

50376
1993
91

50376
1993
91

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1993

N° d'ordre : 1071

THESE de DOCTORAT D'UNIVERSITE

(nouveau régime)

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

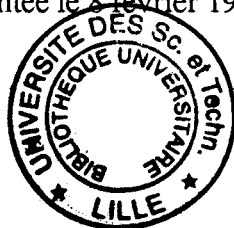
Nathalie MESTDAGH

CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE ET AU CIS-PLATINE

CARACTERISATION ET/OU REVERSION

DU PHENOMENE *IN VITRO*

présentée le 8 février 1993 devant la commission d'examen



JURY

Président : Pr. Maurice PORCHET
Rapporteurs : Pr. Jean-Claude JARDILLIER
Dr. Jacques POUPAERT
Membres : Dr. Jean-Pierre HENICHART
Dr. Maud COLLYN D'HOOGHE
Pr. Pierre FORMSTECHE
Pr. Daniel LESIEUR

Je remercie le Professeur Maurice Porchet d'avoir accepté la présidence de cette thèse qui, pour une grande part, est centrée sur la Biologie Cellulaire.

Ce travail a été effectué sous la direction scientifique de Monsieur Jean-Pierre Hénichart, Head of Drug Discovery. Je tiens à vous exprimer ma plus chaleureuse gratitude pour cette étude que vous m'avez confiée. Vos connaissances scientifiques, votre rigueur, votre enthousiasme et votre disponibilité ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Claude Jardillier, j'ai eu l'occasion de vous rencontrer pour la première fois à Reims lors d'un mini-congrès sur la chimiorésistance; je tiens à vous remercier vivement d'avoir accepté de faire partie de ce jury et surtout du jugement que vous apporterez.

Jacques Poupaert, grâce à vous, j'ai eu l'occasion de connaître Jean-Pierre Hénichart et je vous en suis infiniment reconnaissante. Vous avez bien voulu juger ce travail et je vous en remercie.

Maud Collin, vous m'avez permis de m'initier à la biologie moléculaire. Je ne saurais trop vous remercier de vos conseils judicieux, de votre accueil chaleureux et des discussions que ce travail occasionnera par votre présence dans ce jury.

C'est tout particulièrement que je remercie les Professeurs Pierre Formstecher et Daniel Lesieur de me faire l'honneur de siéger à ce jury et d'avoir accepté de lire et de discuter le présent travail.

J'adresse mes remerciements à Jean-Luc Bernier pour son aide et ses conseils bienveillants.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Bernard Hecquet et Charles Fournier sans qui je n'aurais pu bénéficier de la possibilité d'établir des cellules résistantes en utilisant de pauvres petites souris.

Je remercie Nicole Helbecque pour son amicale contribution et sa lecture attentive.

Je ne saurais trop faire part de ma gratitude à Danièle Lantoine pour son aide et sa précieuse collaboration.

Je suis personnellement reconnaissante à Elisabeth Morier-Teissier pour qui l'HPLC n'a aucun secret.

J'adresse mes remerciements à Nicole Pommery pour sa collaboration et sa persévérance dans l'obtention de cellules résistantes.

Je remercie Jean-Marie Saucier et Monique Charrat de leur collaboration fructueuse.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Christian Slomianny qui a accepté de me consacrer une partie de son temps afin de me permettre de détecter la glycoprotéine P dans les diverses cellules qui étaient à notre disposition.

Je tiens également à remercier Joseph Vamecq pour son aide lors du début de ma thèse.

Ces remerciements s'adressent également à Brigitte Vandewalle et Louis Hornez pour leur collaboration et leur disponibilité lors de ce travail.

Merci aussi à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont pu contribuer à la bonne réalisation de ce travail.

A Thierry, à mes parents.

PLAN

INTRODUCTION	1
GENERALITES	
1. Traitement du cancer	4
2. Chimiorésistance aux anticancéreux	7
3. Chimiorésistance à l'adriamycine et au cis-platine	
3.1. Adriamycine	11
3.2. Cis-platine	12
3.3. Chimiorésistance à l'adriamycine	13
3.4. Chimiorésistance au cis-platine	14
4. Etude de différents paramètres impliqués dans la chimiorésistance	
4.1. La glycoprotéine P	16
4.2. Expression de divers oncogènes	20
4.3. Glutathion et enzymes apparentées	
4.3.1. Glutathion	25
4.3.2. Glutathion réductase	26
4.3.3. Glutathion transférases	27
4.3.4. Glutathion peroxydases	27
4.3.5. γ -glutamyltransférase	29
4.3.6. Glucose-6-phosphate déshydrogénase	30
4.3.7. Glutathion, enzymes du métabolisme du glutathion et chimiorésistance	30
4.4. Topoisomérases	
4.4.1. Topoisomérases de type I	32
4.4.2. Topoisomérases de type II	32
4.4.3. Les molécules antitumorales et les topoisomérases	33
4.4.4. Chimiorésistance et topoisomérases	33
4.5. Calcium et adénosine monophosphate cyclique	34
5. Réversion de la chimiorésistance à l'adriamycine et au cis-platine	
5.1. Réversion de la chimiorésistance à l'adriamycine	38
5.2. Réversion de la chimiorésistance au cis-platine	41

RESULTATS

1. Caractérisation de lignées cellulaires sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine	
1.1. Détection par immunofluorescence de la glycoprotéine P	44
1.2. Expression de différents oncogènes et d'un gène suppresseur de tumeur dans les cellules sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine	51
1.3. Mesure du glutathion et des enzymes associées au métabolisme du glutathion	
1.3.1. Chimiorésistance à l'adriamycine	58
1.3.2. Chimiorésistance au cis-platine	64
1.4. Activité topoisomérase II	67
1.5. Mesure du taux de calcium et d'AMPc dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine	70
2. Réversion de la chimiorésistance à l'adriamycine	
2.1. Réversion de la chimiorésistance à l'adriamycine dans des cellules de carcinome du côlon (MIP-101 et l'équivalent sensible DLD-1)	
2.1.1. Effet du vérapamil	72
2.1.2. Effet de la buthionine sulfoximine	72
2.1.3. Effet de la trifluopérazine	72
2.1.4. Effet du tamoxifène	73
Effet des chimiosensibilisateurs sur l'expression de la glycoprotéine P	73
2.2. Réversion de la chimiorésistance à l'adriamycine dans des cellules de carcinome mammaire (MCF-7 sensibles et résistantes)	
2.2.1. Effet du vérapamil	79
2.2.2. Effet de la buthionine sulfoximine	81
2.2.3. Effet de la trifluopérazine	81
2.2.4. Effet du tamoxifène	81
Effet des chimiosensibilisateurs sur l'expression de la glycoprotéine P	82
2.3. Réversion de la chimiorésistance à l'adriamycine dans des cellules de leucémie murine (P-388 sensibles et résistantes)	
2.3.1. Effet du vérapamil	93
2.3.2. Effet de la buthionine sulfoximine	93
2.3.3. Effet de la trifluopérazine	94
2.3.4. Effet du tamoxifène	94
Effet des chimiosensibilisateurs sur l'expression de la glycoprotéine P	95

2.4. Réversion de la chimiorésistance à l'adriamycine : rôle du calcium et de l'AMP cyclique	
2.4.1. Calcium	101
2.4.2. AMP cyclique	102
3. Modélisation moléculaire de l'interaction glutathion/site actif de la glutathion peroxydase. Recherche d'outils pharmacologiques présentant une analogie conformationnelle avec le glutathion.	
3.1. Conformères du glutathion	105
3.2. Interaction glutathion/miniversion du site actif de la glutathion peroxydase	107
3.3. Interaction glutathion/site actif de la glutathion peroxydase	108
3.4. Interaction pénicillamine-hydantoïne/miniversion du site actif de la glutathion peroxydase	112
4. Effet d'un analogue du glutathion sur l'activité d'enzymes du métabolisme du glutathion	
4.1. Effet de la pénicillamine-hydantoïne sur les glutathion peroxydases	116
Caractéristiques des effets inhibiteur et inactivateur de la L- pénicillamine-hydantoïne sur la glutathion peroxydase	116
4.2. Effet de la pénicillamine-hydantoïne sur la glutathion réductase	121
4.3. Effet de la pénicillamine-hydantoïne sur les glutathion transférases	121
4.4. Etude de la réversion sur cellules en culture de la chimiorésistance par un analogue synthétique du glutathion actif <i>in vitro</i> : la L-pénicillamine-hydantoïne	122
CONCLUSION	123

METHODOLOGIE

1. Culture cellulaire	128
2. Détection de la glycoprotéine P	130
3. Northern blot	
3.1. Extraction de l'ARN	132
3.2. Détermination de la concentration en ARN	133
3.3. Electrophorèse en gel d'agarose en présence de formaldéhyde	133
3.4. Transfert	135
3.5. Marquage de la sonde par le système des amorces multiples	136
3.6. Préhybridation et hybridation	137
3.7. Autoradiographie	137
4. Dosage du glutathion, de la glutathion réductase, des glutathion transférases et peroxydases, de la γ -glutamyl-transpeptidase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase	
4.1. Dosage du glutathion par HPLC et détection électrochimique	138
4.2. Dosage de la glutathion réductase	140
4.3. Dosage des glutathion transférases	141
4.4. Dosage des glutathion peroxydases	141
4.5. Dosage de la γ -glutamyl transpeptidase	142
4.6. Dosage de la glucose-6-phosphate déshydrogénase	143
5. Activité des topoisomérases	
5.1. Préparation des fractions nucléaires	144
5.2. Dosage des topoisomérases dans les fractions nucléaires	145
6. Dosage du calcium intracellulaire	147
7. Dosage de l'AMP cyclique	149
8. Modélisations moléculaires	
8.1. Interaction glutathion - miniversion du site actif de la glutathion peroxydase	151
8.2. Interaction glutathion - site actif de la glutathion peroxydase	152

9. Préparations enzymatiques tissulaires et cellulaires	
9.1. Foie de rat	153
9.2. Cellules en culture	153
10. Dosage des protéines	154
11. Milieux et solutions pour culture cellulaire	155
REFERENCES	156

Ce travail a fait l'objet de 3 publications acceptées et de 2 publications soumises :

- MESTDAGH N., POUPAERT J., HENICHART J.P., VAMECQ J.
Effect of L-penicillamine, an analogue of glutathione on rat liver glutathione peroxidase, reductase and transferase reactions.
Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 1529-1537.
- MORIER-TEISSIER E., MESTDAGH N., BERNIER J.L., HENICHART J.P.
Reduced and oxidized glutathione ratio in tumor cells : comparison of two measurement methods using HPLC and electrochemical detection.
J. Liq. Chromatogr., 1992, sous presse.
- MESTDAGH N., VAMECQ J., POUPAERT J., BERNIER J.L., HENICHART J.P.
The reversal of chemoresistance to anticancer drugs : search for molecules which interfere with glutathione metabolism.
In Recent Advances in Cellular and Molecular Biology (from the 1. World Congress of C.M.B. Paris, September 1-7, 1991) 1992, volume 1, 171-179.
Eds : Wegmann, R. J. & Wegmann, M.A.
- MESTDAGH N., HENICHART J.P., VAMECQ J., BERNIER J.L., BAILLEUX V., DUMONT P., POUPAERT J.
Anti-inflammatory properties and molecular modeling characteristics of D-pen-hyndatoin.
Eur. J. Med. Chem., soumis.
- MESTDAGH N., MORIER-TEISSIER E., HENICHART J.P.
Effect of various chemosensitizers on chemoresistance to adriamycin in MIP-101 cell line, a colon carcinoma cell line. Analysis of glutathione and related enzymes.
Cancer Res., soumis.

et de 7 communications :

- MESTDAGH N., VAMECQ J., POUPAERT J., BERNIER J.L., HENICHART J.P.
The reversal of chemoresistance to anticancer drugs : search for molecules which interfere with glutathione metabolism.
1st World Congress Cellular and Molecular Biology, Paris, September 1-7, 1991.

- MESTDAGH N., POUPAERT J., BERNIER J.L., HENICHART J.P., VAMECQ J.
Inhibition and inactivation properties displayed by L-penicillamine hydantoin on rat liver glutathione peroxidase : I - Biochemical demonstration.
5^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Lille, 26-27 septembre 1991.

- MESTDAGH N., POUPAERT J., BERNIER J.L., HENICHART J.P., VAMECQ J.
Inhibition and inactivation properties displayed by L-penicillamine hydantoin on rat liver glutathione peroxidase : II - Molecular modelling studies.
5^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Lille, 26-27 septembre 1991.

- MESTDAGH N., POUPAERT J., BERNIER J.L., HENICHART J.P., VAMECQ J.
Inhibition and inactivation properties displayed by L-penicillamine hydantoin on rat liver glutathione peroxidase : III - Application of the molecular modelisation studies for the search of other effectors of the enzyme activity and emphasis on chemoresistance reversal.
5^{èmes} Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Lille, 26-27 septembre 1991.

- Mastère en Drug Design, Universités de Lille I et Lille II.
Thème de recherche : *“Réversion de la chimiorésistance à l’adriamycine. Recherche d’outils pharmacologiques pouvant interférer avec le métabolisme du glutathion”*.
Novembre 1991.

- MORIER-TEISSIER E., MESTDAGH N., DUHEM C., BERNIER J.L., HENICHART J.P.
Reduced and oxidized glutathione ratio in tumor cells : comparison of two methods using HPLC and electrochemical detection.
4th European Meeting of G.F.B.C. La Grande Motte - FRANCE. 12-14 May 1992.

- MESTDAGH N., VAMECQ J., MORIER-TEISSIER E., BAILLEUX V., POUPAERT J., HENICHART J.P.
Effect of hydantoin derivatives on glutathione enzymes.
33rd ICBL Lyon-Villeurbanne September 7-10, 1992

INTRODUCTION

Parmi les diverses pathologies pouvant affecter l'être humain, le cancer constitue, après les maladies cardiovasculaires, la seconde cause de mortalité. L'organisme se trouve, en effet, confronté à des agressions ou stimulations externes mais des éléments naturels tels l'âge, les facteurs hormonaux, les habitudes alimentaires, le mode de vie jouent également sans conteste un rôle non négligeable dans le développement de cette pathologie. L'origine des cellules tumorales ainsi que l'étiologie d'un type particulier de cancer varient suivant l'organe et selon l'espèce. Toutefois, des caractères apparaissent universellement associés à toute cellule cancéreuse : la croissance incontrôlée et une perte progressive des caractères différenciés; cette dédifférenciation s'accompagne même parfois de la réexpression de gènes propres à l'état embryonnaire.

Ainsi, le **cancer** représente la conséquence d'une prolifération anarchique des cellules. Quels que soient les événements impliqués dans l'étiologie d'une transformation néoplasique, il est admis qu'ils affectent par une- ou des -modification(s) spécifique(s) le génome d'une cellule dont la descendance constituera la tumeur. Ces facteurs peuvent agir sur les types cellulaires les plus variés mettant en évidence la communauté des mécanismes de la transformation néoplasique dans les différentes cellules.

De très nombreux agents dont le potentiel cancérigène est lié à leur capacité à induire des modifications génétiques dans la cellule ont été clairement identifiés : des agents physiques telles les radiations ionisantes, des agents chimiques de l'environnement et des agents biologiques. Il n'en demeure pas moins que les causes multiples responsables de la majorité des cancers sont, en général, peu connues et que l'apparition d'un cancer est généralement le résultat d'un long processus progressif.

Dans les années 50, la démonstration a été faite que les **substances chimiques** sont généralement biologiquement peu actives par elles-mêmes; c'est parce que l'organisme hôte les métabolise et les transforme en intermédiaires réactionnels qu'elles interagissent avec les macromolécules essentielles causant ou initiant ainsi les phénomènes génotoxiques pouvant conduire à la cancérogénèse. Plus tard, grâce à l'expérimentation animale, le concept de cancérogénèse en plusieurs étapes a pu être élaboré impliquant séquentiellement initiation, promotion et progression (Peraino et al., 1971; Pitot et Sirica, 1980; Farber, 1984).

L'initiation est un processus biologique qui apparaît comme la conséquence d'un événement relativement ponctuel impliquant une altération de l'information génétique. Les promoteurs sont, quant à eux, des substances non génotoxiques mais qui, administrés chroniquement après un effet initiateur, favorisent le développement de cancers (Miller et Miller, 1981). La

progression tumorale proviendrait, elle, de la sélection d'une minorité de cellules malignes qui, en raison de leur vitesse de croissance, deviendraient les cellules prédominantes (Pitot, 1986).

Si des modifications de type mutationnel peuvent induire des cancers, cela signifie que la cellule normale possède dans son génome des gènes codant pour des protéines dont des modifications de structure ou d'expression peuvent entraîner la transformation tumorale, protéines impliquées dans la transduction des signaux de croissance depuis le niveau membranaire jusqu'à des effecteurs de l'expression génétique (Bishop, 1991). Ces gènes cellulaires potentiellement oncogènes existent effectivement et sont dénommés **proto-oncogènes**. Ainsi, une prolifération cellulaire anarchique peut résulter d'une activation de proto-oncogènes en oncogènes par différents processus tels que amplification, mutation, translocation...

C'est avec le développement spectaculaire des techniques de biologie moléculaire que certaines recherches ont pu aboutir, en particulier à la mise en évidence de ces gènes cellulaires appelés "**oncogènes**". En effet, des travaux récents (Bishop, 1987) ont démontré que certains rétrovirus ont la propriété de transformer les cellules. Ils contiennent un gène responsable de l'induction de tumeur. Ce gène a été appelé "**oncogène viral**". Le premier oncogène viral, le gène *v-src* du virus du sarcome du poulet découvert par Rous dès 1911 (Golden et Brugge, 1988), fut isolé en 1975 et son équivalent cellulaire, le proto-oncogène *c-src* fut découvert dans le génome de cellules de poulet non infectées (Stehelin et al., 1976).

Quoi qu'il en soit, le cancer représente, dans nos contrées, l'une des affections les plus meurtrières. Des rémissions totales sont obtenues dans un cas sur deux grâce à une **approche pluridisciplinaire du traitement** combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. A ces trois thérapies classiques s'ajoute l'immunothérapie qui a fait, ces dernières années, des progrès spectaculaires notamment parce que le génie génétique fournit désormais des outils d'intervention nombreux et fiables. Le nombre de personnes qui meurent de cette maladie reste cependant élevé (Poupon et Ling, 1990).

Parmi les divers traitements du cancer, la **chimiothérapie** a pris une place de plus en plus considérable en raison de l'importance de son action. Néanmoins, dans 50% des cas, même avec l'appui de traitements chirurgicaux ou radiologiques, elle ne permet pas l'obtention d'une guérison. Dans la majorité des cas, il faut actuellement se contenter d'une amélioration passagère ou d'une action palliative obtenues au prix de grandes difficultés et accepter une toxicité parfois considérable. L'apparition de cellules tumorales résistantes aux agents

antitumoraux constitue l'une des grandes causes d'échec de la chimiothérapie du cancer (Belpomme, 1991). Ainsi, après un bref aperçu des différents traitements du cancer et des nombreux anticancéreux existant à l'heure actuelle, nous aborderons le problème de la chimiorésistance aux anticancéreux.

Parmi la diversité des mécanismes de **résistance** aux anticancéreux (Tiirikainen et Krusius, 1991; Vendrik et al., 1992), la glycoprotéine P, surexprimée dans la membrane de cellules chimiorésistantes, constitue un paramètre majeur dans le cas de la chimiorésistance pléiotropique c'est-à-dire celle exercée notamment vis-à-vis de l'adriamycine. De nombreuses autres modifications sont observées dans les différents cas de résistance.

Afin de tenter de caractériser les différentes lignées cellulaires dont nous disposons (cellules résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine), nous avons étudié, dans le cadre de cette étude, la glycoprotéine P mais aussi l'expression de divers oncogènes, l'activité d'enzymes du métabolisme du glutathion (modulation de la toxicité de l'adriamycine et du cis-platine), l'activité des topoisomérases (cible de nombreux agents antitumoraux), des variations du taux de calcium et d'adénosine monophosphate cyclique (médiateurs intracellulaires) dans ces cellules.

L'identification de composés **réversant** la chimiorésistance ou l'antagonisant présente également un intérêt important afin de pouvoir disposer d'agents à usage clinique plus efficaces. Pour ce faire, nous avons tenté d'élucider le rôle que peuvent jouer le glutathion et les enzymes du métabolisme du glutathion en traitant des cellules résistantes (*de novo* ou par sélection) à l'adriamycine par la buthionine sulfoximine (inhibiteur de la synthèse du glutathion), le vérapamil (antagoniste calcique), la trifluopérazine (antagoniste de la calmoduline) et le tamoxifène (antioestrogène), quatre chimiosensibilisateurs décrits dans la littérature (Førde et Hait, 1990).

Nous nous sommes, dans le même ordre d'idées, intéressés à la mise en évidence par modélisation moléculaire de l'interaction **glutathion/glutathion peroxydase** afin de rechercher des outils pharmacologiques susceptibles d'interagir avec le site actif de la glutathion peroxydase et de moduler ainsi son activité. De telles pharmacomolécules seraient susceptibles de contrecarrer l'activité de la glutathion peroxydase surexprimée dans diverses situations de chimiorésistance à l'adriamycine.

GENERALITES

1. TRAITEMENT DU CANCER

Avant-propos

Le présent travail est essentiellement axé sur le phénomène de la chimiorésistance aux anticancéreux. Mais pour bien situer ce problème, il nous a semblé utile de rappeler très brièvement les différents traitements du cancer. Ce chapitre volontairement court peut apparaître simpliste pour le spécialiste mais il ne nous a pas semblé nécessaire d'en donner un développement considérable, notre souhait étant de centrer notre réflexion sur les moyens de pallier à la résistance.

Parmi les différents **traitements**, on peut citer :

La chirurgie

La chirurgie peut s'avérer efficace pour supprimer les tumeurs quand il s'agit d'un cancer localisé et que la tumeur détectée est située sur un organe aisément accessible. Mais, la plupart du temps, même si la tumeur semble localisée, il est possible que des cellules cancéreuses se soient détachées et, emportées par le sang ou la lymphe, soient allées coloniser des organes plus ou moins éloignés pour former des métastases. La chirurgie offre l'avantage à présent d'être plus délicate, elle tend à conserver au maximum l'organe atteint et s'applique aussi, lorsque l'amputation est inévitable, à réparer les dégâts.

La radiothérapie

La radiothérapie peut réduire, voire détruire les cancers localisés qui ne sont pas accessibles par voie chirurgicale. Cette méthode, utilisée seule ou associée à la chirurgie ou à la chimiothérapie, donne de bons résultats (Herskovic et al., 1992). Il est important de bien délimiter le champ d'irradiation pour agir sur la division des cellules cancéreuses sans léser les cellules saines des tissus environnants.

Un autre obstacle à la radiothérapie est l'induction de la radiorésistance, perte de la radiosensibilité de cellules cancéreuses, survenant souvent lorsque la tumeur a atteint une taille volumineuse.

L'immunothérapie

Un des moyens permettant de lutter contre le cancer est de stimuler les capacités naturelles des individus. L'immunothérapie est un traitement prometteur pouvant être mis en oeuvre contre les métastases. Par ce traitement, on cherche à déclencher la destruction des cellules cancéreuses, qui portent des antigènes absents chez les cellules normales, par des cellules du système immunitaire. Des méthodes récentes consistent ainsi à faire proliférer, sous l'action d'interleukine-2, un médiateur de l'immunité, des cellules tueuses, "lymphokine-activated killer cells" (cellules LAK) ou à infiltrer les tumeurs en sélectionnant des lymphocytes cytotoxiques particuliers ("tumor infiltrating lymphocytes" ou TIL) (Rosenberg, 1990).

Néanmoins, le traitement de patients atteints de leucémie myéloïde chronique par l'interféron a déjà mis en évidence l'existence d'un phénomène de résistance à l'immunothérapie (Talpaç et al., 1992).

La chimiothérapie

Cette technique consiste à administrer des substances qui détruisent les cellules cancéreuses disséminées dans l'organisme. Née après la deuxième guerre mondiale, et d'abord utilisée essentiellement dans les leucémies et les lymphomes, la chimiothérapie a vu, ces dernières années, ses indications se multiplier. Cependant, il faut reconnaître que la plupart des cancers communs de l'adulte, de très loin les plus fréquents, demeurent insensibles aux progrès réalisés dans ce domaine.

La chimiothérapie du cancer repose sur le principe de toxicité sélective, selon lequel une substance antitumorale se définit comme une substance cytotoxique qui détruit sélectivement les cellules tumorales, en altérant le moins possible les cellules normales. Tel que nous l'entendons classiquement, elle relève d'un phénomène de cytotoxicité, résultant de l'induction de lésions irréversibles au niveau de l'ADN tumoral, par mécanisme direct (incorporation, adduction) ou indirect (inhibition enzymatique, altération protéique). La conséquence en est l'inhibition de synthèse de l'ADN et/ou l'altération des processus de division, lesquelles entraînent le plus souvent la mort cellulaire.

Il faut par ailleurs tenir compte des cinétiques cellulaires et tumorales. Les différences cinétiques présentées par les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales contribuent à la spécificité des médicaments anticancéreux. Les cellules d'une tumeur ne sont pas toutes homogènes, elles peuvent différer les unes des autres par leur vitesse de croissance, leur état de prolifération. L'élimination de toutes les cellules tumorales nécessite l'administration simultanée ou séquentielle de plusieurs agents anticancéreux dont les sites d'action sont distincts afin d'éviter les rechutes, la formation de métastases, et d'optimiser le protocole expérimental.

Les médicaments actuellement utilisés couramment en clinique humaine peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action (Ardiet et al., 1989; Salmon et Sartorelli, 1989) :

- *Antimétabolites*

Un certain nombre d'agents agissent comme inhibiteurs de systèmes enzymatiques impliqués dans la biosynthèse des purines (6-mercaptopurine, 6-thioguanine), des pyrimidines (5-fluoro-uracile, cytosine arabinoside (ara-C)). Le méthotrexate fait également partie des antimétabolites; il se fixe très fortement sur la dihydrofolate réductase en l'inhibant.

- *Agents alkylants*

Parmi les agents anticancéreux agissant directement avec l'ADN, les alkylants sont des composés capables de former avec les bases de l'ADN des liaisons irréversibles. Ce sont des agents électrophiles susceptibles de réagir avec des centres nucléophiles. Parmi ces composés, on peut trouver notamment la moutarde à l'azote, le melphalan, le cis-platine.

- *Agents intercalants*

Certaines molécules sont capables de s'insérer entre les plans de base de l'ADN entraînant une déformation de la double hélice. L'intercalation conduit à une inhibition de la réplication et de la transcription (amsacrine).

- *Agents scindant l'ADN*

L'adriamycine peut, lors de son métabolisme intracellulaire, engendrer des radicaux semiquinones et/ou des radicaux libres. Ces radicaux peuvent se lier de façon covalente à l'ADN et induire des cassures sur l'ADN (voir "GENERALITES 3.1. Adriamycine").

- *Agents tubulo-affines*

Certains alcaloïdes de la pervenche, vinblastine et vincristine, n'agissent pas directement sur l'ADN mais se fixent sur la tubuline, empêchant sa polymérisation en microtubules et la formation du fuseau mitotique : ce sont des poisons du fuseau.

D'une part, l'utilisation des agents anticancéreux est limitée par les toxicités aiguës et chroniques (Fallowfield, 1992) et, d'autre part, l'une des grandes causes d'échec de la chimiothérapie du cancer résulte dans l'apparition de cellules tumorales résistantes (Belpomme, 1991). Nous allons donc aborder ce problème très fréquent et très important de chimiorésistance.

2. CHIMIORESISTANCE AUX ANTICANCEREUX

Les mécanismes biologiques engendrant la **résistance** aux agents anticancéreux donnent actuellement lieu à d'intenses recherches mais peu de solutions thérapeutiques sont apportées. La très grande diversité des mécanismes de résistance intrinsèque témoigne de l'extraordinaire capacité des cellules tumorales à résister à ces agents.

Parmi les nombreux mécanismes de résistance (Bradley et al., 1988; Tsuruo, 1988; Hayes et Wolf, 1990; Tiirikainen et Krusius, 1991; Vendrik et al., 1992), on peut citer :

- altération du transport transmembranaire des anticancéreux, diminution de leur entrée ou augmentation de leur efflux
- altération de leurs enzymes d'activation métabolique
- augmentation de la détoxification de l'anticancéreux
- altération qualitative ou quantitative de la cible de l'anticancéreux
- activation des systèmes de réparation de l'ADN
- changement dans la distribution subcellulaire de l'anticancéreux
- modification qualitative ou quantitative de la topoisomérase II
- altération de l'ultrastructure de la membrane plasmique

La reproduction *in vitro* du phénomène de chimiorésistance à l'aide de lignées cellulaires a permis de démontrer que la résistance est un phénomène complexe dépendant non seulement de la lignée cellulaire concernée, mais aussi du type d'agent cytotoxique utilisé. Les mécanismes en cause sont multiples et il faut distinguer dans ce type de phénomène les **résistances primaires ou occasionnelles** (*de novo*, parfois appelées naturelles) et les **résistances secondaires ou acquises** (après exposition réitérée aux anticancéreux) (Tsuruo, 1988; Hayes et Wolf, 1990).

CLASSIFICATION DES DIFFERENTS TYPES DE CHIMIORESISTANCE

Résistance primaire

Elle décrit une situation où la cellule possède des caractéristiques propres lui permettant de tolérer un produit donné. Elle peut être due à des distorsions cinétiques entre le médicament et la cinétique cellulaire et/ou tumorale (chimiorésistance cinétique); elle peut aussi se manifester quand

la tumeur s'avère inaccessible ou qu'une partie n'est plus vascularisée donc en hypoxie (chimiorésistance anatomique).

Résistance secondaire

Elle est liée à la sélection d'une souche ou lignée cellulaire résistante émergeant d'une population initialement sensible. Elle explique pourquoi des rémissions cliniques peuvent être suivies d'une rechute définitive.

- *Résistance aux antimétabolites* (Scanlon et al., 1987; Bradley et al., 1988; Ardiét et al., 1989; Hayes et Wolf, 1990) :

Elle peut être causée par une altération

- des enzymes impliquées dans le métabolisme intracellulaire

- soit par une diminution d'activation métabolique : activité enzymatique réduite de la désoxycytidine kinase et de l'uridine kinase respectivement pour la cytosine-arabinoside et le 5-fluoro-uracile, déficit génétique en glutamyltransférase pour le méthotrexate

- soit par une augmentation d'une inactivation métabolique : accroissement de l'activité cytidine désaminase métabolisant la cytosine-arabinoside en composé inactif.

- du transport transmembranaire

caractérisé par une diminution du flux entrant (méthotrexate).

- des protéines cibles des agents anticancéreux

avec notamment augmentation et/ou altération de certaines enzymes

- amplification génique de la dihydrofolate réductase pour le méthotrexate, de la thymidylate synthétase pour le 5-fluoro-uracile, de la ribonucléotide réductase pour l'hydroxyurée. Dans ces conditions, l'enzyme reste structurellement la même mais le nombre de copies empêche l'anticancéreux de se lier à tous les sites enzymatiques, l'inhibiteur s'avère inopérant.

- une altération qualitative de la dihydrofolate réductase (mutation ponctuelle) peut également induire une résistance au méthotrexate.

- *Résistance pléiotropique* : elle est induite par un agent donné dans une lignée cellulaire et s'exprime non seulement vis-à-vis de cet agent mais aussi vis-à-vis d'autres médicaments pouvant présenter des mécanismes d'action différents. Cette résistance est ainsi dénommée "croisée". Les cytotoxiques concernés par ce phénomène incluent les anthracyclines (adriamycine), les actinomycines (actinomycine D), des anthraquinones (mitoxantrone), les alcaloïdes de la Pervenche (vincristine, vinblastine), la colchicine et les

épipodophyllotoxines (étoposide, téniposide) (Gottesman et Pastan, 1988; Roninson, 1992). Les cellules présentant ce phénotype développent, par ailleurs, une sensibilité accrue vis-à-vis d'autres substances à tropisme membranaire telles que des anesthésiques locaux (lidocaïne), des hormones stéroïdes (désydrotestostérone), des détergents ioniques (triton) ou encore des inhibiteurs calciques (vérapamil) (Bradley et al., 1988; Ford et Hait, 1990). Ce type de résistance, aussi connu sous le terme de "multidrug resistance" (MDR), est dû de façon quasi constante à la surexpression du gène *mdr* codant pour la glycoprotéine membranaire P 170 (P pour perméabilité membranaire, 170 pour 170 kDa). Cette glycoprotéine est présente dans la membrane de certaines cellules normales et en quantité augmentée dans celle de cellules résistantes (Pastan et al., 1991).

- Des altérations de la topoisomérase II, cible commune des intercalants et des épipodophyllotoxines, peuvent entraîner une "multidrug resistance" d'un autre type dénommée *AT-MDR* (AT = Altération de la Topoisomérase II) (Piller, 1989; Sugawara et al., 1991; Webb et al., 1991).

- *Résistance aux alkylants* (Ardiet et al., 1989; Piller, 1989; Tiirikainen et Krusius, 1991) : Elle peut être causée par

l'activation des systèmes de réparation de l'ADN

Ce mécanisme, certainement le plus fréquent et probablement le plus important, demeure le moins étudié, notamment chez les eucaryotes et plus particulièrement chez l'homme.

l'altération du transport

Ainsi, le melphalan entre dans la cellule cancéreuse via un transporteur actif, le système "leucine" (Begleiter et al., 1979), et l'administration de leucine peut inhiber la prise en charge du melphalan par compétition.

l'augmentation des protéines ou enzymes de détoxification cellulaire

L'altération du métabolisme des agents alkylants peut se réaliser par conjugaison du médicament avec le glutathion, tripeptide impliqué dans les mécanismes d'élimination des substances toxiques. La métallothionéine peut également contribuer à une accélération de la détoxification du cis-platine.

En résumé, au moins cinq grands mécanismes contribuant à la chimiorésistance peuvent être individualisés :

- altération du transport membranaire des agents anticancéreux (intervention de la glycoprotéine P 170)
- altération quantitative et/ou qualitative de leurs protéines cibles (enzymes, protéines de structure)

- altération quantitative et/ou qualitative des processus spécifiques d'activation ou d'inactivation intervenant dans leur métabolisme
- altération quantitative et/ou qualitative des processus généraux de détoxication cellulaire (glutathion, enzymes rédox)
- activation des systèmes de réparation de l'ADN.

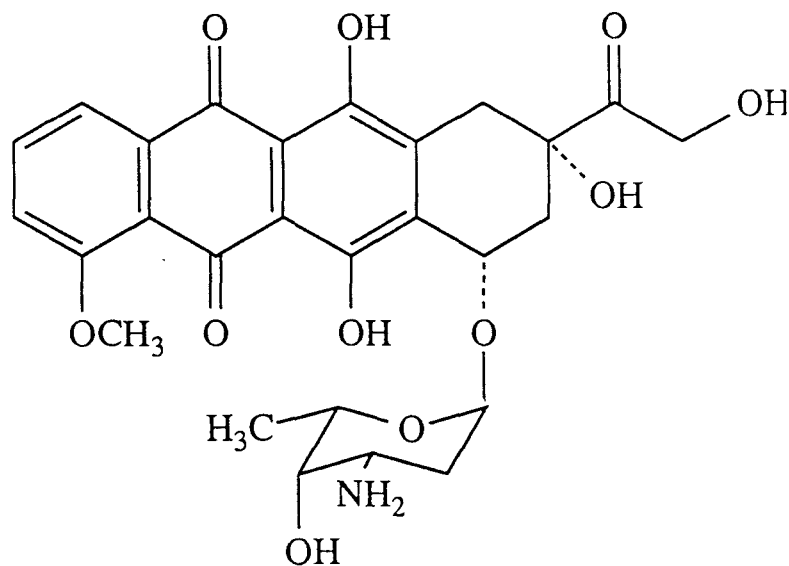
Etant donné la diversité des mécanismes de résistance développés vis-à-vis des nombreux anticancéreux existant à l'heure actuelle, notre attention s'est portée plus particulièrement sur deux anticancéreux couramment utilisés en clinique humaine à savoir l'adriamycine et le cisplatine.

3. CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE ET AU CIS-PLATINE

Ce travail est donc focalisé sur l'étude de deux anticancéreux à savoir l'adriamycine et le cis-platine. Avant de passer en revue les mécanismes connus à l'heure actuelle concernant la chimiorésistance développée vis-à-vis de ces deux composés, il s'avère intéressant de se rappeler leurs propriétés et mécanismes d'action.

3.1. ADRIAMYCINE

L'adriamycine et la daunorubicine font partie de la classe des anthracyclines; elles ne diffèrent entre elles que par la présence d'un groupement hydroxyle.



L'adriamycine, un des médicaments les plus utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, possède un spectre d'action relativement large et est utilisé contre de nombreuses tumeurs solides (poumon, sein). Son utilisation thérapeutique est limitée par la toxicité qu'elle présente vis-à-vis de différents organes, coeur (cardiotoxicité), rein (néphropathies avec lésions glomérulaires, dilatations tubulaires), foie (dysfonctionnement hépatique) (Carter, 1975; Ogura et al., 1991).

Son *mode d'action* cytotoxique est le résultat de plusieurs effets cellulaires :

- formation de radicaux libres. Les anthracyclines peuvent être réduites en radicaux semiquinones par des enzymes mitochondriales (NADH déshydrogénase) ou microsomiales

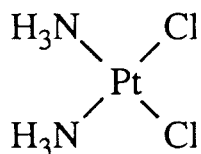
(NADPH cytochrome P-450 réductase) (Doroshov, 1983; Bartoszek et Wolf, 1992). Ces radicaux peuvent se lier de manière covalente à l'ADN et induire la formation de coupures. Ils sont aussi capables de réduire l'oxygène moléculaire en espèces très réactives comme l'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Ces différentes espèces réactives, instables, réagissent rapidement et de façon non spécifique avec diverses macromolécules (Myers, 1985; Ardiet et al., 1989; Turner et al., 1990).

- inhibition de la topoisomérase II et intercalation au niveau de l'ADN. Il en résulte des modifications au niveau de la structure de l'ADN, des changements de conformation, et des erreurs lors de la réplication (Carter, 1975; Wheeler et al., 1982; Tewey et al., 1984; Lock et Ross, 1987; Zunino et Capranico, 1990). Foglesong et ses collaborateurs ont également montré récemment une inhibition de la topoisomérase I par l'adriamycine à des concentrations induisant des dommages à l'ADN et une cytotoxicité *in vivo* (Foglesong et al., 1992). Ces résultats suggèrent d'ailleurs qu'un des premiers mécanismes responsables de la cytotoxicité de l'adriamycine pourrait être dû à la topoisomérase I puisque la concentration nucléaire de celle-ci est 10 fois supérieure à celle de la topoisomérase II.

- altérations membranaires (rupture de l'intégrité membranaire par liaison directe avec les lipides membranaires) qui pourraient induire une fuite ionique et une interaction avec les protéines membranaires (Wheeler et al., 1982; Awasthi et al., 1992).

3.2. CIS-PLATINE

Le cis-platine est un complexe contenant un atome de platine entouré de deux groupes ammoniac et de deux groupements labiles chlorures en position cis.



L'effet antitumoral du cis-platine a été mis en évidence dans des tumeurs expérimentales par le groupe de Rosenberg puis les essais cliniques ont démontré qu'il s'agissait d'un médicament d'intérêt majeur (Rosenberg et al., 1969). Le cis-platine est maintenant utilisé contre un large éventail de tumeurs solides avec une efficacité particulière sur les cancers du testicule, de l'ovaire, du poumon à petites cellules (Müller et al., 1991). Toutefois, une limite importante à son utilisation résulte de sa néphrotoxicité (Ardiet et al., 1989; Los et al., 1991).

Le *mécanisme d'action* l'apparente aux agents alkylants. En solution aqueuse, il s'hydrolyse et les chlorures sont remplacés par des hydroxyles; cette réaction conduit à des

complexes très électrophiles qui peuvent subir une substitution de leurs ligands labiles par divers nucléophiles cellulaires. La cible majeure du cis-platine est l'ADN dont il inhibe la réplication. La position en N7 de la guanine semble constituer un site préférentiel d'attaque, d'autres ligands forts comme la position en N7, N1 de l'adénine ou N3 de la cytosine constituent des cibles du cis-platine (Fichtinger-Schepman et al., 1985). Le cis-platine ayant deux sites réactifs, une seconde réaction a lieu après la première fixation pouvant avoir plusieurs conséquences parmi lesquelles la formation de ponts interbrins, intrabrins ou même protéines-ADN. L'activité plus importante du cis-platine, par rapport à l'isomère trans, vis-à-vis de l'inhibition de la réplication de l'ADN serait due à ce que les pontages interbrins majoritaires de l'isomère trans sont plus efficacement reconnus et éliminés par les systèmes de réparation cellulaires que ceux de l'isomère cis qui s'accumulent sur l'ADN.

L'ADN ne constitue pas la seule cible. D'autres lésions moléculaires peuvent induire des altérations structurales du cytosquelette conduisant notamment à des altérations dans le transport intracellulaire, des changements dans la forme cellulaire et la stabilité (Köpf-Maier et Mühlhausen, 1992).

3.3. CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE

La résistance à l'adriamycine est de type pléiotropique. Elle est associée au développement de mécanismes de défense cellulaire contre l'agression oxydative causée par l'agent anticancéreux. Les changements observés apparaissent convergents et comprennent une augmentation du flux sortant actif transmembranaire responsable de l'expulsion de l'adriamycine intracellulaire et des modifications du métabolisme du glutathion (augmentation du contenu cellulaire en glutathion, glutathion peroxydases et isoenzyme glutathion-S-transférase de type π). La résultante de ces adaptations cellulaires est une diminution appréciable de la production du radical hydroxyle, et par conséquent une perte importante de la cytotoxicité de l'adriamycine (Deffie et al., 1988; Kramer et al., 1988; Mimnaugh et al., 1989; Singh et al., 1989; Crescimanno et al., 1991; Rabier et al., 1991; Chao et al., 1992). Outre les mécanismes précédemment décrits, la topoisomérase II peut également être impliquée dans ce phénomène de chimiorésistance; la modification peut être aussi bien une augmentation qu'une diminution d'activité (Cole et al., 1991; Sugawara et al., 1991; Webb et al., 1991; Hoban et al., 1992).

Quelques études mettent en évidence également des modifications ultrastructurales dans la cellule résistante à l'adriamycine (Bobichon et al., 1992) ainsi que des compartimentations différentes dans la localisation de l'adriamycine (Rabier et al., 1991; Boiocchi et Toffoli, 1992; Marquardt et Center, 1992).

3.4. CHIMIORESISTANCE AU CIS-PLATINE

Les principaux mécanismes sont les suivants :

- différences dans les mécanismes de réparation de l'ADN
- capacité accrue des cellules à tolérer des lésions non réparées de l'ADN
- altération de l'accumulation du cis-platine dans les cellules
- niveau intracellulaire supérieur en glutathion ou en métallothionéine.

D'autres altérations ont également été mises en évidence telles que la surexpression d'une glycoprotéine membranaire dans des cellules thymiques de souris (Kawai et al., 1990), des altérations de la topoisomérase II (de Jong et al., 1990; Waud et al., 1991).

Des modifications observées plus récemment dans les cellules résistantes au cis-platine se rapportent à l'expression de divers oncogènes et à l'importance des mécanismes de réparation dans ces différentes cellules (Reed et al., 1989; Scanlon et al., 1989; Chu et Chang, 1990; Scanlon et al., 1990; Andrews et Howell, 1990; Isonishi et al., 1991; Jiao et al., 1991; Sklar et Prochownik, 1991; Scanlon et al., 1992). Ces études mettent en évidence des protéines pouvant reconnaître spécifiquement des adduits cis-platine/ADN, l'expression d'oncogènes tels que *fos*, *ras*, *myc*, des taux altérés dans les enzymes de réparation de l'ADN.

Les modifications engendrées par la variation du taux de glutathion peuvent s'expliquer par le fait que, à concentration physiologique, le glutathion peut, d'une part, se lier directement au cis-platine, inhibant la réaction entre l'ADN et le cis-platine ou, d'autre part, réagir avec des adduits monofonctionnels de l'ADN avant qu'ils ne puissent se réarranger en adduits bifonctionnels toxiques (Eastman, 1987). Les métallothionéines sont, quant à elles, des protéines ubiquitaires se liant aux métaux tels que Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} ... Ces nucléophiles puissants peuvent interagir avec des anticancéreux électrophiles réduisant la quantité d'agent disponible pour l'interaction avec l'ADN (Hacker, 1990). Le rôle de la métallothionéine dans la résistance au cis-platine est controversé. Certaines expériences ont pu montrer que l'insertion de cette protéine pouvait induire la chimiorésistance (Hacker, 1990) mais, dans d'autres cas, ce sont des paramètres différents qui s'avèrent responsables de l'induction de la chimiorésistance (Andrews et Howell, 1990).

L'analyse de différentes données de la littérature permet de mettre en évidence les nombreuses modifications qui s'avèrent impliquées dans le phénomène de chimiorésistance au cis-platine et la complexité de ce phénomène (Tableau 1).

