement au travers des membranes lipidiques : les anthracyclines, les alcaloïdes de la pervenche ou le bisantrene [243].

9 **Classe 2, les agonistes partiels** : ces composés sont des activateurs de la fonction ATPase de la glycoprotéine P mais leur transport est apparemment inexistant. Ce sont les « diffuseurs rapides » tels que le vérapamil et la progestérone.

9 **Classe 3, les antagonistes** : ils inhibent à la fois l'activité de transport et ATPase de la glycoprotéine P. Un antagoniste bien connu de la glycoprotéine P est le vanadate qui se lie au site de liaison à l'ATP, agissant ainsi comme un inhibiteur non compétitif [242]. Un autre composé bloquant l'activité ATPase de la glycoprotéine P est la ciclosporine mais les études concernant son transport sont en désaccord [241].

9 **Classe 4** : cette classe regroupe les substances qui n'interagissent apparemment pas avec la glycoprotéine P.

III.3.2. Glycoprotéine P : un transport énergie dépendant

III.3.2.1. Sites de liaisons à l'ATP et activité ATPase

Il est connu depuis longtemps que la glycoprotéine P a besoin d'énergie pour assurer le transport des médicaments et que la déplétion de la cellule en ATP restaure l'accumulation intracellulaire de médicaments [88].

La capacité de la glycoprotéine P à se lier avec l'ATP a été démontrée à l'aide d'analogues photoactif et radioactif de l'ATP comme le ^{32}P -8-azido-ATP ou le ^{32}P -2-azido-ATP [79]. Un excès d'ATP, de GTP, d'AMP-PNP (analogue non hydrolysable de l'ATP) permet d'inhiber le marquage de la glycoprotéine P par le ^{32}P -8-azido-ATP ; ce n'est pas le cas pour les substrats de la glycoprotéine P [134]. Ces résultats sont compatibles avec *l'existence d'une région de liaison à l'ATP spécifique différente de celle permettant la liaison des médicaments*. Une étude de LOO et CLARKE [256] a d'ailleurs démontré que la liaison des substrats à la glycoprotéine P pouvait se faire sur une glycoprotéine P mutante dépourvue des deux sites de liaison à l'ATP. *Ainsi, les segments transmembranaires seuls sont suffisants pour la liaison des substrats à la glycoprotéine P.*

Les sites de liaison aux nucléotides sont situés du côté C-terminal de chacune des moitiés de la glycoprotéine P (figure 13, en page 77). La substitution d'acides aminés dans l'un ou l'autre de ces sites entraîne une inactivation du transporteur [14], de même que le remplacement d'un site par l'autre. Toutefois, chez la souris, le remplacement d'un site par son homologue provenant du gène *mMdr2* forme une glycoprotéine P fonctionnelle [45]. La présence des deux sites de liaison à l'ATP est essentielle à la fois pour l'activité ATPase et l'activité de transport de la glycoprotéine P [14, 252].

Des études réalisées à partir de membranes plasmiques de lignées cellulaires multichimiorésistantes ont démontré que [134, 169] :

- 9 le transport lié à la glycoprotéine P requiert une source continue d'énergie sous la forme d'ATP (ou de GTP) ;
- 9 des analogues non hydrolysable ne permettent pas la conservation de l'activité de transport ;
- 9 le vanadate (inhibiteur d'ATPase) inhibe l'activité de transport de la glycoprotéine P.

Ces différentes découvertes permettent de supposer que l'activité de transport de la glycoprotéine P nécessite une activité ATPase de la part de celle-ci. Cette fonction ATPase de la glycoprotéine P a été confirmée pour la première fois par HAMADA et TSURUO [158] (voir II.3.1.3.b Fonction ATPase de la glycoprotéine P, en page 61).

è Purification de la glycoprotéine P

La purification de la glycoprotéine P a permis l'évaluation des caractéristiques cinétiques de son activité ATPasique. HAMADA et TSURUO [158] avaient obtenu une vitesse maximale du transport (V_{\max}) très faible : $1,2 \text{ nmol} \cdot (\text{mg protéine})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Cette faible valeur est probablement due en partie au détergent utilisé (CHAPS) pour l'extraction des membranes qui possède une activité inhibitrice de l'activité de transport de la glycoprotéine P [134]. D'autres études ont obtenu depuis des valeurs plus élevées : $V_{\max} = 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot (\text{mg protéine})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; valeurs correspondant à celles obtenues pour d'autres ATPases purifiées.

La glycoprotéine P possède à la fois une activité ATPase basale et une activité ATPase stimulée par les médicaments anticancéreux comme la vinblastine, la vincristine, la colchicine ou la daunorubicine [9]. L'activité ATPase basale serait due aux lipides endogènes ou à d'autres substrats endogènes de la glycoprotéine P.

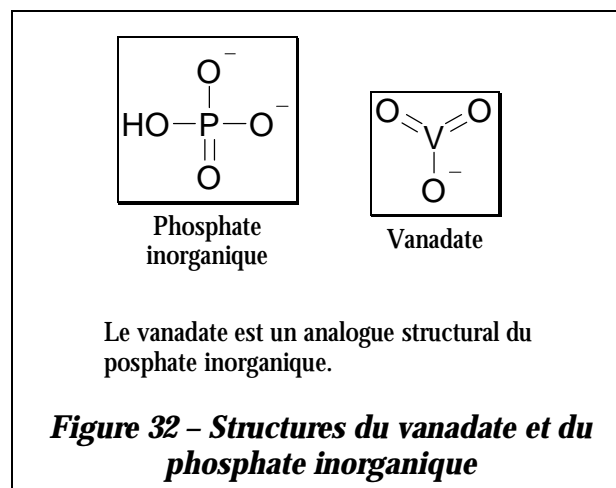
AMBUDKAR *et al* [11] ont démontré que l'activité ATPase de glycoprotéines P partiellement purifiées est multipliée par 3,5 en présence de vinblastine mais n'est pas affectée par la camptothécine (composé non transporté par la glycoprotéine P). En revanche, cette activité ATPasique est stimulée par le topotécan qui est un dérivé de la camptothécine transporté par la glycoprotéine P. Certains inhibiteurs de ce transporteur, comme le vérapamil ou la fluopérazine, induisent aussi une augmentation de l'activité ATPase [134]. Cependant, d'autres inhibiteurs de la fonction de transport n'ont pas cet effet stimulateur – la ciclosporine A, par exemple. Ces inhibiteurs interfèrent d'ailleurs avec la stimulation induite par les autres composés, incluant le vérapamil [135]. Ces différents effets des inhibiteurs sur l'hydrolyse de l'ATP mènent à penser qu'il existe plus d'un seul mécanisme permettant d'inhiber l'efflux lié à la glycoprotéine P.

D'autres composés, comme le N-éthylmaléimide, sont capables d'inhiber l'activité ATPase de la glycoprotéine P, indiquant ainsi la présence de résidus de cystéines importants dans les régions permettant l'hydrolyse de l'ATP. Les résidus de cystéines impliqués dans le

cas du N-éthylmaléimide ont été identifiés sur la glycoprotéine P humaine : ce sont les acides aminés CYS431 et CYS1074 des séquences consensus Walker A de la moitié N- et C-terminal, respectivement [251].

è Études utilisant le vanadate

Le vanadate, analogue du phosphate inorganique (figure 32, ci-dessous), a été utilisé afin d'analyser l'hydrolyse de l'ATP par la glycoprotéine P. Le vanadate inhibe le cycle catalytique de la glycoprotéine P en formant un complexe stable non covalent avec l'ADP [415]. En piégeant le vanadate, l'affinité de liaison de la glycoprotéine P avec les substrats diminue fortement et la demi-vie du complexe gp-P-ADP-vanadate produit est significativement plus longue que celle du complexe gp-P-ADP-Pi. Les complexes formés avec le vanadate sont similaires au stade catalytique transitionnel normal gp-P-ADP-P. L'étude de ce complexe gp-P-ADP-vanadate permet de montrer que le vanadate n'est piégé qu'à raison d'un site par molécule (soit sur la moitié N-terminal ou sur la moitié C-terminal) et que cela est suffisant pour inhiber l'activité ATPase.



Cette découverte permet de confirmer que les deux sites sont actifs pour la catalyse de l'ATP et que les sites doivent être tous les deux intacts [251, 414, 415]. Ces données permettent à SENIOR *et al.* [360] d'établir un modèle catalytique où les deux sites hydrolysent l'ATP en alternance. HRYCYNA *et al.* [171] ont démontré que les deux sites n'hydrolysent pas l'ATP de façon simultanée, bien que chaque site soit capable d'hydrolyser l'ATP.

III.3.2.2. Hydrolyse de l'ATP couplée avec la liaison du substrat et son transport

Des expériences utilisant le vanadate ont aussi été utilisées afin d'étudier le mécanisme reliant l'hydrolyse de l'ATP et la liaison des substrats à la glycoprotéine P. L'exposition de glycoprotéines P purifiées au vanadate inhibe, sous certaines conditions, le marquage de photoaffinité par des analogues de substrats de la glycoprotéine P comme la [¹²⁵I]-iodoarylazidoprazosine et la [³H]-azidopine [307]. Cette inhibition de photoaffinité induite par le vanadate n'a pas lieu avec des glycoprotéines P mutantes incapables de se lier à l'ATP. Puisque le complexe gp-P-ADP-vanadate est connu pour sa ressemblance avec le stade transitionnel gp-P-ADP-P, ces résultats indiquent que l'hydrolyse de l'ATP induit un changement de conformation présentant une diminution d'affinité (d'au moins 30 fois) pour les substrats [9].

Les premières études concernant l'activité de transport de la glycoprotéine P ont été réalisées en utilisant des vésicules issues de la membrane plasmique de cellules multichimiorésistantes exprimant la glycoprotéine P. Les résultats de ces études ont permis de montrer que l'activité de transport nécessitait une hydrolyse d'ATP. Toutefois, en raison de l'utilisation de membranes « brutes », il n'était pas possible de conclure si la glycoprotéine P seule suffisait à ce transport [9].

L'activité de transport liée à la glycoprotéine P seule a maintenant été démontrée et **il est clairement établi que la glycoprotéine P agit comme une pompe ATPase** [361, 362]. SHAROM *et al.* [362] ont démontré que la fixation de la colchicine était ATP-dépendante et qu'elle était inhibée par la présence de substrats tels que le vérapamil et la daunorubicine. SHAPIRO et LING [361] ont utilisé des liposomes intégrant des glycoprotéines P de hamster purifiées et ont démontré que le transport d'un substrat fluorescent de la glycoprotéine P (Hoechst 33342) était Mg²⁺-ATP-dépendant. Durant le transport du Hoechst 33342, il n'a pas été constaté de modification du pH, indiquant ainsi que la modification de pH n'a pas de rôle dans le transport lié à la glycoprotéine P [9].

La purification et la reconstitution de glycoprotéines P issues de lignées cellulaires KB-V1 dans des protéoliposomes permet de mettre en évidence une activité ATPase importante stimulée par la présence de substrats et une accumulation de [³H]-vinblastine

ATP-dépendante [8, 10]. Les activités ATPase et de transport sont toutes les deux inhibées par le vanadate. De plus, le transport de [³H]-vinblastine est inhibé par le vérapamil et la daunorubicine mais pas par la camptothécine, qui n'est pas reconnue par la glycoprotéine P [9].

Il est donc clair d'après ces études que **l'activité de transport par la glycoprotéine P est couplée à une hydrolyse d'ATP**. Différentes études se sont intéressées à la stœchiométrie entre l'hydrolyse d'ATP et l'activité de transport. Les premiers résultats ont été de 50 molécules d'ATP hydrolysées par molécules de substrat transportées [361, 362]. Ces valeurs sont très élevées par rapport à l'intensité de la chimiorésistance observée. Les études plus récentes ont obtenu des valeurs plus faibles : 2–3 molécules d'ATP hydrolysées par molécules de vinblastine transportées, par exemple [9]. Ces valeurs se rapprochent de celles trouvées pour d'autres transporteurs énergie-dépendants.

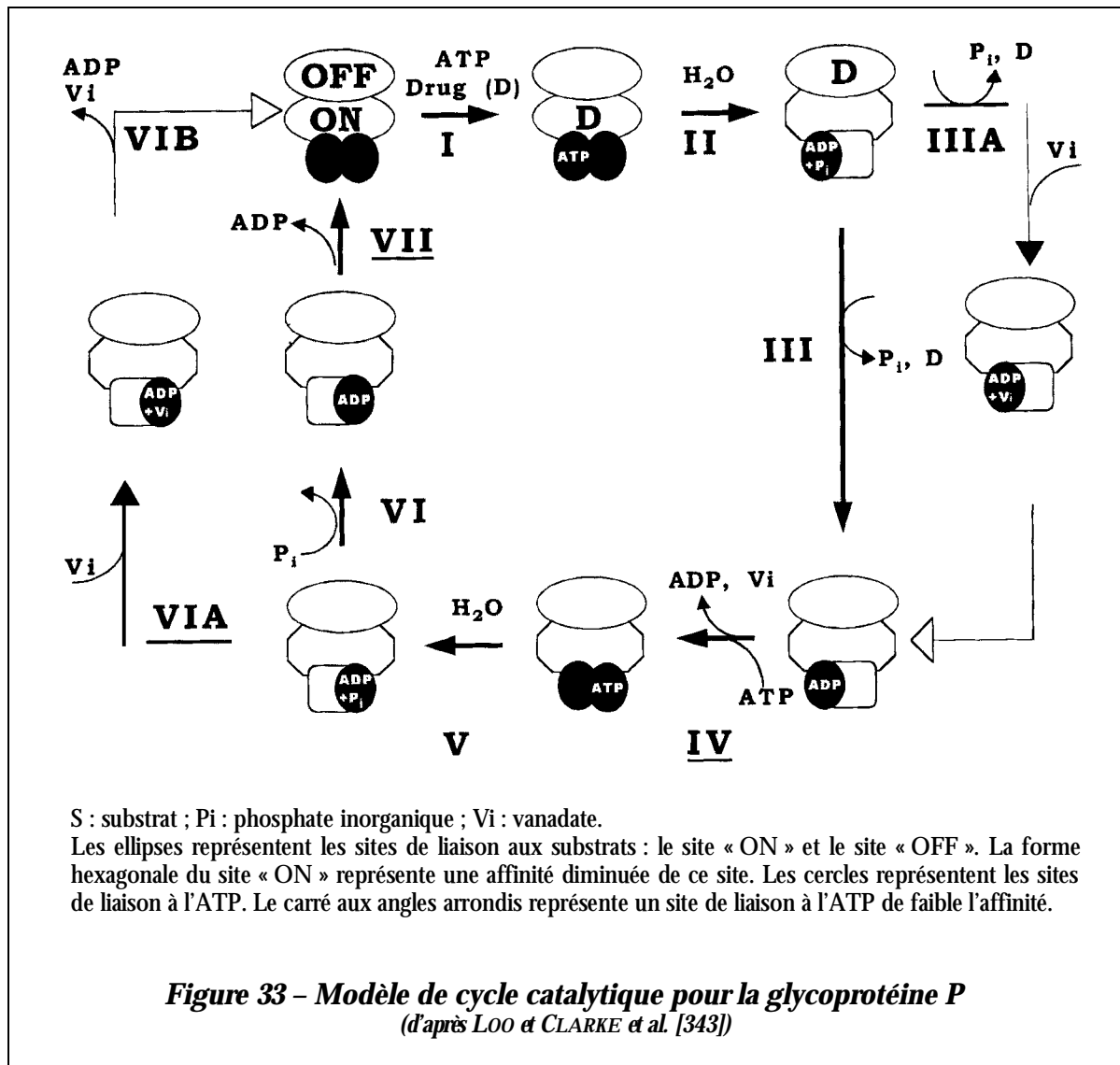
III.3.2.3. Cycle catalytique

L'étude du cycle catalytique de la glycoprotéine P permet à SENIOR *et al.* [359] de proposer un premier modèle de fonctionnement dont la caractéristique principale est l'alternance de l'hydrolyse de l'ATP par les deux sites de liaisons à l'ATP. Dans ce modèle, les auteurs ont supposé que l'ATP se liait d'abord à un des sites de liaison sans pouvoir être hydrolysé. Puis un autre nucléotide se liait au second site et favorisait l'hydrolyse du nucléotide fixé au premier site fournissant ainsi l'énergie nécessaire au transport. Pour le cycle suivant, l'hydrolyse avait lieu sur le deuxième site.

Cependant, récemment, LOO et CLARKE [342] démontrent la nécessité d'hydrolyser de l'ATP à deux étapes distinctes dans le cycle de transport d'une molécule ; découverte compatible avec la stœchiométrie observée (2 molécules d'ATP par cycle de transport). Ces auteurs montrent aussi qu'à la fin de la première hydrolyse, l'affinité de l'ATP pour le complexe gp-P-[8-azido-ADP-vanadate] est diminuée de 30 fois concomitamment avec la diminution observée pour les substrats [343]. À la fin de cette première étape, le simple détachement du 8-azido-ADP-vanadate ne suffit pas à rétablir l'affinité initiale de l'ATP pour la glycoprotéine P : l'hydrolyse d'une molécule d'ATP supplémentaire est nécessaire.

LOO et CLARKE ont proposé un modèle de cycle catalytique de la glycoprotéine P (figure 33, en page 115, ci-contre) :

- 9 **Étape I** : le substrat et l'ATP se lient à la glycoprotéine P sans qu'il y ait besoin d'énergie.
- 9 **Étape II** : première réaction d'hydrolyse accompagnée d'un changement de conformation réduisant l'affinité du site « ON » pour les substrats et pour les nucléotides, le substrat est déplacé vers le site « OFF » dont l'affinité n'est pas modifiée.
- 9 **Étape III** : le phosphate inorganique et le substrat sont libérés lors de cette étape. Le stade intermédiaire de la glycoprotéine P issu de l'étape 2 peut être « bloqué » en utilisant le vanadate (**étape IIIA**), le complexe gp-P-ADP-vanadate obtenu possède une affinité très réduite pour les substrats et les nucléotides.
- 9 **Étape IV** : l'ADP est libéré. Cette libération se fait spontanément et n'est pas influencée par la présence de nucléotides. La libération de l'ADP induit un changement de conformation permettant la liaison avec un nucléotide mais pas avec un substrat.
- 9 **Étape V** : deuxième réaction d'hydrolyse, cinétiquement identique à la première. À ce stade l'affinité pour les substrats n'est toujours pas rétablie ; ce stade peut être « bloqué » avec le vanadate (**étape VIA et VIB**).
- 9 **Étape VI** : libération du phosphate inorganique.
- 9 **Étape VII** : libération de l'ADP qui termine le cycle catalytique et rétablit l'état initial de la glycoprotéine P.



III.3.3. Mécanisme d'action

Ce mécanisme a beaucoup été étudié et différents modèles ont été proposés pour le fonctionnement de la glycoprotéine P. Nous ne connaissons toujours pas clairement, d'un point de vue moléculaire, la façon dont ce transporteur diminue la concentration intracellulaire des agents anticancéreux.

Deux hypothèses, principalement, sont proposées : un modèle où la glycoprotéine P interagit directement avec les substances transportées et un où la glycoprotéine P agit indirectement sur la concentration intracellulaire.

III.3.3.1. Modèle faisant intervenir une modification du pH

Certains auteurs proposent un modèle où la surexpression de la glycoprotéine P conduit à une altération du potentiel électrique membranaire et une augmentation du pH intracellulaire [325]. Ces modifications des paramètres biophysiques de la cellule perturberaient ainsi la concentration intracellulaire des médicaments. Dans ce modèle la glycoprotéine P agit de façon indirecte. Ce modèle est soutenu par des expériences montrant des variations du pH cytosolique, du potentiel électrique de membrane ou des caractéristiques de transports ioniques. Toutefois ces changements ne sont pas trouvés dans toutes les cellules MDR [9, 134].

III.3.3.2. Modèle de pompe transmembranaire

La majorité des données expérimentales sont fortement en faveur d'un modèle de pompe transmembranaire où le transport est direct [9, 134]. De nombreux arguments convergent et suggèrent que la glycoprotéine P n'est pas une simple pompe chassant les médicaments hors du cytoplasme pour les rejeter dans l'espace extracellulaire [323] :

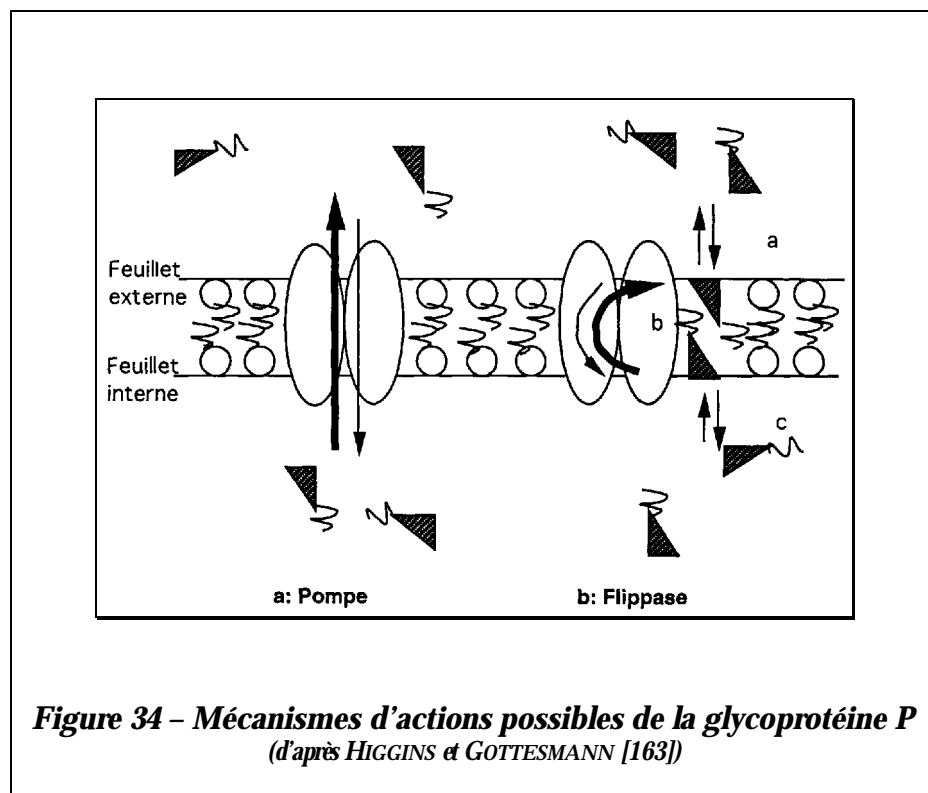
9 Tous les substrats (et inhibiteurs) de la glycoprotéine P sont des molécules hydrophobes ; on les rencontre chez les cellules dépourvues de glycoprotéine P, au niveau des membranes plasmiques ou de leurs cibles moléculaires. Dans les cellules de phénotype MDR, cette localisation membranaire disparaît.

9 Les substances transportées par la glycoprotéine P ont des cibles intracellulaires de haute affinité : tubuline pour les alcaloïdes de la pervenche, ADN pour les anthracyclines... Quel que soit le mécanisme par lequel la glycoprotéine P reconnaît ces substances, il est très improbable qu'elle puisse, pour chacun d'entre eux, modifier de façon appréciable sa répartition : cela supposerait qu'elle ait pour chacun une affinité plus grande que celle qu'ils ont pour leur cible cytotoxique.

9 Il a été observé que l'afflux de médicaments était tout autant altéré que l'efflux dans les cellules MDR [384], ce qui a amené certains auteurs à nier un rôle de pompe d'efflux à la glycoprotéine P : une explication plus simple consiste à voir la glycoprotéine P comme responsable de l'efflux des xénobiotiques *au moment* où ils se trouvent dissous dans la membrane plasmique, soit en provenance de l'extérieur de la cellule, soit en provenance de l'intérieur de la cellule.

Différentes études indiquent que les substrats de la glycoprotéine P peuvent être évacués directement depuis la membrane plasmique [165, 310]. Ces considérations ont amené l'équipe de GOTTESMAN [310] à proposer un modèle original de transport des xénobiotiques par la glycoprotéine P, reposant sur ce principe d'expulsion « latérale », la glycoprotéine P agissant comme un « aspirateur hydrophobe » (« *hydrophobic vacuum cleaner* »).

Une autre version de pompe transmembranaire est un fonctionnement de la glycoprotéine P de type « flippase » [163] (figure 34, ci-dessous), transportant ses substrats depuis le feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe. Ce modèle est conforté par le fait que la protéine MDR2/3 est une phosphatidylcholine translocase (flippase) [333, 375] et par une récente étude de ROMSICKI et SHAROM [327]. Ce modèle de type flippase permettrait d'expliquer que l'ensemble des substrats reconnus par la glycoprotéine P soit de nature hydrophobe et qu'il existe peu de spécificité de substrat — la composition de l'environnement lipidique jouant dans ce modèle un rôle déterminant dans le signal de reconnaissance des molécules par la protéine.



IV. GLYCOPROTÉINE P : RÔLE PHYSIOLOGIQUE ET IMPLICATION EN CANCÉROLOGIE CLINIQUE

IV.1. Fonctions physiologiques de la glycoprotéine P

L'identification de la glycoprotéine P comme une pompe énergie-dépendante capable d'induire une chimiorésistance à des agents cytotoxiques hydrophobes a soulevé la question de son rôle physiologique.

IV.1.1. Expression de la glycoprotéine P par les tissus sains

La glycoprotéine P a, à l'état physiologique, une distribution tout à fait particulière. En effet, l'étude de l'expression de l'ARNm du gène *MDR1* codant la glycoprotéine P dans les tissus sains humains a montré que ce gène était exprimé à un niveau [121] :

- 9 très élevé dans les glandes surrénales ;
- 9 élevé dans le tissu rénal et le placenta [389] ;
- 9 intermédiaire dans le colon, le foie, le jéjunum, le rectum et les poumons ;
- 9 faiblement dans beaucoup d'autres tissus.

L'étude de l'expression de la protéine, chez l'homme, à l'aide d'anticorps monoclonaux (C219, MRK16, HYB-241, HYB-612...) a permis de détecter la glycoprotéine P dans les tissus précédemment cités [121, 398], ainsi que dans le pancréas, le placenta à terme et dans les cellules souches hématopoïétiques [58, 74]. De plus faibles niveaux d'expression ont pu être retrouvés dans la peau, les muscles squelettiques ainsi que dans les cellules endothéliales des capillaires de la barrière hémato-méningée et des testicules [315].

L'étude de l'expression tissulaire de la glycoprotéine P dans d'autres espèces comme les rongeurs ou le **chien** révèle une distribution tissulaire assez proche malgré quelques variations [72, 82] (voir tableau 16, en page 120). Par exemple, chez le **chien** un niveau d'expression élevé est détecté dans le foie alors qu'il est moindre chez l'homme. Une récente étude sur l'expression de la glycoprotéine P chez le poisson chat à l'aide de l'anticorps C219 a montré qu'une protéine homologue à la glycoprotéine P était exprimée dans le foie, les reins et dans l'intestin [213]. La distribution tissulaire de la glycoprotéine P est assez proche de celle de la MRP1 [72].

Tableau 16 – Comparaison de la distribution tissulaire de la glycoprotéine P et de MRP1 chez le chien et chez l'homme
(adapté d'après CONRAD et al. [72])

Tissu	Glycoprotéine P		MRP1	
	Chien ^a	Homme	Chien ^a	Homme
Foie	++	+	+	±
Rein	++	++	++	±
Intestin grêle	ND	+	ND	++
Duodénum	±	ND	±	ND
Jéjunum	+	+ [121]	±	ND
Iléum	±	ND	±	ND
Gros intestin	ND	+	ND	++
Colon	+	ND	±	ND
Poumon	+	+	±	++
Cerveau	++	+	++	0 ou ±
Testicules	+	+	+	++

a) marquage à l'aide de l'anticorps C494

++ : expression élevée ; + : expression moyenne ; ± : expression faible ;
0 : expression non détectable ; ND : non déterminé

Chez le chien, GINN [140] a étudié l'expression de la glycoprotéine P par les tissus sains et tumoraux en utilisant trois anticorps monoclonaux différents : C219, C494 et JSB1 (voir tableau 17, en page 121). Cet auteur a mis en évidence un marquage homogène de la glycoprotéine P dans le foie, les surrénales, l'estomac, le pancréas, le colon, les reins, les canaux salivaires, les poumons, l'encéphale et l'endothélium. Un marquage plus variable est constaté dans le muscle cardiaque, le tissu mammaire, les glandes apocrines et sébacées, l'épithélium cutané, l'utérus, les ovaires et la glande thyroïde.

Tableau 17 – Immunomarquage des tissus sains chez le chien
(d'après GINN *et al.* [140])

Tissus	C219	C494	JSB1	Tissus	C219	C494	JSB1
Foie	+	+	±	Endothélium	+	+	+
Corticosurrénale	+	+	+	Myocarde	-	+	+
Médullosurrénale	-	-	-	Tissu mammaire	-	+	+
Estomac	+	+	+	Glandes apocrines	-	-	+
Pancréas	+	+	+	Glandes sébacées	-	-	+
Colon	±	+	±	Épithélium cutané	+	-	+
Reins	+	+	+	Utérus	-	-	+
Canaux salivaires	±	+	±	Ovaire	+	-	-
Poumon	+	+	+	Glande thyroïde	-	-	+
Encéphale	+	+	+	Chondrocytes	+	+	?

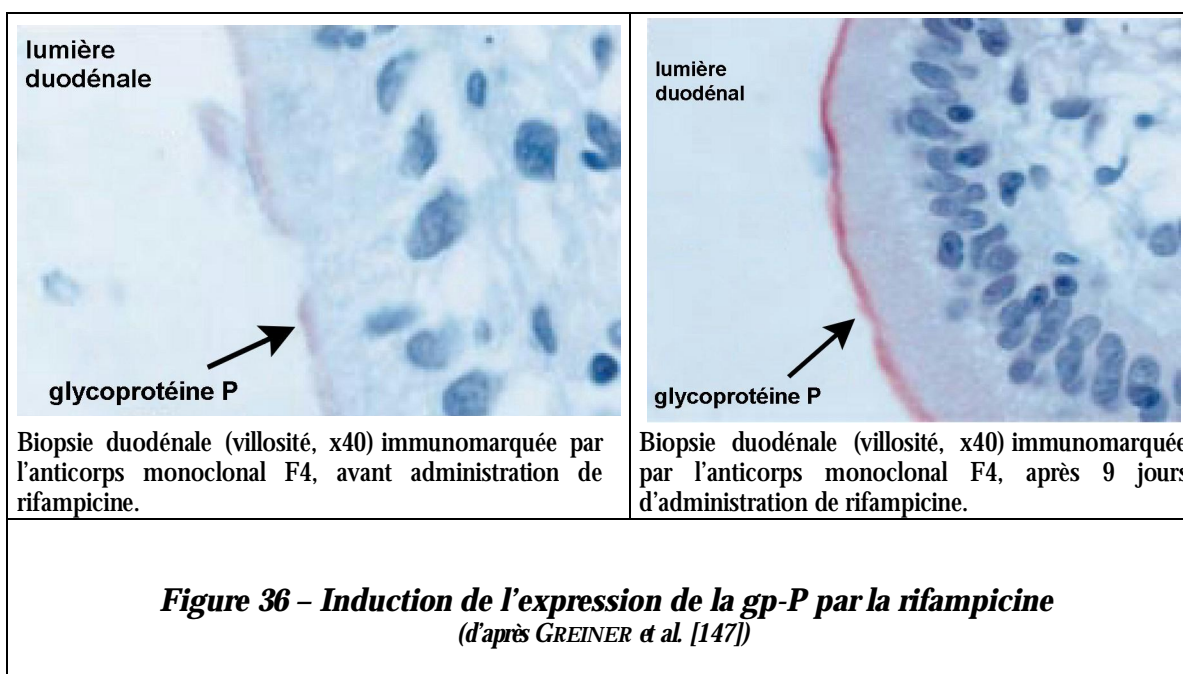
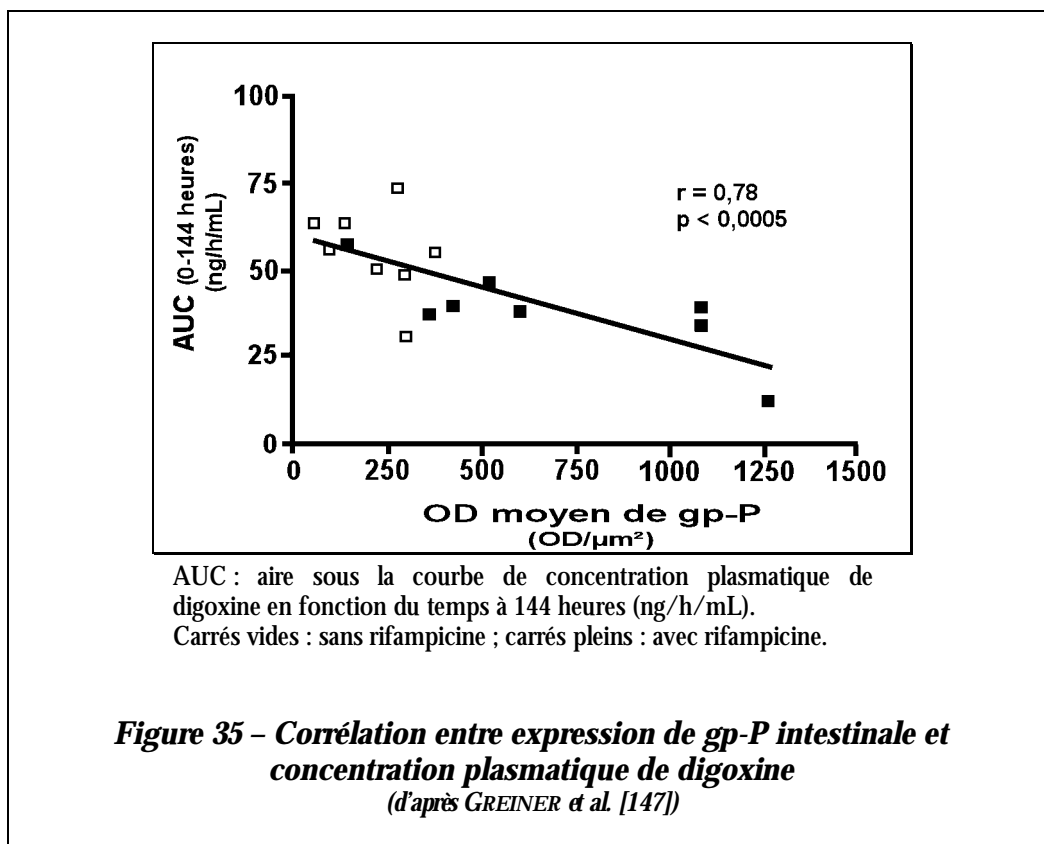
IV.1.2. Distribution tissulaire et rôles possibles de la glycoprotéine P

IV.1.2.1. Tractus digestif

Dans tous les tissus étudiés, la glycoprotéine P est localisée dans la membrane plasmique [9]. Dans les cellules épithéliales du tractus digestif inférieur (**duodénum**, **jéjunum**, **iléum** et **colon**), la glycoprotéine P est exprimée en localisation apicale des cellules — chez l'homme et **chez le chien** —, ce qui suggère que cette protéine peut participer à la *fonction excrétrice/sécrétrice* de la muqueuse du tractus digestif [74, 147].

