

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

ANNIE VENNE

MODULATION DE LA RÉSISTANCE MULTIPLE AUX DROGUES
CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES (MDR) PAR LE POLYMÈRE DE POLY-
OXYÉTHYLÈNE ET POLY-OXYPROPYLÈNE (POP-POE-POP)

DÉCEMBRE 1996

À mes parents, Lorraine et Rosaire,

À Luc,

À Marc,

Pour leur soutien

Les résultats présentés dans ce mémoire ont été en partie publiés et communiqués sous la forme suivante:

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Premier auteur

Venne A., Shengmin, L., Mandeville, R., Kabanov, A. et Alakov, V. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport and subcellular distribution of doxorubicine in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res.* 56 : 3626-3629 (1996).

Venne A., Shengmin L., Alakhov, V. et Mandeville, R. Modulation de la résistance aux drogues chimiothérapeutiques : effets in vitro d'un complexe de polymère de poly (oxypropylène)- poly (oxyéthylène). Présentation orale. 64^e Congrès de l'ACFAS du 13 au 17 mai 1996. Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

Collaborations

Shengmin, L., Mandeville, R., Alakhov, V. et Venne, A. Augmentation de l'activité anti-tumorale de la doxorubicine lorsque complexée au polymère L61: études in vivo. 64^e Congrès de l'ACFAS du 13 au 17 mai 1996. Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

Alakhov, V., Venne, A., Desrosiers, N. Mandeville, R., Batrakova, E. et Kabanov, A.
Block-copolymer micelles as a drug delivery system effective against MDR
tumours. 19th International Congress of Chemotherapy July 16 to July 21 1995.
Montréal, Québec, Canada.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
SOMMAIRE.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. LA RÉSISTANCE MULTIPLE AUX ANTICANCÉREUX.....	6
2. LES PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA MULTIRÉSISTANCE.....	7
2.1. La P-glycoprotéine.....	7
2.2. La MRP.....	12
2.3. La LRP.....	13
3. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES AGENTS CYTOSTATIQUES.....	14
4. LES AGENTS CHIMIOSENSIBILISANTS.....	15
5. POLYMÈRE DE POLY-OXYÉTHYLÈNE ET POLY-OXYPROPYLÈNE.....	18
5.1. Structure et caractéristiques du polymère.....	19
6. LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL.....	26
6.1. Lignées cellulaires.....	26
6.2. Agents cytotostatiques.....	27

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
1. CULTURE CELLULAIRE.....	31
1.1.Origine des lignées cellulaires.....	31
1.2.Culture des cellules.....	31
2. IMMUNOMARQUAGE DE LA P-gp.....	32
2.1.Préparation des cellules.....	32
2.2.Perméabilisation à l'éthanol.....	32
2.3.Incubation avec l'anticorps.....	33
3. EFFET CHIMIOSENSIBILISANT.....	33
3.1.Incubation avec l'agent cytostatique.....	33
3.2.Test de XTT.....	34
4. TRANSPORT MEMBRANAIRE.....	36
4.1.Accumulation.....	36
4.2.Efflux.....	36
4.3.Analyse au cytofluoromètre.....	37
5. ÉVALUATION DE LA STRUCTURE OPTIMALE DU POLYMÈRE.....	38
6. DISTRIBUTION	39
6.1.Préparation des cellules.....	39
6.2.Microscopie à fluorescence.....	39

RÉSULTATS.....	40
1. IMMUNOMARQUAGE DE LA P-gp.....	41
2. EFFET CHIMIOSENSIBILISANT.....	41
3. TRANSPORT MEMBRANAIRE.....	46
3.1. Accumulation intracellulaire.....	46
3.2. Cinétique d'accumulation.....	52
3.3. Efflux.....	57
4. OPTIMISATION DU POLYMÈRE.....	63
4.1. Titration du polymère.....	63
4.2. Hydrophobicité optimale	66
4.3. Masse moléculaire optimale.....	66
5. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DOXORUBICINE.....	71
DISCUSSION	74
1. EFFET CHIMIOSENSIBILISANT.....	75
2. EFFET DU POLYMÈRE SUR L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE.....	76
3. EFFET DU POLYMÈRE SUR LA DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE.....	77
4. EFFET DU POLYMÈRE SUR L'EFFLUX.....	79
5. CONCENTRATION OPTIMALE.....	80
6. RELATION STRUCTURE-FONCTION.....	81
7. MÉCANISME D'ACTION DU POLYMÈRE.....	82

CONCLUSION.....	84
REMERCIEMENTS.....	87
BIBLIOGRAPHIE.....	90
ANNEXE	100

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Modèle schématique de la P-gp.....	10
Figure 2:	Structure d'une chaîne de polymère de poly-oxyéthylène et poly-oxypropylène.....	20
Figure 3:	Interactions entre le polymère et les agents cytotoxiques.....	23
Figure 4 :	Effet du polymère L61 sur la cytotoxicité de la doxorubicine.....	43
Figure 5 :	Effet du polymère L61 sur l'accumulation intracellulaire d'agents cytotoxiques chez les cellules CH ^R C5 et Aux-B1....	48
Figure 6 :	Effet du polymère L61 sur l'accumulation intracellulaire d'agents cytotoxiques chez les cellules MCF-7 et MCF-7/adr.....	50
Figure 7 :	Effet du polymère L61 sur la cinétique d'accumulation de la doxorubicine chez les cellules CH ^R C5 et Aux-B1.....	53
Figure 8 :	Effet du polymère L61 la sur la cinétique d'accumulation de rhodamine123 chez les cellules CH ^R C5 et Aux-B.....	55
Figure 9 :	Effet du polymère L61 sur l'efflux de rhodamine123 chez les cellules CH ^R C5 et Aux-B1.....	59
Figure 10 :	Effet du polymère L61 sur l'efflux de rhodamine123 chez les cellules CH ^R C5 et Aux-B1 selon sa localisation.....	61

Figure 11 :	Efficacité chimiosensibilisante du polymère L61 selon sa concentration.....	64
Figure 12 :	Efficacité chimiosensibilisante du polymère (POP-POE-POP) selon son hydrophobicité.....	67
Figure 13 :	Efficacité chimiosensibilisante du polymère (POP-POE-POP) selon sa masse moléculaire.....	69
Figure 14 :	Effet du polymère L61 sur la distribution intracellulaire de doxorubicine.....	72
Figure 15:	Immunomarquage de P-gp chez les cellules CH ^R C5 et les Aux-B1.....	101
Figure 16:	Immunomarquage de la P-gp chez les cellules MCF-7 et les MCF-7/adr.....	103

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Famille des gènes de la multirésistance chez différentes espèces.....	8
TABLEAU II	Structure de base des différents polymères	25
TABLEAU III	Comparaison entre la cytotoxicité de la doxorubicine seule et complexée au polymère L61 (Dox/L61) chez deux lignées cellulaires MDR différentes et chez leurs lignées parentales sensibles respectives.....	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ATP	:	adénoside triphosphate
Az	:	azide
BSA	:	albumine de sérum bovin
cm	:	centimètre
dox	:	doxorubicine
FITC	:	isothiocyanate de fluorescéine
IgG	:	immunoglobuline G
kDa	:	kilo Dalton
ml	:	millilitre
mM	:	millimole
mg	:	milligramme
ng	:	nanogramme
nm	:	nanomètre
Na	:	sodium
PBS	:	tampon phosphate salin
p/v	:	poids/volume
min	:	minute
Rho123	:	rhodamine 123
SEM	:	écart à la moyenne

SVF	:	sérum de veau foetal
μg	:	microgramme
μl	:	microlitre
μM	:	micromole
Vrp	:	vérapamil

SOMMAIRE

L'émergence d'une résistance multiple aux agents chimiothérapeutiques constitue un problème majeur lors du traitement d'un cancer. Plusieurs changements physiologiques et biochimiques, de même que plusieurs gènes, semblent être impliqués dans le développement de cette résistance. Toutefois c'est le gène *mdr1* codant pour une glycoprotéine de membrane, la P-gp, qui a suscité le plus d'intérêt au cours de la dernière décennie. La P-gp, agirait en expulsant activement les agents cytotoxiques hors de la cellule. Beaucoup d'efforts sont investis dans le développement d'agents chimiosensibilisants pouvant renverser le phénotype de multirésistance.

Notre travail avait pour but d'étudier *in vitro*, le potentiel chimiosensibilisant d'un polymère de poly-oxyéthylène et de poly-oxypropylène (POP-POE-POP), chez des cellules multirésistantes de différentes origines surexprimant la P-gp. Ce polymère constitue un surfactant inerte et peu toxique, formant des micelles en solution, et pouvant solubiliser et de concentrer les agents cytotoxiques.

Dans un premier temps, les tests de cytotoxicité ont montré que le polymère cause une hypersensibilisation à la doxorubicine chez les cellules multirésistantes humaines, MCF-7/adr, et de hamster, CH^RC5. Les cellules MCF-7/adr et CH^RC5 ont subi une augmentation de leur sensibilité de l'ordre de 700 et 290 fois

respectivement. La sensibilité des cellules parentales MCF-7 et Aux-B1 à la doxorubicine n'a été que très peu affectée par la polymère.

Afin de comprendre comment le polymère exerce son effet hypersensibilisant, nous avons étudié le transport transmembranaire de la doxorubicine et de la rhodamine123 par la cytofluorométrie. Il semble que plusieurs facteurs pourraient expliquer l'hypersensibilisation des cellules MDR, causée par le polymère. Premièrement, le polymère cause une augmentation importante de l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine et de la rhodamine123. Cette augmentation pourrait elle-même s'expliquer par une augmentation de la cinétique d'influx intracellulaire. Deuxièmement, l'étude de l'efflux de rhodamine123 indique que le polymère inhibe la P-gp, mais de façon moins efficace que la vérapamil, un inhibiteur direct de la P-gp. De plus, il semble que l'inhibition de la P-gp par le polymère se fasse du côté externe de la membrane cytoplasmique. Enfin, nous avons visualisé la distribution intracellulaire de la doxorubicine par microscopie à fluorescence. Nous avons constaté que contrairement à la doxorubicine seule, la formulation Dox/L61 ne subit aucune séquestration dans des vésicules cytoplasmiques.

L'étude de l'efficacité du polymère en fonction de sa structure nous a révélé l'importance de la balance hydrophobique et hydrophilique dans la médiation de cette hypersensibilisation. Il semble que seul les polymères hydrophobes à plus

de 50%, soient efficaces pour chimiosensibiliser les cellules MDR et augmenter l'accumulation intracellulaire de la doxorubicine. De plus, l'étude sur l'efficacité du polymère en fonction de sa concentration suggère que les unimères sont responsables de l'effet chimiosensibilisant *in vitro*.

En conclusions, nos résultats suggèrent que l'hypersensibilisation des cellules multirésistantes à la doxorubicine serait causée par une augmentation de l'accumulation intracellulaire et par un changement dans la distribution intracellulaire de la doxorubicine. Il semblerait que les membranes cellulaires soient les principales cibles du polymère. Toutefois, la nature exacte de l'interaction entre les membranes et le polymère, ainsi que celle entre la P-gp et le polymère nous échappe toujours. Ces interactions devront faire l'objet d'une étude plus approfondie.

INTRODUCTION

On estime qu'environ 30 % des Nord-américains développeront un cancer au cours de leur vie. Les thérapies conventionnelles, chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie ont grandement contribué à augmenter la survie des patients atteints de cancer. Toutefois l'émergence de cellules résistantes à la chimiothérapie demeure un problème des plus difficile à résoudre. La chimiothérapie semble exercer une sélection positive, conduisant à l'émergence de cellules résistantes, et à l'insuccès de la thérapie. Une rémission temporaire est souvent suivie ultérieurement d'une rechute.

De plus, cette résistance est croisée, impliquant ainsi plusieurs agents cytostatiques de nature et de mode d'action différents. Il est maintenant admis que plusieurs gènes, tels que le *mdr1*, le MRP et le LRP sont impliqués dans le développement de ce nouveau phénotype appelé MDR (*multiple drug resistance*). Le gène *mdr1* codant pour la P-gp (*Permeability-glycoprotein*), une glycoprotéine membranaire expulsant les drogues chimiothérapeutiques hors de la cellule, est de loin le gène qui a suscité le plus d'intérêt et dont le mécanisme d'action est le mieux défini.

Afin de contrer le phénotype MDR, plusieurs composés chimiosensibilisants ont été développés. Des inhibiteurs directs de la P-gp, des surfactants et des liposomes font actuellement l'objet d'étude *in vitro* et *in vivo*. Malgré l'efficacité de

certaines chimiosensibilisants *in vitro*, leur succès clinique reste limité par leur instabilité ou leur grande toxicité démontré lors des études cliniques.

Un biotransporteur, le polymère de poly-oxyéthylène et poly-oxypropylène (POP-POE-POP) semble très prometteur dans la lutte contre la résistance multiple. Ses caractéristiques pharmacologiques ainsi que son absence de toxicité en font un candidat potentiel pour un usage en clinique. *In vitro*, une étude antérieure, a démontré que ce polymère augmentait significativement l'activité cytotoxique de différentes drogues chimiothérapeutiques avec laquelle il était administré (Supratek Pharma Inc, communication personnelle). Toutefois, la nature de son interaction avec les cellules multirésistantes reste inconnue. De plus, il existe plusieurs types de polymères variant entre eux selon leur structure de base. L'efficacité anti-MDR des différents polymères reste à déterminer.

Dans ce travail, nous avons voulu démontrer dans un premier temps, l'efficacité chimiosensibilisante du polymère c'est-à-dire sa capacité à augmenter l'activité cytotoxique de la doxorubicine, la drogue chimiothérapeutique la plus utilisée dans le traitement de tumeurs solides. Nous avons utilisé pour ce faire, des lignées cellulaires surexprimant la P-gp. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de déterminer le mécanisme d'action du polymère en étudiant principalement son effet sur le transport transmembranaire d'agents cytostatiques fluorescents, en particulier la doxorubicine et la rhodamine123. Ce projet de recherche visait également l'établissement d'une relation entre la structure du polymère de poly-

oxyéthylène et poly-oxypropylène (POP-POE-POP) et son activité chimiosensibilisante.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA RÉSISTANCE MULTIPLE AUX AGENTS ANTI-CANCÉREUX

Il existe plusieurs types de résistance aux agents anti-cancéreux, décrites dans la littérature. Parmi celles-ci, la résistance multiple ou mutirésistance (MDR), définie comme étant une résistance croisée étendue à des agents cytostatiques de famille et de mode d'action différent, est probablement celle qui suscite le plus d'intérêt. Ce sont Biedler et Riehm (1970) ainsi que Ling et Thompson (1974) qui ont observé les premiers que des lignées tumorales de rongeurs, exposées de façon prolongée à des doses croissantes d'un agent cytostatique, devenaient d'emblée résistantes à d'autres agents cytostatiques auxquels elles n'avaient jamais été exposées. Ces cellules présentaient un nouveau phénotype, caractérisé par une réduction de l'accumulation intracellulaire des agents cytostatiques (Dano, K. 1973). Par la suite il a été démontré que plusieurs changements biochimiques et physiologiques pouvaient être responsables seuls ou simultanément de ce nouveau phénotype. Toutefois, dans les modèles d'étude *in vitro*, ce sont certaines protéines, telles que la P-gp, la MRP et plus récemment la LRP qui sont davantage associées au phénomène MDR.

2. LES PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA MULTIRÉSISTANCE

2.1. La P-glycoprotéine

Ling et collaborateurs identifièrent une glycoprotéine membranaire de 170 kDa, la P-glycoprotéine (*Permeability glycoprotein*) absente chez les cellules parentales sensibles aux agents cytostatiques, mais présente chez les cellules multirésistantes (Juliano et Ling, 1976; Ling et coll., 1983). Certains anticorps monoclonaux reconnaissent la P-gp du hamster, de la souris, et de l'homme, montrant ainsi une certaine conservation de la structure entre ces espèces (Kartner et coll., 1985). L'émergence du phénotype MDR est dû à l'expression d'une famille de gènes. Chez l'homme, le gène *mdr1* (Shen et coll., 1986) code pour une P-gp fonctionnelle expulsant les agents cytostatiques hors de la cellule. D'ailleurs la transfection de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène *mdr1* semble conférer un phénotype complet de multirésistance aux cellules sensibles (Gros et coll., 1986). Chez la souris, les gènes *mdr1a* et *mdr1b* codent pour deux formes différentes de la P-gp qui confèrent toutes deux le phénotype complet de multirésistance. Par contre, chez le hamster seul le gène *P-gp1* code pour une protéine conférant ce phénotype (Devault et Gros, 1990; Endicott et coll., 1991). Le tableau I présente un résumé de la famille des gènes impliqués dans la multirésistance chez ces différentes espèces.