Tableau 1 : Mécanismes mis en cause dans divers types cellulaires lors de la chimiorésistance au cis-platine

Type cellulaire	Mécanismes mis en cause
- cellules de leucémie murine L1210	<ul style="list-style-type: none"> - augmentation du taux de glutathion et modification de l'accumulation du cis-platine (Richon et al., 1987) - accumulation réduite de cis-platine, taux de réparation accru des adduits DNA-protéines dans les cellules résistantes (Olinski et Briggs, 1991) - prise en charge inférieure du cis-platine, taux de glutathion supérieur dans les cellules résistantes (Tashiro et Sato, 1992) - quenching des monoadduits (Micetich et al., 1983) - accumulation réduite de cis-platine (Nicolson et al., 1992)
- cellules de leucémie murine P-388	<ul style="list-style-type: none"> - accroissement de l'activité topoisomérase II (Waud et al., 1991) - prise en charge inférieure du cis-platine, taux de glutathion supérieur dans les cellules résistantes (Tashiro et Sato, 1992)
- cellules ovariennes de hamster chinois	<ul style="list-style-type: none"> - la transfection du gène codant pour la glutathion transférase de type π induit la résistance (Miyazaki et al., 1990)
- cellules ovariennes humaines (SK-OV3 et TR 175)	<ul style="list-style-type: none"> - modification du taux de glutathion, des activités glutathion réductase et peroxydases, catalase, mécanismes de réparation altérés, capacité accrue à tolérer des lésions non réparées de l'ADN (Shellard et al., 1991)
- cellules ovariennes humaines (2008)	<ul style="list-style-type: none"> - potentiel mitochondrial plus élevé, changement de la morphologie mitochondriale dans les cellules résistantes, changement dans la composition des phospholipides (Andrews et Albright, 1992)
- cellules ovariennes humaines (A2780)	<ul style="list-style-type: none"> - augmentation du taux de glutathion et de l'activité γ-glutamyl-transpeptidase (Godwin et al., 1992) - modification dans la prise en charge et l'efflux du cis-platine, mécanismes de réparation altérés (Parker et al., 1991) - accroissement de l'expression de <i>c-fos</i> (Jiao et al., 1991)
- cancer du poumon à petites cellules (GLC4)	<ul style="list-style-type: none"> - altérations dans le taux de glutathion, dans les interactions cis-platine/ADN (Hospers et al., 1988) - accroissement de l'activité topoisomérase II (de Jong et al., 1990)
- cancer du poumon à petites cellules (H69)	<ul style="list-style-type: none"> - augmentation du taux de métallothionéine, de l'activité glutathion transférases (Kasahara et al., 1991)

4. ETUDE DE DIFFERENTS PARAMETRES IMPLIQUES DANS LA CHIMIORESISTANCE

Parmi les nombreux paramètres pouvant être impliqués dans la chimiorésistance à l'adriamycine et/ou au cis-platine, notre intérêt s'est porté sur la détection de la glycoprotéine P, l'étude de l'expression de divers oncogènes, les variations dans les taux de glutathion et des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion, l'activité topoisomérase II, le taux de calcium et l'activité adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (médiateurs intracellulaires) dans diverses lignées cellulaires sensibles ou résistantes à ces anticancéreux. Diverses notions concernant ces différents paramètres sont présentées.

4.1. LA GLYCOPROTEINE P

La glycoprotéine P a été découverte dans la membrane plasmique de cellules ovariennes de hamster chinois. Il s'agit d'une protéine de 170 kDa, glycosylée (Kartner et al., 1983).

Le gène codant pour cette protéine fait partie d'une famille multigénique dont les séquences sont hautement conservées au cours de l'évolution (Juranka et al., 1989).

La **structure primaire** de la glycoprotéine P a été déduite de la séquence du gène MDR1. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 1280 acides aminés, de poids moléculaire 140 kDa, ce qui correspond à sa forme non glycosylée (Chen et al., 1986; Gros et al., 1986).

L'analyse de la séquence révèle deux parties homologues, chacune comportant

- une région hydrophobe constituée de six domaines transmembranaires susceptibles de s'organiser en hélice α
- une région hydrophile intracytoplasmique très conservée contenant une séquence consensus de liaison à l'ATP.

Le domaine extracellulaire possède des sites de glycosylation (Figure 1).

Avec ses six régions transmembranaires dans chaque demi-séquence, la molécule de glycoprotéine P peut se replier douze fois sur elle-même. Ces douze régions transmembranaires de la protéine s'associent, vraisemblablement, pour former un pore à travers lequel la glycoprotéine P expulserait activement les toxiques. Une configuration transmembranaire de ce type est caractéristique des protéines formant des canaux qui assurent le transport des substances nutritives, des ions et des métabolites cellulaires à travers la membrane plasmique.

En comparant la glycoprotéine P à d'autres protéines connues, il s'est avéré qu'elle ressemblait à une protéine membranaire de transport : elle comporte des régions comparables à celles de nombreuses protéines de transport bactériennes ou eucaryotes (protéine de transport de l' α hémolysine : hylB, du maltose : mulk, d'oligopeptides : Opp D...). La région la mieux conservée chez les diverses espèces interagit spécifiquement avec l'ATP (Juranka et al., 1989; Biedler, 1992).

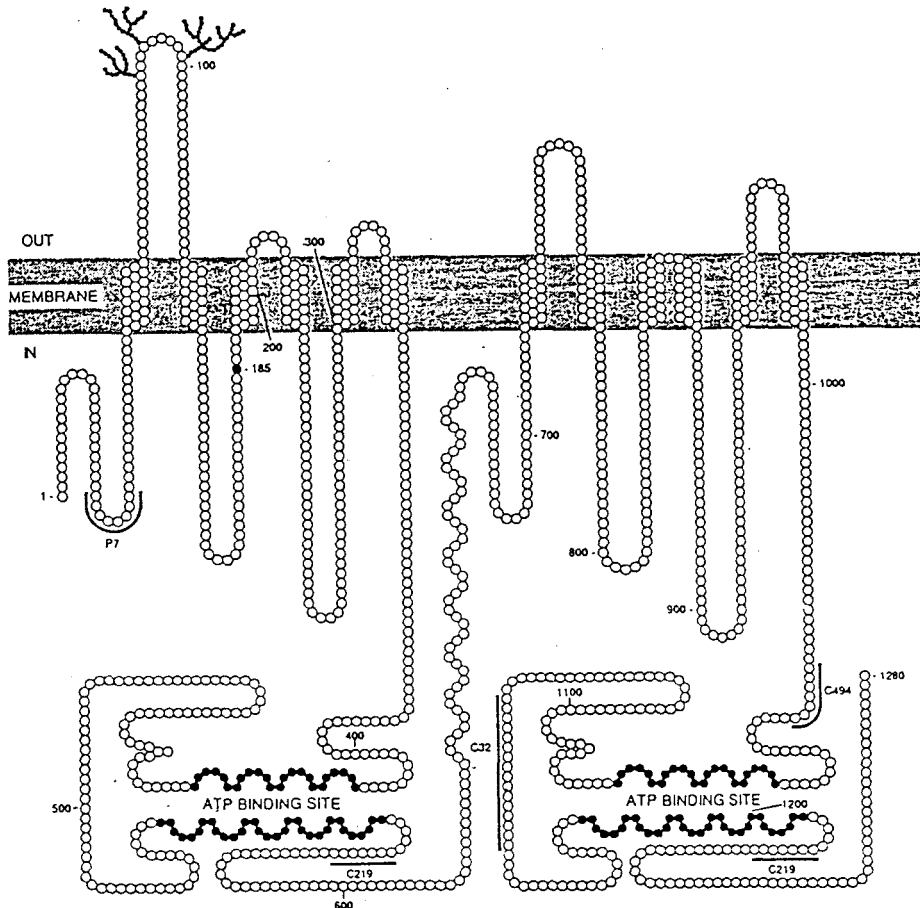


Figure 1 : Topologie de la glycoprotéine P (D'après Juranka et al., 1989)

La glycoprotéine P a été localisée par immunohistochimie dans divers tissus humains et notamment dans le foie, les reins, le côlon, le pancréas (Fojo et al., 1987; Nooter et Herweijer, 1991; Biedler, 1992). L'expression de la glycoprotéine P est variable et hétérogène. La variabilité correspond aux niveaux différents d'expression de la glycoprotéine P dans un tissu parmi les patients et l'hétérogénéité se rapporte aux niveaux différents d'expression à l'intérieur de ce tissu.

Trois types principaux de cellules expriment fortement la glycoprotéine P (Tableau 2) :

- certaines cellules épithéliales spécialisées dans des activités de sécrétion ou d'excrétion
- les trophoblastes du placenta
- les cellules endothéliales des capillaires du système nerveux central, des testicules et des papilles dermiques .

Tableau 2 : Expression de la glycoprotéine P dans les organes et les tissus sains de l'homme (* expression forte)

NIVEAU D'EXPRESSION	ORGANES ET TISSUS
ELEVE	glande surrénale
INTERMEDIAIRE	sein, poumon (épithélium de l'appareil respiratoire *) estomac, côlon, jéjunum, rectum foie, pancréas rein, prostate, vésicule séminale, vessie et uretère placenta
FAIBLE OU NUL	cerveau (endothélium des capillaires*) oesophage, rate, thymus, moelle osseuse ovaire, testicule (endothélium des capillaires*) coeur, muscles lisses, muscles striés peau (endothélium des capillaires des papilles dermiques*)

En raison de sa localisation dans les tissus sains et de la conservation de sa structure au cours de l'évolution des espèces, un **rôle physiologique** important a été suspecté pour la glycoprotéine P ((Nooter et Herweijer, 1991; Tiirikainen et Krusius, 1991; Roninson, 1992).

La glycoprotéine P est située principalement à la surface luminale des organes émonctoires :

- bordure en brosse des cellules des tubules proximaux rénaux
- canalicules biliaires
- canalicules pancréatiques
- surface apicale des cellules du côlon.

Cette glycoprotéine P joue sans aucun doute un rôle de protection contre des toxines naturelles ou exogènes (Pastan et al., 1991).

La glycoprotéine P est présente dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et testiculaires. Par sa localisation, elle pourrait participer au fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique.

L'expression élevée de la glycoprotéine P dans les glandes cortico-surrénales suggère qu'elle pourrait être impliquée dans le transport des corticostéroïdes.

Une hypothèse récente implique également la glycoprotéine P dans le transport de peptides endogènes (Sharma et al., 1992).

La **surexpression** de la glycoprotéine P est l'anomalie la plus fréquemment rencontrée dans de nombreux cas de chimiorésistance (Pastan et al., 1991).

Chez l'homme, deux gènes ont été isolés : MDR1 et MDR2, MDR1 intervenant dans le phénomène de chimiorésistance. L'équivalent murin du gène MDR1 est représenté par les gènes *mdr 1* et *mdr 3*. Dans le cas de la souris, la substitution d'un seul acide aminé est responsable de la modulation de l'activité et de la spécificité de substrat : *mdr 1* est responsable de la résistance à la colchicine et à la doxorubicine alors que pour *mdr 3*, la résistance se manifeste préférentiellement vis-à-vis de l'actinomycine (Gros et al., 1991; Schinkel et al., 1991).

Une relation peut être établie dans certains cas entre le niveau d'expression de la glycoprotéine P dans des tissus tumoraux et la présence d'une sensibilité ou d'une résistance à la chimiothérapie (Tableau 3) (Fojo et al., 1987; Nooter et Herweijer, 1991).

Tableau 3 : Expression de la glycoprotéine P dans les tissus tumoraux

NIVEAU D'EXPRESSION	ORGANES ET TISSUS
<p>GENERALEMENT ELEVE dans les tumeurs non traitées</p>	<p>cancer du côlon, pancréas, rein, du poumon non à petites cellules, hépatome, leucémie myéloïde chronique en phase aiguë <u>Résistance intrinsèque</u></p>
<p>OCCASIONNELLEMENT ELEVE dans les tumeurs non traitées</p>	<p>neuroblastome leucémie aiguë (non) lymphoblastique de l'adulte, lymphome non hodgkinien <u>Sensibilité à la chimiothérapie</u></p>
<p>AUGMENTE dans les tumeurs traitées</p>	<p>neuroblastome leucémie aiguë (non) lymphoblastique cancer du sein <u>Résistance acquise</u></p>

Utilisant l'énergie cellulaire, la *glycoprotéine P expulse rapidement les agents toxiques* hors de la cellule (Kartner et al., 1983; Gottesman et Pastan, 1988; Juranka et al., 1989; Ford et Hait, 1990; Tiirikainen et Krusius, 1991). Elle pourrait évacuer ces agents de deux façons : soit elle les fixerait directement et leur ferait traverser son pore transmembranaire, soit une autre molécule (une protéine de transport) les capterait, et le complexe formé serait évacué à travers la membrane.

La spécificité de la pompe MDR pourrait s'expliquer

- par une conjugaison des substrats au glutathion, même si ce n'est pas un phénomène général (West, 1990)

- par la capacité des substrats à s'insérer dans la bicouche lipidique d'une façon appropriée (Higgins et Gottesman, 1992). Les substrats de la glycoprotéine P étant liposolubles, on peut s'attendre à une intercalation entre les molécules de phospholipides dans la bicouche lipidique, ce qui permet aux différents substrats de pénétrer à l'intérieur de la cellule et d'y exercer leur action.

En outre, la présence exagérée de la glycoprotéine P dans la membrane de cellules peut conduire à des anomalies de la structure et de la fonction membranaires expliquant la "multidrug resistance" autrement que par le seul système d'efflux des cytotoxiques. Des changements de l'architecture membranaire modifieraient la sensibilité des cellules multirésistantes aux agents actifs sur la membrane.

4.2. EXPRESSION DE DIVERS ONCOGENES

On distingue *plusieurs familles d'oncoprotéines*, protéines codées par les oncogènes (Figure 2) :

1/ La famille des *facteurs de croissance*

Le premier représentant de cette catégorie de protéines est le proto-oncogène *sis*; il code lui-même pour un produit analogue à un facteur de croissance, le PDGF, facteur nécessaire à la croissance de divers types cellulaires (Marshall, 1989; Rayter et al., 1989).

2/ Les *récepteurs des facteurs de croissance*

Dans cette famille, on peut trouver des protéines kinases membranaires (produits de *erb-B*, *fms*) avec de larges domaines extracellulaires et cytoplasmiques (site catalytique pour une activité tyrosine kinase) correspondant à des récepteurs pour des facteurs de croissance (*erb-B* pour le récepteur du facteur de croissance EGF, *fms* pour le récepteur du facteur de croissance hématopoïétique) (Rayter et al., 1989; Studzinski, 1989).

3/ La famille des *protéines membranaires liant le GTP*

Cette famille comprend les produits des gènes *c-ras* localisés sur la face interne de la membrane plasmique.

Ce sont des protéines fixant le GTP, douées d'une activité GTPasique. Ras est inactive sous sa forme liée au GDP et active sous sa forme liée au GTP. Ras-GTP interagit avec des protéines GAP (GTPase activating protein), qui stimulent très fortement son activité GTPasique endogène, induisant donc l'inactivation de la protéine ras.

Chez les mammifères, cette famille comprend au moins trois membres (produits de *H-ras*, *K-ras* et *N-ras*). Le produit final codé par ces trois gènes *ras* est similaire : c'est une protéine d'un poids moléculaire de 21 kDa, cette protéine intervient dans la transduction de signaux externes plus probablement induits par des facteurs de croissance ou des facteurs impliqués dans la différenciation cellulaire (Barbacid, 1986; Bos, 1989; Santos and Nebreda, 1989).

4/ La famille des *protéines kinases membranaires*

Ces enzymes phosphorylent des protéines sur un résidu tyrosine (tyrosine kinases : produits de *abl*, *src*). *Src* fut le premier oncogène identifié et son produit fut la première tyrosine kinase découverte (Rayter et al., 1989; Golden et Brugge, 1989).

5/ La famille des *protéines kinases cytosoliques*

Ces enzymes phosphorylent des protéines sur un résidu sérine ou thréonine (sérine/thréonine kinases : produits de *mos*, *mil /raf*) (Studzinski, 1989).

6/ La famille des protéines à *activité nucléaire* ayant de l'affinité pour l'ADN (produits de *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, p53)

Les produits de *myc* et *myb* sont des protéines se liant à l'ADN et sont localisés plus précisément dans la matrice nucléaire. *Myc* joue un rôle important dans la cellule, son expression est soumise à des variations rapides; il intervient au niveau de la prolifération (induction de la prolifération de cellules quiescentes en phase G₀ du cycle cellulaire), de l'arrêt de la croissance, de la différenciation et de la mort cellulaire (Evan et al., 1992; Penn et al., 1990).

L'expression du gène *c-fos* est induite de façon extrêmement rapide par des mitogènes, des facteurs de différenciation. Le produit de *jun* est lui aussi une protéine nucléaire présentant une haute affinité spécifique pour l'ADN, induit comme *fos* par des mitogènes.

Les protéines *fos* et *jun* forment un complexe protéique nucléaire stable non covalent. Cette association se fait par l'interaction de deux régions de ces protéines riches en leucine pour former le facteur de transcription AP-1.

Ainsi, les protéines nucléaires, comme les produits de *jun*, *myb* et *fos*, interagissent directement au niveau de l'expression ou de la réplication de l'ADN (Studzinski, 1989).

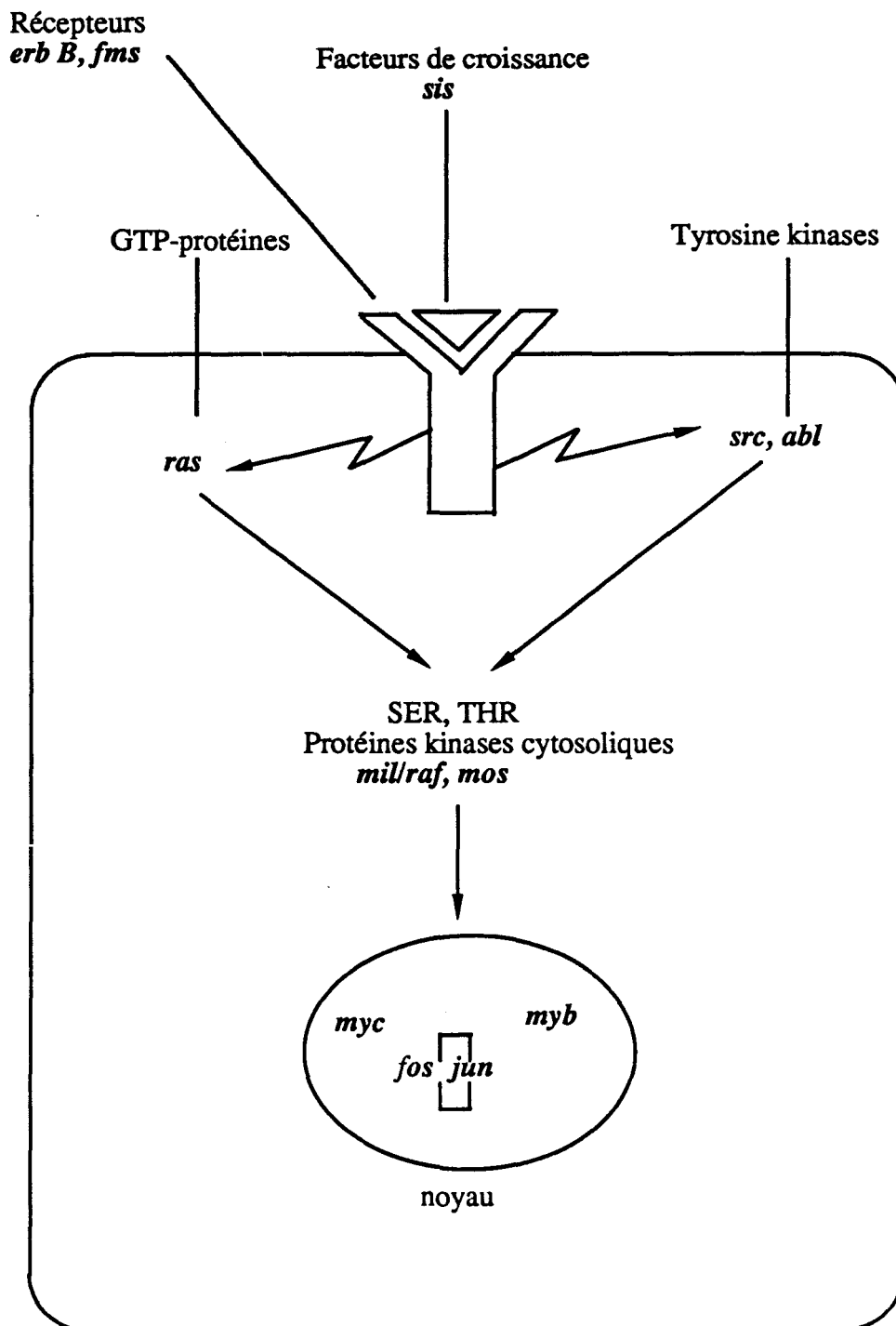


Figure 2 : Localisation cellulaire et fonction des oncoprotéines
(D'après Kaplan et Delpech, 1989)

L'analyse au niveau moléculaire des oncogènes activés présents dans les tumeurs a montré l'existence de différents types de mutations. Plusieurs mécanismes peuvent être

responsables de la **transition proto-oncogène cellulaire** --> **oncogène activé** (Nishimura et Sekiya, 1987; Studzinski, 1989; Bishop, 1991; Torry et Cooper, 1991) :

- l'insertion à proximité de proto-oncogènes d'éléments de régulation exogènes. L'intégration d'un provirus dérégule l'expression du proto-oncogène, dont l'activation entraîne une sélection clonale de la cellule portant cette recombinaison particulière.
ex : *c-myc*, *c-myb*
- l'amplification génique dans laquelle le nombre de copies d'un proto-oncogène est multiplié par un facteur 10 à 100, l'oncogène est surexprimé.
ex : *c-myc*, *c-ras*
- des mutations ponctuelles (changement d'un simple nucléotide dans une séquence d'ADN).
ex : ce mécanisme d'activation caractérise les membres de la famille *c-ras* (le changement d'un seul acide aminé altère profondément la structure de la p21^{ras}) et l'oncogène de rat *neu* équivalent au gène humain *c-erb B-2*.
- une translocation à proximité d'une région transcriptionnellement active. Les deux exemples les plus caractéristiques concernent deux hémopathies malignes.
ex : *c-myc* (dans le cas du lymphome de Burkitt, la translocation implique un échange de matériel génétique entre d'une part le chromosome 8 et d'autre part le chromosome 14 (75% des cas), 22 (20% des cas) ou 2 (5% des cas)), *c-abl* (dans la leucémie myéloïde chronique, l'élément caractéristique est la présence d'un chromosome 22 raccourci produit par une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22).
- des recombinaisons avec un génome viral. Incorporés dans un génome viral, les proto-oncogènes échapperont à leurs mécanismes de régulation propres.
ex : *c-fos*
- perte de gènes suppresseurs de tumeur (anti-oncogènes) par délétions ou mutations. Ces gènes régulent d'une manière négative la croissance cellulaire et ne peuvent plus jouer ce rôle s'ils sont délétés ou inactivés. La cellule devient alors transformée.
ex : p 53, *Rb*

Ainsi, la modulation de la structure des proto-oncogènes peut causer une surproduction des produits d'un gène, une augmentation de l'activité spécifique de ces produits, leur synthèse dérégulée; elle peut également être à l'origine de produits chimères, aboutir à la formation de versions aberrantes, tronquées des proto-oncogènes et peut être le point de départ de l'induction d'un cancer.

Certains groupes ont étudié l'expression d'**oncogènes dans différents types de tumeurs**. Il est possible de rechercher systématiquement dans une tumeur si l'un des oncogènes déjà connus et clonés y est exprimé d'une façon anormale.

Dans les tumeurs d'origine neurale comme le neuroblastome, une augmentation de l'expression du gène *N-myc* a été notée dans certains cas. Cette augmentation de l'expression est parfois associée à une amplification importante du nombre de copies de ce gène qui semble être en corrélation avec le stade de progression tumorale et conférer un pronostic plus grave (Nakagawara et al., 1990).

Le premier oncogène humain a été isolé d'une lignée cellulaire établie à partir d'un carcinome de la vessie : *H-ras*. Aucune corrélation particulière n'a pu cependant être établie entre le type de gène *ras* muté induit et le type de tumeur. *H-ras*, *K-ras* et *N-ras* se retrouvent dans des tumeurs très diverses (adénocarcinome du pancréas, du côlon, poumon, tumeurs thyroïdiennes...) (Bos, 1989).

L'amplification d'un proto-oncogène a été observée dans les cancers du sein. La possibilité de disposer d'une information sur les potentialités d'évolution de la tumeur présente un intérêt évident. L'amplification d'*erb B-2* dans les cancers du sein semble directement associée à la progression tumorale et à l'apparition de métastases et la survie, elle, inversement proportionnelle au facteur d'amplification (Wright et al., 1989; Delvenne et al., 1992).

Il existe des stratégies permettant de détecter, dans des cellules tumorales ou des lignées dérivées de cellules tumorales, l'activation d'oncogènes mais il semble difficile de pouvoir établir un lien direct entre un oncogène donné et un phénotype tumoral.

Grâce aux systèmes de culture, on a pu reproduire des phénomènes de transformation par étapes et montrer que la **coopération d'oncogènes** était nécessaire pour convertir des cellules normales en cellules tumorigènes (Hunter, 1991). En choisissant comme cellules cibles des fibroblastes d'embryon de rat, Land et coll. ont pu obtenir une transformation de ces cellules en cellules tumorales à condition de les co-transfecter à la fois avec le gène *ras* et avec le gène *c-myc* (Land et al., 1983). La transfection du gène *ras* transforme des fibroblastes d'embryon de rat sans les rendre tumorigènes ni les immortaliser et la transfection du gène *myc* immortalise les cellules sans les rendre tumorigènes. On classe les oncogènes en deux catégories : les gènes immortalisants (*myc*) et les gènes transformants (*ras*). La même expérience a été reproduite sur ce type de système cellulaire (fibroblastes embryonnaires de rat) mettant en évidence une coopération entre *ras* (cytoplasmique) et p53 (nucléaire) (Parada et al., 1984). Ces expériences renforcent l'idée que les différentes étapes observées dans l'apparition des cancers pourraient correspondre à des activations successives de gènes, chaque gène activé permettant à une cellule d'échapper graduellement aux contrôles de l'organisme et de proliférer. Des associations privilégiées d'oncogènes seraient peut-être nécessaires pour qu'une étape succède à une autre dans un cancer donné (Weinberg, 1989). La complexité d'une seule cellule, la diversité des tissus de l'organisme et de leurs interrelations ainsi que certaines observations laissent supposer que ces associations privilégiées pourraient être nombreuses et variées.

4.3. GLUTATHION ET ENZYMES APPARENTÉES

4.3.1. Glutathion

Le glutathion ou γ -glutamyl-cystéyl-glycine est le plus important thiol non protéique présent dans de nombreux organismes (Kosower et Kosower, 1978). Il se caractérise par un groupement nucléophile (fonction thiol) et par une liaison impliquant le groupement γ -glutamyl qui le rend résistant à l'action des peptidases (Kosower, 1976). Dans la plupart des tissus, sa concentration est élevée et il existe principalement sous forme réduite (GSH).

La *formation* du glutathion (Meister et Anderson, 1983; Meister, 1985) est assurée

- à partir des acides aminés précurseurs par deux enzymes, la γ -glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase
- par la réduction du glutathion oxydé (GSSG) par la glutathion réductase.

L'inhibition de la γ -glutamylcystéine synthétase par la buthionine sulfoximine a été mise en évidence par Griffith et Meister (Griffith et Meister, 1979; Meister, 1985).

La *disparition* du glutathion (Meister et Anderson, 1983) peut être une conséquence de

- sa dégradation par la γ -glutamyltransférase
- son utilisation dans des réactions d'oxydo-réduction et de conjugaison.

Le glutathion joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire, dans le maintien de l'intégrité tant structurale que fonctionnelle de la cellule, aussi bien dans des conditions physiologiques que lors d'agressions toxiques; il participe à la défense contre les effets délétères de certaines substances exogènes (Deleve et Kaplowitz, 1990). Il est impliqué dans des réactions de détoxification par conjugaison avec des xénobiotiques et/ou leurs métabolites électrophiles, par réaction avec des radicaux libres, par réduction d'hydroperoxydes (Schéma 1). Si, généralement, les réactions de conjugaison permettent la détoxification d'espèces chimiques réactionnelles, elles peuvent aussi générer, dans certains cas, un conjugué plus réactionnel que le composé parent (Koob et Dekant, 1991).

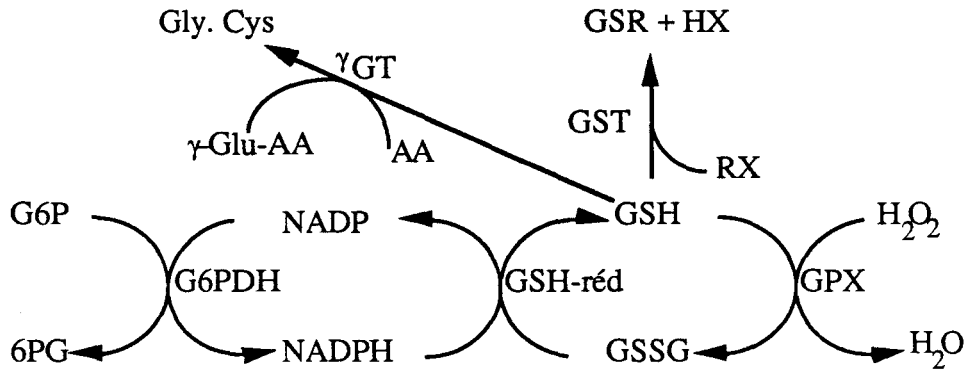
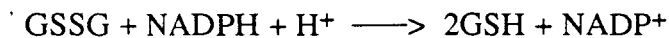


Schéma 1 : Glutathion et enzymes associées

G6P : glucose-6-phosphate, 6PG : 6-phospho-gluconate, NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite), GSH : glutathion (forme réduite), GSSG : glutathion (forme oxydée), G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, GSH-réd : glutathion réductase, GPX : glutathion peroxydase, GST : glutathion transférase, γ -GT : γ -glutamyl-transpeptidase

4.3.2. Glutathion réductase

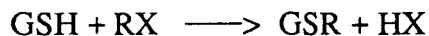
Cette enzyme catalyse la réaction suivante (Carlberg et Mannervik, 1975) :



Le rôle majeur de cette enzyme est de régénérer le glutathion réduit qui a été oxydé, non spécifiquement par les radicaux ou les peroxydes, enzymatiquement par l'intermédiaire de la glutathion peroxydase (Douglas, 1987). L'importance de la glutathion réductase dans le maintien du rapport GSH/GSSG a été démontrée expérimentalement par des études utilisant le (chloro-2-éthyl)1,3-bis-nitroso-1-urée, un inhibiteur spécifique de cette enzyme (Babson et Reed, 1978). Par l'intermédiaire de la glutathion réductase, l'état redox du glutathion dépend de l'apport en NADPH.

4.3.3. Glutathion transférases

Les glutathion-S-transférases catalysent la réaction d'un substrat électrophile avec le groupement -SH du glutathion :



Les glutathion-S-transférases constituent une famille d'enzymes présentes dans la plupart des tissus mais plus abondantes dans le foie (Harada et Abei, 1992).

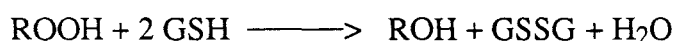
Les glutathion-S-transférases jouent un rôle majeur dans la détoxification de substrats tant exogènes qu'endogènes. En effet, ces enzymes sont capables de catalyser la conjugaison entre la fonction thiol et une large variété de composés électrophiles. Parmi les substrats endogènes des glutathion-S-transférases, on peut citer les leucotriènes et certaines prostaglandines (Mannervik, 1986; van Bladeren et van Ommen, 1991). Ces enzymes peuvent jouer un rôle de détoxification par formation d'association avec des composés potentiellement toxiques (Coles et Ketterer, 1990).

Les glutathion transférases sont des protéines dimériques et plusieurs isoenzymes ont été caractérisées suivant le type de sous-unités qu'elles comportent. On connaît à l'heure actuelle cinq types de transférases : une microsomiale et quatre cytosoliques. Les quatre enzymes cytosoliques sont des homo- ou hétérodimères pouvant se subdiviser en isoenzymes α (basique), μ (neutre), π (acide) et θ (Mannervik et al., 1985; Tew, 1989, Vos et van Bladeren, 1990; Anderson et Morgenstern, 1990; Meyer et al., 1991; Tsuchida et Sato, 1992).

4.3.4. Glutathion peroxydases

Sous la dénomination glutathion peroxydases, il faut considérer les glutathion peroxydases dépendantes du sélénium (celle spécifique du peroxyde d'hydrogène et celle agissant sur les hydroperoxydes phospholipidiques) et la glutathion peroxydase indépendante du sélénium (Carmagnol et al., 1983; Ursini et al., 1985).

La glutathion peroxydase, en réalité connue depuis de nombreuses années, a été d'abord mise en évidence en 1957 par Mills (Mills, 1957) dans les globules rouges qu'elle protège de l'hémolyse par le peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme catalyse la réduction des hydroperoxydes couplée à l'oxydation du glutathion selon la réaction :



La glutathion peroxydase se retrouve dans la plupart des tissus. Les cellules les plus enrichies en cette protéine sont les cellules hépatiques, rénales, cardiaques, pulmonaires et les érythrocytes (Flohé et al., 1976).

L'activité de la glutathion peroxydase constitue l'un des moyens de défense intracellulaire les plus importants contre l'agression oxydative. Un de ses rôles principaux est d'assurer le métabolisme des peroxydes d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques formés au sein de la cellule à la suite de divers processus métaboliques (Flohé et al., 1973). Ces peroxydes, s'ils sont biologiquement importants, n'en sont pas moins toxiques lorsqu'ils ne sont plus neutralisés de manière satisfaisante. Si cette enzyme est spécifique pour le glutathion comme substrat, elle ne l'est pas pour l'hydroperoxyde de telle sorte qu'elle accepte une grande variété de peroxydes comme substrats : H_2O_2 , hydroperoxydes lipidiques (réduction en alcools inoffensifs), prostaglandines et leucotriènes. Les réactions inflammatoires, anaphylactiques et fébriles induites par ces deux derniers médiateurs très actifs sont donc combattues par la glutathion peroxydase (Flohé et al., 1976; Rotruck et al., 1973; Parnham et Graf, 1987, Hong et al., 1989).

Dans ce travail, ne sera pas considérée plus longuement la glutathion peroxydase agissant sur les hydroperoxydes phospholipidiques, nouvelle sélénoenzyme récemment découverte, monomère responsable de l'inhibition cytosolique de la peroxydation lipidique microsomiale induite par l'ascorbate, le fer ou le NADPH (Ursini et al., 1985, Maiorino et al., 1988).

Un des buts de ce travail est de traiter (réverser) la chimiorésistance à l'adriamycine. La glutathion peroxydase a été utilisée comme cible enzymatique initiale pour étudier l'action de diverses pharmacomolécules dont le chef de file est la pénicillamine-hydantoïne. L'étude de l'interaction entre le glutathion et la glutathion peroxydase par modélisation moléculaire nécessite la connaissance de la *structure du site actif* de cette enzyme.

La glutathion peroxydase est un tétramère constitué de sous-unités identiques (poids moléculaire individuel de 21 kDa) comprenant chacune un atome de sélénium (porté par une séléncystéine) responsable des propriétés réductrices à l'égard des hydroperoxydes (Ursini et al., 1985; Parnham et Graf, 1987; Flohé et al., 1973; Günzler et al., 1984; Flohé, 1985; Burk, 1991).

La structure cristalline de la glutathion peroxydase a été décrite par Ladenstein en 1979 avec une résolution de 2,8 Å (Ladenstein et al., 1979). En 1983, Epp et Ladenstein améliorent cette performance avec une résolution de 2 Å (Epp et al., 1983). La séquence peptidique complète n'est, quant à elle, déterminée qu'ultérieurement en 1984 par Günzler (Günzler et al., 1984).

Le site actif de chaque sous-unité se trouve dans une large dépression et la sélénocystéine est située à la surface de l'enzyme ce qui permet d'expliquer sa réaction avec une grande variété de substrats, hydroperoxydes organiques.

Les interactions entre le glutathion et le site actif de la glutathion peroxydase selon Epp (Figure 3) se situeraient à différents niveaux (Epp et al., 1983) :

- une liaison covalente sélénium-soufre impliquant la sélénocystéine 45
- deux liaisons salines responsables de la spécificité de l'enzyme pour le glutathion formées entre les fonctions guanidines des arginines 50 et 177 (situées près de la sélénocystéine) et respectivement le carboxyle du Glu et le carboxyle du Gly du glutathion.
- une liaison hydrogène impliquant la glutamine 80 contribuerait à renforcer l'interaction enzyme-substrat.

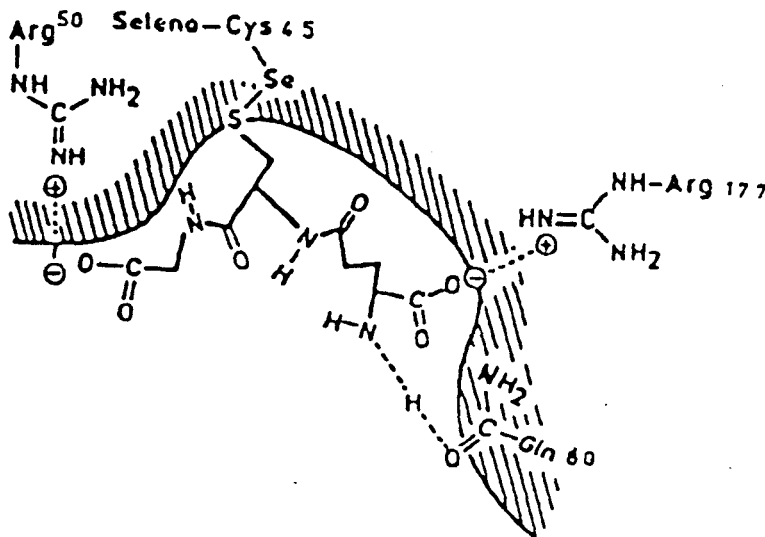


Figure 3 : Représentation hypothétique de l'interaction du glutathion avec la glutathion peroxydase (Epp et al., 1983)

4.3.5. γ -Glutamyltransférase

La γ -glutamyltransférase hydrolyse la liaison γ -glutamyl-peptide du glutathion, laquelle n'est pas scindée par les peptidases. Elle peut catalyser trois types de transfert du groupement glutamyle (Tate et Meister, 1981; Guellaën, 1989) :

- une transpeptidation vers un accepteur
- une autotranspeptidation vers le GSH pour former le γ -glutamyl-GSH

- une hydrolyse

Cette enzyme est localisée au niveau des membranes des cellules d'organes très actifs dans le transport ou la sécrétion de métabolites (Guellaën, 1989).

4.3.6. Glucose-6-phosphate déshydrogénase

Cette enzyme constitue le point de départ de la voie métabolique des pentoses et peut fournir du NADPH par voie oxydative. Deux fonctions majeures sont attribuées à cette voie métabolique : d'une part, la production d'un agent réducteur, le NADPH, utilisé au cours de nombreuses synthèses (acides gras, stéroïdes...) et d'autre part, celle du ribose utilisé pour la biosynthèse de nucléotides et d'acides nucléiques. De plus, l'état redox du glutathion dépend de l'apport en NADPH ce qui explique son importance lorsque l'on étudie le cycle du glutathion (Williams, 1980; Levy et Christoff, 1983; Reed, 1986).

4.3.7. Glutathion, enzymes du métabolisme du glutathion et chimiorésistance

L'effet d'une modification du taux de *glutathion* intracellulaire sur la chimiorésistance a été étudié par de nombreux auteurs (Wolf et al., 1987; Cole et al., 1989; Hosking et al., 1990; Hercbergs et al., 1992; Tsuchida et Sato, 1992). Le glutathion est en effet impliqué dans la modulation de la toxicité à l'adriamycine (Olson et al., 1980). L'augmentation du contenu cellulaire en glutathion dans les cellules résistantes conduit à une diminution de la production de radical hydroxyle, et par conséquent à une perte importante de la cytotoxicité de l'adriamycine (Kramer et al., 1988; Mimnaugh et al., 1989).

Afin de déterminer l'importance du glutathion, les cellules résistantes ont également été traitées par la buthionine sulfoximine. Les résultats obtenus s'avèrent contradictoires; une très forte diminution du taux de glutathion peut induire une réversion de la chimiorésistance ou même n'avoir aucun effet (Somfai-Relle et al., 1984; Hamilton et al., 1985; Bellamy et al., 1989; Batist et al., 1991; Lai et al., 1991; Chao et al., 1992).

L'intérêt de la *glutathion peroxydase* dans la chimiorésistance aux anticancéreux a été exploré dans divers types cellulaires. Une modification fréquemment associée à la chimiorésistance à l'adriamycine, quoique non généralisée, consiste en une modification de l'activité glutathion peroxydase sélénium dépendante et/ou indépendante (Ramu et al., 1984; Bellamy et al., 1989; Lee et al., 1989; Singh et al., 1989; Chu et al., 1990; Cole et al., 1989)

De nombreuses études ont été effectuées concernant l'impact des *glutathion transférases* dans la chimiorésistance.

- L'isoenzyme α , hyperexprimée, confère à la cellule cancéreuse une résistance aux alkylants parmi lesquels se situent le chlorambucil, le melphalan (Buller et al., 1987; Tew, 1989). Cette modification a pu être reproduite également par transfection (Black et al., 1990), résultat cependant controversé (Townsend et al., 1992).
- Une autre isoenzyme de la glutathion S-transférase, l'isoenzyme μ , est capable de réaliser la dénitrosation d'une catégorie particulière d'agents alkylants, les nitrosourées. Une hyperexpression de l'enzyme est susceptible d'accompagner la résistance à ces agents anticancéreux (Tew, 1989), cette modification ne constituant pas une généralité (Skalski et al., 1990). La résistance à certaines nitrosourées, les bis-chloroéthyl-nitrosourées (BCNU) s'explique par la modification de différents facteurs à savoir du taux de glutathion, de l'activité des glutathion-S-transférases et d'autres enzymes de réparation de l'ADN, comme les O₆-alkylguanine-DNA-alkyl-transférases (Evans et al., 1987).
- L'isoenzyme π , toujours par hyperexpression de son gène serait à l'origine du mécanisme de "multidrug resistance" (Batist et al., 1986). Cette isoenzyme a cependant suscité de nombreux travaux et controverses (Deffie et al., 1988; Moscow et al., 1989; Singh et al., 1989; Tsuchida et Sato, 1992). La transfection de cellules sauvages par le gène de cette enzyme est susceptible de s'accompagner d'une résistance (Black et al., 1990; Nakagawara et al., 1990) mais cette technique n'a pas permis de vérifier cette hypothèse de manière formelle (Moscow et al., 1989; Fairchild et al., 1990).
- Il n'existe, à l'heure actuelle, pas de données concernant l'isoenzyme θ découverte très récemment.

4.4. TOPOISOMERASES

La molécule d'ADN est composée de deux brins de polydéoxyribonucléotides enlacés l'un avec l'autre autour d'un axe longitudinal (Watson et Crick, 1953). Cet axe peut lui aussi s'enrouler et créer un ordre de structure supérieure appelée "surenroulement".

Le surenroulement joue un rôle physiologique important et varie en fonction de l'activité cellulaire : réplication, transcription, ... Ces activités entraînent des changements topologiques qui sont régulés par des enzymes : les ADN-topoisomérase de type I et les ADN-topoisomérase de type II. Ces enzymes sont chargées de réguler la structure tri-dimensionnelle de l'ADN par coupures respectivement simple brin et double brin. En effet, la réplication de

l'information génétique d'une molécule d'ADN, sa transcription en ARN ou sa recombinaison avec d'autres gènes ne se font que si diverses enzymes ont accès aux bases nucléotidiques, et seules certaines configurations topologiques de l'ADN permettent aux enzymes d'agir (Wang, 1985; Lock et Ross, 1987; Sutcliffe et al., 1989).

4.4.1. Topoisomérases de type I

Les topoisomérases de type I ont été trouvées aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Wang, 1981). Elles altèrent le degré de surenroulement de l'ADN par coupure de l'un des brins de la double hélice, élimination d'un tour et refermeture du brin coupé (Sutcliffe et al., 1989).

Ces enzymes se fixent à l'ADN, coupent l'un des deux brins et s'attachent par une de leurs tyrosines au phosphate de l'ADN coupé. L'enzyme est liée par covalence à l'ADN coupé par l'extrémité 3' pour les topoisomérases de type I eucaryotes et par l'extrémité 5' pour l'enzyme procaryote (Tse et al., 1980; Sutcliffe et al., 1989).

4.4.2. Topoisomérases de type II

Les topoisomérases de type II semblent ubiquitaires et ont été purifiées à partir de nombreux organismes différents. Elles se distinguent des topoisomérases de type I par leur capacité à couper les deux brins de l'ADN (Sutcliffe et al., 1989).

Le mécanisme d'action de ces enzymes peut artificiellement être divisé en plusieurs étapes :

- la topoisomérase se lie à l'ADN. Cette étape ne requiert aucun cofacteur et la liaison de la topoisomérase à son substrat est déterminée par deux facteurs : la séquence primaire de l'ADN et son état topologique.
- la topoisomérase coupe la double hélice en restant liée de manière covalente par un résidu tyrosine aux extrémités 5' phosphate de l'ADN générées par la réaction. La présence d'un cation bivalent est nécessaire pour cette étape.
- la topoisomérase passe la seconde molécule d'ADN à travers l'ouverture précédemment créée et se lie avec un ATP.
- la topoisomérase referme les deux brins coupés en restant liée de façon non covalente à l'ADN. La coupure et la religature du brin d'ADN coupé sont les étapes cibles des molécules antitumorales qui interagissent avec la topoisomérase II.
- la molécule d'ATP est hydrolysée en ADP + Pi.
- l'enzyme se libère de l'ADN et peut réinitier un nouveau cycle.