GREINER *et al.* [147] ont démontré, chez des volontaires humains, que l'expression de la glycoprotéine P affecte la concentration plasmatique de la digoxine lorsqu'elle est administrée oralement (figure 35, en page 122). Ces auteurs montrent aussi que l'administration simultanée de rifampicine entraîne une diminution de la concentration plasmatique en digoxine en induisant l'expression de la glycoprotéine P intestinale (figure 36, en page 122).

Ces auteurs démontrent ainsi le rôle de la glycoprotéine P dans l'excrétion de la digoxine mais expliquent aussi l'existence d'une interaction rencontrée accidentellement entre la rifampicine et la digoxine.



La glycoprotéine P n'est pas détectée dans le tractus digestif supérieur (œsophage, estomac) [74]. Cependant, **chez le chien**, GINN [140] a mis en évidence un marquage intense du pôle apical de l'épithélium gastrique par l'anticorps C494.

IV.1.2.2. Reins et foie

La glycoprotéine P a été mise en évidence, **chez le chien** [234] et chez l'homme [398], dans la « bordure en brosse » des cellules formant les tubules proximaux rénaux. Dans le **foie**, c'est sur la face biliaire des hépatocytes et dans les cellules épithéliales des canaux biliaires que la glycoprotéine P est retrouvée [9, 19]. Cette localisation est compatible avec un rôle de la glycoprotéine P dans *l'excrétion des xénobiotiques et des métabolites endogènes* dans l'urine et la bile.

L'introduction expérimentale de la glycoprotéine P dans des cellules épithéliales rénales *in vitro* démontre que cette protéine est exprimée au pôle apical des cellules [301]. Des expériences similaires permettent de montrer que des membranes exprimant la glycoprotéine P acquièrent la capacité de transporter les substrats de cette protéine [168].

IV.1.2.3. Cerveau et testicules

Ces tissus ont comme point commun le statut de « sanctuaires pharmacologiques » conféré par une « barrière tissulaire » limitant la pénétration des xénobiotiques.

Chez le chien, comme chez l'homme, la glycoprotéine P est observée sur la face luminale de l'endothélium des capillaires cérébraux et testiculaires [75, 397]. Cette localisation laisse penser que la glycoprotéine P possède un rôle dans *l'existence de ces barrières*.

IV.1.2.4. Placenta

Différentes études [389, 439] ont révélé l'expression de la glycoprotéine P dans le placenta suggérant un rôle de celle-ci dans la protection fœtale vis à vis des xénobiotiques. Une récente étude [416] a permis de localiser la glycoprotéine P au pôle apical des cellules trophoblastiques du placenta humain et confirme que cette protéine possède un rôle dans la protection du fœtus vis à vis de différentes substances comme la vinblastine, la vincristine ou la digoxine.

IV.1.2.5. Endomètre, glandes surrénales

Chez les rongeurs, certaines glandes de l'endomètre gravidique expriment très fortement la glycoprotéine P [13, 39]. Chez l'homme et **chez le chien**, les corticosurrénales présentent une forte expression de la glycoprotéine P alors que les médullosurrénales ne l'expriment pas.

Ces localisations dans des glandes sécrétant des stéroïdes laissent supposer que la glycoprotéine P peut être impliquée dans leur sécrétion ou dans la protection membranaire (vis à vis de leurs effets toxiques à des concentrations élevées) des cellules les sécrétant.

Le fait que la progestérone soit un inhibiteur de la glycoprotéine P [442] et que d'autres stéroïdes (cortisol, dexamétasone...) soient transportés par des membranes exprimant la glycoprotéine P [413] est compatible avec cette hypothèse. L'inactivation du gène *mMdr1b* dans des cellules surrénales murines Y-1 induit une diminution de la sécrétion des stéroïdes. Toutefois, ces souris étant viables, la sécrétion stéroïdienne ne peut pas être complètement dépendante de la glycoprotéine P [9].

IV.1.2.6. Cellules hématopoïétiques et sanguines

Certaines cellules hématopoïétiques expriment la glycoprotéine P, mais dans une moindre intensité. Les cellules souches CD34⁺ de la moelle osseuse, transportant faiblement la rhodamine 123, expriment suffisamment de glycoprotéines P pour expliquer ce phénotype [58] et, en partie, leur chimiorésistance par rapport à des cellules plus différenciées.

KLIMECKI *et al.* [214] ont montré que les leucocytes expriment eux aussi la glycoprotéine P. C'est aussi le cas des macrophages et des lymphocytes T mais la signification physiologique n'est pas encore connue [195].

IV.1.2.7. Autres tissus

La glycoprotéine P a été mise en évidence dans le tissu osseux et plus particulièrement dans les chondrocytes [267]. Cette localisation pourrait être rapproché d'une fonction canal chlore de la glycoprotéine P.

En rapport avec ces localisations, différents rôles ont donc été proposés pour la glycoprotéine P. Les expériences d'inactivation génique chez la souris (voir ci-dessous) ont apporté de nombreux éléments permettant de comprendre ses rôles.

IV.1.3. Inactivation expérimentale des gènes *mdr* chez la souris

L'existence d'une fonction physiologique de la glycoprotéine P a pu être directement démontrée chez des souris porteuses d'une mutation homozygote du gène *mMdr1* [37, 353]. Chez la souris, il existe deux isoformes possédant la capacité de transporter les agents toxiques : l'isoforme de classe I (*mMdr1a*) et l'isoforme de classe II (*mMdr1b*) (voir III.1.1.1. Famille multigénique *MDR*, en page 71).

Chacun de ces gènes a été inactivé expérimentalement de façon isolée ou simultanée [351]. SCHINKEL *et al.* [351] ont montré que l'inactivation de ces deux gènes (séparément ou simultanément) n'avait pas de conséquences sur la viabilité, la fécondité ou la durée de vie des souris. Ce n'est pas le cas du gène *mMdr2* qui est essentiel au transport de la phosphatidylcholine dans le foie (III.1.1.2. Glycoprotéine PGY3, en page 72). La viabilité de ces mutants homozygotes *mMdr1* (-/-) est un argument encourageant pour la faisabilité de traitement se basant sur l'inactivation de la glycoprotéine P.

Le phénotype des souris *mMdr1b* (-/-) apparaît être identique à celui des souris dont les deux isoformes *mMdr1a* et *mMdr1b* sont inactivées. Ces résultats permettent de supposer que, dans des conditions expérimentales, le gène *mMdr1a* participe peu à la pharmacocinétique des médicaments et des xénobiotiques et que le produit du gène *mMdr1b* est le transporteur principal chez ces rongeurs. Toutefois, ces résultats ne signifient pas que le gène *mMdr1a* n'a pas une autre fonction, encore indéterminée [9]. Les tissus provenant de souris dont le ou les gène(s) *mMdr1a/b* sont inactivés représentent une nouvelle approche pour déterminer l'influence de la glycoprotéine P sur la perméabilité de la muqueuse intestinale et pour définir les mécanismes modulants la perméabilité médicamenteuse qui dépendent ou non de la glycoprotéine P [386].

Les souris dont le ou les gène(s) *mMdr1* sont inactivés présentent une sensibilité inhabituelle à quelques médicaments toxiques pour le SNC. Ces données laissent penser que la glycoprotéine P est utile à la formation de la barrière hémato-encéphalique [9]. Ces résultats, obtenus chez la souris, sont cohérents avec les niveaux élevés d'expression du gène *MDR1* constaté chez l'homme dans l'endothélium des capillaires cérébraux (voir IV.1.2.3, en page 123). Les médicaments testés incluent l'ivermectine qui ne traverse pas, habituellement, la barrière hémato-encéphalique. Or cette molécule est retrouvée à des concentrations 100 fois plus élevées dans le cerveau des souris *mMdr1a/b* (-/-). De la même façon, les concentrations

cérébrales en vinblastine sont augmentées plus de 2 fois chez ces souris. Ces données indiquent un rôle possible de la glycoprotéine P dans ce phénomène.

Cependant, l'analyse du rôle de la glycoprotéine P dans la barrière hémato-encéphalique est compliquée par le fait que la glycoprotéine P est impliquée aussi bien dans l'absorption que dans l'excrétion de ses substrats [9, 381].

IV.1.4. Glycoprotéine P : un transporteur aux fonctions multiples

De nombreux arguments sont donc en faveur d'un rôle physiologique de la glycoprotéine P concernant l'absorption, la distribution et l'excrétion de certains médicaments ou xénobiotiques hydrophobes et amphiphiles chez la souris, le **chien** et probablement chez l'homme. Ainsi, la glycoprotéine P peut permettre l'établissement d'une barrière vis à vis des xénobiotiques :

- 9 en empêchant l'entrée des substances toxiques dans l'organisme ;
- 9 en éliminant les médicaments de l'organisme — l'élimination de certaines substances dans l'urine par la glycoprotéine P a été démontrée [57] ;
- 9 en empêchant la pénétration dans certains tissus de substances particulièrement toxiques pour ceux-ci ;
- 9 en protégeant les cellules, à l'échelon cellulaire, contre les substances qui ont réussi à quitter le compartiment vasculaire pour gagner l'espace interstitiel.

Toutefois, ce rôle de protection contre les substances toxiques n'est pas le seul rôle qui ait été évoqué pour la glycoprotéine P. Cette protéine pourrait être impliquée dans le transport du chlore, de l'ATP, dans le métabolisme du cholestérol ou d'autres fonctions que nous évoquerons.

IV.1.4.1. Barrière hémato-encéphalique

Comme nous l'avons vu, le rôle de la glycoprotéine P dans la formation de la barrière hémato-encéphalique a été rapidement suspecté. Récemment, LIU *et al* [246] ont vérifié expérimentalement que l'efflux de glutamate par la barrière hémato-encéphalique était lié à la

glycoprotéine P. Ces résultats confirment que la glycoprotéine P participe à la création de la barrière hémato-encéphalique.

Une étude récente [274] sur des **chiens** de race Colley¹ a montré que les chiens présentant une sensibilité exacerbée à l'ivermectine possédaient une mutation homozygote du gène *mdr1* canin (*cMdr1*) tandis que les chiens homozygotes *cMdr1* (+/+) ou hétérozygotes ne présentaient pas d'augmentation de sensibilité à l'ivermectine. Une étude très récente [275] s'est intéressée à la fréquence de l'allèle *cMdr1* mutant associé avec une sensibilité accrue à l'ivermectine. Les résultats de cette étude sur 40 chiens de race Colley indiquent que :

- 9 17 (42%) sont hétérozygotes ;
- 9 14 (35%) sont homozygotes pour la forme mutante de l'allèle ;
- 9 9 (22%) sont homozygotes pour la forme « sauvage » de l'allèle.

Ces résultats renforcent l'idée du rôle essentiel de la glycoprotéine P dans la production d'une barrière hémato-encéphalique. La MRP pourrait aussi participer à l'établissement de cette barrière [308].

En 2001, COX *et al.* [80] ont démontré que la glycoprotéine P participe au transport de l'énaminone² par la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, la glycoprotéine P peut affecter le traitement de l'épilepsie avec ce médicament.

IV.1.4.2. Canal chlore

En raison de l'homologie de séquence entre la glycoprotéine P et la protéine CFTR, dont on sait qu'elle possède une fonction canal chlore, il a été supposé que la glycoprotéine P pouvait aussi présenter une telle activité.

VAVERDE *et al.* [417] ont testé cette hypothèse et ont mis en évidence une activité de transport des ions chlore par la glycoprotéine P. Cette fonction canal chlore permet la régulation du volume cellulaire. Les résultats d'une étude de GILL *et al.* [139] indiquent que cette activité est indépendante de la fonction de multichimiorésistance et que la liaison avec l'ATP — sans qu'il soit hydrolysé — est suffisante pour cette activité.

La phosphorylation de la *séquence de liaison* de la glycoprotéine P serait à l'origine d'une régulation de la conductance aux ions chlore [176].

¹ Les chiens de race Colley sont connus pour présenter une sensibilité plus importante, chez certains individus, à l'ivermectine.

² L'énaminone est un anticonvulsivant utilisé dans le traitement de l'épilepsie

IV.1.4.3. Transport de l'ATP

ABRAHAM *et al.* [1] ont constaté que la libération d'ATP par les cellules CHO multichimiorésistantes est trois fois plus élevée que celle des cellules CHO sensibles. De plus, une corrélation a été trouvée entre la libération d'ATP et le taux d'expression de la glycoprotéine P dans différentes lignées cellulaires. Ces différents résultats permettent de penser que la glycoprotéine P pourrait avoir une fonction perméase permettant le transport de l'ATP.

Cependant une récente étude de ROMAN *et al.* [326] indique que la glycoprotéine P aurait plutôt un rôle régulateur d'autres voies cellulaires de transport de l'ATP.

IV.1.4.4. Phospholipides-translocase

En se basant sur le fait que le produit du gène *mMdr2* permet le transport de la phosphatidylcholine (voir III.1.1.2. Glycoprotéine PGY3, op pagina 72), VAN HELVOORT *et al.* [422] ont étudié une éventuelle activité translocase du produit du gène *MDR1*. Ces auteurs ont conclu que la glycoprotéine P pouvait agir comme une phospholipides-translocase ayant une large spécificité — contrairement à la PGY3 qui est spécifique de la phosphatidylcholine — : phosphatidylcholine, phosphadityléthanolamine, phosphatidylsérine et sphingomyéline.

Récemment, ROMSICKI et SHAROM [327] ont démontré cette activité en utilisant des protéoliposomes reconstitués exprimant la glycoprotéine P.

IV.1.4.5. Métabolisme du cholestérol

Le métabolisme cellulaire du cholestérol est régulé par un ensemble complexe de mécanismes incluant la biosynthèse du cholestérol, son hydrolyse, son transport vers le réticulum endoplasmique où il subit une estérification [182]. Cette régulation permet de limiter les effets toxiques d'un excès de cholestérol libre ; une fois estérifié, le cholestérol est stocké sous cette forme dans le cytoplasme [134].

Différents auteurs ont proposé un rôle de la glycoprotéine P dans le métabolisme du cholestérol [239]. METHERALL *et al.* [279] ont émit l'hypothèse que la glycoprotéine P participe à la biosynthèse du cholestérol. Les auteurs proposent un modèle dans lequel la glycoprotéine P est nécessaire au transport des stérols de la membrane plasmique vers le

réticulum endoplasmique. Dans les tubules proximaux rénaux, la glycoprotéine P serait indispensable à cette migration du cholestérol [447].

Cependant, bien que différentes études [93, 264] aient mis en évidence une corrélation entre l'activité de la glycoprotéine P et l'estérification du cholestérol, l'implication directe de la glycoprotéine P est discutée [182].

IV.1.4.6. Autres rôles physiologiques

D'autres rôles physiologiques ont été évoqués pour la glycoprotéine P dont certains sont controversés.

a. *Protection de la cellule contre l'apoptose*

Un rôle très controversé de la glycoprotéine P pourrait être de protéger les cellules de l'apoptose [191, 377] en diminuant la formation du *complexe d'attaque de la membrane* (ou MAC pour « *Membrane Attack Complex* »). Cependant, cette fonction reste très controversée et une récente étude semble infirmer cette hypothèse [192].

b. *Résistance vis à vis des infections virales*

RAVIV *et al.* [311] ont mis en évidence que les cellules multichimiorésistantes surexprimant la glycoprotéine P étaient aussi résistantes à l'infection par des virus pénétrant dans la cellule au travers de la membrane plasmique. Cette résistance serait déployée lors des étapes précoces de l'infection virale, au moment de la reconnaissance entre les protéines virales et leur cible membranaire. Les résultats de cette étude laissent penser que le phénomène de multichimiorésistance pourrait protéger les cellules de l'infection par un groupe important de virus tels que le VIH, le HSV (pour « *Hepes Simplex Virus* ») et certains rétrovirus oncogènes [311].

LEE *et al.* [225] ont démontré que l'expression de la glycoprotéine P par une lignée cellulaire leucémique de type T induisait une diminution de l'infectiosité du VIH à la fois durant l'étape de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique et les étapes ultérieures du cycle viral.

IV.2. Expression de la Glycoprotéine P par les tissus tumoraux et valeur pronostique

L'expression du gène *MDR1* a été beaucoup étudiée. Diverses méthodes ont été utilisées comme la détection de l'ARNm ou de la glycoprotéine P. Une classification des tumeurs en fonction de leur profil d'expression de la glycoprotéine P a pu être établie à partir d'un grand nombre de travaux effectués dans ce domaine. Nous pouvons regrouper les tissus exprimant la glycoprotéine P de la façon suivante [297] :

9 d'une part, des *tumeurs issues de tissus exprimant normalement la glycoprotéine P* et qui gardent un certain nombre de caractéristiques du tissu d'origine dont celle d'exprimer nettement la glycoprotéine P [121]. Il s'agit des phéochromocytomes et des carcinomes coliques, pancréatiques et rénaux [74, 293] ;

9 d'autre part, un deuxième groupe comprenant les tumeurs de l'ovaire et du sein, les neuroblastomes, les lymphomes, les leucémies aiguës, le myélome et les sarcomes des tissus mous où l'on distingue une *expression de la glycoprotéine P faible avant la chimiothérapie, mais qui s'élève après traitement* [141] ;

9 enfin, un troisième groupe comprenant les tumeurs gliales, du col utérin, de la prostate, des voies aérodigestives supérieures, de l'estomac et le mélanome où *l'expression du gène MDR1 est faible, quels que soient le stade évolutif ou le traitement utilisé*

Examinons au travers de quelques exemples l'implication de la glycoprotéine P dans la multichimiorésistance de diverses tumeurs.

IV.2.1. Tumeurs issues de tissus exprimant physiologiquement la glycoprotéine P

IV.2.1.1. Carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (ou hépatome malin) fait partie, avec le cholangiocarcinome, des tumeurs hépatiques les plus fréquentes, chez l'homme [204] et chez le chien [266].

Comme nous l'avons vu, la glycoprotéine P est exprimée par les hépatocytes et l'épithélium des canaux biliaires. Les carcinomes hépatocellulaires et les cholangiocarcinomes,

dérivants de ces cellules, présentent souvent une résistance intrinsèque aux différents agents anticancéreux couramment utilisés ; cette chimiorésistance augmentant au cours de traitement successifs [174]. La glycoprotéine P a donc été impliquée dans cette chimiorésistance. Cependant, la valeur pronostique de sa surexpression est très discutée [204].

HUANG *et al.* [174] ont mesuré le niveau d'expression du gène *MDR1* et de la glycoprotéine P chez deux groupes de patients atteints de carcinome hépatocellulaire : un groupe est traité par chimiothérapie avant la chirurgie et l'autre non. Parmi les patients non traités par chimiothérapie, les auteurs ont mis en évidence une expression du gène *MDR1* plus élevée dans le tissu hépatique cancéreux que dans le tissu sain voisin. Les patients traités par chimiothérapie présentent des taux élevés d'expression du gène *MDR1* et ce taux d'expression dans les tissus sains est plus élevé chez les patients ayant subi une chimiothérapie que chez les autres. Dans cette étude les auteurs montrent, dans le cas du carcinome hépatocellulaire, que la glycoprotéine P est surexprimée après chimiothérapie, non seulement par le tissu cancéreux mais aussi par le tissu sain. Les résultats de ces auteurs sont compatibles avec un rôle de la glycoprotéine P dans cette chimiorésistance.

Chez le chien, dans l'étude de GINN P.E. [140], la glycoprotéine P est détectée dans 100 % des hépatomes malins (n=4) et dans deux tiers des cas de cholangiocarcinomes (n=3). Dans le cas des hépatomes malins, les cellules présentent un marquage diffus et intense.

Récemment, KATO *et al.* [204] ont calculé le rapport entre le taux d'expression de la glycoprotéine P par les tissus tumoraux et le taux d'expression par les tissus sains après résection chirurgicale. Dans cette étude, les auteurs concluent que le calcul de ce rapport est un facteur indépendant de pronostic : le pronostic vital étant meilleur pour les patients présentant un rapport inférieur à 1.

La glycoprotéine P pourrait donc avoir une valeur pronostique dans le cas de ces tumeurs hépatiques.

IV.2.1.2. Adénocarcinome rénal

L'adénocarcinome rénal est très souvent résistant aux traitements anticancéreux par chimiothérapie, bien qu'un résultat positif soit parfois obtenu avec la vinblastine ou la

doxorubicine. Cette tumeur se développe habituellement à partir des cellules des tubules rénaux [367], cellules exprimant de façon physiologique la glycoprotéine P [398].

Très tôt, différentes études ont mis en évidence une surexpression du gène *MDR1* dans ce type tumoral [141, 367]. En revanche, les épithéliomas transitionnels du bassinet, répondant bien à la chimiothérapie, présentent seulement de faibles taux d'expression du gène *MDR1*.

Il a été démontré *in vitro*, à partir de lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes rénaux, que la glycoprotéine P joue un rôle essentiel dans la résistance intrinsèque de ce type tumoral alors que d'autres mécanismes s'additionnent lors de résistance acquise [445].

IV.2.1.3. Tumeurs du système nerveux central

Parmi ces tumeurs nous trouvons les tumeurs du cerveau qui sont toujours de mauvais pronostic malgré les progrès des techniques neurochirurgicales, de la radiothérapie ou de la chimiothérapie. Concernant cette dernière le problème de multichimiorésistance est souvent rencontré [313]. La plupart des tumeurs cérébrales expriment une chimiorésistance intrinsèque ; l'effet de la barrière hémato-encéphalique pouvant participer à l'échec de la chimiothérapie. De la même façon, les métastases se développant dans le cerveau présentent une faible réponse à la chimiothérapie anticancéreuse.

Un nombre croissant d'arguments permettent de corréler une surexpression de la glycoprotéine P par les tumeurs n'ayant pas encore subi de traitement avec un mauvais pronostic d'un traitement utilisant les substrats de la glycoprotéine P [313].

L'expression de la glycoprotéine P dans le cerveau humain a été détectée la première fois par THIEBAUT *et al* [398] en 1987. Différents auteurs ont montré que la glycoprotéine P est exprimée de façon prépondérante par les cellules endothéliales du côté luminal des capillaires cérébraux [75, 313, 397].

Les tumeurs cérébrales peuvent être divisées en trois groupes [313] :

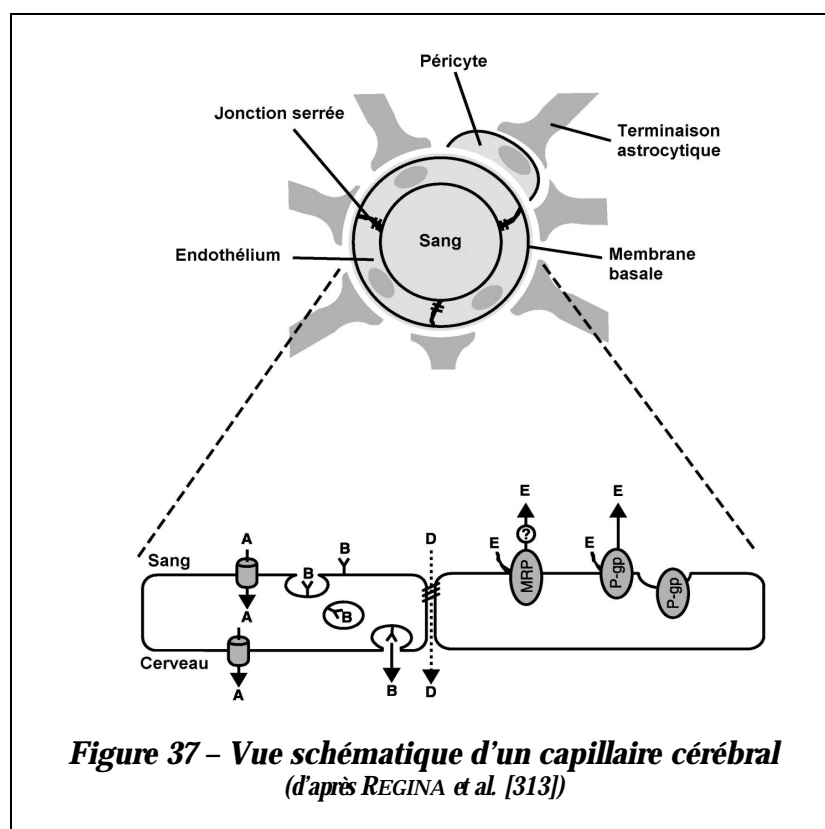
9 premièrement, les tumeurs primitives — se développant *in situ* — qui développent leur vascularisation à partir des vaisseaux cérébraux ;

9 deuxièmement, les tumeurs métastatiques dont l'irrigation se développe aussi à partir des vaisseaux cérébraux ;

9 enfin, les méningiomes qui se développent à partir de la crête neurale et dont la vascularisation provient initialement des méninges.

Ainsi, dans la plupart des cas, il est possible que l'organisation endothéliale particulière des vaisseaux cérébraux (figure 37, ci-dessous) puisse subir des modifications ayant des répercussions sur le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique.

Bien que certains arguments aient pu être en faveur d'une augmentation de la perméabilité de ces capillaires, il semble que la fonction de barrière soit habituellement conservée pouvant ainsi limiter la pénétration des agents anticancéreux *in situ* [313].



L'expression de la glycoprotéine P a été étudiée à la fois sur des cellules de tumeurs primitives et des cellules de tumeurs métastatiques [313].

a. Tumeurs primitives

Le mécanisme exact par lequel les tumeurs cérébrales résistent à la chimiothérapie demeure inconnu. L'absence fréquente de corrélation entre les taux d'expression de la glycoprotéine P et les taux de résistance dans de nombreuses tumeurs est un argument en défaveur de l'implication de la barrière hémato-encéphalique. Néanmoins, une récente étude [5] a montré que l'expression de glycoprotéine P (ou de MRP1), même en faible quantité, pouvaient être à l'origine d'une modification de la chimiosensibilité à de nombreux médicaments transportés par cette glycoprotéine. De plus, dans le cas du neuroblastome, une telle corrélation (entre surexpression de la gp-P et chimiorésistance) a été établie [367].

DEMEULE *et al.* [96] ont étudié l'expression de la glycoprotéine P par des gliomes de différents grades histologiques et l'ont comparé à celle du tissu cérébral sain (figure 38, ci-dessous). Les différents grades de gliomes étudiés sont : l'astrocytome pilocytique (grade I), l'astrocytome (grade II), l'astrocytome anaplastique (grade III) et le glioblastome (grade IV). Leurs résultats montrent que les taux d'expression de la glycoprotéine P sont similaires, dans la plupart des cas, à ceux d'autres tissus néoplasiques ou du tissu cérébral sain.

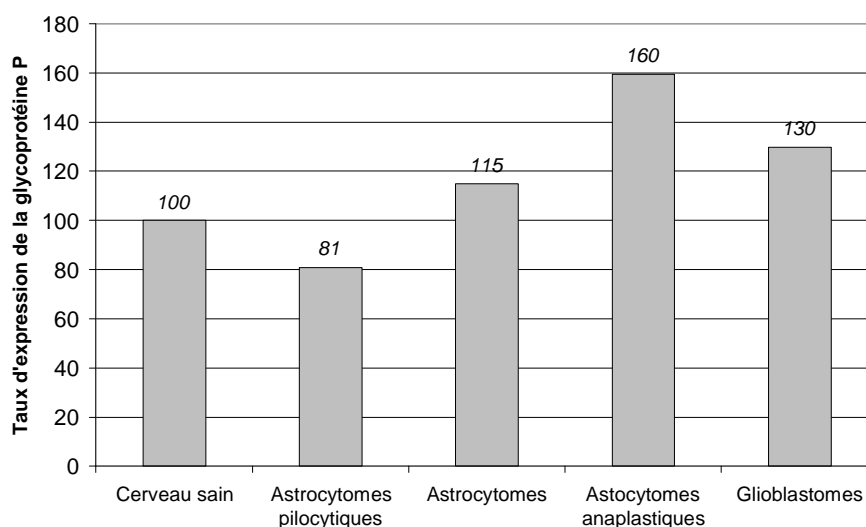


Figure 38 – Expression de la glycoprotéine P par le tissu cérébral sain et tumoral
(d'après REGINA *et al.* [313])

Ces différents résultats permettent de croire que la faible réponse à la chimiothérapie de ces tumeurs trouve son origine dans l'expression intrinsèque de la glycoprotéine P par le tissu cérébral sain et que la glycoprotéine P peut être considérée comme ayant une valeur pronostique négative [96, 313]. Parmi les tumeurs cérébrales, le plus haut taux d'expression intrinsèque de glycoprotéine P a été retrouvé dans les méningiomes ; ce taux est 25 fois supérieur à celui du tissu sain. Les méningiomes sont des tumeurs richement vascularisées ; le haut niveau d'expression de la glycoprotéine P pourrait être la conséquence de cette riche vascularisation.

La multichimiorésistance des tumeurs cérébrales primitives pourrait donc être expliquée par une surexpression intrinsèque de la glycoprotéine P par les cellules tumorales mais aussi par les vaisseaux irriguant ces tumeurs.

b. Tumeurs métastatiques

REGINA *et al* [313] ont étudié l'expression de la glycoprotéine P par les métastases de mélanomes et de carcinomes pulmonaires. Étonnamment, les métastases de mélanomes n'expriment que 5 % du niveau d'expression de la glycoprotéine P du tissu cérébral sain ; celles de carcinome pulmonaire expriment 40 % de ce niveau. Les métastases de mélanomes sont caractérisées par leur faible réponse aux traitements anticancéreux par chimiothérapie alors qu'une réponse est parfois rencontrée dans le cas des métastases de carcinomes pulmonaires. La faible expression de la glycoprotéine P observée laisse penser que *d'autres mécanismes de résistance sont impliqués* dans ces cellules.

Ces résultats permettent aussi de supposer que l'origine tissulaire des cellules tumorales détermine le phénotype des cellules des vaisseaux irriguant la tumeur.

Le rôle de la barrière hémato-encéphalique ainsi que celui de la glycoprotéine P dans l'établissement de la chimiorésistance des tumeurs cérébrales apparaît donc important.

IV.2.1.4. Carcinome colique

Le carcinome colique est la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme. Les traitements par chimiothérapie sont habituellement peu efficaces [367]. Des niveaux d'expression intermédiaires d'ARNm *MDR1* ont été mis en évidence dans les carcinomes du colon, comme dans la muqueuse colique saine. Dans une étude de FOJO *et al* [121] en 1987, des niveaux comparables d'ARNm *MDR1* ont été observés dans les tissus tumoraux et sains de la muqueuse colique de 8 patients atteints de carcinome colique. Les auteurs n'ont pas observé de corrélation entre ces taux et l'analyse histologique de ces tissus.

En 1989, GOLDSTEIN *et al* [141] rapportent des niveaux d'expression moyennement élevés dans 35 échantillons sur 40, dont 10 avec des niveaux d'expression élevés. Il semble que les tumeurs exprimant la glycoprotéine P aient un potentiel de dissémination métastatique accru [367, 435].

Peu d'études se sont intéressées à la valeur pronostique de la surexpression de glycoprotéines P par les cancers colorectaux après avoir mis en œuvre une chimiothérapie. TOKUNAGA *et al* [401] ont examiné 80 patients atteints de cancer colorectal. Ces auteurs ont mis en évidence — à la différence de FOJO *et al* dont l'étude portait uniquement sur les carcinomes coliques — une corrélation entre la différenciation histologique et le niveau

d'expression de la glycoprotéine P. Cependant, les durées de survies tendent à être supérieures chez les patients exprimant la glycoprotéine P. Les analyses univariées ou multivariées de ces auteurs indiquent que la glycoprotéine P n'est pas un facteur pronostic significatif.

Ainsi, la glycoprotéine P ne semble avoir qu'un rôle partiel dans la chimiorésistance manifestée par les cancers colorectaux.

IV.2.2. Tumeurs dont l'expression de la glycoprotéine-P augmente après traitement

Nous retrouvons parmi ces tumeurs les tumeurs hématologiques, les tumeurs mammaires, le carcinome ovarien ou les sarcomes des tissus mous [367]. Nous nous intéresserons principalement aux tumeurs hématologiques et aux tumeurs mammaires.

IV.2.2.1. Tumeurs hématologiques

Le développement de cas de résistance dans les leucémies aiguës lymphoïdes ou myéloïdes et les myélomes multiples est fréquemment associé avec l'expression d'un ou plusieurs des gènes de résistance pléiotropique (*MDR1*, *MRP1* et *LRP*) [379].

a. *Leucémies aiguës*

Les progrès réalisés dans le traitement des leucémies aiguës ont été marqués par l'augmentation du taux de rémission lors de l'induction et du maintien de celle-ci [367]. Malgré les succès rencontrés dans le traitement des leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) et myéloïdes (LAM), une rechute dans les deux années suivant le diagnostic est habituelle ; souvent avec la présence d'une multichimiorésistance et d'une moins bonne réponse aux traitements. Le phénotype MDR dans les leucémies aiguës a été beaucoup étudié puisque les médicaments associés à ce phénotype sont fréquemment utilisés dans le traitement des leucémies aiguës. Les anthracyclines, la daunorubicine et l'idarubicine sont des anticancéreux importants dans le traitement des LAM et les alcaloïdes de la pervenche (vincristine) dans le traitement des LAL [367].