TABLEAU I : Famille des gènes de la multirésistance chez différentes espèces

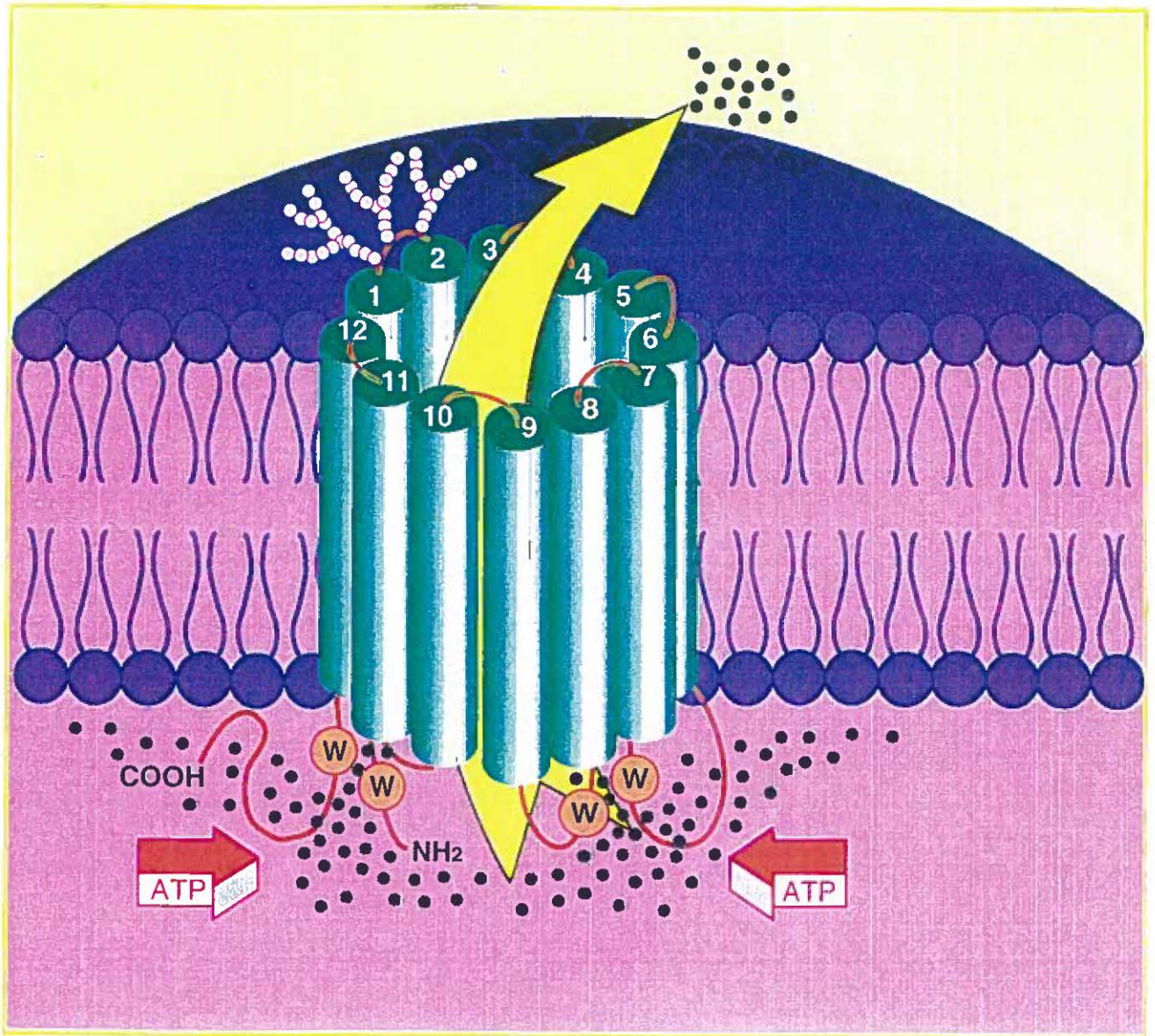
Espèce	Classe I	Classe II	Classe III
Humain	MDR1*	—	MDR2
Souris	Mdr1a*	Mdr1b*	Mdr2
Hamster	Pgp1*	Pgp2*	Pgp3

* La P-glycoprotéine produite par de les gènes ci-dessus confère un phénotype complet de multirésistance.

La séquence en acides aminés de la P-gp révèle que celle-ci est composée de deux parties homologues avec des régions transmembranaires et un site de glycosylation en N' terminal (Chen et coll., 1986). Le profil d'hydropathie de la P-gp montre que les deux parties homologues qui la compose contiennent un domaine hydrophobe formé de six segments transmembranaires (Zhang et coll., 1993). Certains groupes de chercheurs émettent l'hypothèse d'un gène ancestral commun à la P-gp et aux membres de la superfamille des transporteurs ABC (pour *ATP-binding-cassette*), partie qui se serait dupliquée au cours de l'évolution (Higgins, 1992). Ce modèle de la P-gp consistant en six segments transmembranaires reste cependant controversé; un modèle alternatif suggère la présence de quatre segments transmembranaires (Skach et coll. 1993). La P-gp possède également deux sites intracytoplasmiques de liaison à l'ATP lui permettant d'expulser les agents cytostatiques à l'extérieur de la cellule contre un gradient de concentration (Hamada et coll, 1988). Le mécanisme exact de liaison et d'excrétion des agents antitumoraux n'est pas encore élucidé. La reconnaissance et l'excrétion par la P-gp de plusieurs composés chimiques de structure et de fonctions diverses demeure l'un des aspects les plus énigmatiques de la fonction de cette protéine. Des expériences de photomarquage utilisant des analogues photoactivables des médicaments ainsi que des anticorps dirigés contre certains épitopes de la P-gp révèlent la présence de deux sites majeurs de liaison des médicaments, un dans chaque moitié de la P-gp au niveau des domaines transmembranaires 6 et 12 (Bruggemann et coll., 1992; Greenberger, 1993). Il a également été suggéré que la

Figure 1 Modèle schématique de la P-gp

Modèle topologique tridimensionnel de la P-gp d'après Zhang et collaborateurs (1993) (adaptation de Michael Popkov).



P-gp pourrait changer de conformation selon la fonction accomplie et le substrat transporté, et que la structure conformationnelle de la P-gp pourrait être sous l'influence de facteurs solubles cytoplasmiques (Zhang et coll., 1993). La Figure 1 présente le modèle de la P-gp de Ling et collaborateurs (1983) actuellement le plus admis.

Les différents gènes *mdr* sont exprimés dans l'organisme sous un contrôle tissulaire précis. La P-gp est présente, entre autre au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Cordon-Cardo et coll.1989), les glandes surrénales, le foie et le pancréas (Fojo et coll.,1987; Bradley et coll.,1990). Cette distribution suggère que la P-gp pourrait avoir un rôle dans la protection de la cellule contre les xénobiotiques ou bien même au niveau de la sécrétion et le transport d'hormones ou de petits peptides. Toutefois, la P-gp qui semble présenter un avantage évolutif devient cependant un obstacle lors d'un traitement chimiothérapeutique.

2.2 La MRP

Plusieurs groupes de recherche ont rapporté l'existence de cellules multirésistantes n'exprimant pas la P-gp (McGrath et Center, 1988; Cole et coll., 1991). Toutefois seulement certaines de ces cellules montrent une réduction de l'accumulation des agents cytostatiques au niveau intracellulaire. De plus, le taux d'expression de la P-gp n'est cliniquement pas toujours associé au degré de

résistance de la tumeur (Maslak et coll., 1994; Finnegan et coll., 1995); cela suggère l'implication d'autres mécanismes. En 1992, Cole et collaborateurs identifièrent une protéine membranaire de 190 kDa, la MRP (*Multidrug-Resistance associated Protein*) qui semble être surexprimée chez des cellules multirésistantes pulmonaires d'origine humaines. La MRP qui appartient aussi à la superfamille des ABC transporteurs, se situe au niveau transmembranaire et expulse activement les agents cytostatiques hors de la cellule (Zaman et coll., 1994). Toutefois, la P-gp et la MRP ne semblent pas avoir la même affinité pour les agents anti-cancéreux (Feller et coll., 1995). De plus, la MRP peut être exprimée seule ou simultanément avec la P-gp, et les gènes de ces deux protéines, semblent être régulés de façon différentes (Burger et coll., 1994; Shuurhuis et coll., 1995).

2.3 La LRP

Scheper et collaborateurs (1993) identifièrent chez l'homme, la LRP (*Lung Resistance-associated Protein*), une protéine cytoplasmique surexprimée chez les cellules multirésistantes pulmonaires. Cette protéine, isolée par la suite à partir des vésicules cytoplasmiques, s'avère faire partie des *vaults* qui sont des ribonucléoprotéines impliquées dans le transport entre le noyau et le cytoplasme (Scheffer et coll., 1995). La LRP semble être surexprimée chez toutes les cellules multirésistantes et le degré d'expression fournirait cliniquement le niveau de résistance à la chimiothérapie (Izquierdo et coll., 1995).

3. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES AGENTS CYTOSTATIQUES

Plusieurs groupes de recherche ont rapporté que la distribution intracellulaire des anthracyclines jouerait un rôle important dans la résistance multiple. En effet, Schuurhuis et collaborateurs (1991), ont observé que le ratio de distribution noyau/cytoplasme de la doxorubicine est plus faible chez les cellules multirésistantes, comparativement aux cellules sensibles, et que ce processus est indépendant de la présence de P-gp. Il semble aussi que les anthracyclines en général, soient séquestrées dans des vésicules intracytoplasmiques, les empêchant ainsi de se rendre au noyau (Gervasoni, et coll., 1991; Marquart et Center, 1992; Sognier et coll., 1994). Le mécanisme précis responsable de la séquestration des agents cytostatiques dans des vésicules cytoplasmiques restent toutefois indéterminé. Il semblerait que les protéines LRPs pourraient être impliquées dans ce processus de séquestration (Scheffer et coll., 1995). De plus, dans ces vésicules présentant un pH très acide, les anthracyclines semblent subir une protonation, les empêchant de traverser la membrane des vésicules pour atteindre leur cible (Schindler et coll., 1996). Par ailleurs, les agents cytostatiques séquestrés dans les vésicules peuvent également être expulsés de la cellule via le processus d'exocytose qui contribue à diminuer le contenu intracellulaire (Dietel et coll., 1990).

Une augmentation du pH au niveau du cytoplasme des cellules multirésistantes a également été rapportée et pourrait constituer un changement physico-chimique important (Simon et Schindler, 1994). La plupart des agents chimiothérapeutiques étant des faibles bases avec une affinité pour les milieux acides, il a été proposé que ce changement de pH pourrait être impliqué dans l'émergence de la résistance multiple.

Cette brève revue montre la complexité du phénotype MDR. Dans les modèles d'étude *in vitro*, cette résistance semble être le résultat d'une surexpression de plusieurs protéines différentes, la P-gp, la MRP et la LRP. Un changement dans la distribution intracellulaire des drogues et possiblement une variation au niveau du pH cytoplasmique semblent également être impliqués dans l'émergence du phénotype MDR.

4. LES AGENTS CHIMIOSENSIBILISANTS

Afin de sensibiliser les cellules multirésistantes aux agents chimiothérapeutiques, plusieurs approches sont déjà établies, d'autres sont en cours de développement. Plusieurs groupes de composés appelés agents chimiosensibilisants ont en effet, la capacité de sensibiliser *in vitro* les cellules multirésistantes. Mentionnons certains inhibiteurs des canaux calciques, quelques inhibiteurs des calmodulines, la cyclosporine A et la trifluoropérazine. Ces

composés affectent principalement l'activité de la P-gp, leur activité s'effectuant souvent via une inhibition compétitive de l'expulsion de l'agent cytostatique (Georges et coll., 1990). La vérapamil, par exemple, compétitionne avec les agents chimiothérapeutiques pour leur site de liaison à la P-gp (Safa, 1988). En présence de concentrations croissantes d'un composé chimiosensibilisant, tel que la vérapamil, l'activité cytotoxique de l'agent chimiothérapeutique est grandement accrue (Willingham et coll., 1986). Dans certaines conditions, l'IC₅₀ (concentration à laquelle 50% de la prolifération cellulaire est inhibé) de cet agent chimiothérapeutique approche parfois celui des cellules sensibles. Toutefois le potentiel de sensibilisation de la vérapamil dépend souvent du type d'agent chimiothérapeutique avec lequel elle est administrée (Beck et coll., 1986). Notons toutefois que la vérapamil et la trifluoropérazine se sont toutes deux montrées cliniquement inefficaces lorsqu'utilisées chez des patients dont les tumeurs étaient multirésistantes. Ces échecs peuvent être dû, d'une part aux doses sub-optimales utilisées (la toxicité de ces produits étaient très élevée) ou bien à la présence d'autres mécanismes impliqués dans la multirésistance.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des domaines de la P-gp pourrait être une deuxième approche visant à inhiber l'action de la P-gp. Hamada et Tsuruo (1986) ont démontré que l'anticorps MRK-16, sensibilisait les cellules MDR à certains agents cytostatiques en augmentant l'accumulation de ces agents à l'intérieur de la cellule via une inhibition de l'activité de la P-gp.

Par ailleurs, un certain nombre de surfactants naturels ou synthétiques démontrent une activité de sensibilisation chez des cellules multirésistantes. Pharmacologiquement ces composés sont intéressants puisqu'ils sont relativement inertes. En effet, il a été démontré que les détergents non-ioniques tels que le Triton-X-100, le Tween 80, et le crémosphore EL peuvent sensibiliser les cellules multirésistantes (Schuurhuis et coll., 1990; Woodcock et coll., 1992; Zordan-Nudo et coll., 1993). Il est intéressant de noter que tous les surfactants ayant des propriétés anti-MDR possèdent une chaîne hydrophile de poly-oxyéthylène attachée à un noyau hydrophobe. Le mécanisme d'action de ces composés demeure toutefois méconnu. Certaines études suggèrent la modification de la fluidité membranaire des cellules résistantes (Woodcock et coll., 1992; Dudeja et coll., 1995). D'autre part, Zordan-Nudo et collaborateurs (1993) ont montré que plusieurs de ces détergents non-ioniques tel que le Triton-X-100 inhibent la liaison de la P-gp aux agents cytostatiques.

Des ionophores tels que le monensin et le nigericin semblent être des agents sensibilisants très efficaces puisqu'ils bloquent l'efflux des agents cytostatiques hors des cellules multirésistantes. Ces molécules exercent leur activité surtout au niveau de l'exocytose et de la sécrétion (Sehested et coll., 1988). Toutefois, les ionophores et certains surfactants ont un usage limité puisque leur administration *in-vivo* chez des souris induit souvent une réaction de choc septique. D'autre part, le Tween 80, le crémosphore EL et le Solutol semblent être

plus sécuritaires pour des injections intraveineuses à des concentrations effectrices (Woodcock et coll., 1992).

Les liposomes, sont des vésicules lipidiques se formant spontanément lorsqu'ils sont en milieu aqueux (Weinstein et Leserman, 1984). Ils sont inertes et peu toxiques. Différentes techniques permettent, d'encapsuler à l'intérieur des liposomes différents composés chimiothérapeutiques ou des oligo-antisens (Thierry et coll., 1993a). *In vitro*, plusieurs formulations de doxorubicine/liposomes peuvent ainsi abolir le phénotype MDR (Fan et coll., 1990; Thierry et coll., 1993b). Par contre, le problème principalement rencontré lors de la formulation de ces biotransporteurs, est le manque d'affinité de plusieurs agents chimiothérapeutiques pour les liposomes. De plus, ces composés sont pharmacologiquement instables, et leur succès *in vivo* est limité à certains types de cancer seulement (Priebe et Perez-Soler, 1993).

5. POLYMÈRE DE POLY-OXYÉTHYLÈNE ET POLY-OXYPROPYLÈNE

Afin d'augmenter *in vivo* l'apport de neuroleptiques à travers la barrière hémato-encéphalique, Kabanov et collaborateurs proposèrent une nouvelle approche utilisant un surfactant polymérique de poly-oxyéthylène et poly-oxypropylène (POP-POE-POP; aussi connu sous le nom de Pluronic) (Kabanov et coll., 1989; Kabanov et coll., 1992). Ce surfactant qui forme une micelle en solution

semble renverser le phénotype MDR *in vitro* chez des cellules de carcinomes ovariens d'origine humaine, exprimant la P-gp (Page et Alakhov, 1992). La façon par laquelle un tel surfactant polymérique affecte le phénotype MDR reste cependant inconnu.

5.1 Structure et caractéristiques du polymère

Le polymère de poly-oxyéthylène et poly-oxypropylène représente un surfactant non-toxique utilisé dans des formulations de sang artificiel (Lowe et Armstrong, 1990) et comme adjuvant immunitaire pour l'administration de vaccin (Byars et Allison, 1987). Ce polymère semble également constituer un transporteur efficace pour plusieurs agents cytostatiques (Kabanov et coll., 1992).

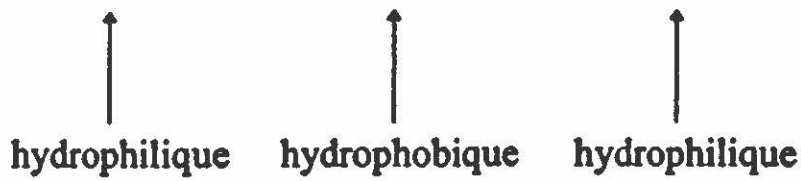
La Figure 2a présente la structure d'une chaîne de polymère. La partie centrale composée de plusieurs résidus d'oxypropylène constitue la partie hydrophobique du polymère et se lie de façon non-covalente aux agents cytostatiques. La partie externe, hydrophilique, du polymère est quant à elle formée de plusieurs résidus d'oxyéthylène. La Figure 2b montre qu'en effet, le polymère solubilise les composés qui sont insolubles dans l'eau, comme c'est le cas de la plupart des agents chimiothérapeutiques. Les micelles qui résultent de cette incorporation ont une taille qui varie entre 12-35nm dépendant de la structure de

Figure 2. Structure d'une chaîne de polymère de poly-oxypropylène et poly-oxyéthylène

a. Structure de base d'une chaîne de polymère. Elle est composée d'un nombre y de résidus d'oxypropylène (POP) hydrophobes constituant la partie centrale, et d'un nombre x et z de résidus d'oxyéthylène (POE) de chaque côté. **b.** En solution le polymère forme un agrégat de type micellaire avec une partie centrale fortement hydrophobe constitué principalement de POP. La partie centrale de POP solubilise la plupart des composés insolubles dans l'eau, comme plusieurs agents chimiothérapeutiques.

A

Structure du polymère



B



(Supratek Pharma Inc., 1989)

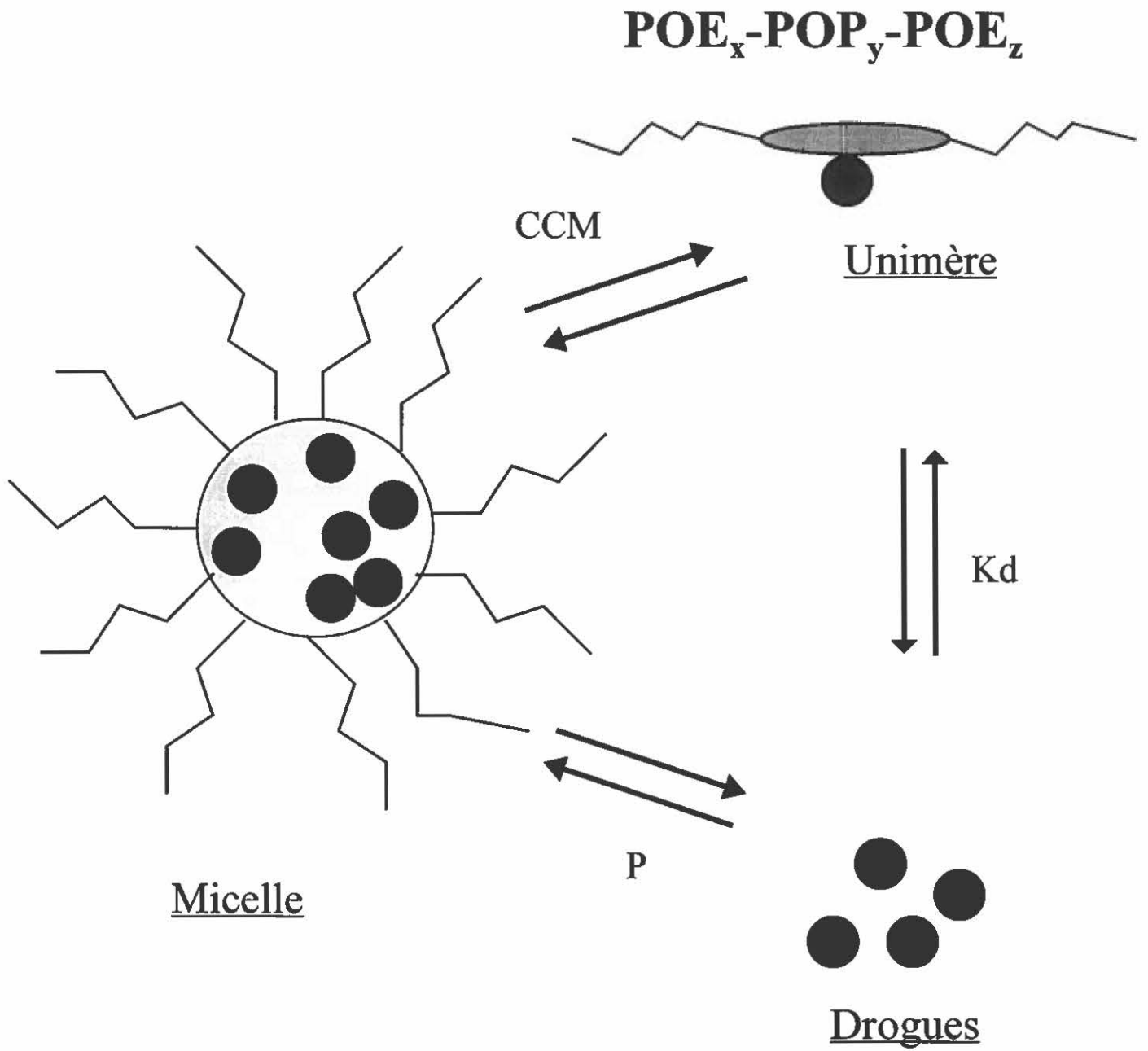
base du polymère. La micelle qui résulte est composée d'un centre fortement hydrophobe, qui devient de plus en plus hydrophile à mesure que l'on approche la périphérie.