4.4.3. Les molécules antitumorales et les topoisomérases

La topoisomérase II et plus récemment la topoisomérase I ont pris une importance considérable lorsqu'elles se sont avérées être la cible de nombreux agents antitumoraux. Toutes les molécules thérapeutiques qui ont pour cible les topoisomérases inhibent l'étape de refermeture du brin coupé, d'où il résulte un complexe topoisomérase-ADN appelé "complexe clivable".

Inhibiteur de la topoisomérase I

Le seul inhibiteur connu de la topoisomérase I est la camptothécine. Il apparaît également que la camptothécine n'a pour cible que la topoisomérase I (Wang, 1987; Drlica et Franco, 1988).

Inhibiteurs de la topoisomérase II

La topoisomérase II a été identifiée comme étant la cible de nombreux agents antitumoraux largement utilisés en clinique comme l'adriamycine, l'actinomycine D, l'étoposide, l'amsacrine (Wang, 1987; Chow et al., 1988; Drlica et Franco, 1988; Zunino et Capranico, 1990; Su et al., 1992). Toutes ces molécules produisent des coupures de l'ADN associées de manière covalente à des protéines, ces protéines étant des topoisomérases II inhibées au stade de la religature, et forment le "complexe clivable".

La doxorubicine est un des médicaments les plus employés contre les tumeurs des tissus mous, l'amsacrine est également utilisée en clinique humaine. Au vu des utilisations cliniques des inhibiteurs de topoisomérases II, il est clair que cette enzyme joue un rôle clé dans les processus de mort cellulaire.

4.4.4. Chimiorésistance et topoisomérases

Certaines altérations, spécifiques ou non, de la topoisomérase II, cible commune de plusieurs médicaments anticancéreux, peut avoir pour résultat une résistance croisée des cellules à ces médicaments, résistance appelée "multidrug resistance atypique" ou AT-MDR. Les lignées cellulaires exprimant une résistance par un mécanisme impliquant une altération de la topoisomérase II ont été sélectionnées avec des épipodophyllotoxines, l'amsacrine ou l'adriamycine (Per et al., 1987; Sullivan et al., 1989). Le trait le plus remarquable est une absence de résistance croisée avec les alcaloïdes de la pervenche, ce qui orienta les recherches vers la topoisomérase de type II sur laquelle les alcaloïdes de la pervenche étaient les seuls à ne

pas avoir d'action. Cette forme de résistance peut être due à une diminution d'expression ou à l'absence de topoisomérases II-cibles (Long et al., 1991; Sugawara et al., 1991; Webb et al., 1991). Cependant, l'étude de ce type de résistance se complique, parce qu'une même lignée cellulaire peut exprimer simultanément plusieurs mécanismes distincts (Deffie et al., 1988).

4.5. CALCIUM ET ADENOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE (AMPc)

L'étude du **calcium** et de l'**AMPc** dans des cellules chimiorésistantes se comprend aisément si l'on considère le fait que d'une part, des chimiosensibilisateurs connus ont des propriétés d'antagonistes calciques (vérapamil) ou de la calmoduline (trifluopérazine) et que d'autre part, la glycoprotéine P est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC) (Chambers et al., 1990 (a); Chambers et al., 1990 (b); Zernig, 1990; Hait et Aftab, 1992). Une activité accrue de la PKC a d'ailleurs été démontrée dans certaines cellules cancéreuses chimiorésistantes de diverses origines : sein, leucémie, fibrosarcome (Aquino et al., 1988; Fine et al., 1988; O'Brian et al., 1989; Ford et Hait, 1990); une activité inférieure a cependant été également mise en évidence (Palayoor et al., 1987).

La PKC est, quant à elle, activée par le diacylglycérol (DAG), celui-ci faisant partie avec les ions calcium et l'inositol triphosphate des seconds messagers impliqués dans les voies de communications intracellulaires au même titre que l'AMPc.

L'une des caractéristiques essentielles de ce que l'on appelle la vie est la capacité que possède un être à répondre à des stimuli extérieurs. La communication intercellulaire, essentielle à la bonne coordination de l'ensemble, représente ainsi une chaîne ininterrompue de la reconnaissance d'un signal émis par une cellule jusqu'à la mise en marche de la fonction cellulaire. Les phénomènes de communication reposent sur une base moléculaire : les cellules émettent des messages par l'intermédiaire de molécules qui sont reconnues par d'autres molécules des cellules effectrices, cellules qui, à leur tour, induisent des modifications moléculaires (soit directement, soit par l'intermédiaire de molécules messagères intracellulaires) mettant en marche les mécanismes de réponse. Les structures clés de la communication cellulaire comprennent, outre des médiateurs chimiques (stéroïdes, peptides, acétylcholine...), des seconds messagers.

Parmi les deux voies de communication intracellulaire, on peut distinguer l'AMPc, les ions, et en particulier le calcium, le phosphatidylinositol, l'inositol triphosphate et le diacylglycérol.

L'obtention de ces composés s'obtient par deux voies différentes mais interactives (Figure 4).

1/ Voie des cyclases qui produisent l'AMPc et le GMPc (Gilman, 1987)

Les récepteurs de membrane développent une interaction avec les molécules transductrices G (actives quand elles sont liées au guanosine triphosphate, GTP); celles-ci activent l'adénylate cyclase avec production de nucléotides cycliques jusqu'à ce que l'hydrolyse du GTP uni au GDP arrête le processus. L'AMPc est inactivée par une phosphodiesterase.

2/ Voie du phosphatidyl-inositol (Berridge, 1984; Gilman, 1987)

Certaines protéines G activent des phosphodiesterases spécifiques situées à la face interne de la membrane plasmique. Ces enzymes hydrolysent un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol-diphosphate (PIP₂) en inositol-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). Le phosphatidyl-inositol peut donc être considéré comme un précurseur donnant naissance à deux seconds messagers distincts.

L'*IP₃* est une substance soluble diffusant dans le cytoplasme afin de libérer les ions calcium stockés dans des structures membranaires intracellulaires appelées réticulum endoplasmique. Le Ca^{++} , après union à des protéines spécifiques telles que la calmoduline, active toute une série de processus Ca^{++} dépendants (contraction, exocytose, synthèse) par l'intermédiaire de kinases qui, à leur tour, activent par phosphorylation des protéines.

Le *DAG* reste au niveau de la membrane et active les protéines kinases (type C) qui déclenchent des phénomènes identiques à ceux précédemment décrits.

L'inactivation des seconds messagers est obtenue par l'intermédiaire d'enzymes ou par transport de Ca^{++} vers le réticulum endoplasmique.

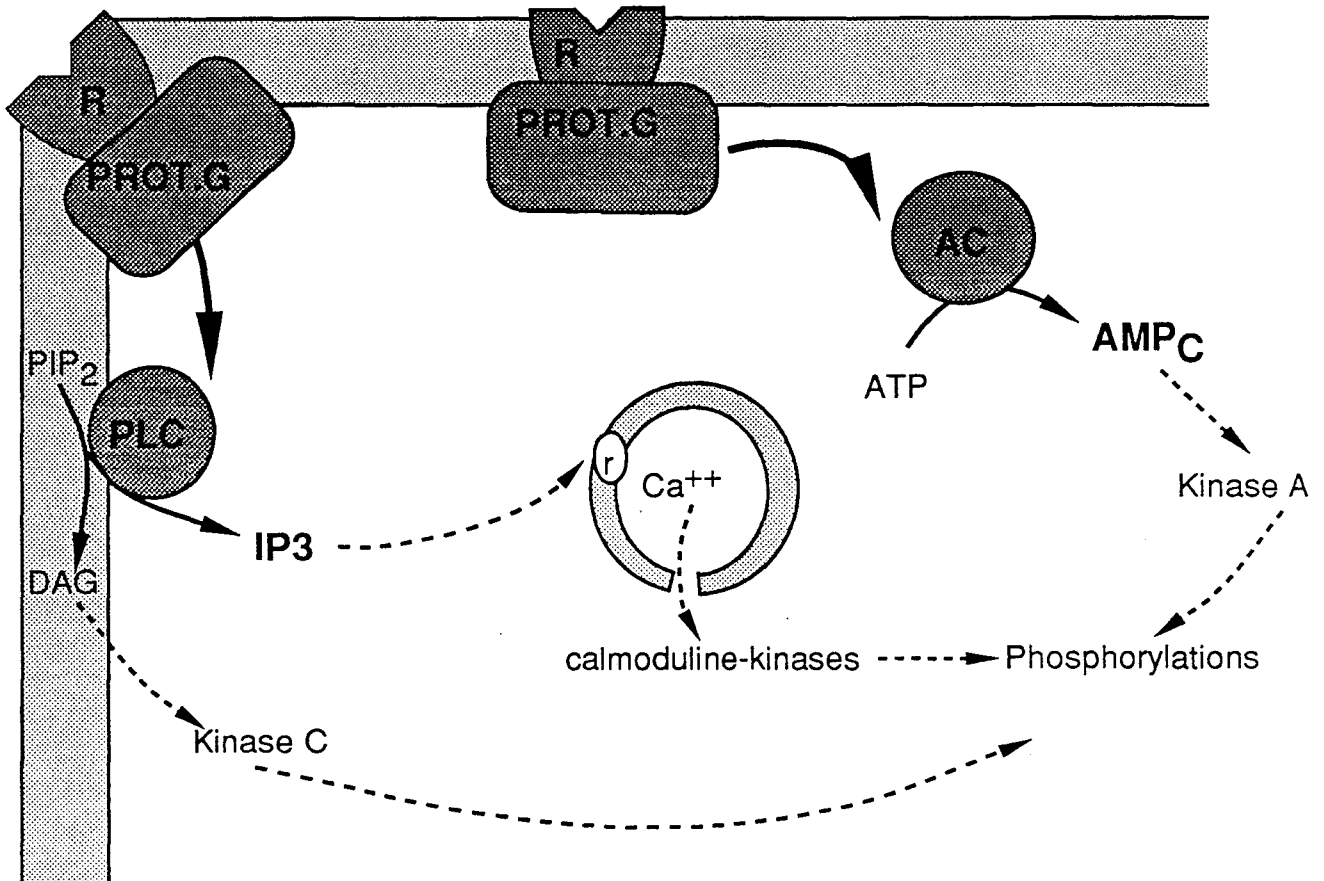


Figure 4 : Voies du phosphatidyl-inositol et de l'AMP cyclique
(PLC : phospholipase C, AC : adénylate cyclase)

L'AMPc provoque les réponses physiologiques observées dans différents tissus comme par exemple l'hydrolyse du glycogène dans les muscles ou dans le foie ou, la sécrétion de liquide dans les cellules sécrétrices (Rubin et Rosen, 1975).

Le calcium est impliqué dans la régulation de processus physiologiques. Il participe à des mécanismes aussi variés que la contraction des muscles, la croissance, le fonctionnement d'un organe...(Richter et Kass, 1991). Le calcium joue également un rôle critique dans de nombreux processus pathologiques et toxicologiques (Orrenius et al., 1989). En fait, l'homéostasie intracellulaire du calcium est maintenue par des systèmes de transport et de compartimentation. La membrane plasmique étant peu perméable aux ions calcium, une pompe membranaire peut évacuer les ions calcium hors de la cellule (transport hors de la cellule contre un gradient électrochimique nécessitant un apport énergétique) ou l'échangeur Na⁺/Ca⁺⁺ peut intervenir (Richter et Kass, 1991). Le calcium peut s'accumuler dans deux compartiments : le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Somlyo et al., 1985). Une partie du calcium se

trouve liée sur certaines protéines, les "Ca⁺⁺ binding protéines", relais entre le calcium et les différentes fonctions cellulaires dépendantes du calcium; parmi celles-ci, la troponine C et la calmoduline. L'existence d'un gradient de calcium de part et d'autre de la membrane plasmique en fait un excellent candidat pour jouer un rôle de second messenger intracellulaire. Les ionophores du calcium permettent, comme l'IP₃, aux ions calcium libres d'entrer dans la cellule (Carafoli, 1987).

L'activation de la PKC requiert la présence de Ca⁺⁺ et d'un phospholipide, la phosphatidylsérine. Le DAG augmente de façon considérable l'affinité de l'enzyme pour le Ca⁺⁺. Les esters de phorbol, promoteurs de tumeurs, peuvent activer la PKC en présence de Ca⁺⁺ et de phospholipides; il se pourrait que les modifications des voies de communication intracellulaire provoquent un dérèglement de la croissance cellulaire et soient donc une cause de cancer (Nishizuka, 1983; Berridge, 1984).

La voie AMPc et la voie Ca⁺⁺ peuvent interagir étroitement, elles peuvent stimuler la même fonction (Burgess et al., 1986). D'autre part, la stimulation d'une voie peut agir soit positivement soit négativement sur l'autre voie (Poggioli et al., 1986; Gusovsky et Gutkind, 1991).

Même si la mise en évidence de modifications particulières dans des cellules résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine constitue une approche intéressante dans la compréhension des mécanismes de chimiorésistance, il n'en demeure pas moins que l'étude de la réversion de ce phénomène revêt également un intérêt particulier, sujet que nous aborderons dans la partie suivante de ces généralités.

5. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE ET AU CIS-PLATINE

Par l'identification de composés réversant la chimiorésistance ou l'antagonisant, nous espérons obtenir une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques l'engendrant et disposer d'agents à usage clinique.

Nous avons tenté d'élucider le rôle que peuvent jouer le glutathion et les enzymes du métabolisme du glutathion en traitant des cellules résistantes à l'adriamycine mais non au cis-platine par la buthionine sulfoximine, le vérapamil, la trifluopérazine et le tamoxifène.

Néanmoins, dans cette introduction, une description des études effectuées à l'heure actuelle permettant de réverser la chimiorésistance tant à l'adriamycine qu'au cis-platine sera effectuée, le cis-platine étant un anticancéreux moins étudié et beaucoup plus complexe.

5.1. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE

De nombreuses études sont actuellement en cours pour tenter de lutter contre la résistance pléiotropique. Les premières tentatives de réversion reviennent à Tsuruo et ses collaborateurs qui démontrèrent que le vérapamil, antagoniste calcique, ainsi que la trifluopérazine, antagoniste de la calmoduline, potentialisent l'activité de la vincristine et provoquent une augmentation de sa rétention intracellulaire dans une lignée leucémique P 388 multirésistante (Tsuruo et al., 1981; Tsuruo et al., 1982).

Les applications cliniques de notre connaissance de la résistance aux médicaments anticancéreux sont actuellement quasi inexistantes, principalement en raison de l'extrême diversité des mécanismes sous-jacents (Redmond et al., 1991).

La majorité des études effectuées visent à bloquer les fonctions de la **glycoprotéine P**. En effet, dans une perspective thérapeutique, nous devons détourner l'effet de la pompe refoulant les toxiques et les empêchant d'agir, soit en la privant d'énergie, soit en saturant les sites de fixation des agents anticancéreux, soit en les maquillant de telle sorte qu'ils ne soient pas reconnus par la pompe et atteignent sans encombre leur cible d'action.

- L'identification du gène *mdr* pourrait en théorie constituer un moyen de diagnostic mais, jusqu'à l'heure actuelle, en pratique, peu de résultats convaincants ont été obtenus.
- La glycoprotéine P étant douée d'activité *ATPase*, on peut envisager de concevoir des inhibiteurs d'*ATPase*.
- L'utilisation d'*anticorps* dirigés spécifiquement contre la glycoprotéine P peut s'avérer efficace contre la chimiorésistance (Efferth et al., 1991; Mickisch et al., 1992; Rittmann-Grauer et al., 1992). Fitzgerald et ses collaborateurs ont, quant à eux, utilisé un anticorps spécifique dirigé contre la glycoprotéine P (MRK-16) couplé à une toxine permettant de tuer les cellules tumorales exprimant la glycoprotéine P (Fitzgerald et al., 1987). Néanmoins, ce traitement peut engendrer des problèmes immunologiques et de toxicité systémique, la glycoprotéine P étant exprimée sur de nombreuses cellules en raison de sa fonction physiologique (Beck, 1991).
- La synthèse de molécules ayant un spectre d'activités proche de celui de l'adriamycine mais une structure telle qu'elles ne soient pas transportées par la glycoprotéine P ou que leur affinité pour celle-ci soit faible a été également réalisée (Ripamonti et al., 1992).
- Certaines équipes cherchent des *inhibiteurs de la pompe à calcium* tels que le vérapamil pouvant entrer en compétition avec l'anticancéreux par fixation au niveau de la glycoprotéine P (liaison du vérapamil à la glycoprotéine P, taux intracellulaire de vérapamil inférieur dans les cellules résistantes, transport du vérapamil hors de la cellule comme pour les agents anticancéreux avec consommation d'ATP) (Tsuruo et al., 1983; Rogan et al., 1984; Yusa et Tsuruo, 1989; Solary et al., 1991). Le vérapamil peut également induire un changement du caractère hydrophobe ou hydrophile de différents compartiments intracellulaires modifiant la solubilité de l'adriamycine (Hindenburt et al., 1987). Les résultats obtenus avec le vérapamil *in vitro*, bien qu'encourageants, voient leurs potentialités limitées par l'apparition, *in vivo*, d'effets secondaires sévères. Le composé SR33557 est, quant à lui, un inhibiteur calcique qui reverse la chimiorésistance à l'adriamycine sans inhiber la fixation de la glycoprotéine P (Jaffrézou et al., 1991). D'autres molécules ont été utilisées telles que des antagonistes de la calmoduline comme les phénothiazines (Ganapathi et Grabowski, 1983; Ford et al., 1989).

Ainsi, de nombreux composés permettant à l'heure actuelle de réverser la chimiorésistance agissent principalement sur la glycoprotéine P170; ils présentent de faibles analogies structurales mais le plus souvent sont extrêmement lipophiles. Certains d'entre eux peuvent se lier à la glycoprotéine P de façon compétitive avec les médicaments qu'elle chasse hors des cellules (Ford et Hait, 1990; Twentyman, 1992; Wiebe et al., 1992). Ils peuvent être arbitrairement classés en 6 catégories :

- les antagonistes des canaux calciques
- les antagonistes de la calmoduline
- les analogues non cytotoxiques des anthracyclines et des alcaloïdes de la pervenche

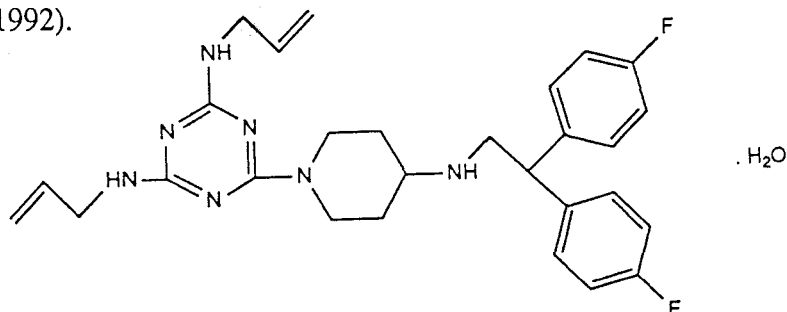
- les stéroïdes et analogues hormonaux
- les composés cationiques, hydrophobes
- les cyclosporines.

La plupart de ces produits induisent de profondes modifications de la physiologie cellulaire ce qui rend difficile la détermination d'un mécanisme commun et précis de résistance multidrogue.

A l'heure actuelle, des études de relation structure-activité ont permis de mettre en évidence la présence de deux structures caractéristiques communes à la plupart des produits "anti-multidrug resistance" à savoir un noyau plan possédant des doubles liaisons conjuguées, hydrophobe et un groupe amine tertiaire substitué, de préférence inclus dans un hétérocycle (Zamora et al., 1988; Ford et Hait, 1990).

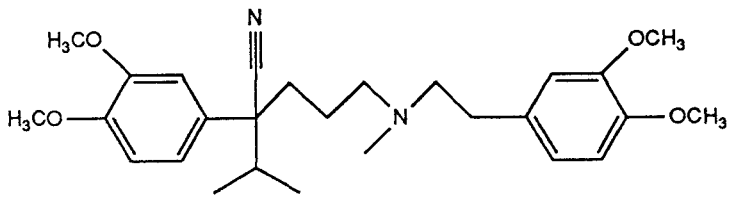
Klopman et ses collaborateurs ont tenté très récemment d'établir une relation structure-activité de différents chimiosensibilisateurs connus (137 composés) en utilisant un programme Multiple Computer Automated Structure Evaluation (MULTICASE) (Klopman et al., 1992). Cette étude a permis de mettre en évidence des fragments-clés dans la structure de composés permettant de réverser la chimiorésistance, d'identifier de nouvelles structures et de vérifier expérimentalement l'activité de celles-ci sur des cellules d'ovaire de hamster chinois.

Un dérivé triazinoaminopipéridine, le S 9788, produit à l'étude chez SERVIER, s'avère particulièrement intéressant. Il semble agir en inhibant de manière spécifique la glycoprotéine P et présente une activité *in vitro* et *in vivo* supérieure à celle du vérapamil (Cros et al., 1992; Pierré et al., 1992; Soudon et al., 1992).

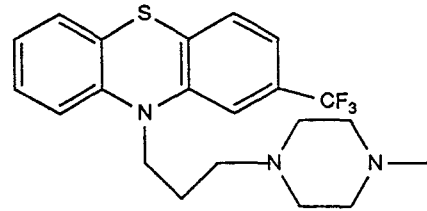


La Figure 5 représente quelques uns des nombreux chimiosensibilisateurs étudiés à l'heure actuelle. Parmi ceux-ci, on peut citer :

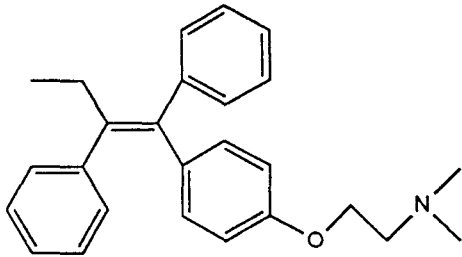
- le FK506, un analogue de la cyclosporine pouvant interférer avec la membrane plasmique (Eband et Eband, 1991; Mizuno et al., 1992)
- le MS-073, dérivé quinoléique qui réverse la chimiorésistance par inhibition compétitive de la glycoprotéine P (Sato et al., 1991)
- les dérivés de la quinine et parmi ceux-ci, la cinchonine active sur les cellules K562 (Genne et al., 1992)
- des dérivés indoles, A 30312 et A 39355, de faible activité antagoniste calcique, qui inhibent spécifiquement la glycoprotéine P. En outre, le A 39355 présente une certaine similarité structurale avec les phénothiazines (Kadam et al., 1992)
- des composés divers tels que la bamipine (Pommerenke et al., 1990).



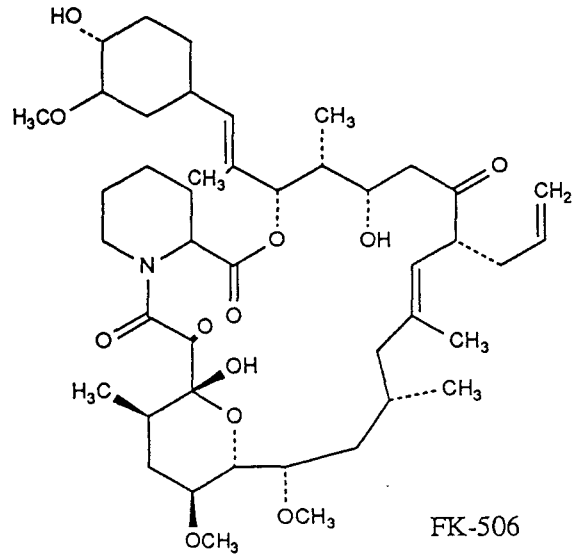
Vérapamil



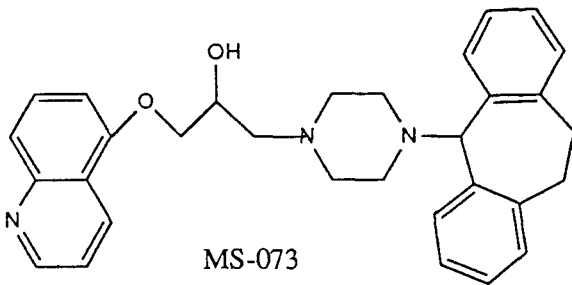
trifluopérazine



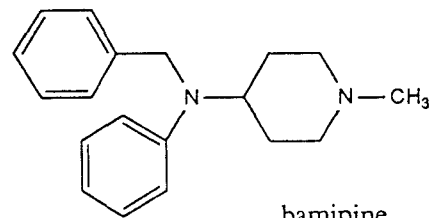
tamoxifène



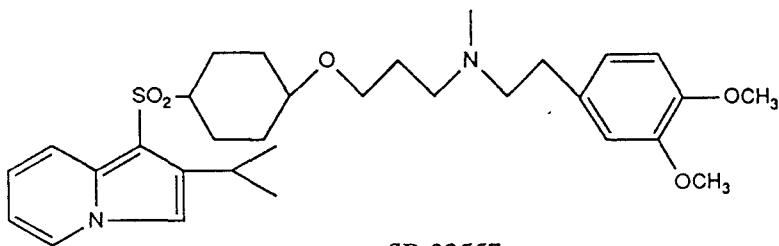
FK-506



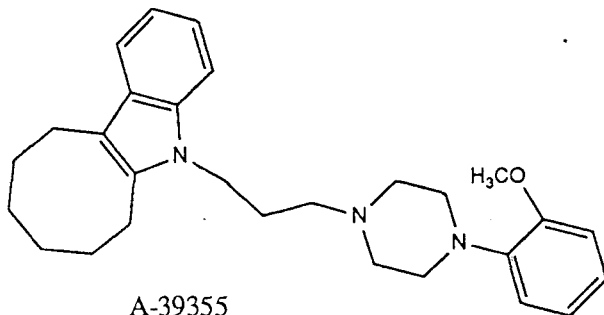
MS-073



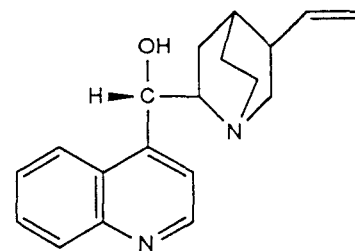
bamipine



SR 33557



A-39355



cinchonine

Figure 5 : Composés permettant de réverser la chimiorésistance à l'adriamycine

Peu d'études ont porté sur l'utilisation des vecteurs de médicaments pour vaincre la résistance aux agents anticancéreux. En ce qui concerne la résistance pléiotropique, pour laquelle le phénomène le plus marquant est la présence d'une pompe refoulant le principe actif à l'extérieur de la cellule, l'utilisation d'un vecteur de médicament capable de libérer le principe actif à distance de la pompe et à proximité de sa cible nucléaire est une démarche pouvant conduire logiquement à la réversion de cette chimiorésistance (Oudard et al., 1991; Mickisch et al., 1992; Thierry et al., 1992). Les liposomes utilisés varient bien souvent par leur composition, leur charge électrique, leur taille ou leur structure. Leur mode d'action pourrait résulter de leur fusion avec la membrane plasmique des cellules et d'un changement transitoire de la composition lipidique (Warren et al., 1992); il peut aussi être dû à des modifications pharmacocinétiques de l'anticancéreux (Gabizon, 1992). Plus récemment, des vecteurs colloïdaux ont été développés, nanosphères biodégradables de polyalkylcyanoacrylate (Cuvier et al., 1992).

5.2. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE AU CIS-PLATINE

Les tentatives allant dans le sens d'une réversion de la chimiorésistance au cis-platine peuvent être qualifiées de ponctuelles par rapport à toutes les études effectuées sur l'adriamycine. Il est bien évident que, comme il a été décrit précédemment, ce processus de chimiorésistance est particulièrement complexe et l'on ne dispose pas d'une cible telle que la glycoprotéine P même si celle-ci ne constitue pas un mécanisme universel.

Outre l'élaboration de nouveaux dérivés du platine actifs sur les cellules chimiorésistantes (Kelland et al., 1992 (a); Kelland et al., 1992 (b)), les sites possibles d'action peuvent se situer à trois niveaux (Timmer-Bosscha et al., 1992) :

- 1/ action sur la membrane avec ou sans effet sur l'accumulation de cis-platine
- 2/ action cytoplasmique
- 3/ action au niveau du noyau, de l'ADN

1/ action sur la membrane avec ou sans effet sur l'accumulation de cis-platine

Utilisation d'agents affectant l'accumulation de cis-platine, les voies de transduction.

- liposomes permettant une libération accrue de l'anticancéreux à sa cible, une modification de sa distribution intracellulaire ou de son métabolisme (Perez-Soler et al., 1988)
- effet sur la fluidité membranaire (hyperthermie)

- modification de la transduction de signaux
 - . augmentation de l'AMPC
 - . activation (lyngbyatoxine A, bryostatine 1) ou inhibition (tamoxifène) de la PKC. La contradiction concernant l'effet de la PKC peut s'expliquer par l'utilisation d'inhibiteurs non spécifiques de la PKC et par le site de mesure de l'activité PKC (lysats cellulaires ou cellules intactes) (Basu et al., 1991; Basu et Lazo, 1992)
 - . modulation de l'expression d'oncogènes, *c-fos* et *H-ras* par la cyclosporine A (Kashani-Sabet et al., 1990)

Bloqueurs des canaux calciques et inhibiteurs de la calmoduline. La nifédipine, inhibiteur calcique, interagit avec des cibles cellulaires qui ne doivent pas être accessibles au vérapamil, au diltiazem ou aux antagonistes de la calmoduline, ces derniers composés s'avérant inactifs (Onoda et al., 1989).

2/ action cytoplasmique

Modulation de la concentration intracellulaire en thiols. Le rôle du glutathion étant controversé dans la chimiorésistance au cis-platine, l'utilisation de la buthionine sufoximine a des effets divers conduisant à une réversion du phénomène ou à une absence d'effets (Hamilton et al., 1985; Richon et al., 1987).

3/ action au niveau du noyau, de l'ADN

Ceci peut se réaliser en utilisant des inhibiteurs de la polymérase α , de la synthèse d'ADN, des mécanismes de réparation ou bien même, en modulant l'accessibilité à l'ADN ou sa conformation.

RESULTATS

1. CARACTERISATION DE LIGNEES CELLULAIRES SENSIBLES ET RESISTANTES A L'ADRIAMYCINE OU AU CIS-PLATINE

Une étape préalable de cytotoxicité a permis de vérifier (pour les cellules obtenues gracieusement) ou de mettre en évidence (cellules rendues résistantes au sein du laboratoire) l'indice de résistance des différentes cellules. Les diverses lignées cellulaires utilisées sont décrites dans la partie "METHODOLOGIE 1.CULTURE CELLULAIRE."

L'indice de résistance correspond au rapport entre la concentration d'adriamycine ou de cis-platine inhibant la croissance des cellules de 50% dans les cellules résistantes et celle obtenue dans les cellules sensibles.

Pour les cellules MCF-7, cet indice est de 200 (la concentration d'adriamycine inhibant la croissance des cellules de 50% est de 0,25 μ M pour les cellules sensibles et de 50 μ M pour les cellules résistantes). Pour les P-388, l'indice de résistance est de 95, pour les L-1210 résistantes à l'adriamycine de 65 et pour les MIP-101 de 10.

Les cellules L-1210 résistantes au cis-platine le sont d'un indice 7 pour les cellules 5 mg et d'un facteur 10 pour les cellules 8 mg. Les NIH 3T3 transfectées par *ras* sont deux fois plus résistantes au cis-platine que ne le sont les cellules non transfectées.

1.1. DETECTION PAR IMMUNOFLUORESCENCE DE LA GLYCOPROTEINE P

La glycoprotéine P a pu être mise en évidence dans les cellules résistantes à l'adriamycine (Figures 6 à 9), que leur indice de résistance soit de 10 ou de 200.

Dans le cas des MIP-101, cellules de côlon résistantes *de novo* à l'adriamycine, les cellules sensibles (DLD-1) peuvent exprimer la glycoprotéine P mais d'une manière fortement moins nette et moins homogène que les cellules MIP-101. Cette expression est caractérisée par la présence d'un très fin liseré ou d'un petit halo. La présence de la glycoprotéine P dans les cellules DLD-1 se comprend aisément si l'on considère que le niveau d'expression de la

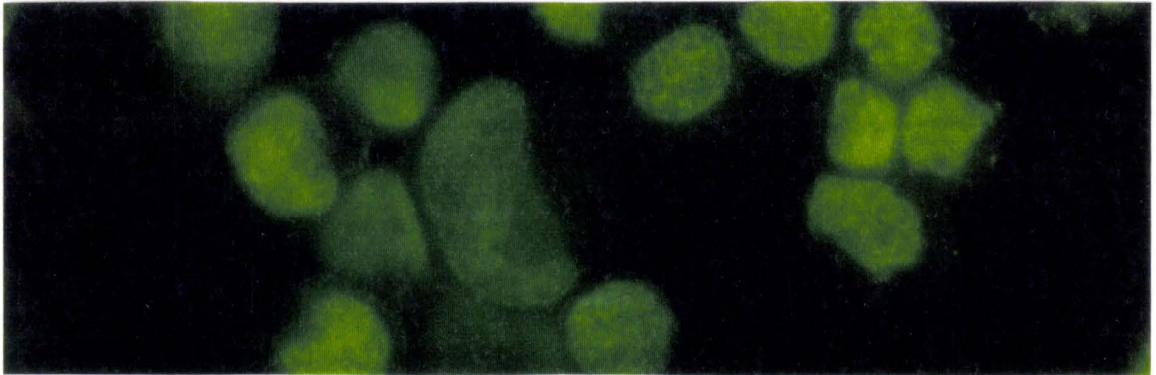
glycoprotéine P est relativement élevé dans le côlon. La Figure 6 met en évidence la présence de la glycoprotéine P dans les cellules MIP-101 sous la forme d'un contour membranaire très important.

En ce qui concerne les cellules résistantes à l'adriamycine, cellules MCF-7, P-388 et L-1210, elles présentent toutes également la glycoprotéine P respectivement sous forme de petits points répartis de manière diffuse (Figure 7), d'un contour membranaire plus ou moins régulier (Figure 8) ou de petits points formant des amas (Figure 9).

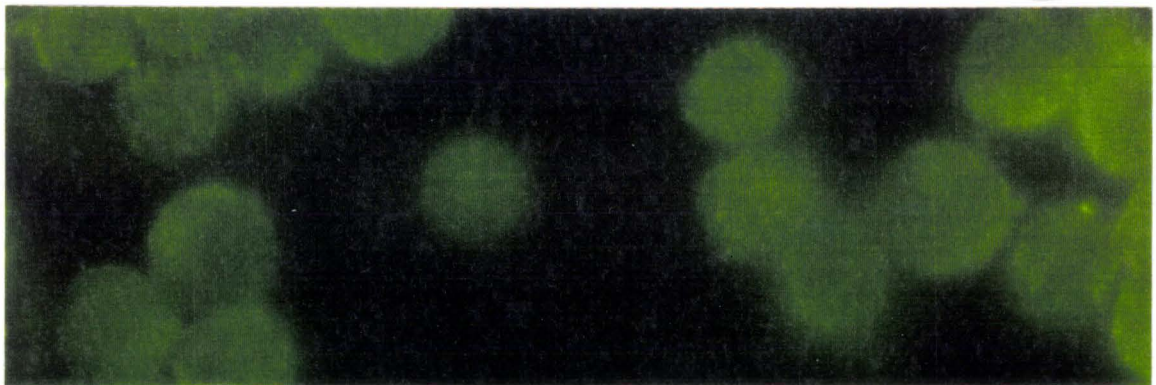
Les cellules résistantes au cis-platine, L-1210 et NIH 3T3 transfectées par *ras*, par opposition aux cellules "multidrug résistantes", n'expriment pas la glycoprotéine P (Figure 10).

La détection de la glycoprotéine P ayant été effectuée par immunofluorescence, aucune mesure quantitative n'a pu être réalisée et il s'avère impossible de pouvoir établir une corrélation entre l'expression de la glycoprotéine P et l'indice de chimiorésistance. Quoiqu'il en soit, la glycoprotéine P s'avère présente dans les cellules résistantes à l'adriamycine mais non dans celles résistantes au cis-platine.

A/



B/



C/

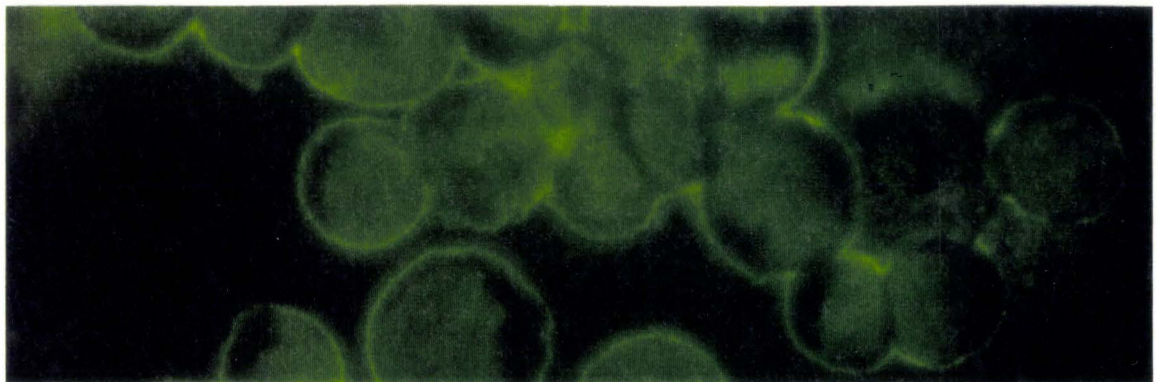
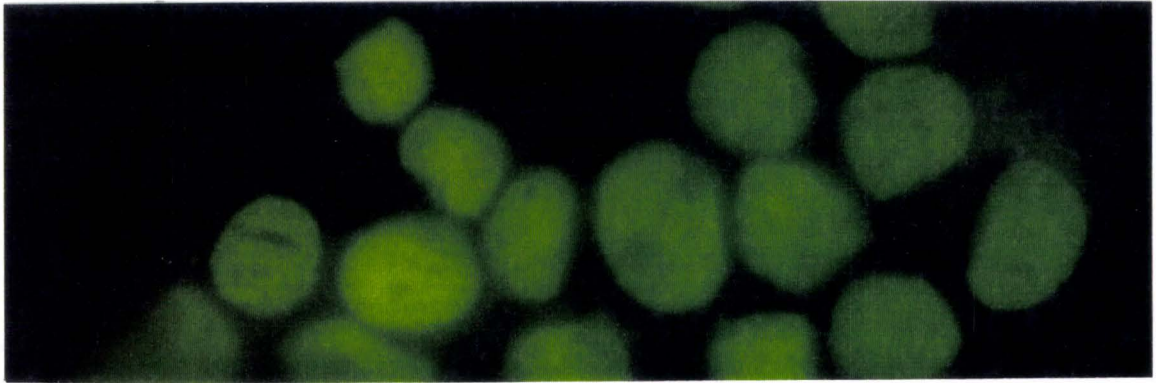
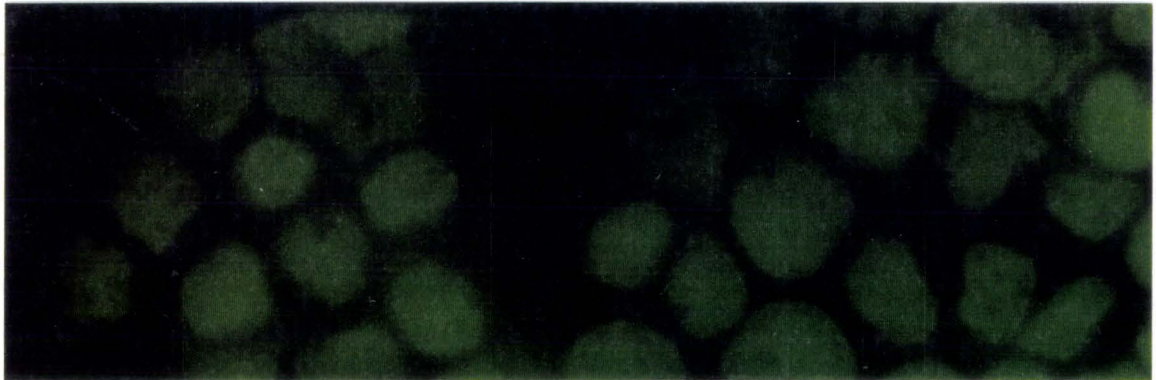


Figure 6 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules DLD-1 (A), MIP-101 test - (B) et MIP-101 (C) résistantes *de novo* à l'adriamycine.

A/



B/



C/

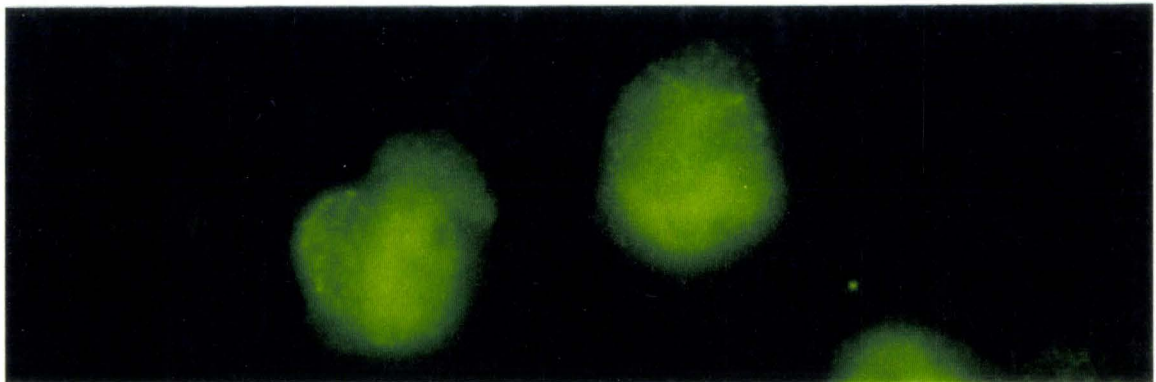
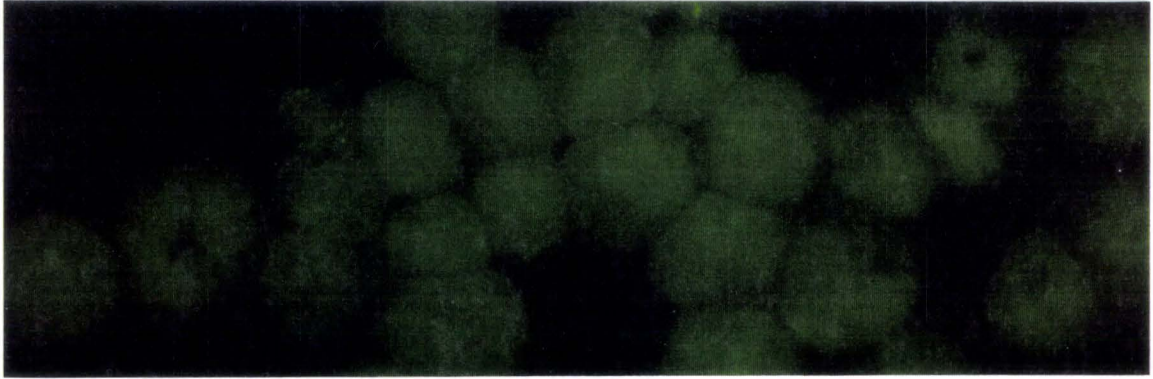
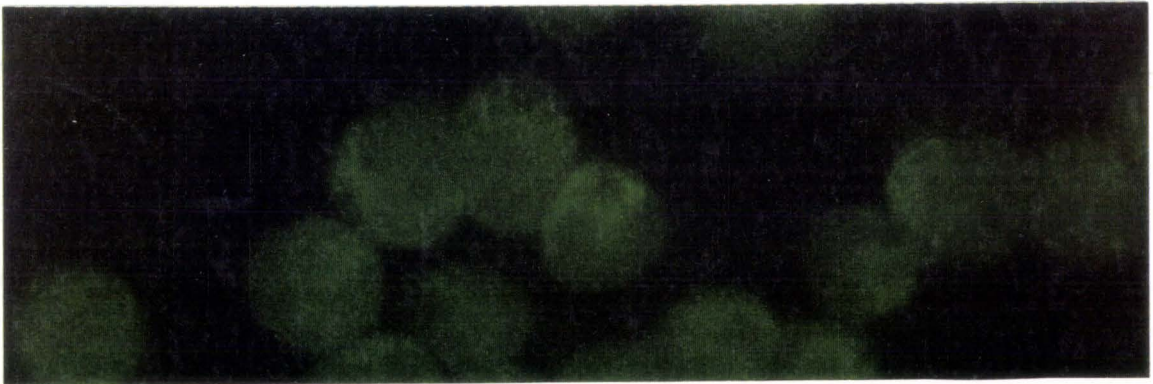


Figure 7 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules MCF-7 sensibles (A), MCF-7 résistantes test - (B) et MCF-7 résistantes (C) à l'adriamycine.