≈ Leucémies aiguës myéloïdes

La facilité d'obtention des cellules tumorales dans les leucémies aiguës myéloïdes a permis un grand nombre d'études qui révèlent une positivité initiale de la glycoprotéine P dans 40 à 70 % des cas. Cette fréquence est plus élevée pour les LAM secondaires aux syndromes myélodysplasiques et les LAM préalablement traitées par chimiothérapie, en rechute ou réfractaires [297, 367].

De plus en plus d'études semblent indiquer que l'expression de la glycoprotéine P dans le cas des LAM est un marqueur de mauvais pronostic [34, 358, 454]. L'expression de la glycoprotéine P a été détectée par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps monoclonal C219 dans étude réalisée à partir de 82 patients atteints de LAM. Les résultats de cette étude indiquent que l'expression de la glycoprotéine P possède une bonne valeur pronostique [358]. Une étude de BORG *et al.* [34] indique que l'expression de la glycoprotéine P est corrélée à la diminution de la concentration intracellulaire de la daunorubicine dans des cellules de LAM — ce qui n'est pas le cas de l'expression de la MRP ou de la LRP. Dans cette étude, la glycoprotéine P — mais aussi la LRP — permet de prévoir la réponse à la chimiothérapie et le taux de survie global. DAMIANI *et al.* [86] établissent qu'un rôle important est joué par la glycoprotéine P dans la réponse thérapeutique des LAM secondaires à un syndrome myélodysplasique.

Pourtant, malgré ce rôle important de la glycoprotéine P dans le pronostic, d'autres mécanismes peuvent survenir et certaines études n'attribuent à la glycoprotéine P qu'un rôle limité [403].

≈ Leucémies aiguës lymphoïdes

Les leucémies aiguës lymphoïdes sont les tumeurs les plus fréquentes chez l'enfant. Chez l'adulte elles sont moins fréquentes que les leucémies myéloïdes. Dans le cas des LAL, l'incidence du phénotype MDR est de 30 à 40 % [379]. La corrélation de l'expression de la glycoprotéine P avec la réponse thérapeutique est cependant moins évidente [297] : certains auteurs [433] ne trouvent pas de corrélation entre l'expression du phénotype MDR et l'efficacité de la chimiothérapie.

Cependant, d'autres études [85, 367, 379] parviennent à démontrer une corrélation entre la surexpression de la glycoprotéine P et une survie plus courte. La surexpression de gp-P semble être plus fréquente dans les LAL de l'adulte que la surexpression de la MRP ou de la LRP [85].

b. *Leucémies chroniques*

Le phénotype de résistance pléiotropique dans le cas des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) est observé avec une fréquence variable selon les études [367]. Une étude récente [73] indique que la glycoprotéine P, la MRP et la LRP sont fréquemment exprimées dans les LLC. Toutefois, la signification clinique reste à déterminer.

La signification de la surexpression du gène *MDR1* par des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) n'a pas été très étudié. Toutefois, GILES *et al* [138] ont étudié cette surexpression chez 198 patients. Les auteurs ont observés une surexpression de ce gène chez 55 % des patients. En revanche, leurs résultats indiquent que la surexpression du gène *MDR1* n'est pas associée à la progression de la maladie, à la réponse au traitement ou à la survie des patients en phase précoce de LMC.

c. *Lymphomes*

La multichimiorésistance exprimée par le lymphome malin a fait l'objet de nombreuses études. En 1989, SALMON *et al* [340] ont démontré que l'expression de la glycoprotéine P était corrélée avec la chimiorésistance *in vitro* à la doxorubicine. L'expression de la gp-P a été étudiée dans les cas de lymphomes malins non-Hodgkinien (LMNH) avant traitement [304]. Dans cette étude, il n'a pas été observé de corrélation entre les niveaux d'expression de la glycoprotéine P et les sous-types histologiques définis par la classification de Kiel.

Différentes études [367] ont démontré que, dans le cas de lymphomes nouvellement diagnostiqué, l'expression du gène *MDR1* par une partie des cellules tumorales était faible. Ces études montrent aussi que ces niveaux d'expression augmentent après l'échec du traitement. Toutefois, l'importance de ce mécanisme de résistance dans la résistance *in vivo* n'est pas encore établie.

Chez le chien, le lymphome malin (LM) fait partie des tumeurs où l'expression de la glycoprotéine P a été la plus étudiée [28, 140, 226, 285, 385] ; probablement parce ce qu'il peut servir de modèle pour le LMNH [285]. Une chimiorésistance est fréquemment rencontrée lors du traitement du lymphome. Plusieurs protocoles de chimiothérapie permettent d'induire une rémission rapide du lymphome malin chez le chien ; cependant, l'efficacité de ces traitements lors d'une rechute est fortement diminuée [28].

Les anticancéreux fréquemment utilisés chez le chien pour le traitement du LM sont le cyclophosphamide, la vincristine, la prednisolone et la doxorubicine. Les chiens traités à l'aide de doxorubicine seule présentent une rémission plus longue que les animaux traités avec les

trois autres médicaments cités (protocole COP). Une explication possible est que dans ce protocole COP, deux substances (vincristine et prednisolone) sont connus pour induire le phénotype MDR alors que dans le cas de l'utilisation de doxorubicine seule, il n'y a évidemment que cette dernière qui peut induire le phénotype MDR [28]. De même, chez les chiens atteints de LM, l'utilisation de corticoïdes avant l'induction d'une chimiothérapie anticancéreuse est un facteur pronostic négatif. Ce phénomène est probablement dû à une induction de l'expression de la glycoprotéine P par la prednisolone.

MOORE *et al.* [285] ont montré — en effectuant des biopsies avant et après traitement sur des chiens atteints de lymphome — que l'expression de la glycoprotéine P augmentait après traitement. LEE *et al.* [226] ont démontré, **chez le chien**, que l'expression de la glycoprotéine P lors de LM spontanés est similaire à l'expression rencontrée chez l'homme. Ces auteurs ont aussi démontré que la surexpression de glycoprotéines P chez des chiens atteints de lymphome était corrélée avec une diminution de la réponse au traitement.

Une récente étude de LIU *et al.* [245] concernant des patients atteints de LM de phénotype B indique qu'un haut niveau d'expression de la glycoprotéine P est corrélé avec une probabilité élevée de rechute et un mauvais pronostic.

d. *Myélome multiple*

Tout comme dans les autres tumeurs hématologiques la réponse initiale du myélome multiple (MM) à la chimiothérapie est généralement bonne. Cependant, la durée de rémission peut être courte [367] et lors d'une rechute, une surexpression de la glycoprotéine P est fréquemment retrouvée.

La détection d'une surexpression de la glycoprotéine P avant tout traitement ne semble pas être corrélée au résultats du traitement. En revanche, l'expression du gène *MDR1* est systématiquement observée lors de MM réfractaires au protocole VAD¹. Chez ces patients, la fréquence et l'intensité de l'expression de la glycoprotéine P semblent être corrélé à une exposition préalable à, respectivement, la doxorubicine et la vincristine [379].

¹ Le protocole VAD est un protocole de chimiothérapie anticancéreuse utilisant la vincristine, la doxorubicine (ou adriamycine) et la dexaméthasone

IV.2.2.2. Tumeurs mammaires

Ces tumeurs sont souvent considérées comme les tumeurs solides parmi les plus chimiosensibles [402]. La chimiothérapie anticancéreuse est utilisée pour traiter ces tumeurs à la fois en traitement adjuvant d'une exérèse chirurgicale et comme traitement des tumeurs non opérables ou métastasées [367]. La doxorubicine est la molécule de choix.

Les résultats des différentes études concernant l'expression de la glycoprotéine P dans le tissu mammaire sont très variables [402]. La glycoprotéine P est faiblement exprimée par le tissu mammaire sain (chez l'homme comme chez le chien) [74, 140, 367]. La glycoprotéine P est observée plus souvent lorsqu'une chimiothérapie a été préalablement réalisée.

La valeur pronostique de l'expression de la glycoprotéine P par les tumeurs mammaires est très controversée et les différentes études concluent tantôt à une absence de valeur pronostique [114, 321] tantôt à une signification pronostique défavorable [238].

Cependant, TROCK *et al.* [402] concluent, à l'aide d'une méta-analyse, à une corrélation entre la surexpression de la glycoprotéine P et un échec du traitement. Les résultats de cette étude laissent penser que la glycoprotéine P contribue à la multichimiorésistance dans la plupart des tumeurs mammaires.

IV.2.3. Conclusion

Ainsi, la **contribution précise de la glycoprotéine P à la chimiorésistance *in vivo* est encore mal comprise** [241]. Des corrélations entre l'expression de la glycoprotéine P et la réponse thérapeutique ont pu être établies pour les sarcomes de l'enfant [55], les neuroblastomes [297], les ostéosarcomes [20] et les tumeurs de l'œsophage [7]. L'expression tissulaire semble similaire chez l'homme et le chien [385]. Dans le cas des ostéosarcomes, MEALEY *et al.* [273] ont démontré **chez le chien** que, comme chez l'homme, l'exposition de cellules d'ostéosarcomes à la doxorubicine induit une surexpression d'ARNm *MDR1* et de glycoprotéines P. De plus, ces cellules présentent une diminution de la CIC de doxorubicine ainsi qu'une diminution de leur sensibilité vis à vis de la vincristine.

La confirmation de la valeur pronostique de la glycoprotéine P **nécessite de plus larges études** avec des outils de détection plus performants. Certains auteurs s'intéressent par exemple à la scintigraphie au *Tchetchenium 99 Sestamibi* [241, 297].

IV.3. Régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes *mdr*

Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à une surexpression de la glycoprotéine P et d'envisager des traitements permettant de la contrôler, l'étude de la régulation de l'expression des gènes *mdr* est indispensable.

Chez les eucaryotes, la régulation de l'expression des gènes est complexe. Le contrôle peut être transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel ou s'effectuer par l'intermédiaire de la chromatine. Les contrôles les plus importants sont réalisés lors de la transcription et de la maturation des transcrits. L'encadré 2, en page 142, présente quelques rappels sur le déroulement de la transcription chez les eucaryotes. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la régulation transcriptionnelle.

Les premières études des lignées cellulaires MDR ont indiqué que la surexpression de la glycoprotéine P résultait d'une amplification génique [355]. Toutefois, des études postérieures ont montré que cet augmentation d'expression de la glycoprotéine P pouvait survenir en l'absence d'une augmentation proportionnelle du nombre de copies géniques, évoquant ainsi un mécanisme de régulation transcriptionnelle [355]. L'absence d'identification d'une amplification génique *in vivo* a renforcé ce concept.

Les causes à l'origine de l'acquisition du phénotype de résistance pléiotropique sont controversées : cette acquisition résulte-t-elle d'une sélection ou bien d'une induction par les agents anticancéreux ? Il a été prouvé qu'une sélection médicamenteuse d'un tel phénotype était possible [197]. Cependant, des preuves d'une régulation de l'expression de la glycoprotéine P consécutive à des modifications des facteurs environnementaux [67, 355] ou à l'évolution tumorale ont aussi été apportées [197, 400].

Encadré 2 – Transcription génique : quelques rappels

La transcription est un processus qui conduit à la formation des précurseurs des ARNm (ou transcrit primaires) à partir de l'ADN. La transcription est réalisée à l'aide d'ARN polymérases ; chez les eucaryotes, il en existe trois : ARNp I, ARNp II, ARNp III. L'ARNp II transcrit les ARNm, tandis que les ARNp I et III transcrivent les ARN de transfert (ARNt) et les ARN ribosomiaux (ARNr).

La transcription est réalisée en trois étapes : initiation, élongation et terminaison.

Lors de l'étape d'initiation, l'ARNp se lie à l'ADN double brin sur le site promoteur et entraîne localement une dénaturation de l'ADN libérant le « *brin négatif* » qui sera transcrit. Le premier codon transcrit est noté « +1 » et correspond au site d'initiation. Lors de cette étape une coiffe (ou « cap ») est additionnée à l'extrémité 5' de l'ARNm. Cette coiffe est indispensable pour protéger les ARNm de l'attaque par des enzymes de dégradation.

L'élongation est l'étape la plus longue pendant laquelle l'ARNm est synthétisé.

Lorsque ARNp arrive à la fin de l'unité transcriptionnelle, cette enzyme se détache et libère l'ARNm transcrit. Après synthèse, une séquence poly-A est ajoutée à l'extrémité 3'. La présence de poly-A aurait également une fonction de protection des ARNm sur l'extrémité 3' des ARNm.

La régulation transcriptionnelle fait intervenir des facteurs de transcription, des facteurs cis- et trans-régulateurs et le choix du promoteur.

IV.3.1. Complexe d'initiation de la transcription

À la différence des ARNp des procaryotes, l'ARN polymérase II des eucaryotes ne se fixe pas directement sur le promoteur, elle se fixe par l'intermédiaire de facteurs généraux de la transcription comprenant plusieurs protéines dénommées TFIIA, TFIIB... (TF pour « *Transcription Factor* » et II pour ARN polymérase II). Ces protéines associées à l'ARNp II constituent le complexe d'initiation de la transcription et catalysent la formation de la première liaison phosphodiester entre les deux premiers nucléotides de l'ARNm. La fixation du complexe d'initiation a lieu via le promoteur qui contient souvent une boîte TATA (ou boîte de HOGNESS) et/ou une boîte CCAAT. Lorsque le site promoteur est libéré par la progression de l'ARNp II sur l'ADN, un autre complexe d'initiation peut se mettre en place.

Il existe des promoteurs avec ou sans boîte TATA. La boîte TATA est un élément reconnu par TFIID. Il apparaît que les promoteurs des gènes *mdr* murins de classe I et II (*mMdr1a* et *mMdr1b*), ainsi que des gènes *mdr* de classe II du rat (*Pgp2*), possèdent une boîte TATA [355]. La plupart des promoteurs dépourvus de boîte TATA contiennent un autre élément appelé *initiateur*, suffisant pour permettre l'initiation de la transcription. C'est le cas du gène humain *MDR1* qui contient une séquence consensus de cet élément dans la région située entre -3 et +5 [197]. Malgré l'absence de boîte TATA, l'étude du gène *MDR1* a révélé l'existence d'une boîte CAAT-like située dans la région entre -113 et -118 et d'une boîte CCAAT située entre -238 et -232 (figure 39, en page 144).

La **transcription** du gène *MDR1* commence à la hauteur de deux sites majeurs (+1 et +5) positionnés à 140 et 136 pb, respectivement, en amont du site d'initiation de la **traduction** [355]. Dans certaines cellules multichimiorésistantes (*in vitro* et *in vivo*), des transcrits *MDR1* initiés en amont du site +1 ont été identifiés. Chez le hamster, par exemple, la transcription du gène de classe I (*Pgp1*) commence habituellement à un site situé 67 pb en amont du site +1 homologue du gène *MDR1*. La translocation d'un promoteur hétérologue pourrait en être l'origine [355].

IV.3.2. Facteurs cis- et trans-régulateurs de la transcription

Il existe toute une série de séquences nucléotidiques comportant chacune un nombre limité de nucléotides (6-8 nucléotides le plus souvent) et dispersées généralement en 5' du gène. Ces séquences sont appelées *éléments cis-régulateurs* et sont remarquablement conservées dans les gènes de nombreuses espèces. Elles vont fixer des facteurs dits *trans-régulateurs*.

IV.3.2.1. Facteurs cis-régulateurs

Quand un facteur trans-régulateur se fixe sur une séquence cis-régulatrice de l'ADN, la quantité d'ARNm synthétisé est brusquement modifiée : elle est soit augmentée, soit diminuée. Les séquences activatrices (séquences « *enhancer* ») peuvent être situées à des distances très importantes du promoteur du gène (jusqu'à quelques dizaines de kilobases) et ceci en amont ou en aval. Des séquences extinctrices (séquences « *silencer* ») ont un effet opposé aux séquences activatrices. Elles peuvent être également situées très à distance du promoteur du gène. C'est bien entendu la structure tridimensionnelle de l'ADN qui permet de rapprocher ces éléments régulateurs du gène à transcrire. L'ensemble de ces séquences forme les séquences régulatrices d'amont.

Ainsi, pour nous limiter à quelques exemples :

9 Le facteur général de transcription TFIID peut être considéré comme un facteur trans-régulateur. Il se fixe sur un élément cis-régulateur qui est la boîte TATA située à environ -25 pb de l'origine de la transcription.

9 La boîte GC, élément cis-régulateur, va fixer un facteur trans-régulateur : la protéine Sp1. La boîte GC est située le plus souvent dans la région entre -110 et -40.

9 La boîte CCAAT (ou CAAT), élément cis-régulateur va fixer le facteur CTF (pour « *CCAAT binding Transcription Factor* »). La boîte CCAAT est souvent située dans la région entre -120 et -80.

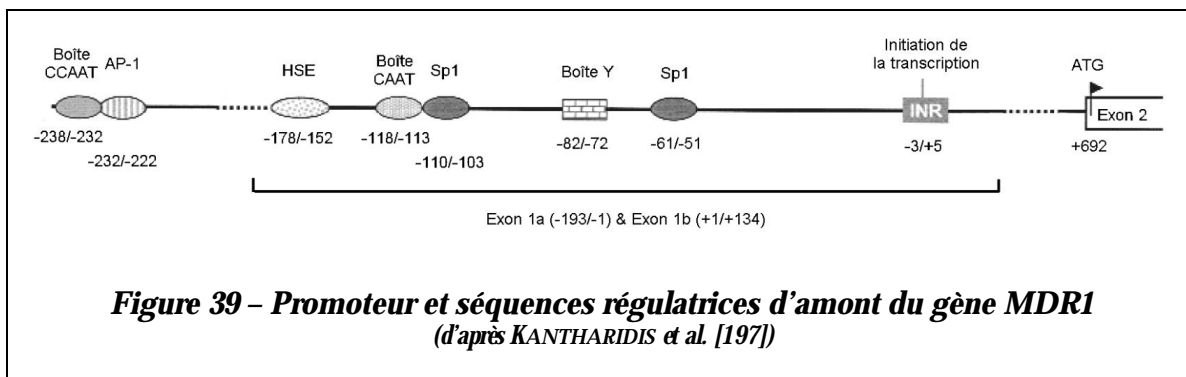
IV.3.2.2. Facteurs trans-régulateurs

Les facteurs trans-régulateurs sont des protéines particulières produites par d'autres gènes. Ces protéines présentent des caractéristiques structurales communes, avec au minimum deux domaines : un *domaine de fixation à l'ADN* et un *domaine d'action sur la transcription*

Certains facteurs trans-régulateurs possèdent un troisième domaine qui permet de fixer un élément annexe permettant de réaliser l'action d'un message extérieur à la cellule, comme un message hormonal.

IV.3.3. Activation et répression de la transcription des gènes *mdr*

L'étude du gène *MDR1* a mis en évidence la présence de différentes séquences consensus : au minimum deux boîtes GC (-61 à -51 et -110 à -103), une boîte Y (ou boîte CCAAT inversé) entre -82 et -72 fixant la protéine YB-1 et un site Ap-1 (figure 39, ci-dessous) [197, 355]. La majorité des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes *mdr* ont un effet activateur.



Pour faciliter la présentation de ces différents facteurs cis- et trans-régulateurs, ceux-ci seront divisés en deux catégories :

9 les **facteurs intrinsèques**, mis en évidence dans des lignées cellulaires données et sous des conditions standards de culture ;

9 les **facteurs extrinsèques**, correspondant à des facteurs extérieurs : choc thermique, rayons UV, agents anticancéreux, hormones etc.

IV.3.3.1. Facteurs intrinsèques

Nous retrouvons parmi ces facteurs : le site de fixation de la protéine SP1 (boîte GC), les facteurs de transcription NF-R1 et NF-R2, la boîte Y, le site de fixation AP-1, les oncogènes et les anti-oncogènes (ou *gènes suppresseurs de tumeurs*) et la cascade Ras/Raf.

a. Site SP1 ou boîte GC [355]

La protéine SP1 est un facteur trans-régulateur ubiquitaire et ses sites de fixation sont retrouvés pratiquement systématiquement dans les séquences régulatrices d'amont de gène dépourvus de boîte TATA. C'est le cas du gène *MDR1*. Des mutations de ce site entraînent une diminution importante (6 fois) de l'activité promotrice de la transcription et les propriétés activatrices du promoteur du gène *MDR1* de la protéine SP1 ont été démontrées.

L'activité de la phosphoprotéine SP1 est régulée par la protéine kinase A (PKA). Ainsi, la répression du gène *MDR1* constatée avec certains inhibiteurs de la PKA pourrait être relayée par la protéine SP1. Le gène *mMdr2* du rat — dépourvu de boîte TATA — est aussi régulé par la protéine SP1.

b. NF-R1 et NF-R2 [355]

Deux facteurs trans-régulateurs supplémentaires interagissant avec les séquences GC ont été purifiés à partir de cellules K562/DOX. Ils ont été nommés NF-R1 et NF-R2.

La masse moléculaire de la **protéine NF-R1** est environ 110 kDa et elle interagit avec les séquences nucléotidiques entre -123 et -115 et entre -56 et -45. La **protéine NF-R2** a une masse moléculaire d'environ 75 kDa et se fixe sur une région comprise entre les positions -119 et -111.

Le rôle de ces facteurs dans la régulation du gène *MDR1* est encore incertain.

c. Boîte Y [197, 355]

La boîte Y est un facteur de cis-régulation dont l'importance dans l'expression basale du gène *MDR1* a été démontrée. Des mutations de cet élément, *in vitro*, induisent une diminution importante (5–10 fois) de l'activité du promoteur du gène *MDR1*.

Les deux protéines NF-Y et YB-1 ont été impliquées dans la régulation du gène *MDR1* au travers de la boîte Y. L'importance de la protéine YB-1 dans l'activation de la transcription du gène *MDR1* a été démontrée [296].

Les protéines YB-1 [296] et NF-Y sont aussi impliquées dans la régulation de l'expression du gène *MDR1* liée aux stress environnementaux comme l'exposition aux rayons UV ou à des agents anticancéreux.

d. Complexe AP-1 [355]

Les protéines constituant ce complexe sont codées par les proto-oncogènes *fos* et *jun*. Ce complexe peut être constitué de plusieurs protéines apparentées : c-Fos, FosB, Fra1, Fra2 et c-Jun, JunB et JunD. L'activité des complexes AP-1 est modulée par phosphorylation (par la PKA par exemple). Divers stimuli sont capables de les activer (les rayons UV par exemple).

Des taux élevés de protéines c-Fos ont été découverts dans des lignées cellulaires chimiorésistantes. Des cellules CHO exprimant une forme mutante de PKA présentent une diminution de l'expression de glycoprotéine P. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKA (H-87) est capable d'induire une baisse du niveau d'expression du gène *MDR1* dans une lignée cellulaire leucémique (P388). Ces données laissent supposer un rôle de la PKA et du site AP-1 dans la régulation de l'expression du gène *MDR1*.

Des sites de reconnaissance du complexe AP-1 ont été décrits dans la classe I de glycoprotéine P chez l'homme et chez les rongeurs. Une récente étude confirme que ce complexe AP-1 possède un rôle dans la régulation génique de l'expression de glycoprotéines P [309].

e. Oncogènes et anti-oncogènes [197, 355]

De hauts niveaux d'expression du gène *MDR1* sont quelques fois observés en l'absence d'une exposition médicamenteuse préalable, même si la tumeur se développe à partir de tissus n'exprimant que faiblement ou pas du tout la glycoprotéine P. Ainsi, l'expression

intrinsèque du gène *MDR1* pourrait être modifiée, dans certaines cellules, par des composants impliqués dans la transformation tumorale.

Des mutations des proto-oncogènes *ras* et *p53* ont souvent été détectées dans beaucoup de cellules cancéreuses exprimant la glycoprotéine P. La modulation de l'expression du gène *MDR1* par le gène mutant *p53* (*p53*-MT) est maintenant bien établie [164, 322, 341, 400]. Cette modulation peut prendre deux formes : une activation ou une répression de l'expression du gène *MDR1* [341].

Cependant, le mécanisme d'action précis est encore très controversé. Plusieurs arguments plaident en faveur d'un mécanisme indirect au vu des résultats contradictoires de différentes études. Une interaction avec les facteurs généraux de transcription ou trans-régulateurs impliqués dans la transcription du gène *MDR1* est possible.

f. Voie de signalisation cellulaire par la cascade Ras/Raf/MAPk [355]

La voie Ras/Raf/MAPk (pour « *mitogen-activated protein kinase* ») est activée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires. Les protéines Ras (pour « *Rous avian sarcoma* ») sont des protéines membranaires de la famille des protéines G (protéines liant le GTP), codées par les oncogènes *ras*; ces protéines sont aussi appelées p21^{ras}.

La protéine Ras peut être phosphorylée suite à la stimulation de récepteurs cellulaires par des facteurs de croissances. Cette protéine, une fois activée, permet la phosphorylation de la protéine Raf qui permet à son tour la phosphorylation de la MAPk. La protéine MAPk peut pénétrer dans le noyau et activer des facteurs de transcription comme c-myc et c-jun.

Différentes études de transfection laissent penser que le gène *MDR1* pourrait être une des cibles de cette voie de signalisation cellulaire. La transfection de cellules épithéliales de rat avec les gènes *v-H-ras* et *v-raf* ('v' pour « *viral* ») induit une augmentation de l'expression de la glycoprotéine P et de la multichimiorésistance. Les résultats récents d'une étude de HE *et al.* [160] suggèrent un rôle important du facteur de transcription c-myc dans la régulation de l'expression de *MDR1*.

IV.3.3.2. Facteurs extrinsèques

Dès les premières études concernant la fonction de la glycoprotéine P, il a été suggéré que la glycoprotéine P était une protéine de « réponse au stress » puisque son activité peut être

modulée par des « stress » environnementaux [67]. Parmi ces stress nous retrouvons : le choc thermique, les substances cancérigènes, l'inflammation, les rayons UV, les hormones mais aussi les agents anticancéreux qui nous intéresseront plus particulièrement [355].

a. *Choc thermique*

Pour la survie des cellules, en particulier dans des conditions difficiles, l'un des mécanismes qui s'est le plus maintenu lors de l'évolution est celui de l'expression de protéines connues sous le nom de *protéines de choc thermique* (ou HSP pour « *Heat Shock Protein* ») ou *protéines de stress*. Chez les eucaryotes, les gènes codant pour les protéines de choc thermique sont sous le contrôle des HSF (pour « *Heat Shock transcription Factors* »). Pour les HSP de faible masse moléculaire, ces gènes comportent un motif d'ADN régulateur nommé HSE (pour « *Heat Shock Element* »). La phosphorylation semble être un des facteurs de régulation de l'activité des gènes codant les HSP le plus important.

EN 1990, CHIN *et al* [67] ont mis en évidence une augmentation des taux d'ARNm *MDR1* dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome rénal ayant été exposées à un choc thermique. Ces mêmes auteurs ont aussi démontré l'existence d'un HSE parmi les séquences régulatrices d'amont du gène *MDR1*. Une récente étude de VILABOA *et al* [427] démontre que la protéine HSF1 est capable de réguler l'expression du gène *MDR1*.

En 2001, STEIN *et al* [383] ont démontré que la protéine YB-1 joue aussi un rôle dans la réponse au choc thermique : la protéine YB-1 est déplacée du cytoplasme vers le noyau et active ainsi l'expression du gène *MDR1* et de la glycoprotéine P.

b. *Substances cancérigènes [355]*

La plupart des études sur les effets des cancérigènes ont été effectuées sur les gènes du rat. Ces études ont montré que l'expression de ces gènes est stimulée par différents xénobiotiques et que l'augmentation d'expression du gène *rMdr1b* est due à une augmentation de la transcription. Il semble qu'il existe des différences entre la réponse des cellules du rat et des cellules humaines à l'exposition aux cancérigènes.

c. *Inflammation [355]*

Lors de la phase aiguë de l'inflammation, il a été démontré une induction de l'expression des gènes codant la glycoprotéine P dans le foie. Au moins deux facteurs de

transcription connus pour être induit lors la phase aiguë de l'inflammation ont été mis en cause dans la régulation de l'expression du gène *MDR1* :

- 9 le facteur NF-IL6 qui active l'expression des glycoprotéines P de classe I chez l'homme et la souris ;
- 9 le facteur NFκB.

d. *Rayons UV [173, 355]*

L'exposition de cellules à des rayons UV est capable d'induire une augmentation de la transcription du gène *MDR1*. Cette régulation de la transcription est dépendante de la boîte CCAAT, de la boîte GC et de facteurs trans-régulateurs comme les facteurs NF-Y, SP1 ou YB-1 [173, 190]. Cependant, pour cette dernière protéine, les résultats de HU *et al.* [173] indiquent que ce facteur, seul, n'est pas suffisant pour induire l'activation de la transcription.

e. *Hormones*

Le récepteur de la progestérone (PR pour « *Progesteron receptor* ») est le premier récepteur stéroïdien dont la capacité à réguler la transcription du gène *MDR1* ait été démontrée [442].

Différents auteurs ont suggéré un rôle des glucocorticoïdes dans la régulation de l'expression de la glycoprotéine P. Le fait que les glucocorticoïdes sont souvent utilisés dans le traitement des tumeurs hématologiques et les cancers du sein rend la compréhension de leur mécanisme d'action importante.

f. *Agents anticancéreux*

De nombreux éléments indiquant que l'expression de la glycoprotéine P peut être induite après un traitement anticancéreux par chimiothérapie ont été accumulées [60, 141, 197]. Cela a d'abord été démontré sur des cellules CCRF-CEM résistantes à la dactinomycine. Une courte exposition de ces cellules à la dactinomycine entraîne l'expression d'ARNm *MDR1*. Cette augmentation d'expression d'ARNm après traitement par chimiothérapie est suspectée être la conséquence d'une régulation transcriptionnelle où la séquence régulatrice d'amont serait la boîte Y [296, 355]. Ce site interagit avec la protéine YB-1.

Il a d'abord été supposé que seuls les substances associées au phénotype MDR puissent induire l'expression des gènes codant la glycoprotéine P. Toutefois,

CHAUDHARY *et al.* [60] ont démontré que cette transcription du gène *MDR1* pouvait être induite par des médicaments « non-MDR » tels que le cisplatine, les antifolates et l'hydroxyurée. Dans cette étude, l'induction du gène *MDR1* est associée avec des signes de lésions cellulaires, suggérant que l'augmentation de la transcription du gène *MDR1* puisse être une partie de la réponse cellulaire globale aux substances nocives.

Ce phénomène a aussi été constaté *in vivo* sur des métastases pulmonaires après exposition à la doxorubicine ; une exposition de 20–50 min est suffisante pour stimuler l'expression du gène *MDR1*. Le fait que l'expression des gènes codant la glycoprotéine P puisse être induite suite à un contact de courte durée avec des médicaments a soulevé une question importante : la chimiothérapie peut-elle induire le phénotype ainsi que sélectionner les variants résistants parmi une population de cellules tumorale *in vivo*

Dans ce cas, il est possible de supposer que l'induction de l'expression de la glycoprotéine P dans des cellules tumorales puisse rendre ces cellules encore plus chimiorésistantes aux médicaments connus pour être des substrats de la glycoprotéine P.

IV.3.4. Rôle de la chromatine

La chromatine est constituée d'un mélange d'ADN et de protéines. Les nucléosomes forment un élément essentiel de la chromatine : ils sont formés par environ 200 pb d'ADN associées à un octamère d'histones. Chaque octamère comporte deux copies de chacune des histones : H2A, H2B, H3 et H4. Les histones peuvent présenter des modifications transitoires sur certains groupement de leurs chaînes polypeptidiques.

Ainsi, des acétylations ou des méthylation sont possibles et réversibles sur des résidus lysine. Enfin, des protéines non histones interagissent sur la chromatine.

Deux états de la chromatine sont importants à connaître :

9 **L'hétérochromatine** : région du génome en permanence dans un état hautement condensé. Ces régions ne sont pas transcrites.

9 **L'euchromatine** est, à l'opposé de l'hétérochromatine, activement transcrites.

L'acétylation des histones est associée avec une augmentation de l'accessibilité de l'ADN pour la transcription. L'histone acétyltransférase (HAT pour « *histone acetyltransferase* ») catalyse l'acétylation des résidus lysine des histones H3 et H4. La réaction inverse est catalysée par des histones désacétylases (HDAC pour « *histone deacetylases* »). Ces HDAC peuvent être inhibées par le butyrate de sodium (NaB), or il a été démontré que le NaB pouvait augmenter l'expression du gène *MDR1* [355]. Toutefois le NaB possède une multitude d'effets sur les protéines cellulaires.

Afin de vérifier l'implication de la HDAC, JIN et SCOTTO [190] ont évalué les effets d'un inhibiteur hautement spécifique de cette enzyme : le trichostatin (TSA). Leurs résultats ont confirmé que l'expression du gène *MDR1* pouvait être régulée par la HDAC. Cette régulation — dans le cas du TSA ou du NaB — se fait par l'intermédiaire de la boîte Y et du facteur NF-Y.

Cependant, bien que la formation d'hétérochromatine puisse permettre la répression de la transcription génique, ce mécanisme n'est pas le seul : la méthylation de l'ADN est aussi impliquée. Ce mécanisme entraîne une méthylation des résidus cystéine présents dans des séquences de dinucléotides GC [197].

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer la répression de l'activité transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN. Il a été évoqué la possibilité d'une diminution des interactions entre certains facteurs transcriptionnels et leurs sites spécifiques après méthylation de ces derniers. Il a été également suggéré que des liaisons directes entre des répresseurs transcriptionnels spécifiques et des sites ADN méthylés diminue l'activité transcriptionnelle.

Enfin, plus récemment, la modification de la structure chromatinienne par la méthylation de l'ADN a été proposée.

Ainsi, nous pouvons voir d'après les études menées ces 15 dernières années que la régulation de l'expression de la glycoprotéine P dépend de facteurs complexes (intrinsèques ou environnementaux) interagissant dans la régulation du niveau d'expression de la glycoprotéine P selon un type cellulaire donné et un ensemble de conditions précises. La connaissance des mécanismes de cette régulation permettrait de trouver de nouvelles voies afin de moduler l'expression de la glycoprotéine P pour prévenir ou empêcher le développement de la résistance pléiotropique dépendante de la glycoprotéine P.