En fait l'agent chimiothérapeutique et le polymère en solution constituent un système à trois composantes thermodynamiquement stables et en équilibre (Figure 3). À faible concentration le polymère est sous une forme unimérique. L'augmentation graduelle de la concentration du polymère en solution, permet à celui-ci d'atteindre une concentration critique de micellisation (CCM) à partir de laquelle, la première micelle est formée. L'agent chimiothérapeutique peut interagir avec le polymère soit sous sa forme monomérique ou sous sa forme micellaire, selon des constantes différentes. L'agent chimiothérapeutique interagit avec la forme monomérique selon une constante de dissociation K_d et avec la forme micellaire selon une constante P représentant la proportion de la drogue incorporée par rapport à la proportion de drogue libre en solution. Ces deux constantes dépendent directement de la structure de base du polymère.

Il existe plusieurs types de polymères de POP-POE-POP variant selon le nombre de résidus de POP et de POE. Le Tableau II illustre différents polymères possédant une structure de base différente. La variation de la structure de base du polymère permet de faire varier certains paramètres tels que la masse moléculaire, la balance hydrophilique-lipophile (BHL), la température critique de micellisation (TCM), la concentration critique de micellisation (CCM) ainsi que les constantes

Figure 3. Interactions entre le polymère et les agents cytotoxiques

A faible concentration, le polymère se présente sous une forme unimérique. Au fur et à mesure que la concentration du polymère augmente en solution celui-ci atteint une concentration critique de micellisation (CCM) à partir de laquelle le premier agrégat de type micellaire est formé. Les agents cytotoxiques peuvent interagir avec le polymère à la fois sous sa forme unimérique et micellaire. L'agent s'associe à la chaîne unimérique selon une constante K_d . L'agent s'associe également avec la partie centrale hydrophobe de la micelle selon une constante P . Ces constantes sont directement dépendantes de la structure de base de la chaîne de polymère c'est-à-dire du nombre de résidus de POP et POE composant chacune des parties.



(Supratek Pharma Inc., 1989)

TABLEAU II : Structure de base des différents polymères

Polymère	y^a	$x+z^b$	hydrophobicité (%)	hydrophilicité (%)
L61	1 750	195	90	10
L81	2 250	250	90	10
P84	2 250	1 500	60	40
P85	2 250	2 250	50	50
F87	2 250	5 250	30	70
L101	3 100	345	90	10
L121	3 700	411	90	10

^a La valeur de y représente le poids moléculaire de la partie hydrophobe de polyoxypropylène (POP)

^b La valeur de $x+z$ représente le poids moléculaire des deux parties hydrophiles de polyoxyéthylène (POE)

d'association entre l'agent chimiothérapeutique et le polymère (Kabanov, et coll., 1995). Il est possible que la variation de certains de ces paramètres influence les propriétés du polymère, entre autre son action anti-MDR. Une étude *in vivo* a démontré que le polymère L61 semble être le plus efficace (Batrakova et coll., 1996). C'est ce polymère que nous utiliserons pour la majorité de nos expériences. Toutefois jusqu'à présent, aucune étude *in vitro* ne s'est penchée sur la relation structure/propriété anti-MDR du polymère.

6. LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL

6.1 Lignées cellulaires

L'étude *in vitro* du phénomène de la multirésistance a nécessité l'établissement de nombreux modèles expérimentaux. Ainsi, il existe une grande quantité de lignées cellulaires MDR humaines et de rongeurs, sélectionnées par un traitement à des doses croissantes d'un agent cytostatique. L'origine tissulaire, ainsi que l'agent de sélection font en sorte que le phénotype MDR de ces lignées cellulaires diffèrent beaucoup .

Ling et Thompson (1974) sélectionnèrent un grand nombre de cellules multirésistantes à partir des cellules parentales sensibles Aux-B1, provenant elles-mêmes des sous-clones des cellules CHO (cellules ovariennes de hamster chinois). Les cellules Aux-B1 furent soumises à un agent mutagène puis exposées

à des doses croissantes d'un agent cytostatique, la colchicine. Les CH^RC5 et d'autres sous-clones présentant le phénotype MDR furent obtenus. Les cellules CH^RC5 possèdent une grande résistance à divers agents cytostatiques et surexpriment la P-gp (Ling et coll., 1983). Ces cellules représentent un bon modèle d'étude *in vitro*, et ont été utilisées dans un bon nombre de travaux portant sur la P-gp (Riordan, et coll., 1985; Kartner et coll., 1985). Dans notre étude sur le polymère nous utiliserons la lignée multirésistante CH^RC5 et la lignée parentale sensible, Aux-B1.

Nous utiliserons également les cellules MCF-7/adr qui dérivent d'adénocarcinomes mammaires malins prélevés d'une patiente lors de la chirurgie (Soule et coll., 1973). Les cellules ont été sélectionnées par une exposition à des doses croissantes d'adriamycine (nom commerciale de la doxorubicine) (Batist et coll., 1986). Ces cellules présentent un phénotype MDR et surexpriment la P-gp et leur facteur de résistance à la doxorubicine est élevée (Fairchild et coll., 1987; Moscow et coll., 1989).

6.2 Agents cytostatiques

La doxorubicine et la daunorubicine sont des anthracyclines isolées de différentes espèces de *Streptomyces*. Elles possèdent des anneaux aromatiques

et diffèrent entre elles par un seul groupement terminal. La doxorubicine est utilisée pour le traitement de divers tumeurs solides (Pratt et coll., 1994).

La liaison non-covalente de la doxorubicine à l'ADN constitue le mécanisme de cytotoxicité de cette drogue. La résistance à la doxorubicine semble être principalement dû à la présence de la P-gp, toutefois d'autres mécanismes spécifiques aux anthracyclines pourrait intervenir. Ces mécanismes étant: (a) la diminution de l'activité de la topoisomérase II (Deffie et coll., 1989) (la topoisomérase II clive le complexe formé entre le brin d'ADN et la drogue), (b) l'augmentation de l'activité de l'enzyme de détoxification glutathione-s-transférase (Batist et coll., 1986). Dans notre étude, la doxorubicine sera utilisée comme agent cytostatique afin d'évaluer l'effet chimiosensibilisant du polymère.

La doxorubicine est un composé naturellement fluorescent donc facilement utilisée en cytofluorométrie. Elle peut-être excitée par un laser à argon de 488 nm et émet à une longueur d'onde maximale de 590 nm. Par contre, cette fluorescence diminue lorsqu'elle se lie à l'ADN, phénomène pouvant limiter l'interprétation des résultats de transport membranaire.

L'accumulation intracellulaire totale d'un agent cytostatique, dépend de deux paramètres : la pénétration de l'agent cytostatique à travers la membrane cytoplasmique (l'influx) et la sortie de l'agent (efflux). Cet efflux peut être dû à une simple diffusion passive dans le sens du gradient de concentration où à une

expulsion active contre le gradient de concentration dû à la présence d'une pompe comme la P-gp. Les agents chimiosensibilisants peuvent augmenter l'accumulation intracellulaire des agents cytotoxiques en modifiant soit leurs influx ou leurs efflux, ou les deux simultanément. La rhodamine123 est un agent cytotoxique fluorescent largement utilisé pour l'étude du transport membranaire et pour mesurer l'activité de la P-gp. Elle possède entre autres caractéristiques, une grande affinité pour la P-gp. (Feller et coll., 1995; Dudeja et coll.,1995). Contrairement à la doxorubicine qui subit une baisse de sa fluorescence lorsqu'elle se lie à l'ADN, la rhodamine123 s'accumule principalement dans les mitochondries et ne se rend pas au noyau (Bernal et coll., 1982). Elle est excitable par un laser à argon et l'émission maximale se situe à 525nm. Des résultats préliminaires obtenus par Supratek Pharma Inc. (communication personnelle) indiquent que la doxorubicine et la rhodamine123 possèdent une affinité similaire pour le polymère. Ces deux agents cytotoxiques seront utilisés dans cette étude afin de mesurer l'effet chimiosensibilisant du polymère.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1 Origine des lignées cellulaires

Les cellules Aux-B1 (parentales sensibles) et CH^RC5 (multirésistantes) proviennent du laboratoire du Dr. Ling (Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada). Les cellules MCF-7 et MCF-7/adr proviennent du laboratoire du Dr. Dritchillo (Georgetown University, Washington, E.U.).

1.2 Culture des cellules

Les cellules Aux-B1 et les CH^RC5 sont cultivées en milieu α -MEM (Gibco) et les cellules MCF-7 et MCF-7/adr sont cultivées en milieu RPMI1640. Tous les milieux sont enrichis de 10% de SVF et de 1% de HEPES. Ces cellules adhérentes ont été maintenues en culture dans des flasques de polystyrène de 25 ou 75 cm² (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada) dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂. À chaque confluence les cellules sont détachées par une méthode standard de trypsinisation (Freshney, 1988) en utilisant de la trypsine:EDTA à 0.25% (Gibco) et remises en culture à une dilution de 1/5 pour les Aux-B1 et les CH^RC5 et de 1/10 pour les MCF-7 et MCF-7/adr. Les cellules Aux-B1 et CH^RC5 sont détachées tout les 2 à 3 jours tandis que les cellules MCF-7 et les MCF-7/adr sont détachées tout les 4 à 5 jours.

2. IMMUNOMARQUAGE DE LA P-gp

Nous avons procédé à une méthode d'immunomarquage en utilisant l'anticorps monoclonal C-219 (Signet Laboratories Inc, Massachussetts) qui reconnaît un épitope intracytoplasmique conservé chez les différentes espèces (Kartner et coll., 1985) afin de nous assurer de la surexpression de la P-gp chez les cellules multirésistantes CH^RC5 et MCF-7/adr dont nous disposions.

2.1. Préparation des cellules

Les cellules ont d'abord été trypsinées selon la méthode d'exclusion au bleu de trypan, comptées à l'hémacymètre, puis lavées. Afin de bloquer les sites non-spécifiques, le culot de cellules fut incubé avec 100 µl de sérum de souris normal (Sigma Immunochemicals) pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans du milieu complet contenant 0.02% d'azide de sodium puis distribuées dans des eppendorfs à raison de 1×10^6 cellules par eppendorf.

2.2. Perméabilisation à l'éthanol

Après deux lavages au PBS, les cellules ont été perméabilisées avec 1 ml d'éthanol 70%, préalablement refroidi à -20°C, sous agitation douce. Les cellules ont ensuite été placées au congélateur à -20°C pendant exactement 10 minutes.

Les cellules ont été lavées dans un milieu de blocage (PBS + BSA 1% + Az de Na 0.02%) trois fois puis resuspendues dans 100µl de PBS + Tween 80, 0.5%.

2.3. Incubation avec l'anticorps

L'anticorps C-219 ou l'anticorps contrôle isotypique IgG_{2A} (Cedarlane Laboratories, Canada) tous deux couplé au FITC ont été ajoutés à 1×10^6 cellules (3 µl d'une solution stock de 100µg/ml pour les deux anticorps). L'incubation s'est déroulée pendant 1 heure à 4°C dans le noir, suivie de 3 lavages au milieu de blocage. Les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de PBS. Les échantillons ont immédiatement été analysés au cytofluoromètre (Coulter, Epics C ou Epics XL) en utilisant un filtre de 525 nm. Les résultats sont présentés en Annexe.

3. EFFET CHIMIOSENSIBILISANT

3.1. Incubation avec l'agent cytotatique

Les cellules (3000/puit) sont placées dans une plaque de 96 puits avec 200µl de milieu complet et incubées à 37°C jusqu'au lendemain afin de permettre leur réattachement. Une solution de doxorubicine (Sigma, Illinois) (1mg/ml) est préparée le jour même de l'essai dans de l'eau distillée. Des dilutions successives (1/5) sont préparées dans du milieu complet et ajoutées aux cellules. La concentration maximale de doxorubicine (250000ng/ml pour les cellules résistantes

et 1000ng/ml pour les cellules sensibles) est ajoutée aux cellules de la rangée A. La rangée H quand à elle constitue le contrôle sans doxorubicine. Dans les expériences utilisant le polymère (BASF Inc., Parsippany, N.J.) celui-ci est ajouté simultanément à tous les puits incluant un contrôle avec polymère et sans doxorubicine. La doxorubicine seule ou complexée avec le polymère est incubée avec les cellules pendant 2 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS (Gibco) puis remises en culture pour 4 jours dans du milieu complet.

3.2. Test de XTT

Afin d'évaluer l'effet cytotoxique, le test de XTT proposé par Scudiero (1988) à été utilisé. Le XTT est un sel de tétrazolium métabolisé par la cellule permettant la lecture directe de l'absorbance sans étape de solubilisation. L'addition de phénazine methosulfate (PMS) permet une meilleure réduction du XTT. Brièvement, une solution de XTT (1mg/ml) et une solution de PMS (1.54 mg/ml) sont préparées dans du PBS. Pour chaque 1ml de solution de XTT, 5 μ l de solution de PMS est ajoutée. Par la suite, 50 μ l de cette solution (XTT/PMS) est ajoutée dans chaque puit contenant 200 μ l de milieu complet. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 1 à 2 heures. L'absorbance est ensuite déterminée à 450 nm. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicata. L'IC₅₀ de la doxorubicine seule ou avec le polymère a été déterminée pour chaque lignée cellulaire. Le calcul de l'IC₅₀ s'est effectuée comme suit:

Rangée A : 100% d'inhibition de la prolifération = **Bruit de fond**

Rangée H: 0% d'inhibition de la prolifération = **prolifération maximale**

Première étape : Soustraction du bruit de fond : $(H-A) = H'$

$$(G-A) = G'$$

$$(F-A) = F' \text{ etc...}$$

$$(A-A) = A' \text{ (c'est-à-dire 0)}$$

Deuxième étape : Calcul du % de la prolifération maximale

$$A'/H' \times 100$$

$$B'/H' \times 100$$

$$C'/H' \times 100 \text{ etc..}$$

Troisième étape: Présentation d'un graphique du % de la prolifération maximale en fonction de la concentration de doxorubicine. La concentration de doxorubicine correspondant sur le graphique à 50 % de la prolifération cellulaire maximale constitue l'IC₅₀

4. TRANSPORT TRANSMEMBRANAIRE

4.1 Accumulation intracellulaire

Les cellules dans leur phase exponentielle de croissance ont été trypsinées. Par la suite $2,5 \times 10^5$ cellules ont été incubées avec la doxorubicine ($10 \mu\text{g/ml}$) ou de la rhodamine 123 ($0,5 \mu\text{M}$). Les cellules ont été incubées à 37°C avec les drogues seules ou en présence de $50 \mu\text{M}$ de vérapamil ou de 0,1% (p/v) de polymère L61 durant différentes périodes de temps afin d'établir une cinétique d'accumulation. Après l'incubation, les cellules ont été placées sur la glace et lavées 2 fois avec du PBS froid. L'analyse de l'accumulation à l'intérieur des cellules est effectuée immédiatement par cytofluorométrie.

4.2. Efflux

La détermination de l'efflux de rhodamine123 en fonction du temps a été réalisée selon un protocole adapté de Krishan (1990). Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été trypsinées et comptées. Chaque tube correspondant à une courbe d'efflux contenait 2×10^6 cellules. Par la suite les cellules furent incubées avec la rhodamine123 ($0,5 \mu\text{M}$) seule ou avec $50 \mu\text{M}$ de vérapamil ou 0,1% de polymère L61, pendant 60 minutes à 37°C . Les cellules ainsi chargées ont été mises sur glace et lavées au PBS froid et gardées sur glace jusqu'au début de l'efflux. Les cellules ont été resuspendues dans du milieu sans

rhodamine123 ou contenant de la vérapamil ou du polymère L61 à la même concentration qu'utilisée précédemment. Les cellules ont été par la suite placées sur un chauffe-module à 37°C disposé près de l'appareil de cytofluorométrie. Après différents temps d'incubation un échantillon de 10000 cellules a été collecté et analysé au cytofluoromètre. L'efflux a été mesuré indirectement par une courbe du taux de rétention intracellulaire de la fluorescence en fonction du temps par rapport au temps initial (0 minute). Les expériences ont été répétées au moins 2 fois et les valeurs sont accompagnées de leur valeur de SEM. La fluorescence a été normalisée selon le volume des cellules, et selon la formule donnée ci-dessous (section 4.3)

4.3. Analyse au cytofluoromètre

L'ensemble des expériences de transport transmembranaire a été effectué sur le cytofluoromètre Coulter Epics XL du service de cytofluorométrie de l'IAF équipé d'un laser à argon émettant à 488 nm. Un filtre à 525 nm (FL1) a été utilisé dans le cas de la rhodamine123, tandis que pour la doxorubicine un filtre à 620nm (FL3) a été utilisé. Les expériences ont été répétées au moins 2 fois et la valeur de SEM a été déterminée pour chacun des points sur la courbe. Afin de tenir compte du volume variable des cellules des différentes lignées cellulaires, nous avons normalisé par une méthode suggérée par Luk et Tannock (1989) selon

laquelle la fluorescence moyenne donnée par le canal moyen de fluorescence est divisée par la taille moyenne des cellules.