A/



B/



C/

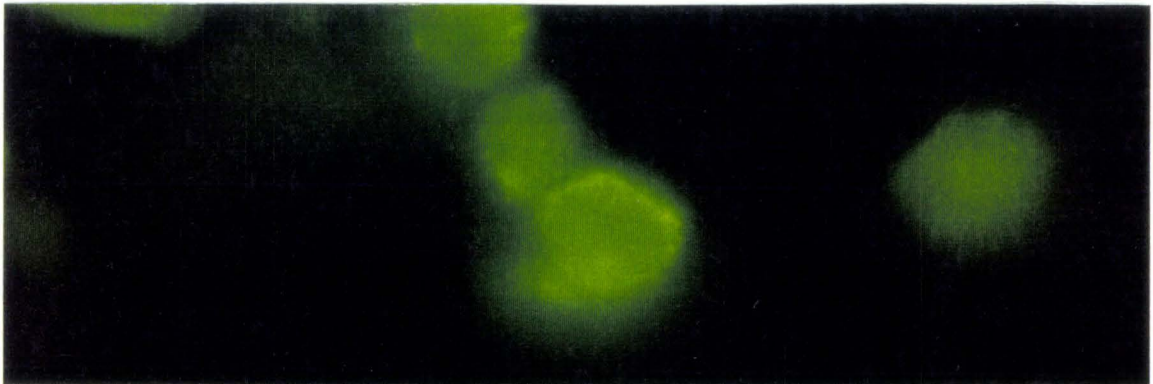
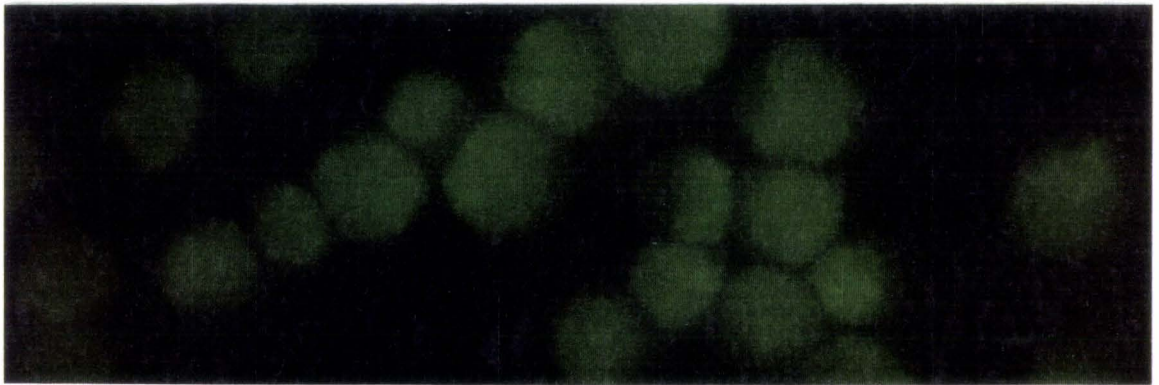
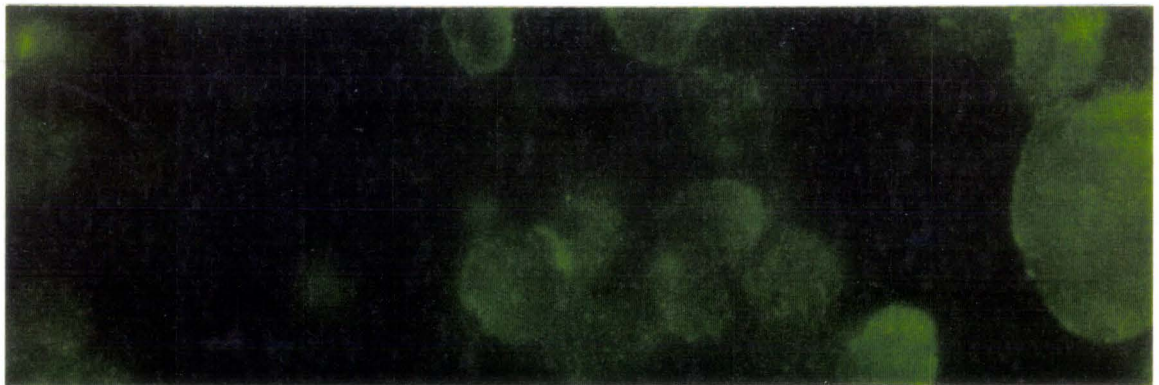


Figure 8 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules P-388 sensibles (A), P-388 résistantes **test** - (B) et P-388 résistantes (C) à l'adriamycine.

A/



B/



C/

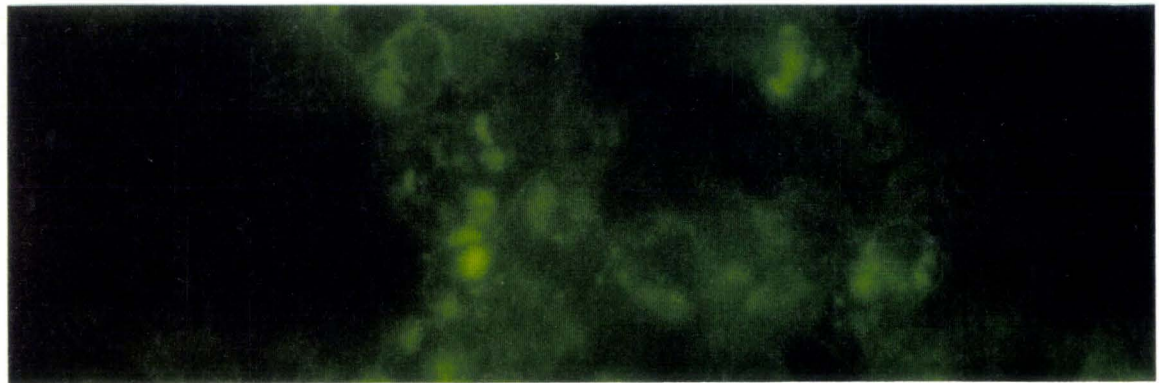
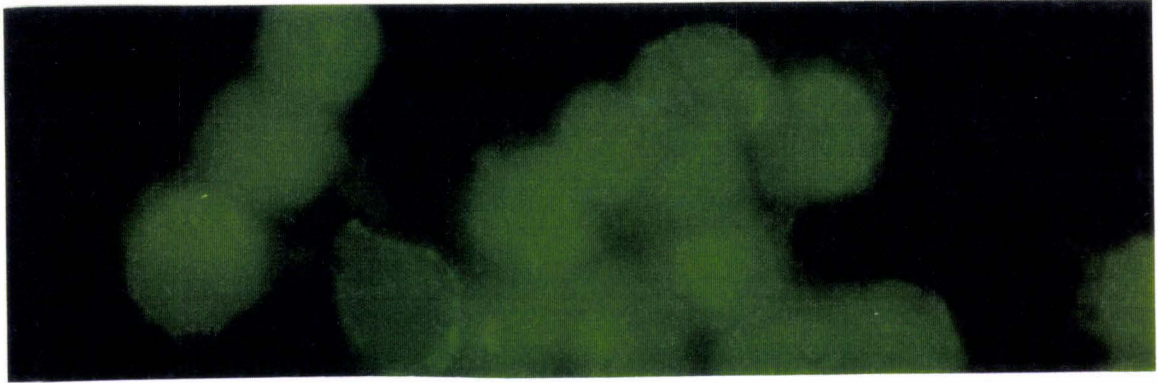
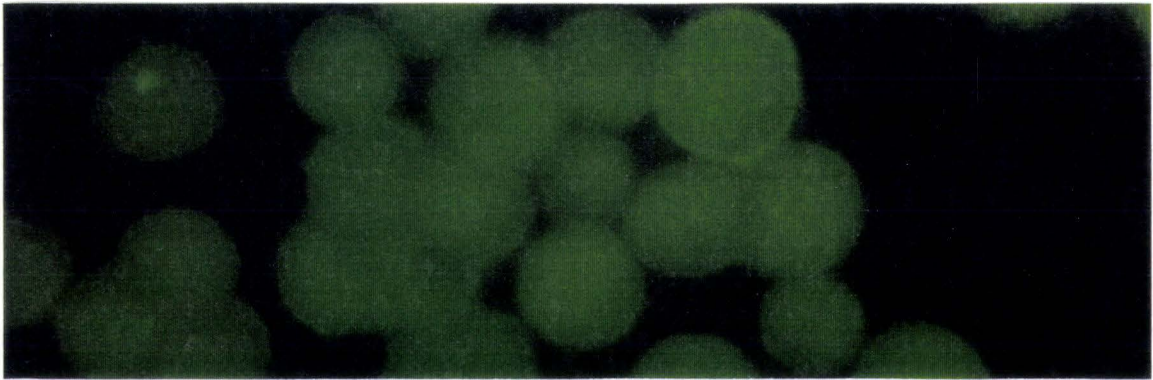


Figure 9 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules L-1210 sensibles (A), L-1210 résistantes test - (B) et L-1210 résistantes (C) à l'adriamycine.

A/



B/



C/

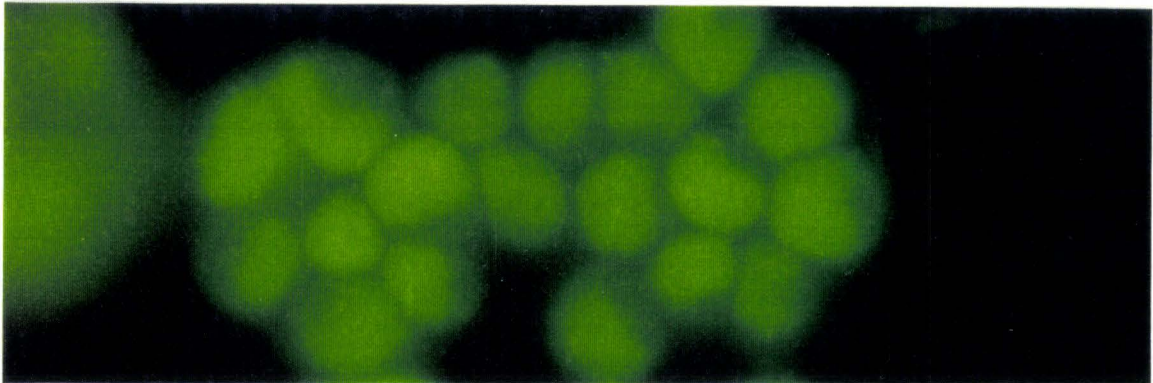


Figure 10 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules L-1210 résistantes au cisplatine : 5 mg (A), 8 mg (B) et dans les cellules NIH 3T3 transfectées par *ras* (C).

1.2. EXPRESSION DE DIFFERENTS ONCOGENES ET D'UN GENE SUPPESSEUR DE TUMEUR DANS LES CELLULES SENSIBLES ET RESISTANTES A L'ADRIAMYCINE OU AU CIS-PLATINE

L'étude des oncogènes et d'un gène suppresseur de tumeur a été effectuée dans les cellules MIP-101, MCF-7 et P-388 résistantes à l'adriamycine ainsi que dans les cellules L-1210 et NIH 3T3 résistantes au cis-platine. Parmi les nombreux oncogènes existant à l'heure actuelle, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à *c-H-ras*, *c-K-ras*, *c-myc*, *c-myb*, *c-mil*, *c-fos*, *c-mdr* et au gène suppresseur de tumeur, la p 53. Les Tableaux 4 et 5 résument l'ensemble des résultats obtenus.

Tableau 4 : Expression de différents oncogènes dans les cellules sensibles et résistantes à l'adriamycine. Le niveau d'expression est comparé à l'actine, témoin interne représentatif de la quantité déposée. Dans un premier temps, nous avons utilisé comme témoin interne la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Nous nous sommes aperçus de modifications de la quantité de dépôt d'une manière parallèle à la sensibilité des cellules; ces modifications peuvent être mises en rapport avec celles de la glucose-6-phosphate déshydrogénase observées dans les cellules MCF-7 (voir Section RESULTATS 1.3.). Nous avons donc décidé d'utiliser l'actine comme témoin.

Oncogènes	Cellules		MCF-7		P- 388	
	DLD-1 sensibles	MIP-101 résistantes	sensibles	résistantes	sensibles	résistantes
<i>c-H-ras</i>	+	++	+	++	+	+
<i>c-K-ras</i>	-	-	-	-	-	-
<i>c-myc</i>	+	+	++	+	+	+++
<i>c-myb</i>	+	+	++	+	-	+++
<i>c-mil</i>	-	+++++	++	+	+	++
<i>c-fos</i>	+	+	-	-	-	-
<i>c-mdr</i>	+	+++	-	++	-	+
p 53	+	+	++	+	-	-

Tableau 5 : Expression de différents oncogènes dans les cellules sensibles et résistantes au cis-platine. Le niveau d'expression est comparé à l'actine, témoin interne représentatif de la quantité déposée. Les L-1210 *vitro* correspondent aux cellules L-1210 sensibles n'ayant pas été transplantées, les L-1210 *ex vivo* aux cellules transplantées chez la souris et récupérées *in vitro*, les L-1210/5 mg aux cellules provenant de souris ayant reçu 5 mg de cis-platine et les L-1210/8 mg aux cellules provenant de souris ayant reçu 8 mg de cis-platine (voir Section METHODOLOGIE).

Oncogènes	Cellules	L- 1210				NIH 3T3	
		sensibles <i>vitro</i>	sensibles <i>ex vivo</i>	résistantes 5 mg	résistantes 8 mg	sensibles	résistantes
c-H- <i>ras</i>		+	+	+++	+++	+	++
c-K- <i>ras</i>		-	-	-	-	-	-
c- <i>myc</i>		+	+	+++	+++	+	+
c- <i>myb</i>		++	+	+++	+++	-	-
c- <i>mil</i>		+	+	+++	+++	-	-
c- <i>fos</i>		-	-	-	-	-	-
c- <i>mdr</i>		-	-	-	-	-	-
p 53		-	-	-	-	-	-

Si l'on considère les cellules résistantes à l'adriamycine, la modification la plus importante qui puisse être observée dans les cellules MIP-101 concerne le gène *mil* qui s'exprime très fortement dans ces cellules et qui, de plus, présente une taille anormale. Une étude par Southern blot a permis de mettre en évidence que la modification résulte bien d'une différence d'expression et non d'une amplification génique.

En ce qui concerne le gène *mdr*, sa détection par Northern blot confirme les résultats obtenus par immunofluorescence à savoir son expression dans les cellules résistantes à l'adriamycine, cellules résistantes *de novo* ou résistance acquise.

Pour les cellules MCF-7 et P-388, cellules résistantes à l'adriamycine obtenues par un processus de sélection, l'expression des gènes *c-myc*, *c-myb* et *c-mil* est modifiée, mais d'une façon tout à fait opposée; ces gènes sont plus exprimés dans les cellules P-388 résistantes et

dans les cellules MCF-7 sensibles que dans leurs équivalents, respectivement sensibles et résistants. Pour la p 53, on observe également une augmentation d'expression dans les cellules sensibles mais non dans les cellules résistantes.

Les seuls résultats présentés dans la littérature concernant l'adriamycine sont une corrélation d'une part, entre une transfection de cellules épithéliales de foie de rat par *v-H-ras* et *v-raf* et la résistance à l'adriamycine et d'autre part, entre une expression accrue de *c-fos* et *c-jun* dans des cellules de sarcome 180 et des cellules KB et la chimiorésistance à l'adriamycine (Bhushan et al., 1992; Burt et al., 1988). Les résultats que nous avons obtenus concernant l'expression de *c-mil* (homologue de *c-raf*) dans les cellules P-388 s'avèrent comparables à ceux décrits précédemment.

Les cellules L-1210 résistantes au cis-platine présentent des modifications importantes de l'expression de certains oncogènes à savoir *c-H-ras*, *c-myc*, *c-myb* et *c-mil*, tous les quatre surexprimés dans ces cellules résistantes au cis-platine. Les cellules NIH 3T3 ne présentent qu'une modification de l'expression de *c-H-ras* surexprimé dans les cellules transfectées, ce paramètre induisant une chimiorésistance au cis-platine déjà décrite par divers auteurs (Sklar, 1988; Isonishi et al., 1991). Il est évident que, avec la sonde utilisée, nous ne pouvons pas déterminer si la modification d'expression de ce gène est due à sa transfection ou à sa variation d'expression endogène (la taille des transcrits de l'oncogène *c-H-ras* d'origine humaine ou de souris est identique). En ce qui concerne l'expression de *c-H-ras*, *c-myc* et *c-mil*, les résultats obtenus avec les L-1210 sont compatibles avec ceux décrits dans la littérature. Ces derniers peuvent se subdiviser en deux parties : des études de transfection d'oncogènes et des analyses d'expression dans des cellules chimiorésistantes :

- la transfection de cellules NIH 3T3 par *c-H-ras* ou de cellules érythroleucémiques de Friend par *c-myc* induit une résistance au cis-platine (Sklar, 1988; Sklar et Prochownik, 1991)
- l'expression de *c-H-ras*, de *c-myc*, de *c-raf* mais aussi de *c-fos* s'avère accrue dans des cellules A2780 résistantes au cis-platine (Scanlon et al., 1989; Kashani-Sabet et al., 1990; Jiao et al., 1991).

En ce qui nous concerne, nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de corrélation entre l'expression de *c-fos* et la chimiorésistance au cis-platine.

Les Figures 11 et 12 illustrent quelques-uns de nos résultats concernant l'expression de divers oncogènes dans les cellules sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine.

Quelle peut être la signification de telles modifications dans l'expression des oncogènes ?

Les produits des oncogènes peuvent stimuler la croissance cellulaire en agissant sur les voies intracellulaires clés participant au contrôle de la croissance, leur perturbation pouvant entraîner une modification de la régulation de la prolifération. La sensibilité aux anticancéreux peut, quant à elle, être régulée par différentes voies de transduction de signaux qui interviennent normalement dans l'homéostasie cellulaire mais peuvent être altérées dans le cas de cellules tumorales.

Les mécanismes biochimiques par lesquels les oncogènes peuvent intervenir dans la chimiorésistance restent encore obscurs. Néanmoins, plusieurs hypothèses peuvent être proposées, surtout pour le cis-platine, mais également envisagées pour l'adriamycine.

Ainsi, pour l'oncogène *c-ras*, la localisation des produits de cet oncogène sur la face interne de la membrane cellulaire permet de suggérer qu'il pourrait affecter la concentration intracellulaire du médicament. Ce mécanisme pourrait s'expliquer par une expulsion de l'anticancéreux ou par sa liaison aux protéines de l'oncogène ou aux protéines induites par la transformation aboutissant à une biodisponibilité inférieure de l'anticancéreux, à une interaction moindre avec l'ADN ou à une modification de sa distribution (Sklar, 1988). L'oncogène *c-ras* pourrait également affecter l'expression des gènes impliqués dans la réparation des dommages causés à l'ADN par le cis-platine ou altérer la structure de la chromatine ou les autres structures nucléaires afin d'augmenter l'accès aux enzymes de réparation (Sklar, 1988; Jiao et al., 1991). Une autre possibilité consiste en une altération du taux de glutathion, de métallothionéine ou d'autres agents réducteurs (Sklar, 1988; Isonishi et al., 1991). *c-H-ras* agit également en amont de *c-fos* dans les voies de transduction de signaux et cet oncogène membranaire peut donc moduler l'expression d'oncogènes nucléaires (Kashani-Sabet et al., 1990; Scanlon et al., 1990; Isonishi et al., 1991; Jiao et al., 1991).

c-mil (homologue de *c-raf*) fait lui aussi partie, au même titre que *c-ras*, des oncogènes membranaires pouvant stimuler l'expression d'oncogènes nucléaires (Scanlon et al., 1990).

c-myc peut, quant à lui, réguler directement ou indirectement les processus de réparation de l'ADN affectant les dommages causés à ce dernier par un anticancéreux (Sklar et Prochownik, 1991). Les produits de *c-myc* étant des protéines se liant à l'ADN, localisées plus précisément dans la matrice nucléaire, un rôle de cet oncogène dans les processus de réparation et les processus par lesquels les cellules font face aux lésions est tout à fait envisageable. Le proto-oncogène *c-myc* joue également un rôle dans le contrôle de la division cellulaire (Penn et al., 1990). Dans des cellules normales, le gène *c-myc* est exprimé à faible taux de façon ubiquitaire mais fait partie des "immediate early gene" impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Selon Eliopoulos et coll., *c-myc* pourrait modifier la durée du cycle cellulaire et augmenter le temps disponible afin de réparer les lésions affectant les cellules avant la mitose suivante (Eliopoulos et al., 1991).

L'expression de *c-fos* est un événement nécessaire à la prolifération cellulaire. Le rôle direct et indispensable du produit de *c-fos* pour la croissance cellulaire illustre l'idée que chaque maillon de la cascade mitogène constitue potentiellement une cible dont la modification peut entraîner la cellule vers une prolifération incontrôlée, c'est-à-dire vers un état tumoral (Studzinski, 1989).

Diverses études ont mis en évidence l'importance de l'expression du gène *c-fos* dans la chimiorésistance au cis-platine (Scanlon et al., 1989; Kashani-Sabet et al., 1990; Jiao et al., 1991; Bhushan et al., 1992). L'action de *c-fos* dans la chimiorésistance pourrait résider dans son action au niveau de la synthèse d'ADN, des processus de réparation, de l'activation d'enzymes importantes dans la synthèse de l'ADN y compris la dTMP (thymidylate monophosphate) synthétase et la DNA polymérase β (Scanlon et al., 1989; Kashani-Sabet et al., 1990; Jiao et al., 1991). *c-fos* peut également intervenir par une activation de la métallothionéine, un autre gène dont la surexpression est liée à la chimiorésistance au cis-platine pouvant contribuer à une détoxification de ce dernier (Jiao et al., 1991).

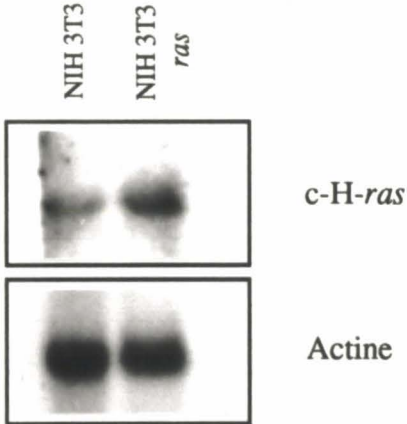
Chin et coll. ont mis en évidence une corrélation inverse entre la présence de la p 53 de type sauvage et l'expression du gène MDR1 (Chin et al., 1992).

Les données obtenues concernant les cellules MCF-7 confirment les résultats présentés par ces auteurs. Dans les cellules MCF-7 résistantes à l'adriamycine, nous observons la présence de la p 53 exerçant un effet répresseur sur l'expression du gène *c-mdr*; la situation inverse étant obtenue pour les cellules sensibles.

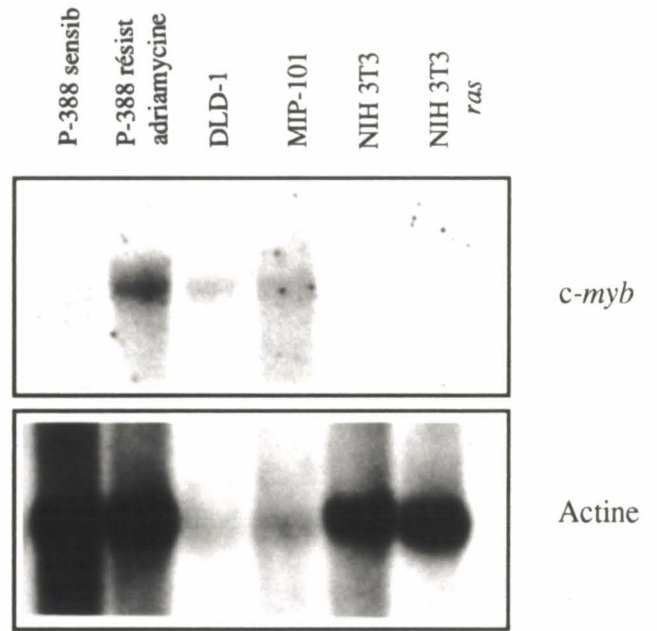
Dans le cas des cellules MIP-101, une expression accrue de *c-mdr* n'est pas corrélée à une variation d'expression de la p 53. Par contre, dans ces cellules, l'expression d'une p 53 mutée qui n'exercerait plus son rôle répresseur sur le promoteur du gène *mdr* permettrait d'expliquer les résultats obtenus.

c-H-ras

NIH 3T3



A/ c-myb



B/

L-1210

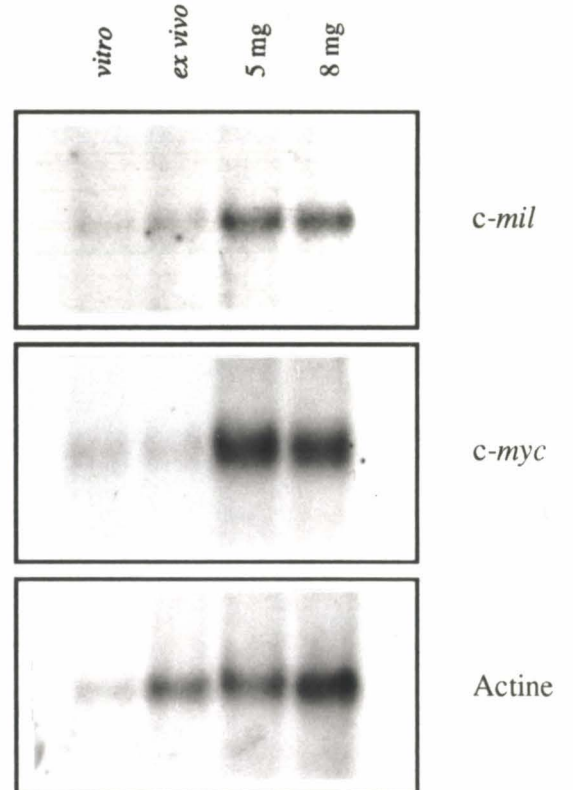
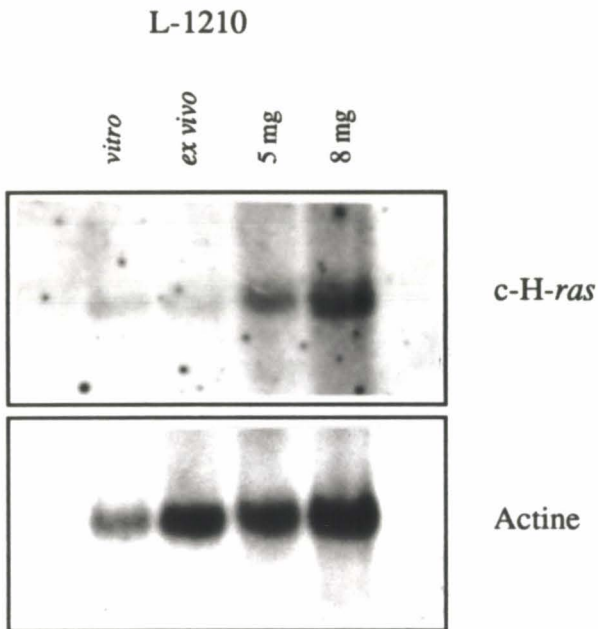
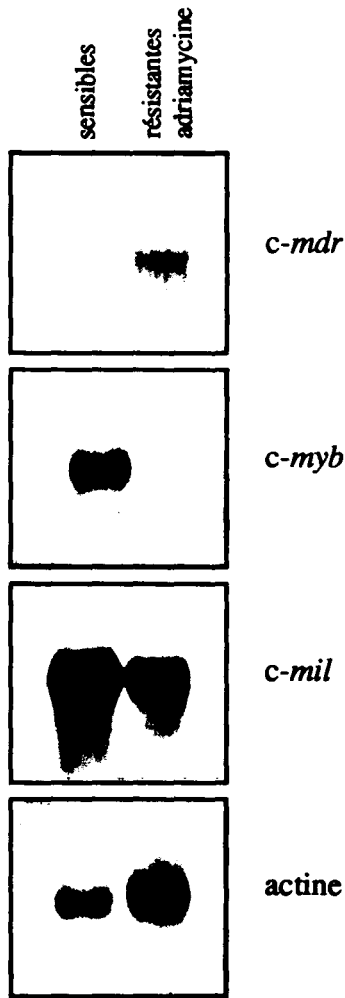


Figure 11 : Expression de l'oncogène *c-H-ras* dans les cellules NIH 3T3 et L-1210 sensibles et résistantes au cis-platine (côté gauche), de l'oncogène *c-myb* (A) et de différents oncogènes dans les cellules L-1210 sensibles et résistantes au cis-platine (B)

MCF-7



c-fos

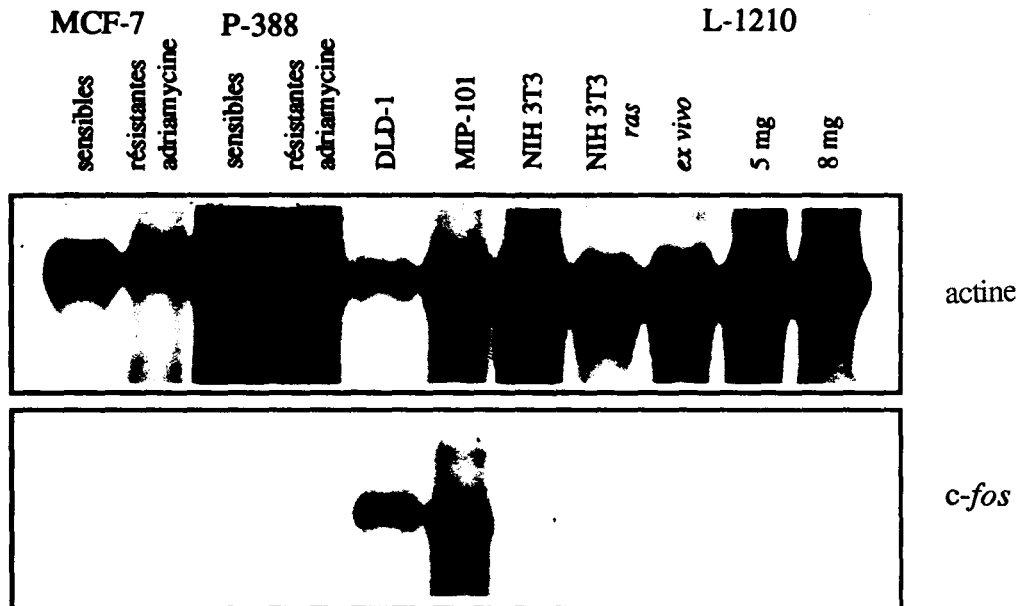


Figure 12 : Expression de différents oncogènes dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine et de l'oncogène *c-fos* dans différentes lignées cellulaires sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine

1.3. MESURE DU GLUTATHION ET DES ENZYMES ASSOCIEES AU METABOLISME DU GLUTATHION.

Les Tableaux 6 à 10 présentent les taux de glutathion (sous forme réduite et oxydée) ainsi que ceux d'enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion (glutathion réductase, glutathion transférases et peroxydases, glucose-6-phosphate déshydrogénase et γ -glutamyl transpeptidase) dans les diverses lignées cellulaires sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine.

1.3.1. Chimiorésistance à l'adriamycine

Si l'on considère les cellules MIP-101, ces cellules possèdent environ deux à trois fois plus de glutathion que les cellules DLD-1, cellules sensibles. Leurs activités glutathion réductase et peroxydases, glucose-6-phosphate déshydrogénase sont plus élevées alors que les glutathion transférases et la γ -glutamyl-transpeptidase sont diminuées.

Les activités des glutathion transférases et peroxydases sont stimulées dans la fraction cytosolique des cellules MCF-7 résistantes à l'adriamycine. Une modification importante de la glutathion réductase est également observée dans les cellules résistantes mais, contrairement aux activités précédemment citées, une baisse d'activité enzymatique est ici observée. Il en est de même pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Les cellules P-388 et L-1210 résistantes à l'adriamycine, tout comme les MCF-7, ne montrent pas de modification importante du taux de glutathion, réduit ou oxydé. L'activité glutathion réductase subit également, dans un ordre de mesure différent, les mêmes modifications. Les accroissements d'activités glutathion transférases et peroxydases particulièrement importants dans les cellules MCF-7 résistantes sont également mis en évidence dans les cellules P-388 même si l'ordre de grandeur s'avère différent; la situation est inversée pour les cellules L-1210. L'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase est supérieure dans les cellules P-388 résistantes et la γ -glutamyl-transpeptidase est modifiée d'une façon similaire à celle présente dans les cellules MCF-7 résistantes. Les cellules L-1210, de même origine que les cellules P-388, mis à part leur taux de glutathion et d'activité glutathion réductase, réagissent d'une façon tout à fait différente par rapport aux P-388.

Les Figures 13 à 15 résument l'ensemble des données concernant les cellules résistantes à l'adriamycine sous forme d'un rapport d'activité cellules résistantes/cellules sensibles.

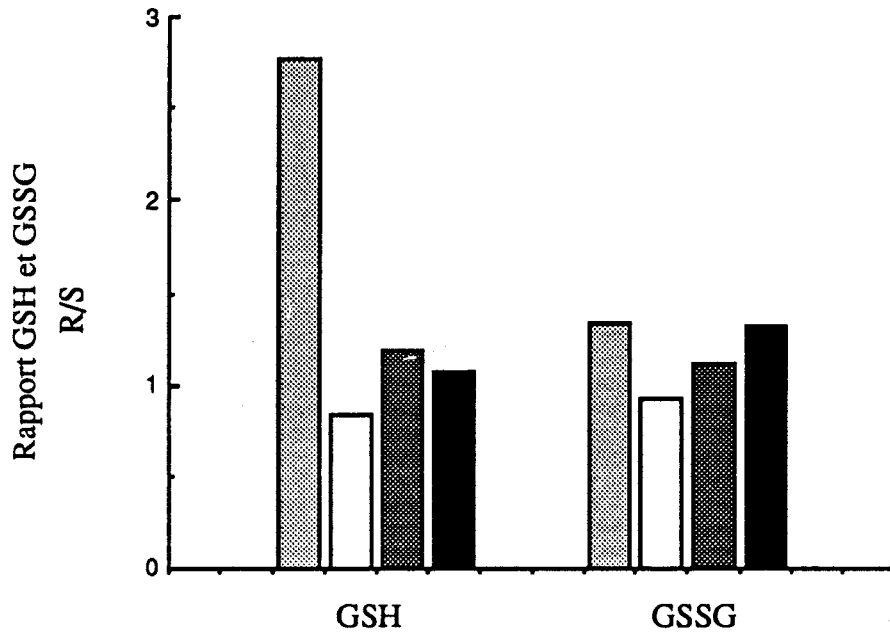


Figure 13 : Rapport de GSH et GSSG cellules résistantes/cellules sensibles dans les MIP-101 (▨), les MCF-7 (□), les P-388 (▩) et les L-1210 (■).

D'une manière générale, on peut considérer que seules les cellules résistantes *de novo* manifestent une modification importante de leur taux de glutathion.

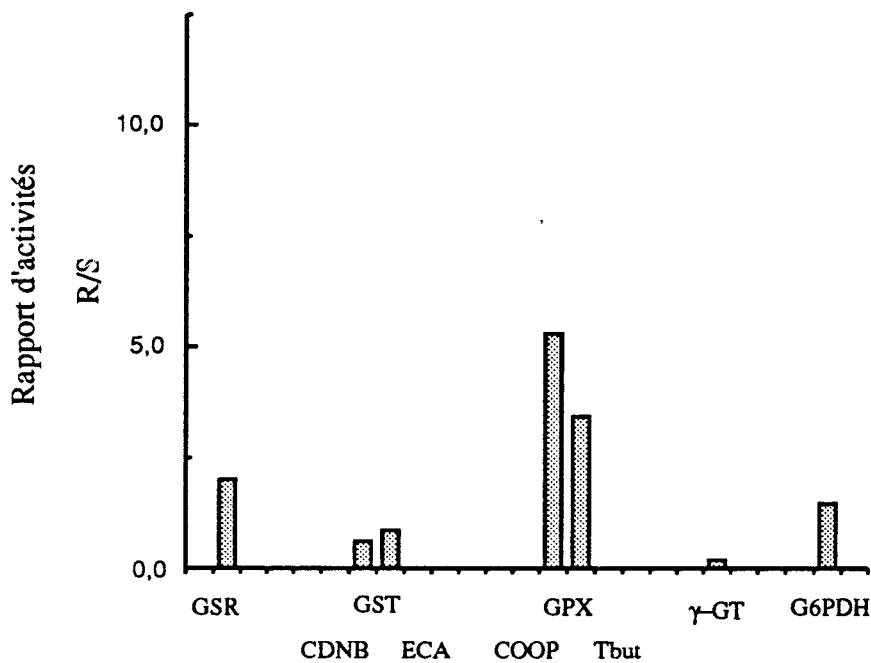


Figure 14 : Rapport d'activités cellules résistantes/cellules sensibles dans les DLD-1 et MIP-101.

Les abréviations sont : GSR : glutathion réductase, GST : glutathion transférase, CDNB : chloro-dinitrobenzène (mesure globale des glutathion transférase), ECA : acide éthacrinique (isoenzyme de type π), GPX : glutathion peroxydases, COOP : hydroperoxyde de cumène (mesure des glutathion peroxydases dépendantes et indépendantes du sélénium), Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle (mesure des glutathion peroxydases dépendantes du sélénium), γ -GT : γ -glutamyl transpeptidase et G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase.

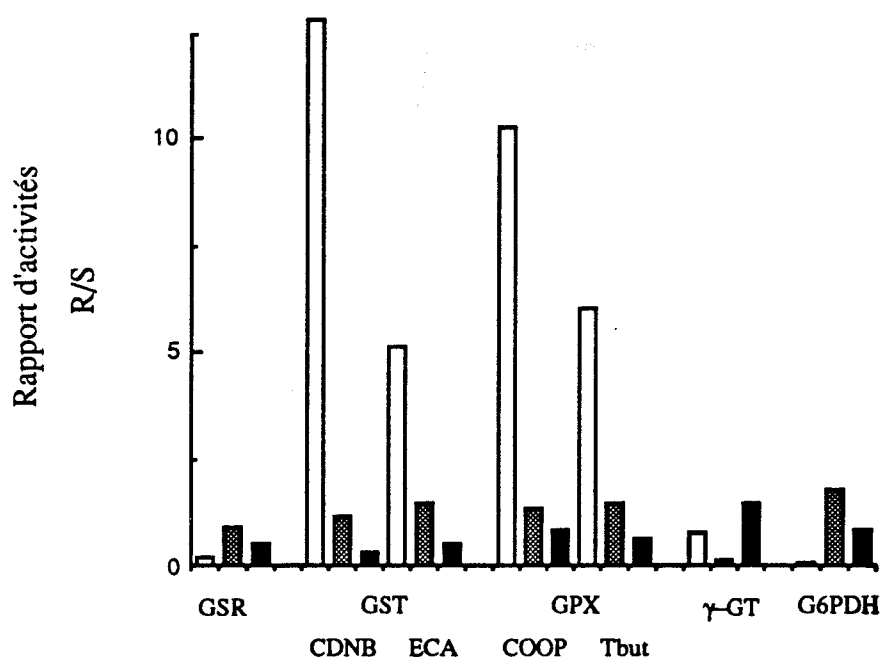


Figure 15 : Rapport d'activités cellules résistantes/cellules sensibles dans les MCF-7 (□), les P-388 (▨) et les L-1210 (■).

Les abréviations sont : GSR : glutathion réductase, GST : glutathion transférase, CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, GPX : glutathion peroxydases, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle, γ -GT : γ -glutamyl transpeptidase et G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase.

La situation s'avère complexe en ce qui concerne les activités enzymatiques : les glutathion peroxydases atteignent un niveau supérieur dans les cellules résistantes dans 75% des cas et les glutathion transférase dans 50%. La glutathion réductase tend également à diminuer dans tous les cas de chimiorésistance acquise. Aucune corrélation ne peut être mise en évidence entre l'indice de chimiorésistance des cellules testées et les modifications enzymatiques observées. L'ensemble de ces données met en évidence la complexité des modifications enzymatiques observées *in vitro* et, par conséquent, laisse présager d'une difficulté d'analyse de ce phénomène *in vivo*.

Tableau 6 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les fractions cytosoliques et/ou microsomiales de cellules sensibles (DLD-1) et résistantes (MIP-101) de novo à l'adriamycine.

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules ou par mg de protéines) représentent la moyenne \pm SEM (Standard Error Mean) de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

Les abréviations sont : CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle.

	DLD-1	MIP-101
-GSH		
par million de cellules	3253 \pm 314	8882 \pm 881
par mg de protéines	52894 \pm 5103	89717 \pm 8970
-GSSG		
par million de cellules	338 \pm 112	450 \pm 120
par mg de protéines	4492 \pm 1488	4545 \pm 1212
- glutathion réductase	26,67 \pm 0,98	53,55 \pm 1,85
- glutathion transférases		
CDNB	145,81 \pm 3,24	92,93 \pm 1,00
ECA	12,73 \pm 1,07	10,94 \pm 1,01
- glutathion peroxydases		
COOP	0,96 \pm 0,10	5,11 \pm 0,39
Tbut	1,69 \pm 0,24	5,78 \pm 0,07
- γ -glutamyl transpeptidase	59,29 \pm 2,51	11,59 \pm 0,56
- glucose-6-P-déshydrogénase	114,77 \pm 5,72	171,33 \pm 7,03

Tableau 7 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les fractions cytosoliques et/ou microsomiales de cellules MCF-7, cellules sensibles et résistantes à l'adriamycine.

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules ou par mg de protéines) représentent la moyenne \pm SEM de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

Les abréviations sont : CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle.

	MCF-7 / S	MCF-7 / R
-GSH		
par million de cellules	6542 \pm 575	5447 \pm 475
par mg de protéines	44503 \pm 3911	45016 \pm 3926
-GSSG		
par million de cellules	194 \pm 86	178 \pm 79
par mg de protéines	1320 \pm 485	1471 \pm 653
- glutathion réductase	197,61 \pm 8,36	41,96 \pm 1,55
- glutathion transférases		
CDNB	20,00 \pm 5,58	256,15 \pm 11,28
ECA	2,23 \pm 0,15	11,47 \pm 0,47
- glutathion peroxydases		
COOP	2,41 \pm 0,35	24,81 \pm 1,77
Tbut	3,75 \pm 0,32	22,66 \pm 1,26
- γ -glutamyl transpeptidase	5,85 \pm 0,87	4,65 \pm 1,10
- glucose-6-P-déshydrogénase	947,29 \pm 34,11	47,67 \pm 3,52

Tableau 8 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les fractions cytosoliques et/ou microsomiales de cellules P-388 et L-1210, cellules leucémiques sensibles et résistantes à l'adriamycine.

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules ou par mg de protéines) représentent la moyenne \pm SEM de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

Les abréviations sont : CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle.

Enzymes	Lignées cellulaires			
	P-388 / S	P-388 / R	L-1210 / S	L-1210 / R
-GSH				
par million de cellules	3030 \pm 284	3607 \pm 180	3625 \pm 218	3877 \pm 119
par mg de protéines	61837 \pm 5796	85881 \pm 4286	77128 \pm 4635	77501 \pm 2379
-GSSG				
par million de cellules	137 \pm 12	152 \pm 6	118 \pm 51	155 \pm 24
par mg de protéines	2796 \pm 262	3619 \pm 181	2511 \pm 1123	3100 \pm 480
- glutathion réductase	74,67 \pm 4,64	64,26 \pm 4,04	124,25 \pm 6,70	59,84 \pm 2,16
- glutathion transférases				
CDNB	74,39 \pm 2,36	84,64 \pm 3,50	110,64 \pm 2,92	36,70 \pm 1,51
ECA	4,98 \pm 0,41	7,38 \pm 0,41	15,57 \pm 1,22	7,68 \pm 0,63
- glutathion peroxydases				
COOP	29,48 \pm 1,50	40,38 \pm 2,00	23,38 \pm 1,25	19,05 \pm 1,36
Tbut	25,45 \pm 1,37	40,56 \pm 1,35	22,52 \pm 1,35	14,33 \pm 1,36
- γ -glutamyl transpeptidase	24,68 \pm 0,42	3,16 \pm 0,24	2,40 \pm 0,26	3,43 \pm 0,46
- glucose-6-P déshydrogénase	25,51 \pm 1,63	44,92 \pm 1,87	51,69 \pm 1,86	41,30 \pm 1,60

.3.2. Chimiorésistance au cis-platine

Les cellules L-1210 résistantes au cis-platine montrent une augmentation de leur activité glutathion réductase, glutathion transférase isoenzyme de type π et γ -glutamyl-transpeptidase. L'évaluation de leur activité se fait par rapport aux cellules L-1210 *ex vivo* qui représentent le témoin réel. Par contre, dans les NIH 3T3 résistantes, les activités glutathion réductase et transférases décroissent alors que les glutathion peroxydases augmentent.

Comme pour l'adriamycine, les modifications observées ne permettent pas d'établir une corrélation entre l'indice de résistance et le degré de modification de l'activité enzymatique. Les cellules L-1210/5 mg représentent une situation plus proche du niveau physiologique parce qu'*in vivo*, la résistance au cis-platine est assez faible.

Tableau 9 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les fractions cytosoliques et/ou microsomiales de cellules L-1210 sensibles et résistantes au cis-platine.

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules ou par mg de protéines) représentent la moyenne \pm SEM de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

Les abréviations sont : CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle.