IV.4. Modulation du phénotype MDR et possibilités de traitement

La découverte du phénotype MDR a conduit à rechercher des composés « chimiosensibilisateurs », c'est à dire capables de lever cette résistance. A ce jour, il est démontré que de nombreuses molécules, issues de classes pharmacologiques très diverses, sont capables de moduler *in vitro* le phénotype MDR (voir tableau 18, en page 153). Ces agents, appelés *agents réversants*, incluent des analogues non cytotoxiques, des agents antinéoplasiques, des agents lysosomotropes, la ciclosporine et ses dérivés, des stéroïdes, des antagonistes calciques, des inhibiteurs de la calmoduline, des inhibiteurs de protéines kinases et des composés de synthèse [221, 428].

Plus récemment, divers auteurs s'intéressent à la modulation du phénotype MDR par des oligonucléotides [428].

Le meilleur modulateur est celui dont on pourrait obtenir un taux sérique supérieur à celui nécessaire, *in vitro*, pour inhiber complètement la glycoprotéine P, diffusant bien dans le tissu tumoral, *in vivo* et dénué de toxicité. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour ces chimiosensibilisateurs : ils peuvent être des inhibiteurs compétitifs ou non compétitifs (figure 40, ci-dessous) mais peuvent aussi agir sans interaction directe avec la glycoprotéine P (en modulant son expression, par exemple).

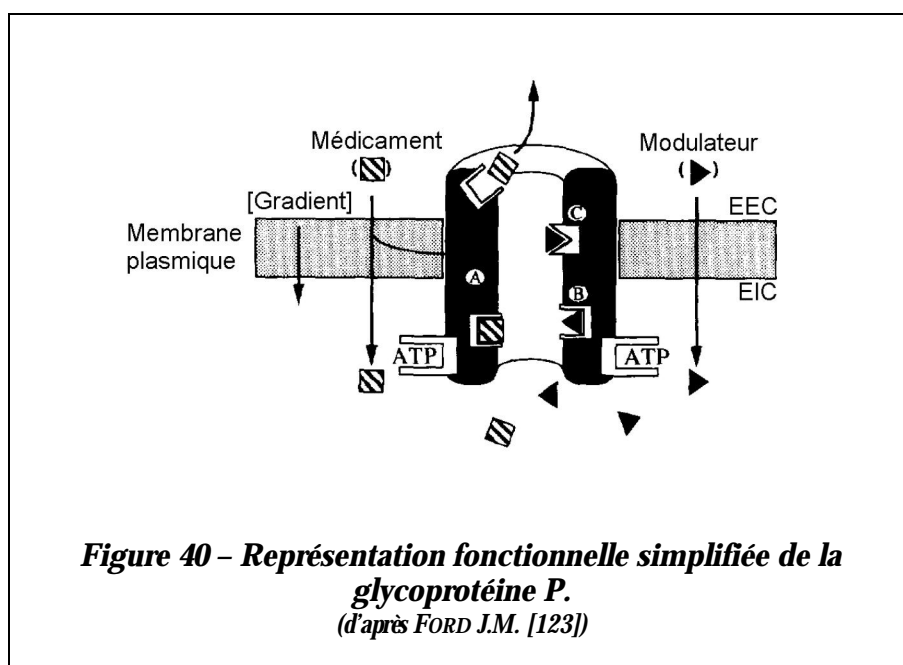


Tableau 18 – Agents réversants du phénotype MDR

Agent	Cellules	Agents	Cellules
Analogues non cytotoxiques		Inhibiteurs de kinases	
Diverses anthracyclines	P388/DOX	H-87 Staurosporine (200 nM) Calphostine C (250 nM)	P388/DOX K562/DOX -
Inhibiteurs de la calmoduline		CGP41251 (150 nM) NPC15437 (60 µM) Safingol (20–50 µM)	- - -
Trifluoropérazine (3–5 µM) ^a	KB-1	Antibiotiques	
Chlorpromazine	KB-1	Céfopérazone (1000 µM) Ceftriaxone (1000 µM) Érythromycine (650 µM)	- - -
Propranolol	KB-1	Stéroïdes	
Prochlorpérazine (4 µM)	-	Progéstérone (2µM) Dexaméthasone	J7.V1-1 J7.V1-1
Fluphénazine (3 µM)	-	Cyclosporines et dérivés	
Trans-flupenthixol (3 µM)	-	Tamoxifène (2–10 µM) Torémifène (5–10 µM) Acétate de mégestrol (5 µM) Glucuronide de 17β-oestradiol (100 µM)	- - - -
Agents lysosomotropes		Autres	
Cloroquine	KB-1	Dipyridamole (5–10 µM) BIBW 22 (1 µM) Quinidine (10 µM) Terfénadine (3–6 µM) Réserpine (5 µM) Amiodarone (4 µM) Méthadone (75 µM) S9788 (1–3 µM) GF 120918 (0,02–0,1 µM) Tolyphorphine (0,1–0,5 µM)	- - - - - - - - -
Triton WR-1339	KB-1	Analogues des vinca-alcaloïdes	
Cyclosporines et dérivés		Vindoline (20–50 µM) Thaliblastine (2 µM)	KB-1 -
Cyclosporine A (0,8–2 µM)	L100/VCR		
SDZ PSC 833 (0,1 µM)	-		
SDZ 28-446 (0,1 µM)	-		
FK506 (3 µM)	-		
Antagonistes calciques			
Vérapamil (6–10 µM)	P388/VCR		
Perhexiline	P388/DOX		
Azidopine	DC3F/VCR		
Diltiazem	KB-C4		
Nifédipine (35 µM)	-		
Niguldipine (10 µM)	-		
Dexniguldipine (0,1–1 µM)	-		
Bépridil (4 µM)	-		
PAK-200 (5 µM)	-		
Ro 11-2933 (2–6 µM)	-		

a) Les concentrations indiquées entre parenthèse sont celles pour lesquelles une action *in vitro* a été démontrée.

IV.4.1. Modulation à l'aide d'agents pharmaceutiques

IV.4.1.1. Antagonistes calciques : vérapamil et analogues

Le *premier agent modulateur testé a été le vérapamil* [406]. Le vérapamil est expulsé activement des cellules chimiorésistantes et peut se lier à la glycoprotéine P, laissant ainsi penser que ce composé inhibe de façon compétitive le transport des autres substrats de la glycoprotéine P [77, 123, 291, 428]. Les essais de modulation avec le vérapamil dans les tumeurs solides (ovaire, vessie, côlon, cancer pulmonaire à petites cellules) se sont soldés par un échec [297]. Les résultats sont discordants dans les études sur les cancers du sein avancés résistant aux anthracyclines et utilisant le vérapamil comme modulateur [289, 297]. Des résultats encourageants ont été obtenus dans les hémopathies malignes (voir tableau 19, en page 155), en particulier dans les lymphomes et le myélome [84].

Cependant, des taux plasmatiques élevés de vérapamil sont difficiles à obtenir en raison d'une **toxicité cardiaque** marquée par une hypotension et une insuffisance cardiaque congestive [221]. Le vérapamil est constitué d'un mélange de la forme lévogyre (L) et dextrogyre (D). L'isomère lévogyre a des capacités de blocage de la conduction auriculo-ventriculaire beaucoup plus importante que la forme dextrogyre. Puisque les deux formes ont la même activité modulatrice, la forme dextrogyre (D-vérapamil ou dexvérapamil) est un bon candidat pour être testé en pratique clinique [221].

Des analogues du vérapamil comme le bépridil [336] et la dextniguldipine (forme dextrogyre de la niguldipine) ont été utilisés, cependant la **toxicité limitante est toujours cardiaque** [297].

IV.4.1.2. Ciclosporine et dérivés

a. *Ciclosporine*

La ciclosporine est l'agent modulateur le plus utilisé, car son maniement est bien connu des cliniciens de la transplantation : elle est facilement dosable et les taux plasmatiques obtenus sont compatibles avec un réel effet de modulation [297]. Très tôt la ciclosporine A a été identifiée comme un agent réversant du phénotype MDR et pouvant se lier avec la glycoprotéine P [95, 124]. La ciclosporine est deux à trois fois plus active *in vitro* sur la modulation de la résistance que le vérapamil utilisé à des taux sériques de 2 à 4 μM .

Les effets secondaires de la ciclosporine sont les nausées, les vomissements, l'asthénie et une hyperbilirubinémie si le taux sérique est maintenu plus de 3 jours au-dessus de 3 μM . De même, une **toxicité rénale** peut survenir pour des perfusions longues et/ou lors d'insuffisance rénale existante, notamment chez les **individus âgés** [297, 393]. Dans ces deux cas, une surveillance de la calciurie est nécessaire. Cependant, même si le taux sérique de la ciclosporine atteint souvent le taux *in vitro* considéré comme réversant, celui-ci est imparfaitement corrélé au taux tissulaire intratumoral, car la ciclosporine semble pénétrer faiblement dans les cellules tumorales [297].

Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus dans les leucémies aiguës myéloblastiques [240], le myélome [26] et les lymphomes [297].

Tableau 19 – Réversion de la résistance pléiotropique *in vivo* (modèles murins)
(d'après VOLM M. [428])

Tumeur	Modulateur	Anticancéreux	Augmentation survie (%)
P388/vincristine ^R	Vérapamil	Vincristine	34
Ehrl./daunomycine ^R	Vérapamil	Daunomycine	120
P388/vincristine ^R	Diltiazem	Vincristine	32
Ehrl./daunomycine ^R	N-acétyl-daunomycine	Daunomycine	53
Ehrl./daunomycine ^R	Ciclosporine A	Daunomycine	183
P388/vincristine ^R	Quinidine	Vincristine	41
Ehrl./daunomycine ^R	Tween 80	Daunomycine	500

^R : résistance à ; **P388** : lignée cellulaire leucémique murine ; **Ehrl.** : cellules d'ascite tumorale de Ehrlich

b. PSC 833

Le dérivé non immunosuppresseur de la ciclosporine, la molécule PSC 833, semble être un modulateur prometteur. Le PSC 833 se révèle, *in vitro*, être jusqu'à 20 fois plus puissant que la ciclosporine [393]. Les taux plasmatiques compatibles avec une activité clinique (dose active inférieure à 1 μM) peuvent être aisément atteints chez l'homme [297]. Une récente étude [410] indique que la concentration intracellulaire du PSC 833 (ou **valsopodar**), contrairement à celle de la ciclosporine A, n'est pas régulée par le système d'efflux lié à la glycoprotéine P. Dans cette étude, la CIC du valsopodar est souvent supérieure à celle de la

ciclosporine A dans les cellules exprimant la glycoprotéine P. De plus, l'utilisation de vérapamil augmente la CIC de ciclosporine A mais pas celle du valspodar.

Des études *in vivo* montrent que le PSC 833 réverse la chimiorésistance à la doxorubicine et aux alcaloïdes de la pervenche chez des souris porteuses de tumeurs exprimant le phénotype MDR [393].

IV.4.1.3. Inhibiteurs de protéines kinases

Nous avons vu que les protéines kinases sont impliquées dans la régulation de l'expression de la glycoprotéine P (voir III.1.3.2.b. Phosphorylation, en page 93 et IV.3. Régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes *mdr*, en page 141) [123]. Parmi ces protéines kinases, la PKC permet la phosphorylation de la glycoprotéine P et l'inhibition de cette kinase peut réverser partiellement le phénotype de résistance pléiotropique [428, 446].

Des inhibiteurs de la PKC tels que la chlorpromazine, la trifluopérazine [156], le tamoxifène [429] et la staurosporine [265] permettent de vaincre la multichimiorésistance [428]. WADDLE *et al.* [429] montrent, dans un essai thérapeutique de phase I (voir Annexe 1 : Les phases de l'essai thérapeutique, en page 163), chez le chien, qu'une concentration de tamoxifène suffisante pour inhiber la glycoprotéine P peut être atteinte avec une augmentation acceptable de la toxicité gastro-intestinale.

De plus la PKC phosphoryle aussi la GST, la topoisomérase II et la MRP et la chimiorésistance induite par ces protéines pourrait être aussi réduite par des inhibiteurs de la PKC [428].

IV.4.1.4. Anticorps

Ces traitements utilisent des anticorps monoclonaux, des immunotoxines ou des anticorps bispécifiques.

a. *Anticorps monoclonaux*

Les anticorps monoclonaux sont étudiés en tant que modulateurs en raison de leur grande spécificité vis-à-vis d'épitope bien définis. Différents anticorps monoclonaux (par exemple, C219, JSB-1, MRK16, HYB-612, 265/F4, C494, 32C7) et quelques anticorps polyclonaux ont été analysés [428].

Il a été démontré que seuls les anticorps ayant une cible extracellulaire sont potentiellement utilisables (MRK16, HYB-612, 265/F4). HAMADA et TSURUO [157] ont été les premiers à décrire les effets spécifiques d'anticorps de ce type *in vitro*

L'anticorps **MRK16** potentialise la cytotoxicité de médicaments impliqués dans la résistance pléiotropique (vincristine, dactinomycine) de façon dose-dépendante. Cet anticorps entraînerait une augmentation de la CIC en bloquant l'efflux des médicaments. Des essais *in vivo*, chez la souris, montrent que l'utilisation de MRK16 permet une rémission rapide et la guérison de certains animaux [428].

b. Immunotoxines

Une immunotoxine est constituée par un anticorps monoclonal couplé à un agent cytotoxique par l'intermédiaire d'une molécule « *linker* ». Cette molécule hybride peut se lier à un antigène spécifique et exercer son effet cytotoxique après son internalisation. En 1987, FITZGERALD *et al.* [117] ont conjugué une exotoxine bactérienne de *Pseudomonas* avec l'anticorps MRK16. Ils ont découvert que cette immunotoxine **tuait spécifiquement** les cellules humaines de carcinome KB ayant acquis le phénotype de multichimiorésistance alors que les cellules KB chimiosensibles n'étaient pas affectées. De plus, l'étendue de la mort cellulaire est corrélée au degré de chimiorésistance et d'expression du gène *MDR1*.

Des résultats similaires ont été trouvés avec l'anticorps 265/F4 couplés à un autre cytotoxique (RAC pour « *Ricin Alpha Chain* ») [428].

c. Anticorps bispécifiques

Les anticorps bispécifiques sont des protéines chimériques dont les deux sites de reconnaissance antigénique reconnaissent des antigènes différents. Ces molécules peuvent être employées pour diriger des cellules effectrices cytotoxiques, des drogues cytotoxiques, des isotopes radioactifs ou des toxines vers des cellules tumorales.

VAN DIJK *et al.* [421] ont préparé un anticorps bispécifique constitué de l'anticorps monoclonal OKT3, réagissant avec l'antigène CD3 des lymphocytes, et l'anticorps MRK16 réagissant avec la glycoprotéine P. Cet hybride CD3/MRK16 induit une cytolysse spécifique des cellules A2780/AD de carcinome ovarien exprimant la glycoprotéine P ; la cytolysse étant induite par des lymphocytes-T activés.

IV.4.1.5. Conclusion

De nombreux agents sont donc potentiellement utilisables dans la modulation du phénotype MDR. De plus, la combinaison d'agents anticancéreux, de substances chimiosensibilisatrices et d'anticorps donne d'intéressants résultats thérapeutiques [428].

Cependant, la présence de la glycoprotéine P dans des tissus normaux tels que les reins, le foie ou le colon soulève la question de la toxicité de ces modulateurs sur ces tissus. Le tableau 20, en page 159 indique les effets potentiels des modulateurs du phénotype MDR sur les tissus normaux exprimant la glycoprotéine P.

De plus, la possibilité d'une induction de l'expression de la glycoprotéine P par le vérapamil et d'autres inhibiteurs a été décrite [428]. HERZOG *et al* [162] ont étudié, sur des souris atteintes de leucémie (lignée P388), les effets d'une exposition au vérapamil avant un traitement utilisant la doxorubicine. Leurs résultats indiquent une durée de survie inférieure chez les souris ayant été exposées au vérapamil (16,4 jours contre 21 jours pour le groupe témoin).

Dans le cas des traitements utilisant les anticorps, différents problèmes sont encore à résoudre :

9 les anticorps monoclonaux utilisés sont d'origine murine et sont donc immunogènes chez l'homme ;

9 des difficultés sont rencontrées dans l'obtention de concentrations suffisantes dans le cas des tumeurs solides ;

9 le problème de toxicité pour les tissus sains exprimant la glycoprotéine P reste entier.

Tableau 20 – Effets potentiels de la modulation de la résistance pléiotropique sur les tissus normaux exprimant la glycoprotéine P. Incidence sur la pharmacocinétique des agents anticancéreux. (d'après OUDARD *et al.* [297])

Tissus	Effet(s) potentiel(s)
Canalicules biliaires	↑ excrétion cytotoxique, ↓ toxicité
Tubes contournés proximaux rénaux	↑ excrétion cytotoxique, ↓ toxicité
Corégulation de la glycoprotéine P et du cytochrome P-450	↑ métabolisme cytotoxique, ↓ toxicité
Cellules souches hématopoïétiques	↓ myélosuppression, retard à la sortie d'aplasie
Endothélium cérébral	↓ nausées et vomissements, ↓ neurotoxicité
Cortex surrénalien	↑ transport des stéroïdes, insuffisance rénale ?
Muqueuses	↓ mucite, ulcération
Revêtement intestinal jéjunum-côlon	↑ excrétion cytotoxique, ↓ absorption

Ces différents problèmes de toxicité ont donc conduit au **développement d'agents moins toxiques** de 2^{ème} ou de 3^{ème} génération comme le PSC 833 (voir ci-dessus), le GF120918 (un dérivé de l'acridonecarboxamide), le LY335979 (un dérivé du dibenzosubérane) ou le biricodar (VX-710) [221, 393].

Les études *in vitro* indiquent que le **GF120918** permet une bonne réversion de la chimiorésistance de cellules de sarcomes multichimiorésistants aux étoposides, à la doxorubicine, la vinblastine, le docétaxel et le paclitaxel [182, 393]. ISSANDOU *et al.* [182] ont montré, récemment, que cette molécule était un inhibiteur spécifique de la glycoprotéine P.

Le **LY335979** est actuellement un des modulateurs les plus spécifiques de la glycoprotéine P et ne permet pas la modulation de la MRP1. Le **biricodar** permet, non seulement, l'inhibition de la glycoprotéine P mais aussi de la MRP1. C'est un dérivé de l'amido-kéto-pipécolinate [393].

IV.4.2. Modulation à l'aide d'oligonucléotides

Les oligonucléotides antisens (désoxyribonucléotides, mais il peut s'agir de ribonucléotides) sont de courtes séquences de 10 à 20 nucléotides — le plus souvent 15 à 18 — dont la stabilité a été renforcée en remplaçant la liaison phosphodiester par des liaisons plus résistantes — de type phosphorothioate, par exemple — leur donnant une demi-vie beaucoup

plus longue. Les molécules antisens peuvent être mixtes formées de désoxyribonucléotides (ADN) et de ribonucléotides (ARN) pouvant avoir ou non une activité de type ribozyme.

En règle générale, la séquence désoxyribonucléotidique antisens, complémentaire d'une séquence spécifique d'ARNm, se fixe à cette dernière et empêche la traduction de la protéine correspondante. **Le problème principal rencontré** avec l'utilisation de ces oligonucléotides **est leur stabilité**. Quelques études ont confirmé l'existence d'une modulation de l'expression de la glycoprotéine P par l'utilisation d'oligonucléotides antisens [428].

Les ribozymes sont des ARN possédant une activité enzymatique. Leur potentiel thérapeutique est important puisqu'ils sont capables d'hydrolyser les liaisons phosphodiester de séquences d'ARN ou de réparer des ARN mutants. Les ribozymes sont capables de moduler l'expression d'oncogènes ou de gènes associés à la multichimiorésistance [428]. Il a été démontré que des **ribozymes anti-MDR1 étaient capables de diminuer de façon importante** la chimiorésistance à la vincristine ou à la doxorubicine, par exemple [215, 428].

SCANLON *et al.* [345] ont découvert que la ribozyme anti-*fos* pouvait réverser le phénotype MDR de cellules humaines de carcinome ovarien. Ceci peut s'expliquer du fait que l'oncogène *c-fos* joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la résistance pléiotropique (voir IV.3.3. Activation et répression de la transcription des gènes *mdr*; en page 144). Cependant, **l'obstacle majeur** à ce type de traitement est la difficulté à trouver un vecteur d'expression efficace.

Durant ces dernières années, différentes stratégies permettant de réverser le phénotype MDR ont été développées ; ceci aussi bien à partir de substances naturelles que synthétiques. Toutes ces stratégies ont montré leur efficacité dans la modulation du phénotype MDR *in vitro*. Cependant, **malgré des résultats prometteurs** (spécialement dans le cas des tumeurs hématologiques), **l'atteinte de résultats dans le traitement des tumeurs solides est encore éloignée**.

CONCLUSION

Un grand nombre de résultats a été accumulé et il a été mis en évidence un rôle important de la glycoprotéine P dans la résistance à la chimiothérapie de certaines tumeurs. Cependant, les mécanismes de chimiorésistance sont multiples et variés et le phénotype MDR « classique » (médié par la glycoprotéine P) seul n'explique pas entièrement la chimiorésistance tumorale. D'autres protéines sont exprimées par les cellules chimiorésistantes : O⁶-alkylguanine-ADN-alkyltransférase, thymidylate synthétase, métallothionéine... De plus, les mécanismes de prolifération cellulaire, de vascularisation et l'apoptose jouent aussi un rôle important dans la résistance médicamenteuse.

La détermination de la participation quantitative de chacun de ces mécanismes au phénomène de chimiorésistance est un défi important pour le développement d'agents modulateurs ; le choix de modulateurs efficaces sur plusieurs protéines pouvant être intéressant. Le biricodar (ou VX-710), par exemple, peut inhiber la glycoprotéine P ainsi que la MRP1. Cependant, de nombreuses questions restent encore à résoudre : comment choisir les meilleures associations d'agents anticancéreux ? Doit-on choisir des substances non transportées par ces différentes protéines ? Quels sont les meilleurs modulateurs en fonction du type tumoral ?

Le rôle physiologique de la glycoprotéine P dans l'établissement des barrières tissulaires (comme la barrière hémato-encéphalique) soulève lui aussi différentes questions. En effet, l'utilisation de modulateurs de la glycoprotéine P pourrait augmenter la pénétration de certains médicaments dans des « sanctuaires pharmacologiques » tels que le SNC. Cette propriété peut être un atout si le but recherché est le traitement de maladies siégeant dans de tels sanctuaires pharmacologiques. En revanche, elle peut aussi être néfaste et augmenter la toxicité de médicaments utilisés dans un autre contexte.

Les récentes découvertes de l'implication de la glycoprotéine P dans le transport des antiviraux couramment utilisés dans le traitement du VIH (amprénavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir et saquinavir) élargissent le champs d'application des recherches concernant cette glycoprotéine [94, 209]. Paradoxalement, la glycoprotéine P pourrait aussi entraîner une diminution de l'infectiosité du VIH en intervenant à la fois lors de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et durant les étapes suivantes du cycle viral du VIH.

Chez le chien, un gène fortement homologue (93%) au gène *MDR1* humain a été identifié. La distribution tissulaire du produit de ce gène est très proche de celle de l'homme. Ces données, ajoutées au fait que de nombreuses tumeurs sont similaires — cliniquement et

histopathologiquement — (cas du lymphome malin ou de l'ostéosarcome [273], par exemple) font de cette espèce un modèle d'étude intéressant pour l'étude du phénotype MDR et de sa modulation en clinique.

Le PROFESSEUR RESPONSABLE
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon

Vu : Le DIRECTEUR
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon

Professeur L. CHABANNE

Professeur J.-F. CHARY

Le PRÉSIDENT de la thèse

Professeur G. SALLES

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le

Pour le PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ,
Le Président du Comité de Coordination des Études Médicales,

Professeur F. MAUGUIERE

Annexe 1

Les phases de l'essai thérapeutique

Ces définitions sont extraites du cours de cancérologie de la Faculté de Médecine de Lyon ; cours consultés « *en ligne* » le 11 juin 2002 à l'adresse suivante :

<http://cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/Cancerologie/>

PHASE I

C'est le premier essai d'application d'un traitement chez l'homme. Cette phase permet de déterminer la tolérance et/ou la pharmacocinétique du produit, paramètres indispensables à la réalisation d'essais de phase II. Dans la plupart des spécialités médicales, la Phase I consiste à administrer la nouvelle molécule chez un petit nombre de volontaires sains, et d'étudier les paramètres pharmacologiques de cette molécule. En cancérologie, cette phase est réalisée chez des malades pour lesquels toutes les thérapeutiques mises en oeuvre dans le passé ont échoué.

PHASE II

Une fois les paramètres pharmacocinétiques et/ou la dose toxique connue, la Phase II permet de tester l'efficacité et la tolérance du produit utilisé à dose thérapeutique en l'administrant à un nombre limité de malades (20 à 25 patients). Ce nombre doit être suffisant pour une exploitation statistique des résultats afin d'extrapoler ces données à la population des malades atteints de la même affection.

PHASE III

C'est une phase comparative, l'efficacité du nouveau médicament est comparée à l'activité d'un produit de référence (ou d'un placebo). Le nouveau produit ou la nouvelle association médicamenteuse est pratiquement toujours comparée à une thérapeutique ayant déjà fait la preuve de son efficacité. Cette phase nécessite en général des échantillons de patients de plus grande importance (200 à 400 malades, parfois 1000 malades ou plus dans chaque groupe). La taille de l'échantillon est alors fonction de la différence attendue entre les 2 traitements.

PHASE IV

Elle se situe après l'AMM et consiste à détecter les effets secondaires rares qui surviennent sur toute la population des patients traités par le produit. C'est le travail de pharmacovigilance qui est effectué par tous les centres régionaux de pharmacovigilance de France. Les études de phase IV reprennent en général la méthodologie des études épidémiologiques et ce sont soit des études cas-témoins, soit des études de cohorte prospectives ou rétrospectives. Elles se font le plus souvent à l'instigation du laboratoire pharmaceutique ou d'organismes de recherche lorsque les systèmes de pharmacovigilance ont répertorié des cas de toxicité similaires faisant suite à l'administration d'un même traitement.

Annexe 2

Quelques médicaments majeurs en chimiothérapie

Cette annexe présente les principales substances utilisées en cancérologie. Le tableau 21, ci-dessous situe la découverte de ces substances dans le temps. Une substance antitumorale (cytotoxique, antinéoplasique, anticancéreuse) se définit comme une substance **cytotoxique** qui détruit **sélectivement** les cellules transformées.

Tableau 21 – Étapes de la découverte de quelques agents anticancéreux

1945 à 1955	Moutardes azotées	1975 à 1985	CCNU
	Méthotrexate		BCNU
	6-Mercaptopurine		Cisplatine
	Busulfan		Téniposide (ou VM-26)
1955 à 1965	Chlorambucil	1985 à 1995	Étoposide (ou VP-16)
	Cyclophosphamide		Mitoxantrone
	Vinblastine		Carboplatine
	Vincristine		Ifosfamide
	5-Fluoro-Uracil		Taxol
	Dactinomycine (ou Actinomycine D)		Taxotère
1965 à 1975	Melphalan	CPT-11	Topotecan
	6-Thio-Guanine	Idarubicine	
	Cytosine arabinoside		
	Bléomycine		
	Mitomycine C		
	Adriamycine		

Les substances utilisées en chimiothérapie anticancéreuse ont pour cible l'ADN ou des protéines nécessaires à la mitose. Leur activité n'est pas spécifique des cellules néoplasiques et elles ont aussi une toxicité notable sur les cellules saines. La classification des agents anticancéreux se fait suivant leur mécanisme d'action sur le cycle cellulaire et leur appartenance à des familles chimiques. Ces agents peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques, réagir directement avec l'ADN ou interagir avec les protéines permettant la division cellulaire.

è Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques

Ce sont des analogues structuraux pour la plupart d'entre eux.

⇒ Antimétabolites (ou analogues structuraux ou « faux substrats »)

Les antimétabolites peuvent être des analogues des purines, des pyrimidines ou de l'acide folique (voir tableau 22, ci-dessous). L'hydroxyurée (ou hydroxycarbamide) inhibe la ribonucléotide réductase.

Tableau 22 – Les antimétabolites

Analogues des purines	6-Mercaptopurine (PURINÉTHOL ND)	1965
	Fludarabine (FLUDARA ND)	1994
	Cladribine (LEUSTATINE ND)	1994
	Pentostatine (NIPENT ND)	1993
Analogues des pyrimidines	5-fluoro-uracile (FLURO-URACILE ND)	1977
	Cytosine arabinoside (ARACYTINE ND , CYTARBEL ND)	1985
	Gemcitabine (GEMZAR ND)	1996
Analogues de l'acide folique	Méthotrexate (MÉTHOTREXATE ND , LEDERTHREXATE ND)	1962
	Raltitrexed (TOMUDEX ND)	1996
-	Hydroxyurée (HYDREA ND)	1968

⇒ Inhibiteurs de topoisomérase

Les inhibiteurs des ADN topoisomérase I ou II (voir tableau 23, ci-dessous) ne s'intercalent pas dans l'ADN mais stabilisent le complexe de clivage, empêchant l'étape de religation. Ils provoquent une coupure définitive des brins d'ADN et induisent ainsi l'apoptose. Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I sont une classe récente de médicaments anticancéreux, ce sont des dérivés hydrosolubles de la camptothécine. Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II sont représentés par les anthracyclines et l'étoposide.

Tableau 23 – Les inhibiteurs de topoisomérase

Inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I		Inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II	
Irinotécan (CAMPTO ND)	1995	Étoposide (CELLTOP ND , VÉPÉSIDE ND)	1975
Topotécan (HYCAMTIN ND)	1996	Anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine...)	

è Substances réagissant avec l'ADN

Ces substances peuvent être des agents intercalants, des agents électrophiles ou des agents scindants (voir tableau 24, en page 168).

⇒ Agents intercalants

Ce sont des molécules caractérisées par plusieurs noyaux aromatiques condensés, de dimension et structure telles qu'elles provoquent une détorsion de la molécule d'ADN et donc : un empêchement de la progression des ARN et ADN polymérase et une inhibition de la réplication et de la transcription.

Mais ces molécules induisent également : une génération de radicaux libres, une liaison non dissociable aux ADN topoisomérase II ; donc des cassures mono- et bicaténaire.

Ces substances sont des antibiotiques.

⇒ Agents électrophiles

Ces agents sont à l'origine de la réaction d'alkylation dont l'effet est le remplacement d'un proton par un radical alkyl. Cette réaction peut entraîner des délétions, des modifications

chimiques de bases, la formation de ponts inter- ou intrabins et/ou une rupture de la liaison aux phosphates.

⇒ Agents scindants

Les agents scindants se comportent comme des endonucléases et réalisent de multiples cassures de la molécule d'ADN.

Tableau 24 – Agents intercalant, électrophile et scindants

SUBSTANCES INTERCALANTES	Anthracidines	Daunorubicine (CÉRUBIDINE ND , DAUNOXOME ND)	1967
		Doxorubicine (ADRIBLASTINE ND)	1991
		Épirubicine (FARMORUBICINE ND)	1990
		Idarubicine (ZAVEDOS ND)	1991
		Pirarubicine (THÉPRUBICINE ND)	1990
Acridines	Amsacrine	-	
Ellipticines	Acétate d'elliptinium (CELIPTIUM ND)	-	
Anthracènediones	Mitoxantrone (NOVENTRONE ND)	1985	
AGENTS ÉLECTROPHILES	Alkylants bifonctionnels	Moutardes à l'azote	
		Chlorméthine (CARYOLYSINE ND)	1949
		Cyclophosphamide (ENDOXAN ND)	1960
		Ifosfamide (HOLOXAN ND)	1975
		Melphalan (ALKÉLAN ND)	1966
		Chlorambucil (CHLORAMINOPHÈNE ND)	1956
	Nitroso-urées	Alkylsulfonates	
		Busulfan (MYLÉLAN ND)	1998
		Carmustine = BCNU (BICNU ND)	1981
	-	Fotémustine (MUPHORAN ND)	1989
		Streptozocine (ZANOSAR ND)	1985
		Mitomycine C (AMÉTYCINE ND)	1974
	Dérivés du platine	Carboplatine (PARAPLATINE ND)	1989
		Cisplatine (CISPLATINE ND , CISPLATYL ND)	1979
		Oxaliplatine (ELOXATINE ND)	1996
Apparentés	Procarbazine (NATULAN ND)	1965	
	Dacarbazine (DÉTICÈNE ND)	1975	
AGENTS SCINDANTS		Bléomycine (BLÉOMYCINE ND)	1970

è Substances interagissant avec les protéines

Ce sont les « poisons du fuseau », antimitotiques au sens strict (voir tableau 25, ci-dessous). Nous retrouvons dans cette catégorie les alcaloïdes de la pervenche et les taxanes (dérivés de l'If). Ces substances empêchent la formation du fuseau mitotique et le maintien du cytosquelette en agissant sur l'équilibre entre les dimères et les polymères de tubuline.

Tableau 25 – Les poisons du fuseaux

Alcaloïdes de la pervenche		Taxanes	
Vinblastine (VELBÉ ND)	1974	Paclitaxel (TAXOL ND)	1993
Vincristine (ONCOVIN ND)	1983	Docétaxel (TAXOTÈRE ND)	1996
Vindésine (ELDISINE ND)	1982		
Vinorelbine (NAVELBINE ND)	1989		

La L-asparaginase (KIDROLASEND) permet de diminuer la quantité de L-asparagine qui est un acide aminé non synthétisé par certaines cellules leucémiques.

Annexe 3

La glycoprotéine P chez le chien

Des auteurs se sont rapidement intéressés à l'existence d'une glycoprotéine P homologue chez le chien. En effet, la présence d'une glycoprotéine P homologue à la glycoprotéine P de l'homme permettrait d'envisager l'utilisation de l'espèce canine comme modèle d'étude de la résistance multidroge clinique.

En 1989, LIEBERMAN *et al.* [234] mettent en évidence un immunomarquage positif de la membrane de la bordure en brosse rénale à l'aide de l'anticorps C219. La masse moléculaire mesurée par ces auteurs est de 160 kDa pour la glycoprotéine P canine et de 170 kDa pour la glycoprotéine P humaine. Cette différence de masse moléculaire est expliquée par des différences de glycosylation — après avoir subi un traitement permettant la déglycosylation, les deux glycoprotéines P présentent une masse moléculaire de 120 kDa.