Canal moyen de fluorescence = fluorescence moyenne par unité de volume
(Forward light scatter) de la cellule

Pour la génération de chaque histogramme, 10 000 cellules ont été analysées.

5. ÉVALUATION DE LA STRUCTURE OPTIMALE POLYMÈRE

Nous disposons de plusieurs polymères de POE-POP-POE différant entre eux par leur structure de base. Nous évaluerons l'efficacité de chacun à augmenter l'activité cytotoxique de la doxorubicine et à augmenter l'accumulation à l'intérieur des cellules selon les protocoles décrits ci-haut. Les caractéristiques structurales de chaque polymère évalué ont été décrites au Tableau II.

6.DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DE LA DOXORUBICINE

6.1 Préparation des cellules

Les cellules sensibles et multirésistantes Aux-B1 et CH^RC5 (1×10^6 par tube) ont été incubées avec de la doxorubicine (20 μ g/ml) seule ou en présence de vérapamil (50 μ M) ou de polymère L61 (0.1% (p/v)) pendant 90 minutes à 37°C. Les cellules ont été lavées 3 fois au PBS froid et maintenues sur glace jusqu'au moment de l'observation au microscope à fluorescence, afin de limiter la diffusion passive de doxorubicine hors de la cellule.

6.2 Microscopie à fluorescence

Les cellules furent mises entre lame et lamelle immédiatement après leur incubation avec la doxorubicine. L'observation au microscope à fluorescence a été effectuée à un grossissement de 500X. Les photos furent prises avec un film AGFA Color ISO50.

RÉSULTATS

1. IMMUNOMARQUAGE DE LA P-gp

Les différentes lignées cellulaires, CH^RC5, Aux-B1, MCF-7/adr et MCF-7 ont été incubées avec l'anticorps C-219 afin de déterminer le niveau d'expression de la P-gp. Les résultats montrent que les cellules multirésistantes CH^RC5 et MCF-7/adr surexpriment la P-gp tel que rapporté dans la littérature. Les résultats sont présentés en Annexe.

2. EFFET CHIMIOSENSIBILISANT

L'effet chimiosensibilisant du polymère de poly-oxyéthylène et poly-oxypropylène chez des cellules multirésistantes a été évalué. Les cellules multirésistantes CH^RC5 et les cellules parentales sensibles Aux-B1 ont été incubées avec des doses croissantes de doxorubicine seule ou de Dox/L61, afin de déterminer la concentration de doxorubicine inhibant 50% de la prolifération cellulaire (IC₅₀). Un test colorimétrique, XTT, a été utilisé afin de mesurer l'effet cytotoxique. Les résultats montrent que le polymère réduit significativement l'IC₅₀ de la doxorubicine chez les cellules multirésistantes CH^RC5 : l'IC₅₀ diminue de 70 000 ng/ml à 250 ng/ml en présence de polymère L61 (Figure 4) . Nous avons également observé une hypersensibilisation des cellules CH^RC5 à la formulation Dox/L61. Celles-ci sont plus sensibles comparativement aux cellules parentales Aux-B1 mises en présence également de Dox/L61. Par ailleurs, chez les cellules

Aux-B1, le polymère n'entraîne qu'une très légère sensibilisation. Un contrôle utilisant le polymère L61 seul a permis de s'assurer que celui-ci était non-toxique aux concentrations effectives.

L'effet hypersensibilisant du polymère a été observé chez d'autres lignées cellulaires multirésistantes surexprimant la P-gp (Tableau III) . Le polymère L61 augmente la sensibilité des cellules CH^RC5 à la doxorubicine de l'ordre de 280 fois comparativement à 1,3 fois dans le cas des cellules parentales sensibles Aux-B1. De plus le facteur de résistance relatif à la doxorubicine passe de 70 à 0,35 en présence du polymère. Notons qu'un facteur de résistance inférieur à 1 signifie une hypersensibilisation. Par ailleurs, le polymère L61 semble avoir un effet chimiosensibilisant plus important chez les cellules MCF-7/adr. Ces cellules multirésistantes subissent une augmentation de leur sensibilité de 740 fois tandis que les cellules parentales sensibles, MCF-7, ne subissent aucune sensibilisation. De plus, le facteur de résistance relatif à la doxorubicine passe de 111 à 0,15 ce qui signifie que ces cellules ont subi une hypersensibilisation.

Figure 4. Effet du polymère L61 sur la cytotoxicité de la doxorubicine

L'activité cytotoxique de la doxorubicine seule et de la formulation Dox/L61 a été mesurée par un test standard de XTT. Les courbes représentent l'inhibition de la prolifération cellulaire (%) en fonction d'une augmentation de la concentration de doxorubicine seule ou complexée au L61(Dox/L61), chez les cellules multirésistantes CH^RC5 et leurs cellules parentales sensibles, Aux-B1. Les expériences ont été effectuées deux fois en triplicata. Chaque point de la courbe est accompagné de la valeur de SEM .

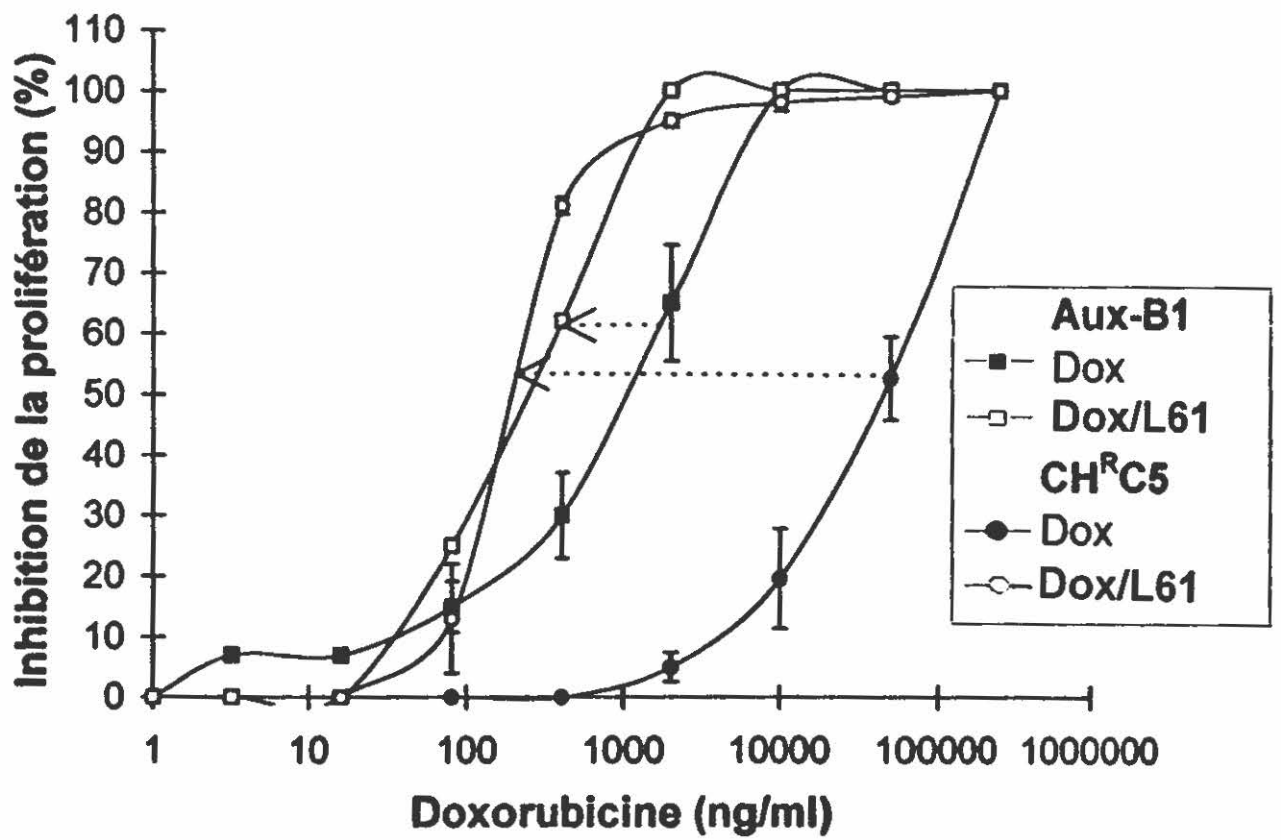


TABLEAU III. Comparaison entre la cytotoxicité de la doxorubicine seule et complexée au polymère L61 (Dox/L61) chez deux lignées cellulaires MDR différentes et chez leurs lignées parentales sensibles respectives.

Lignée cellulaire	IC ₅₀ ng/ml ^a Dox	IC ₅₀ ng/ml ^a Dox/L61	Augmentation de la sensibilité par L61 ^b (nb de fois)	Facteur de résistance Dox ^c	Facteur de résistance Dox/L61 ^c
MCF-7	2 000 ± 58	2 000 ± 65	1		
MCF-7/ADR	222 000 ± 12,000	300 ± 15	740	111	0.15
Aux-B1	1 000 ± 29	700 ± 21	1,3		
CH ^R C5	70 000 ± 2,470	250 ± 9	280	70	0.35

^a L'IC₅₀ fut déterminée par un test de cytotoxicité XTT standard. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM pour deux expériences différentes effectuées en triplicata.

^b Ratio entre l'IC₅₀ de la Dox seule et l'IC₅₀ de la Dox/L61

^c Le facteur de résistance relative fut calculé par l'IC₅₀ des cellules MDR divisée par l'IC₅₀ de la lignée parentale respective pour la Dox seule et pour la Dox/L61

3. TRANSPORT TRANSMEMBRANAIRE

3.1. Accumulation intracellulaire d'agents cytostatiques

Une réduction de l'accumulation intracellulaire des agents cytostatiques constitue une caractéristique importante des cellules multirésistantes. Nous avons évalué la capacité du polymère L61 à augmenter l'accumulation de doxorubicine (Dox) et de rhodamine123 (Rho123) chez les cellules multirésistantes CH^RC5 et MCF-7/adr et leurs cellules parentales sensibles respectives, les Aux-B1 et les MCF-7. Ces cellules ont été incubées à 37°C pendant 60 minutes avec l'agent cytotoxique seul ou accompagné de la vérapamil (Vrp) ou du polymère L61. L'accumulation de l'agent cytotoxique a été mesurée par cytofluorométrie et exprimée en canal moyen de fluorescence. Les valeurs ont été normalisées afin de permettre la comparaison entre les lignées cellulaires ayant des volumes différents.

Les résultats ont montré que le polymère L61 augmente l'accumulation de doxorubicine chez les cellules CH^RC5 de façon plus importante que la vérapamil, qui est un inhibiteur connu de la P-gp (4,75 fois et 7,25 fois respectivement) (Figure 5). Chez les cellules Aux-B1, la vérapamil n'augmente pas l'accumulation de doxorubicine mais le polymère L61 augmente l'accumulation de 1,5 fois. Comme mentionné précédemment, la fluorescence diminue lorsqu'elle se lie à l'ADN; il est donc possible que l'accumulation réelle soit sous-estimée. Ainsi, pour

une meilleur évaluation de la capacité du polymère à augmenter l'accumulation intracellulaire de drogue, la rhodamine123, qui ne se lie pas à l'ADN, à été utilisée. Les résultats montrent que le polymère L61 augmente l'accumulation de rhodamine123 chez les cellules CH^RC5 de 124 fois comparativement à 5 fois dans le cas de la vérapamil. Chez les cellules Aux-B1 le polymère augmente l'accumulation de rhodamine123 de 4,6 fois. Il semble donc que le polymère L61 augmente plus efficacement l'accumulation intracellulaire de rhodamine 123 que la vérapamil.

Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules MCF-7 et MCF-7/adr (Figure 6). Chez les cellules résistantes MCF-7/adr le polymère a augmenté de 1,1 fois seulement l'accumulation de doxorubicine tandis que la vérapamil n'a semblé avoir aucun effet. Toutefois, le polymère a augmenté de 90 fois l'accumulation de rhodamine 123, comparativement à 40 fois dans le cas de la vérapamil. Chez les cellules sensibles MCF-7, le polymère L61 a augmenté l'accumulation intracellulaire de rhodamine123 de 2,6 fois. Pour sa part la vérapamil ne semble pas affecter l'accumulation de rhodamine123 chez les cellules sensibles.

Figure 5. Effet du polymère L61 sur l'accumulation intracellulaire d'agents cytotoxiques chez les cellules CH^RC5 et Aux-B1

Effet modulateur de la vérapamil (Vrp) et du polymère L61 sur l'accumulation intracellulaire de rhodamine123 (Rho123) ou de doxorubicine (Dox) chez des cellules multirésistantes CH^RC5 et leurs cellules parentales sensibles Aux-B1 a été mesuré par cytofluorométrie. Les expériences furent répétées 3 fois. La fluorescence moyenne est accompagnée de la valeur de SEM.

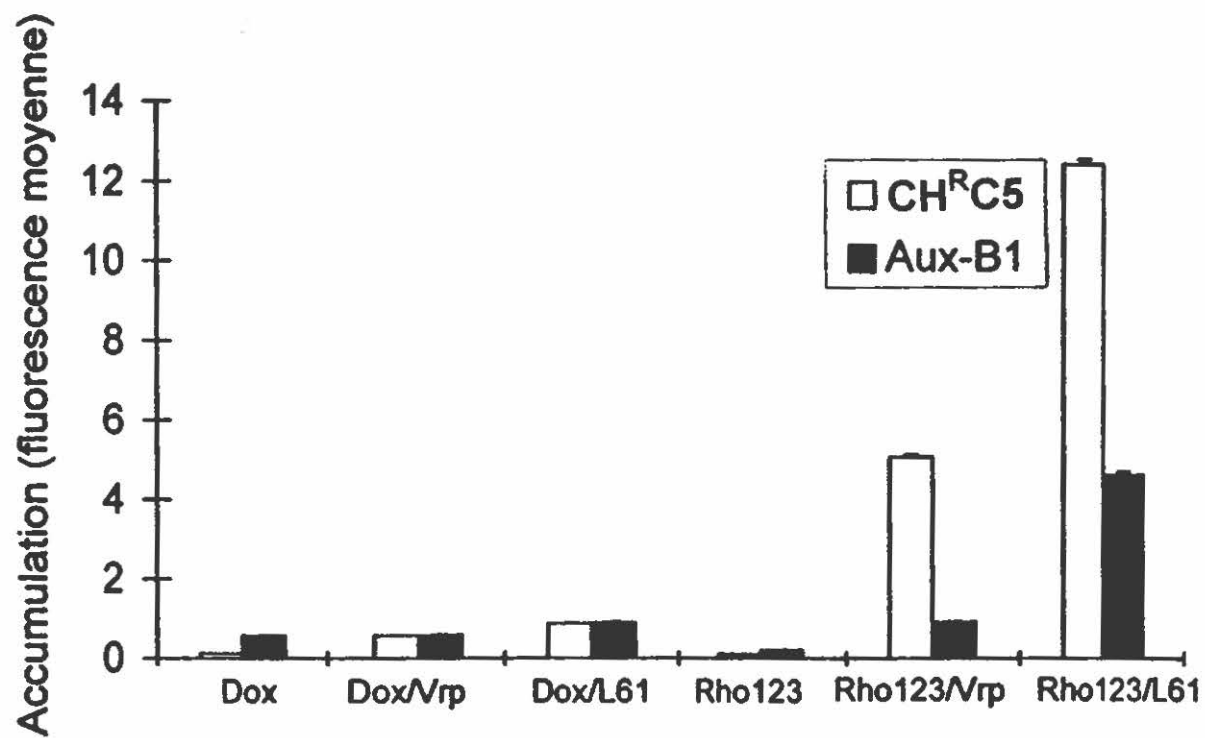
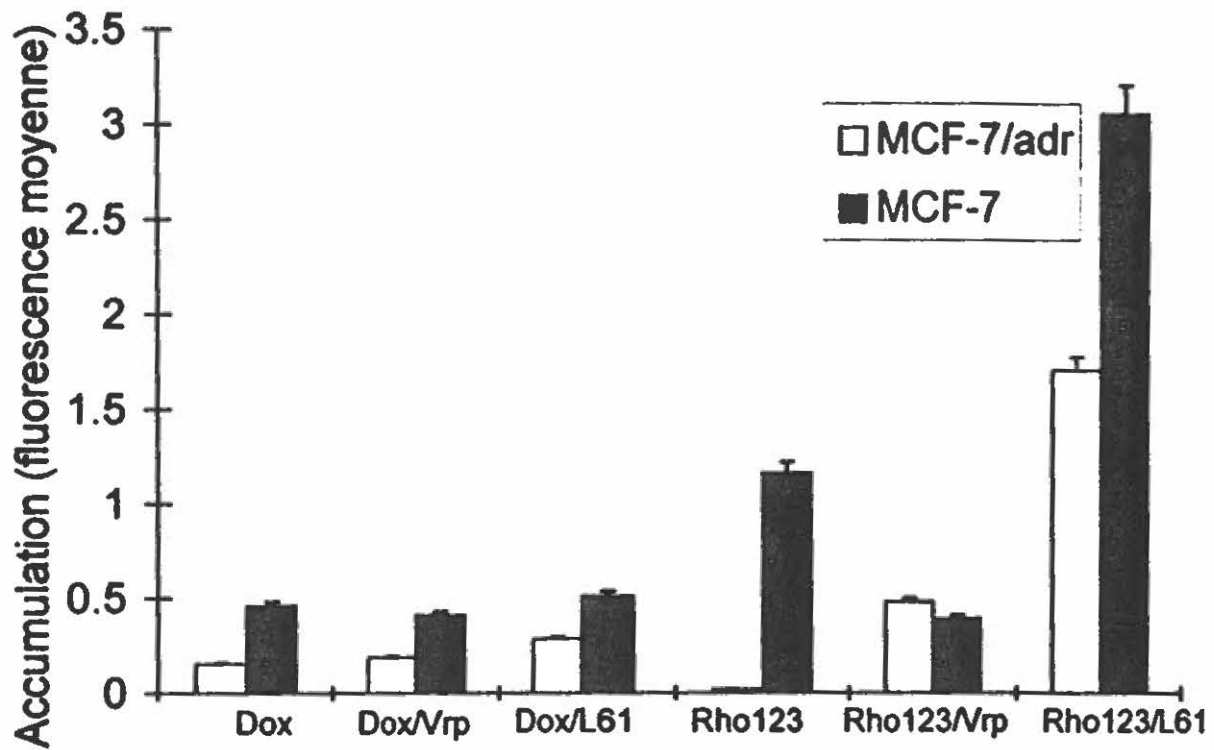


Figure 6. Effet du polymère L61 sur l'accumulation intracellulaire d'agents cytotoxiques chez les cellules MCF-7 et MCF-7/adr.