	L-1210 <i>vitro</i>	L-1210 <i>ex vivo</i>	L1210/5 mg	L1210/8mg
-GSH				
par million de cellules	3261 \pm 351	3464 \pm 323	3696 \pm 181	5226 \pm 475
par mg de protéines	75854 \pm 8160	68867 \pm 6420	67237 \pm 3293	69481 \pm 6315
-GSSG				
par million de cellules	126 \pm 34	125 \pm 58	151 \pm 35	200 \pm 87
par mg de protéines	2931 \pm 790	2485 \pm 1150	2747 \pm 626	2659 \pm 1140
- glutathion réductase	124,25 \pm 6,70	71,60 \pm 2,45	90,27 \pm 2,06	98,62 \pm 5,62
- glutathion transférases				
CDNB	110,64 \pm 2,92	55,86 \pm 2,18	52,95 \pm 1,63	49,48 \pm 1,33
ECA	15,57 \pm 0,81	7,38 \pm 0,27	33,92 \pm 2,33	14,40 \pm 0,55
- glutathion peroxydases				
COOP	23,38 \pm 1,25	21,69 \pm 2,74	17,64 \pm 0,68	20,24 \pm 1,47
Tbut	22,52 \pm 1,35	22,71 \pm 4,71	18,93 \pm 0,97	18,97 \pm 1,48
- γ -glutamyl transpeptidase	2,40 \pm 0,26	3,61 \pm 0,42	5,80 \pm 0,41	4,46 \pm 0,26
-glucose-6-P déshydrogénase	51,69 \pm 1,86	38,54 \pm 1,38	34,07 \pm 1,39	47,04 \pm 1,50

Tableau 10 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les fractions cytosoliques et/ou microsomiales de cellules sensibles (NIH 3T3) et résistantes au cis-platine (NIH 3T3 transfectées par ras).

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules ou par mg de protéines) représentent la moyenne \pm SEM de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

Les abréviations sont : CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle.

	NIH 3T3	NIH 3T3 <i>ras</i>
-GSH		
par million de cellules	4473 \pm 419	4723 \pm 337
par mg de protéines	51642 \pm 4837	21070 \pm 1503
-GSSG		
par million de cellules	121 \pm 24	171 \pm 16
par mg de protéines	1397 \pm 277	763 \pm 72
- glutathion réductase	58,12 \pm 2,78	46,74 \pm 2,19
- glutathion transférases		
CDNB	68,55 \pm 4,12	39,46 \pm 1,22
ECA	7,45 \pm 0,36	5,22 \pm 0,64
- glutathion peroxydases		
COOP	4,13 \pm 0,14	12,69 \pm 0,48
Tbut	2,68 \pm 0,25	13,53 \pm 0,84
- γ -glutamyl transpeptidase	4,17 \pm 0,37	4,48 \pm 0,19
- glucose-6-P-déshydrogénase	56,35 \pm 1,78	59,58 \pm 1,95

1.4. ACTIVITE TOPOISOMERASE II

L'activité topoisomérase II (mesurée par le pourcentage de décaténation de [³H]ADN de kinétoplaste : voir Section METHODOLOGIE) a été étudiée dans les diverses lignées mentionnées précédemment, résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine. Les Figures 16 et 17 illustrent la différence d'activité pouvant exister entre cellules sensibles et résistantes.

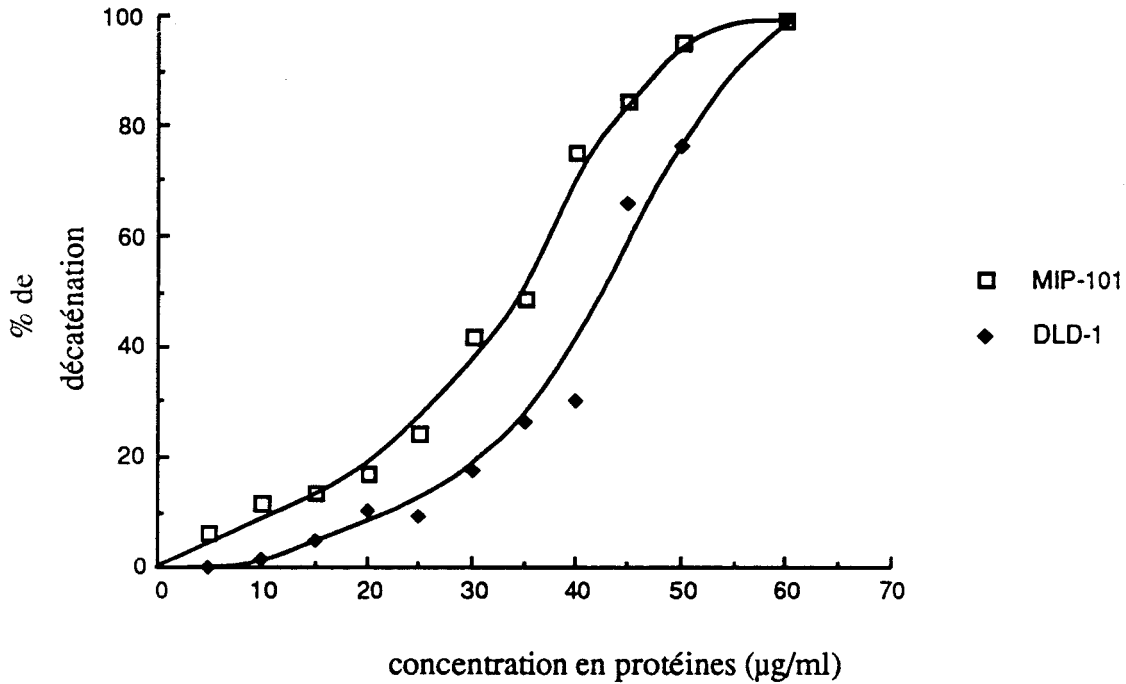


Figure 16 : Activité topoisomérase II mesurée dans les cellules MIP-101 et DLD-1. Cette Figure est représentative du rapport d'activité entre cellules sensibles et résistantes lors de 3 expériences consécutives.

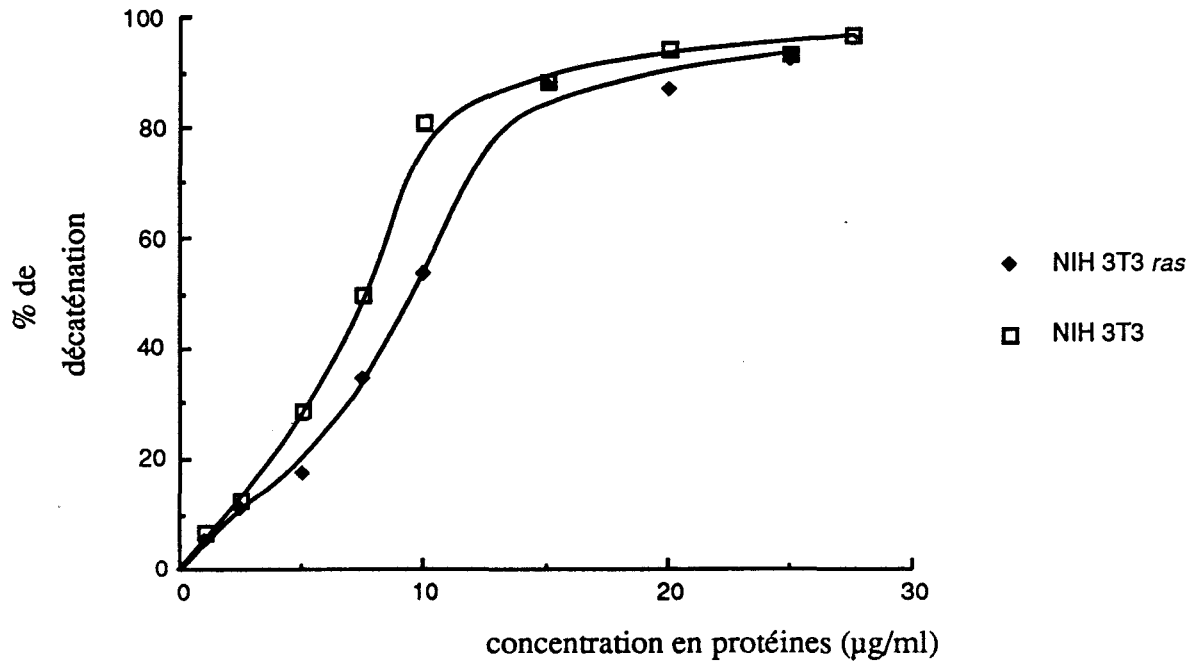


Figure 17 : Activité topoisomérase II mesurée dans les cellules NIH 3T3. Cette Figure est représentative du rapport d'activité entre cellules sensibles et résistantes lors de 3 expériences consécutives.

Sans prendre en compte les variations entre cellules sensibles et résistantes, les MIP-101 possèdent une activité topoisomérase très faible ($\pm 0,077$ U/ μ g de protéines) comparativement aux autres lignées cellulaires résistantes à l'adriamycine telles que les MCF-7 ($\pm 0,276$ U/ μ g de protéines), les P-388 ($\pm 0,608$ U/ μ g de protéines) et les L-1210 ($\pm 0,146$ U/ μ g de protéines). Pour les cellules résistantes au cis-platine, ce sont les NIH 3T3 qui sont les cellules les plus riches en topoisomérase II ($\pm 0,430$ U/ μ g de protéines) comparativement aux L-1210/8 mg ($\pm 0,288$ U/ μ g de protéines).

Dans le tableau 11 se trouve résumé le rapport d'activité de la topoisomérase II des cellules résistantes/cellules sensibles à l'adriamycine ou au cis-platine.

Tableau 11 : Rapport d'activité topoisomérase II cellules résistantes/cellules sensibles. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences.

Type de lignée cellulaire	Rapport d'activité topoisomérase II R/S
MIP-101 / DLD-1	1,18 \pm 0,04
MCF-7 / Adriamycine	0,84 \pm 0,01
P-388 / Adriamycine	1,02 \pm 0,03
L-1210 / Adriamycine	0,75 \pm 0,06
NIH 3T3 / Cis-platine	0,77 \pm 0,00
L-1210 5 mg / Cis-platine	1,00 \pm 0,00
L-1210 8 mg / Cis-platine	1,46 \pm 0,04

Ce tableau nous indique que ce sont les cellules MIP-101, cellules résistantes *de novo* à l'adriamycine, et les cellules L-1210/8 mg, résistantes au cis-platine, qui possèdent une activité topoisomérase II supérieure par rapport à leur équivalent sensible. Les P-388, comme pour les activités du métabolisme du glutathion, ne réagissent pas d'une manière similaire à leur homologue murin, les L-1210. Ainsi, l'activité topoisomérase II dans les cellules résistantes à l'adriamycine, toutes lignées confondues, s'avère inférieure ou égale à 1 par rapport à celle observée dans les cellules sensibles.

Les cellules résistantes au cis-platine réagissent toutes d'une manière différente mais l'on pourrait être tenté d'établir une corrélation entre l'indice de résistance des cellules et leur degré d'activité topoisomérase II. Les L-1210/8 mg, cellules présentant l'indice de résistance au cis-platine le plus élevé, possèdent l'activité topoisomérase II la plus haute.

1.5. MESURE DU TAUX DE CALCIUM ET D'AMPc DANS LES CELLULES MCF-7 SENSIBLES ET RESISTANTES A L'ADRIAMYCINE

Les résultats concernant les taux de calcium et d'AMPc sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Taux de calcium et d'AMPc dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine. Les valeurs de calcium représentent la médiane d'un nombre minimum de 35 données et celles d'AMPc sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences, chacune ayant été effectuée en double.

	MCF-7/S	MCF-7/R
Taux de calcium (nM)	105	184
Taux d'AMPc (pmoles/mg de protéines)	112	19

Le taux de calcium s'avère supérieur dans les cellules MCF-7 résistantes à l'adriamycine et celui de l'AMPc, par contre, montre une diminution très importante dans ces mêmes cellules. L'intérêt de l'étude de ces deux paramètres réside dans leur modification éventuelle au cours d'essais de réversion de la chimiorésistance afin de déterminer l'importance de ceux-ci.

2. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE

L'étude de l'effet de différents chimiosensibilisateurs (le vérapamil, la buthionine sulfoximine, la trifluopérazine et le tamoxifène) sur le taux de glutathion et des enzymes apparentées au métabolisme du glutathion a été réalisée dans les mêmes conditions sur trois systèmes cellulaires différents :

- cellules sensibles (DLD-1) et résistantes *de novo* (MIP-101) à l'adriamycine
- cellules sensibles (MCF-7 et P-388) et résistantes (MCF-7 et P-388 résistantes) à l'adriamycine par un mécanisme de résistance acquise.

L'apparition du phénomène de chimiorésistance dans ces deux lignées n'induit pas de modification importante du taux de glutathion mais des variations d'activités enzymatiques diverses (voir Section RESULTATS 1. Caractérisation de lignées cellulaires).

2.1. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE DANS DES CELLULES DE CARCINOME DU COLON (MIP-101 et l'équivalent sensible DLD-1).

L'indice de résistance des cellules MIP-101 est d'environ 10. L'incubation de ces cellules durant 72 heures en présence de vérapamil (10 µg/ml), de buthionine sulfoximine (200 µM), de trifluopérazine (6 µM) ou de tamoxifène (6 µM) conduit à une réversion partielle de la résistance et à un indice de résistance résiduelle de 2, 5, 5 et 4 respectivement pour les chimiosensibilisateurs considérés.

Les taux de base de glutathion (réduit et oxydé) ainsi que les valeurs d'activités enzymatiques dans les cellules MIP-101 et DLD-1 ont été développés précédemment (voir Section RESULTATS / 1. Caractérisation de lignées cellulaires) et ne sont rappelés que pour mémoire (Tableau 13).

2.1.1. EFFET DU VERAPAMIL

Le vérapamil, un antagoniste des canaux calciques, après 72 heures d'incubation dans le milieu de culture, induit une chute importante du taux de glutathion réduit et oxydé tant dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes (valeurs respectives de glutathion réduit de 1195 ± 220 pmoles/million de cellules et 2464 ± 217 comparativement à 3253 ± 14 et 8882 ± 881 pour les DLD-1 et les MIP-101) (Tableau 14). Le rapport MIP-101/DLD-1 diminue d'approximativement 20%. Concernant les activités enzymatiques, le traitement par le vérapamil induit une activité accrue de la glucose-6-phosphate déshydrogénase couplée à une modification similaire de la glutathion réductase. Le rapport MIP-101/DLD-1, exception faite de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, tend à diminuer, ce qui contribue à une réversion du phénomène de chimiorésistance.

2.1.2. EFFET DE LA BUTHIONINE SULFOXIMINE

La buthionine sulfoximine, inhibiteur irréversible de la γ -glutamylcystéine synthétase, à une dose de 200 μ M, induit une déplétion quasi complète du taux de glutathion intracellulaire (supérieure à 95%). Les enzymes les plus affectées sont les glutathion peroxydases, la diminution observée dans les cellules MIP-101 étant de l'ordre de 1,5 (Tableau 15). Cette modification très importante induit un rapport MIP-101/DLD de 1,75 en utilisant l'hydroperoxyde de cumène comme substrat et de 2,03 pour l'hydroperoxyde de *tert*-butyle comparativement à une valeur de 5,32 et 3,42 dans les cellules non traitées. Ces modifications contribuent, comme pour le vérapamil, à une diminution des mécanismes de détoxication de l'adriamycine et à une efficacité accrue de l'anticancéreux.

2.1.3. EFFET DE LA TRIFLUOPERAZINE

La trifluopérazine, antagoniste de la calmoduline, induit une diminution importante du taux de glutathion (valeurs respectives de glutathion réduit de 264 ± 101 pmoles/million de cellules et 1934 ± 373 comparativement à 3253 ± 314 et 8882 ± 881 pour les DLD-1 et MIP-101) mais, cette modification étant plus significative pour les cellules sensibles, le rapport MIP-101/DLD-1, par opposition avec celui obtenu pour la buthionine sulfoximine s'accroît : 7,37 par comparaison à 2,73 (cellules non traitées) et 2,08 (cellules traitées par le vérapamil) (Tableau 16). Les activités glutathion réductase et glutathion-S-transférase isoenzyme de type π sont accrues dans les cellules MIP-101 (facteur 2). En raison des modifications d'activités enzymatiques observées dans les cellules DLD-1, le rapport MIP-101/DLD-1 est

particulièrement diminué pour les activités glutathion peroxydases. Ces résultats convergent avec ceux obtenus précédemment indiquant une tendance à la réversion de la chimiorésistance.

2.1.4. *EFFET DU TAMOXIFENE*

Le tamoxifène induit une diminution de glutathion réduit plus significative dans les cellules résistantes (valeurs respectives de glutathion réduit de 2363 ± 512 pmoles/million de cellules et 3951 ± 591 comparativement à 3253 ± 314 et 8882 ± 88 pour les DLD-1 et les MIP-101) conduisant à un rapport MIP-101/DLD-1 de 1,68 par référence au rapport de 2,73 pour les cellules non traitées (Tableau 17). L'activité glutathion réductase dans les cellules MIP-101 est particulièrement diminuée, induisant un rapport de cellules résistantes/sensibles de 0,57. En raison des modifications d'activité des glutathion peroxydases dans les cellules DLD-1, ce rapport décroît également contribuant à la réversion du phénomène de chimiorésistance à l'adriamycine.

Effet des chimiosensibilisateurs sur l'expression de la glycoprotéine P

Les cellules MIP-101 et DLD-1 ont été incubées avec les quatre chimiosensibilisateurs décrits précédemment dans les mêmes conditions. La glycoprotéine P, exprimée faiblement dans les cellules DLD-1 et de manière très importante dans les cellules MIP-101, ne subit aucune modification de son expression quel que soit le traitement imposé (données non montrées).

Tableau 13 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les cellules DLD-1 et MIP-101. Dans la dernière colonne est représenté le rapport des activités entre cellules résistantes de novo (MIP-101) et sensibles (DLD-1) à l'adriamycine.

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules) représentent la moyenne \pm SEM de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques (GSR : glutathion réductase, GST : glutathion transférases, CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, GPX : glutathion peroxydases, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle, γ -GT : γ -glutamyl transpeptidase et G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase) ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	DLD-1	MIP-101	Rapport MIP/DLD
Glutathion			
GSH	3253 \pm 314	8882 \pm 881	2,73
GSSG	338 \pm 112	450 \pm 120	1,33
GSR	26,67 \pm 0,98	53,55 \pm 1,85	2,01
GST			
CDNB	145,81 \pm 3,24	92,93 \pm 1,00	0,64
ECA	12,73 \pm 1,07	10,94 \pm 1,01	0,86
GPX			
COOP	0,96 \pm 0,10	5,11 \pm 0,39	5,32
Tbut	1,69 \pm 0,24	5,78 \pm 0,77	3,42
γ -GT	59,28 \pm 2,51	11,59 \pm 0,56	0,19
G-6-PDH	114,77 \pm 5,72	171,33 \pm 7,03	1,49

Tableau 14 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MIP-101 et DLD-1 en présence de 10 µg/ml de vérapamil (vérap).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MIP-101 ou DLD-1) ou non traitées (MIP-101) et l'activité des DLD-1 non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MIP-101) et sensibles (DLD-1) traitées par le vérapamil.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	DLD-1	MIP-101	DLD-1/ vérap	MIP-101/ vérap	MIP- vérap/ DLD-vérap
Glutathion					
GSH	1	2,73	0,36	0,75	2,08
GSSG	1	1,33	1,29	0,89	0,69
GSR	1	2,01	2,25	3,35	1,49
GST					
CDNB	1	0,64	1,26	0,82	0,65
ECA	1	0,86	1,14	0,48	0,42
GPX					
COOP	1	5,32	2,98	5,27	1,77
Tbut	1	3,42	1,43	4,96	3,47
γ-GT	1	0,19	1,20	0,18	0,15
G-6-PDH	1	1,49	1,32	3,56	2,70

Tableau 15 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MIP-101 et DLD-1 en présence de 200 μ M de buthionine sulfoximine (BSO).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MIP-101 ou DLD-1) ou non traitées (MIP-101) et l'activité des DLD-1 non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MIP-101) et sensibles (DLD-1) traitées par la BSO. Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	DLD-1	MIP-101	DLD-1/BSO	MIP-101/ BSO	MIP-BSO/ DLD-BSO
Glutathion					
GSH	1	2,73	/	/	/
GSSG	1	1,33	/	/	/
GSR	1	2,01	2,61	3,22	1,23
GST					
CDNB	1	0,64	1,54	0,64	0,42
ECA	1	0,86	1,21	0,72	0,60
GPX					
COOP	1	5,32	1,99	3,49	1,75
Tbut	1	3,42	1,15	2,33	2,03
γ -GT	1	0,19	1,17	0,15	0,13
G-6-PDH	1	1,49	1,72	1,89	1,10

Tableau 16 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MIP-101 et DLD-1 en présence de 6 μ M de trifluopérazine (trifluo).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MIP-101 ou DLD-1) ou non traitées (MIP-101) et l'activité des DLD-1 non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MIP-101) et sensibles (DLD-1) traitées par la trifluopérazine.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	DLD-1	MIP-101	DLD-1/ trifluo	MIP-101/ trifluo	MIP- trifluo/ DLD-trifluo
Glutathion					
GSH	1	2,73	0,08	0,59	7,37
GSSG	1	1,33	4,50	1,09	0,24
GSR	1	2,01	0,81	1,09	1,35
GST					
CDNB	1	0,64	1,21	0,65	0,54
ECA	1	0,86	0,66	0,39	0,59
GPX					
COOP	1	5,32	4,36	5,08	1,16
Tbut	1	3,42	2,03	2,50	1,23
γ -GT	1	0,19	0,82	0,16	0,19
G-6-PDH	1	1,49	1,32	1,99	1,51

Tableau 17 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MIP-101 et DLD-1 en présence de 6 μ M de tamoxifène (tamox).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MIP-101 ou DLD-1) ou non traitées (MIP-101) et l'activité des DLD-1 non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MIP-101) et sensibles (DLD-1) traitées par le tamoxifène.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	DLD-1	MIP-101	DLD-1/ tamox	MIP-101/ tamox	MIP- tamox/ DLD-tamox
Glutathion					
GSH	1	2,73	0,72	1,21	1,68
GSSG	1	1,33	2,76	1,69	0,61
GSR	1	2,01	1,30	0,74	0,57
GST					
CDNB	1	0,64	1,48	0,67	0,45
ECA	1	0,86	0,53	0,80	1,51
GPX					
COOP	1	5,32	2,97	5,02	1,69
Tbut	1	3,42	1,33	3,25	2,44
γ -GT	1	0,19	1,01	0,14	0,14
G-6-PDH	1	1,49	1,47	1,49	1,01

2.2. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE DANS DES CELLULES DE CARCINOME MAMMAIRE (MCF-7 sensibles et résistantes).

L'incubation des cellules MCF-7 résistantes à l'adriamycine, durant 72 heures, en présence de vérapamil (10 µg/ml), de buthionine sulfoximine (200 µM), de trifluopérazine (4 µM) ou de tamoxifène (3 µM) conduit à une réversion partielle de la chimiorésistance. L'indice de résistance des cellules MCF-7 résistantes à l'adriamycine, initialement de l'ordre de 200, décroît, dans ces conditions, pour atteindre une valeur respectivement de 55, 44, 29 et 18 pour chaque chimiosensibilisateur décrit.

Les activités basales de glutathion et d'enzymes associées au métabolisme du glutathion décrites précédemment (voir Section RESULTATS 1. Caractérisation de lignées cellulaires) sont représentées dans le Tableau 18.

2.2.1. EFFET DU VERAPAMIL

Après 72 heures d'incubation dans les cellules MCF-7, le vérapamil induit une diminution très importante du taux de glutathion dans les cellules résistantes (240 ± 167 pmoles/million de cellules par rapport à 5447 ± 475 pour les cellules non traitées) mais aussi, dans une mesure moindre, dans les cellules sensibles (609 ± 469 par rapport à 6542 ± 575 pour les cellules non traitées) (Tableau 19). Cette diminution du taux de glutathion peut conduire à une efficacité supérieure de l'adriamycine par inhibition partielle des mécanismes de détoxication. Durant une période d'incubation inférieure à 72 heures, des études de cinétique nous ont permis de mettre en évidence que le taux de GSH diminue lentement alors que celui de GSSG, après une phase d'augmentation, décroît par la suite (Figure 18 A et B). Le traitement par le vérapamil pourrait favoriser l'oxydation du glutathion GSH en GSSG ou bloquer le recyclage du GSSG en GSH. L'activité glutathion réductase s'avère, par ailleurs, inférieure dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes. Les enzymes les plus modifiées par le traitement avec le vérapamil sont les glutathion peroxydases particulièrement diminuées dans les cellules résistantes conduisant à un rapport MCF-7 résistantes/MCF-7 sensibles de 1,24 (hydroperoxyde de cumène comme substrat) et de 1,15 (substrat utilisé : hydroperoxyde de *tert*-butyle) comparativement à 10,29 et 6,04 pour les cellules non traitées.

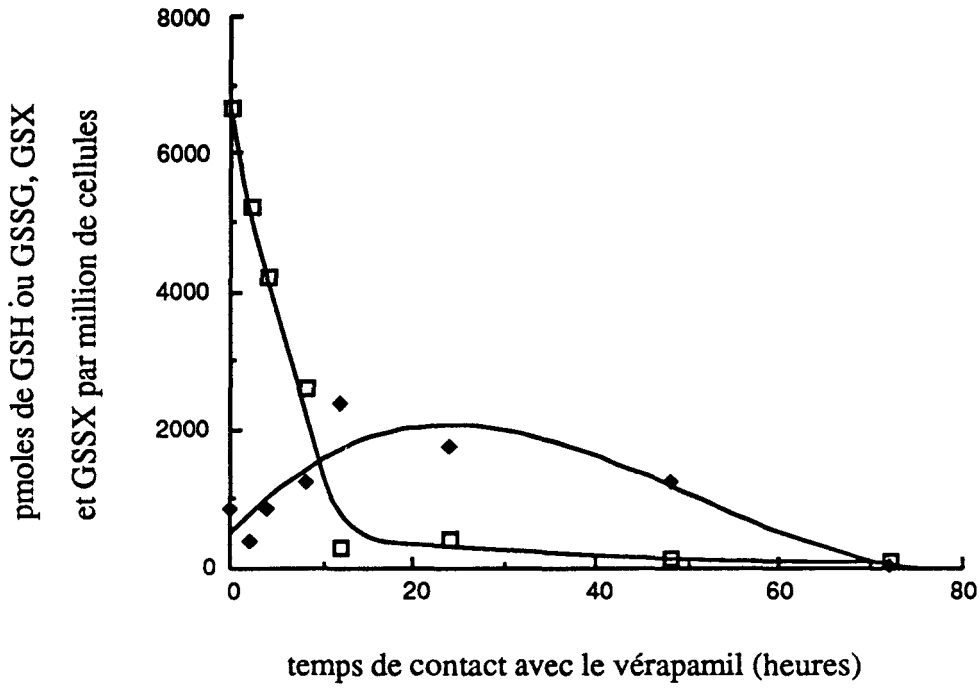


Figure 18 A : Evolution du taux de GSH (\square) ou de GSSG, GSX et GSSX (\blacklozenge) en fonction du temps d'incubation de cellules MCF-7 résistantes avec le vérapamil.

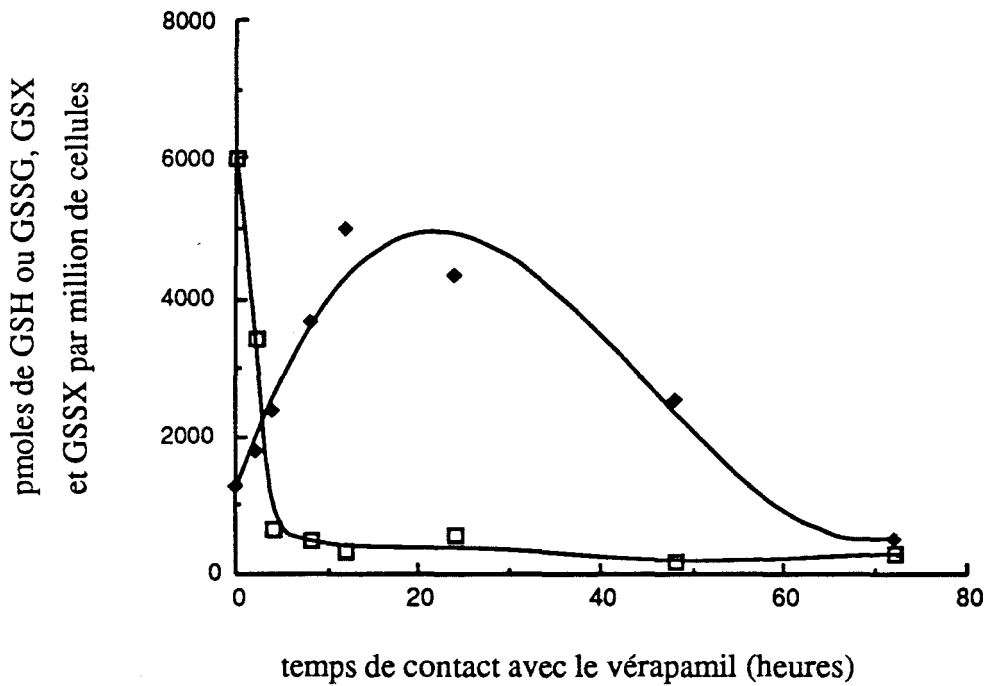


Figure 18 B : Evolution du taux de GSH (\square) ou de GSSG, GSX et GSSX (\blacklozenge) en fonction du temps d'incubation de cellules MCF-7 sensibles avec le vérapamil.

2.2.2. EFFET DE LA BUTHIONINE SULFOXIMINE

La BSO induit une chute drastique du taux de glutathion, déplétion beaucoup plus efficace et plus rapide dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes. Le temps d'exposition à la BSO fixée dans cette expérience permet de réduire le taux de glutathion d'environ 95 %. Dans ces conditions, les glutathion peroxydases sont, comme lors du traitement avec le vérapamil, déplétées dans les cellules résistantes (Tableau 20). Ainsi, le rapport d'activité glutathion peroxydase MCF-7 résistantes/MCF-7 sensibles, encore plus faible lors du traitement avec le vérapamil, est un mécanisme pouvant expliquer une diminution des mécanismes de détoxification.

2.2.3. EFFET DE LA TRIFLUOPERAZINE

Des quatre chimiosensibilisateurs testés, la trifluopérazine est celui qui produit la diminution la plus faible du taux de glutathion (de l'ordre de 20%), que les cellules soient sensibles ou chimiorésistantes. Le taux de glutathion oxydé s'avère aussi élevé que lors du traitement avec le tamoxifène (1013 ± 650 pmoles/million de cellules et 1265 ± 325 pour les cellules MCF-7 sensibles et résistantes) mais vu la valeur très élevée de glutathion réduit (5494 ± 223 et 4253 ± 576 dans les mêmes conditions), le rapport GSH/GSSG reste supérieur à 1. La glutathion réductase diminue mais aussi bien dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes (Tableau 21). Les seules enzymes affectées de façon importante sont les glutathion peroxydases conduisant à un rapport MCF-7 résistantes/MCF-7 sensibles de 3,49 (hydroperoxyde de cumène utilisé comme substrat) et de 2,20 (hydroperoxyde de *tert*-butyle) comparativement à 10,29 et 6,04 pour les cellules non traitées.

2.2.4. EFFET DU TAMOXIFENE

Le tamoxifène produit une diminution très importante du taux de glutathion (valeurs respectives de 327 ± 185 pmoles/million de cellules et 368 ± 182 comparativement à 6542 ± 575 et 5447 ± 475 pour les cellules MCF-7 sensibles et MCF-7 résistantes). Cette diminution du taux de glutathion associée à un accroissement important du glutathion oxydé (1101 ± 627 et 1020 ± 551 par rapport à 194 ± 86 et 178 ± 79 respectivement pour les cellules MCF-7 sensibles et résistantes) conduit à un rapport de glutathion réduit/glutathion oxydé inférieur à 1, valeur critique concernant l'homéostasie cellulaire. L'activité glutathion réductase s'avère légèrement inférieure dans les cellules non traitées mais ne reflète pas la modification du taux de glutathion oxydé (Tableau 22). Les enzymes affectées par le traitement au tamoxifène sont la glutathion

transférase isoenzyme de type π et les glutathion peroxydases, enzymes intervenant dans le mécanisme d'action de l'adriamycine.

Effet des chimiosensibilisateurs sur l'expression de la glycoprotéine P

L'expression de la glycoprotéine P a également été étudiée dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine traitées ou non par le vérapamil, la buthionine sulfoximine, la trifluopérazine et le tamoxifène dans les conditions précédemment citées.

La Figure 19 reprend les données obtenues pour les cellules MCF-7 sensibles et résistantes non traitées. Les Figures 20 à 23 correspondent aux cellules traitées respectivement par le vérapamil, la buthionine sulfoximine, la trifluopérazine et le tamoxifène. On peut observer que les divers traitements n'affectent en aucune manière l'expression de la glycoprotéine P dans ces cellules. La glycoprotéine P apparaît toujours dans les cellules résistantes et ce, sous forme d'un fin liseré membranaire.

Tableau 18 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine. Dans la dernière colonne est représenté le rapport des activités entre cellules MCF-7 résistantes et MCF-7 sensibles.

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules) représentent la moyenne \pm SEM de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques (GSR : glutathion réductase, GST : glutathion transférases, CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, GPX : glutathion peroxydases, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle, γ -GT : γ -glutamyl transpeptidase et G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase) ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	MCF-7/S	MCF-7/R	Rapport MCF-7 résist/ MCF-7 sens
Glutathion			
GSH	6542 \pm 575	5447 \pm 475	0,83
GSSG	194 \pm 86	178 \pm 79	0,92
GSR	197,61 \pm 8,36	41,96 \pm 1,55	0,21
GST			
CDNB	20,00 \pm 5,58	256,15 \pm 11,28	12,81
ECA	2,23 \pm 0,15	11,47 \pm 0,47	5,14
GPX			
COOP	2,41 \pm 0,35	24,81 \pm 1,77	10,29
Tbut	3,75 \pm 0,32	22,66 \pm 1,26	6,04
γ -GT	5,85 \pm 0,87	4,65 \pm 1,10	0,79
G-6-PDH	947,29 \pm 34,11	47,67 \pm 3,52	0,05

Tableau 19 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 10 µg/ml de vérapamil (vérap).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MCF-7 sensibles ou résistantes) ou non traitées (MCF-7 résistantes) et l'activité des MCF-7 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MCF-7/R) et sensibles (MCF-7/S) traitées par le vérapamil.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	MCF-7/S	MCF-7/R	MCF-7/S/ vérap	MCF-7/R/ vérap	résist- vérap/ sens-vérap
Glutathion					
GSH	1	0,83	0,09	0,04	0,44
GSSG	1	0,92	1,97	0,19	0,10
GSR	1	0,21	0,21	0,08	0,38
GST					
CDNB	1	12,81	0,72	8,24	11,44
ECA	1	5,14	0,96	8,04	8,37
GPX					
COOP	1	10,29	1,73	2,14	1,24
Tbut	1	6,04	1,11	1,28	1,15
γ-GT	1	0,79	0,99	0,96	0,97
G-6-PDH	1	0,05	0,88	0,05	0,06

Tableau 20 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 200 μ M de buthionine sulfoximine (BSO).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MCF-7 sensibles ou résistantes) ou non traitées (MCF-7 résistantes) et l'activité des MCF-7 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MCF-7/R) et sensibles (MCF-7/S) traitées par la BSO.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	MCF-7/S	MCF-7/R	MCF-7/S/ BSO	MCF-7/R/ BSO	résist- BSO/ sens-BSO
Glutathion					
GSH	1	0,83	0,02	0,06	3,22
GSSG	1	0,92	/	/	/
GSR	1	0,21	0,31	0,11	0,35
GST					
CDNB	1	12,81	0,72	7,40	10,28
ECA	1	5,14	1,50	9,32	6,21
GPX					
COOP	1	10,29	1,00	3,81	3,81
Tbut	1	6,04	0,94	2,35	2,50
γ -GT	1	0,79	1,24	1,02	0,82
G-6-PDH	1	0,05	1,23	0,06	0,05

Tableau 21 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 4 μ M de trifluopérazine (trifluo).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MCF-7 sensibles ou résistantes) ou non traitées (MCF-7 résistantes) et l'activité des MCF-7 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MCF-7/R) et sensibles (MCF-7/S) traitées par la trifluopérazine.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	MCF-7/S	MCF-7/R	MCF-7/S/ trifluo	MCF-7/R/ trifluo	résist- trifluo/ sens-trifluo
Glutathion					
GSH	1	0,83	0,84	0,65	0,77
GSSG	1	0,92	5,22	6,52	1,25
GSR	1	0,21	0,28	0,12	0,43
GST					
CDNB	1	12,81	0,85	8,39	9,87
ECA	1	5,14	1,49	10,34	6,94
GPX					
COOP	1	10,29	1,07	3,73	3,49
Tbut	1	6,04	0,74	1,63	2,20
γ -GT	1	0,79	0,76	0,89	1,17
G-6-PDH	1	0,05	1,08	0,05	0,05

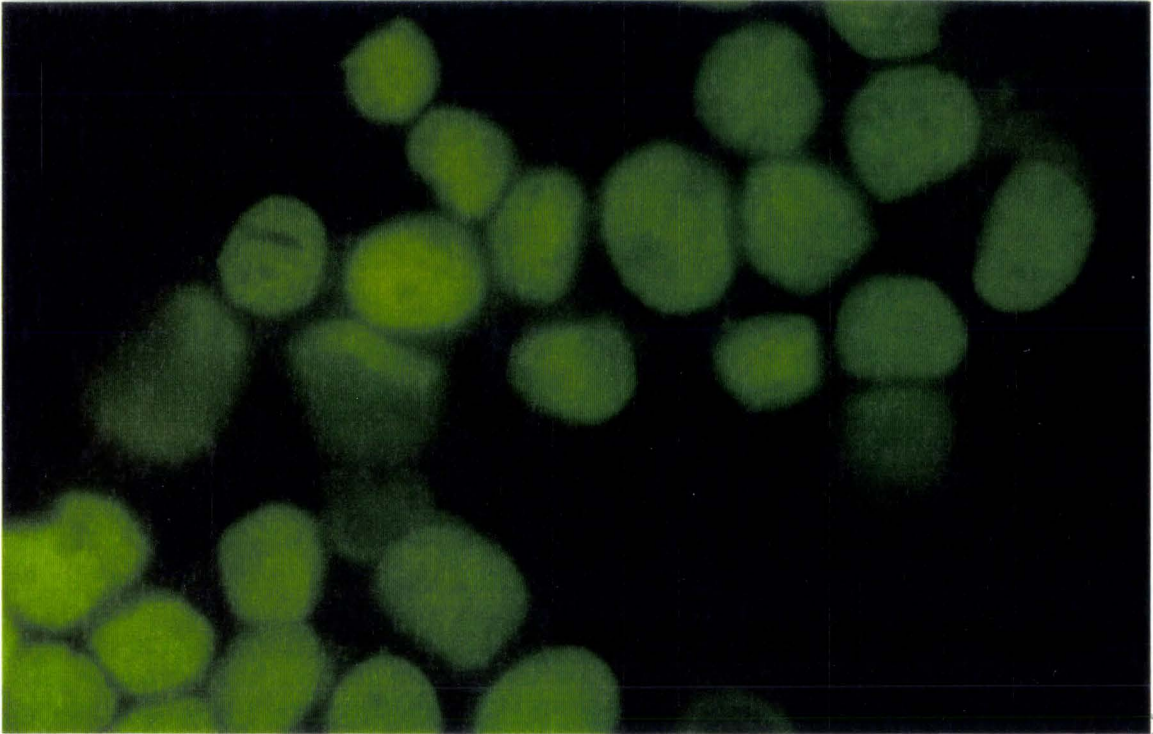
Tableau 22 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 3 μ M de tamoxifène (tamox).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (MCF-7 sensibles ou résistantes) ou non traitées (MCF-7 résistantes) et l'activité des MCF-7 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (MCF-7/R) et sensibles (MCF-7/S) traitées par le tamoxifène.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	MCF-7/S	MCF-7/R	MCF-7/S/ tamox	MCF-7/R/ tamox	résist- tamox/ sens-tamox
Glutathion					
GSH	1	0,83	0,05	0,06	1,20
GSSG	1	0,92	5,67	5,26	0,93
GSR	1	0,21	0,31	0,12	0,39
GST					
CDNB	1	12,81	1,61	11,02	6,84
ECA	1	5,14	2,30	4,58	1,99
GPX					
COOP	1	10,29	1,02	3,93	3,85
Tbut	1	6,04	0,49	2,74	5,59
γ -GT	1	0,79	0,64	1,06	1,66
G-6-PDH	1	0,05	1,12	0,06	0,05

A/



B/

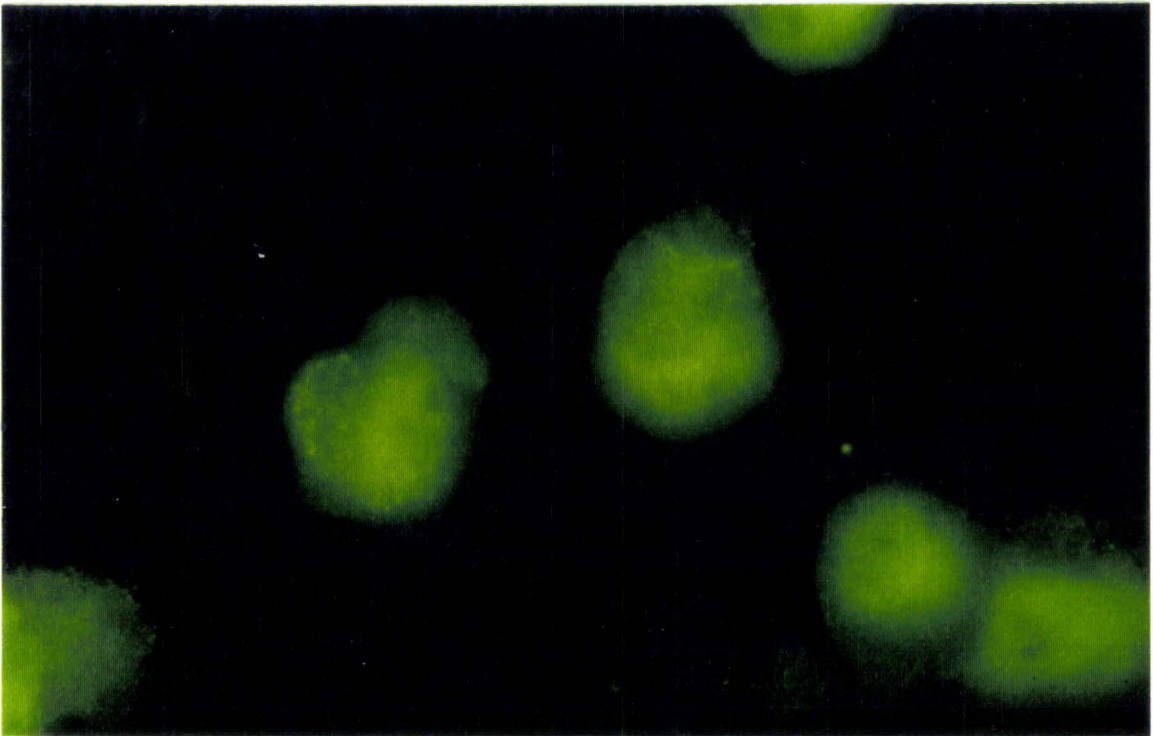
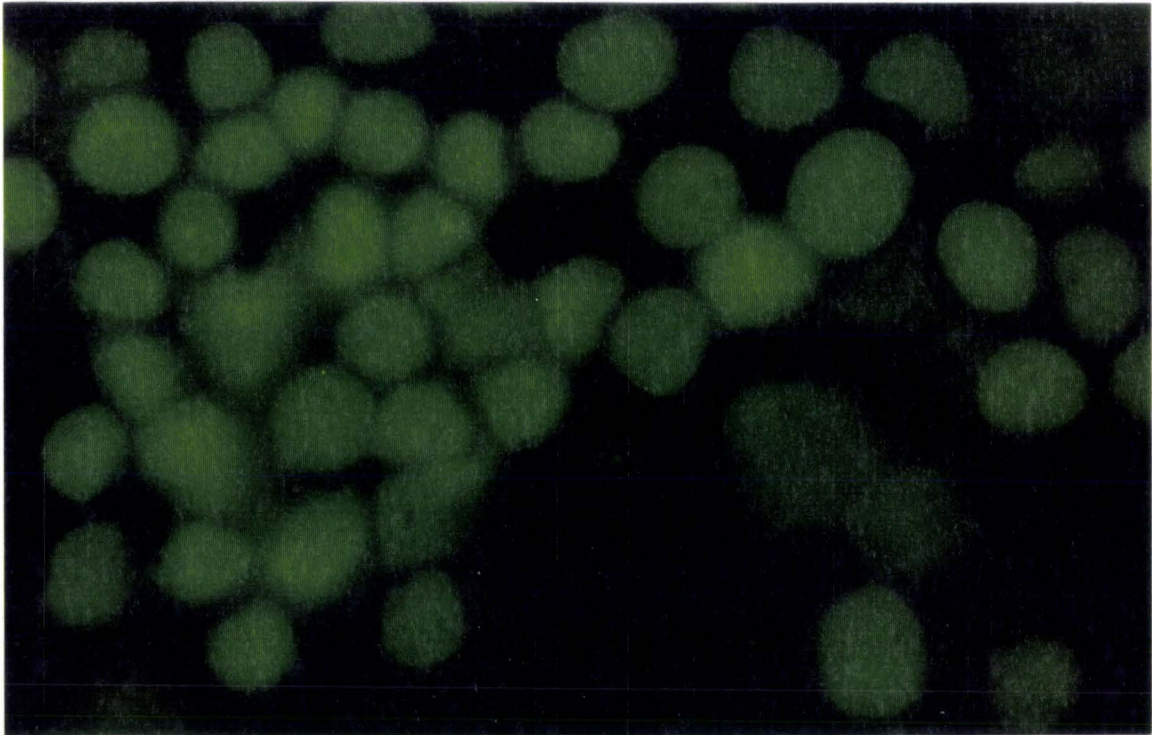