En 1998, STEINGOLD *et al.* [385] mettent en évidence l'existence chez le chien d'un gène homologue au gène *MDR1*. Celui-ci présente une homologie de 93% avec le gène humain *MDR1*, de 74% avec le gène *MDR2* et de 90% avec les gènes *mMdr1a* de la souris et du hamster. Nous avons appelé ce gène *cMdr1*.

è DÉTECTION EXPÉRIMENTALE

La principale méthode de détection expérimentale de la glycoprotéine P chez le chien est l'immunohistochimie. Quelques auteurs ont utilisé des méthodes de détection de l'ARNm *mdr1* [273, 385].

Plusieurs anticorps monoclonaux sont utilisables : les anticorps C494 [284] et C219 [28, 234, 285] sont les plus couramment utilisés chez le chien [140, 226]. Cependant, d'autres anticorps sont disponibles : JSB1, MRK16, UIC2, C32 ou HYB241 (voir Annexe 4 – Méthodes de détection expérimentale de la glycoprotéine P, en page 177).

A notre connaissance, seule une étude [140] a utilisé plusieurs anticorps reconnaissant des épitopes différents — dont un extracellulaire et un intracellulaire —, selon les recommandations consensus décrites dans une publication regroupant divers auteurs [23].

Dans cette étude [140], GINN indique que l'anticorps C494 semble être un anticorps de choix pour un immunomarquage chez le chien : cette anticorps présente une bonne qualité de marquage, est spécifique de la glycoprotéine P codée par le gène *mdr1* et peut être utilisé à des dilutions élevées (diminuant ainsi le coût de son utilisation). Dans cette étude les tissus ont été prélevés immédiatement après le décès de l'animal, fixés pendant 24–48 heures dans une solution de formol neutre tamponné à 10% puis inclus sous paraffine.

⇒ DISTRIBUTION TISSULAIRE

⇒ Tissus sains

Chez le chien, la glycoprotéine P a été détectée dans de nombreux tissus sains comme le foie, les reins, les glandes corticosurrénales, l'estomac, le pancréas, le tube digestif, les canaux salivaires, le poumon ou l'encéphale (tableau 16, en page 120 et tableau 17, en page 121). Différents auteurs se sont intéressés à la distribution tissulaire de la glycoprotéine P.

CONRAD *et al.* [72] ont détecté une expression de la glycoprotéine P — en utilisant l'anticorps C494 — dans tous les tissus analysés : foie, rein, duodénum, jéjunum, iléon, colon, poumon, encéphale et testicules.

⇒ Tissus néoplasiques

MOORE *et al.* [285] ont étudié l'expression de la glycoprotéine P (avec l'anticorps C219) chez des chiens atteints de lymphome malin ; tout d'abord avant le commencement d'une chimiothérapie puis suivant une rechute après le développement d'une résistance clinique à l'adriamycine et à la vincristine.

Dans cette étude, les auteurs obtiennent une incidence de l'expression de la glycoprotéine P de 3% (1/30) chez les individus sains et de 38% (3/8) chez les chiens présentant une chimiorésistance. L'incidence observée est proche de celle qui est constatée chez l'homme lors de lymphome non-Hodgkinien après chimiothérapie.

Une étude de GINN [140] a mis en évidence un marquage positif pour l'expression de la glycoprotéine P dans de nombreux tissus néoplasiques chez le chien (tableau 26, en page 173). Nous pouvons noter que **l'anticorps C219 ne permet pas de marquer des échantillons qui n'aient été déjà marqués par un des 2 autres anticorps.**

Tableau 26 – Comparaison de l'immunomarquage de la gp-P sur des tissus néoplasiques canins avec trois anticorps (d'après GINN P.E. [140])

Néoplasme	n	C494		C219		JSB-1		Ensemble
		(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	
Lymphome	22	6 (27,3%)	6 (27,3%)	0	0	0	0	6 (27,3%)
Histiocytome	10	0	0	0	0	0	0	0
Mélanome malin	13	0	3 (23,1%)	0	1 (7,7%)	1 (7,7%)	4 (30,8%)	4 (30,8%)
Fibrome	3	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosarcome	4	0	0	0	0	0	0	0
Hémangiopéricytome	15	14 (93,3%)	15 (100%)	0	1 (6,7%)	0	0	15 (100%)
Léiomyome	4	0	0	0	0	0	0	0
Léiomyosarcome	6	2 (33,3%)	3 (50%)	0	1 (16,7%)	0	0	3 (50%)
Adénoc. mammaire	19	1 (5,3%)	8 (42,1%)	0	8 (42,1%)	2 (10,5%)	9 (47,4%)	12 (63,2%)
Adénome mammaire	9	0	0	0	3 (33,3%)	0	3 (33,3%)	3 (33,3%)
Carcinome épidermoïde	10	1 (10%)	4 (40%)	0	5 (50%)	2 (20%)	7 (70%)	8 (80%)
Tumeur basocellulaire	7	0	1 (14,3%)	0	4 (57,1%)	1 (14,3%)	5 (71,4%)	5 (71,4%)
Adénome apocrine	2	0	1 (50%)	0	1 (50%)	0	1 (50%)	1 (50%)
Adénoc. apocrine	5	0	4 (80%)	0	4 (80%)	0	4 (80%)	4 (80%)
Hépatome	4	0	4 (100%)	0	4 (100%)	0	4 (100%)	4 (100%)
Cholangiocarcinome	3	0	2 (66,7%)	0	0	0	2 (66,7%)	2 (66,6%)
Carcinome transitionnel	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)
Adénome de Conn	3	0	3 (100%)	0	3 (100%)	0	3 (100%)	3 (100%)
Carcinome thyroïdien	4	0	0	0	0	2 (50%)	2 (50%)	2 (50%)
Adénome colique	7	2 (28,9%)	6 (85,7%)	0	1 (14,3%)	1 (14,3%)	5 (71,4%)	7 (100%)
Adénocarcinome colique	4	2 (50%)	4 (100%)	0	0	0	2 (50%)	4 (100%)

Sont indiqués dans ce tableau, pour chaque type de néoplasme, le nombre total de prélèvement analysé ainsi que la proportion de ces prélèvements marquée par chaque anticorps (en valeur absolue et en pourcentage).

(a) échantillons dont l'immunomarquage est positif **uniquement** pour l'anticorps indiqué

(b) total des échantillons dont l'immunomarquage est positif pour l'anticorps indiqué.

è IMPLICATIONS CLINIQUES

⇒ Les néoplasmes canins en tant que modèle d'étude

BERGMAN *et al.* [28] se sont intéressés, chez des chiens atteints de lymphome malin (n=58), à la corrélation entre le marquage à l'aide de l'anticorps C219 (« *scoring*») et la durée de la rémission, la durée de survie totale et la durée de survie après rechute.

Ces auteurs concluent que le *score* de marquage avec l'anticorps C219 avant de débiter une chimiothérapie est corrélé avec la durée de rémission et la durée de survie totale, tandis que le *score* C219 déterminés au moment de la rechute sont corrélés à la durée de survie après la rechute. Il apparaît dans cette étude que le **lymphome malin canin peut être un excellent modèle** pour l'étude de la glycoprotéine P chez l'homme.

Une étude similaire de LEE *et al.* [226] abouti à des résultats similaires. Plus récemment, MEALEY *et al.* [273] ont étudié, pour la première fois, l'expression de la glycoprotéine P par une lignée cellulaire d'ostéosarcome (OS2.4) chez le chien. L'ostéosarcome canin est reconnu

comme un bon modèle pour l'étude de son homologue chez l'homme. Les auteurs montrent dans cette étude que l'exposition de cellules d'ostéosarcome canin à de l'adriamycine conduit à une surexpression d'ARNm *mdr1* et de glycoprotéines P. De plus, comme chez l'homme, ces cellules présentent, en comparaison avec les cellules parentales, une concentration intracellulaire en adriamycine plus faible et une sensibilité accrue à la vincristine.

Très récemment, MIYOSHI *et al.* [284] ont mis en évidence, chez le chien, que 26% des mastocytomes expriment la glycoprotéine P et/ou la MRP1 et que ces tumeurs peuvent être multichimiorésistantes.

Ainsi, les études menées chez le chien depuis ces dernières années montrent que les tumeurs dans cette espèce peuvent servir de modèle d'étude à leurs homologues chez l'homme.

⇒ Étude de la modulation du phénotype MDR chez le chien

Les recherches moléculaires et cellulaires sur la modulation de la RP/gp-P chez le chien sont devenues possibles depuis le développement de lignées cellulaires canines exprimant le produit du gène *cMdr1* [273, 299]. Quelques premières études ont déjà été menées sur la modulation du phénotype MDR chez le chien [299, 429].

WADDLE *et al.* [429] ont montré que des concentrations de tamoxifène suffisantes¹ pour inhiber la glycoprotéine P pouvaient être atteintes chez des chiens traités par chimiothérapie avec une augmentation modérée mais acceptable de la toxicité gastro-intestinale. Une toxicité gastro-intestinale et neurologique se manifeste chez le chien à partir de doses élevées de tamoxifène (> 600 mg/m² *per os* toutes les 12 heures).

PAGE *et al.* [299] ont évalué la chimiosensibilité des lignées cellulaires RP/gp-P canines (4TG11 [408] et OS2.4 [273]) vis à vis des agents anticancéreux impliqués ou non dans le phénotype MDR « classique ». Ces lignées cellulaires sont de 2 à 5 fois plus résistantes à l'adriamycine que les lignées sauvages (résultats comparables à ceux rencontrés dans les lignées cellulaires humaines). Ces lignées sont sensibles au cisplatine, agent non transporté par la gp-P. Les auteurs ont aussi déterminé la capacité de certains modulateurs de la glycoprotéine P (PSC833, tamoxifène, vérapamil) à vaincre la chimiorésistance-MDR1 induite

¹ Chez l'homme, la dose de tamoxifène suffisante pour inhiber la glycoprotéine P est de 150–250 mg/m² *per os* toutes les 12 heures.

par l'adriamycine. Le PSC833 s'est révélé meilleur que le vérapamil et le tamoxifène pour augmenter l'accumulation intracellulaire d'adriamycine.

Les données obtenues à partir de telles études sur des lignées cellulaires canines seront utiles pour le développement de futures stratégies cliniques de modulation du phénotype MDR.

⇒ Chiens de race Colley sensibles à l'ivermectine et pharmacologie

Nous avons vu que les chiens de race Colley (dont la sensibilité à l'ivermectine est accrue) présentent une mutation du gène *cMdr1* (voir IV.1.4.1. Barrière hémato-encéphalique, en page 126). D'autres races sont suspectées de la même sensibilité : les Border Colleys, les Bergers des Shetland, les Bobtails et les Bergers australiens.

Étant donné le grands de substances transportées par la glycoprotéine P, il est possible que les Colleys sensibles à l'ivermectine le soient aussi à d'autres substrats de la glycoprotéine P comme la digoxine, le lopéramide, la vincristine ou la vinblastine [274]. Cette sensibilité a, par exemple, été constatée dans le cas du lopéramide : 40 cas de neurotoxicité induite par le lopéramide ont été décrits au CNITV¹ par HUGNET C., CADORE J.-L. *et al* [175].

Ce type de sensibilité ne semble pas exister chez l'homme [274]. Toutefois, un grand nombre de médicaments (voir IV.4.1. Modulation à l'aide d'agents pharmaceutiques, en page 154) est capable d'inhiber la glycoprotéine P. Ainsi, l'administration concomitante de ces médicaments avec l'ivermectine pourrait déclencher la neurotoxicité chez certains patients.

Une autre conséquence de cette découverte concerne la biodisponibilité de nombreux médicaments substrats de la glycoprotéine P chez les chiens de race Colley. En effet, la glycoprotéine P est exprimée dans le tube digestif et est impliquée dans des mécanismes « anti-absorption ». Ainsi, **des précautions doivent être prises lors de l'administration de tels médicaments** (ciclosporine A, dexamétasone) **dans cette race** : leur biodisponibilité lors d'administration *per os* est probablement plus élevée chez les individus présentant une mutation du gène *cMdr1* [275].

¹ Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires

Annexe 4

Méthodes de détection expérimentale de la glycoprotéine P

Nous décrirons dans cette annexe les principales méthodes utilisées pour la détection de la glycoprotéine P.

Un problème majeur dans la détection d'une surexpression de la glycoprotéine P a été la variabilité des résultats obtenus dans les différentes études. Ainsi, un groupe d'auteurs international a publié des recommandations communes concernant les méthodes de détection de la glycoprotéine P [23].

è Immunomarquage

Cette méthode possède des avantages importants pour la détection de l'expression de la glycoprotéine P lors de leucémies ou de tumeurs solides : • délimitation des détails microanatomiques ; , identification de l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur ; *f* détermination de la proportion de cellules exprimant la glycoprotéine P ; „ possibilité de corréler l'histologie avec le phénotype.

La part de subjectivité dans l'interprétation du marquage est l'inconvénient majeur.

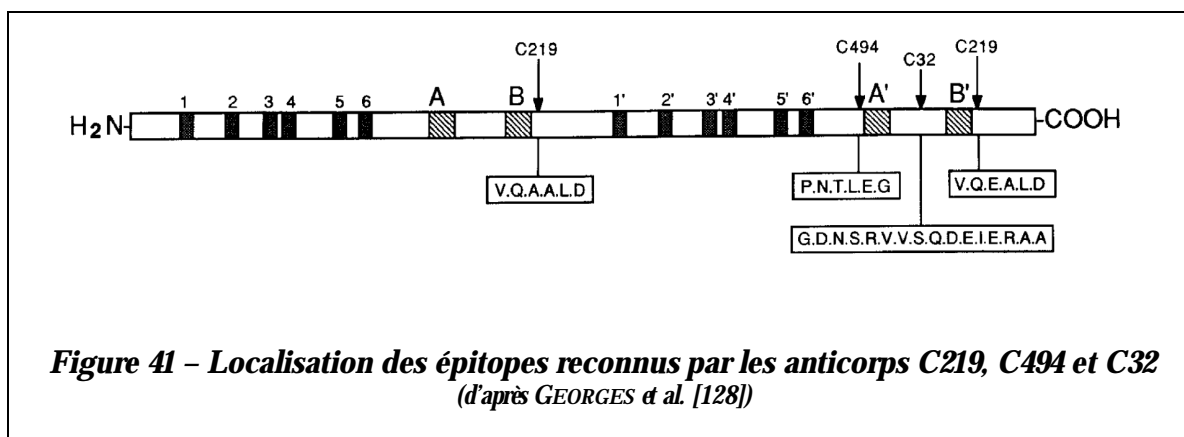
⇒ Les anticorps

Il est recommandé d'utiliser **au minimum deux anticorps** reconnaissant des épitopes différents (un extracellulaire et un intracellulaire) [23]. Les anticorps C219, C494, MRK16 et JSB-1 sont les plus fréquemment utilisés alors que les anticorps C32, 4E3, UIC2 et HYB241 le sont plus rarement.

Ä *Anticorps reconnaissant un épitope intracellulaire*

Les anticorps **C219**, **C494** et **C32** [128, 199] reconnaissent des séquences d'acides aminés intracellulaires (figure 41, en page 178). L'anticorps **C219** reconnaît une séquence hautement conservée au travers des espèces et semble marquer toutes les isoformes de la glycoprotéine P — incluant les isoformes non impliquées dans la résistance

pléiotropique (réaction croisée) — alors que les anticorps **C32** et **C494** sont plus spécifiques (tableau 27, ci-dessous).



L'anticorps C32 n'a pas été utilisé chez le chien, mais la séquence d'acides aminés reconnue (« SQDEIER » chez le hamster) est très différente (« SHEEIMQ ») et nous pouvons supposer que cette anticorps ne reconnaît pas la glycoprotéine P canine.

L'anticorps JSB-1 reconnaît lui aussi un épitope intracellulaire hautement conservé. Cependant, il n'est pas observé de réaction croisée avec le gène *mdr* de classe III.

Tableau 27 – Épitopes reconnus et isoformes de la glycoprotéine P
(adapté d'après GEORGES et al. [128])

Isoformes et classes de la gp-P	Épitopes						
	C219	C32	C494	MRK16	4E3	UIC2	HYB241
Hamster							
I (<i>Pgp1</i>)	+	+	+	-	?	ND	?
II (<i>Pgp2</i>)	+	+	-	-	?	ND	?
III (<i>Pgp3</i>)	+	-	-	-	?	ND	?
Homme							
I (<i>MDR1</i>)	+	-	+	+	+	+	+
III (<i>MDR2/3</i>)	+	-	-	-	-	-	-
Souris							
I (<i>mMdr1b</i>)	+	-	-	-	?	-	?
II (<i>mMdr1a</i>)	+	-	-	-	?	-	?
III (<i>mMdr2</i>)	+	-	-	-	?	-	?
Chien							
I (<i>cMdr1</i>)	+	?	+	?	?	?	?

À Anticorps reconnaissant un épitope extracellulaire

Nous trouvons parmi ceux-ci, les anticorps MRK16 [157], UIC2 [276], 4E3 et HYB241 [23].

MRK16 est un anticorps monoclonal murin élaboré à partir de la lignée cellulaire humaine K562/DOX. Il reconnaît un épitope extracellulaire discontinu (boucle extracellulaires EC1 et EC4) [424]. Cet anticorps est particulièrement spécifique vis à vis de l'isoforme de classe I de la glycoprotéine P humaine (PGY1 ou ABCB1). Il semble que cette spécificité lui soit conférée par la boucle EC4. Cependant, chez le chien, la séquence de l'épitope reconnu est assez proche (tableau 28, ci-dessous). À notre connaissance, aucune étude n'a utilisé l'anticorps MRK16 chez le chien.

Tableau 28 – Spécificité de séquence de l'anticorps MRK16
(adapté d'après VASUDEVAN et al. [424])

Espèce	Classes de la gp-P	Boucle EC1	Boucle EC4
Homme	I (<i>MDR1</i>)	EEDMTRY	RIDDPETKR
	III (<i>MDR2/3</i>)	EEEMTRY	PGDDA-VKQ
Chien^a	I (<i>cMdr1</i>)	EEEMTTY	RDEDPETKR
Hamster	I (<i>Pgp1</i>)	EEEMTTY	RNTDDETKR
	II (<i>Pgp2</i>)	EEDMATY	RDDDPKTKQ
	III (<i>Pgp3</i>)	EEEMTRY	PGDDA-VKQ
Souris	I (<i>mMdr1b</i>)	EEEMTTY	NGGPPETQR
	II (<i>mMdr1a</i>)	EEEMAIY	RDDDHETKR
	III (<i>mMdr2</i>)	EEEMTRY	PGDDA-VKQ

Les séquences correspondant à la PGY1 sont surlignées.

(a) D'après la séquence obtenue à partir de tissu colique de Beagles (GenBank¹ AAC02113)

L'anticorps **UIC2** est spécifique de l'isoforme de classe I de la glycoprotéine P humaine (PGY1), il n'a cependant pas été testé à notre connaissance chez le chien. La présence de la boucle EC3 (entre TM5 et TM6) est indispensable mais n'est pas suffisante à la réactivité de cet anticorps. La proximité entre le domaine TM6 (participant à la formation du

¹ accessible à l'adresse internet suivante :
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list_uids=2852441&dopt=GenPept

site de liaison des médicaments) et un des épitopes de UIC2 explique que la liaison de cet anticorps à la glycoprotéine P soit capable d'inhiber son fonctionnement. La boucle EC1 est, elle aussi, indispensable à la reconnaissance de la glycoprotéine P par UIC2.

Tableau 29 – Séquences des acides aminés de la glycoprotéine P canine
(GenBank AAC02113)

1	MDPEGGRKGS	AEKNFWKMGK	KSKKEKKEKK	PTVSTFAMFR	YSNWLDRLYM	LVGTMAAIIH
61	GAALPLMMLV	FGNMTDSFAN	AGISRNKTFP	VIINESITNN	TQHFINHLEE	EMTTYAYYYS
121	GIGAGVLVAA	YIQVSFWCLA	AGRQILKIRK	QFFHAIMRQE	IGWFDVHDVG	ELNTRLTDDV
181	SKINEGIGDK	VGMFFQSIAT	FFTGFIVGFT	PGWKLTLVIL	AISPVLGLSA	AIWAKILSSF
241	TDKELLAYAK	AGAVAEVLA	AIRTVIAFGG	QKKELERYNK	NLEEAKRIGI	KKAITANISI
301	GAAFLLIYAS	YALAFWYGTS	LVLSSSEYTI	QVLTVFFSVL	IGAFSIGQAS	PSIEAFANAR
361	GAAYEIFKII	DNKPSIDSYS	KSGHKPDNIK	GNLEFKNVHF	SYPSRKEVKI	LKGLNLKVQS
421	GQTVALVGNS	GCGKSTTVQL	MQRLYDPTDG	MVCIDGQDIR	TINVRHLREI	TGVVSEQEPVL
481	FATTIAENIR	YGRENVTMDE	IEKAVKEANA	YDFIMKLPNK	FDTLVGERGA	RLSGGQKQRI
541	LAIARALVRN	PKILLLDEAT	SALDTESEAV	<u>VQVALD</u> KARK	GRTTIVIAHR	LSTVRNADVI
601	AGFDDGVIVE	KGNHDELMKE	KGIYFKLVTM	QTRGNEIELE	NATGESKSES	DALEMSPKDS
661	GSSLIKRRST	RSIHAPQGG	DRKLGTKEDL	NENVPSVSFW	RILKLNSTEW	PYFVVGFICA
721	IINGGLQPAF	SIIFSRIIGI	<u>FTRDEDPETK</u>	RQNSNMFSVL	FLVLGIISFI	TFFLQGFTEG
781	KAGEILTKRL	RYMVFRSMLR	QDVSWFDDPK	NTTGALTRL	ANDAAQVKGGA	IGSRLAVITQ
841	NIANLGTGII	ISLIYGWQLT	LLLLAIVPII	AIAGVEMKM	LSGQALKDKK	ELEGAGKIAT
901	EAIENFRTVV	SLTREQKFY	MYAQSLOVPY	RNSLRKAHIF	GVSFSITQAM	MYFSYAGCFR
961	FGAYLVANEF	MNFQDVLVLF	SAIVFGAMAV	GQVSSFAPDY	AKAKVSAAHV	IMIIEKSPLI
1021	DSYSPHGLKP	<u>NTLEGN</u> VTFN	EVVFNYPTRP	DIPVLQGLSL	EVKKGQTLAL	VGSSGCGKST
1081	VVQLLERFYD	PLAGSVLIDG	KEIKHLNVQW	LRAHLGIVSQ	EPILFDCSIA	ENIAYGDNSR
1141	<u>VVSHEEIMQA</u>	AKEANIHHFI	ETLPEKYNTR	VGDKGTQLSG	GQKQRIAIAR	ALVRQPHILL
1201	LDEATSALDT	ESEK <u>VQEAL</u>	<u>DKAREG</u> RTCI	VIAHRLSTIQ	NADLIVVFQN	GKVKEHGTHQ
1261	QLLAQKGIYF	SMISVQAGAK	R			

Séquences des 1281 acides aminés identifiés à partir de tissu colique chez des Beagles. Les épitopes de certains anticorps sont mis en évidence :

+ anticorps reconnaissant la glycoprotéine P canine : C219 ; C494

+ anticorps non évalués chez le chien dont la séquence est proche de l'épitope reconnu : MRK16 ; C32

⇒ Les contrôles

Le choix de la lignée cellulaire servant de **contrôle positif** est important : il est nécessaire d'utiliser une lignée cellulaire bien caractérisée dans son expression de la glycoprotéine P. Il est aussi essentiel de bien connaître les spécificités des anticorps utilisés et d'utiliser des cellules issues d'un tissu correspondant à l'organe ou au néoplasme étudié. Enfin, un contrôle « *gold standard* » doit être utilisé lors d'analyses multiparamètres : les lignées cellulaires 8226/DOX et CEM/VLB sont, par exemple, bien appropriées dans ce cas [4, 23, 24].

⇒ Standardisations de la manipulation et de la préparation des tissus

Dans le cas des **préparations par centrifugation** (CYTOSPIN®), les cellules doivent d'abord être séchées puis trempées pendant 10 min. dans de l'acétone à 4°C. Les lames sont ensuite conservées au frais et à l'abri de l'humidité.

Les préparations de **tissus congelés** (cryopréservation) doivent être effectuées à partir d'échantillons fraîchement prélevés puis placé dans un milieu d'enrobement (ex. : OCT) et conservées dans l'azote liquide, des vapeurs d'azote liquide ou dans des congélateurs permettant une température constamment inférieure à -70°C.

Lors de préparation de **tissus enrobés de paraffine**, BECK *et al.* [23] recommandent une fixation tissulaire brève (environ 4 heures) dans du formol tamponné neutre à 10% lorsqu'une extraction d'antigènes n'est pas requise. Dans le cas contraire, un temps de fixation plus long doit être utilisé.

⇒ Analyse des résultats

BECK *et al.* [23] conseillent d'évaluer l'intensité de l'immunomarquage : négatif (-), faible (+), moyen (++) , élevé (+++) ou très élevé (++++).

è Cytométrie en flux

Le principe de la cytométrie en flux est d'analyser et, éventuellement, de trier des cellules ou d'autres particules biologiques mises en suspension dans un liquide. Pour distinguer ces éléments les uns des autres, des mesures de fluorescence à une ou plusieurs longueurs d'onde ainsi que des mesures de diffusion de lumière sont réalisées.

La cytométrie en flux peut être réalisée à partir d'échantillons frais ; en différé de 24h à température ambiante ou à partir d'échantillons cryopréservés. Il est recommandé d'utiliser des anticorps spécifiques de la glycoprotéine P et reconnaissant un épitope extracellulaire (MRK16, UIC2 et 4E3, par exemple). La qualité des lots d'anticorps utilisés doit être rigoureusement vérifiée.

è Mesure du fonctionnement de la glycoprotéine P

Les mesures du fonctionnement de la glycoprotéine P **en présence et en absence** de modulateur de la gp-P (ex. : ciclosporine, PSC833 ou vérapamil) sont préférables aux mesures de l'accumulation intracellulaire de médicaments seules [23]. Étant donné que la plupart des mesures fonctionnelles sont effectuées par cytométrie en flux, il est recommandé de corrélérer

les paramètres fonctionnels avec l'expression de la glycoprotéine P détectée à l'aide d'anticorps anti-gp-P. Ainsi, il est possible de détecter un efflux en l'absence d'expression de glycoprotéine P : une indication permettant de supposer l'existence d'autres mécanismes de résistance pléiotropique.

è **Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)**

La RT-PCR est une PCR après transcription inverse d'un ARN en ADNc. En réalité, il s'agit d'une PCR « classique » réalisée sur un ADN complémentaire, qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse.

L'analyse par RT-PCR est probablement la technique la plus spécifique et la plus sensible pour détecter l'ARNm *MDR1* mais ne permet pas actuellement l'identification des cellules (tumoraux ou saines) exprimant le gène. Ainsi, BECK *et al* [23] recommandent que cette identification accompagne ce type de mesures.

Glossaire

- **ABC (transporteurs)** : la superfamille des protéines ABC forme une des plus grandes familles de protéines. On en dénombre aujourd'hui 48 chez les mammifères. On les retrouve dans pratiquement tous les tissus. Ces protéines fixent l'ATP et utilisent l'énergie de son hydrolyse pour permettre le transport de molécules au travers des membranes cellulaires.
- **Adriamycine** : synonyme de doxorubicine (DCI), voir Annexe 2, en page 165.
- **Amphiphile** : se dit d'une molécule possédant des régions hydrophiles et d'autres hydrophobes, ce qui lui confère des propriétés tensio-actives.
- **Anthracyclines** : famille d'agents anticancéreux (voir Annexe 2, en page 165).
- **Apoptose** : Processus d'autodestruction des cellules commandé par le programme génétique.
- **Biotinylation** : la biotinylation consiste à fixer artificiellement la biotine sur un substrat quelconque à l'aide d'un réactif bifonctionnel.
- **CFTR** : protéine dont la déficience est à l'origine de la mucoviscidose.
- **Chromosome minuscule double** : Fragment d'ADN extrachromosomique instable dépourvu de centromère.
- **Dalton** : unité de masse atomique (u.m.a.) équivalant au douzième de la masse d'un atome neutre de carbone ^{12}C .
- **Épigénétique** : Tout facteur qui peut modifier le phénotype sans changer le génotype. Processus réversible, intervenant en aval du gène, et qui affecte le phénotype (ex. : méthylation de l'ADN).
- **Épipodophylotoxines** : famille d'agents anticancéreux (voir Annexe 2, en page 165).
- **ERM (protéines)** : Ensemble de protéines (Ezrin/Radixin/Moesin) reliant le cytosquelette à la membrane plasmique permettant la biogenèse, le maintien et le renouvellement de structures membranaires, cibles de diverses voies de signalisation cellulaire.
- **HeLa (cellules)** : cellules issues de culture cellulaire en lignée continue, isolées en 1952 du carcinome du col utérin d'une patiente américaine (Helen Lansing)

- **K562** (cellules) : cellules isolées à partir d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique. Les cellules sélectionnées pour leur résistance à la doxorubicine sont appelées K562/DOX.
- **KB** (cellules) : cellules issues de culture cellulaire en lignée continue, isolées à partir d'un carcinome buccal humain
- **Melphalan** (ALKÉRANND) : agent anticancéreux cytostatique de la famille des moutardes à l'azote. C'est un agent alkylant qui établit avec les groupements nucléophiles des nucléoprotéines, des ponts stables empêchant la réplication de l'ADN (voir Annexe 2, en page 165).
- **Molaire** : unité de la concentration molaire. $1 \text{ M} = 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- **Mole** : par convention, la mole est la quantité de matière d'un système contenant autant d'espèces chimiques qu'il y a d'atomes de carbone dans 12g de carbone 12. Le nombre de particules dans une mole est la constante d'Avogadro. Dans l'état actuel de nos connaissances, on estime qu'il y a : $6,0221367\cdot 10^{23}$ atomes de carbone 12 dans 0,012 kg de ¹²C.
- **PCR** (ou ACP) : procédé d'amplification exponentielle *in vitro* d'une séquence définie d'ADN, faisant intervenir des cycles successifs d'appariements d'oligonucléotides spécifiques et d'élongation à l'aide d'une polymérase.
- **Promoteur** : Au sens stricte, le promoteur d'un gène correspond à la région où se fixe l'ARNp II jusqu'au site d'initiation de la transcription. Au sens large, il comprend aussi les séquences régulatrices d'amont (séquences cis-régulatrices).
- **Proto-oncogène** : gène impliqué dans le contrôle de la division cellulaire (stimulation) et dont la mutation est à l'origine d'oncogènes.
- **SDS-PAGE** (pour « *Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* ») : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium.
- **Ras** (protéines) : ces protéines appartiennent à la famille des « petites protéines » liant le GTP. Elles sont constituées d'un domaine globulaire représentant le site de fixation du nucléotide (GDP ou GTP) et d'une région C-terminal qui se termine par un site de farnésylation.
- **Réversion** : retour au phénotype primitif soit par un changement dans l'A. D. N. qui inverse une altération causée par une mutation (réversion vraie), soit par une compensation.

-
- **Thiotépa** (DCI) : antimitotique chromosomique, il empêche la synthèse des désoxyribonucléoprotéines indispensables à la mitose.
 - **Tonneaux** β : repliement β se présentant sous la forme d'un feuillet refermé sur lui-même, c'est à dire d'un tonneau dans lequel le premier brin est connecté au dernier par des liaisons H entre ces brins.
 - **Vinblastine** (DCI) : antinéoplasique de la famille des alcaloïdes de la pervenche d'Amérique (*Vinca rosea*). Il agit en bloquant la division cellulaire au stade de la métaphase en inhibant la formation du fuseau (liaison aux microtubules). Ce composé n'affecte pas la formation de l'ADN (voir Annexe 2, en page 165).
 - **Vincristine** (DCI) : antinéoplasique de la famille des alcaloïdes de la pervenche d'Amérique (*Vinca rosea*). Il agit en bloquant la division cellulaire au stade de la métaphase en inhibant la formation du fuseau (liaison aux microtubules) (voir Annexe 2, en page 165).