L'effet modulateur de la vérapamil (Vrp) et du polymère L61 sur l'accumulation intracellulaire de rhodamine123 (Rho123) ou de doxorubicine (Dox) chez des cellules multirésistantes MCF-7/adr et leurs cellules parentales sensibles MCF-7 a été mesuré par cytofluorométrie. Les expériences furent répétées 3 fois . La fluorescence moyenne est accompagnée de la valeur de SEM.



3.2. Cinétique d'accumulation

La cinétique d'accumulation de doxorubicine seule ou en présence de L61 chez les cellules résistantes CH^RC5 et sensibles Aux-B1 a été évaluée (Figure 7). Toutes les courbes montrent une saturation de l'influx après 60 minutes. Chez les cellules CH^RC5 et les cellules Aux-B1, le polymère L61 semble augmenter la cinétique d'accumulation de façon importante. Toutefois, l'accumulation totale de doxorubicine est plus importante chez les cellules Aux-B1 que chez les cellules CH^RC5.

Des résultats similaires ont été obtenus avec la cinétique d'accumulation de rhodamine123 (Figure 8). Il semble que le polymère L61 augmente dramatiquement l'influx de rhodamine123 à la fois chez les cellules CH^RC5 et les cellules Aux-B1. Toutefois, une saturation de l'influx est visible après 10 minutes. L'accumulation de rhodamine123 est environ 2,5 fois plus élevée chez les cellules CH^RC5 après 60 minutes.

Figure 7. Effet du polymère L61 sur la cinétique d'accumulation de la doxorubicine

Cinétique d'accumulation de doxorubicine seule ou de Dox/L61 chez des cellules multirésistantes CH^RC5 et leurs cellules parentales sensibles Aux-B1. Les expériences furent répétées 3 fois. La fluorescence moyenne est accompagnée de la valeur de SEM.

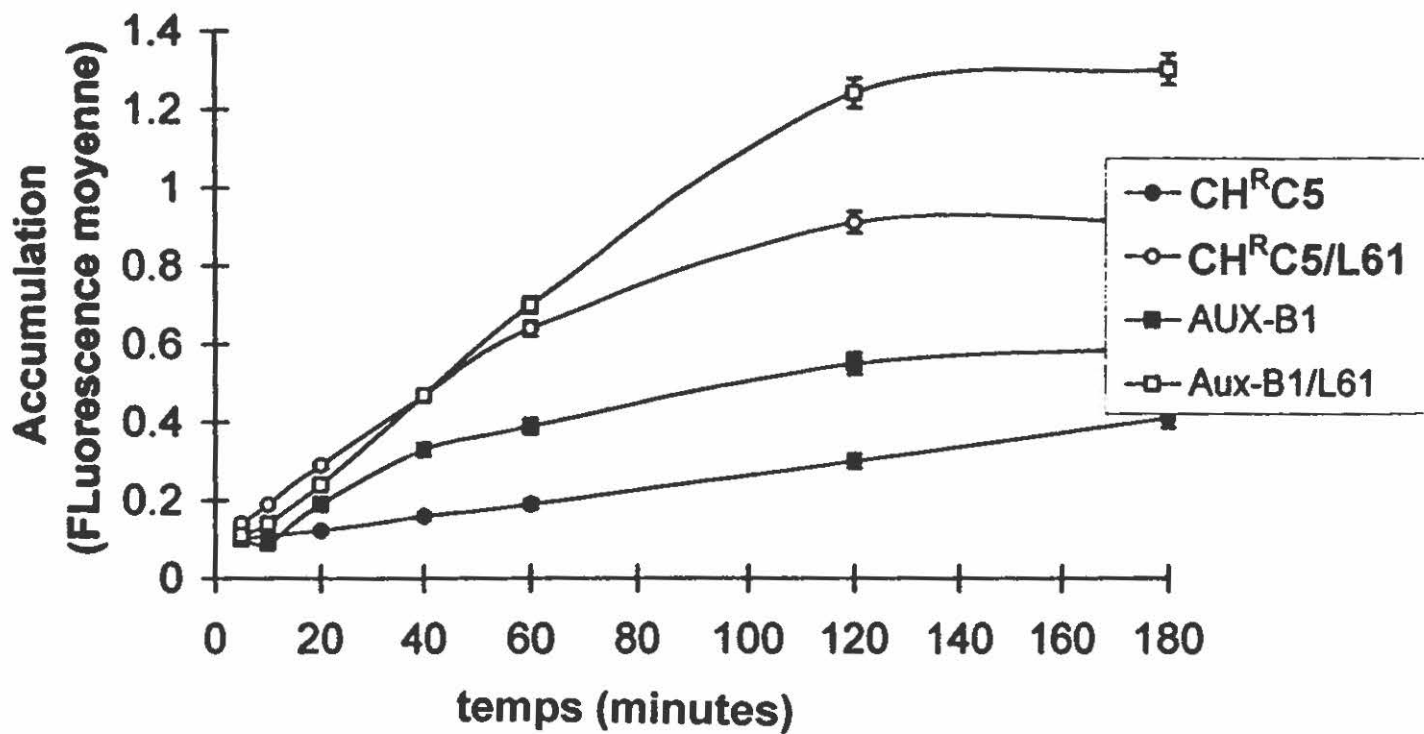
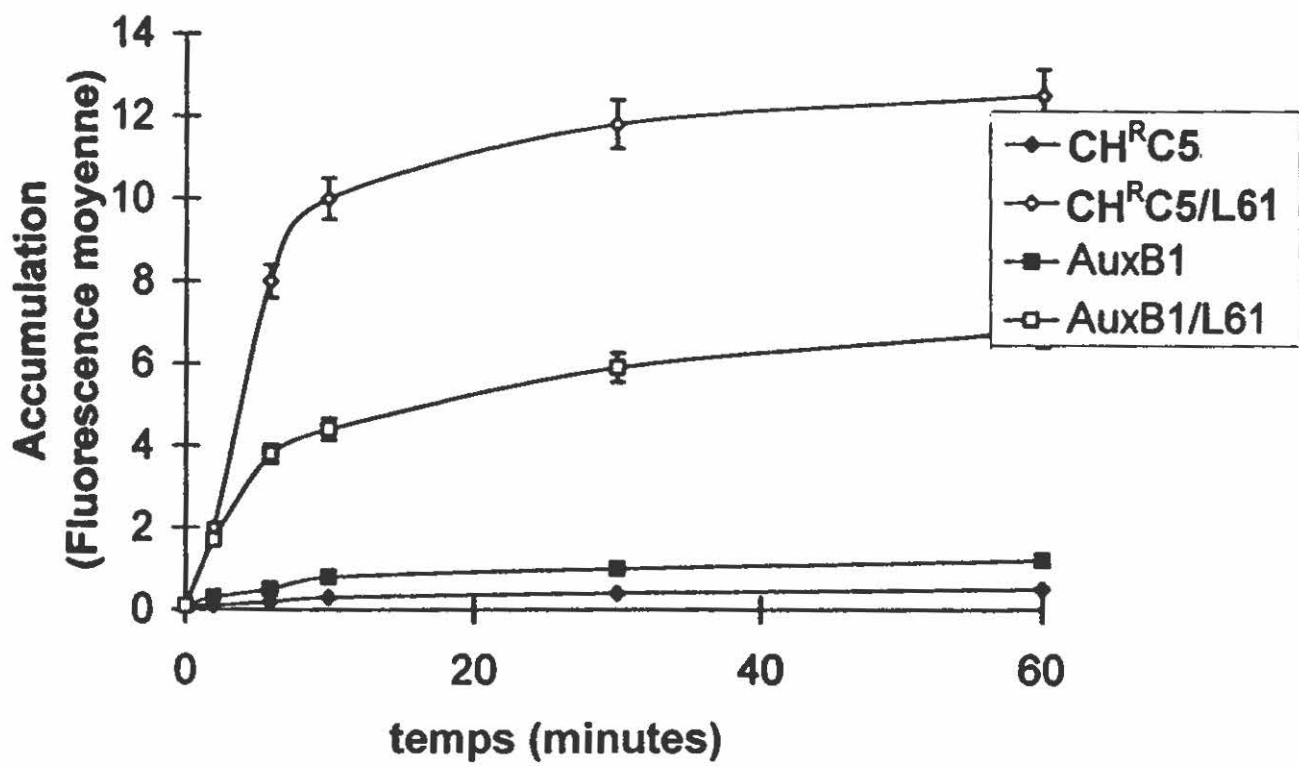


Figure 8. Effet du polymère L61 sur la cinétique d'accumulation de rhodamine123

Cinétique d'accumulation de rhodamine123 seule ou de Rho123/L61 chez des cellules multirésistantes CH^RC5 et leurs cellules parentales sensibles Aux-B1. Les expériences furent répétées 3 fois. La fluorescence moyenne est accompagnée de la valeur de SEM.



3.3.Efflux

La capacité du polymère à réduire l'expulsion active de rhodamine123 hors de la cellule par la P-gp a été évaluée chez les cellules CH^RC5. Les cellules ont d'abord été chargées de rhodamine123 pendant 60 minutes puis remises dans un milieu sans rhodamine123. Par la suite, il a été possible d'évaluer indirectement l'efflux par la mesure de la rétention intracellulaire de la rhodamine123 en fonction du temps.

Dans un premier temps, nous avons observé un efflux rapide de la rhodamine123 chez les cellules CH^RC5 (Figure 9). En effet, la rétention intracellulaire chute à 19% après seulement 10 minutes d'incubation dans un milieu sans rhodamine123. La vérapamil qui compétitionne avec la rhodamine123 pour les sites de liaison à la P-gp, inhibe complètement l'efflux rapide et on peut observer qu'un faible efflux dû à la diffusion passive. D'autre part, lorsque la rhodamine123 est complexée au polymère L61, l'efflux rapide provoqué par la P-gp est ralenti (première partie de la courbe). Cependant la diffusion passive de rhodamine123 semble être plus importante avec le polymère L61 (deuxième partie de la courbe) qu'avec la vérapamil.

Afin de mieux comprendre l'effet du polymère L61 sur l'activité de la P-gp, nous avons localisé celui-ci soit à l'intérieur, à l'extérieur ou à l'intérieur et à

l'extérieur de la cellule. Dans un premier temps les cellules furent chargées de rhodamine123 accompagnée de L61. Après les lavages, les cellules furent placées dans du milieu sans rhodamine123 et sans polymère L61. On peut donc présumer que durant l'efflux, le polymère est principalement localisé à l'intérieur des cellules. Dans un deuxième temps, les cellules furent chargées de rhodamine123 sans polymère L61. Par contre après les lavages, les cellules furent placées dans du milieu sans rhodamine123 mais avec du polymère L61. On peut donc présumer que durant l'efflux, celui-ci se trouvait à l'extérieur de la cellule. Les résultats ont montré que le polymère inhibe complètement l'efflux de la rhodamine123 lorsqu'il est principalement localisé à l'extérieur de la membrane cytoplasmique des cellules CH^RC5 (Figure 10). Par contre, le polymère ne montre aucun effet inhibiteur sur l'efflux de cet agent cytotoxique lorsqu'il est situé à l'intérieur seulement de la membrane cytoplasmique. Lorsque le polymère se trouve à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, celui-ci montre un effet d'inhibition intermédiaire.

Figure 9. Effet du polymère L61 sur l'efflux de rhodamine123

Efflux de Rhodamine123 (Rho123) après une incubation de 60 minutes à 37°C exprimé en % de rétention en fonction du temps chez des cellules CH^RC5. La rétention de Rho123 seule ou en présence de vérapamil (Vrp) ou de Rho123/L61 en fonction du temps a été mesurée par cytofluorométrie. Les courbes représentent 2 différentes expériences et les valeurs sont présentées \pm SEM.

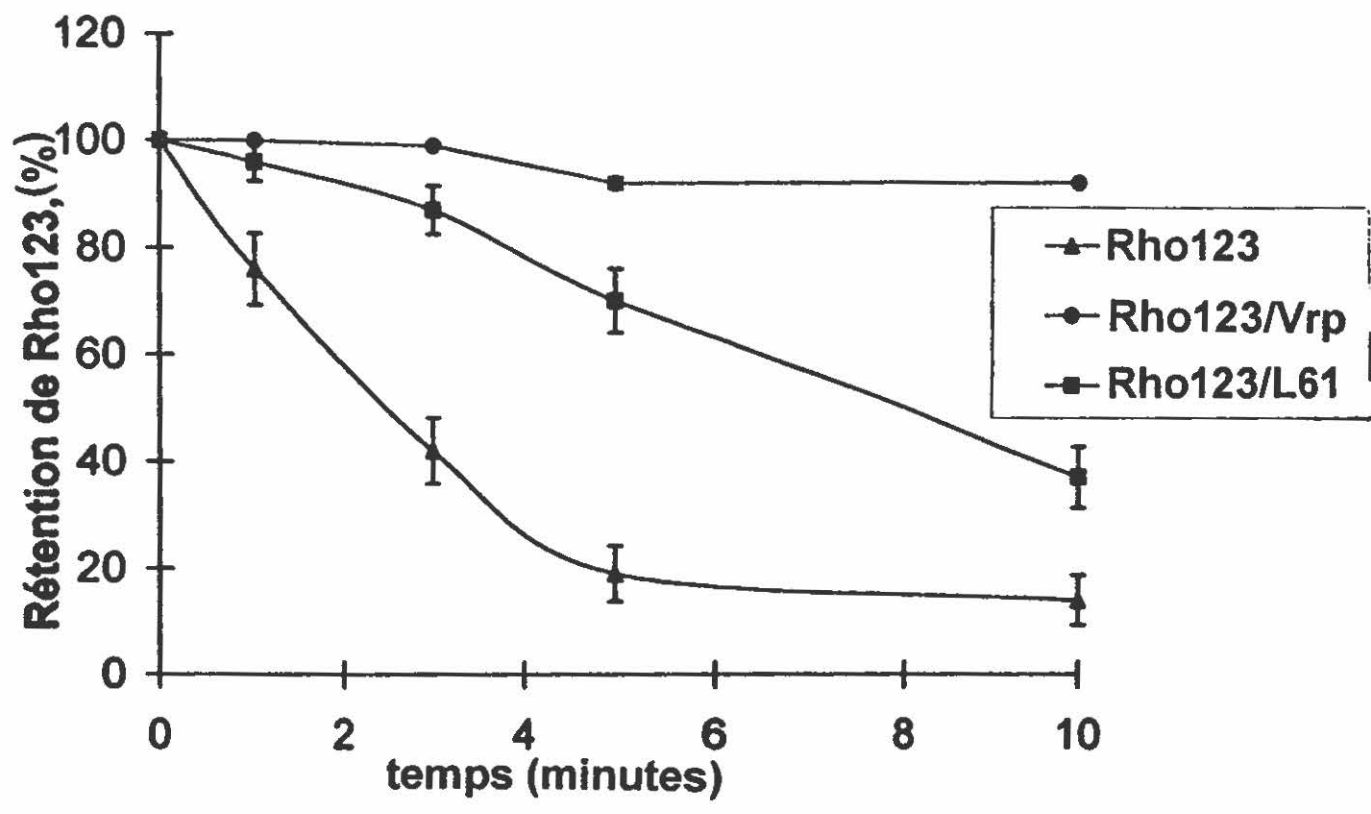
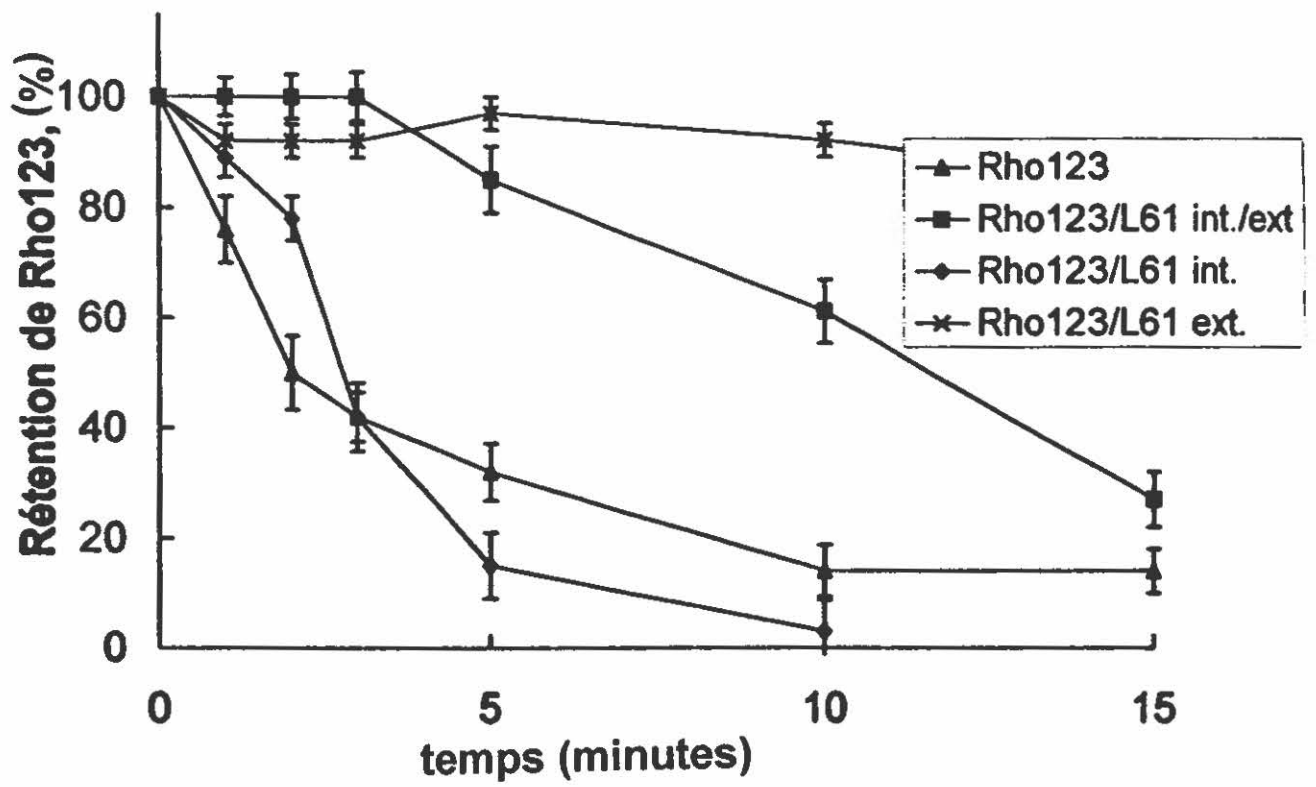


Figure 10. Effet du polymère L61 sur l'efflux de rhodamine123 selon sa localisation

L'effet du polymère sur l'inhibition de l'efflux de rhodamine123 (Rho123) a été évalué selon sa localisation par rapport à la membrane cytoplasmique des cellules CH^RC5. Le polymère est localisé soit à l'intérieur seulement, à l'extérieur seulement ou à l'intérieur et à l'extérieur à la fois. Les courbes représentent 2 différentes expériences et les valeurs sont présentées \pm SEM.