Figure 19 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules MCF-7 sensibles (A) et résistantes (B) à l'adriamycine

A/



B/

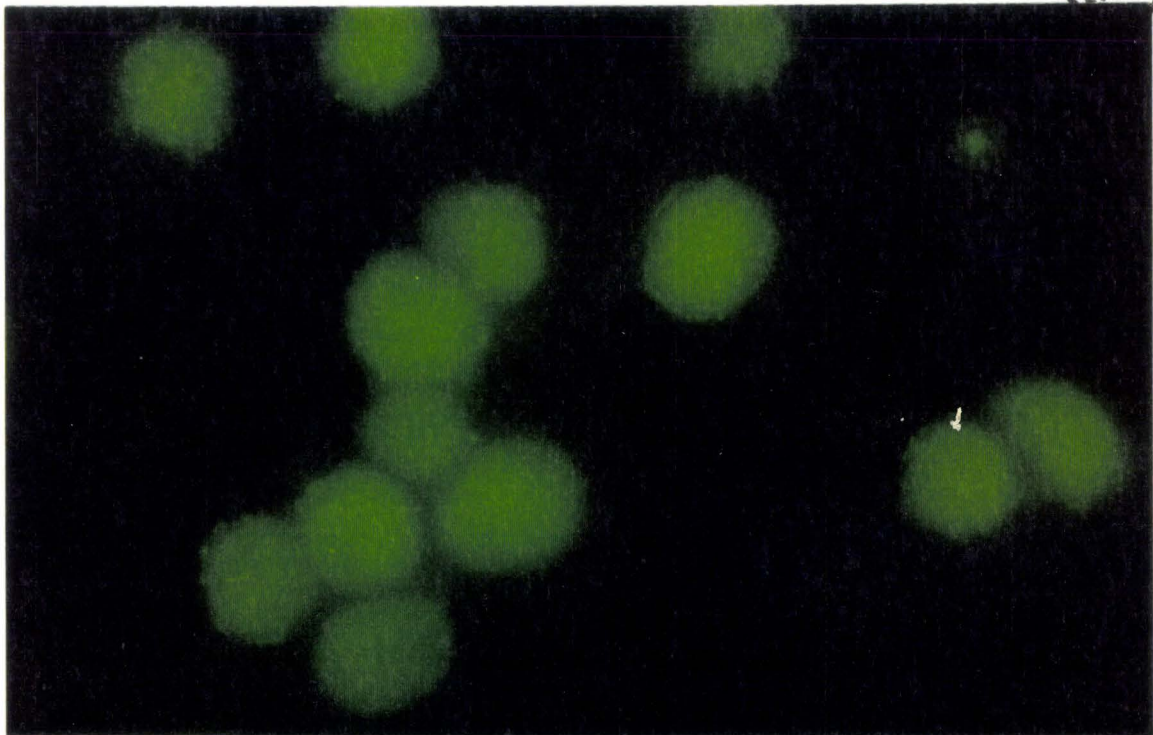
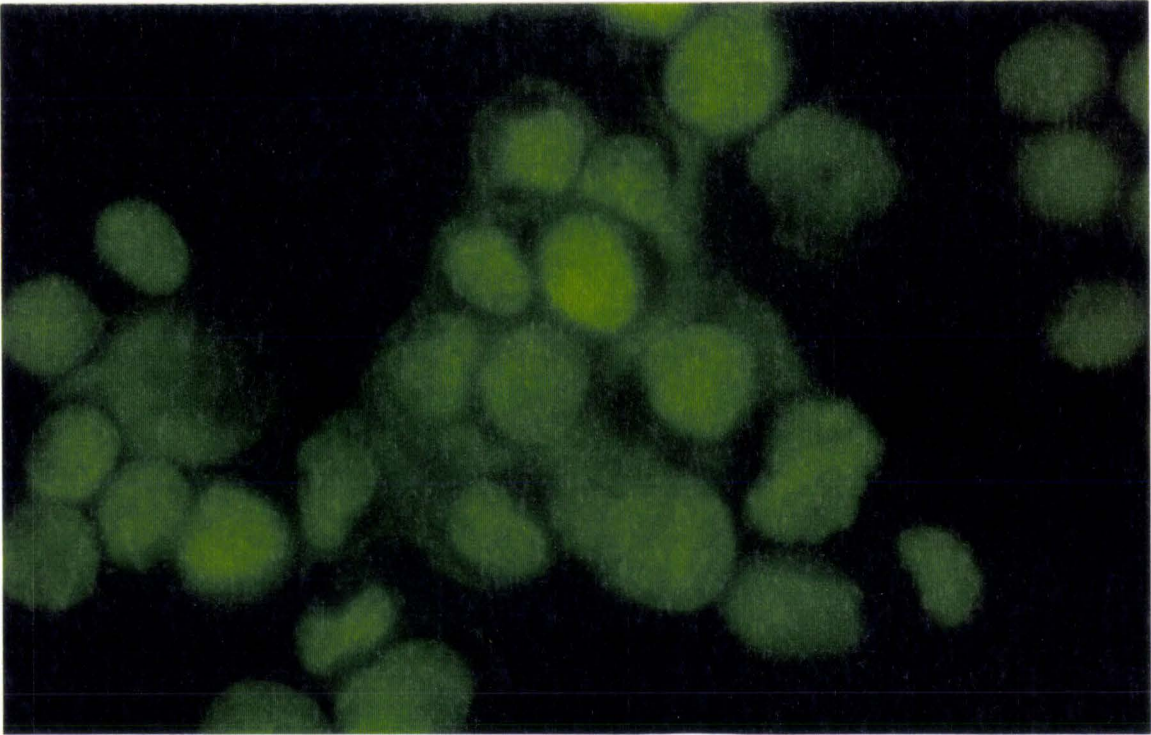


Figure 20 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules MCF-7 sensibles (A) et résistantes (B) à l'adriamycine incubées durant 72 heures en présence de vérapamil (10 $\mu\text{g/ml}$)

A/



B/

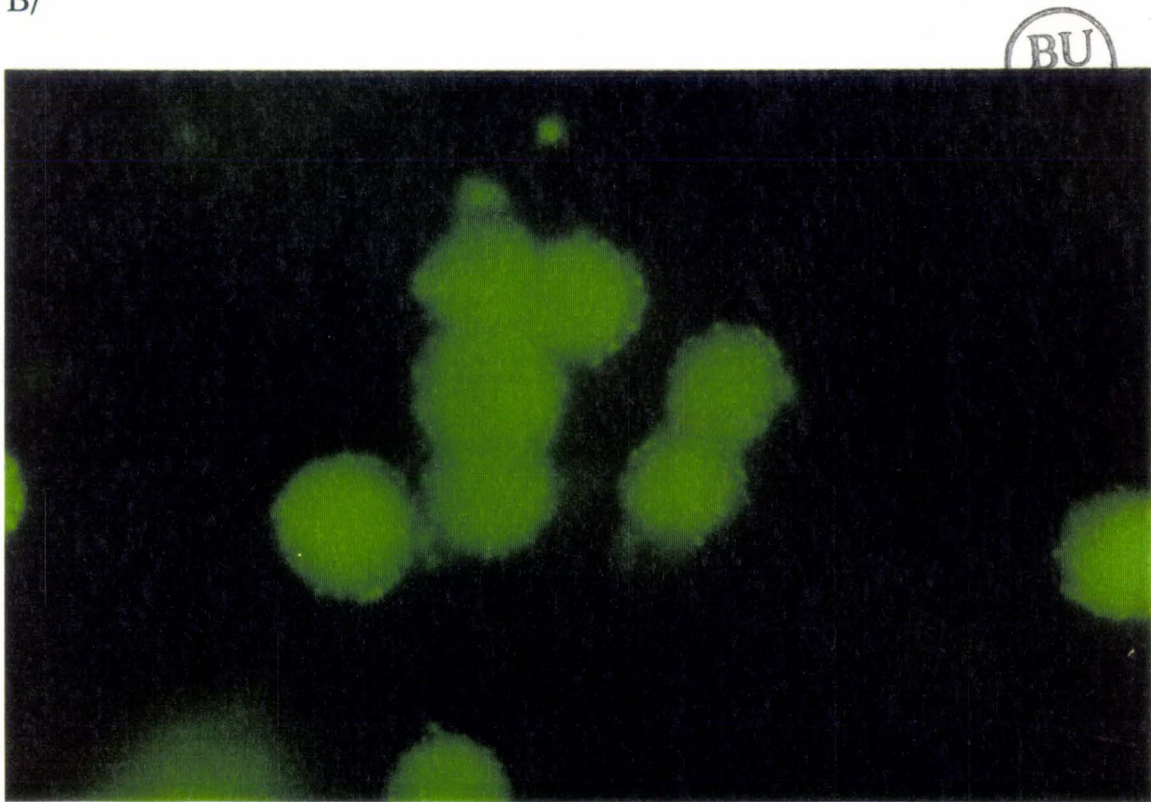
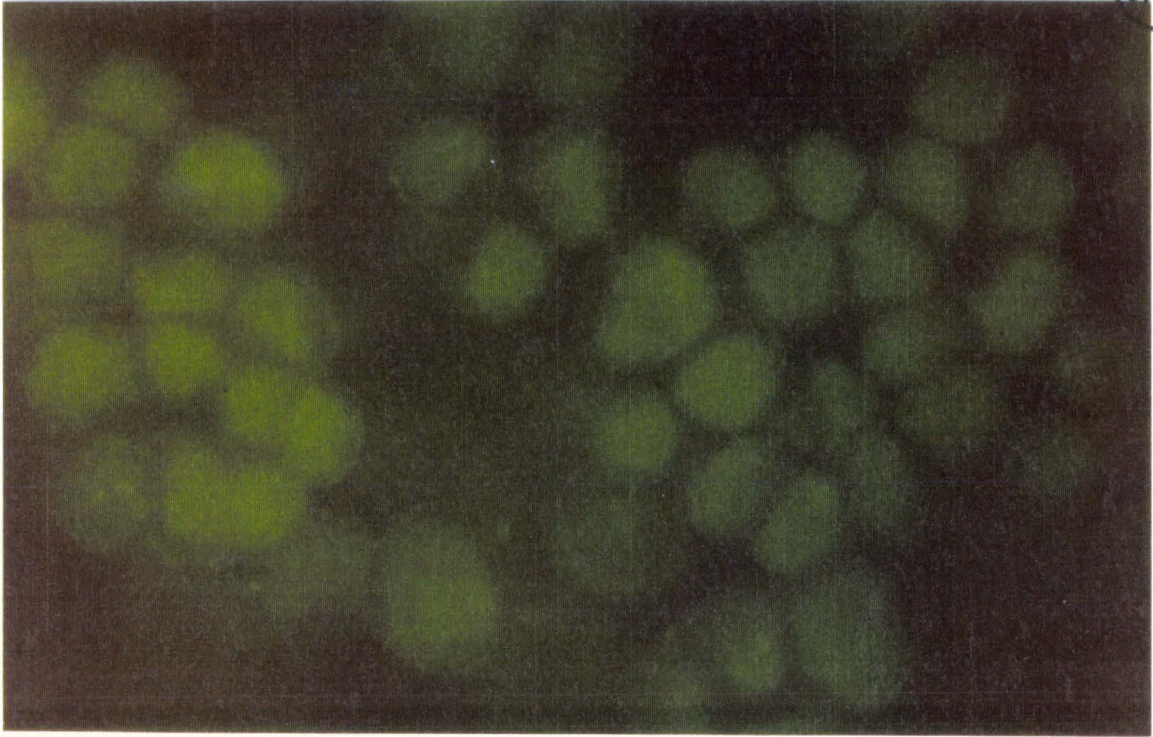


Figure 21 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules MCF-7 sensibles (A) et résistantes (B) à l'adriamycine traitées par la buthionine sulfoximine (200 μ M)

A/



B/

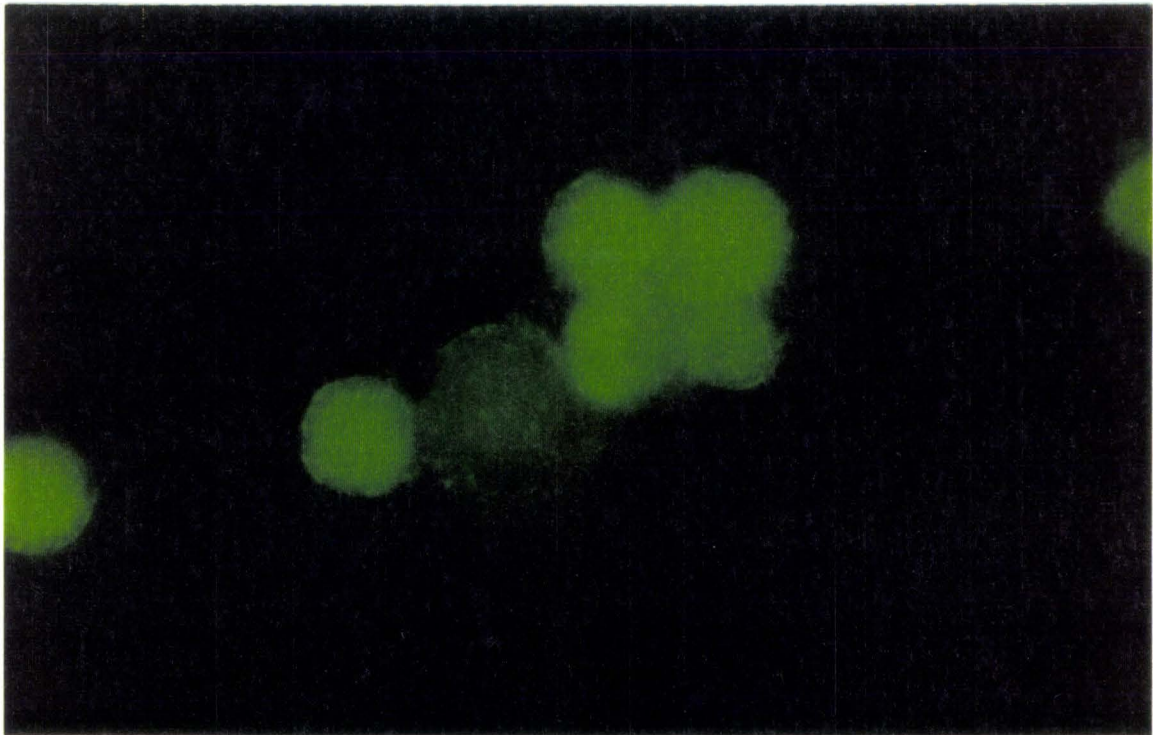
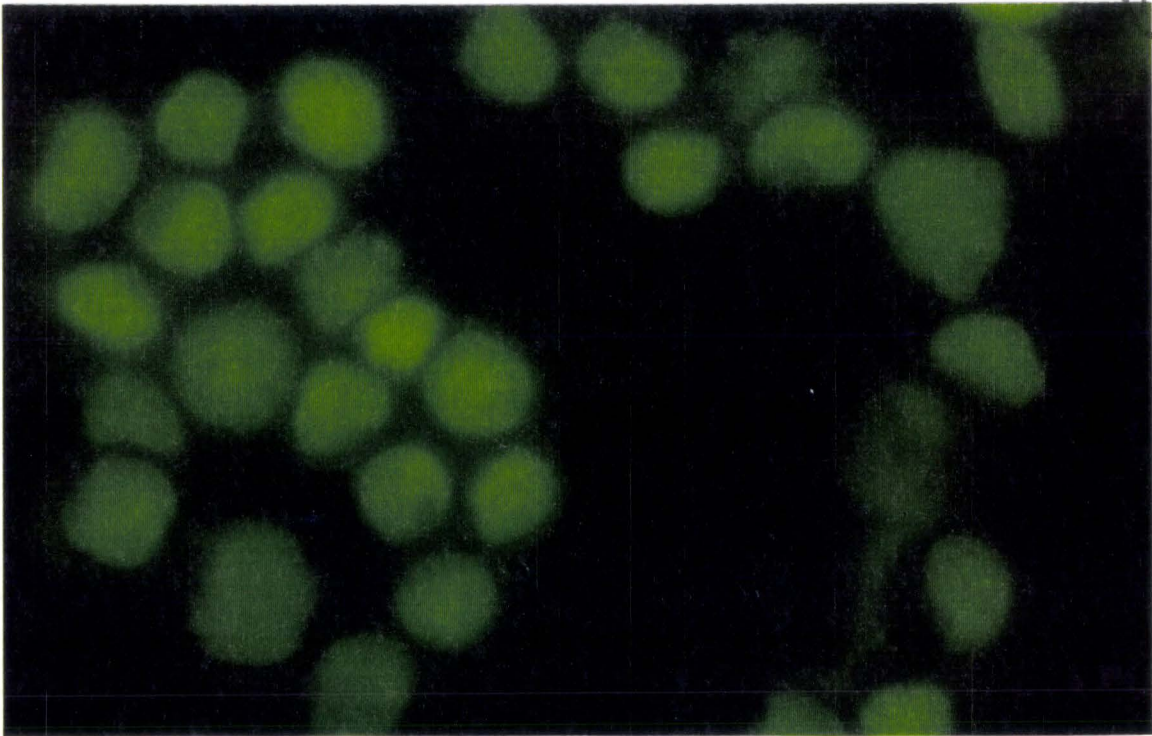


Figure 22 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules MCF-7 sensibles (A) et résistantes (B) à l'adriamycine incubées durant 72 heures en présence de trifluopérazine (4 μ M)

A/



B/

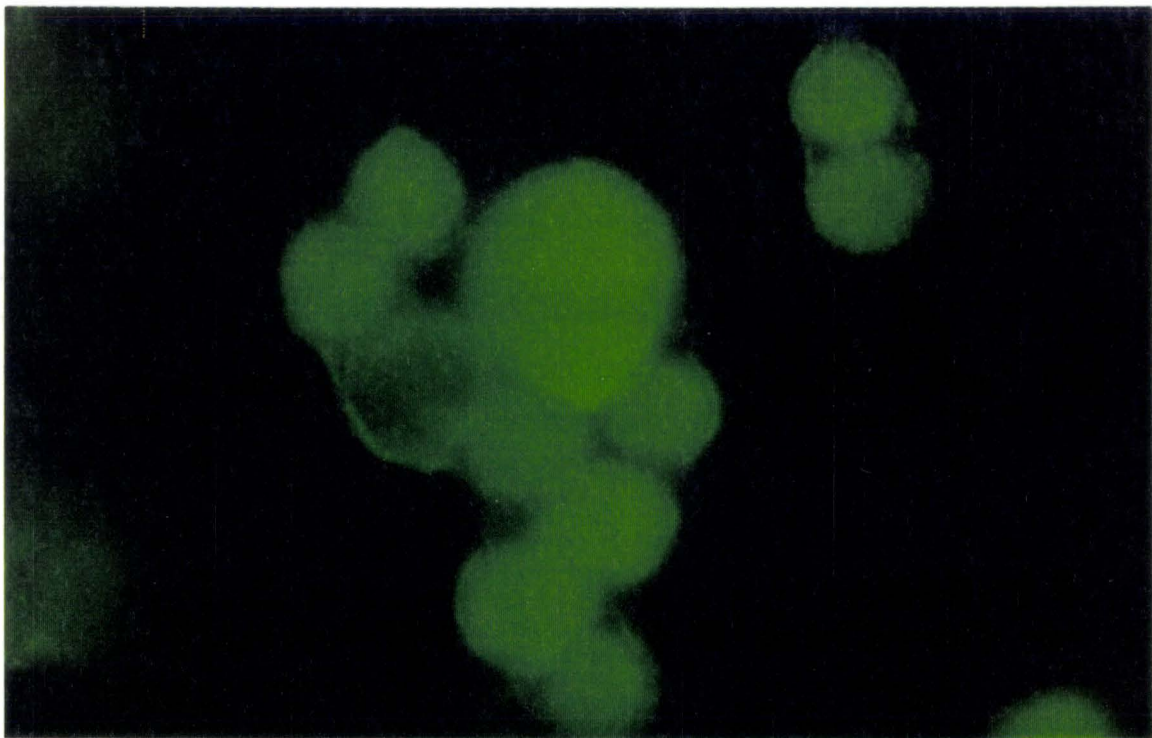


Figure 23 : Expression de la glycoprotéine P dans les cellules MCF-7 sensibles (A) et résistantes (B) à l'adriamycine traitées durant 72 heures par le tamoxifène ($3 \mu\text{M}$)

2.3. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE DANS DES CELLULES DE LEUCEMIE MURINE (P-388 sensibles et résistantes).

Les cellules P-388 résistantes à l'adriamycine ont un facteur de résistance de l'ordre de 95. Incubées en présence de vérapamil (5 µg/ml), de buthionine sulfoximine (10 µM), de trifluopérazine (2 µM) ou de tamoxifène (3 µM) durant 72 heures, leurs indices de résistance deviennent respectivement 45, 12, 45 et 18 en fonction du chimiosensibilisateur testé.

Le taux de glutathion ainsi que les activités enzymatiques associées au métabolisme du glutathion dans les cellules P-388 sensibles et résistantes non traitées sont décrites pour rappel dans le Tableau 23. Pour plus de renseignements, se rapporter à la Section RESULTATS (1. Caractérisation de lignées cellulaires).

2.3.1. EFFET DU VERAPAMIL

Le vérapamil, après 72 heures d'incubation, induit une diminution du taux de glutathion réduit d'environ 50% dans les cellules P-388 résistantes et, pour les cellules sensibles, une chute très importante, le taux résiduel étant inférieur à 5% ; ceci nous conduit à un rapport de GSH P-388 résistantes/P-388 sensibles très élevé (15,87) (Tableau 24). Le taux de glutathion oxydé est également fortement diminué dans les cellules sensibles (51 ± 26 pmoles/million de cellules par rapport à 137 ± 14 dans les cellules P-388 non traitées). La seule enzyme affectée par ce traitement est la glutathion transférase isoenzyme de type π .

Les variations d'activités enzymatiques entre cellules résistantes et cellules sensibles, mise à part celle de la γ -glutamyl-transpeptidase, étant moins significatives avec ce type cellulaire, l'effet des chimiosensibilisateurs s'avère plus difficile à mettre en évidence.

2.3.2. EFFET DE LA BUTHIONINE SULFOXIMINE

La BSO induit, dans les cellules P-388, un effet similaire sur le taux de glutathion réduit que lors du traitement avec le vérapamil à savoir une chute très importante de GSH dans les cellules P-388 sensibles (valeur inférieure à 5 %) et dans une mesure légèrement moindre dans les cellules P-388 résistantes (taux résiduel de l'ordre de 10%, 384 ± 52 pmoles/million de cellules). L'effet exercé par ces deux composés s'avère le même sur le taux de GSH avec un effet supérieur pour la BSO, inhibiteur de la synthèse du glutathion. Le rapport du taux de GSH entre les cellules P-388 résistantes/P-388 sensibles est, de même que pour le vérapamil,

très élevé (12,67 dans ces cellules traitées par rapport à 1,19 pour les non traitées) (Tableau 25).

Aucune enzyme ne s'avère particulièrement affectée par ce traitement quelle que soit la sensibilité de la cellule.

2.3.3. EFFET DE LA TRIFLUOPERAZINE

La trifluopérazine exerce sur les cellules P-388 le même effet que sur les cellules MCF-7, à savoir, une diminution nettement moins faible du taux de GSH par ce traitement par rapport à l'utilisation du vérapamil, de la BSO ou du tamoxifène de même qu'un effet plus important sur le taux de glutathion intracellulaire dans les cellules résistantes par rapport aux sensibles (2495 ± 646 pmoles/million de cellules et 1246 ± 272 respectivement dans les cellules P-388 sensibles et résistantes incubées avec la trifluopérazine comparativement à 3030 ± 284 et 3607 ± 180 pour les cellules non traitées). Outre le faible effet exercé par ce composé sur le taux de GSH, le GSSG subit, quant à lui, dans ces conditions, un accroissement (358 ± 133 et 297 ± 78 pour les cellules sensibles et résistantes par rapport à 137 ± 16 et 152 ± 6). Ce composé est le seul produit qui, incubé avec les cellules P-388, induit une diminution du rapport GSH P-388 résistantes/P-388 sensibles (valeur de 0,50 par rapport à 1,19 pour les cellules non traitées (Tableau 26). La glutathion réductase et les glutathion transférases sont les enzymes qui subissent le plus de modifications dans ces conditions expérimentales et qui conduisent à un rapport cellules résistantes/cellules sensibles plus faible que dans le cas des cellules non traitées; ceci est en accord avec une diminution des mécanismes de détoxification permettant une réversion de la chimiorésistance. Un fait surprenant est que ce phénomène soit observé dans des conditions où la diminution du taux de GSH est la plus faible.

2.3.4. EFFET DU TAMOXIFENE

Les effets obtenus avec le tamoxifène sur le taux de GSH coïncident avec ceux du vérapamil et de la BSO : diminution très importante du taux de GSH (42 ± 26 pmoles/million de cellules et 617 ± 384 pour les cellules sensibles et résistantes traitées par ce composé par rapport à 3030 ± 284 et 3607 ± 180 pour les mêmes cellules non traitées), diminution significative et plus importante dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes, diminution du taux de GSSG surtout dans les cellules sensibles (12 ± 6 par rapport à 137 ± 12), rapport GSH P-388 sensibles/P-388 résistantes très élevé (15,66) (Tableau 27). Les enzymes les plus affectées par ce traitement sont la glutathion réductase et les glutathion transférases, situation similaire à celle obtenue dans le cas de la trifluopérazine.

Effet des chimiosensibilisateurs sur l'expression de la glycoprotéine P

Les cellules P-388 sensibles et résistantes à l'adriamycine ont été incubées durant 72 heures en présence des quatre chimiosensibilisateurs précédemment décrits. Comme pour les cellules MCF-7 et MIP-101, aucune modification de l'expression de la glycoprotéine P n'est observée (données non montrées).

Tableau 23 : Valeurs de glutathion (réduit et oxydé) et activités des glutathion réductase, transférases, peroxydases, γ -glutamyl-transpeptidase, glucose-6-phosphate déshydrogénase dans les cellules P-388 sensibles et résistantes à l'adriamycine. Dans la dernière colonne est représenté le rapport des activités entre cellules P-388 résistantes et P-388 sensibles.

Pour le glutathion, les valeurs (exprimées en pmoles par million de cellules) représentent la moyenne \pm SEM de 8 déterminations.

Les différentes activités enzymatiques (GSR : glutathion réductase, GST : glutathion transférases, CDNB : chloro-dinitrobenzène, ECA : acide éthacrinique, GPX : glutathion peroxydases, COOP : hydroperoxyde de cumène, Tbut : hydroperoxyde de *tert*-butyle, γ -GT : γ -glutamyl transpeptidase et G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase) ont été mesurées comme décrit précédemment (Section METHODOLOGIE). Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines et représentent la moyenne de 2 à 3 valeurs expérimentales \pm SEM, chacune des valeurs expérimentales étant elle-même la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	P-388/S	P-388/R	Rapport P-388 résist/ P-388 sens
Glutathion			
GSH	3030 \pm 284	3607 \pm 180	1,19
GSSG	137 \pm 14	152 \pm 6	1,11
GSR	74,67 \pm 4,64	64,26 \pm 4,04	0,86
GST			
CDNB	74,39 \pm 2,36	84,64 \pm 3,50	1,14
ECA	4,98 \pm 0,41	7,38 \pm 0,41	1,48
GPX			
COOP	29,48 \pm 1,50	40,38 \pm 2,00	1,36
Tbut	25,45 \pm 1,37	40,56 \pm 1,35	1,45
γ -GT	24,68 \pm 0,42	3,16 \pm 0,24	0,13
G-6-PDH	25,51 \pm 1,63	44,92 \pm 1,87	1,76

Tableau 24 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules P-388 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 5 µg/ml de vérapamil (vérap).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (P-388 sensibles ou résistantes) ou non traitées (P-388 résistantes) et l'activité des P-388 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (P-388/R) et sensibles (P-388/S) traitées par le vérapamil.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	P-388/S	P-388/R	P-388/S/ vérap	P-388/R/ vérap	résist- vérap/ sens-vérap
Glutathion					
GSH	1	1,19	0,04	0,63	15,87
GSSG	1	1,11	0,37	0,98	2,66
GSR	1	0,86	0,72	0,64	0,89
GST					
CDNB	1	1,14	0,66	0,87	1,32
ECA	1	1,48	1,26	0,86	0,68
GPX					
COOP	1	1,36	0,86	1,84	2,14
Tbut	1	1,45	1,10	1,71	1,55
γ-GT	1	0,13	1,00	0,20	0,20
G-6-PDH	1	1,76	0,93	1,26	1,35

Tableau 25 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules P-388 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 10 μ M de buthionine sulfoximine (BSO).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (P-388 sensibles ou résistantes) ou non traitées (P-388 résistantes) et l'activité des P-388 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (P-388/R) et sensibles (P-388/S) traitées par la BSO.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	P-388/S	P-388/R	P-388/S/ BSO	P-388/R/ BSO	résist- BSO/ sens-BSO
Glutathion					
GSH	1	1,19	0,01	0,13	12,67
GSSG	1	1,11	0,07	1,06	15,12
GSR	1	0,86	1,13	0,82	0,73
GST					
CDNB	1	1,14	0,99	1,16	1,17
ECA	1	1,48	1,51	1,71	1,13
GPX					
COOP	1	1,36	0,84	1,53	1,82
Tbut	1	1,45	0,92	1,68	1,83
γ -GT	1	0,13	1,02	0,16	0,16
G-6-PDH	1	1,76	1,58	1,99	1,26

Tableau 26 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules P-388 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 2 μ M de trifluopérazine (trifluo).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (P-388 sensibles ou résistantes) ou non traitées (P-388 résistantes) et l'activité des P-388 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (P-388/R) et sensibles (P-388/S) traitées par la trifluopérazine.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	P-388/S	P-388/R	P-388/S/ trifluo	P-388/R/ trifluo	résist-trifluo/ sens-trifluo
Glutathion					
GSH	1	1,19	0,82	0,41	0,50
GSSG	1	1,11	2,61	2,17	0,83
GSR	1	0,86	1,00	0,70	0,70
GST					
CDNB	1	1,14	1,24	0,88	0,71
ECA	1	1,48	3,18	2,83	0,89
GPX					
COOP	1	1,36	1,11	1,78	1,60
Tbut	1	1,45	1,03	1,95	1,89
γ -GT	1	0,13	0,90	0,11	0,12
G-6-PDH	1	1,76	1,04	1,58	1,52

Tableau 27 : Etude de l'effet sur le taux de glutathion et les enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion d'une incubation de cellules P-388 sensibles et résistantes à l'adriamycine en présence de 3 μ M de tamoxifène (tamox).

Les résultats représentent le rapport entre l'activité des cellules traitées (P-388 sensibles ou résistantes) ou non traitées (P-388 résistantes) et l'activité des P-388 sensibles non traitées, une valeur arbitraire de référence de 1 étant considérée pour ces dernières. Dans la dernière colonne, la valeur décrite est celle du rapport d'activité entre cellules résistantes (P-388/R) et sensibles (P-388/S) traitées par le tamoxifène.

Les valeurs pour le glutathion constituent la moyenne de 4 déterminations et pour les activités enzymatiques, la moyenne pondérée de 3 dosages effectués sur une même préparation enzymatique.

	P-388/S	P-388/R	P-388/S/ tamox	P-388/R/ tamox	résist-tamox/ sens-tamox
Glutathion					
GSH	1	1,19	0,01	0,20	15,66
GSSG	1	1,11	0,09	1,12	12,41
GSR	1	0,86	0,86	0,31	0,36
GST					
CDNB	1	1,14	1,27	0,56	0,44
ECA	1	1,48	2,16	2,38	1,10
GPX					
COOP	1	1,36	1,12	2,39	2,13
Tbut	1	1,45	0,84	2,45	2,92
γ -GT	1	0,13	0,83	0,19	0,23
G-6-PDH	1	1,76	1,35	0,96	0,71

2.4. REVERSION DE LA CHIMIORESISTANCE A L'ADRIAMYCINE : ROLE DU CALCIUM ET DE L'AMP CYCLIQUE

Le taux de calcium dans les cellules résistantes est environ deux fois supérieur à celui des cellules sensibles et, pour l'AMPc, la situation est inversée : ce sont les cellules résistantes qui possèdent la quantité la plus faible d'AMPc (voir Section RESULTATS 1. Caractérisation de lignées cellulaires).

2.4.1. CALCIUM

Les cellules MCF-7, sensibles et résistantes à l'adriamycine, ont été incubées durant 72 heures en présence des différents chimiosensibilisateurs. La Figure 24 représente les valeurs médianes de calcium obtenues dans les différentes situations.

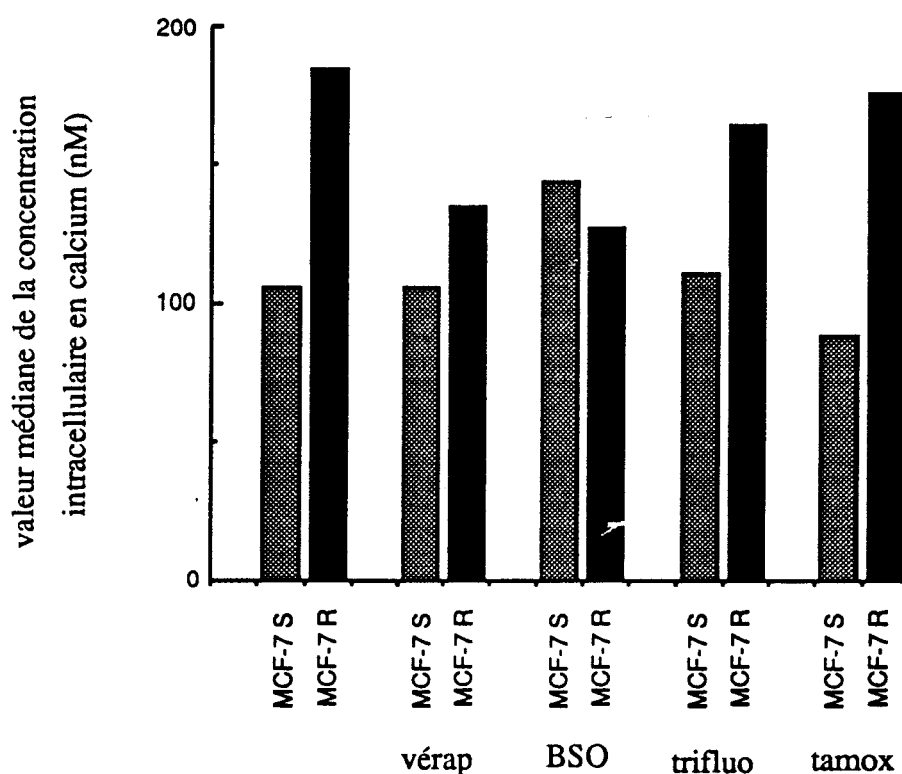


Figure 24 : Influence des traitements au vérapamil (vérap), buthionine sulfoximine (BSO), trifluopérazine (trifluo) et tamoxifène (tamox) sur le taux de calcium intracellulaire dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine.

Les valeurs de calcium représentent la médiane d'un nombre minimum de 35 données.

La représentation de ces résultats sous cette forme (valeur de médiane) s'explique par le nombre très important de données dans cette expérience et par la recherche d'une étude statistique la plus significative possible.

Cette Figure nous montre que le rapport de la concentration en calcium des MCF-7 résistantes/MCF-7 sensibles est modifié lors d'une incubation en présence de vérapamil et de BSO (1,29 et 0,89 par rapport à 1,75).

Une différence significative (test de Man Whitney) est obtenue, dans 80% des cas, entre les cellules MCF-7 résistantes non traitées et traitées par le vérapamil, la BSO et le tamoxifène. Dans le cas de la BSO et du tamoxifène, il semble évident que ces produits agissent sur les cellules résistantes en modifiant leur taux de calcium. Néanmoins, si la valeur médiane s'avère inférieure pour les cellules traitées, nous avons obtenu, dans les différentes expériences, des valeurs significativement, à la fois, plus faibles ou plus élevées, que celles obtenues dans les cellules non traitées.

2.4.2. AMP cyclique

Les cellules MCF-7 ont été incubées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment afin de mesurer leur taux d'AMP cyclique. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 25. Ces données mettent en évidence le fait que le taux d'AMPc particulièrement faible dans les cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles (rapport de 0,17) subit un accroissement important dans le cas du traitement par la BSO (rapport cellules résistantes traitées par la BSO/cellules résistantes non traitées de 3,30). La BSO est le seul chimiosensibilisateur qui agit à la fois sur les cellules MCF-7 sensibles et résistantes. Les cellules MCF-7 sensibles subissent toutes, de manière plus ou moins importante, des modifications de leur taux d'AMPc lors de l'incubation avec les différents chimiosensibilisateurs.

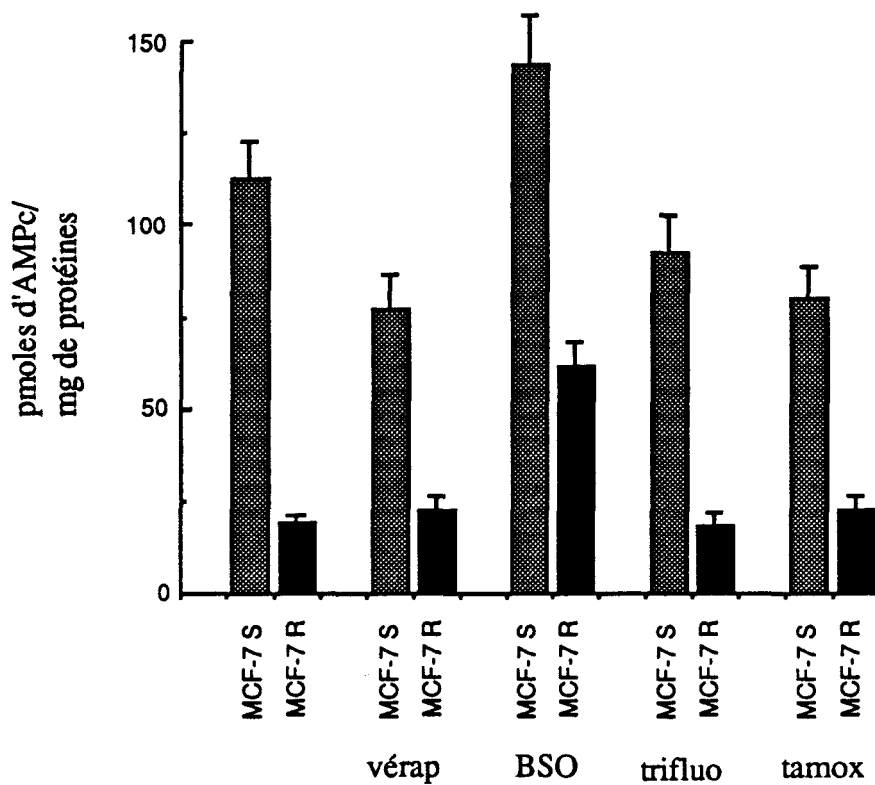


Figure 25 : Influence des traitements au vérapamil (vérap), buthionine sulfoximine (BSO), trifluopérazine (trifluo) et tamoxifène (tamox) sur le taux d'AMPc (exprimé en pmoles par mg de protéines) dans les cellules MCF-7 sensibles et résistantes à l'adriamycine.

Les valeurs d'AMPc représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences, chacune ayant été effectuée en double.

Si l'on considère le rapport cellules MCF-7 résistantes/cellules MCF-7 sensibles pour le taux de calcium intracellulaire et celui d'AMP cyclique, les changements observés s'avèrent opposés sauf en ce qui concerne le tamoxifène qui induit une augmentation des deux rapports (Tableau 28).

Tableau 28 : Rapport de calcium intracellulaire et d'AMPc entre cellules MCF-7 résistantes et sensibles (R/S) traitées ou non par différents chimiosensibilisateurs (vérapamil, BSO, trifluopérazine et tamoxifène).

	Calcium : R/S	AMPc : R/S
MCF-7 sensibles et résistantes		
- non traitées	1,75	0,17
- traitées par le vérapamil	1,29	0,30
- traitées par la BSO	0,89	0,43
- traitées par la trifluopérazine	1,49	0,20
- traitées par le tamoxifène	1,99	0,29

3. MODELISATION MOLECULAIRE DE L'INTERACTION GLUTATHION/SITE ACTIF DE LA GLUTATHION PEROXYDASE.

RECHERCHE D'OUTILS PHARMACOLOGIQUES PRESENTANT UNE ANALOGIE CONFORMATIONNELLE AVEC LE GLUTATHION.

D'une part, les variations importantes de l'activité de la glutathion peroxydase associées à la chimiorésistance à l'adriamycine et, d'autre part, la connaissance de la séquence en acides aminés du site actif de cette protéine (Epp et al., 1983; Günzler et al., 1984; Deffie et al., 1988; Kramer et al., 1988) nous ont conduit à étudier par modélisation moléculaire l'interaction glutathion/glutathion peroxydase. Notre objectif a alors été de mimer cette interaction en remplaçant le glutathion par des pharmacomolécules ayant la capacité de moduler la chimiorésistance.

L'étude de l'interaction entre le glutathion et le site actif de la glutathion peroxydase a été réalisée d'une part, en collaboration avec le Docteur Jacques Poupaert en utilisant une miniversion du centre catalytique de l'enzyme et d'autre part, en collaboration avec le Professeur Gérard Vergoten, en modélisant la protéine dans son ensemble.

3. 1. CONFORMERES DU GLUTATHION

Des études de modélisation moléculaire nous ont permis de démontrer l'existence du glutathion sous 2 conformères : d'une part, le conformère de type S (décrit également par Laurence et Thomson en 1980) d'autre part, un conformère de type pseudocyclique non précédemment décrit (Figure 26).

Le Tableau 29 résume les caractéristiques énergétiques les plus importantes de ces deux conformères. L'interaction charge/charge (Tableau 29) constitue le paramètre le plus précieux permettant de distinguer les deux conformères. Elle stabilise la conformation pseudocyclique et rend son énergie nettement plus faible. C'est cette conformation pseudocyclique qui a été

choisie dans les études de modélisation moléculaire du glutathion présentées tout au long de cette section.

Tableau 29 : Paramètres principaux contribuant à l'énergie potentielle des deux conformères du glutathion.

Paramètres	forme S	forme pseudocyclique
interactions		
charge / charge	-84,0093	-118,7363
charge / dipôle	-18,1255	-10,8384
dipôle / dipôle	-3,3429	-3,7775
liaisons		
non-1,4 van der Waals	-0,5746	2,2351
1,4 van der Waals	11,0277	9,1008
ENERGIE TOTALE	-84,7124	-113,9950

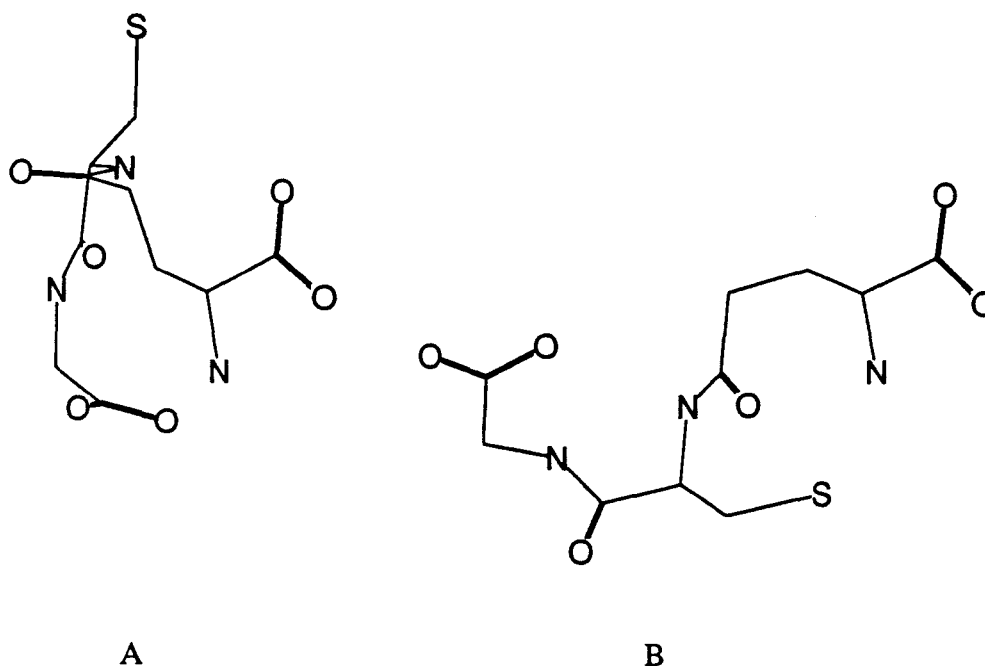


Figure 26 : Les 2 conformères du glutathion

A = Type pseudocyclique

B = Type S

3. 2. INTERACTION GLUTATHION / MINIVERSION DU SITE ACTIF DE LA GLUTATHION PEROXYDASE

La parfaite connaissance de la séquence en acides aminés du site actif de la glutathion peroxydase et de la conformation du glutathion seul ou en interaction avec l'enzyme a permis d'en effectuer la modélisation moléculaire. Le modèle initialement choisi est une miniversion du centre catalytique (7 acides aminés) de la glutathion peroxydase où la sélénocystéine naturelle est artificiellement remplacée par une cystéine (ceci pour des raisons pragmatiques, certains paramètres du sélénium n'étant pas directement disponibles dans le programme de modélisation moléculaire étudié). La conformation de ce modèle après minimisation d'énergie est illustrée à la Figure 27.