Table des matières

SOMMAIRE.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES	11
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ENCADRÉS.....	13
LISTE DES FIGURES	15
INTRODUCTION.....	19
I. RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE ET PHÉNOTYPE MDR.....	21
I.1. CONCEPT DE RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE.....	21
I.2. AGENTS CYTOTOXIQUES IMPLIQUÉS	22
I.3. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE.....	24
I.3.1. Résistance en amont de la cible moléculaire.....	27
I.3.1.1. <i>Facteurs tissulaires</i>	28
a. Barrière hémato-encéphalique [27, 229,353]	28
b. Vascularisation et tissu interstitiel [229].....	29
I.3.1.2. <i>Facteurs membranaires</i>	31
a. Glycoprotéine P.....	31
b. MRP («Multidrug Resistance-associated Proteins »)	31
^z Protéine MRP ou MRP1	32
^z Famille de protéines MRP	34
^Ā Protéine MRP2	35
^Ā Protéine MRP3	35
^Ā Protéine MRP4	35
^Ā Protéine MRP5	36
^Ā Protéine MRP6	36
^Ā Protéine MRP7 [167, 241]	36
c. MXR (« MitoXantrone Resistance protein »)	37
I.3.1.3. <i>Facteurs cytoplasmiques</i>	39
a. Séquestration vésiculaire (protéine LRP/MVP).....	39
b. Modification du métabolisme inactivateur.....	41
I.3.2. Résistance par modification de la cible moléculaire.....	41
I.3.2.1. <i>Rôle de la topoisomérase II [272]</i>	42
I.3.2.2. <i>Résistance cellulaire envers les poisons des topoisomérases [320]</i>	42
a. Résistance quantitative [390]	43
b. Résistance qualitative [56].....	43
I.3.3. Résistance en aval de la cible moléculaire	43
I.3.3.1. <i>Augmentation de l'activité de réparation de l'ADN</i>	43

a.	Exemple des agents alkylants.....	43
b.	Exemple des dérivés du platine [61].....	44
1.3.3.2.	<i>Tolérance accrue aux lésions de l'ADN [61]</i>	44
1.3.3.3.	<i>Régulation négative du signal de mort cellulaire</i>	45
a.	Apoptose ou mort cellulaire programmée : quelques rappels [399].....	45
b.	Mort cellulaire et prolifération cellulaire tumorale	46
II.	GLYCOPROTÉINE P ET RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE	49
II.1.	HISTORIQUE.....	49
II.1.1.	Origine de cette résistance.....	49
II.1.2.	Diminution de la concentration intracellulaire [206]	49
II.1.3.	Facteur pronostic du phénotype MDR.....	50
II.2.	ALTÉRATIONS DES LIGNÉES CELLULAIRES MDR	50
II.2.1.	Transports membranaires	51
II.2.1.1.	<i>Mesures de flux entrant</i>	51
II.2.1.2.	<i>Mesures de flux sortant</i>	52
II.2.2.	Modifications biochimiques	54
II.2.2.1.	<i>Protéines membranaires et cytoplasmiques, glycosylations, phosphorylations</i>	54
II.2.2.2.	<i>Structure lipidique de la membrane cellulaire</i>	55
II.3.	GLYCOPROTÉINE P ET PHÉNOTYPE MDR CLASSIQUE	56
II.3.1.	Surexpression de la glycoprotéine P.....	56
II.3.1.1.	<i>Découverte de la glycoprotéine P</i>	56
II.3.1.2.	<i>Corrélation entre la surexpression de glycoprotéine P et le phénotype MDR classique</i>	56
II.3.1.3.	<i>Implication de la glycoprotéine dans le phénotype MDR classique</i>	60
a.	Capacité de transport de la glycoprotéine P	60
b.	Fonction ATPase de la glycoprotéine P	61
c.	Réversion du phénotype MDR par des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine P	62
II.3.2.	Amplification génique dans les cellules présentant le phénotype MDR	62
II.3.2.1.	<i>Modifications caryotypiques</i>	62
II.3.2.2.	<i>Gènes amplifiés</i>	63
II.3.3.	Conclusion	65
II.4.	IMPORTANCE DE LA GLYCOPROTÉINE P DANS LA RÉSISTANCE PLÉIOTROPIQUE	66
III.	GLYCOPROTÉINE P : BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, RELATION STRUCTURE-FONCTION ET BIOCHIMIE.....	71
III.1.	BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET STRUCTURE DE LA GLYCOPROTÉINE P	71
III.1.1.	Diversité des glycoprotéines P	71
III.1.1.1.	<i>Famille multigénique MDR</i>	71

III.1.1.2. Glycoprotéine PGY3.....	72
III.1.1.3. Glycoprotéine BSEP/SPGP	74
a. Fonction physiologique	74
b. Rôle dans la résistance pléiotropique.....	75
III.1.2. Structure de la glycoprotéine P (PGY1).....	75
III.1.2.1. Analyse de séquence du gène MDR1.....	75
III.1.2.2. Topologie de la glycoprotéine P.....	76
a. Modèle proposé à partir de l'analyse du profil d'hydrophatie de la glycoprotéine P.....	76
b. Modèles basés sur l'analyse in vitro de glycoprotéine P tronquée	79
\approx Modèle '4+4'	79
\approx Modèle '6+4'	80
\approx Autres modèles.....	81
c. Modèles basés sur l'insertion de marqueurs in vivo	81
\approx Glycoprotéines P mutantes dépourvues de cystéine	81
\approx Insertion d'épitope.....	84
d. Conclusion.....	85
III.1.3. Biosynthèse et modifications post-traductionnelles.....	91
III.1.3.1. Biosynthèse de la glycoprotéine P.....	91
III.1.3.2. Modifications post-traductionnelles.....	92
a. Glycosylation de la glycoprotéine P.....	92
b. Phosphorylation de la glycoprotéine P	93
III.2. RELATION STRUCTURE-FONCTION ET SITES DE LIAISON.....	95
III.2.1. Analyses mutationnelles de la glycoprotéine P	96
III.2.1.1. Mutations spontanées.....	96
a. Mutation GLY185-VAL185.....	96
b. Mutations GLY338-ALA338 et ALA339-PRO339.....	97
III.2.1.2. Mutations expérimentales.....	97
a. Mutation SER941-PHE941	98
b. Mutation ASN183-SER183.....	98
c. Mutations concernant les sites de liaison à l'ATP.....	99
III.2.1.3. Conclusion.....	99
III.2.2. Marquage de photoaffinité.....	101
III.2.3. Conclusion	104
III.3. BIOCHIMIE DE LA GLYCOPROTÉINE P.....	104
III.3.1. Substances reconnues par la glycoprotéine P.....	104
III.3.2. Glycoprotéine P : un transport énergie dépendant.....	109
III.3.2.1. Sites de liaisons à l'ATP et activité ATPase.....	109
III.3.2.2. Hydrolyse de l'ATP couplée avec la liaison du substrat et son transport	112
III.3.2.3. Cycle catalytique	113
III.3.3. Mécanisme d'action.....	115
III.3.3.1. Modèle faisant intervenir une modification du pH.....	116
III.3.3.2. Modèle de pompe transmembranaire	116

IV. GLYCOPROTÉINE P : RÔLE PHYSIOLOGIQUE ET IMPLICATION EN CANCÉROLOGIE CLINIQUE.....	119
IV.1. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA GLYCOPROTÉINE P	119
IV.1.1. Expression de la glycoprotéine P par les tissus sains	119
IV.1.2. Distribution tissulaire et rôles possibles de la glycoprotéine P.....	121
IV.1.2.1. <i>Tractus digestif</i>	121
IV.1.2.2. <i>Reins et foie</i>	123
IV.1.2.3. <i>Cerveau et testicules</i>	123
IV.1.2.4. <i>Placenta</i>	123
IV.1.2.5. <i>Endomètre, glandes surrénales</i>	124
IV.1.2.6. <i>Cellules hématopoïétiques et sanguines</i>	124
IV.1.2.7. <i>Autres tissus</i>	124
IV.1.3. Inactivation expérimentale des gènes <i>mdr</i> chez la souris.....	125
IV.1.4. Glycoprotéine P : un transporteur aux fonctions multiples.....	126
IV.1.4.1. <i>Barrière hémato-encéphalique</i>	126
IV.1.4.2. <i>Canal chlore</i>	127
IV.1.4.3. <i>Transport de l'ATP</i>	128
IV.1.4.4. <i>Phospholipides-translocase</i>	128
IV.1.4.5. <i>Métabolisme du cholestérol</i>	128
IV.1.4.6. <i>Autres rôles physiologiques</i>	129
a. Protection de la cellule contre l'apoptose.....	129
b. Résistance vis à vis des infections virales	129
IV.2. EXPRESSION DE LA GLYCOPROTÉINE P PAR LES TISSUS TUMORAUX ET VALEUR PRONOSTIQUE.....	130
IV.2.1. Tumeurs issues de tissus exprimant physiologiquement la glycoprotéine P	130
IV.2.1.1. <i>Carcinome hépatocellulaire</i>	130
IV.2.1.2. <i>Adénocarcinome rénal</i>	131
IV.2.1.3. <i>Tumeurs du système nerveux central</i>	132
a. Tumeurs primitives.....	133
b. Tumeurs métastatiques	135
IV.2.1.4. <i>Carcinome colique</i>	135
IV.2.2. Tumeurs dont l'expression de la glycoprotéine-P augmente après traitement	136
IV.2.2.1. <i>Tumeurs hématologiques</i>	136
a. Leucémies aiguës.....	136
² Leucémies aiguës myéloïdes	137
² Leucémies aiguës lymphoïdes	137
b. Leucémies chroniques.....	138
c. Lymphomes.....	138
d. Myélome multiple	139
IV.2.2.2. <i>Tumeurs mammaires</i>	140
IV.2.3. Conclusion	140

IV.3. RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DES GÈNES <i>MDR</i>	141
.....	
IV.3.1. Complexe d'initiation de la transcription	142
IV.3.2. Facteurs cis- et trans-régulateurs de la transcription	143
IV.3.2.1. <i>Facteurs cis-régulateurs</i>	143
IV.3.2.2. <i>Facteurs trans-régulateurs</i>	144
IV.3.3. Activation et répression de la transcription des gènes <i>mdr</i>	144
IV.3.3.1. <i>Facteurs intrinsèques</i>	145
a. Site SP1 ou boîte GC [355]	145
b. NF-R1 et NF-R2 [355].....	145
c. Boîte Y [197, 355]	146
d. Complexe AP-1 [355].....	146
e. Oncogènes et anti-oncogènes [197, 355].....	146
f. Voie de signalisation cellulaire par la cascade Ras/Raf/MAPk [355].....	147
IV.3.3.2. <i>Facteurs extrinsèques</i>	147
a. Choc thermique	148
b. Substances cancérogènes [355].....	148
c. Inflammation [355].....	148
d. Rayons UV [173, 355].....	149
e. Hormones	149
f. Agents anticancéreux	149
IV.3.4. Rôle de la chromatine	150
IV.4. MODULATION DU PHÉNOTYPE <i>MDR</i> ET POSSIBILITÉS DE TRAITEMENT	152
.....	
IV.4.1. Modulation à l'aide d'agents pharmaceutiques	154
IV.4.1.1. <i>Antagonistes calciques : vérapamil et analogues</i>	154
IV.4.1.2. <i>Ciclosporine et dérivés</i>	154
a. Ciclosporine	154
b. PSC 833	155
IV.4.1.3. <i>Inhibiteurs de protéines kinases</i>	156
IV.4.1.4. <i>Anticorps</i>	156
a. Anticorps monoclonaux	156
b. Immunotoxines	157
c. Anticorps bispécifiques	157
IV.4.1.5. <i>Conclusion</i>	158
IV.4.2. Modulation à l'aide d'oligonucléotides	159
CONCLUSION	161
GLOSSAIRE	183
TABLE DES MATIÈRES	187
BIBLIOGRAPHIE	193

Bibliographie

1. **Abraham E.H., Prat A.G., Gerweck L., Seneveratne T., Arceci R.J., Kramer R., Guidotti G. et al. (1993)**
The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel.
Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 90 (1), p. 312–316
2. **Aebi S., Kurdi-Haidar B., Gordon R., Cenni B., Zheng H., Fink D., Christen R.D., Boland C.R. et al. (1996)**
Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 56 (13), p. 3087–3090
3. **Aftab D.T., Yang J.M., Hait W.N. (1994)**
Functional role of phosphorylation of the multidrug transporter (P-glycoprotein) by protein kinase C in multidrug-resistant MCF-7 cells.
Oncol. res, Vol. 6 (2), p. 59–70
4. **Akiyama S., Fojo A., Hanover J.A., Pastan I., Gottesman M.M. (1985)**
Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs.
Somat. cell mol. genet., Vol. 11 (2), p. 117–126
5. **Allen J.D., Brinkhuis R.F., van Deemter L., Wijnholds J., Schinkel A.H. (2000)**
Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 60 (20), p. 5761–5766
6. **Allikmets R., Schriml L.M., Hutchinson A., Romano-Spica V., Dean M. (1998)**
A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 58 (23), p. 5337–5339
7. **Aloia T.A., Harpole D.H. Jr, Reed C.E., Allegra C., Moore M.B., Herndon J.E. 2nd, D'Amico T.A. (2001)**
Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer.
Ann. thorac. surg., Vol. 72 (3), p. 859–866
8. **Ambudkar S.V. (1995)**
Purification and reconstitution of functional human P-glycoprotein.
J. bioenerg. biomembranes, Vol. 27 (1), p. 23–29
9. **Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M. (1999)**
Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.
Annu. rev. pharmacol. toxicol., Vol. 39, p. 361–398
10. **Ambudkar S.V., Lelong I.H., Zhang J., Cardarelli C. (1998)**
Purification and reconstitution of human P-glycoprotein.
Methods enzymol., Vol. 292, p. 492–504
11. **Ambudkar S.V., Lelong I.H., Zhang J., Cardarelli C.O., Gottesman M.M., Pastan I. (1992)**
Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump : characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis.
Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 89 (18), p. 8472–8476
12. **Arceci R.J. (1993)**
Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies.
Blood, Vol. 81 (9), p. 2215–2222
13. **Arceci R.J., Croop J.M., Horwitz S.B., Housman D. (1988)**
The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus.
Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 85 (12), p. 4350–4354
14. **Azzaria M., Schurr E., Gros P. (1989)**
Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the mdr1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance.
Mol. cell. biol., Vol. 9 (12), p. 5289–5297
15. **Baggetto L.G. (1997)**
Biochemical, genetic and metabolic adaptations of tumor cells that express the typical MDR phenotype. Reversion by new therapies.
J. Bioenerg. Biomemb., Vol. 29 (4), p. 401–413

16. **Baggetto L.G. (1997)**
Non P-glycoprotein novel proteins involved in human cancer multidrug resistance.
Bull. cancer (Paris), Vol. 84 (4), p. 385–390
17. **Baggetto L.G., Testa-Parussini R. (1990)**
Role of acetoin on the regulation of intermediate metabolism of Ehrlich ascites tumor mitochondria: its contribution to membrane cholesterol enrichment modifying passive proton permeability.
Arch. biochem. biophys., Vol. 283 (2), p. 241–248
18. **Bailly J.-D. (1995)**
Implication de la P-glycoprotéine dans la résistance aux agents antitumoraux des cellules myéloïdes leucémiques. Tentative de réversion du phénotype MDR.
Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 108 pages
19. **Bailly J.-D., Laurent G., Delverdier M. (1995)**
La P-glycoprotéine : rôle physiologique et implication en cancérologie.
Rev. Méd. Vét., Vol. 146 (11), p. 723–730
20. **Baldini N., Scotlandi K., Barbanti-Brodano G., Manara M.C., Maurici D., Bacci G., Bertoni F. et al (1995)**
Expression of P-glycoprotein in high grade osteosarcomas in relation to clinical outcome.
N. Engl. j. med., Vol. 333, p. 1380–1385
21. **Baskin F., Rosenberg R.N., Dev V. (1981)**
Correlation of double-minute chromosomes with unstable multidrug cross-resistance in uptake mutants of neuroblastoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 78 (6), p. 3654–3658
22. **Bech-Hansen N.T., Till J.E., Ling V. (1976)**
Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity.
J. cell. physiol., Vol. 88 (1), p. 23–31
23. **Beck W.T., Grogan T.M., Willman C.L., Cordon-Cardo C., Parham D.M., Kuttesch J.F. et al. (1996)**
Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 56 (13), p. 3010–3020
24. **Beck W.T., Mueller T.J., Tanzer L.R. (1979)**
Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 39 (6 Pt 1), p. 2070–2076
25. **Béjà O., Bibi E. (1995)**
Multidrug resistance protein (Mdr)-alkaline phosphatase hybrids in Escherichia coli suggest a major revision in the topology of the C-terminal half of Mdr.
J. biol. chem., Vol. 270 (21), p. 12351–12354
26. **Bellamy W.T., Peng Y.M., Odeleye A., Ellsworth L., Xu M.J., Grogan T.M., Weinstein R.S. (1995)**
Cardiotoxicity in the SCID mouse following administration of doxorubicin and cyclosporin A.
Anti-cancer drugs, Vol. 6 (6), p. 736–743
27. **Bénard J., Rixe O. (1996)**
Résistance aux drogues anticancéreuses.
Presse Méd. (Paris), Vol. 25 (35), p. 1724–1730
28. **Bergman P.J., Ogilvie G.K., Powers B.E. (1996)**
Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma.
J. vet. intern. med., Vol. 10 (6), p. 354–359
29. **Bhalla K. (1985)**
Isolation and characterization of an anthracycline-resistant human leukemic cell line.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 45 (8), p. 3657–3662
30. **Bibi E., Béjà O. (1994)**
Membrane topology of multidrug resistance protein expressed in Escherichia coli. N-terminal domain.
J. biol. chem., Vol. 269 (31), p. 19910–19915
31. **Biedler J., Riehm H. (1970)**
Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro : Cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies.
Cancer Res. (Baltimore), Vol. 30, p. 1174–1184
32. **Biedler J.L. (1992)**
Genetic aspects of multidrug resistance.
Cancer, Vol. 70 (6 sup), p. 1799–1809

33. **Boldogh I., Ramana C.V., Chen Z., Biswas T., Hazra T.K., Grosch S., Grombacher T., Mitra S. et al. (1998)**
Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 58 (17), p. 3950–3956
34. **Borg A.G., Burgess R., Green L.M., Scheper R.J., Liu Yin J.A. (2000)**
P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein, but not lung resistance protein, lower the intracellular daunorubicin accumulation in acute myeloid leukaemic cells.
Br. j. haematol., Vol. 108 (1), p. 48–54
35. **Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (1999)**
The multidrug resistance protein family.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1461 (2), p. 347–357
36. **Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (2000)**
A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 92 (16), p. 1295–1302
37. **Borst P., Schinkel A.H. (1996)**
What have we learnt thus far from mice with disrupted P-glycoprotein genes?
Eur. j. cancer (1990), Vol. 32A (6), p. 985–990
38. **Bosch I., Croop J.M. (1998)**
P-glycoprotein structure and evolutionary homologies.
Cytotechnology (Dordr.), Vol. 27, p. 1–30
39. **Bradley G., Georges E., Ling V. (1990)**
Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in Chinese hamster.
J. cell. physiol., Vol. 145 (3), p. 398–408
40. **Breuninger L.M., Paul S., Gaughan K., Miki T., Chan A., Aaronson S.A., Kruh G.D. (1995)**
Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 55 (22), p. 5342–5347
41. **Brown J.M., Giaccia A.J. (1998)**
The unique physiology of solid tumors - opportunities (and problems) for cancer therapy.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 58 (7), p. 1408–1416
42. **Bruggemann E.P., Currier S.J., Gottesman M.M., Pastan I. (1992)**
Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein.
J. biol. chem., Vol. 267 (29), p. 21020–21026
43. **Busche R., Tummler B., Riordan J.R., Cano-Gauci D.F. (1989)**
Preparation and utility of a radioiodinated analogue of daunomycin in the study of multidrug resistance.
Mol. pharmacol., Vol. 35 (4), p. 414–421
44. **Buschman E., Arceci R.J., Croop J.M., Che M., Arias I.M., Housman D.E., Gros P. (1992)**
mdr2 encodes P-glycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoform-specific antibodies.
J. biol. chem., Vol. 267 (25), p. 18093–18099
45. **Buschman E., Gros P. (1991)**
Functional analysis of chimeric genes obtained by exchanging homologous domains of the mouse mdr1 and mdr2 genes.
Mol. cell. biol., Vol. 11 (2), p. 595–603
46. **Callen D.F., Baker E., Simmers R.N., Seshadri R., Roninson I.B. (1987)**
Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1.
Hum. genet., Vol. 77 (2), p. 142–144
47. **Carlsen S.A., Till J.E., Ling V. (1976)**
Modulation of membrane drug permeability in Chinese hamster ovary cells.
Biochim. biophys. acta, Vol. 455 (3), p. 900–912
48. **Carlsen S.V., Till J.E., Ling V. (1977)**
Modulation of drug permeability in Chinese hamster ovary cells. Possible role for phosphorylation of surface glycoproteins.
Biochim. biophys. acta, Vol. 467 (2), p. 238–250
49. **Center M.S. (1983)**
Evidence that adriamycin resistance in Chinese hamster lung cells is regulated by phosphorylation of a plasma membrane glycoprotein.
Biochem. biophys. res. commun., Vol. 115 (1), p. 159–166

50. **Chambers T.C., Germann U.A., Gottesman M.M., Pastan I., Kuo J.F., Ambudkar S.V. (1995)**
Bacterial expression of the linker region of human MDR1 P-glycoprotein and mutational analysis of phosphorylation sites.
Biochemistry (Easton), Vol. 34 (43), p. 14156–14162
51. **Chambers T.C., McAvoy E.M., Jacobs J.W., Eilon G. (1990)**
Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells.
J. biol. chem., Vol. 265 (13), p. 7679–7686
52. **Chambers T.C., Pohl J., Glass D.B., Kuo J.F. (1994)**
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. (Lond., 1984), Vol. 299 (Part. 1), p. 309–315
53. **Chambers T.C., Pohl J., Raynor R.L., Kuo J.F. (1993)**
Identification of specific sites in human P-glycoprotein phosphorylated by protein kinase C.
J. biol. chem., Vol. 268 (7), p. 4592–4595
54. **Chambers T.C., Zheng B., Kuo J.F. (1992)**
Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells.
Mol. pharmacol., Vol. 41 (6), p. 1008–1015
55. **Chan K.S.L., Thorne P.S., Haddad G., Ling V. (1990)**
Immunohistochemical detection of P-glycoprotein : prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood.
J. clin. oncol., Vol. 8 (4), p. 689–704
56. **Charcosset J.Y., Saucier J.M., Jacquemin-Sablon A. (1988)**
Reduced DNA topoisomerase II activity and drug-stimulated DNA cleavage in 9-hydroxyellipticine resistant cells.
Biochem. pharmacol., Vol. 37 (11), p. 2145–2149
57. **Charuk M.H., Grey A.A., Reithmeier R.A. (1998)**
Identification of the synthetic surfactant nonylphenol ethoxylate: a P-glycoprotein substrate in human urine.
Am. j. physiol., Vol. 274 (6 Pt 2), p. F1127–F1139
58. **Chaudhary P.M., Roninson I.B. (1991)**
Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells.
Cell (Cambridge), Vol. 66 (1), p. 85–94
59. **Chaudhary P.M., Roninson I.B. (1992)**
Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists.
Oncol. res., Vol. 4 (7), p. 281–290
60. **Chaudhary P.M., Roninson I.B. (1993)**
Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 85 (8), p. 632–639
61. **Chauffert B., Correia M., Sergent C. (1999)**
Actualités sur les mécanismes de la chimiorésistance.
Bull. cancer (Paris), Vol. 86 (1), p. 97–103
62. **Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B. (1986)**
Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells.
Cell (Cambridge), Vol. 47 (3), p. 381–389
63. **Chen C.J., Clark D., Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B. (1990)**
Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins.
J. biol. chem., Vol. 265 (1), p. 506–514
64. **Chen Z.S., Lee K., Walther S., Raftogianis R.B., Kuwano M., Zeng H., Kruh G.D. (2002)**
Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 62 (11), p. 3144–3150
65. **Childs S., Yeh R.L., Georges E., Ling V. (1995)**
Identification of a sister gene to P-glycoprotein.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 55 (10), p. 2029–2034
66. **Childs S., Yeh R.L., Hui D., Ling V. (1998)**
Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 58 (18), p. 4160–4167

67. **Chin K.V., Tanaka S., Darlington G., Pastan I., Gottesman M.M. (1990)**
Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells.
J. biol. chem., Vol. 265 (1), p. 221–226
68. **Choi K., Frommel T.O., Stern R.K., Perez C.F., Kriegler M., Tsuruo T., Roninson I.B. (1991)**
Multidrug resistance after retroviral transfer of the human MDR1 gene correlates with P-glycoprotein density in the plasma membrane and is not affected by cytotoxic selection.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 88 (16), p. 7386–7390
69. **Choi K.H., Chen C.J., Kriegler M., Roninson I.B. (1988)**
An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene.
Cell (Cambridge), Vol. 53 (4), p. 519–529
70. **Cianfriglia M., Willingham M.C., Tombesi M., Scagliotti G.V., Frasca G., Chersi A. (1994)**
P-glycoprotein epitope mapping. I. Identification of a linear human-specific epitope in the fourth loop of the P-glycoprotein extracellular domain by MM4.17 murine monoclonal antibody to human multi-drug-resistant cells.
Int. j. cancer, Vol. 56 (1), p. 153–160
71. **Cole S.P.C., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.H., Grant C.E. (1992)**
Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.
Science (Wash. D.C.), Vol. 258 (5088), p. 1650–1654
72. **Conrad S., Viertelhaus A., Orzechowski A., Hoogstraate J., Gjellan K., Schrenk D., Kauffmann H.M. (2001)**
Sequencing and tissue distribution of the canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1.
Toxicology (Amst.), Vol. 156 (2-3), p. 81–91
73. **Consoli U., Santonocito A., Stagno F., Fiumara P., Privitera A., Parisi G., Giustolisi G.M. et al. (2002)**
Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia.
Br. j. haematol., Vol. 116 (4), p. 774–780
74. **Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., Casals D., Bertino J.R., Melamed M.R. (1990)**
Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues.
J. histochem. cytochem., Vol. 38 (9), p. 1277–1287
75. **Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J.L., Melamed M.R., Bertino J.R. (1989)**
Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 86 (2), p. 695–698
76. **Cornwell M.M., Gottesman M.M., Pastan I.H. (1986)**
Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells.
J. biol. chem., Vol. 261 (17), p. 7921–7928
77. **Cornwell M.M., Pastan I., Gottesman M.M. (1987)**
Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein.
J. biol. chem., Vol. 262 (5), p. 2166–2170
78. **Cornwell M.M., Safa A.R., Felsted R.L., Gottesman M.M., Pastan I. (1986)**
Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150- to 170-kDa protein detected by photoaffinity labeling.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 83 (11), p. 3847–3850
79. **Cornwell M.M., Tsuruo T., Gottesman M.M., Pastan I. (1987)**
ATP-binding properties of P glycoprotein from multidrug-resistant KB cells.
FASEB j., Vol. 1 (1), p. 51–54
80. **Cox D.S., Scott K.R., Gao H., Raje S., Eddington N.D. (2001)**
Influence of multidrug resistance (MDR) proteins at the blood-brain barrier on the transport and brain distribution of enaminone anticonvulsants.
J. pharm. sci., Vol. 90 (10), p. 1540–1552
81. **Croop J.M., Guild B.C., Gros P., Housman D.E. (1987)**
Genetics of multidrug resistance: relationship of a cloned gene to the complete multidrug resistant phenotype.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 47 (22), p. 5982–5988
82. **Croop J.M., Raymond M., Haber D., Devault A., Arceci R.J., Gros P., Housman D.E. (1989)**
The three mouse multidrug resistance (*mdr*) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues.
Mol. cell. biol., Vol. 9 (3), p. 1346–1350
83. **Currier S.J., Kane S.E., Willingham M.C., Cardarelli C.O., Pastan I., Gottesman M.M. (1992)**
Identification of residues in the first cytoplasmic loop of P-glycoprotein involved in the function of chimeric human MDR1-MDR2 transporters.
J. biol. chem., Vol. 267 (35), p. 25153–25159

84. Dalton W.S., Grogan T.M., Meltzer P.S., Scheper R.J., Durie B.G.M., Taylor C.W., Miller T.P. et al. (1989) Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J. clin. oncol.*, Vol. 7 (4), p. 415–424
85. Damiani D., Michelutti A., Michieli M., Masolini P., Stocchi R., Geromin A., Ermacora A. et al. (2002) P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br. j. haematol.*, Vol. 116 (3), p. 519–527
86. Damiani D., Michieli M., Ermacora A., Candoni A., Raspadori D., Geromin A., Stocchi R. et al. (1998) P-glycoprotein (PGP), and not lung resistance-related protein (LRP), is a negative prognostic factor in secondary leukemias. *Haematologica (Roma)*, Vol. 83 (4), p. 290–297
87. Danø K. (1972) Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor in vivo. *Cancer chemother. rep., Part 1*, Vol. 56 (6), p. 701–708
88. Danø K. (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. biophys. acta*, Vol. 323 (3), p. 466–483
89. de Bruijn M.H., Van der Bliek A.M., Biedler J.L., Borst P. (1986) Differential amplification and disproportionate expression of five genes in three multidrug-resistant Chinese hamster lung cell lines. *Mol. cell. biol.*, Vol. 6 (12), p. 4717–4722
90. de Graaf D., Sharma R.C., Mechetner E.B., Schimke R.T., Roninson I.B. (1996) P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 93 (3), p. 1238–1242
91. de Vree J.M., Jacquemin E., Sturm E., Cresteil D., Bosma P.J., Aten J., Deleuze J.F. et al. (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 95 (1), p. 282–287
92. Debenham P.G., Kartner N., Siminovitch L., Riordan J.R., Ling V. (1982) DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol. cell. biol.*, Vol. 2 (8), p. 881–889
93. Debry P., Nash E.A., Neklason D.W., Metherall J.E. (1997) Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification. *J. Biol. Chem.*, Vol. 272 (2), p. 1026–1031
94. Delph Y. (2002) P-glycoprotein and HIV. *GMHC Treat. Issues*, Vol. 16 (1), p. 6–10
95. Demeule M. et al. (1998) Identification of the cyclosporin binding site in Pgp. *Biochemistry (Mosc.)*, Vol. 37 (51), p. 18110–18118
96. Demeule M., Shedid D., Beaulieu E., Del Maestro R.F., Moghrabi A., Ghosn P.B., Moumdjian R. et al. (2001) Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors. *Int. j. cancer*, Vol. 93 (1), p. 62–66
97. Devault A., Gros P. (1990) Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. cell. biol.*, Vol. 10 (4), p. 1652–1663
98. Devine S.E., Hussain A., Davide J.P., Melera P.W. (1991) Full length and alternatively spliced *pgp1* transcripts in multidrug-resistant Chinese hamster lung cells. *J. Biol. Chem.*, Vol. 266 (7), p. 4545–4555
99. Devine S.E., Ling V., Melera P.W. (1992) Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 89 (10), p. 4564–4568
100. Dey S., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M., Ambudkar S.V. (1997) Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 94 (20), p. 10594–10599
101. Dietel M., Arps H., Lage H., Niendorf A. (1990) Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer res. (Baltimore)*, Vol. 50 (18), p. 6100–6106

102. Diociaiuti M., Molinari A., Ruspantini I., Gaudio M.C., Ippoliti R., Lendaro E., Bordi F., Chistolini P., Arancia G. (2002)
P-glycoprotein inserted in planar lipid bilayers formed by liposomes opened on amorphous carbon and Langmuir-Blodgett monolayer.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1559 (1), p. 21–31
103. Dong M., Ladaviere L., Penin F., Deleage G., Baggetto L.G. (1998)
Secondary structure of P-glycoprotein investigated by circular dichroism and amino acid sequence analysis.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1371 (2), p. 317–334
104. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D. (1998)
A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 95 (26), p. 15665–15670
105. Dudeja P.K., Anderson K.M., Harris J.S., Buckingham L., Coon J.S. (1995)
Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity.
Arch. biochem. biophys., Vol. 319 (1), p. 309–315
106. Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M., Wall R. (1984)
Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot.
J. Mol. Biol., Vol. 179 (1), p. 125–142
107. el Rouby S., Thomas A., Costin D., Rosenberg C.R., Potmesil M., Silber R., Newcomb E.W. (1993)
p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression.
Blood, Vol. 82 (11), p. 3452–3459
108. Elferink R.P., Tytgat G.N., Groen A.K. (1997)
Hepatic canalicular membrane 1: The role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport.
FASEB j., Vol. 11 (1), p. 19–28
109. Endicott J.A., Juranka P.F., Sarangi F., Gerlach J.H., Deuchars K.L., Ling V. (1987)
Simultaneous expression of two P-glycoprotein genes in drug-sensitive Chinese hamster ovary cells.
Mol. cell. biol., Vol. 7 (11), p. 4075–4081
110. Endicott J.A., Ling V. (1989)
The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance.
Ann. rev. biochem., Vol. 58, p. 137–171
111. Evans G.L., Ni B., Hrycyna C.A., Chen D., Ambudkar S.V., Pastan I., Germann U.A., Gottesman M.M. (1995)
Heterologous expression systems for P-glycoprotein: E. coli, yeast, and baculovirus.
J. bioenerg. biomembranes, Vol. 27 (1), p. 43–52
112. Eytan G.D., Regev R., Oren G., Assaraf Y.G. (1996)
The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation.
J. biol. chem., Vol. 271 (22), p. 12897–12902
113. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F. (1971)
Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.
Biochemistry (Easton), Vol. 10 (13), p. 2606–2617
114. Faneyte I.F., Kristel P.M., van de Vijver M.J. (2001)
Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer.
Int. j. cancer, Vol. 93 (1), p. 114–122
115. Figler R.A., Omote H., Nakamoto R.K., Al-Shawi M.K. (2000)
Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein.
Arch. biochem. biophys., Vol. 376 (1), p. 34–46
116. Fine R.L., Jett M., Patel J., Carmichael J., Ahn C.H. (1989)
Phosphoprotein, protein kinase C, and second-messenger system changes in human multidrug-resistant cancer cells.
Cancer treat. res., Vol. 48 (1), p. 107–123
117. FitzGerald D.J., Willingham M.C., Cardarelli C.O., Hamada H., Tsuruo T., Gottesman M.M., Pastan I. (1987)
A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 84 (12), p. 4288–4292
118. Flens M.J., Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Fritz J.M., Meijer C.J., Scheper R.J., Zaman G.J. (1994)
Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 54 (17), p. 4557–4563

119. **Fojo A. (1985)**
Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 45 (7), p. 3002–3007
120. **Fojo A., Lebo R., Shimizu N., Chin J.E., Roninson I.B., Merlino G.T., Gottesman M.M., Pastan I. (1986)**
Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7.
Somat. cell mol. genet., Vol. 12 (4), p. 415–420
121. **Fojo A.T., Ueda K., Slamon D.J., Ppoplack D.D., Gottesman M.M., Pastan I. (1987)**
Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 84, p. 265–269
122. **Fojo A.T., Whang-Peng J., Gottesman M.M., Pastan I. (1985)**
Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 82 (22), p. 7661–7665
123. **Ford J.M. (1996)**
Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers.
Eur. j. cancer (1990), Vol. 32A (6), p. 991–1001
124. **Foxwell B.M., Mackie A., Ling V., Ryffel B. (1989)**
Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein.
Mol. pharmacol., Vol. 36 (4), p. 543–546
125. **Frezard F., Pereira-Maia E., Quidu P., Priebe W., Garnier-Suillerot A. (2001)**
P-Glycoprotein preferentially effluxes anthracyclines containing free basic versus charged amine.
Eur. j. biochem., Vol. 268 (6), p. 1561–1567
126. **Fujiwara T., Grimm E.A., Mukhopadhyay T., Zhang W.W., Owen-Schaub L.B., Roth J.A. (1994)**
Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 54 (9), p. 2287–2291
127. **Garman D., Center M.S. (1982)**
Alterations in cell surface membranes in Chinese hamster lung cell resistant to adriamycin.
Biochem. biophys. res. commun., Vol. 105 (1), p. 157–163
128. **Georges E., Bradley G., Garipey J., Ling V. (1990)**
Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 87 (1), p. 152–6
129. **Georges E., Tsuruo T., Ling V. (1993)**
Topology of P-glycoprotein as determined by epitope mapping of MRK-16 monoclonal antibody.
J. biol. chem., Vol. 268 (3), p. 1792–1798
130. **Gerlach J.H., Endicott J.A., Juranka P.F., Henderson G., Sarangi F., Deuchars K.L., Ling V. (1986)**
Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance.
Nature (Lond.), Vol. 324 (6096), p. 485–489
131. **Gerlach J.H., Kartner N., Bell D.R., Ling V. (1986)**
Multidrug resistance.
Cancer surv., Vol. 5 (1), p. 25–46
132. **Gerloff T., Stieger B., Hagenbuch B., Madon J., Landmann L., Roth J., Hofmann A.F., Meier P.J. (1998)**
The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver.
J. biol. chem., Vol. 273 (16), p. 10046–10050
133. **Germann U.A. (1996)**
P-glycoprotein - A Mediator of Multidrug Resistance in Tumour Cells.
Eur. j. cancer (1990), Vol. 32A (6), p. 927–944
134. **Germann U.A., Chambers T.C. (1998)**
Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein.
Cytotechnology (Dordr.), Vol. 27, p. 31–60
135. **Germann U.A., Chambers T.C., Ambudkar S.V., Licht T., Cardarelli C.O., Pastan I., Gottesman M.M. (1996)**
Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells.
J. biol. chem., Vol. 271 (3), p. 1708–1716
136. **Gerolami A. (1996)**
Sécrétion biliaire.
Hépatogastro, Vol. 3 (2), p. 139–147