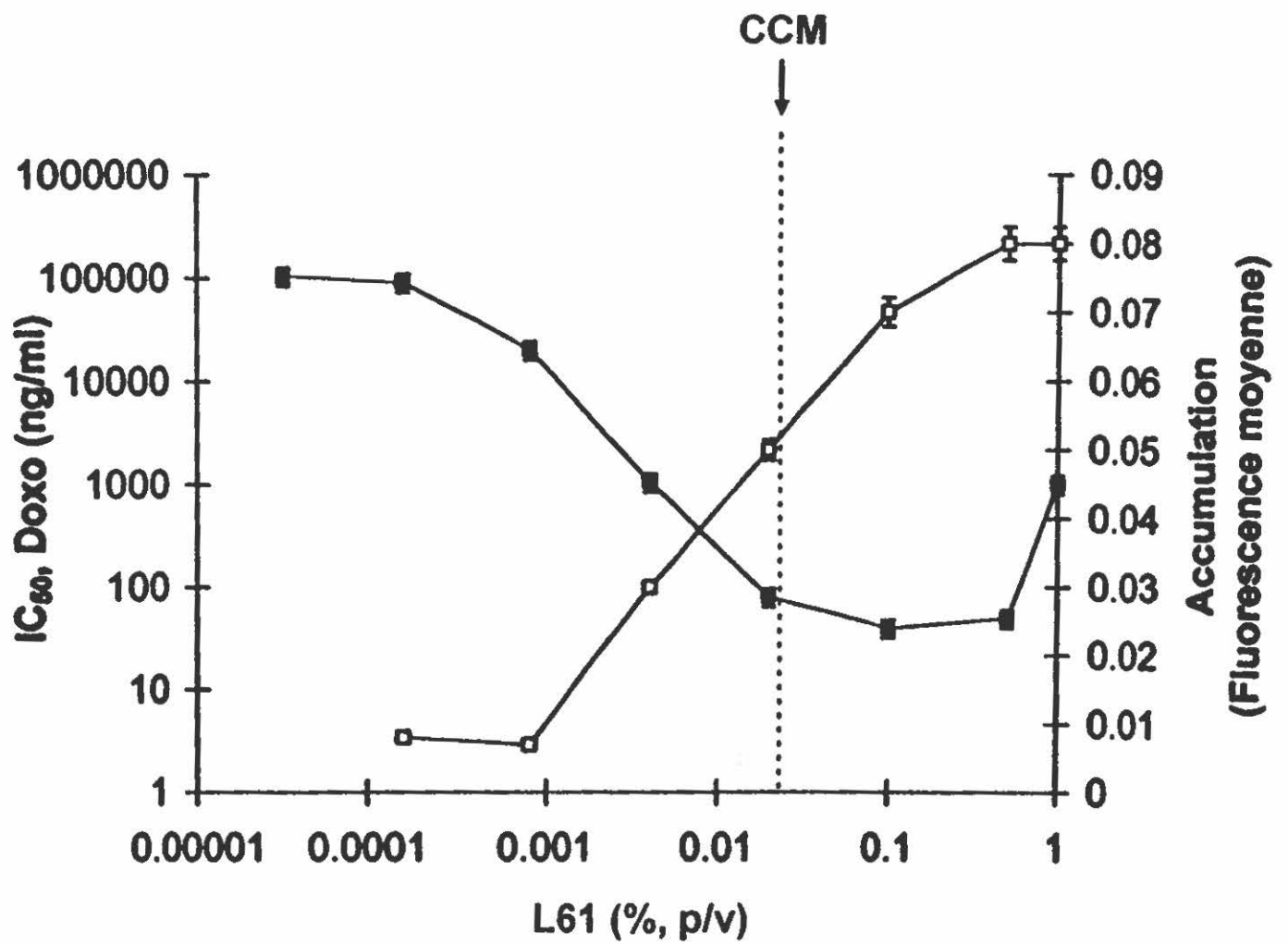
4. OPTIMISATION DU POLYMÈRE

4.1. Titration du polymère

Nous avons voulu déterminer l'efficacité du polymère à chimiosensibiliser les cellules multirésistantes et à augmenter l'accumulation intracellulaire d'agents cytotoxiques en fonction de sa concentration et par conséquent selon sa forme, unimérique ou micellaire. Dans un premier temps, la capacité du polymère L61 à chimiosensibiliser les cellules multirésistantes à la doxorubicine, a été évaluée par le test standard de XTT (Figure 11). Les concentrations du polymère variaient de 0,00001 à 1 % (p/v). Les résultats suggèrent que la capacité du polymère à réduire la valeur d'IC₅₀ de la doxorubicine, donc à chimiosensibiliser les cellules, varie en fonction de sa concentration. Le polymère semble être plus efficace à des concentrations sous la concentration critique de micellisation (CCM: 0,02%). Ces résultats suggèrent également que le polymère L61 est plus efficace à augmenter l'accumulation intracellulaire de rhodamine123 à des concentrations inférieures à la valeur de CCM.

Figure 11. Effet du polymère L61 selon sa concentration

Efficacité de différentes concentrations du polymère L61, à diminuer la valeur d' IC_{50} de la doxorubicine (symboles fermés, ■) et à augmenter son accumulation intracellulaire (symboles ouverts, □). La valeur de CCM est donnée et représente la concentration de polymère à partir de laquelle la première micelle est formée. Les résultats sont représentatifs de trois différentes expériences.



4.2. Hydrophobicité optimale

Les polymères L81, P84, P85 et F87 possèdent une quantité de résidus de POP(hydrophobe) centrale constante mais varient entre eux par leur nombre de résidus de POE (hydrophile) périphériques. Ces polymères ont donc des pourcentages d'hydrophobicité globaux différents (Voir Tableau II). Les expériences permettant d'évaluer l'efficacité anti-MDR du polymère en fonction de son hydrophobicité suggèrent que les formes composées d'au moins 50% de résidus hydrophobes sont les plus efficaces à la fois pour chimiosensibiliser les cellules multirésistantes et pour augmenter l'accumulation intracellulaire de rhodamine123 (Figure 12).

4.3. Masse moléculaire optimale

Les polymères L61, L81, L101 et L121 ont des masses moléculaires différentes. Leur nombre de résidus hydrophobiques de poly-oxypropylène (POP), varient mais le % d'hydrophobicité reste constant (voir Tableau II). Ces polymères varient donc par la quantité d'agents cytotoxiques qu'ils peuvent solubiliser. Les résultats ont montré que la masse moléculaire n'influence que légèrement l'activité anti-MDR du polymère. Au-delà d'une masse moléculaire de 3100, l'activité anti-MDR du polymère diminue c'est-à-dire qu'on observe une plus faible efficacité à diminuer l'IC₅₀ de la doxorubicine et à augmenter l'accumulation intracellulaire (Figure 13).

Figure 12. Efficacité du polymère (POP-POE-POP) selon son hydrophobicité

Efficacité du polymère à diminuer l' IC_{50} de la doxorubicine (symboles fermés, ■) et à augmenter son accumulation intracellulaire (symboles ouverts, □) en fonction de l'hydrophobicité de la structure de base du polymère. La concentration des polymères utilisés, L81, P84, P85, F87 est de 0.1% (p/v). Les résultats sont représentatifs de trois différentes expériences.

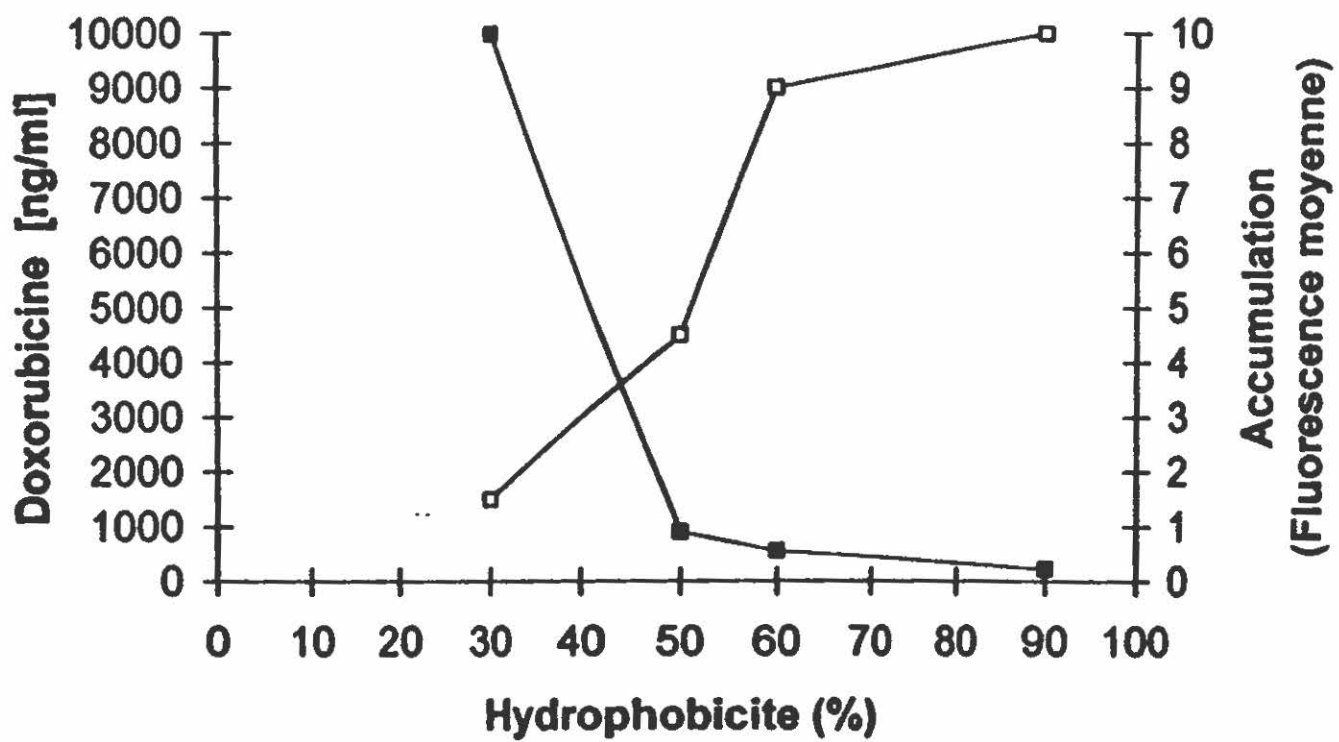
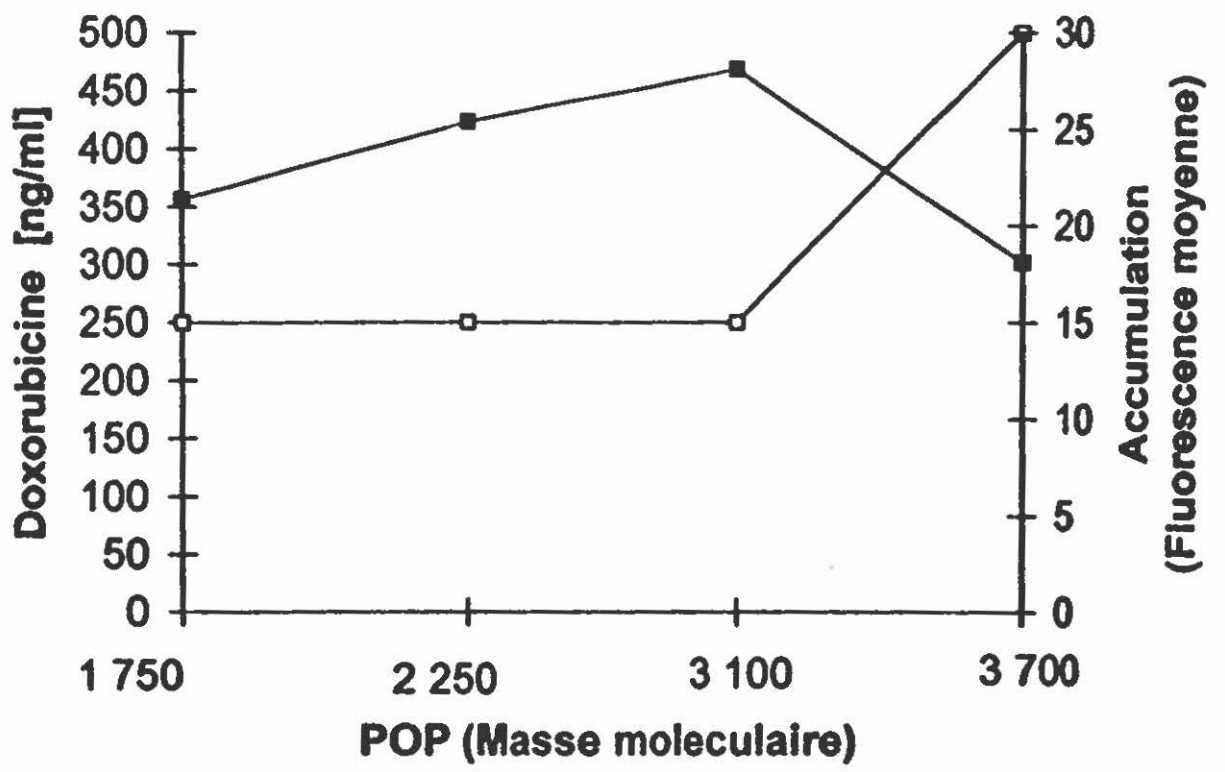


Figure 13. Efficacité du polymère (POP-POE-POP) selon sa masse moléculaire

Efficacité du polymère à diminuer l'IC₅₀ de la doxorubicine (symboles fermés, ■) et à augmenter son accumulation intracellulaire (symboles ouverts, □) en fonction d'une augmentation de la masse moléculaire du polymère. La concentration des polymères utilisés, L61, L81, L101, L121, est de 0.1% (p/v). Les résultats représentent trois différentes expériences.

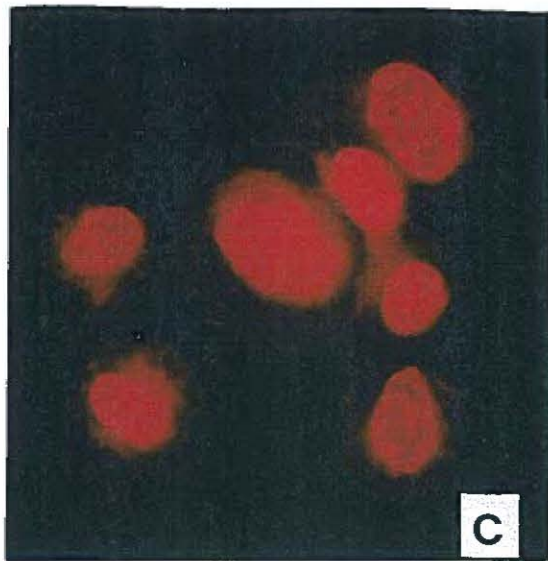
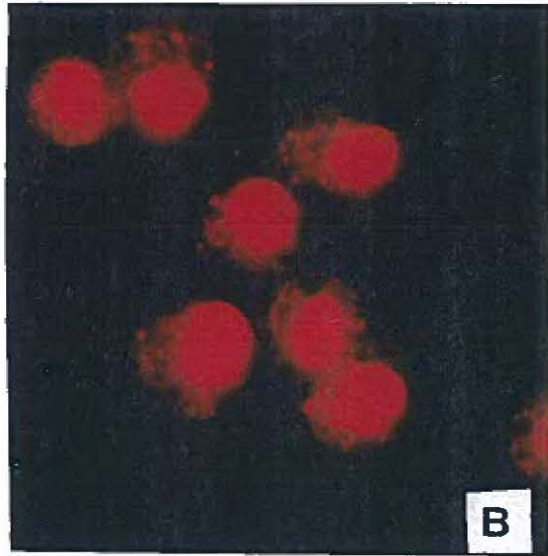
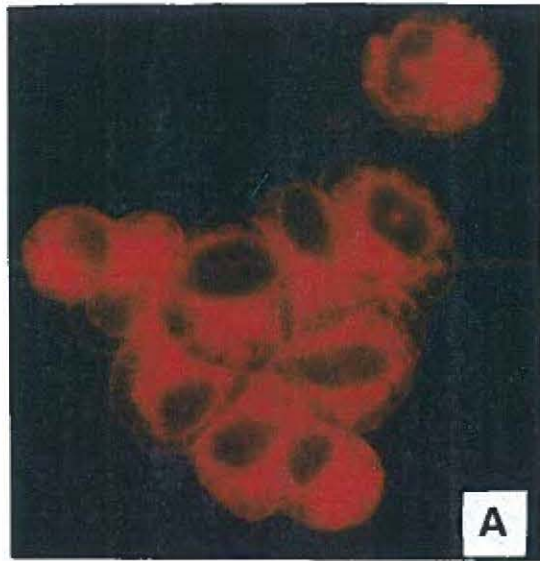


5. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE

La distribution intracellulaire de doxorubicine après une incubation de 60 minutes à 37°C a été observée au microscope à fluorescence. Chez les cellules multirésistantes CH^RC5, nous avons remarqué la séquestration de la doxorubicine dans des vésicules intracytoplasmiques comme il a été rapporté dans la littérature (Gervasoni et coll., 1991; Sognier et coll., 1994). Nous avons également remarqué une absence de doxorubicine au niveau du noyau (Figure 14 a). Lorsque ces cellules sont incubées avec la doxorubicine et la vérapamil, l'accumulation totale d'agent cytotoxique semble être augmentée mais il est tout de même possible de voir des vésicules de séquestration au niveau intracytoplasmique (Figure 14 b). Par contre, la formulation Dox/L61 semblent libérer complètement la doxorubicine séquestrée dans les vésicules intracytoplasmiques, lui permettant ainsi de se rendre au noyau (Figure 14 c).

Figure 14. Effet du polymère L61 sur la distribution intracellulaire de doxorubicine

La distribution intracellulaire de la doxorubicine (Dox) (20 μ g/ml) chez les cellules multirésistantes CH^RC5 est visualisée par microscopie à fluorescence (400X) après 60 minutes d'incubation a. Dox seule b. Dox incubée en présence de vérapamil (50 μ M) c. Dox/L61 (0.1%, p/v).