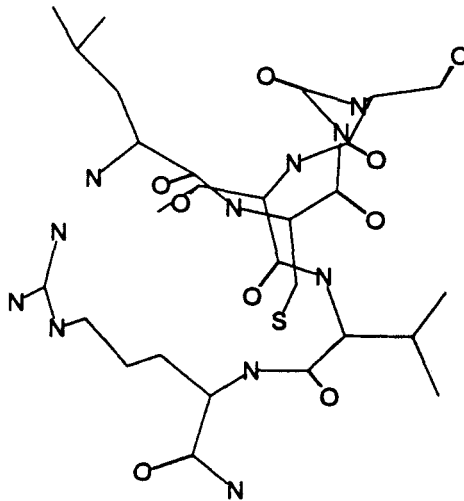


Figure 27 : Structure de l'environnement immédiat du site catalytique modifié de la glutathion peroxydase où la cystéine remplace la sélénocystéine (dans cette représentation, les atomes d'hydrogène ne sont pas mentionnés)

Le glutathion est incorporé dans le centre catalytique immédiatement après avoir remplacé l'atome de soufre de la cystéine par un atome de sélénium (restitution de la sélénocystéine naturelle) via une liaison sélénium-soufre et l'adduit glutathion-enzyme est alors soumis à une minimisation d'énergie. La structure minimisée adopte une conformation dans laquelle sont favorisées les interactions entre guanidinium du site actif de la protéine et carboxylate du substrat (Figure 28).

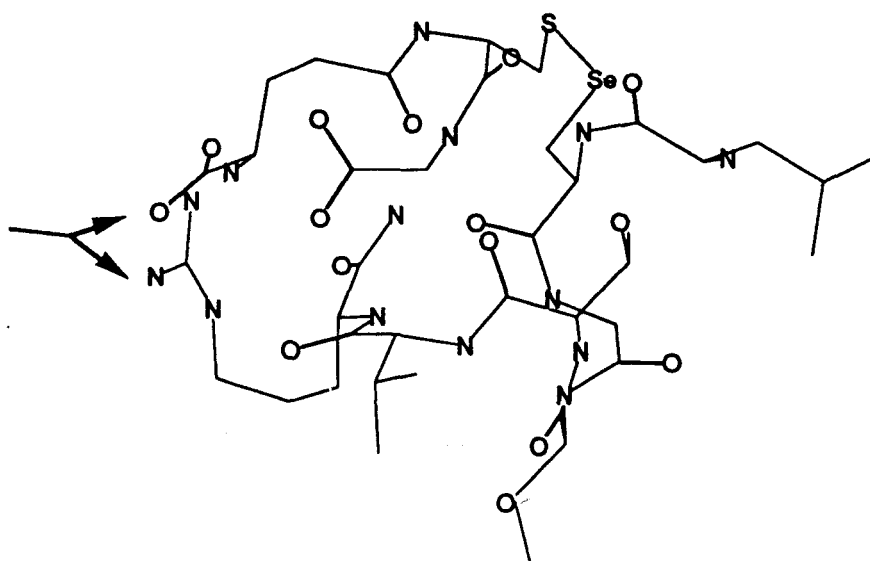


Figure 28 : Structure de l'adduit glutathion - site catalytique de la glutathion peroxydase après minimisation d'énergie. La double flèche indique l'interaction guanidinium-carboxylate (cf commentaires dans le texte).

3. 3. INTERACTION GLUTATHION / SITE ACTIF DE LA GLUTATHION PEROXYDASE

Afin de modéliser la cavité de la protéine, les hydrogènes sont ajoutés par l'intermédiaire d'un programme Sybyl. Les Figures 29 à 34 représentent la glutathion peroxydase, sa structure secondaire, son site actif, son interaction avec le glutathion

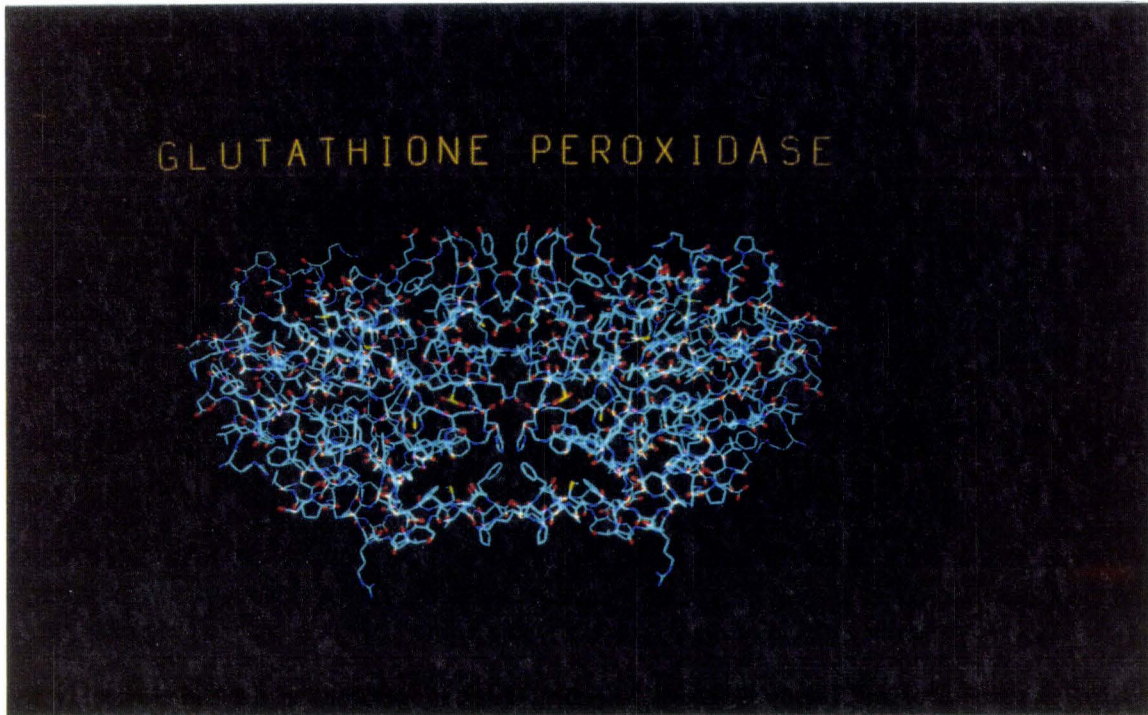


Figure 29 : Le dimère de la glutathion peroxydase

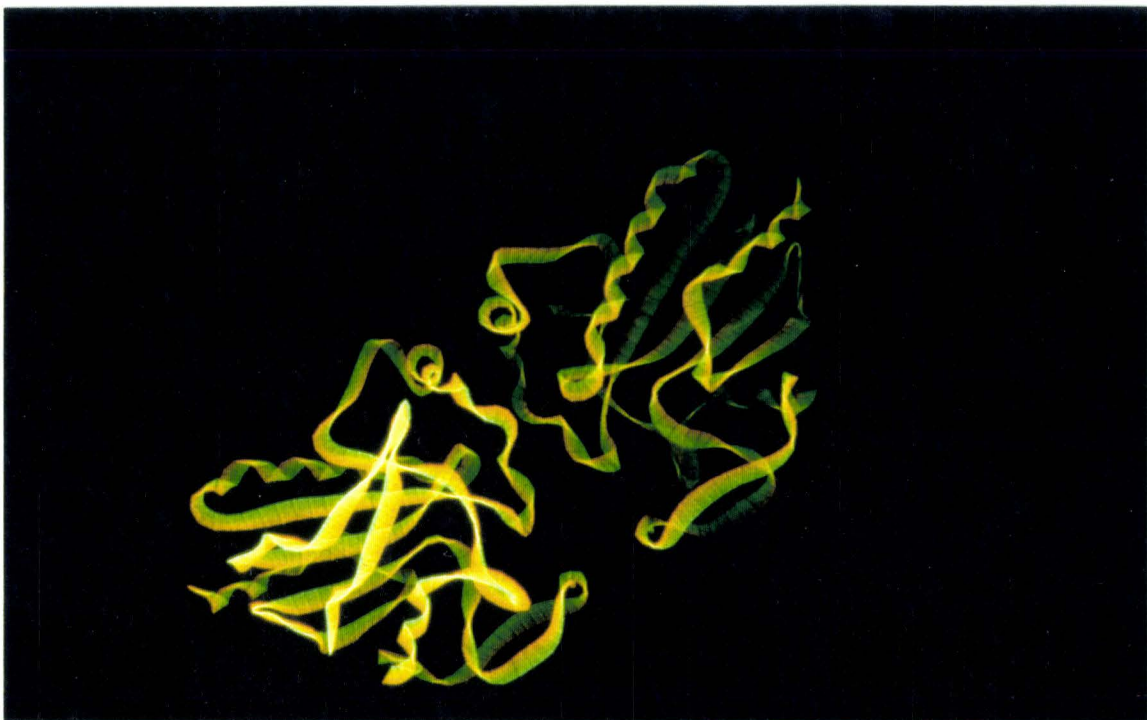


Figure 30 : Représentation tridimensionnelle, sous forme de rubans, de la glutathion peroxydase (modélisée avec le logiciel MANOSK)

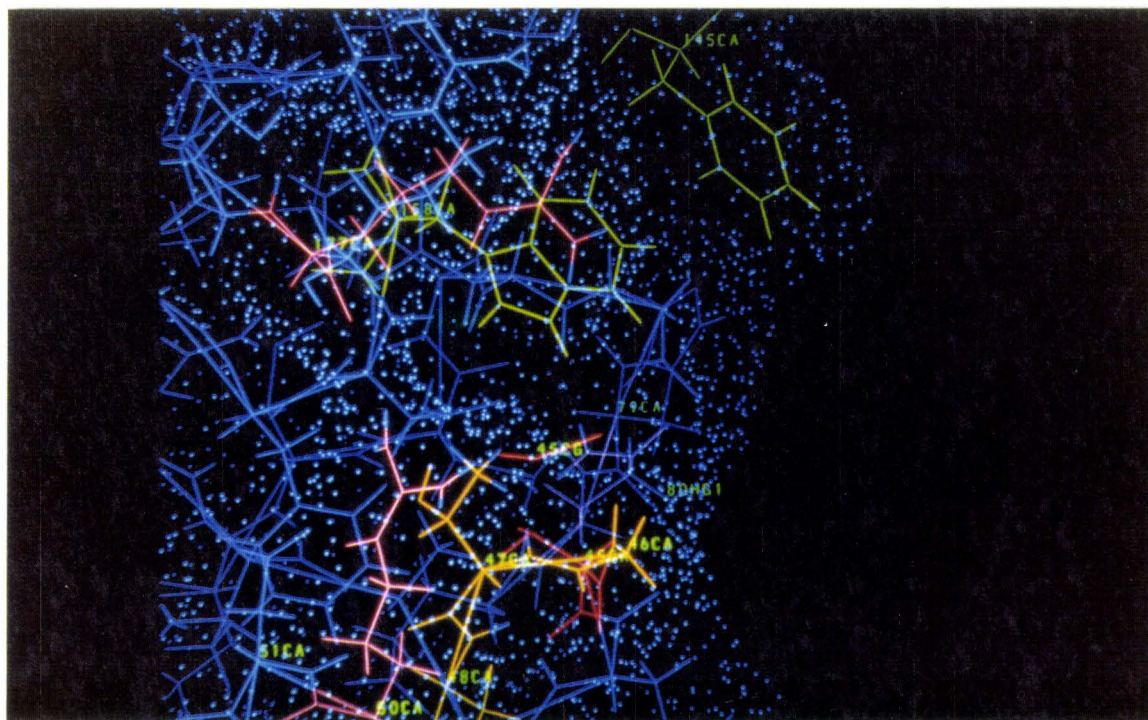


Figure 31 : Site actif de la glutathion peroxydase (logiciel SYBYL).

La sélénocystéine se trouve en position 45 (45 CG) et les arginines en 50 et 177 (50 CA, 177 CA)

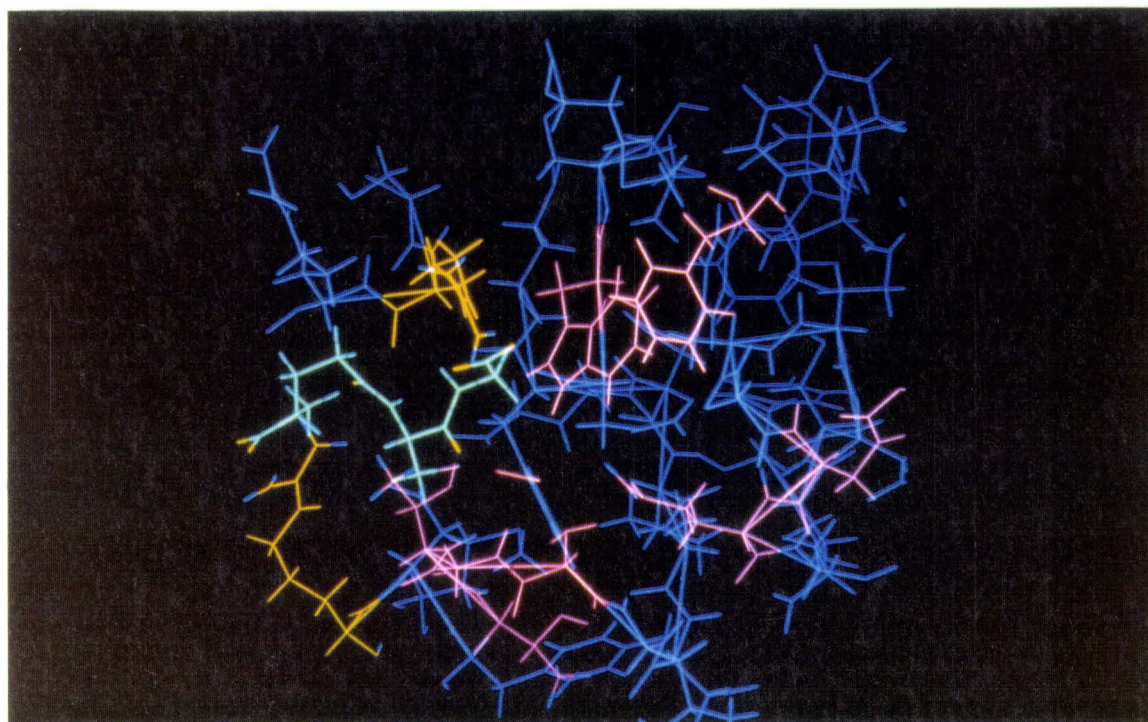


Figure 32 : Site actif de l'enzyme en interaction avec le glutathion

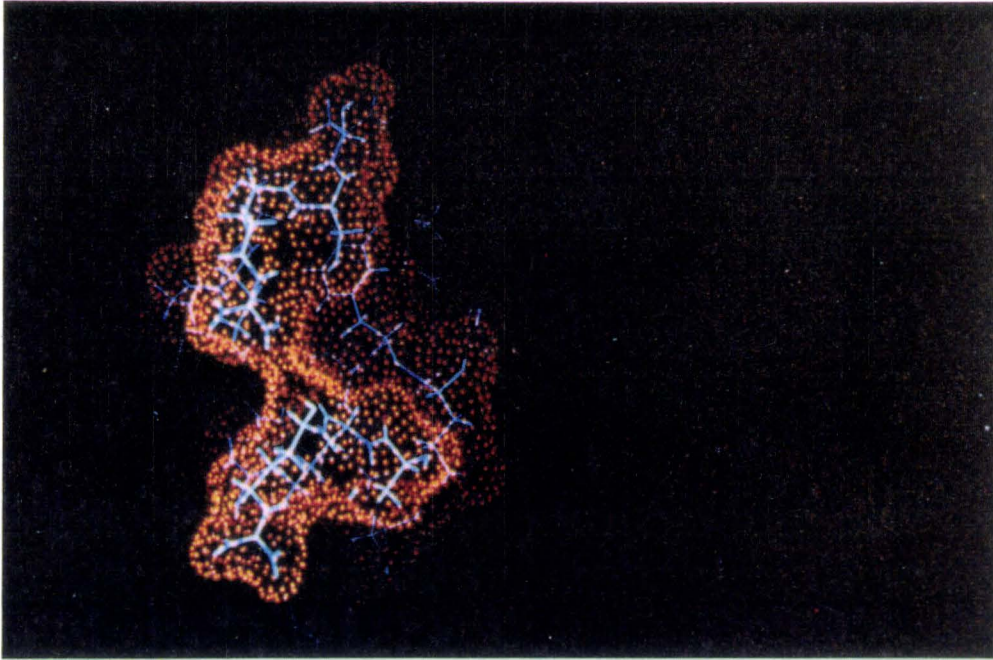


Figure 33 : Représentation en surfaces de Connolly (surface accessible au solvant) du site actif de la glutathion peroxydase

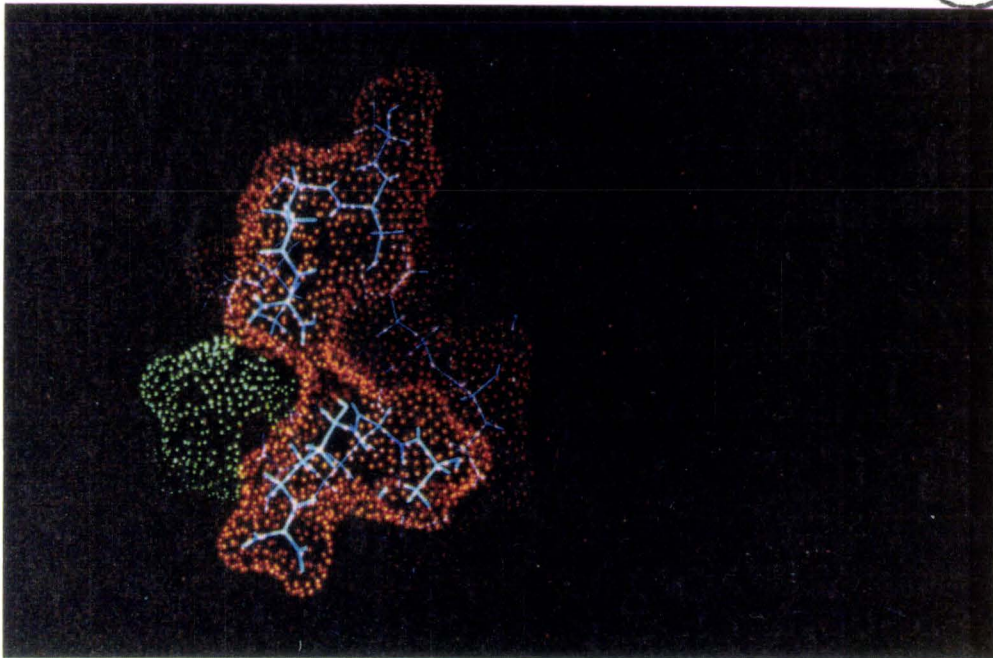


Figure 34 : Représentation en surfaces de Connolly (surface accessible au solvant) du site actif de la glutathion peroxydase en interaction avec le glutathion

3.4. INTERACTION PENICILLAMINE-HYDANTOÏNE/MINIVERSION DU SITE ACTIF DE LA GLUTATHION PEROXYDASE.

Ayant réalisé l'interaction glutathion/glutathion peroxydase, notre but était de disposer de molécules pouvant mimer cette interaction. Du fait de son analogie conformationnelle un peu inattendue avec le glutathion (Figure 35), la pénicillamine-hydantoïne, possédant des propriétés antiinflammatoires, attirera notre intérêt par sa possibilité d'interagir avec la glutathion peroxydase.

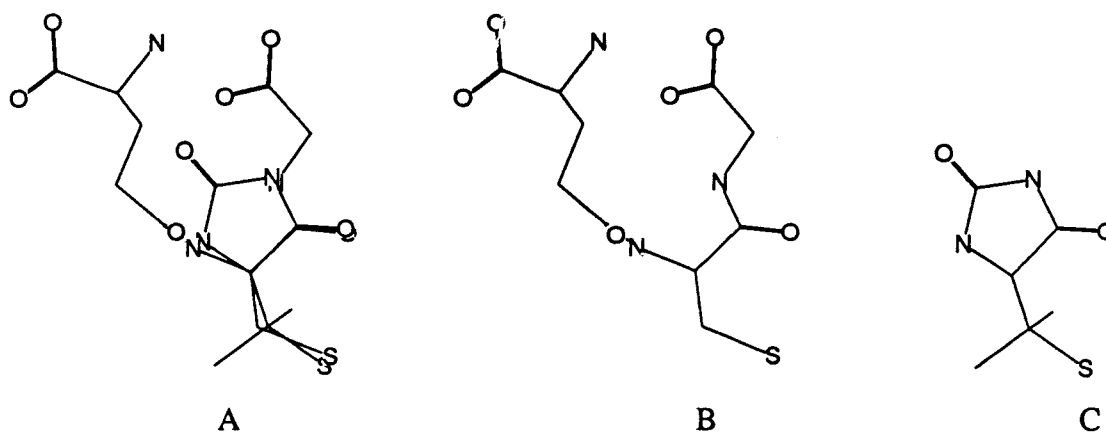


Figure 35 :

- A. Superposition des conformations de basse énergie du glutathion et de la pénicillamine-hydantoïne
- B. Conformation de basse énergie du glutathion
- C. Conformation de basse énergie de la pénicillamine-hydantoïne

Comme l'illustre la Figure 36, une reconnaissance moléculaire existe entre la pénicillamine-hydantoïne et le site actif de la glutathion peroxydase. Cette reconnaissance moléculaire est différente de celle observée dans l'interaction glutathion/site actif de l'enzyme puisqu'elle fait intervenir les fonctions amides du cycle hydantoïne (et non carboxyliques) et le guanidinium de l'arginine du site actif (cf Figure 36).

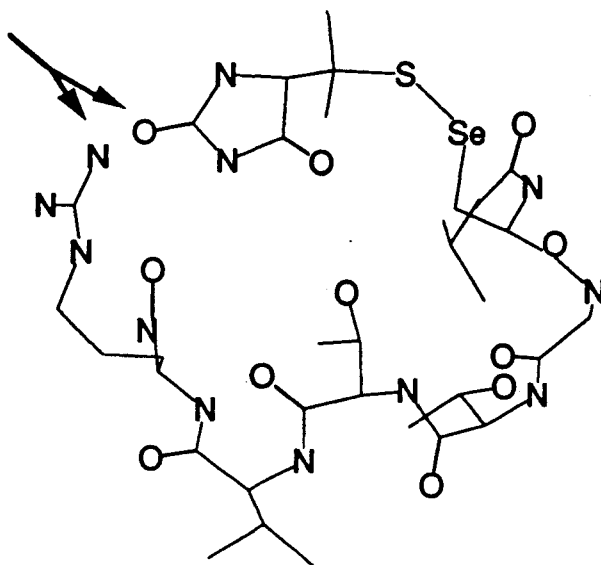
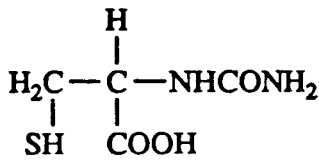


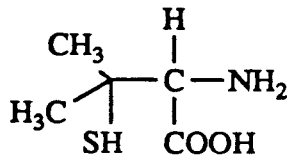
Figure 36 : Structure de l'adduit pénicillamine-hydantoïne / site catalytique de la glutathion peroxydase après minimisation.

La double flèche indique l'interaction guanidine-amide (cf commentaires dans le texte).

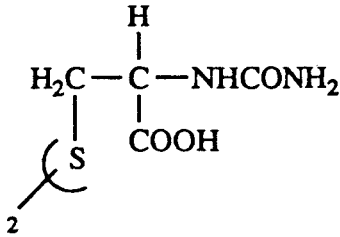
Les interactions existant entre la pénicillamine-hydantoïne et le site actif de la glutathion peroxydase étant fortes, cette pharmacomolécule a servi de chef de file à toute une série de molécules qu'on pourrait considérer comme des analogues synthétiques potentiels du glutathion et dont les formules sont illustrées à la Figure 37 A et B. Par rapport à la molécule de base choisie pour cette étude, la majorité des molécules reprises à la Figure 37 A et B conservent une partie du squelette chimique, à savoir la partie hydantoïne. Certaines sont présentes sous forme acide, d'autres le sont sous forme disulfure. Toutes ces molécules ont été étudiées pour leurs activités inhibitrices et/ou inactivatrices des glutathion réductase, transférases et peroxydases. La molécule s'étant révélée la plus active fut la pénicillamine-hydantoïne dont l'activité sera développée dans la section ultérieure.



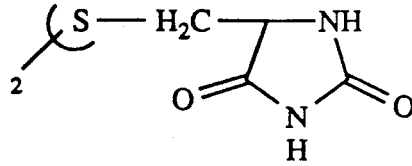
acide L-cystéine hydantoïque



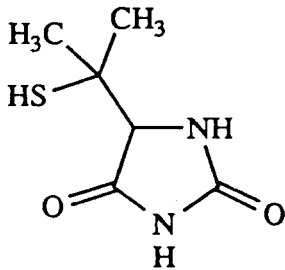
pénicillamine



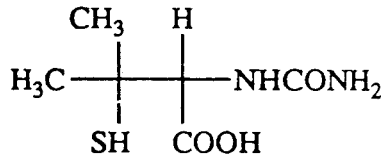
acide L-cystine hydantoïque



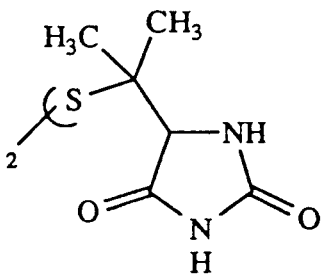
L-cystine hydantoïne



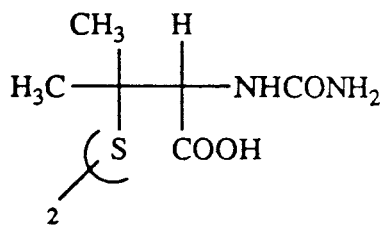
Pénicillamine hydantoïne



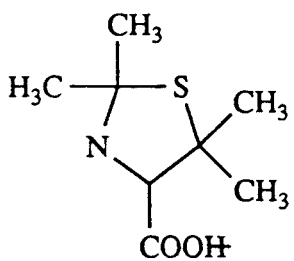
Acide pénicillamine hydantoïque



disulfure de la pénicillamine hydantoïne

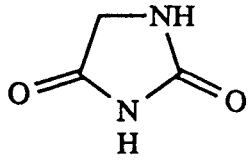


disulfure de l'acide pénicillamine hydantoïque

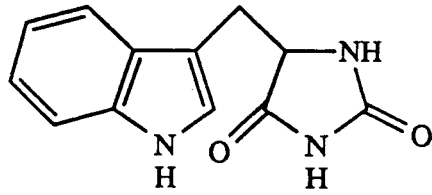


pénicillamine acétonide

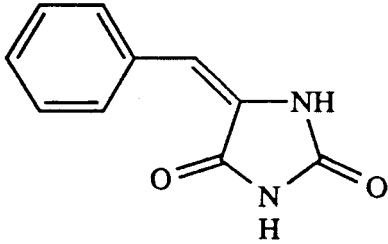
Figure 37 A



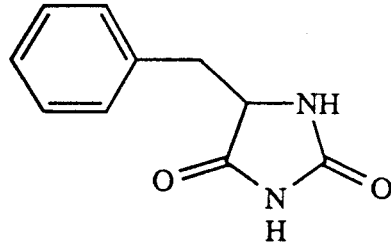
hydantoïne



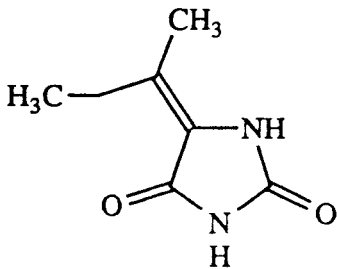
tryptophane hydantoïne



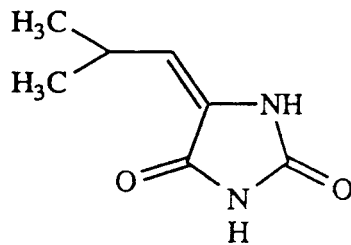
benzylidène hydantoïne



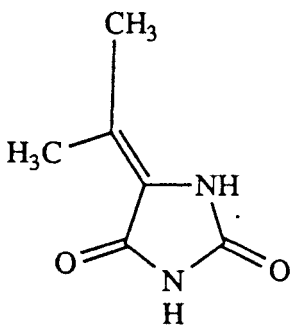
phénylalanine hydantoïne



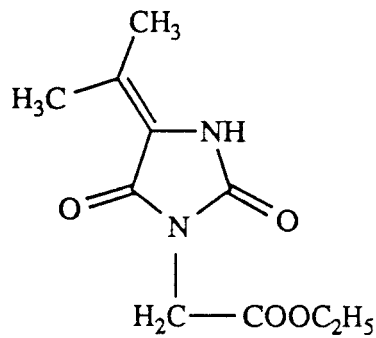
5-(1-méthylpropylidène)hydantoïne



5-(2-méthylpropylidène)hydantoïne



5-isopropylidène hydantoïne



N-carbéthoxyméthyl 5-isopropylidène hydantoïne

Figure 37 B

4. EFFET D'UN ANALOGUE DU GLUTATHION SUR L'ACTIVITE D'ENZYMES DU METABOLISME DU GLUTATHION

La seule molécule dont l'étude sera développée est la pénicillamine-hydantoïne qui s'est révélée douée de propriétés inhibitrices et inactivatrices de la glutathion peroxydase.

4.1. EFFET DE LA PENICILLAMINE-HYDANTOÏNE SUR LES GLUTATHION PEROXYDASES

L'étude de l'effet inhibiteur se réalise par incubation directe de la source enzymatique (cytosol de foie de rat) avec la pénicillamine-hydantoïne et celle de l'effet inactivateur par préincubation de la source enzymatique avec la pénicillamine-hydantoïne.

Caractéristiques cinétiques des effets inhibiteur et inactivateur de la L-pénicillamine-hydantoïne sur la glutathion peroxydase

Effet inhibiteur

L'activité de la glutathion peroxydase est inhibée par la L-pénicillamine-hydantoïne quelle que soit la nature du peroxyde (hydroperoxyde d'hydrogène, de *tert*-butyle, de cumène) utilisé comme substrat de la réaction. Cette inhibition est de l'ordre de 50% avec l'hydroperoxyde de cumène comme substrat et de l'ordre de 60% avec l'hydroperoxyde de *tert*-butyle.

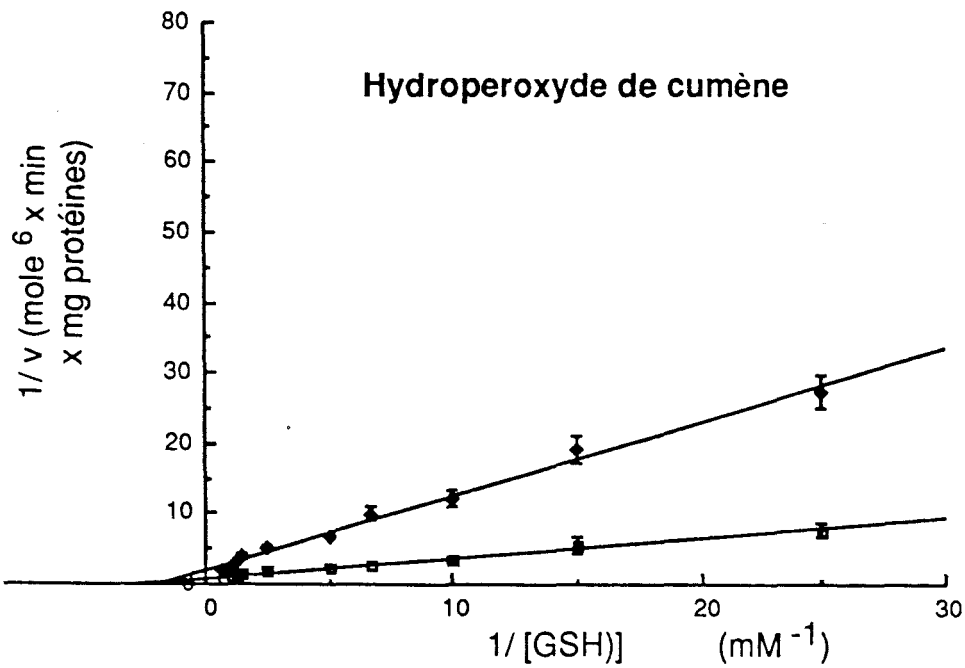
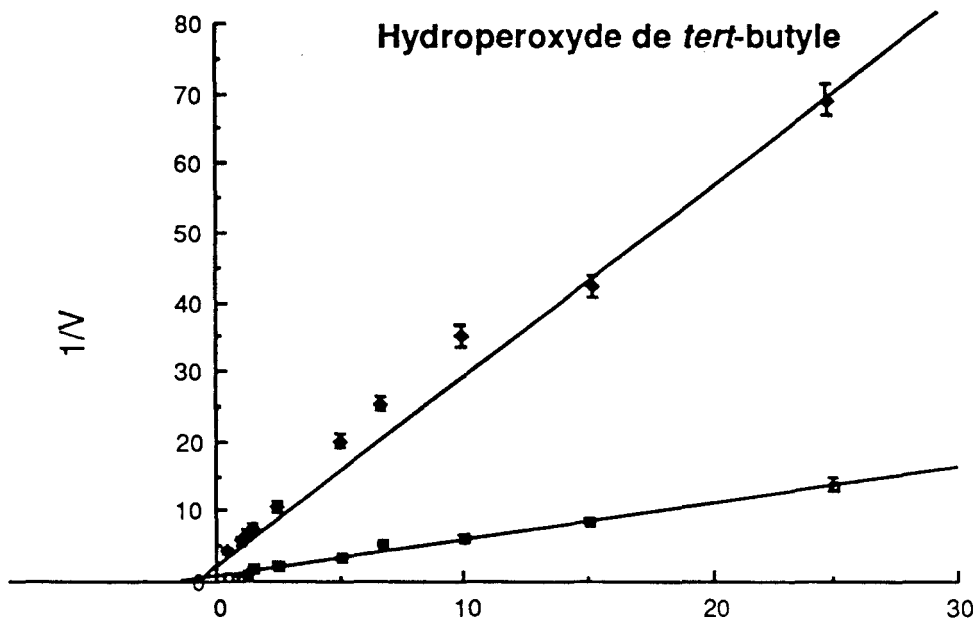
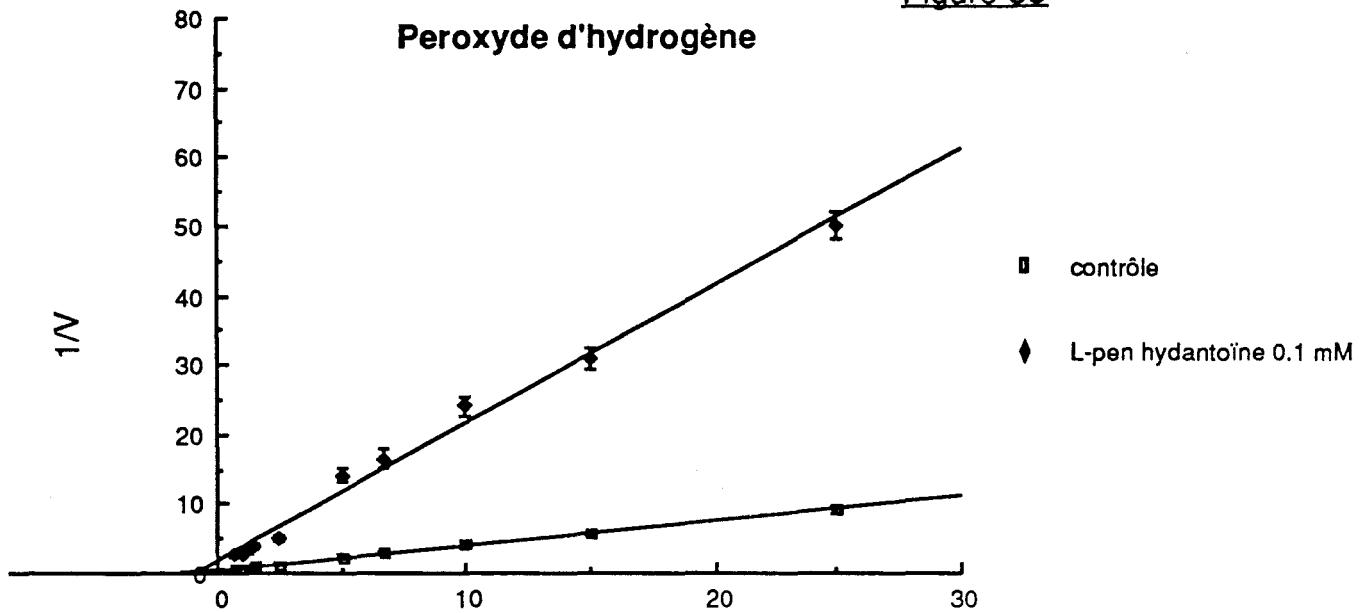
L'activité de la glutathion peroxydase a été dosée en fonction de quantités croissantes de glutathion et en présence de quantités constantes de peroxyde, avec ou sans ajout de L-pénicillamine-hydantoïne. En absence de cet effecteur, les K_m et V_m apparents (calculés dans la représentation de Lineweaver-Burk) du glutathion pour l'enzyme varient suivant la nature du peroxyde. Bien que des valeurs semblables soient obtenues dans le cas de l'hydroperoxyde d'hydrogène et de *tert*-butyle (substrats spécifiques des glutathion peroxydases dépendantes du sélénium), des valeurs différentes sont calculées avec l'hydroperoxyde de cumène. L'inhibition

obtenue en présence de 100 μM de L-pénicillamine-hydantoïne est apparemment mixte puisqu'à la fois K_m et V_m sont modifiés par l'effecteur (Figure 38 et Tableau 30).

Tableau 30: Effet de la L-pénicillamine-hydantoïne sur les K_m et V_m apparents du glutathion pour la glutathion peroxydase dosée en présence de peroxyde d'hydrogène, d'hydroperoxyde de *tert*-butyle ou de cumène

Les résultats sont exprimés en μM pour les K_m apparents et en mU/mg de protéines pour les V_m .

Substrat	Absence de pen-hydantoïne		Présence de pen-hydantoïne	
	K_m	V_m	K_m	V_m
H_2O_2	622	1783	1122	568
<i>tert</i> -butyle	633	1205	1079	353
COOP	281	1025	542	516



Effet inactivateur

Une préincubation d'une durée de 5 minutes de cytosol de foie de rat et de L-pénicillamine-hydantoïne est réalisée à 30°C. Par cette méthode, les glutathion peroxydases sont fortement inactivées (85%) quelle que soit la nature du peroxyde pour des concentrations en pénicillamine-hydantoïne supérieures à 50 μM (Figure 39).

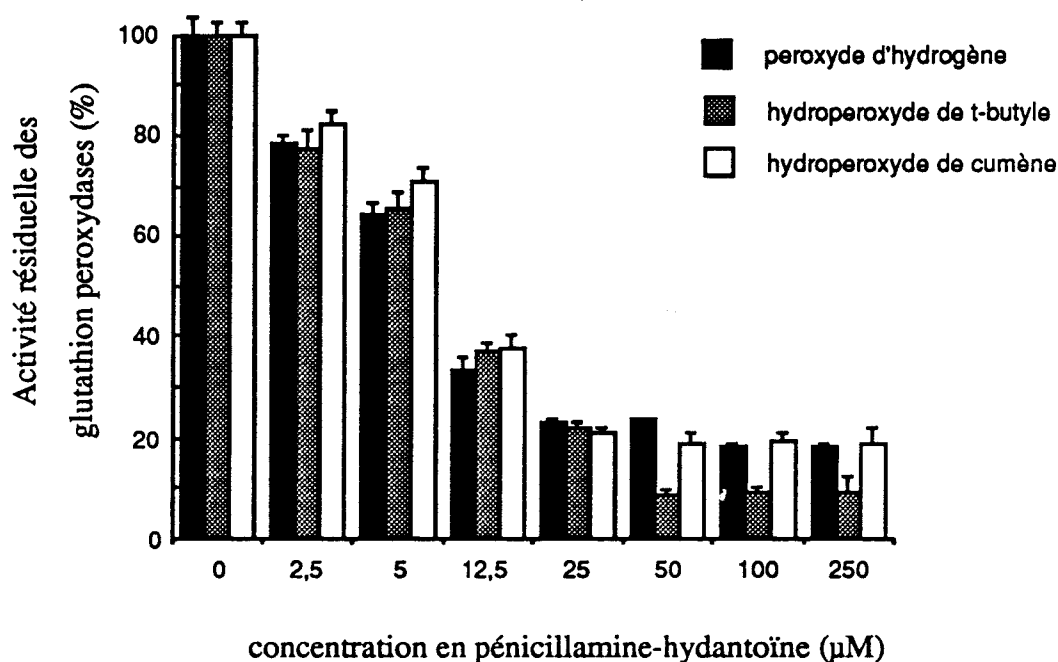


Figure 39 : Etude de l'effet d'une préincubation de 5 minutes de cytosol de foie de rat avec différentes concentrations de pénicillamine-hydantoïne sur l'activité des glutathion peroxydases

L'addition dans le milieu de préincubation (dans lequel est inclus l'effecteur) de molécules contenant des groupements SH telles que le glutathion, la cystéine ou le dithiothréitol prévient l'inactivation des glutathion peroxydases par la L-pénicillamine-hydantoïne. Par contre, l'addition de ces molécules après la préincubation de 5 minutes ne permet pas de restaurer l'activité des glutathion peroxydases. Des molécules telles que l'hydantoïne, le Triton X 100 ou le phénol (intérêt d'utilisation provenant de l'existence de domaines hydrophobes de la glutathion peroxydase) n'ont pas permis de réverser, à la fin de la période de préincubation avec la L-pénicillamine-hydantoïne, l'état inactivé de l'enzyme (Figure 40). La réversibilité du processus d'inactivation des glutathion peroxydases par la pénicillamine-hydantoïne ont également été étudiées par dialyse de la préparation enzymatique (cytosol de foie de rat) inactivée

par cette pharmacomolécule. Ce traitement n'a cependant pas permis de restaurer l'activité enzymatique (données non présentées).

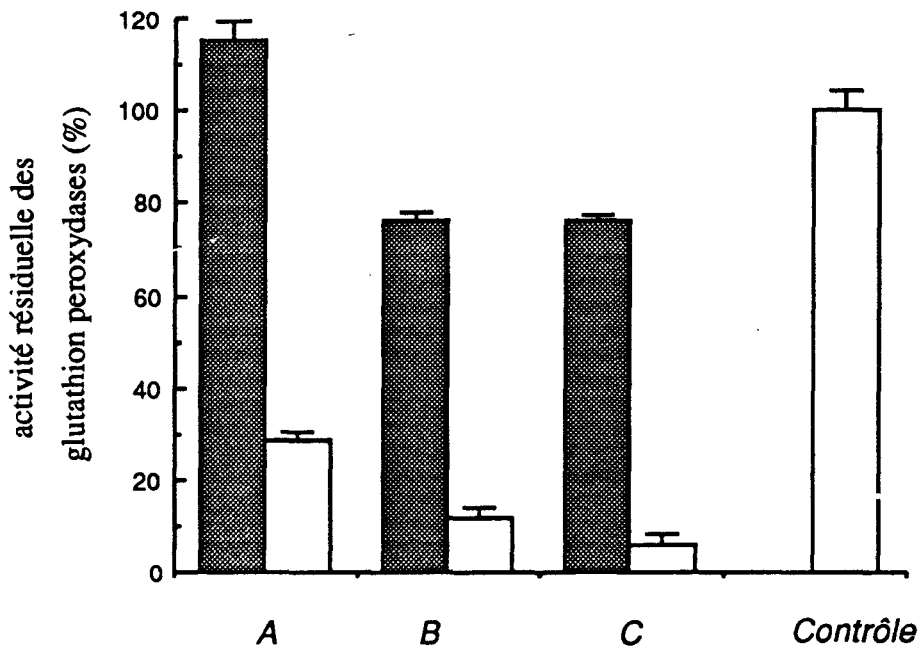


Figure 40 : Inactivation des glutathion peroxydases par préincubation à 30°C de la pénicillamine- hydantoïne (50 μ M) avec les protéines cytosoliques de foie de rat.

A : aucune addition de molécules autres que la pénicillamine-hydantoïne et les réactifs classiques dans le milieu d'incubation. Le glutathion (1 mM) a été introduit durant la période de préincubation (■) ou d'incubation (□).

B : addition de cystéine (1 mM) dans le milieu de préincubation (■) ou d'incubation (□).

C : addition de dithiothréitol dans le milieu de préincubation (■) ou d'incubation (□)

Contrôle : préincubation des protéines cytosoliques de foie de rat sans aucune autre molécule. L'activité des glutathion peroxydases est considérée comme 100 %.