137. **Gervasoni J.E. Jr, Fields S.Z., Krishna S., Baker M.A., Rosado M., Thuraiamy K. et al. (1991)**
Subcellular distribution of daunorubicin in P-glycoprotein-positive and -negative drug-resistant cell lines using laser-assisted confocal microscopy.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 51 (18), p. 4955–4963
138. **Giles F.J., Kantarjian H.M., Cortes J., Thomas D.A., Talpaz M., Manshouri T., Albitar M. (1999)**
Multidrug resistance protein expression in chronic myeloid leukemia: associations and significance.
Cancer, Vol. 86 (5), p. 805–813
139. **Gill D.R., Hyde S.C., Higgins C.F., Valverde M.A., Mintenig G.M., Sepulveda F.V. (1992)**
Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein.
Cell (Cambridge), Vol. 71 (1), p. 23–32
140. **Ginn P.E. (1996)**
Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues.
Vet. Pathol., Vol. 33 (5), p. 533–541
141. **Goldstein L.J. et al. (1989)**
Expression of a Multidrug Resistance Gene in Human Cancers.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 81 (2), p. 116–124
142. **Gottesman M.M., Pastan I. (1988)**
The multidrug transporter, a double-edged sword.
J. biol. chem., Vol. 263 (25), p. 12163–12166
143. **Gottesman M.M., Pastan I. (1993)**
Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.
Ann. rev. biochem., Vol. 62, p. 385–427
144. **Grant C.E., Valdimarsson G., Hipfner D.R., Almquist K.C., Cole S.P., Deeley R.G. (1994)**
Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 54 (2), p. 357–361
145. **Greenberger L.M. (1993)**
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., Vol. 268 (15), p. 11417–11425
146. **Greenberger L.M., Lisanti C.J., Silva J.T., Horwitz S.B. (1991)**
Domain mapping of the photoaffinity drug-binding sites in P-glycoprotein encoded by mouse mdr1b.
J. biol. chem., Vol. 266 (31), p. 20744–20751
147. **Greiner B., Eichelbaum M., Fritz P., Kreichgauer H.P., von Richter O., Zundler J., Kroemer H.K. (1999)**
The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin.
J. din. invest., Vol. 104 (2), p. 147–153
148. **Gros P., Ben Neriah Y.B., Croop J.M., Housman D.E. (1986)**
Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance.
Nature (Lond.), Vol. 323 (6090), p. 728–731
149. **Gros P., Croop J., Housman D. (1986)**
Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins.
Cell (Cambridge), Vol. 47 (3), p. 371–380
150. **Gros P., Croop J., Roninson I., Varshavsky A., Housman D.E. (1986)**
Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 83 (2), p. 337–341
151. **Gros P., Dhir R., Croop J., Talbot F. (1991)**
A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse mdr1 and mdr3 drug efflux pumps.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 88 (16), p. 7289–7293
152. **Gros P., Fallows D.A., Croop J.M., Housman D.E. (1986)**
Chromosome-mediated gene transfer of multidrug resistance.
Mol. cell. biol., Vol. 6 (11), p. 3785–3790
153. **Gros P., Raymond M., Bell J., Housman D. (1988)**
Cloning and characterization of a second member of the mouse mdr gene family.
Mol. cell. biol., Vol. 8 (7), p. 2770–2778

154. **Grund S.H., Patil S.R., Shah H.O., Pauw P.G., Stadler J.K. (1983)**
Correlation of unstable multidrug cross resistance in Chinese hamster ovary cells with a homogeneously staining region on chromosome 1.
Mol. cell. biol., Vol. 3 (9), p. 1634–1647
155. **Guild B.C., Mulligan R.C., Gros P., Housman D.E. (1988)**
Retroviral transfer of a murine cDNA for multidrug resistance confers pleiotropic drug resistance to cells without prior drug selection.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 85 (5), p. 1595–1599
156. **Hamada H., Hagiwara K., Nakajima T., Tsuruo T. (1987)**
Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: effects of verapamil, trifluoperazine, and phorbol esters.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 47 (11), p. 2860–2865
157. **Hamada H., Tsuruo T. (1986)**
Functional role for the 170-180 kD glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 83 (20), p. 7785–7789
158. **Hamada H., Tsuruo T. (1988)**
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., Vol. 263 (3), p. 1454–1458
159. **Hamada H., Tsuruo T. (1988)**
Characterization of the ATPase activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 48 (17), p. 4926–4932
160. **He Y., Zhang J., Zhang J., Yuan Y. (2000)**
The role of c-myc in regulating mdr1 gene expression in tumor cell line KB. [Résumé]
Chin. med. j., Vol. 113 (9), p. 848–851
161. **Heck M.M., Earnshaw W.C. (1986)**
Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation.
J. cell biol., Vol. 103 (6 Pt 2), p. 2569–2581
162. **Herzog C.E., Tsokos M., Bates S.E., Fojo A.T. (1993)**
Increased mdr-1/P-glycoprotein expression after treatment of human colon carcinoma cells with P-glycoprotein antagonists.
J. biol. chem., Vol. 268 (4), p. 2946–2952
163. **Higgins C.F., Gottesman M.M. (1992)**
Is the multidrug transporter a flippase?
Trends biochem. sci. (Regular. ed.), Vol. 17 (1), p. 18–21
164. **Hirose M., Kuroda Y. (1998)**
p53 may mediate the mdr-1 expression via the WT1 gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines.
Cancer lett., Vol. 129 (2), p. 165–171
165. **Homolya L., Hollo Z., Germann U.A., Pastan I., Gottesman M.M., Sarkadi B. (1993)**
Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein.
J. biol. chem., Vol. 268 (29), p. 21493–21496
166. **Hooiveld G.J., van Montfoort J.E., Meijer D.K., Muller M. (2001)**
Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport.
Eur. j. pharm. sci., Vol. 12 (4), p. 525–543
167. **Hopper E., Belinsky M.G., Zeng H., Tosolini A., Testa J.R., Kruh G.D. (2001)**
Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily.
Cancer lett., Vol. 162 (2), p. 181–191
168. **Horio M., Chin K.V., Currier S.J., Goldenberg S., Williams C., Pastan I., Gottesman M.M., Handler J. (1989)**
Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby canine kidney cell epithelia.
J. biol. chem., Vol. 264 (25), p. 14880–14884
169. **Horio M., Gottesman M.M., Pastan I. (1988)**
ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 85 (10), p. 3580–3584
170. **Hrycyna C.A., Airan L.E., Germann U.A., Ambudkar S.V., Pastan I., Gottesman M.M. (1998)**
Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport.
Biochemistry (Easton), Vol. 37 (39), p. 13660–13673

171. Hrycyna C.A., Ramachandra M., Ambudkar S.V., Ko Y.H., Pedersen P.L., Pastan I., Gottesman M.M. (1998)
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., Vol. 273 (27), p. 16631–16634
172. Hsu S.I., Lothstein L., Horwitz S.B. (1989)
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., Vol. 264 (20), p. 12053–12062
173. Hu Z., Jin S., Scotto K.W. (2000)
Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1.
J. Biol. Chem., Vol. 275 (4), p. 2979–2985
174. Huang C., Wu M., Xu G., Li D., Cheng H., Tu Z. et al. (1992)
Overexpression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in human hepatocellular carcinoma.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 84 (4), p. 262–264
175. Hugnet C., Cadore J.-L., Buronfosse F., Pineau X., Mathet T., Berny P.J. (1996)
Loperamide poisoning in the dog.
Vet. Hum. Toxicol., Vol. 38 (1), p. 31–33
176. Idriss H.T., Hannun Y.A., Boulpaep E., Basavappa S. (2000)
Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say!
J. Physiol. (Lond., Print), Vol. 524 (Part. 3), p. 629–636
177. Inaba M., Kobayashi H., Sakurai Y., Johnson R.K. (1979)
Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 39 (6 Pt 1), p. 2200–2203
178. Isenberg B., Thole H., Tummler B., Demmer A. (2001)
Identification and localization of three photobinding sites of iodoarylazidoprazosin in hamster P-glycoprotein.
Eur. j. biochem., Vol. 268 (9), p. 2629–2634
179. Ishikawa T. (1992)
The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump.
Trends biochem. sci. (Regular. ed.), Vol. 17 (11), p. 463–468
180. Ishikawa T., Akimaru K., Nakanishi M., Tomokiyo K., Furuta K., Suzuki M., Noyori R. (1998)
Anti-cancer-prostaglandin-induced cell-cycle arrest and its modulation by an inhibitor of the ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump (GS-X pump).
Biochem. j. (Lond., 1984), Vol. 336 (47), p. 569–576
181. Ishikawa T., Bao J.J., Yamane Y., Akimaru K., Frindrich K., Wright C.D., Kuo M.T. (1996)
Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells.
J. Biol. Chem., Vol. 271 (25), p. 14981–14988
182. Issandou M., Grand-Perret T. (2000)
Multidrug resistance P-glycoprotein is not involved in cholesterol esterification.
Biochem. biophys. res. commun., Vol. 279 (2), p. 369–377
183. Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J., Schroeijers A.B., van der Valk P., Scheper R.J. (1996)
Major vault protein LRP-related multidrug resistance.
Eur. j. cancer (1990), Vol. 32A (6), p. 979–984
184. Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J., Shoemaker R.H., Rome L.H., Scheper R.J. (1996)
Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs.
Cytotechnology (Dordr.), Vol. 19 (3), p. 191–197
185. Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Schroeijer A.B., de Jong M.C., Scheper R.J. (1998)
Vault-related resistance to anticancer drugs determined by the expression of the major vault protein LRP.
Cytotechnology (Dordr.), Vol. 27, p. 137–148
186. Izquierdo M.A., van der Zee A.G., Vermorken J.B., van der Valk P., Belien J.A., Giaccone G., Scheffer G.L., Flens M.J., Pinedo H.M., Kenemans P., et al (1995)
Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 87 (16), p. 1230–1237
187. Jansen P.L., Strautnieks S.S., Jacquemin E., Hadchouel M., Sokal E.M., Hooiveld G.J. (1999)
Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis.
Gastroenterology (N. Y. N. Y., 1943), Vol. 117 (6), p. 1370–1379

188. Jedlitschky G., Leier I., Buchholz U., Center M., Keppler D. (1994)
ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 54 (18), p. 4833–4836
189. Jedlitschky G., Leier I., Buchholz U., Hummel-Eisenbeiss J., Burchell B., Keppler D. (1997)
ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2.
Biochem. j. (Lond., 1984), Vol. 327 (Part 1), p. 305–310
190. Jin S., Scotto K.W. (1998)
Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF- κ B.
Mol. cell. biol., Vol. 18 (7), p. 4377–4384
191. Johnstone R.W., Cretney E., Smyth M.J. (1999)
P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death.
Blood, Vol. 93 (3), p. 1075–1085
192. Johnstone R.W., Tainton K.M., Ruefli A.A., Froelich C.J., Cerruti L., Jane S.M., Smyth M.J. (2001)
P-glycoprotein does not protect cells against cytolysis induced by pore-forming proteins.
J. Biol. Chem., Vol. 276 (20), p. 16667–16673
193. Jones P.M., George A.M. (2000)
Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters what goes around comes around.
Eur. j. biochem., Vol. 267 (17), p. 5298–5305
194. Juliano R.L., Ling V. (1976)
A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.
Biochim. biophys. acta, Vol. 455, p. 152–162
195. Kaczorowski S., Ochocka M., Kaczorowska M., Aleksandrowicz R., Matysiak M., Karwacki M. (1995)
Is P-glycoprotein a sufficient marker for multidrug resistance in vivo? Immunohistochemical staining for P-glycoprotein in children and adult leukemia: correlation with clinical outcome.
Leuk. lymphoma, Vol. 20 (1), p. 143–152
196. Kane S.E., Gottesman M.M. (1989)
Multidrug resistance in the laboratory and clinic.
Cancer Cells, Vol. 1 (1), p. 33–36
197. Kantharidis P., El-Osta S., Silva M., Lee G., Hu X.F., Zalberg J. (2000)
Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts.
Drug Resist. Updat., Vol. 3 (2), p. 99–108
198. Kao H., Huang J., Chang M. (2002)
cDNA cloning and genomic organization of the murine MRP7, a new ATP-binding cassette transporter.
Gene (Amst.), Vol. 286 (2), p. 299–306
199. Kartner N., Evernden-Porelle D., Bardley G., Ling V. (1985)
Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies.
Nature (Lond.), Vol. 316 (6031), p. 820–823
200. Kartner N., Riordan J.R., Ling V. (1983)
Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines.
Science (Wash. D.C.), Vol. 221 (4617), p. 1285–1288
201. Kartner N., Shales M., Riordan J.R., Ling V. (1983)
Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 43 (9), p. 4413–4419
202. Kast C., Canfield V., Levenson R., Gros P. (1995) (r153-34-N-4402r) Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3.
203. Kast C., Canfield V., Levenson R., Gros P. (1996)
Transmembrane organization of mouse P-glycoprotein determined by epitope insertion and immunofluorescence.
J. Biol. Chem., Vol. 271 (16), p. 9240–9248
204. Kato A., Miyazaki M., Ambiru S., Yoshitomi H., Ito H., Nakagawa K., Shimizu H., Yokosuka O. et al. (2001)
Multidrug resistance gene (MDR-1) expression as a useful prognostic factor in patients with human hepatocellular carcinoma after surgical resection.
J. surg. oncol., Vol. 78 (2), p. 110–115
205. Kaufmann S.H., Karp J.E., Jones R.J., Miller C.B., Schneider E., Zwelling L.A., Cowan K. et al. (1994)
Topoisomerase II levels and drug sensitivity in adult acute myelogenous leukemia.
Blood, Vol. 83 (2), p. 517–530

206. **Kessel D., Bosmann H.B. (1970)**
On the characteristics of actinomycin D resistance in L5178Y cells.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 30 (11), p. 2695–2701
207. **Kessel D., Botterill V., Wodinsky I. (1968)**
Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 28 (5), p. 938–941
208. **Kessel D., Wilberding C. (1985)**
Anthracycline resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonists.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 45 (4), p. 1687–1691
209. **Kim R.B., Fromm M.F., Wandel C., Leake B., Wood A.J., Roden D.M., Wilkinson G.R. (1998)**
The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors.
J. clin. invest., Vol. 101 (2), p. 289–294
210. **Kioka N., Tsubota J., Kakehi Y., Komano T., Gottesman M.M., Pastan I., Ueda K. (1989)**
P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance.
Biochem. biophys. res. commun., Vol. 162 (1), p. 224–231
211. **Kipp H., Arias I.M. (2000)**
Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver.
J. biol. chem., Vol. 275 (21), p. 15917–15925
212. **Klein I., Sarkadi B., Varadi A. (1999)**
An inventory of the human ABC proteins.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1461 (2), p. 237–262
213. **Kleinow K.M., Doi A.M., Smith A.A. (2000)**
Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal.
Mar. environ. res., Vol. 50 (1-5), p. 313–317
214. **Klimecki W.T., Futscher B.W., Grogan T.M., Dalton W.S. (1994)**
P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers.
Blood, Vol. 83 (9), p. 2451–2458
215. **Kobayashi H., Dorai T., Holland J.F., Ohnuma T. (1994)**
Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 54 (5), p. 1271–1275
216. **Kondratov R.V., Komarov P.G., Becker Y., Ewenson A., Gudkov A.V. (2001)**
Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 98 (24), p. 14078–14083
217. **Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J., Juijn J.A., Baas F., Borst P. (1997)**
Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 57 (16), p. 3537–3547
218. **Kool M., van der Linden M., de Haas M., Baas F., Borst P. (1999)**
Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 59 (1), p. 175–182
219. **Kool M., van der Linden M., de Haas M., Scheffer G.L., de Vree J.M., Smith A.J., Jansen G., Peters G.J., Ponne N., Scheper R.J., Elferink R.P., Baas F., Borst P. (1999)**
MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 96 (12), p. 6914–6919
220. **Kramer R., Weber T.K., Arcenci R., Ramchurren N., Kastriakis W.V., Steele G. Jr, Summerhayes I.C. (1995)**
Inhibition of N-linked glycosylation of P-glycoprotein by tunicamycin results in a reduced multidrug resistance phenotype.
Br. J. Cancer, Vol. 71 (4), p. 670–675
221. **Krishna R., Mayer L.D. (2000)**
Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs.
Eur. j. pharm. sci., Vol. 11 (4), p. 265–283
222. **Kuwano M., Toh S., Uchiumi T., Takano H., Kohno K., Wada M. (1999)**
Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance.
Anti-cancer drug des., Vol. 14 (2), p. 123–131

223. Lavie Y., Fiucci G., Czamy M., Liscovitch M. (1999)
Changes in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells.
Lipids, Vol. 34 (Suppl), p. 57–63
224. Lecureur V., Sun D., Hargrove P., Schuetz E.G., Kim R.B., Lan L.B., Schuetz J.D. (2000)
Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein.
Mol. pharmacol., Vol. 57 (1), p. 24–35
225. Lee C.G., Ramachandra M., Jeang K.T., Martin M.A., Pastan I., Gottesman M.M. (2000)
Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter.
FASEB j., Vol. 14 (3), p. 516–522
226. Lee J.J., Hughes C.S., Fine R.L., Page R.L. (1996)
P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance.
Cancer, Vol. 77 (9), p. 1892–1898
227. Lee J.M., Bernstein A. (1993)
p53 mutations increase resistance to ionizing radiation.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 90 (12), p. 5742–5746
228. Lee K., Klein-Szanto A.J., Kruh G.D. (2000)
Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 92 (23), p. 1934–1940
229. Lehnert M. (1996)
Clinical Multidrug Resistance in Cancer : A Multifactorial Problem.
Eur. J. Cancer, Vol. 32A (6), p. 912–920
230. Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., Cole S.P., Deeley R.G., Keppler D. (1994)
The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates.
J. Biol. Chem., Vol. 269 (45), p. 27807–27810
231. Leighton J.C., Jr, Goldstein L.J. (1995)
P-glycoprotein in adult solid tumours. Expression and prognostic significance.
Hematol./oncol. Clin. North Am., Vol. 9 (2), p. 251–273
232. Lelong I.H., Guzikowski A.P., Haugland R.P., Pastan I., Gottesman M.M., Willingham M.C. (1991)
Fluorescent verapamil derivative for monitoring activity of the multidrug transporter.
Mol. pharmacol., Vol. 40 (4), p. 490–494
233. Leung S., Bendayan R. (1999)
Role of P-glycoprotein in the renal transport of dideoxynucleoside analog drugs.
Can. j. physiol. pharm., Vol. 77 (8), p. 625–630
234. Lieberman D.M., Reithmeier R.A., Ling V., Charuk J.H., Goldberg H., Skorecki K.L. (1989)
Identification of P-glycoprotein in renal brush border membranes.
Biochem. biophys. Res. Commun., Vol. 162 (1), p. 244–252
235. Ling V. (1975)
Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian cells.
Can. j. genet. cytol., Vol. 17 (4), p. 503–515
236. Ling V., Kartner N., Sudo T., Siminovitch L., Riordan J.R. (1983)
Multidrug-resistance phenotype in Chinese hamster ovary cells.
Cancer Treat. Rep., Vol. 67 (10), p. 869–874
237. Ling V., Thompson L.H. (1974)
Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine.
J. Cell. Physiol., Vol. 83 (1), p. 103–116
238. Linn S.C., Giaccone G., van Diest P.J., Blokhuis W.M., van der Valk P., van Kalken C.K., Kuiper C.M., Pinedo H.M., Baak J.P. (1995)
Prognostic relevance of P-glycoprotein expression in breast cancer.
Ann. Oncol., Vol. 6 (7), p. 679–685
239. Liscovitch M., Lavie Y. (2000)
Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways?
Trends Biochem. Sci. (Regular. ed.), Vol. 25 (11), p. 530–534
240. List A.F., Kopecky K.J., Willman C.L., Head D.R., Persons D.L., Slovak M.L., Dorr R. et al. (2001)
Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study.
Blood, Vol. 98 (12), p. 3212–3220

241. Litman T., Druley T.E., Stein W.D., Bates S.E. (2001)
From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.
Cell. mol. life sci. (Print. ed.), Vol. 58 (7), p. 931–959
242. Litman T., Zeuthen T., Skovsgaard T., Stein W.D. (1997)
Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1361 (2), p. 169–176
243. Litman T., Zeuthen T., Skovsgaard T., Stein W.D. (1997)
Structure-activity relationships of P-glycoprotein interacting drugs: kinetic characterization of their effects on ATPase activity.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1361 (2), p. 159–168
244. Liu L.F. (1989)
DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs.
Ann. rev. biochem., Vol. 58, p. 351–375
245. Liu Q., Ohshima K., Kikuchi M. (2001)
High expression of MDR-1 gene and P-glycoprotein in initial and re-biopsy specimens of relapsed B-cell lymphoma.
Histopathology (Oxf.), Vol. 38 (3), p. 209–216
246. Liu X.D., Liu G.Q. (2001)
P glycoprotein regulated transport of glutamate at blood brain barrier.
Acta Pharmacol. Sin., Vol. 22 (2), p. 111–116
247. Loetchutinat C., Priebe W., Garnier-Suillerot A. (2001)
Drug sequestration in cytoplasmic organelles does not contribute to the diminished sensitivity of anthracyclines in multidrug resistant K562 cells.
Eur. j. biochem., Vol. 268 (16), p. 4459–4467
248. Loo T.W., Clarke D.M. (1994)
Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis.
J. biol. chem., Vol. 269 (46), p. 28683–28689
249. Loo T.W., Clarke D.M. (1994)
Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides.
J. biol. chem., Vol. 269 (10), p. 7750–7755
250. Loo T.W., Clarke D.M. (1995)
P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones.
J. biol. chem., Vol. 270 (37), p. 21839–21844
251. Loo T.W., Clarke D.M. (1995)
Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity.
J. biol. chem., Vol. 270 (39), p. 22957–22961
252. Loo T.W., Clarke D.M. (1995)
Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein.
J. biol. chem., Vol. 270 (2), p. 843–848
253. Loo T.W., Clarke D.M. (1996)
The minimum functional unit of human P-glycoprotein appears to be a monomer.
J. biol. chem., Vol. 271 (44), p. 27488–27492
254. Loo T.W., Clarke D.M. (1999)
The glycosylation and orientation in the membrane of the third cytoplasmic loop of human P-glycoprotein is affected by mutations and substrates.
Biochemistry (Easton), Vol. 38 (16), p. 5124–5129
255. Loo T.W., Clarke D.M. (1999)
The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy.
FASEB j., Vol. 13 (13), p. 1724–1732
256. Loo T.W., Clarke D.M. (1999)
The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface.
J. biol. chem., Vol. 274 (35), p. 24759–24765

257. **Loo T.W., Clarke D.M. (1999)**
Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1461 (2), p. 315–325
258. **Loo T.W., Clarke D.M. (2000)**
The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis.
J. Biol. Chem., Vol. 275 (8), p. 5253–5256
259. **Loo T.W., Clarke D.M. (2001)**
Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil.
J. Biol. Chem., Vol. 276 (18), p. 14972–14979
260. **Loo T.W., Clarke D.M. (2001)**
Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers.
J. Biol. Chem., Vol. 276 (40), p. 36877–36880
261. **Lowe S.W., Bodis S., McClatchey A., Remington L., Ruley H.E., Fisher D.E., Housman D.E., Jacks T. (1994)**
p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo.
Science, Vol. 266 (5186), p. 807–810
262. **Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., Housman D.E. (1993)**
p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents.
Cell (Cambridge), Vol. 74 (6), p. 957–967
263. **Luciani F., Molinari A., Lozupone F., Calcabrini A., Lugini L., Stringaro A., Puddu P. et al. (2002)**
P-glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin.
Blood, Vol. 99 (2), p. 641–648
264. **Luker G.D., Nilsson K.R., Covey D.F., Piwnicka-Worms D. (1999)**
Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol.
J. Biol. Chem., Vol. 274 (11), p. 6979–6991
265. **Ma L.D., Marquardt D., Takemoto L., Center M. (1991)**
Analysis of P-glycoprotein phosphorylation in HL60 cells isolated for resistance to vincristine.
J. Biol. Chem., Vol. 266 (9), p. 5593–5599
266. **Magnol J.-P., Marchal T., Delisle F., Devauchelle P., Fournel C. (1998)**
Cancérologie clinique du chien.
Ouvrage publié à compte d'auteur, 426 pages
267. **Mangham D.C., Cannon A., Komiya S., Gendron R.L., Dunussi K., Gebhardt M.C., Mankin H.J. et al. (1996)**
P-glycoprotein is expressed in the mineralizing regions of the skeleton.
Calif. tissue int., Vol. 58 (3), p. 186–191
268. **Marie J.P. (1992)**
Les gènes de résistance à la chimiothérapie.
Presse Med. (Paris), Vol. 21 (22), p. 1033–1037
269. **Martin C., Berridge G., Higgins C.F., Mistry P., Charlton P., Callaghan R. (2000)**
Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein.
Mol. pharmacol., Vol. 58 (3), p. 624–632
270. **Mazzoni A., Trave F. (1993)**
Cytoplasmic membrane cholesterol and doxorubicin cytotoxicity in drug-sensitive and multidrug-resistant human ovarian cancer cells.
Oncol. res., Vol. 5 (2), p. 75–82
271. **McAleer M.A., Breen M.A., White N.L., Matthews N. (1999)**
pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells.
J. Biol. Chem., Vol. 274 (33), p. 23541–23548
272. **McKenna S.L., Padua R.A. (1997)**
Multidrug Resistance in Leukaemia.
Brit. J. Haematol., Vol. 96 (4), p. 659–674
273. **Mealey K.L., Barhoumi R., Rogers K., Kochevar D.T. (1998)**
Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line.
Cancer Lett., Vol. 126 (2), p. 187–192

274. Mealey K.L., Bentjen S.A., Gay J.M., Cantor G.H. (2001)
Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene.
Pharmacogenetics (Lond), Vol. 11 (8), p. 727–733
275. Mealey K.L., Bentjen S.A., Waiting D.K. (2002)
Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of collies from the northwestern United States.
Am. j. vet. res., Vol. 63 (4), p. 479–481
276. Mechetner E.B., Roninson I.B. (1992)
Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 89 (13), p. 5824–5828
277. Meijer C., Mulder N.H., Timmer-Bosscha H., Sluiter W.J., Meersma G.J., de Vries E.G. (1992)
Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 52 (24), p. 6885–6889
278. Meister A. (1983)
Selective modification of glutathione metabolism.
Science, Vol. 220 (4596), p. 472–477
279. Metherall J.E., Li H., Waugh K. (1996)
Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol biosynthesis.
J. biol. chem., Vol. 271 (5), p. 2634–2640
280. Meyers M.B., Biedler J.L. (1981)
Increased synthesis of a low molecular weight protein in vincristine-resistant cells.
Biochem. biophys. res. commun., Vol. 99 (1), p. 228–235
281. Meyers M.B., Spengler B.A., Chang T.D., Melera P.W., Biedler J.L. (1985)
Gene amplification-associated cytogenetic aberrations and protein changes in vincristine-resistant Chinese hamster, mouse, and human cells.
J. cell biol., Vol. 100 (2), p. 588–597
282. Michieli M., Damiani D., Ermacora A., Masolini P., Raspadori D., Visani G., Scheper R.J. et al. (1999)
P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance associated protein in de novo acute non-lymphocytic leukaemias: biological and clinical implications.
Br. j. haematol., Vol. 104 (2), p. 328–335
283. Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger L., Dean M., Fojo T., Bates S.E. (1999)
Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 59 (1), p. 8–13
284. Miyoshi N., Tojo E., Oishi A., Fujiki M., Misumi K., Sakamoto H., Kameyama K., Shimizu T., Yasuda N. (2002)
Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors.
J. vet. med. sci., Vol. 64 (6), p. 531–533
285. Moore A.S., Leveille C.R., Reimann K.A., Shu H., Arias I.M. (1995)
The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance.
Cancer investig., Vol. 13 (5), p. 475–479
286. Morris D.I., Greenberger L.M., Bruggemann E.P., Cardarelli C., Gottesman M.M., Pastan I. et al. (1994)
Localization of the forskolin labeling sites to both halves of P-glycoprotein: similarity of the sites labeled by forskolin and prazosin.
Mol. pharmacol., Vol. 46 (2), p. 329–337
287. Morris D.I., Speicher L.A., Ruoho A.E., Tew K.D., Seamon K.B. (1991)
Interaction of forskolin with the P-glycoprotein multidrug transporter.
Biochemistry (Easton), Vol. 30 (34), p. 8371–8379
288. Moscow J.A., Cowan K.H. (1988)
Multidrug resistance.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 80 (1), p. 14–20
289. Mross K., Bohn C., Edler L., Jonat W., Queisser W., Heidemann E., Goebel M., Hossfeld D.K. (1993)
Randomized phase II study of single-agent epirubicin +/- verapamil in patients with advanced metastatic breast cancer. An AIO clinical trial. Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie of the German Cancer Society.
Ann. oncol., Vol. 4 (1), p. 45–50

290. Müller M., Meijer C., Zaman G.J., Borst P., Scheper R.J., Mulder N.H., de Vries E.G., Jansen P.L. (1994)
Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 91 (26), p. 13033–13037
291. Naito M., Tsuruo T. (1989)
Competitive inhibition by verapamil of ATP-dependent high affinity vincristine binding to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells without calcium ion involvement.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 49 (6), p. 1452–1455
292. Ng W.F., Sarangi F., Zastawny R.L., Veinot-Drebot L., Ling V. (1989)
Identification of members of the P-glycoprotein multigene family.
Mol. cell. biol., Vol. 9 (3), p. 1224–1232
293. Nishiyama K., Shirahama T., Yoshimura A., Sumizawa T., Furukawa T., Ichikawa-Haraguchi M. et al. (1993)
Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in renal and transitional cell carcinomas.
Cancer, Vol. 71 (11), p. 3611–3619
294. Nooter K., Stoter G. (1996)
Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy.
Pathol. res. pract., Vol. 192 (7), p. 768–780
295. Nooter K., Westerman A.M., Flens M.J., Zaman G.J., Scheper R.J., van Wingerden K.E., Burger H. et al. (1995)
Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers.
Clin. cancer res., Vol. 1 (11), p. 1301–1310
296. Ohga T., Uchiumi T., Makino Y., Koike K., Wada M., Kuwano M., Kohno K. (1998)
Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene.
J. Biol. Chem., Vol. 273 (11), p. 5997–6000
297. Oudard S., Marie J.P., Pujade Lauraine E. (1996)
Résistance à la chimiothérapie de type MDR en pratique clinique.
Bull. cancer (Paris), Vol. 83 (8), p. 609–618
298. Oude Elferink R.P., Groen A.K. (1995)
The role of *mdr2* P-glycoprotein in biliary lipid secretion. Cross-talk between cancer research and biliary physiology.
J. Hepatol., Vol. 23 (5), p. 617–625
299. Page R.L., Hughes C.S., Huyen S., Sagris J., Trogdon M. (2000)
Modulation of P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in canine cell lines.
Anticancer res., Vol. 20 (5B), p. 3533–3538
300. Pallares-Trujillo J., Domenech C., Grau-Oliete M.R., Rivera-Fillat M.P. (1993)
Role of cell cholesterol in modulating vincristine uptake and resistance.
Int. j. cancer, Vol. 55 (4), p. 667–671
301. Pastan I., Gottesman M.M., Ueda K., Lovelace E., Rutherford A.V., Willingham M.C. (1988)
A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 85 (12), p. 4486–4490
302. Paul S., Breuninger L.M., Tew K.D., Shen H., Kruh G.D. (1996)
ATP-dependent uptake of natural product cytotoxic drugs by membrane vesicles establishes MRP as a broad specificity transporter.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 93 (14), p. 6929–6934
303. Peterson R.H., Biedler J.L. (1978)
Plasma membrane proteins and glycoproteins from Chinese hamster cells sensitive and resistant to actinomycin D.
J. Supramol. Struct., Vol. 9 (3), p. 289–298
304. Pileri S.A., Sabbatini E., Falini B., Tazzari P.L., Gherlinzoni F., Michieli M.G., Damiani D., Zucchini L., Gobbi M., Tsuruo T. et al. (1991)
Immunohistochemical detection of the multidrug transport protein P170 in human normal tissues and malignant lymphomas.
Histopathology (Oxf), Vol. 19 (2), p. 131–140
305. Pirker R., Wallner J., Geissler K., Linkesch W., Haas O.A., Bettelheim P., Hopfner M., Scherrer R. et al. (1991)
MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 83 (10), p. 708–712
306. Poulain S., Lepelley P., Cambier N., Wattel E., Fenaux P., Cosson A. (1999)
Évaluation de l'expression de la glycoprotéine P en immunocytochimie et en cytométrie de flux associée au test fonctionnel : application aux leucémies aiguës myéloïdes.
Ann. Biol. Clin., Vol. 57 (5), p. 595–600