DISCUSSION

1. EFFET CHIMIOSENSIBILISANT

Le polymère de poly-oxyéthylène et poly-oxypropylène (POP-POE-POP) a démontré une grande capacité chimiosensibilisante. Le polymère semble causer une hypersensibilisation à la doxorubicine chez différentes cellules MDR d'origine différentes et surexprimant le produit du gène *mdr1*, la P-gp. Aucune hypersensibilisation de la part d'un agent chimiosensibilisant, que ce soit les inhibiteurs de la P-gp, les liposomes ou les surfactants, n'a été rapportée dans la littérature jusqu'à ce jour. Par exemple, le crémosphore EL, un des surfactants les plus efficaces, fait d'huile de castor et de poly-oxyéthylène, sensibilise de manière importante les cellules multirésistantes mais ne cause aucune hypersensibilisation (Schuurhuis et coll., 1990). L'hypersensibilisation constitue un avantage important en clinique puisque les cellules multirésistantes sont davantage affectées comparativement aux cellules sensibles. Cette hypersensibilisation permet donc une sélection négative des cellules multirésistantes et il serait intéressant d'utiliser le polymère non seulement dans le traitement des MDR, comme c'est le cas de la plupart des agents chimiosensibilisants, mais aussi dès le début des traitements chimiothérapeutiques.

2. EFFET DU POLYMÈRE SUR L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE

La plupart des agents chimiosensibilisants augmentent l'accumulation intracellulaire des agents cytostatiques à l'intérieur des cellules multirésistantes. Ce phénomène est le résultat de l'effet combiné d'une augmentation de l'influx et d'une réduction de l'efflux. Le polymère a montré une grande capacité à augmenter le transport des agents cytostatiques à l'intérieur des cellules. En ce qui concerne la doxorubicine, l'interprétation des résultats est difficile ; ceci est principalement dû à la réduction de la fluorescence que subit celle-ci lors de la liaison à l'ADN. Les différences entre les lignées cellulaires pourraient s'expliquer au niveau de la distribution intracellulaire. Par contre dans le cas de la rhodamine123, le polymère a nettement montré son efficacité à augmenter l'accumulation intracellulaire d'environ 100 fois chez les cellules multirésistantes.

L'hypersensibilisation des cellules CH^RC5 à la doxorubicine par le polymère, pourrait donc s'expliquer par une plus grande accumulation intracellulaire des agents cytostatiques, comparativement aux cellules Aux-B1. Il a été rapporté que l'endocytose, la sécrétion et d'autres processus reliés à la membrane cytoplasmique, sont plus efficaces chez les cellules MDR que chez les cellules sensibles (Sehested, 1987). Ce processus pourrait être dû à une augmentation de la fluidité membranaire tel que suggéré par Arsenault et

collaborateurs (1988). Toutefois, le polymère ne sensibilise pas ou très peu les cellules parentales à l'effet de la doxorubicine, alors que celles-ci subissent une augmentation considérable de l'accumulation intracellulaire des agents cytostatiques. Ces observations suggèrent que des mécanismes différents que celui d'une simple augmentation de l'accumulation intracellulaire seraient impliqués dans la médiation de l'effet chimiosensibilisant du polymère. Nous avons remarqué également que la vérapamil qui sensibilise les cellules MDR en inhibant la P-gp (Willingham et coll., 1986), affecte l'accumulation de ces agents cytostatiques de façon moins importante, ce qui suggère que l'influx de Dox/L61 serait probablement indépendant de la présence de P-gp.

3. EFFET DU POLYMÈRE SUR LA DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE

La résistance à la doxorubicine est souvent associée à la formation de vésicules cytoplasmiques visibles au microscope à fluorescence. Ces vésicules séquestrent la doxorubicine au niveau du cytoplasme l'empêchant de se rendre au noyau. Nous avons pu constater que contrairement à la doxorubicine seule, la doxorubicine complexée au polymère ne subit aucune séquestration au niveau du cytoplasme. Ainsi la doxorubicine libre dans le cytoplasme ira soit se lier à la P-gp, ou elle pourra atteindre sa cible, le noyau. Après une incubation de 60 minutes, la majorité de la doxorubicine intracellulaire est retrouvée au niveau du noyau. Une étude réalisée précédemment chez des cellules de carcinomes ovariens (SKVLB),

a montré que le polymère augmente à la fois la quantité de doxorubicine se rendant au noyau, et la quantité de doxorubicine se liant à l'ADN (Alakhov et coll., 1996). Les mécanismes responsables de ces phénomènes restent toutefois indéterminés.

La séquestration de la doxorubicine dans des vésicules intracytoplasmiques joue un rôle important dans le développement de la multirésistance. Ces vésicules seraient des réservoirs ayant un pH très acide à l'intérieur desquelles les anthracyclines y subissent une protonation les empêchant de retraverser les membranes cytoplasmiques. Les ionophores (composés modifiant la charge des membranes et créant des courants ioniques) comme le monensin et le nigericine, semblent chimiosensibiliser les cellules MDR en détruisant ces vésicules intracytoplasmiques (Schindler et coll., 1996). Il a été précédemment démontré que le polymère pouvait induire des courants ioniques (Supratek Pharma Inc, communication personnelle). Comme les ionophores le polymère pourrait donc libérer la doxorubicine séquestrée dans les vésicules. La destruction des vésicules entraînerait également une acidification du cytoplasme. Les anthracyclines étant de faibles bases, leur affinité pour un cytoplasme plus acide favoriserait du même coup une accumulation intracytoplasmique plus importante. Ainsi, une plus grande affinité de la doxorubicine pour un cytoplasme plus acide ainsi qu'une meilleure distribution favorisant la liaison de la doxorubicine à l'ADN, pourrait expliquer

l'hypersensibilisation des cellules multirésistantes provoquée par le polymère de POP-POE-POP.

4. EFFET DU POLYMÈRE SUR L'EFFLUX

En plus d'une augmentation de l'influx de drogues et d'une inhibition de la séquestration cytoplasmique, le polymère semble affecter l'efflux rapide de la rhodamine123 dû à l'action de la P-gp. Lorsque la rhodamine123 est incubée en présence du polymère à l'intérieur et à l'extérieur, l'efflux rapide dû à la P-gp (première partie de la courbe) semble inhibé mais la diffusion passive (deuxième partie de la courbe) reste cependant très importante. De plus lorsque le polymère se retrouve à l'extérieur seulement, les efflux actifs et passifs sont totalement inhibés suggérant ainsi que le polymère inhibe la P-gp du côté externe de la membrane. Toutefois, la nature de l'interaction directe, ou indirecte, entre le polymère et la P-gp reste méconnue. Le polymère pourrait agir indirectement en protégeant la drogue de la liaison de la P-gp ou en déstabilisant la membrane, induisant ainsi un changement de conformation de la glycoprotéine. Comme les surfactants cremophore EL et Triton-X-100 (Friche et coll., 1990; Zordan-Nudo et coll., 1993) le polymère pourrait inhiber la P-gp en bloquant son site de liaison aux drogues. De plus, les résultats sur l'efficacité du polymère en fonction de sa localisation soulèvent la possibilité que le polymère augmente la diffusion passive

et l'endocytose du côté de la membrane où il se trouve . La nature exacte de l'interaction entre le polymère et la P-gp reste inconnue et devra faire l'objet d'une étude plus approfondie.

5. CONCENTRATION OPTIMALE

À une faible concentration, le polymère est sous forme unimérique. À la concentration critique de micellisation (CCM) la première micelle se forme. Les résultats montrent que ce sont les parties unimériques qui sensibilisent les cellules multirésistantes et qui augmentent l'accumulation de doxorubicine. En effet, au fur et à mesure que le nombre de micelles augmente, l'efficacité du polymère diminue. Cela implique que *in vivo*, le polymère qui est administré à une forte concentration se retrouve sous une forme micellaire et agit possiblement comme biotransporteur, comme les liposomes, en concentrant la drogue et en réduisant sa métabolisation (Lasic et Papahadjopoulos, 1995) . Par contre, au fur et à mesure que le polymère se dilue dans le sang, se serait plutôt les formes unimériques qui interagiraient avec les cellules et qui exerceraient leur effet chimiosensibilisant.

6. RELATION STRUCTURE-FONCTION

La composition du polymère semble influencer son efficacité. En effet, une augmentation du nombre de résidus de POP hydrophobes augmente le poids moléculaire et la taille du polymère et par conséquent, augmenterait le nombre d'interactions entre la doxorubicine et le polymère. L'efficacité du polymère augmente très légèrement en fonction de l'augmentation de la taille du polymère. Par contre, au-dessus d'une certaine taille, l'efficacité du polymère diminue. Ceci est possiblement dû à une réduction de la pénétration par diffusion passive ou bien aussi à une diminution de la solubilité du polymère.

La balance hydrophobique-hydrophilique semble jouer un rôle plus important sur l'efficacité du polymère que la taille. Au-delà de 50% d'hydrophobicité, le polymère sensibilise efficacement les cellules multirésistantes à l'action de la doxorubicine et augmente son accumulation intracellulaire. Nos résultats concordent avec une récente étude publiée par Buckingham (1995) qui, comparant différents surfactants (le crémophor EL, le solutol HS 15 et un surfactant d'acide gras et d'oxyéthylène), a démontré que la structure de la partie hydrophobe ainsi que la balance hydrophilique-lipophile étaient critiques pour le potentiel anti-MDR des surfactants. L'hydrophobicité semble déterminer l'affinité du polymère pour les membranes.

7. MÉCANISMES D'ACTION DU POLYMÈRE

L'ensemble des résultats semblent indiquer qu' *in vitro*, le polymère de POP-POE-POP agit davantage comme chimiosensibilisant que comme biotransporteur. Nous ne sommes pas en moyen toutefois de déterminer si c'est le polymère seul ou le complexe polymère/Dox qui est responsable de l'effet chimiosensibilisant. Il est possible que le polymère interagisse avec les membranes des cellules multirésistantes en les solubilisant ou en les perméabilisant. Ceci faciliterait l'entrée de la doxorubicine et réduirait la séquestration intracytoplasmique augmentant ainsi la quantité de doxorubicine libre de se rendre au noyau. Plusieurs études rapportent que les surfactants exercent leur action chimiosensibilisante en modifiant principalement la fluidité membranaire (Woodcock et coll., 1992 ; Dudeja et coll., 1995). La composition et la fluidité membranaire des cellules MDR et des cellules sensibles diffèrent et peuvent expliquer les différences au niveau de la chimiosensibilité et de l'accumulation intracellulaire des agents cytotoxiques observées dans l'ensemble de notre étude entre les cellules parentales et leur sous-lignées multirésistantes.

Les résultats sur la structure et la concentration optimale ont montré que l'effet chimiosensibilisant est principalement dû aux unimères de POP-POE-POP et que la taille a une importance moindre que la balance hydrophobique-hydrophilique. Cela suggère que le polymère pourrait fusionner à la membrane

cytoplasmique à différente profondeur selon son hydrophobicité et faciliter la pénétration des agents cytotoxiques. Le polymère pourrait interagir de la même manière avec les membranes des vésicules de séquestration intracytoplasmiques et favoriser la sortie des molécules des agents cytotoxiques séquestrés.

Le modèle utilisé dans ce projet comporte toutefois des limites. Les cellules que nous avons utilisées possèdent des facteurs de résistance et des niveaux d'expression de P-gp beaucoup plus importants que ce qui est rencontré au niveau des tumeurs multirésistantes en clinique. De plus, les lignées cellulaires ne tiennent pas compte de l'aspect tridimensionnel des tumeurs. Le transport membranaire y est probablement différent. Ainsi donc l'étude actuelle aura permis de démontrer l'énorme potentiel chimiosensibilisant du polymère de POP-POE-POP envers les cellules MDR surexprimant la P-gp justifiant ainsi la poursuite des recherches *in vivo*, utilisant différents modèles tumoraux. De plus, étant donné la complexité du phénotype MDR, l'évaluation du potentiel chimiosensibilisant envers des cellules exprimant des caractéristiques différentes semble primordiale.

CONCLUSION

Ce travail avait pour but d'évaluer la capacité chimiosensibilisante du polymère de poly-oxyéthylène et poly-oxypropylène (POP-POE-POP) envers les cellules multirésistantes surexprimant la P-gp, les cellules CH^RC5 et MCF-7/adr.

Le polymère a montré une très grande capacité chimiosensibilisante, provoquant même une hypersensibilisation des cellules multirésistantes par rapport aux cellules sensibles à la doxorubicine. Les causes de cette hypersensibilisation nous paraissent nombreuses. Premièrement, le polymère semble augmenter l'accumulation intracellulaire des drogues chimiothérapeutiques de façon considérable. Deuxièmement le polymère possède la capacité d'inhiber la P-gp à partir du côté extérieur de la membrane cytoplasmique causant ainsi une réduction de l'efflux actif des drogues. Enfin, le polymère semble empêcher la séquestration de la doxorubicine dans des vésicules intracytoplasmiques. En conséquence, tous ces effets peuvent contribuer ensemble à augmenter la quantité de doxorubicine libre lui permettant de se rendre au noyau pour y exercer son activité cytotoxique.

L'étude de l'efficacité du polymère en fonction de sa structure a révélé que la balance hydrophobique-hydrophilique est importante tandis que la masse moléculaire n'influence que très peu l'activité anti-MDR du polymère. Le polymère semble exercer son effet chimiosensibilisant de façon optimale lorsque sa structure est au moins à 50% hydrophobe. Par ailleurs, l'étude de l'efficacité du

polymère à chimiosensibiliser les cellules multirésistantes et à augmenter l'accumulation intracellulaire de la rhodamine123 en fonction de sa concentration suggère que ce sont les unimères qui sont responsables de la chimiosensibilisation. Ces résultats nous permettent de spéculer que le polymère exerce tous ces effets principalement en déstabilisant les membranes cellulaires.

L'ensemble de cette étude montre que le polymère de poly-oxypropylène et poly-oxyéthylène possède un grand potentiel chimiosensibilisant, ce qui fait de lui un candidat intéressant à utiliser dès l'instauration des traitements chimiothérapeutiques et non uniquement pour le traitement des cancers multirésistants. Les recherches méritent d'être poursuivies à la fois *in vitro* et *in vivo* afin d'atteindre ultérieurement nous espérons, les essais cliniques.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier en premier lieu ma directrice de recherche Rosemonde Mandeville pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance et son support tout au long de mon projet.

J'aimerais également exprimer ma gratitude au docteur Valery Alakhov pour son apport indispensable dans l'orientation du projet. Sa disponibilité, son intérêt constant et ses précieux conseils, furent toujours très appréciés.

J'aimerais remercier Supratek Pharma Inc. ainsi que tous ses membres pour leur aide dans la réussite de ce projet. Plus particulièrement j'aimerais remercier Shengmin Li pour son aide précieuse.

Je voudrais également remercier Marcel Desrosiers du service de cytofluorométrie, Salwa Ghali et Ginette Mercier qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans l'apprentissage des techniques.

Mes remerciements (ils sont nombreux) vont également à l'ensemble des étudiants du laboratoire (également nombreux !) pour leur aide morale et leur bonne humeur. Tous et chacun ont contribué à créer une atmosphère où il était agréable de travailler.

J'aimerais remercier enfin la fondation Armand-Frappier pour le support financier qui m'a été accordé durant mes études de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

ALAKHOV, Y.V., MOSKALEVA, E.Y., BATRAKOVA, E.V. et KABANOV, A.V. 1996. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugated Chem.*, 7 : 209-216 .

ARSENAULT, A.L., LING, V. et KARTNER, N. 1988. Altered plasma membrane ultrastructure in multidrug resistant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 938 : 315-321.

BATRAKOVA, E.V., DORODNYCH, T.Y., KLINSKI, E.Y., KLUSHNENKA, E.N., SHEMCHUKOVA, O.B., ARJAKOV, S.A., ALAKHOV, V.Y. et KABANOV, A.V. 1996. Anthracycline antibiotics noncovalently incorporated into micelles of pluronic block copolymers: activity against drug sensitive and resistant tumors. *Br. J. Cancer*, in Press.

BATIST, G., TULPULE, A., SINHA, B.K., KATKI, A.G., MYERS, C.E. et COWAN, K.H. 1986. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 261: 15544-15549.

BECK, W.T., CIRTAIN, M.C., LOOK, A.T. et ASHMUN, R.A. 1986. Reversal of *vinca alkaloid* resistance but not multidrug resistance in human leukemic cells by verapamil. *Cancer Res.* 46: 778-784.

BERNAL, S.D., LAMPIDIS, T.J., SUMMERHAYES, I.C., et CHEN, B.L. 1982. Rhodamine-123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells in vitro. *Science* 218 : 1117-1119.

BIEDLER, J.L., et RIEHM, H. 1970. Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cells in vitro : Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30 : 1174-1184.

BRADLEY, G., GEORGES, E. et LING, V. 1990. Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in Chinese hamster. *J. Cell. Physiology.* 145: 398-408.

BRUGGEMAN, E.P., CURRIER, S.J., GOTTESMAN, M.M., et PASTAN, I. 1992. Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 267: 21020-21026.

BUCKINGHAM, L.E., BALASUBRAMANIAN, M., EMANUELE, R.M., CLODFELTER, K.E. et COON, J.S. 1995. Comparison of solutol HS 15, cremophor EL and novel ethoxylated fatty acid surfactants as multidrug resistance modification agents. *Int. J. Cancer.* 62: 436-442.

BURGER, H., NOOTER, K., ZAMAN, G.J.R., SONNEVELD, P., VAN WINGERDEN, K.E., OOSTRUM, R.G. et STOTER, G. 1994 Expression of the multidrug resistance protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia* 6: 990-997.

BYARS, N.E. et ALLISON, A.C. 1987. Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity. *Vaccine* 5: 223-228.

CHEN, C.J., CHIN, J.E., UEDA, K., CLARK, D.P., PASTAN, I., GOTTESMAN, M.M. et RONINSON, I.B. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*. 47: 381-389.

COLE, S.P. CHANDA, E.R., DICKE, F.P., GERLACH, J.M., et MIRSKI, S.E.L. 1991. Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in small cell Lung Cancer Cell Line: Evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. *Cancer Res.* 51: 3345-3352.

COLE, S.P.C., BHARDWA, G., GERLACH, J.H., MACKIE, J.E., GRANT, C.E., ALMQUIST, K.C., STEWART, A.J., KURZ, E.U., DUNCAN, A.M.V., et DEELEY, R.G. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258: 1650-1654.

CORDON-CARDO, C., O'BRIEN, J., CASALS, D., RITTMAN-GRAUER, L., BIEDLER, J.L., MELAMED, M.R. et BERTINO, J.R. 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 695-698.

DANO, K. 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumour cells. *Biochim. Biophys. Acta* 323 : 466-483.

DEFFIE, A.M., BATRA, J.K. et GOLDENBERG, G.J. 1989. Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res.* 49: 58-62.