307. **Ramachandra M., Ambudkar S.V., Chen D., Hrycyna C.A., Dey S., Gottesman M.M., Pastan I. (1998)**
Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state.
Biochemistry (Easton), Vol. 37 (14), p. 5010–5019
308. **Rao V.V., Dahlheimer J.L., Bardgett M.E., Snyder A.Z., Finch R.A., Sartorelli A.C., Piwnica-Worms D. (1999)**
Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier.
Proc Natl Acad Sci U. S. A., Vol. 96 (7), p. 3900–3905
309. **Ratnasinghe D., Daschner P.J., Anver M.R., Kasprzak B.H., Taylor P.R., Yeh G.C., Tangrea J.A. (2001)**
Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible?.
Anticancer res., Vol. 21 (3C), p. 2141–2147
310. **Raviv Y., Pollard H.B., Bruggemann E.P., Pastan I., Gottesman M.M. (1990)**
Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells.
J. biol. chem., Vol. 265 (7), p. 3975–3980
311. **Raviv Y., Puri A., Blumenthal R. (2000)**
P-glycoprotein-overexpressing multidrug-resistant cells are resistant to infection by enveloped viruses that enter via the plasma membrane.
FASEB j., Vol. 14 (3), p. 511–515
312. **Raymond M., Gros P. (1989)**
Mammalian multidrug-resistance gene: correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene.
Proc Natl Acad Sci U. S. A., Vol. 86 (17), p. 6488–6492
313. **Regina A., Demeule M., Laplante A., Jodoin J., Dagenais C., Berthelet F., Moghrabi A., Beliveau R. (2001)**
Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier.
Cancer Metastasis Rev., Vol. 20 (1-2), p. 13–25
314. **Richert N., Akiyama S., Shen D., Gottesman M.M., Pastan I. (1985)**
Multiply drug-resistant human KB carcinoma cells have decreased amounts of a 75-kDa and a 72-kDa glycoprotein.
Proc Natl Acad Sci U. S. A., Vol. 82 (8), p. 2330–2333
315. **Richert N.D., Aldwin L., Nitecki D., Gottesman M.M., Pastan I. (1988)**
Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells.
Biochemistry (Easton), Vol. 27 (20), p. 7607–7613
316. **Riehm H., Biedler J.L. (1971)**
Cellular resistance to daunomycin in Chinese hamster cells in vitro.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 31 (4), p. 409–412
317. **Ringpfeil F., Lebwohl M.G., Christiano A.M., Uitto J. (2000)**
Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter.
Proc Natl Acad Sci U. S. A., Vol. 97 (11), p. 6001–6006
318. **Riordan J.R., Deuchars K., Kartner N., Alon N., Trent J., Ling V. (1985)**
Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines.
Nature (Lond.), Vol. 316 (6031), p. 817–819
319. **Riordan J.R., Ling V. (1985)**
Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance.
Pharmacol. ther. (Oxf.), Vol. 28 (1), p. 51–75
320. **Riou J.-F., Pommier Y. (1994)**
La résistance pléiotropique liée aux topo-isomérasés.
Bull. Cancer (Paris), Vol. 81 (suppl. 2), p. 62–68
321. **Ro J., Sahin A., Ro J.Y., Fritsche H., Hortobagyi G., Blick M. (1990)**
Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer.
Human pathol., Vol. 21 (8), p. 787–791
322. **Robert J. (1994)**
La multidrug résistance aux médicaments anticancéreux.
Bull. cancer (Paris), Vol. 81 (s1), p. 33s–38s
323. **Robert J. (1994)**
Structure et fonction de la glycoprotéine P.
Bull. cancer (Paris), Vol. 81 (5), p. 400–408

324. **Robertson S.M., Ling V., Stanners C.P. (1984)**
Co-amplification of double minute chromosomes, multiple drug resistance, and cell surface P-glycoprotein in DNA-mediated transformants of mouse cells.
Mol. cell. biol., Vol. 4 (3), p. 500–506
325. **Roepe P.D. (1995)**
The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes.
Biochim. biophys. acta, Vol. 1241 (3), p. 385–405
326. **Roman R.M., Lomri N., Braunstein G., Feranchak A.P., Simeoni L.A., Davison A.K. et al. (2001)**
Evidence for multidrug resistance-1 P-glycoprotein-dependent regulation of cellular ATP permeability.
J. membr. biol., Vol. 183 (3), p. 165–173
327. **Romsicki Y., Sharom F.J. (2001)**
Phospholipid flippase activity of the reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter.
Biochemistry (Easton), Vol. 40 (23), p. 6937–6947
328. **Roninson I.B. (1992)**
The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo.
Biochem. pharmacol., Vol. 43 (1), p. 95–102
329. **Roninson I.B., Abelson H., Housman D.E., Howell N., Varshavsky A. (1984)**
Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells.
Nature (Lond.), Vol. 309 (5969), p. 626–628
330. **Roninson I.B., Chin J.E., Choi K., Gros P., Housman D.E., Fojo A., Shen D., Gottesman M.M., Pastan I. (1986)**
Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 83, p. 4538–4552
331. **Rooney M., Kish J., Jacobs J., Kinzie J., Weaver A., Crissman J., Al-Sarraf M. (1985)**
Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin.
Cancer, Vol. 55 (5), p. 1123–1128
332. **Rosenberg M.F., Callaghan R., Ford R.C., Higgins C.F. (1997)**
Structure of the multidrug resistant P-glycoprotein to 2,5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis.
J. biol. chem., Vol. 272 (16), p. 10685–10694
333. **Ruetz S., Gros P. (1994)**
Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene.
Cell (Cambridge), Vol. 77 (7), p. 1071–1081
334. **Rumsby M.G., Drew L., Warr J.R. (1998)**
Protein kinase and multidrug resistance.
Cytotechnology (Dordr.), Vol. 27, p. 203–224
335. **Sachs C.W., Safa A.R., Harrison S.D., Fine R.L. (1995)**
Partial inhibition of multidrug resistance by safinol is independent of modulation of P-glycoprotein substrate activities and correlated with inhibition of protein kinase C.
J. biol. chem., Vol. 270 (44), p. 26639–26648
336. **Safa A.R. (1988)**
Photoaffinity labeling of the multidrug-resistance-related P-glycoprotein with photoactive analogs of verapamil.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 85 (19), p. 7187–7191
337. **Safa A.R. (1999)**
Photoaffinity analogs for multidrug resistance-related transporters and their use in identifying chemosensitizers.
Drug Resist. Updat., Vol. 2 (6), p. 371–381
338. **Safa A.R., Glover C.J., Meyers M.B., Biedler J.L., Felsted R.L. (1986)**
Vinblastine photoaffinity labeling of a high molecular weight surface membrane glycoprotein specific for multidrug-resistant cells.
J. biol. chem., Vol. 261 (14), p. 6137–6140
339. **Safa A.R., Stern R.K., Choi K., Agresti M., Tamai I., Mehta N.D., Roninson I.B. (1990)**
Molecular basis of preferential resistance to colchicine in multidrug-resistant human cells conferred by Gly-185----Val-185 substitution in P-glycoprotein.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 87 (18), p. 7225–7229
340. **Salmon S.E., Grogan T.M., Miller T., Scheper R., Dalton W.S. (1989)**
Prediction of doxorubicin resistance in vitro in myeloma, lymphoma, and breast cancer by P-glycoprotein staining.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 81 (9), p. 696–701

341. **Sampath J., Sun D., Kidd V.J., Grenet J., Gandhi A., Shapiro L.H., Wang Q., Zambetti G.P. et al. (2001)**
Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1.
J. Biol. Chem., Vol. 276 (42), p. 39359–39367
342. **Sauna Z.E., Ambudkar S.V. (2000)**
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. U. S. A., Vol. 97 (6), p. 2515–2520
343. **Sauna Z.E., Ambudkar S.V. (2001)**
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., Vol. 276 (15), p. 11653–11661
344. **Scala S., Dickstein B., Regis J., Szallasi Z., Blumberg P.M., Bates S.E. (1995)**
Bryostatins affect P-glycoprotein phosphorylation but not function in multidrug-resistant human breast cancer cells.
Clin. Cancer Res., Vol. 1 (12), p. 1581–1587
345. **Scanlon K.J., Ishida H., Kashani-Sabet M. (1994)**
Ribozyme-mediated reversal of the multidrug-resistant phenotype.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 91 (23), p. 11123–11127
346. **Scheffer G.L., Kool M., Heijn M., de Haas M., Pijnenborg A.C., Wijnholds J., van Helvoort A., de Jong M.C., Hooijberg J.H., Mol C.A., van der Linden M., de Vree J.M., van der Valk P., Elferink R.P. et al. (2000)**
Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies.
Cancer Res. (Baltimore), Vol. 60 (18), p. 5269–5277
347. **Scheffer G.L., Wijngaard P.L., Flens M.J., Izquierdo M.A., Slovak M.L., Pinedo H.M., Meijer C.J., Clevers H.C., Scheper R.J. (1995)**
The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein.
Nat. Med., Vol. 1 (6), p. 578–582
348. **Scheper R.J., Broxterman H.J., Scheffer G.L., Kaaijk P., Dalton W.S., van Heijningen T.H., van Kalken C.K., Slovak M.L., de Vries E.G., van der Valk P. et al. (1993)**
Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistance.
Cancer Res. (Baltimore), Vol. 53 (7), p. 1475–1479
349. **Schimke R.T. (1984)**
Gene amplification in cultured animal cells.
Cell (Cambridge), Vol. 37 (3), p. 705–13
350. **Schinkel A.H., Kemp S., Dolle M., Rudenko G., Wagenaar E. (1993)**
N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein.
J. Biol. Chem., Vol. 268 (10), p. 7474–7481
351. **Schinkel A.H., Mayer U., Wagenaar E., Mol C.A., van Deemter L., Smit J.J., van der Valk M.A., Voordouw A.C., Spits H., van Tellingen O., Zijlmans J.M., Fibbe W.E., Borst P. (1997)**
Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 94 (8), p. 4028–4033
352. **Schinkel A.H., Roelofs E.M., Borst P. (1991)**
Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies.
Cancer Res. (Baltimore), Vol. 51 (10), p. 2628–35
353. **Schinkel A.H., Smit J.J.M., van Telling O. et al. (1994)**
Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs.
Cell, Vol. 77, p. 491–502
354. **Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D., Paibir S.G., Flynn P.M., Srinivas R.V., Kumar A., Fridland A. (1999)**
MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs.
Nat. Med., Vol. 5 (9), p. 1048–1051
355. **Scotto K.W., Egan D.A. (1998)**
Transcriptional regulation of MDR genes.
Cytotechnology (Dordr.), Vol. 27, p. 257–269
356. **See Y.P., Carlsen S.A., Till J.E., Ling V. (1974)**
Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide.
Biochim. Biophys. Acta, Vol. 373 (2), p. 242–252

357. **Sehested M., Skovsgaard T., Jensen P.B., Demant E.J., Friche E., Bindslev N. (1990)**
Transport of the multidrug resistance modulators verapamil and azidopine in wild type and daunorubicin resistant Ehrlich ascites tumour cells.
Br. J. Cancer, Vol. 62 (1), p. 37–41
358. **Senent L., Jarque I., Martin G., Sempere A., Gonzalez-Garcia Y., Gomis F., Perez-Sirvent M., De La Rubia J., Sanz M.A. (1998)**
P-glycoprotein expression and prognostic value in acute myeloid leukemia.
Haematologica (Roma), Vol. 83 (9), p. 783–787
359. **Senior A.E., al-Shawi M.K., Urbatsch I.L. (1995)**
The catalytic cycle of P-glycoprotein.
FEBS lett., Vol. 377 (3), p. 285–289
360. **Senior A.E., Gadsby D.C. (1997)**
ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR.
Semin. cancer biol., Vol. 8 (3), p. 143–150
361. **Shapiro A.B., Ling V. (1995)**
Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein.
J. biol. chem., Vol. 270 (27), p. 16167–16175
362. **Sharom F.J., Yu X., Doige C.A. (1993)**
Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein.
J. biol. chem., Vol. 268 (32), p. 24197–24202
363. **Shen D.W., Fojo A., Chin J.E., Roninson I.B., Richert N., Pastan I., Gottesman M.M. (1986)**
Human Multidrug-Resistant Cell Lines : Increased mdr1 expression can precede gene amplification.
Science (Wash. D.C.), Vol. 232 (4750), p. 643–645
364. **Shen D.W., Fojo A., Roninson I.B., Chin J.E., Soffir R., Pastan I., Gottesman M.M. (1986)**
Multidrug resistance of DNA-mediated transformants is linked to transfer of the human mdr1 gene.
Mol. cell. biol., Vol. 6 (11), p. 4039–4045
365. **Shiraki N., Okamura K., Tokunaga J., Ohmura T., Yasuda K., Kawaguchi T., Hamada A., Nakano M. (2002)**
Bromocriptine Reverses P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance in Tumor Cells.
Jpn. j. cancer res., Vol. 93 (2), p. 209–215
366. **Shoemaker R., Wolpert-DeFilippes M., Plowman J., Abbott B., Venditti J., Trader M., Griswold D., Gerlach J., Ling V. (1986)**
Pleiotropic resistance and drug development.
Prog. clin. biol. res., Vol. 223, p. 143–149
367. **Shustik C., Dalton W., Gros P. (1995)**
P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells : biochemistry, clinical relevance and modulation.
Mol. aspects med., Vol. 16, p. 1–78
368. **Siegfried J.A., Kennedy K.A., Sartorelli A.C., Tritton T.R. (1983)**
The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin. Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug-resistant tumor cells.
J. biol. chem., Vol. 258 (1), p. 339–343
369. **Silverman-J.A., Raunio-H., Gant-T.W., Thorgeirsson-S.S. (1991)**
Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance (mdr) gene family.
Gene (Amst.), Vol. 106 (2), p. 229–336
370. **Skach W.R., Calayag M.C., Lingappa V.R. (1993)**
Evidence for an alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis.
J. biol. chem., Vol. 268 (10), p. 6903–6908
371. **Skach W.R., Lingappa V.R. (1993)**
Amino-terminal assembly of human P-glycoprotein at the endoplasmic reticulum is directed by cooperative actions of two internal sequences.
J. biol. chem., Vol. 268 (31), p. 23552–23561
372. **Skach W.R., Lingappa V.R. (1994)**
Transmembrane orientation and topogenesis of the third and fourth membrane-spanning regions of human P-glycoprotein (MDR1).
Cancer res. (Baltimore), Vol. 54 (12), p. 3202–3209
373. **Skovsgaard T. (1978)**
Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 38 (6), p. 1785–1791

374. **Skovsgaard T. (1978)**
Mechanism of cross-resistance between vincristine and daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells.
Cancer res. (Baltimore), Vol. **38** (12), p. 4722–4727
375. **Smit J.J., Schinkel A.H., Oude Elferink R.P., Groen A.K., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A., Ottenhoff R., van der Lugt N.M., van Roon M.A. et al. (1993)**
Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease.
Cell (Cambridge), Vol. **75** (3), p. 451–462
376. **Smith D.G. (1993)**
Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism.
Eur. j. cancer (1990), Vol. **30**, p. 1921–1935
377. **Smyth M.J., Krasovskis E., Sutton V.R., Johnstone R.W. (1998)**
The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. **95** (12), p. 7024–7029
378. **Song J., Melera P.W. (2001)**
Transmembrane domain (TM) 9 represents a novel site in P-glycoprotein that affects drug resistance and cooperates with TM6 to mediate [125I]iodoarylazidoprazosin labeling.
Mol. pharmacol., Vol. **60** (2), p. 254–261
379. **Sonneveld P. (2000)**
Multidrug resistance in haematological malignancies.
J. intern. med., Vol. **247** (5), p. 521–534
380. **Sonveaux N., Shapiro A.B., Goormaghtigh E., Ling V., Ruyschaert J.M. (1996)**
Secondary and tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A Fourier transform attenuated total reflection infrared spectroscopy analysis.
J. biol. chem., Vol. **271** (40), p. 24617–24624
381. **Sparreboom A., van Asperen J., Mayer U., Schinkel A.H., Smit J.W., Meijer D.K., Borst P., Nuijten W.J., Beijnen J.H., van Tellingen O. (1997)**
Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. **94** (5), p. 2031–2035
382. **Stahl F., Martinsson T., Dahllöf B., Levan G. (1988)**
Amplification and overexpression of the P-glycoprotein genes and differential amplification of three other genes in SEWA murine multidrug-resistant cells.
Hereditas, Vol. **108** (2), p. 251–258
383. **Stein U., Jurchott K., Walther W., Bergmann S., Schlag P.M., Royer H.D. (2001)**
Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters.
J. biol. chem., Vol. **276** (30), p. 28562–28569
384. **Stein W.D., Cardarelli C., Pastan I., Gottesman M.M. (1994)**
Kinetic evidence suggesting that the multidrug transporter differentially handles influx and efflux of its substrates.
Mol. pharmacol., Vol. **45** (4), p. 763–772
385. **Steingold S.F., Sharp N.J., McGahan M.C., Hughes C.S., Dunn S.E., Page R.L. (1998)**
Characterization of canine MDR1 mRNA: its abundance in drug resistant cell lines and in vivo.
Anticancer res., Vol. **18** (1), p. 393–400
386. **Stephens R.H., O'Neill C.A., Bennett J., Humphrey M., Henry B., Rowland M., Warhurst G. (2002)**
Resolution of P-glycoprotein and non-P-glycoprotein effects on drug permeability using intestinal tissues from *mdr1a* (-/-) mice.
Br. J. Pharmacol., Vol. **135** (8), p. 2038–2046
387. **Stouch T.R., Gudmundsson O. (2002)**
Progress in understanding the structure-activity relationships of P-glycoprotein.
Adv. drug deliv. rev., Vol. **54** (3), p. 315–328
388. **Strautnieks S.S., Bull L.N., Knisely A.S., Kocoshis S.A., Dahl N., Arnell H., Sokal E., Dahan K., Childs S., Ling V., Tanner M.S., Kagalwalla A.F., Nemeth A., Pawlowska J., Baker A., Mieli-Vergani G., Freimer N.B., Gardiner R.M., Thompson R.J. (1998)**
A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis.
Nat. genet., Vol. **20** (3), p. 233–238

389. Sugawara I., Kataoka I., Morishita Y., Hamada H., Tsuruo T., Itoyama S., Mori S. (1988)
Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK16.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 48 (7), p. 1926–1929
390. Sullivan D.M., Glisson B.S., Hodges P.K., Smallwood-Kentro S., Ross W.E. (1986)
Proliferation dependence of topoisomerase II mediated drug action.
Biochemistry (Mosc), Vol. 25 (8), p. 2248–2256
391. Taguchi Y., Kino K., Morishima M., Komano T., Kane S.E., Ueda K. (1997)
Alteration of substrate specificity by mutations at the His61 position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein.
Biochemistry (Easton), Vol. 36 (29), p. 8883–8889
392. Taguchi Y., Morishima M., Komano T., Ueda K. (1997)
Amino acid substitutions in the first transmembrane domain (TM1) of P-glycoprotein that alter substrate specificity.
FEBS lett., Vol. 413 (1), p. 142–146
393. Tan B., Piwnica-Worms D., Ratner L. (2000)
Multidrug resistance transporters and modulation.
Curr. opin. oncol., Vol. 12 (5), p. 450–458
394. Tannock I.F. (2001)
Tumor physiology and drug resistance.
Cancer Metastasis Rev., Vol. 20 (1–2), p. 123–132
395. Taylor J.C., Horvath A.R., Higgins C.F., Begley G.S. (2001)
The multidrug resistance P-glycoprotein. Oligomeric state and intramolecular interactions.
J. biol. chem., Vol. 276 (39), p. 36075–36078
396. Tew K.D. (1994)
Glutathione-associated enzymes in anticancer drugs resistance.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 54 (16), p. 4313–4320
397. Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C. (1989)
Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein.
J. histochem. cytochem., Vol. 37 (2), p. 159–164
398. Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C. (1987)
Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 84 (21), p. 7735–7738
399. Thompson C.B. (1995)
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science, Vol. 267 (5203), p. 1456–1462
400. Thottassery J.V., Zambetti G.P., Arimori K., Schuetz E.G., Schuetz J.D. (1997)
p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 94 (20), p. 11037–11042
401. Tokunaga Y., Hosogi H., Hoppou T., Nakagami M., Tokuka A., Ohsumi K. (2001)
Effects of MDR1/P-glycoprotein expression on prognosis in advanced colorectal cancer after surgery.
Oncol. Rep., Vol. 8 (4), p. 815–819
402. Trock B.J., Leonessa F., Clarke R. (1997)
Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 89 (13), p. 917–931
403. Tsimberidou A.M., Paterakis G., Androutsos G., Anagnostopoulos N., Galanopoulos A., Kalmantis T., Meletis J., Rombos Y., Sagriotis A., Symeonidis A., Tiniakou M., Zoumbos N., Yataganas X. (2002)
Evaluation of the clinical relevance of the expression and function of P-glycoprotein, multidrug resistance protein and lung resistance protein in patients with primary acute myelogenous leukemia.
Leuk. res., Vol. 26 (2), p. 143–154
404. Tsuruo T., Iida H., Kitatani Y., Yokota K., Tsukagoshi S., Sakurai Y. (1984)
Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 44 (10), p. 4303–4307
405. Tsuruo T., Iida H., Nojiri M., Tsukagoshi S., Sakurai Y. (1983)
Circumvention of vincristine and adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium channel blockers.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 43 (6), p. 2905–2910

406. Tsuruo T., Iida H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. (1981)
Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 41 (5), p. 1967–1972
407. Tsuruo T., Iida H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. (1982)
Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 42 (11), p. 4730–4733
408. Turker M.S., Duffin K.Z., Smith A.C., Martin G.M., Martin A.W., DiMartino D.L., Kersey D.S. (1991)
Multidrug resistance phenotype associated with selection of an aminopterin resistant dog kidney cell line.
Pharmacogenetics (Lond.), Vol. 1 (3), p. 149–160
409. Uchiumi T., Hinoshita E., Haga S., Nakamura T., Tanaka T., Toh S., Furukawa M., Kawabe T., Wada M., Kagotani K., Okumura K., Kohno K., Akiyama S., Kuwano M. (1998)
Isolation of a novel human canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT2/MRP3, and its expression in cisplatin-resistant cancer cells with decreased ATP-dependent drug transport.
Biochem. biophys. res. commun., Vol. 252 (1), p. 103–110
410. Uchiyama-Kokubu N., Watanabe T., Cohen D. (2001)
Intracellular levels of two cyclosporin derivatives valspodar (PSC 833) and cyclosporin a closely associated with multidrug resistance-modulating activity in sublines of human colorectal adenocarcinoma HCT-15.
Jpn. j. cancer res., Vol. 92 (10), p. 1116–1126
411. Ueda K., Cardarelli C., Gottesman M.M., Pastan I. (1987)
Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 84 (9), p. 3004–3008
412. Ueda K., Cornwell M.M., Gottesman M.M., Pastan I., Roninson I.B., Ling V., Riordan J.R. (1986)
The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein.
Biochem. biophys. res. commun., Vol. 141 (3), p. 956–962
413. Ueda K., Okamura N., Hirai M., Tanigawara Y., Saeki T., Kioka N., Komano T., Hori R. (1992)
Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone.
J. biol. chem., Vol. 267 (34), p. 24248–24252
414. Urbatsch I.L., Beaudet L., Carrier I., Gros P. (1998)
Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites.
Biochemistry (Easton), Vol. 37 (13), p. 4592–4602
415. Urbatsch I.L., Sankaran B., Bhagat S., Senior A.E. (1995)
Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active.
J. biol. chem., Vol. 270 (45), p. 26956–26961
416. Ushigome F., Takanaga H., Matsuo H., Yanai S., Tsukimori K., Nakano H., Uchiumi T., Nakamura T., Kuwano M., Ohtani H., Sawada Y. (2000)
Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein.
Eur. j. pharmacol., Vol. 408 (1), p. 1–10
417. Valverde M.A., Diaz M., Sepulveda F.V., Gill D.R., Hyde S.C., Higgins C.F. (1992)
Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein.
Nature (Lond.), Vol. 355 (6363), p. 830–833
418. Van der Blik A.M., Baas F., Ten Houte de Lange T., Kooiman P.M., Van der Velde-Koerts T., Borst P. (1987)
The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver.
EMBO j., Vol. 6 (11), p. 3325–3331
419. Van der Blik A.M., Borst P. (1989)
Multidrug resistance.
Adv. cancer res., Vol. 52, p. 165–203
420. Van der Blik A.M., Van der Velde-Koerts T., Ling V., Borst P. (1986)
Overexpression and amplification of five genes in a multidrug-resistant Chinese hamster ovary cell line.
Mol. cell. biol., Vol. 6 (5), p. 1671–1678
421. Van Dijk J., Tsuruo T., Segal D.M., Bolhuis R.L., Colognola R., van de Griend R.J., Fleuren G.J. et al. (1989)
Bispecific antibodies reactive with the multidrug-resistance-related glycoprotein and CD3 induce lysis of multidrug-resistant tumor cells.
Int. j. cancer, Vol. 44 (4), p. 738–743

422. **Van Helvoort A., Smith A.J., Sprong H., Fritzsche I., Schinkel A.H., Borst P., Van-Meer G. (1996)**
MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine.
Cell (Cambridge), Vol. **81** (3), p. 507–517
423. **Vanoye C.G., Castro A.F., Pourcher T., Reuss L., Altenberg G.A. (1999)**
Phosphorylation of P-glycoprotein by PKA and PKC modulates swelling-activated Cl⁻ currents.
Am. j. physiol., Vol. **276** (2 Part. 1), p. C370–C378
424. **Vasudevan S., Tsuruo T., Rose D.R. (1998)**
Mode of binding of anti-P-glycoprotein antibody MRK-16 to its antigen. A crystallographic and molecular modeling study.
J. biol. chem., Vol. **273** (39), p. 25413–25419
425. **Verrelle P., Meissonnier F., Fonck Y. et al. (1991)**
Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. **83**, p. 111–116
426. **Versantvoort C.H., Bagrij T., Wright K.A., Twentyman P.R. (1995)**
On the relationship between the probenecid-sensitive transport of daunorubicin or calcein and the glutathione status of cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP).
Int. j. cancer, Vol. **63** (6), p. 855–862
427. **Vilaboa N.E., Galan A., Troyano A., de Blas E., Aller P. (2000)**
Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1).
J. biol. chem., Vol. **275** (32), p. 24970–24976
428. **Volm M. (1998)**
Multidrug resistance and its reversal.
Anticancer res., Vol. **18** (4C), p. 2905–2917
429. **Waddle J.R., Fine R.L., Case B.C., Trogdon M.L., Tyczkowska K., Frazier D., Page R.L. (1999)**
Phase I and pharmacokinetic analysis of high-dose tamoxifen and chemotherapy in normal and tumor-bearing dogs.
Cancer chemother. pharmacol., Vol. **44** (1), p. 75–80
430. **Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. (1982)**
Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.
EMBO j., Vol. **1** (8), p. 945–951
431. **Wang J.C. (1985)**
DNA topoisomerases.
Ann. rev. biochem., Vol. **54**, p. 665–697
432. **Wang R., Salem M., Yousef I.M., Tuchweber B., Lam P., Childs S.J., Helgason C.D., Ackerley C., Phillips M.J., Ling V. (2001)**
Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. **98** (4), p. 2011–2016
433. **Wattel E., Lepelley P., Merlat A., Sartiaux C., Bauters F., Jouet J.P., Fenaux P. (1995)**
Expression of the multidrug resistance P glycoprotein in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia: absence of correlation with response to treatment.
Leukemia, Vol. **9** (11), p. 1870–1874
434. **Webb M., et al. (1998)**
MDR1 and MRP expression in chronic B-cell lymphoproliferative disorders.
Br. j. haematol., Vol. **102** (3), p. 710–717
435. **Weinstein R.S., Jakate S.M., Dominguez J.M., Lebovitz M.D., Koukoulis G.K., Kuszak J.R., Klusens L.F., Grogan T.M., Saclarides T.J., Roninson I.B., et al. (1991)**
Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis.
Cancer res. (Baltimore), Vol. **51** (10), p. 2720–2726
436. **Wheeler C., Rader R., Kessel D. (1982)**
Membrane alterations associated with progressive adriamycin resistance.
Biochem. pharmacol., Vol. **31** (16), p. 2691–2693
437. **Wijnholds J., Mol C.A., van Deemter L., de Haas M., Scheffer G.L., Baas F., Beijnen J.H., Scheper R.J., Hatse S., De Clercq E., Balzarini J., Borst P. (2000)**
Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. **97** (13), p. 7476–7481

438. **Willingham M.C., Cornwell M.M., Cardarelli C.O., Gottesman M.M., Pastan I. (1986)**
Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and -sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 46 (11), p. 5941–5946
439. **Willingham M.C., Richert N.D., Cornwell M.M., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I.H. (1987)**
Immunocytochemical localization of P170 at the plasma membrane of multidrug-resistant human cells.
J. histochem. cytochem., Vol. 35 (12), p. 1451–1456
440. **Wu Q., Bounaud P.Y., Kuduk S.D., Yang C.P., Ojima I., Horwitz S.B., Orr G.A. (1998)**
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 (Easton), Vol. 37 (32), p. 11272–11279
441. **Xu-Welliver M., Kanugula S., Pegg A.E. (1998)**
Isolation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O6-benzylguanine.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 58 (9), p. 1936–1945
442. **Yang C.P., DePinho S.G., Greenberger L.M., Arceci R.J., Horwitz S.B. (1989)**
Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus.
J. biol. chem., Vol. 264 (2), p. 782–788
443. **Yoshimura A., Kuwazuru Y., Sumizawa T., Ichikawa M., Ikeda S., Uda T., Akiyama S. (1989)**
Cytoplasmic orientation and two-domain structure of the multidrug transporter, P-glycoprotein, demonstrated with sequence-specific antibodies.
J. biol. chem., Vol. 264 (27), p. 16282–16291
444. **Young L.C., Campling B.G., Voskoglou-Nomikos T., Cole S.P., Deeley R.G., Gerlach J.H. (1999)**
Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response.
Clin. cancer res., Vol. 5 (3), p. 673–680
445. **Yu D.S., Chang S.Y., Ma C.P. (1998)**
The expression of mdr-1-related gp-170 and its correlation with anthracycline resistance in renal cell carcinoma cell lines and multidrug-resistant sublines.
Br. j. urol., Vol. 82 (4), p. 544–547
446. **Yu G., Ahmad S., Aquino A., Fairchild C.R., Trepel J.B., Ohno S., Suzuki K., Tsuruo T., Cowan K.H., Glazer R.I. (1991)**
Transfection with protein kinase C alpha confers increased multidrug resistance to MCF-7 cells expressing P-glycoprotein.
Cancer commun. (N.Y.), Vol. 3 (6), p. 181–189
447. **Zager R.A. (2001)**
P glycoprotein-mediated cholesterol cycling determines proximal tubular cell viability.
Kidney int., Vol. 60 (3), p. 944–956
448. **Zaman G.J., Flens M.J., van Leusden M.R., de Haas M., Mulder H.S., Lankelma J., Pinedo H.M. et al. (1994)**
The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 91 (19), p. 8822–8826
449. **Zaman G.J., Lankelma J., van Tellingen O., Beijnen J., Dekker H., Paulusma C. et al. (1995)**
Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein.
Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 92 (17), p. 7690–7694
450. **Zeng H., Bain L.J., Belinsky M.G., Kruh G.D. (1999)**
Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents.
Cancer res. (Baltimore), Vol. 59 (23), p. 5964–5967
451. **Zhang J.T., Duthie M., Ling V. (1993)**
Membrane topology of the N-terminal half of the hamster P-glycoprotein molecule.
J. biol. chem., Vol. 268 (20), p. 15101–15110
452. **Zhang J.T., Ling V. (1991)**
Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by in vitro translation.
J. biol. chem., Vol. 266 (27), p. 18224–18232
453. **Zhang M., Wang G., Shapiro A., Zhang J.T. (1996)**
Topological folding and proteolysis profile of P-glycoprotein in membranes of multidrug-resistant cells: implications for the drug-transport mechanism.
Biochemistry (Easton), Vol. 35 (30), p. 9728–9736
454. **Zochbauer S., Gsur A., Brunner R., Kyrle P.A., Lechner K., Pirker R. (1994)**
P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia.
Leukemia, Vol. 8 (6), p. 974–977

**MUSSET Stéphane – ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'EXPRESSION
DU PHÉNOTYPE MDR DANS LES ESPÈCES HUMAINE ET CANINE.
Thèse Vétérinaire : LYON 2002**

RÉSUMÉ :

Le phénotype MDR semble souvent impliqué dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Il se caractérise par l'apparition d'une chimiorésistance pléiotropique, c'est à dire par la faculté que possèdent certaines cellules à présenter une résistance croisée à des agents cytotoxiques de structures différentes. Ces agents peuvent posséder différents mécanismes d'action. De nombreux mécanismes d'action sont d'ailleurs à l'origine du phénotype MDR au sens large : les caractéristiques tissulaires, des protéines de transport membranaire, l'altération de la cible moléculaire ou du mécanisme de l'apoptose...

Le phénotype MDR au sens strict — aussi appelé phénotype MDR « classique » ou phénotype MDR1 — est caractérisé par l'expression d'une glycoprotéine membranaire de 170 kDa appelée glycoprotéine P. Cette protéine agit comme une pompe transmembranaire créant un efflux actif des agents toxiques hors de la cellule. La distribution de cette protéine dans les tissus sains suggère un rôle physiologique très important de protection et/ou de détoxification de celle-ci. Une surexpression de la gp-P a été retrouvée dans de nombreux types de tumeurs épithéliales mais aussi hématologiques réfractaires aux traitements.

La découverte du phénotype MDR a conduit à l'identification de molécules capables de réverser cette résistance. Ces dernières, sélectionnées sur leur capacité à inhiber la fonction de la gp-P sont nombreuses mais leur toxicité propre en limite le plus souvent l'utilisation clinique.

MOTS CLÉS :

- | | |
|---------------------------------------------------|----------------------------------|
| - GÈNE MDR | - GLYCOPROTÉINE P |
| - CHIEN | - GÈNE MDR1 |
| - PROTÉINES ASSOCIÉES À
RÉSISTANCE MULTIDROGUE | - MULTIRÉSISTANCE
MÉDICAMENTS |

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur SALLES
1 ^{er} Assesseur :	Monsieur le Professeur CHABANNE
2 ^{ème} Assesseur :	Monsieur le Professeur CADORÉ

DATE DE SOUTENANCE :

04 octobre 2002

ADRESSE DE L'AUTEUR :

5 Rue du Puits
55170 SAVONNIÈRES-EN-PERTHOIS