DEVAULT, A. et GROS, P. 1990. Two members of the mouse *mdr* family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Molec. Cell Biol.* 10: 1652-1663.

DIETEL, M., ARPS, H., LAGE, H. et NIENDORF, A. 1990. Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res.* 50: 6100-6106.

- DUDEJA, P.K., ANDERSON, K.M., HARRIS, J.S., BUCKINGHAM, L. et COON, J.S. 1995. Reversal of multidrug resistance phenotype by surfactants: relationship to membrane lipid fluidity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 319: 309-315.
- ENDICOTT, J.A., SARANGI, F. et LING, V. 1991. Complet cDNA sequences encoding the chinese hamster P-glycoprotein gene family. *J.DNA Sequencing Mapping* 2: 89-101.
- FAIRCHILD, C.R., IVY, S.P., KAO-SHAN, C.-S., WHANG-PENG, J., ROSEN, N., ISRAEL, M.A., MALERA, P.W., COWAN, K.H., et GOLDSMITH, M.E. 1987. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res*. 47: 5141-5148.
- FAN, D., BUCANA, C., O'BRIAN, C.A., ZWELLING, L.A., SEID, C. et FIEDLER, I. 1990. Enhancement of murine tumor cell sensitivity to adriamycin by presentation of the drug in phosphatidylcholine-phosphatidylserine liposomes. *Cancer Res*. 50: 3619-3626.
- FELLER, N., KUIPER, C.M., LANKELMA, J., RUHDAL, J.K., SCHEPER, R.J., PINEDO, H.M. et BROXTERMAN, H.J. 1995. Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. *Br. J Cancer* 72: 543-549.
- FINNEGAN, M.C., ROYDS, J., GOEPEL, J.R., LORIGAN, P., HANCOCK, B.W. et GOYNS, M.H. 1995. MDR-1 expression in non-hodkin's lymphomas is unrelated to treatment intensity or response to therapy. *Leukemia & Lymphoma* 18: 297-302.
- FOJO, A.T., UEDA, K., SLAMON, D.J., POPLACK, D.G., GOTTESMAN, M.M. et PASTAN, I. 1987. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84 : 265-269.
- FRESHNEY, R.I. 1988. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 2nd ed. Alan R. Liss Inc. New-York. Chapitre 10.
- FRICHE, E., JENSEN, P.B., SEHESTED, M., DEMANT, E.J. et NISSEN, N.N. 1990. The solvents cremophor EL and Tween 80 modulate daunorubicin resistance in the multidrug resistant Ehrlich ascites tumor. *Cancer Commun.* 2 : 297-304.
- GEORGES, E., SHAROM, F.J. et LING, V. 1990. Multidrug resistance and chemosensitization : therapeutic implications for cancer chemotherapy. *Advances in Pharmacology* 21: 185-220.

GERVASONI, J.E., FIELD, S.Z.Jr., KRISHNA, S., BAKER, M.A., ROSADO, M., THURAISAMY, K., HINDENBURG, A.A. et TAUB, R.N. 1991. Subcellular distribution of Daunorubicin in P-glycoprotein-positive and negative drug-resistant cell lines using laser-assisted confocal microscopy. *Cancer Res.* 51: 4955-4963.

GILL, D.R. HYDE, S.C. HIGGINS, C.F. VALVERDE, M.A. MINTENIG, G.M., et SEPULVA, F.V. 1992. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell* 71: 23-32.

GREENBERGER, L.M. 1993. Major photoaffinity drug labelling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12. *J. Biol. Chem.* 268: 11417-11425.

GROS, P., NERIAH, Y.B., CROOP, J.M. et HOUSMAN, D.E. 1986. Isolation and expression of a cDNA (mdr) that confers multidrug resistance. *Nature* 323: 728-731.

HAMADA, H., et TSURUO, T. 1986. Functional role for the 170-180 kDA glycoprotein specific to drug-resistance tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 7785-7789.

HAMADA, H et TSURUO, T. 1988. Characterization of the ATPase activity of the M170 000 to 180 000 Membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res.* 48 : 4926-4932.

HIGGINS, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113.

IZQUIERDO, M.A., van der Zee, A.G.J., VERMORKEN, J.B., van der Valk, P., BELIEN, J.A.M., GIACCONE, G., SCHEFFER, G.L., FLENS, M.J., PINEDO, H.M., KENEMANS, P., MEIJER, C.J.L.M., de VRIES, E.G.E. et SCHEPER, R.J. 1995. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 87 : 1230-1237.

JULIANO, R.L. et LING, V. 1976 A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cells mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455: 152-162.

KABANOV, A.V., CHEKHONIN, V.P., ALAKHOV, V.Y., BATRAKOVA, E.V., LEBEDEV, A.S., MELIK-NUBAROV, N.S., ARZHAROV, S.A., LEVASHOV, A.V., MOROZOV, G.V., SEVERIN, E.S. et KABANOV, V.A. 1989 The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilisation in surfactant micelles. Micelles as microcontainers for drug targeting. *FEBS Lett.* 258: 343-345.

KABANOV, A.V., BATRAKOVA, E.V., MELIK-NUBAROV, N.S., FEDOSEEV, N.A., DORODNICH, T.Y., ALAKHOV, V.Y., CHEKHONIN, V.P., NAZAROVA, R., et KABANOV, V.A. 1992. A new class of drug carriers : micelles of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *J. of Controlled Release* 22 : 141-158.

KABANOV, A.V., NAZAROVA, I.R., ASTAFIEVA, I.V., BATRAKOVA, E.V., ALAKHOV, V.Y., YAROSLAVOV, A.A. et KABANOV, V.A. 1995. Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in Poly (oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) solutions. *Macromolecules* 28: 2303-2314.

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

KRISHAN, A. 1990. Rapid determination of cellular resistance-related drug efflux in tumor cells. *Methods in cell biology*. 33: 491-500.

LASIC, D.D., PAPAHAJOPOULOS, D. 1995. Liposomes revisited. (Review) *Science*. 267: 1275-1276.

LING, V., et THOMPSON, L.H., 1974. Reduced cell permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J.Cell. Physiol*. 83: 103-116.

LING, V., KARTNER, N., SUDO, T., SIMINOVITCH, L., et RIORDAN, J.R. 1983. Multidrug resistance phenotype in chinese hamster ovary cells. *Cancer Treat. Rep*. 67: 869-874.

LOWE, K.C. et ARMSTRONG, F.H.1990. Oxygen-transport fluid based on perfluorochemicals: effects on liver biochemistry. *Adv. Exp. Med. Biol*. 277: 267-276.

LUK, C.K. et TANNOCK, F. 1989. Flow cytometric analysis of doxorubicin accumulation in cells from human and rodent cell lines. *J. Natl. Cancer Inst*. 81: 55-59.

MARQUART, D. et CENTER, M.S. Drug transport mechanisms in HL60 cells isolated for resistance to adruamycin: Evidence for nuclear drug acumulation and redistribution in resistant cells. *Cancer Res*. 52: 3157-3163.

MASLAK, P., HEGEWISCH-BECHER, S., GODFREY, L. et ANDREEFF, M. 1994. Flow cytometric determination of the multidrug resistance phenotype in acute leukemia. *Cytometry* 17 : 84-93.

McGRATH et CENTER, M.S. 1988. Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: Evidence that a surface membrane protein distinct from P-glycoprotein contributes to reduce cellular accumulation of drug. *Cancer Res.* 48: 3959-3963.

MOSCOW, J.A., FAIRCHILD, C.R., MADDEN, M.J., RANSOM, D.T., WIEAND, M.S., O'BRIEN, E.E., POPLACK, D.G., COSSMAN, J., MYERS, C.E., et COWAN, K.H. 1989. Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res.* 49: 1422-1428.

PAGE, M., et ALAKHOV, V.Y. 1992. Elimination of P-gp mediated multidrug resistance by solubilization in Pluronic micelles. (Meeting Abstract) *Proc, Annu. Meet. Am. Assoc, Cancer. Res.* 33: A3302.

PARADIS, R., NOEL, C., et PAGE, M. 1994. Use of Pluronic micelles to overcome multidrug resistance. *Int. J. Oncol.* 5: 1305-1308.

PRATT, W.B., RUDDON, R.W., ENSMINGER, W.D. et MAYBAUM, J. (éd.) 1994. *The anticancer drugs*. 2nd ed. Oxford University Press Inc. Chapitre 7.

PRIEBE, W, et PEREZ-SOLER, 1993. Design and tumor targeting of anthracyclines able to overcome multidrug resistance: a double-advantage approach. *Pharmac. Ther.* 60 : 215-234.

RIORDAN, J.R., DEUCHARS, K., KARTNER, N., ALON, N., TRENT, J., et LING, V. 1985. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316: 817-819.

SADAVISAN, R., MORGAN, R., FABIAN, C. et STEPHENS, R. 1991. Reversal of multidrug-resistance in HL-60 cells by verapamil and liposome-encapsulated doxorubicin. *Cancer Lett.* 57 : 165-171.

SAFA, A.R. 1988. Photoaffinity labelling of the multidrug-resistance related P-glycoprotein with photoactive analogs of verapamil. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 7187-7191.

SCHEFFER, G.L., WIJNGAARD, P.L.J., FLENS, M.J., IZQUIERDO, M.A., SLOVAK, M.L., PINEDO, H.M., MEIJER, C.J.L.M., CLEVERS, H.C. et SCHEPER, R.J. 1995. The multidrug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med.* 1: 578-582.

SCHEPER, R.J., BROXTERMAN, H.J., SCHEFFER, G.L., KAAIJK, P., DALTON, W.S., van HEIJNINGEN, T.H.M., van KALKEN, C.K., SLOVAK, M.L., de VRIES, E.G.E., van der VALK, P., MEIJER, C.J.L.M. et PINEDO, H.M. 1993. Overexpression of a Mr 110, 000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* 53 : 1475-1479.

SCHINDLER, M., GRABSKI, S., HOFF, E. et SIMON, M. 1996. Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7/adr) . *Biochem.* 35: 2811-2817.

SCHUURHUIS, G.J., BROXTERMAN, H.J., PINEDO, H.M., van HEIJNINGEN, T.H.M., van KALKEN, C.K., VERMORKEN, J.B., SPOELSTRA, E.C. et LANKELMA, J. 1990 The polyoxyethylene castor oil Cremophor EL modifies multidrug resistance. *Br. J. Cancer* 62 : 591-594.

SCHUURHUIS, G.J., BROXTERMAN, H.J., deLANGE, J.H.M., PINEDO, H.M., van HEIJNINGEN, KUIPER, C.M., SCHEFFER, G.L., SCHEPER, R.J. van KALKEN, C.K., BAAK, J.P.A. et LANKELMA, J. 1991. Early multidrug resistance, defined by changes in intracellular doxorubicin distribution, independent of P-glycoprotein. *Br.J. Cancer* 64 : 857-861.

SCHUURHUIS, G.J., BROXTERMAN, H.J., OSSENKOPPELE, G.J., BAAK, J.P.A., EEKMAN, C.A., KUIPER, C.M., FELLER, N., VAN HEISNINGEN, T.H.M., KLUMPER, E., PIETERS, R., LANKELMA, J. et PINEDO, H.M. 1995. Functional multidrug resistance phenotype associated with combined overexpression of Pgp/MDR1 and MRP together with cytosine-arabioside sensitivity may predict clinical response in acute myleoid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 1: 81-93.

SCUDIERO, D.A., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T.H., CURRENS, M.J., SENIFF, D. et BOYD, M.R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48 : 4827-4833.

SEHESTED, M., SKOVSGAARD, T. van DEURS, B. et WINNTHNER-NIELSEN, H. 1987. Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukaemic cells. Effect of daunorubicin and verapamil. *Br. J. Cancer* 56: 747-751.

SEHESTED, M., SKOVSGAARD, T. et ROED, H. 1988. The carboxylic ionophore monensin inhibits active drug efflux and modulates in vitro resistance in daunorubicin resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 37: 3305-3310.

SHEN, D.-W., CARDARELLI, C., ZHANG, J., CORNWELL, M., RICHERT, N., ISHII, S., PASTAN, I., et GOTTESMAN, M.M. 1986. Human multidrug resistant cell lines : Increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 232: 643-645.

SIMON, S.M. et SCHINDLER, M. 1994. Cell biological mechanisms of multidrug-resistant in tumors (Review). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3497-3504.

SKACH, W.R., CALAYAG, M.C. et LINGAPPA, V.R. 1993. Evidence for an alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *J. Biol. Chem.* 268: 6903-6908.

SOGNIER, M.A., ZHANG, Y., EBERLE, R.L., SWEET, K.M., ALTENBERG, G.A. et BELLI, J.A. 1994. Sequestration of doxorubicin in vesicles in a multidrug-resistant cell line (LZ-100). *Biochem. Pharmacol.* 48: 391-401.

SOULE, H.D., VAZQUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S., et BRENNAN, M. 1973. A human cell line from pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409-1416.

THIERRY, A.R., RAHMAN, A. et DRITSCHILO, A. 1993a. Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 190: 952-960.

THIERRY, A.R., VIGE, D., COUGHLIN, S.S. BELLI, J.A., DRITSCHILLO, A. et RAHMAN, A. 1993b. Modulation of doxorubicin resistance in multidrug-resistant cells by liposomes. *FASEB J.* 7: 572-579.

WEINSTEIN, J.N. et LESERMAN, L.D. 1984. Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy (Review). *Pharmacology and Therapeutics.* 24: 207-233.

WILLINGHAM, M., CORNWELL, M.M., CARDARELLI, C.O., GOTTESMAN, M.M. et 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.* 46: 5941-5946.

WOODCOCK, D.M., LINSENMEYER, M.E., CHOJNOWSKI, G., KRIEGLER, A.B., NONK, V., WEBSTER, L.K. et SAWYER, W.H. 1992. Reversal of multidrug-resistance by surfactants. *Br. J. Cancer.* 66: 62-68.

ZAMAN, G.J.R., FLENS, M.J., VANLEUSDEN, M.R., HAAS, M., MÜLDER, H.S., LANKELMA, J., PINEDO, H.M., SCHEPER, R.J., BASS, F., BROXTERMAN, H.J. et BORST, P. 1994. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8822-8826.

ZHANG, J.T. DUTHIE, M. et LING, V. 1993. Membrane topology of the N-terminal half of the hamster P-glycoprotein molecule. *J. Biol. Chem.* 268: 15101-15110.

ZORDAN-NUDO, T., LING, V., LIU, Z. et GEORGES, E. 1993. Effects on Non-ionic detergents on P-glycoprotein drug binding and reversal of Multidrug resistance. *Cancer Res.* 53: 5994-6000.

ANNEXE

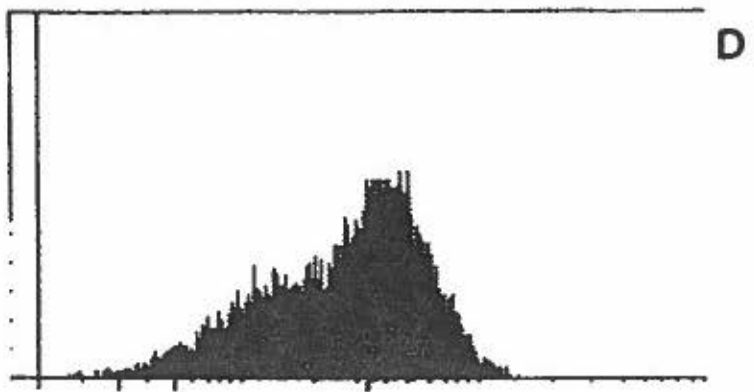
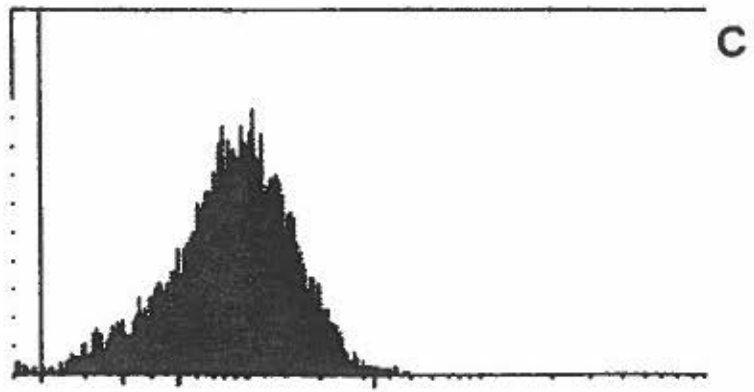
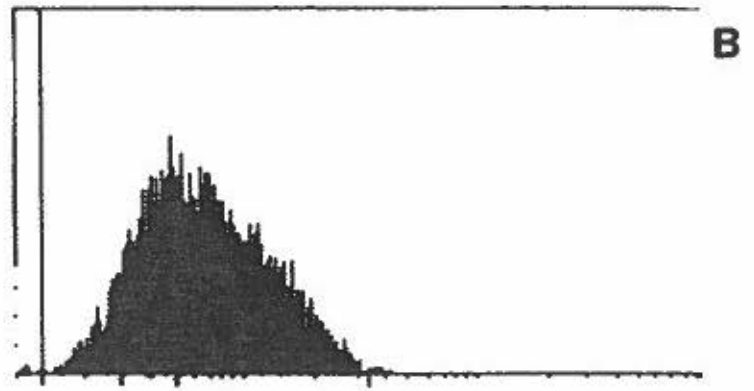
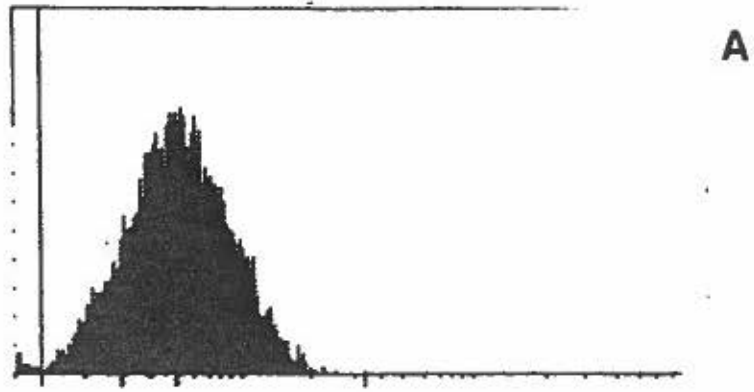


Figure 16. Immunomarquage de la P-gp chez les cellules MCF-7 et MCF-7/adr

Expression de la P-gp détectée par immunomarquage à l'aide de l'anticorps C-219 (lignes pointillées) ou un anticorps isotypique IgG_{2A} (lignes pleines) et analysée par cytofluorométrie (Coulter, EPICS XL) chez les cellules **a.** MCF-7 parentales sensibles et **b.** MCF-7/adr multirésistantes.