4.2. EFFET DE LA PENICILLAMINE HYDANTOÏNE SUR LA GLUTATHION REDUCTASE

Aucun effet significatif n'a été observé quel qu'ait été le protocole expérimental (protocole d'inhibition ou d'inactivation).

4.3. EFFET DE LA PENICILLAMINE HYDANTOÏNE SUR LES GLUTATHION TRANSFERASES

Propriétés d'inhibition et/ou stimulation de la pénicillamine-hydantoïne (incubation directe de la source enzymatique avec la pharmacomolécule à une concentration de 0,25 mM)

Une légère modification de l'activité des glutathion transférases, mesurée d'une manière globale avec le CDNB comme substrat est observée dans le cas d'incubations du cytosol de foie de rat (source enzymatique) avec la pénicillamine-hydantoïne.

L'activité de l'isoenzyme glutathion transférase de type π peut être mesurée spécifiquement en utilisant l'acide éthacrinique comme substrat. Dans ce cas, la pénicillamine-hydantoïne stimule l'activité de 100 %.

Propriétés d'inactivation et/ou activation de la pénicillamine-hydantoïne (préincubation de la source enzymatique avec la pharmacomolécule à une concentration de 0,05 mM)

La pénicillamine-hydantoïne ne possède aucun effet inactivateur apparent sur les glutathion transférases dosées avec le CDNB ou avec l'acide éthacrinique.

4.4. ETUDE DE LA REVERSION SUR CELLULES EN CULTURE DE LA CHIMIORESISTANCE PAR UN ANALOGUE SYNTHETIQUE DU GLUTATHION ACTIF *IN VITRO* : LA L-PENICILLAMINE HYDANTOÏNE

Notre but était d'incuber des cellules MCF-7 résistantes à l'adriamycine en présence d'une concentration 50 μ M finale en pénicillamine-hydantoïne dans le milieu de culture, concentration non cytotoxique. Néanmoins, avant d'étudier le devenir du glutathion et des enzymes associées au métabolisme du glutathion dans ces cellules traitées par la pénicillamine-hydantoïne, il s'avérait nécessaire d'étudier le devenir de cette pharmacomolécule dans le milieu de culture c'est-à-dire en solution diluée.

La Figure 41 représente le devenir de la pénicillamine dans le milieu de culture RPMI.

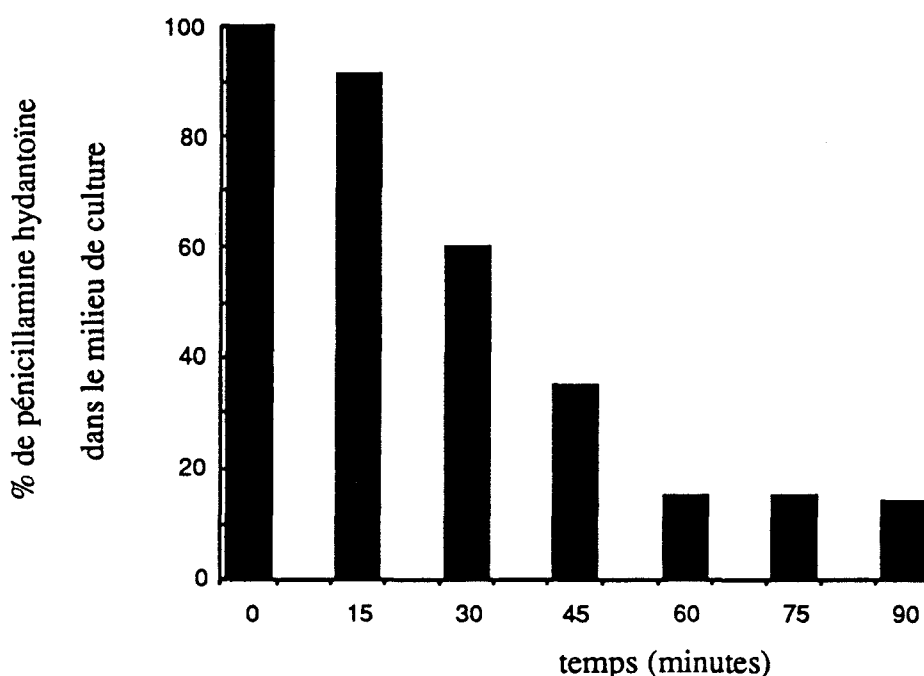


Figure 41 : Pourcentage de pénicillamine-hydantoïne présent en solution dans le milieu de culture au cours du temps.

Cette Figure met en évidence le fait que la pénicillamine-hydantoïne est très instable en solution et que l'on ne pourra pas obtenir *in vivo* d'effet inhibiteur et inactivateur de la glutathion peroxydase susceptible de permettre une réversion du phénomène de chimiorésistance. En fait, la pénicillamine-hydantoïne se transforme en 5-isopropylidène hydantoïne, pharmacomolécule dépourvue d'activité inhibitrice et/ou inactivatrice de la glutathion peroxydase.

CONCLUSION

Il est à l'heure actuelle bien admis que les changements cellulaires responsables de la chimiorésistance aux anticancéreux sont particulièrement complexes et regroupent des modifications de la glycoprotéine membranaire P-170, d'activités enzymatiques et même de modifications de l'expression d'oncogènes.

La caractérisation de lignées cellulaires sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine représente un des objectifs fixés pour nos travaux de recherche et constitue une approche intéressante visant à une meilleure compréhension des mécanismes de chimiorésistance. Parmi les nombreux paramètres susceptibles d'être modifiés, nous nous sommes focalisés sur la présence de la glycoprotéine P, l'expression de certains oncogènes, la mise en évidence du taux de glutathion (réduit et oxydé) et des enzymes du métabolisme du glutathion, l'activité de la topoisomérase II et, dans des cellules de carcinome mammaire résistantes à l'adriamycine, l'analyse de leurs taux de calcium et d'AMP cyclique.

Une prolifération cellulaire incontrôlée étant une caractéristique des cellules tumorales, il s'avérait intéressant d'étudier l'expression de certains gènes impliqués dans la transformation cellulaire et codant pour des produits intervenant aux différents niveaux du contrôle de la régulation de la croissance cellulaire. Ainsi, au niveau de l'expression génique, ce sont les oncogènes qui sont le plus souvent impliqués dans les processus de synthèse et de réparation de l'ADN dont l'expression est accrue dans les cellules résistantes (*c-myc*, *c-myb*). Les deux anticancéreux étudiés dans ce travail, à savoir le cis-platine et l'adriamycine, stimulent l'expression d'oncogènes membranaires (*c-ras* ou *c-mil*) qui peuvent moduler l'expression d'oncogènes nucléaires (*c-myc*, *c-myb*) régulant directement ou indirectement des processus de réparation de l'ADN (modification de la durée du cycle cellulaire, du temps nécessaire à la réparation des lésions). Cependant, le cas de la chimiorésistance à l'adriamycine dans les cellules MCF-7 ne semble pas suivre ce schéma dans son ensemble. La présence de la p 53, gène suppresseur de tumeur, n'a pu être mise en évidence que dans les cellules DLD-1, MIP-101 et MCF-7; son taux d'expression s'avère légèrement supérieur dans les cellules MCF-7 sensibles. Or, un des effets de la p 53 est lié à une modification du cycle cellulaire et, dans des cas de cancers radioinduits, elle bloquerait les cellules en phase G1 afin de leur laisser le temps de réparer les lésions. Pour les cellules MCF-7, l'effet de la p 53 serait plutôt un effet répresseur du gène MDR.

Pour le cis-platine et l'adriamycine, une augmentation du processus de détoxification de ces anticancéreux constitue un complément d'action aux processus de synthèse et de réparation de l'ADN.

Des études cliniques ont pu mettre en évidence une amplification du gène MDR1 dans certains cas de chimiorésistance pléiotropique, ce paramètre ne pouvant être observé dans tous les cas de chimiorésistance. L'intérêt de notre travail réside dans une analyse relativement complète de différents oncogènes dans diverses lignées cellulaires sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine. En effet, plusieurs cancers sont associés à la production anormale d'enzymes, de protéines et d'hormones qu'il est possible de mesurer dans le plasma ou le sérum, ces molécules étant reconnues comme des marqueurs tumoraux. Dans le cas que nous étudions, c'est-à-dire la chimiorésistance, la recherche de caractéristiques spécifiques, i.e. diminution ou augmentation de l'expression de certains oncogènes, apparaissant au cours de ce processus fait partie intégrante de la démarche à suivre afin d'obtenir une chimiothérapie la plus efficace possible. Ainsi, dans l'ensemble des lignées cellulaires étudiées, un accroissement de l'expression de l'oncogène *c-H-ras* semble corrélé à l'apparition de la chimiorésistance. L'observation de la surexpression de différents oncogènes pourrait ainsi constituer un facteur diagnostique d'un phénomène de chimiorésistance.

Les données concernant le glutathion et les enzymes qui lui sont associées sont complexes aussi bien pour l'adriamycine que pour le cis-platine et ne permettent pas de mettre en évidence une corrélation entre la chimiorésistance à un anticancéreux et des modifications du métabolisme du glutathion dans différentes lignées cellulaires simultanément. Ceci justifie notre choix d'étudier la chimiorésistance dans différentes lignées cellulaires aussi bien d'origine murine que d'origine humaine et dans le cas de l'adriamycine, résistantes *de novo* ou par sélection. L'activité topoisomérase II semble, quant à elle, mais uniquement pour le cis-platine, pouvoir être corrélée avec l'indice de chimiorésistance dans les deux types de lignées cellulaires étudiées.

Une plus grande sensibilité à un anticancéreux demande la détermination de caractéristiques biochimiques spécifiques afin de pouvoir se focaliser sur la lutte contre la chimiorésistance. Ayant mis en évidence diverses modifications dans les cellules sensibles et résistantes à l'adriamycine ou au cis-platine, nous nous sommes intéressés au problème de réversion de la chimiorésistance. Pour ce faire, nous avons utilisé quatre chimiosensibilisateurs décrits dans la littérature (vérapamil, buthionine sulfoximine, trifluopérazine et tamoxifène) et étudié leurs effets sur le taux de glutathion (réduit et oxydé) et des enzymes qui lui sont associées. Cette étude a été effectuée dans des cellules résistantes à l'adriamycine et repose sur le fait que les cellules MCF-7 sont connues pour leurs activités glutathion transférase et peroxydase particulièrement modifiées. Ces quatre chimiosensibilisateurs induisent comme modification la plus commune une diminution du taux de glutathion. Aucune généralisation ne peut, par contre, être effectuée concernant l'effet de ces substances sur les enzymes associées au métabolisme du glutathion.

Si l'on considère les cellules MIP-101, cellules résistantes *de novo* à l'adriamycine, nous pouvons observer une diminution importante du taux de glutathion. En ce qui concerne les activités enzymatiques, si ce n'est la γ -glutamyl transpeptidase, la tendance générale des autres enzymes est une diminution d'activité dans les cellules résistantes et un accroissement dans les cellules sensibles. L'ensemble de ces modifications conduit à une diminution du rapport MIP-101/DLD-1 contribuant à la réversion du phénomène de chimiorésistance.

Le glutathion subit les mêmes modifications dans les cellules MCF-7 et P-388 résistantes que dans les cellules MIP-101. Les enzymes les plus modifiées, dans les cellules MCF-7, sont les glutathion peroxydases et, dans les cellules P-388, les glutathion transférases. Ainsi, deux lignées cellulaires résistantes à l'adriamycine et sélectionnées selon un protocole identique ne semblent pas mettre en cause les mêmes mécanismes d'action afin d'induire une chimiorésistance.

En raison du mécanisme d'action physiologique d'un composé tel que le vérapamil, il s'avérait également intéressant d'étudier l'effet éventuel des différents chimiosensibilisateurs décrits dans cette étude sur le taux de calcium et, par extension, sur celui d'AMP cyclique, deux messagers pour lesquels des interrelations ont été établies. Ce travail n'a été effectué que sur les cellules MCF-7.

La neutralisation de l'activité accrue des enzymes du métabolisme du glutathion, peu documentée, représente également un des objectifs fixés par nos travaux de recherche. En vue d'atteindre cet objectif, une étape importante nous a semblé l'élaboration d'analogues non peptidiques du glutathion dans l'intention de modifier les activités d'enzymes utilisatrices de ce tripeptide i.e. glutathion peroxydases et transférases, principalement. Ce présent travail fournit une série de résultats expérimentaux démontrant que la pénicillamine-hydantoïne constitue un analogue non peptidique du glutathion capable de modifier l'activité de diverses enzymes du métabolisme du glutathion. La modélisation moléculaire nous a permis de mettre en évidence divers types d'interactions entre la pénicillamine-hydantoïne et le site actif de la glutathion peroxydase et d'utiliser cette molécule comme modèle pour d'autres pharmacomolécules. La pénicillamine-hydantoïne s'est révélée douée de propriétés d'inhibiteur et d'inactivateur des glutathion peroxydases. Cependant, des essais effectués *in vivo* en vue de réverser la chimiorésistance par la pénicillamine-hydantoïne ont malheureusement mis en évidence une dégradation très importante de cette pharmacomolécule ne permettant pas d'envisager une utilisation thérapeutique.

Cette étude a donc été effectuée sur des modèles cellulaires *in vitro* et il serait intéressant de vérifier certains de ces paramètres *in vivo*. En effet, dans ce cas, l'environnement s'avère différent (état nutritionnel des cellules, présence de facteurs de croissance spécifiques, importance du pH, de la vascularisation, du degré d'oxygénation et du métabolisme de l'anticancéreux). Le but de tout oncologue étant de traiter les cellules tumorales à des sites métastatiques, une compréhension de l'environnement cellulaire pourrait permettre l'élaboration d'une chimiothérapie plus efficace.

En fait, la chimiorésistance est un problème complexe et les réponses peuvent varier d'un individu à l'autre. Les difficultés de traitement qui en résultent diminuent les chances de succès de la chimiothérapie. Il faut donc considérer simultanément plusieurs mécanismes de résistance afin de tenter de sélectionner des anticancéreux efficaces. Le développement de formes améliorées de médicaments actifs qui peuvent avoir de multiples effets chimiques ou biochimiques connus peut être guidé par l'objectif d'éliminer les actions inutiles à leur activité antitumorale. De plus, en raison de la coexistence de plusieurs facteurs de résistance, la réversion de ce phénomène doit passer par l'utilisation de chimiosensibilisateurs et même par une combinaison de ceux-ci afin d'obtenir un effet thérapeutique plus important.

Ainsi, il apparaît intéressant de pouvoir disposer de tests prédictifs rapides, simples, efficaces et reproductibles, nécessitant de faibles quantités de "matériel", permettant de mettre en évidence un éventuel phénomène de résistance même dans le cas de tumeurs particulièrement hétérogènes.

METHODOLOGIE

1. CULTURE CELLULAIRE

Afin de réaliser cette étude, **différentes lignées cellulaires** ont été sélectionnées.

Parmi celles-ci, des cellules *sensibles et résistantes à l'adriamycine* :

- des cellules de carcinome mammaire humain (MCF-7) gracieusement fournies par le Docteur Kenneth Cowan (Medicine Branch, NCI, NIH, Bethesda)
- des cellules de leucémie murine (P-388) obtenues par l'intermédiaire du Professeur Awtar Krishan (School of Medicine, University of Miami, Jackson Memorial Medical Center)
- des cellules de leucémie murine (L-1210) sensibles et résistantes, le processus de sélection de cellules résistantes était réalisé au sein du laboratoire par Nicole Pommery (Faculté de Pharmacie, Lille)
- des cellules de carcinome du colon sensibles (DLD-1) et résistantes (MIP-101) *de novo* à l'adriamycine; les cellules MIP-101 ont été gracieusement fournies par le Docteur Peter Thomas (Harvard Medical School, Boston) et les cellules DLD-1 ont été achetées à l'ATCC.

Les cellules (MCF-7, P-388, L-1210) résistantes ont été isolées à partir de la lignée sensible par sélection en présence de quantités croissantes d'adriamycine dans le milieu. Les cellules utilisées lors des expériences sont maintenues en culture dans un milieu dépourvu d'adriamycine.

mais aussi des cellules *sensibles et résistantes au cis-platine* :

- des fibroblastes de souris NIH 3T3, cellules normales et transfectées par *ras* (résistantes au cis-platine), cellules obtenues auprès du Docteur Maud Collyn (INSERM U 124, Lille)
- des cellules de leucémie murine L-1210 sensibles et résistantes au cis-platine obtenues au laboratoire par transplantations successives de cellules L-1210 à des souris traitées ou non par le cis-platine.

Afin d'obtenir ces cellules, le procédé utilisé fut le suivant : les souris ont reçu, lors de la première transplantation, $5 \cdot 10^5$ cellules L-1210 en administration intrapéritonéale. Après quelques jours, une ascite se manifesta et les cellules contenues dans cette ascite furent prélevées, comptées et réinjectées ($5 \cdot 10^5$ cellules) à une autre souris. Les souris témoins n'ont reçu que des cellules L-1210 par transplantations successives, les souris traitées recevaient des cellules L-1210 et dans le premier groupe de souris, du cis-platine à J1 (à une dose de 8mg/kg) et dans le second groupe à J4 (à une dose de 5 mg/kg). Ceci permit l'obtention de deux groupes de cellules résistantes au cis-platine, l'indice de résistance obtenu avec l'administration de cis-platine à J1 étant le plus élevé.

La Figure 42 présente les données concernant la durée de vie des souris témoins (environ 10 jours) et celle des souris traitées par le cis-platine (21 jours lors de la première transplantation suivie d'une tendance à un niveau proche de celui des témoins).

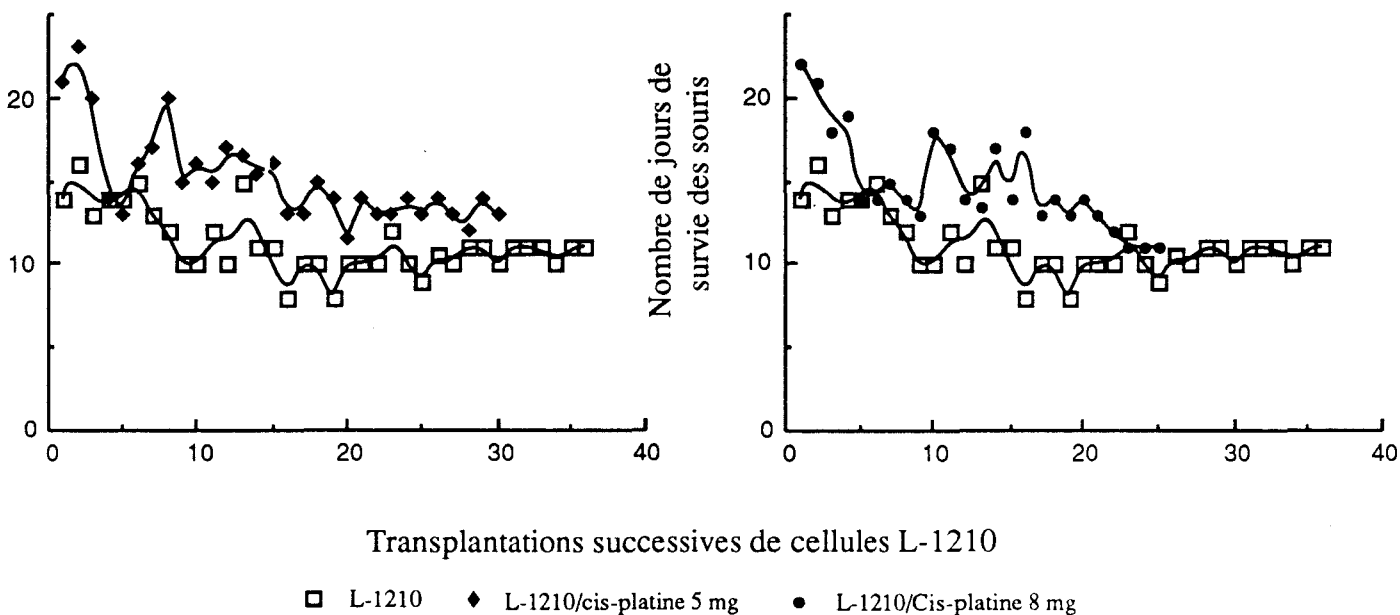


Figure 42 : Processus de sélection de cellules résistantes au cis-platine.

Conditions de culture des cellules.

Les cellules MCF-7 (cellules en monocouche), L-1210 (cellules en suspension), DLD-1 (cellules en monocouche) et MIP-101 (cellules en monocouche) sont entretenues dans le milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, de la glutamine (2mM), de la pénicilline (100 unités/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml) en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ à 37°C.

Les cellules P-388 (cellules en suspension) sont maintenues dans les mêmes conditions que les cellules précédentes excepté le fait que le milieu RPMI contient également de l'acide N-2 hydroxyéthylpipérazine-N-éthane sulfonique (HEPES) à une concentration de 10 mM et 50 µM de β-mercaptoéthanol.

Les cellules NIH 3T3 ont été mises en culture dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, de la glutamine (2mM), de la pénicilline (100 unités/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml) à 37°C.

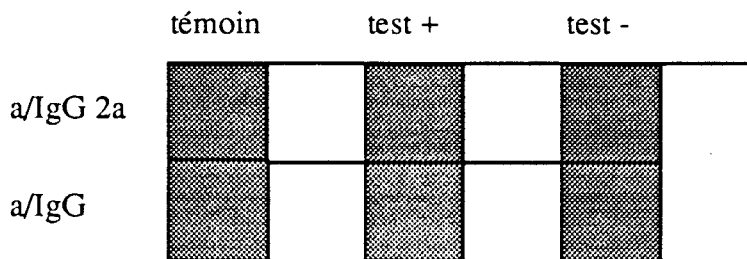
2. DETECTION DE LA GLYCOPROTEINE P

La glycoprotéine P peut être détectée par immunofluorescence indirecte en utilisant l'anticorps C 219 (P-GlycoCHECK C219, Centocor Diagnostics). L'anticorps C 219 est un anticorps monoclonal dirigé contre un site intra-cytoplasmique hautement conservé situé dans la partie C terminale de la protéine (Kartner et al., 1985). Il reconnaît, de ce fait, la glycoprotéine P de diverses origines. L'anticorps C 219 d'origine murine a été obtenu par immunisation avec des extraits membranaires de cellules de la lignée d'ovaires de hamster chinois (CHO) et de lignées humaines mdr résistantes; c'est un anticorps anti-immunoglobuline G 2a.

Technique

- Les cellules sont trypsinisées dans le cas de cellules en monocouche puis centrifugées à 100 g/min pendant 10 minutes. Le culot, repris dans du PBS (solution saline avec tampon phosphate de Dulbecco), est remis en suspension et soumis à une seconde centrifugation dans les mêmes conditions.
- Le culot de cellules est remis en suspension dans un volume de PBS correspondant à 2 fois le volume du culot.
- Les cellules sont déposées sur des lames pour immunofluorescence (Bio-Mérieux), séchées puis fixées dans de l'acétone glaciaire à -20°C durant 20 minutes.
- Les lames sont séchées puis les sites non spécifiques sont saturés avec 20 µl de PBSG pH 7 (PBS gélatine, concentration en gélatine de 0,1%) durant 30 minutes à température ambiante.
- Après élimination du PBSG, les cellules sont incubées :
 - pour le témoin, avec 10 µl de PBSG
 - pour le test, avec 10 µl d'anticorps C 219 dilué au 1/25 dans du PBSG
 - pour le test négatif, avec 10 µl d'anticorps négatif de souris dilué au 1/25 dans du PBSG
 durant 30 minutes à 37°C en chambre humide.
- Les cellules sont ensuite lavées 5 fois avec 20 µl de PBSG et ce, toutes les 5 minutes.

- Après élimination du PBSG, les cellules sont incubées avec 10 μ l d'anticorps anti IgG 2a de souris biotinylé (anticorps de chèvre anti-souris) (Amersham) dilué au 1/25 dans du PBSG
ou
anti IgG de souris biotinylé (anticorps de cheval anti-souris) (Centocor Diagnostics) dilué au 1/25 dans du PBSG
durant 30 minutes à 37°C en chambre humide.
- Les cellules sont ensuite lavées 5 fois avec 20 μ l de PBSG et ce, toutes les 5 minutes.
- Après élimination du PBSG, les cellules sont incubées avec 10 μ l d'un mélange streptavidine-fluorescéine (Boehringer) 1/50 - bleu Evans 1/10 000 (dilués dans du PBSG) durant 30 minutes à 37°C en chambre humide.
- Les cellules sont ensuite lavées 5 fois avec 20 μ l de PBSG et ce, toutes les 5 minutes.
- Les lames sont montées dans du DABCO, recouvertes d'une lamelle et observées sous un microscope ZEISS Axiophot.
- Les photographies (EKTACHROME 400) ont été effectuées en utilisant un grossissement de 1000 (filtre d'excitation : 490, filtre d'émission : 525).



exemple type de lame

DABCO :

2,5% de DABCO en PBS-glycérol (1 vol/ 9 vol), solution ajustée à un pH de 8 avec de l'HCl 1N.

3. NORTHERN BLOT

3.1. EXTRACTION DE L'ARN

La principale source d'échec dans toute tentative d'extraction de l'ARN est la contamination par les ribonucléases, enzymes très stables. Pour éviter toute contamination, il convient de filtrer les solutions (0,22 μm) ou de les traiter par le diéthylpyrocarbonate (DEPC) et de les autoclaver.

- Les cellules sont rincées au tampon PBS stérile, le PBS est enlevé puis les cellules sont grattées à l'aide d'un "rubber policeman" dans un peu de tampon PBS stérile.
- Après centrifugation de la suspension cellulaire à 700 g/min pendant 3 à 4 minutes et lavage du culot avec du tampon PBS stérile, le culot est repris dans 5 ml de tampon de lyse isothiocyanate de guanidium (GT) (isothiocyanate de guanidium 4 M, citrate trisodique 6 mM, β -mercaptoéthanol 0,7%, sarcosyl 20 mM, diéthylpyrocarbonate 1 ‰).
- Le lysat obtenu est homogénéisé (20 coups) dans un Dounce puis on y ajoute 2 g de chlorure de césium pour précipiter l'ARN.
- Homogénéiser dans le Dounce (20 coups), passer à plusieurs reprises l'homogénat fluide au travers d'une fine aiguille afin de casser l'ADN.
- Déposer dans des tubes Beckman pour rotor SW 41 un coussin de 3,2 ml de chlorure de césium (CsCl 5,7M - EDTA 0,1 M).
- Couler doucement en obtenant deux phases les 5 ml d'homogénat et équilibrer avec du tampon GT.
- Ultracentrifuger à 150 000 g/min pendant 16 heures à 18°C. On réalise un gradient de densité, ce qui permet de séparer les protéines, l'ADN et l'ARN. Le culot contient l'ARN que l'on veut extraire.

Il est alors récupéré de la façon suivante :

- clamage du tube pour éviter le mélange ADN-ARN
- élimination du surnageant
- coupure du tube
- Le culot est repris par 2 x 0,5 ml de Tris - EDTA - SDS 1%. Bien homogénéiser.
- Récupérer dans des tubes à centrifuger. Ajouter 2 ml d'un mélange chloroforme/butanol (rapport 4/1). Agiter vigoureusement et centrifuger à 2000 g/min pendant 5 minutes. Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter 1 ml de Tris - EDTA. Agiter vigoureusement et centrifuger à 2000 g/min pendant 5 minutes.
- Après avoir récupéré la phase aqueuse, ajouter 2 volumes d'éthanol refroidi à -20°C et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M.
- Laisser à - 80°C pendant 2 heures minimum pour précipiter l'ARN.

3.2. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN ARN

- Centrifuger à 18 000 g/min pendant 45 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Reprendre le culot par un volume donné d'eau traitée au DEPC (le volume étant fonction de la taille du culot). Bien homogénéiser.
- Prélever un échantillon de 10 µl de cette solution et le déposer dans 990 µl de Tris 5 mM pour mesurer l'absorbance à 260 et 280 nm.

La mesure de l'absorbance à 260 nm permet de déterminer la concentration en ARN.

- Aliquoter le reste de la solution en fractions correspondant à 25 γ d'ARN, ajouter 2 volumes d'éthanol refroidi à -20°C et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M. Les aliquots sont conservés à -80°C.

3.3. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE EN PRESENCE DE FORMALDEHYDE

L'électrophorèse est pratiquée dans une cuve horizontale en présence d'un agent dénaturant, le formaldéhyde, afin de détruire la structure secondaire des ARN.

Tampons et solutions

* Tampon MOPS 10 X pH 7

- | | |
|--|--------|
| - MOPS (morpholinopropanesulfonic acid) | 20 g |
| - acétate de sodium 3 M | 8,4 ml |
| - EDTA 0,5 M | 10 ml |
| - H ₂ O DEPC | 400 ml |
| ajuster à pH 7 avec de la soude 3 M (environ 16 ml) qsp H ₂ O DEPC 500 ml | |

* Eau DEPC

concentration en DEPC de 1 ‰

* Composition du gel

- agarose	1,8 g
- eau DEPC	109,2 ml
- tampon MOPS 10 X	15 ml
- DEPC	15 μ l
- formaldéhyde	25,5 ml, solution désionisée sur résine Bio-Rad AG501 -X8.

* Tampon de migration

Tampon MOPS 1 X

* Tampon de dénaturation de l'échantillon

- formamide désionisé sur résine	500 μ l
- formaldéhyde désionisé sur résine	178 μ l
- MOPS 10 X	100 μ l
- eau DEPC qsp 1 ml	

* Tampon de bleu de bromophénol

- EDTA 1M pH 7,4	40 ml
- glycérine	50 ml
- bleu de bromophénol	100 mg
- Ficoll 400	200 mg

* Solution colorante pour le gel

solution stock de bromure d'éthidium à 1 g/100 ml

Technique

- Traiter la cuve à électrophorèse avec de la soude 0,5 N pendant 30 minutes puis rincer abondamment avec de l'eau DEPC.
- Préparer le gel : faire bouillir le mélange mais n'ajouter le formaldéhyde désionisé qu'après refroidissement (60°C).
- Couler le gel. Laisser durcir durant environ une heure avant d'enlever le peigne.
- Placer le gel dans la cuve contenant le tampon de migration.
- Les échantillons d'ARN aliquotés et stockés à -80°C sont centrifugés à 12 880 g/min pendant 45 minutes.
Éliminer les surnageants et placer les tubes contenant les culots dans la glace.

- Reprendre les culots par 20 µl de tampon de dénaturation froid. Après avoir remis les culots en suspension, les placer au bain-marie à 68°C pendant 5 minutes.
- Plonger immédiatement les tubes dans la glace.
- A chaque échantillon, ajouter 6 µl de solution de bleu de bromophénol.
- Déposer la totalité dans les puits. Laisser migrer une nuit à température ambiante à 30 volts.
- Démouler le gel et le laver dans du tampon SSC 10 X sous agitation deux fois une heure (SSC : standard sodium citrate; la concentration est exprimée en multiples de la concentration du tampon de base : 0,15 M NaCl / 0,015 M citrate trisodique).
- La partie du gel qui doit être transférée n'est pas colorée par le bromure d'éthidium. Par contre, la partie du gel destinée à la visualisation sous UV de l'échelle de taille de l'ARN est placée dans la solution de bromure d'éthidium (100 µl de solution stock/100 ml SSC 10 X) durant 5 minutes sous agitation puis décolorée dans du tampon SSC 10 X (renouveler le tampon) pendant plusieurs heures et photographiée.

3.4. TRANSFERT

Après une électrophorèse en gel d'agarose, les fragments d'ARN sont transférés par capillarité sur un support solide (nitronylon) à température ambiante. Afin que la fixation devienne irréversible, la membrane doit subir une cuisson.

- Sur une cuve contenant le tampon de transfert SSC 20 X,
 - . poser une plaque de verre puis un pont de papier Whatman 3 dont les deux extrémités trempent dans la cuve (assure une hydratation en continu)
 - . déposer le gel puis la membrane de nitronylon (préalablement mouillée dans de l'eau puis du SSC 20 X) tout en évitant les bulles d'air
 - . ajouter deux feuilles de papier Whatman 1 (humidifiées dans du SSC 20 X, un paquet de papier buvard (très hydrophile pour absorber le liquide contenu dans le gel d'agarose et donc créer un courant liquide ascendant qui entraîne l'ARN sur le nitronylon), une plaque de verre et un poids.

Le transfert se fait pendant 15 à 20 heures.

3.5. MARQUAGE DE LA SONDÉ PAR LE SYSTÉME DES AMORCES MULTIPLES

Principe

La technique repose sur l'utilisation d'hexanucléotides pour amorcer la synthèse d'ADN en de nombreux sites à partir d'un fragment d'ADN simple brin. Parmi les différents hexanucléotides, il s'en trouvera obligatoirement quelques uns qui s'hybrideront avec ce fragment. Ces petits oligonucléotides servent alors d'amorce pour le fragment de Klenow de la DNA polymérase I qui reconstitue le second brin (extension d'amorce). Parmi les désoxyribonucléotides triphosphates, les déoxycytidines ajoutées étant radioactives, le brin néosynthétisé est hautement radioactif.

Marquage

Utilisation du kit Amersham "Marquage par amorces multiples de l'ADN".

Dans un tube eppendorf, introduire 23 μl d'eau stérile et 5 μl de la solution contenant 25 ng d'ADN.

Plonger le tube dans l'eau bouillante pendant 2 minutes afin de séparer les deux brins de l'ADN. Cette séparation est suivie d'un refroidissement brutal du tube dans la glace.

Ajouter dans l'ordre :

11 μl de tampon multiprime

4 μl de primer solution (hexanucléotides pris au hasard)

5 μl de dCTP 32

2 μl de solution d'enzyme (fragment de Klenow d'ADN polymérase I)

Le volume total de solution dans le tube est de 50 μl .

Incuber à température ambiante pendant au moins 2 heures.

Les nucléotides non incorporés sont séparés de la sonde marquée par chromatographie (Sephadex G50).

Après dénaturation, la radioactivité est mesurée sur un aliquot.

3.6. PREHYBRIDATION ET HYBRIDATION

Cette étape va permettre de visualiser le signal d'hybridation entre l'ARN recherché et la sonde marquée au P32. Préhybridation et hybridation sont réalisées à 42°C dans un sac hermétiquement scellé et dans le même tampon (SSPE 5 X, formamide 50%, Denhardt's 5 X, 2 ml de sperme de saumon à 1 mg/ml, 1 g de SDS).

* Composition du Denhardt's 50 X

Ficoll 400	1 g
polyvinylpyrrolidone	1 g
sérum albumine de boeuf	1 g
eau	qsp 100 ml

* Le SSPE 20 X, solution de pH 7,4 comprend du NaCl 3 M, du NaH₂PO₄ H₂O 0,2 M et de l'EDTA 20 mM.

Préhybridation

Pendant 2 heures à 42°C.

Hybridation

La sonde radioactive est additionnée au tampon de préhybridation (environ 30 millions de coups/ 235 cm² de blot).

Lavages

Ces lavages vont permettre d'éliminer l'excès de sonde et la sonde retenue de façon non spécifique sur la membrane

- premier lavage à température ambiante dans une solution de SSC 2 X
- lavages avec une solution à 65 °C de SSC 2 X - SDS 0,1%.

Séchage

Le séchage s'effectue à 42°C.

3.7. AUTORADIOGRAPHIE

La membrane est emballée dans du cellofrais, mise en contact avec un film Amersham dans une cassette à -80°C. Le temps d'exposition varie de quelques heures à plusieurs jours selon l'intensité du signal.

4. DOSAGE DU GLUTATHION, DE LA GLUTATHION REDUCTASE, DES GLUTATHION TRANSFERASES ET PEROXYDASES, DE LA γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE ET DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE

4. 1. DOSAGE DU GLUTATHION PAR HPLC ET DETECTION ELECTROCHIMIQUE (E. Morier-Teissier et al., 1992)

Matériel

- Une pompe WATERS 600 E SYSTEM CONTROLLER équipée d'un injecteur U6K (Millipore)
- Une colonne chromatographique Novapack CD ODS (150 x 3,9 mm; 4 μ m) permettant de réaliser une chromatographie en phase inverse. Un détecteur ampérométrique BAS LC 4B équipé d'une électrode de travail en carbone vitreux ou d'une électrode or/mercure, ainsi que d'une électrode de référence Ag/AgCl
- Un intégrateur MERCK D 2500.

Standard

Préparation des solutions standards

Les solutions standards de GSH et GSSG sont préparées à une concentration de 10^{-2} M dans de l'acide sulfosalicylique (SSA) 0,5 % (20 mM) contenant 1 mM d'EDTA. La solution dite GSH contient du GSSG dans un rapport GSH/GSSG de 200. Des aliquots sont stockés à -20°C et dilués immédiatement avant utilisation à une concentration de 10^{-4} ou 10^{-5} M dans du SSA 0,5%.

Elimination des thiols

20 μ l de solution standard de glutathion 10^{-5} M ou de surnageant dans le SSA sont mélangés avec 20 μ l de N-éthylmaléimide (NEM) 2mM et 20 μ l de Tris (pH 8,5; 0,1M). La solution est ensuite placée à 0°C pendant 1 minute.

Réduction de GSSG en GSH

Pour mesurer le glutathion total (GSH + GSSX), 20 μ l de solution standard de glutathion 10^{-5} M ou de surnageant sont mélangés avec 20 μ l de Tris (pH 8,5; 0,1 M) et 20 μ l de dithiothréitol

(DDT) (10^{-2} M). Après 30 minutes à 0°C , le DDT est éliminé par extraction à l'acétate d'éthyle ($3 \times 500 \mu\text{l}$). Dans les échantillons successivement traités par NEM et DDT, seul le GSSG contenu dans le mélange est mesuré.

Préparation des extraits cellulaires

Un million de cellules sont centrifugées à $100\text{g}/\text{min}$ pendant 10 minutes, puis remises en suspension dans $500 \mu\text{l}$ de PBS et recentrifugées dans les mêmes conditions. Les cellules précipitées, remises en suspension dans $200 \mu\text{l}$ de SSA 0,5% ou une solution de SSA contenant 50 mM de NEM afin d'éviter l'oxydation possible du GSH en GSSG, sont congelées à -20°C durant 2 heures. Après décongélation, les cellules sont centrifugées durant 10 minutes à $700 \text{g}/\text{min}$.

Dosage du glutathion par l'électrode de carbone

Eluant

L'éluant contient 10% de méthanol et 90% de tampon hydrogénophosphate-disodium (Na_2HPO_4) 0,1M pH 7. Il est filtré et dégazé préalablement aux ultra-sons.

La vitesse d'élution est de $0,5 \text{ ml}/\text{min}$. Les pics sont détectés à $+0,80 \text{ V}$ et 50 nA .

Mode opératoire de la dérivation

La solution d'orthophthalaldéhyde (OPA) est préparée en dissolvant 50 mg de réactif OPA dans $0,5 \text{ ml}$ de méthanol et en diluant ceci dans un volume final de 10 ml avec du borate de potassium $0,4 \text{ M}$ pH 9,9. Cette solution peut être stockée plusieurs semaines à 4°C sans perdre son activité. La dérivation est effectuée à température ambiante en mélangeant $10 \mu\text{l}$ de GSH 10^{-5} M (100pmoles) avec $10 \mu\text{l}$ de solution OPA (370 nmoles) dans un tube de polypropylène. Après 1 minute, le complexe dérivatisé est chromatographié. Une diminution de l'excès d'OPA n'a pas été réalisée car l'excès d'OPA n'est pas accumulé dans la colonne et n'est pas détecté. De plus, l'excès d'OPA est utile pour transformer le pic correspondant au DDT en un nouveau pic qui correspond au DTT-OPA.

Méthode de dosage du GSH

$10 \mu\text{l}$ de la solution standard de GSH ou $10 \mu\text{l}$ de surnageant sont mélangés avec $90 \mu\text{l}$ d'OPA (réactif de dérivation). Après 1 minute, l'ensemble ($100 \mu\text{l}$) est injecté.

Dosage du glutathion par l'électrode de mercure

Eluant

L'éluant utilisé est un mélange de

- dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) 0,1 M amené à pH 3 par addition de H_3PO_4
- acide heptane sulfonique 3 mM

Il est filtré (0,45 μM) et dégazé préalablement aux ultra-sons.

La vitesse d'élution est de 0,5 ml/min. Les pics sont détectés à +0,15 V et 200 nA.

Le temps d'élution du glutathion est de 6,4 minutes et celui de la pénicillamine, standard interne, de 12 minutes.

Méthode de dosage du GSH

10 μl de préparation de cellules sont injectés directement.

4.2. DOSAGE DE LA GLUTATHION REDUCTASE

Principe

Le principe de la réaction a été donné dans la partie introduction.

Technique

La mesure de l'activité enzymatique est basée sur la diminution dépendante du GSSG de l'absorbance à 340 nm reflétant la consommation du NADPH.

La *composition du milieu réactionnel* (1 ml) est pour la cuvette test :

400 μl de tampon phosphate 0,25 M pH 7,6

100 μl de GSSG 10 mM

50 μl de NADPH 2 mM

cytosol de foie de rat ou de cellules

eau qsp 1 ml

Le dosage a été effectué à 30°C contre un blanc (cuvette test sans GSSG) (Carlberg et Mannervik, 1975).

4.3. DOSAGE DES GLUTATHION TRANSFERASES

Principe

Le principe de la réaction a été donné dans la partie introduction.

Technique

Le glutathion peut réagir avec différents substrats. Le produit de la réaction absorbe la lumière à une longueur d'onde dépendant du type de conjugué du glutathion (conjugué glutathion-acide éthacrinique (ECA) : 270 nm, conjugué glutathion-chlorodinitrobenzène (CDNB) : 340 nm (Habig et al. , 1974)).

La *composition du milieu réactionnel* (1 ml) est pour la cuvette test:

200 µl de tampon phosphate 0,5 M pH 6,5

50 µl de GSH 20 mM et 20 µl de CDNB 50 mM

ou 12,5 µl de GSH 20 mM et 20 µl d'acide éthacrinique 10 mM

cytosol de foie de rat ou de cellules

eau qsp 1 ml

Le dosage a été effectué à 30° C contre un blanc (cuvette test sans cytosol) (Habig et al. , 1974).

4.4. DOSAGE DES GLUTATHION PEROXYDASES

Principe

Le principe de la réaction a été donné dans la partie introduction.

Technique

L'activité de la glutathion peroxydase peut être déterminée en utilisant le peroxyde d'hydrogène, l'hydroperoxyde de *tert*-butyle ou l'hydroperoxyde de cumène comme substrats (ROOH) et en

couplant la réaction à celle qui est catalysée par la glutathion réductase. En fait, le glutathion réduit (GSH) réagit avec le peroxyde pour former du glutathion oxydé (GSSG). Ce dernier est dosé en présence d'un excès de glutathion réductase et de NADPH par la vitesse d'oxydation du triphosphonucléotide mesurée à 340 nm.

La composition du milieu réactionnel (1 ml) est pour la cuvette test :

400 µl de tampon phosphate 0,25 M pH 7,6

50 µl de GSH 20 mM

50 µl de NADPH 2 mM

1 UI de glutathion réductase

10 µl d'hydroperoxyde de cumène (COOP) 10 mM

ou 10 µl d'hydroperoxyde de *tert*-butyle (T-but) 20 mM

ou 10 µl d'azide 100 mM et 2,5 µl d'hydroperoxyde d'hydrogène (H₂O₂) 100 mM

eau qsp 1 ml

Le dosage a été effectué à 30° C contre un blanc (cuvette test sans cytosol) (Carmagnol et al., 1983; Lawrence et Burk, 1976).

4.5. DOSAGE DE LA γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE

Principe

L'activité de la γ -glutamyltransférase est déterminée suivant la méthode décrite par Szasz (Szasz, 1969). Cet essai utilise la γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide et la glycylglycine comme substrats.

Technique

La composition du milieu réactionnel (1,2 ml) est pour la cuvette test :

800 µl de tampon 0,1 M Tris- 0,15 M glycylglycine pH 8

200 µl de triton X/100 (2%)

100 µl de L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 6mM

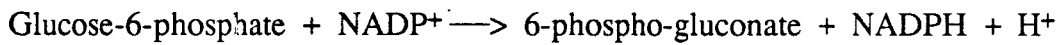
eau qsp 1, 2 ml

Le dosage a été effectué à 30° C contre deux blancs (cuvette test sans microsomes et cuvette test sans substrat) à 405 nm.

4.6. DOSAGE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE

Principe

La glucose-6-phosphate déshydrogénase catalyse la réaction suivante (Reed, 1986) :



Technique

La mesure de l'activité enzymatique est basée sur l'augmentation de l'absorbance à 340 nm reflétant la formation du NADPH.

La *composition du milieu réactionnel* (1 ml) est pour la cuvette test :

800 µl de tampon 0,1 M Tris pH 7,4

25 µl de NADP 2 mM

10 µl de glucose-6-phosphate 0,1 M

Le dosage a été effectué à 30° C contre un blanc (cuvette test sans glucose-6-phosphate).

5. ACTIVITE DES TOPOISOMERASES

Différents tests permettent de détecter l'activité topoisomérase de type II : relaxation d'ADN surenroulé, dénouage de l'ADN du phage T4 qui existe naturellement noué, décaténation d'ADN kinétoplastique de trypanosome. Les produits de ces réactions sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, la séparation s'effectuant en fonction de leur taille et de leur structure topologique. Ils peuvent être quantifiés par analyse densitométrique ou, lors de l'utilisation d'un substrat marqué par un radioélément, à l'aide d'un compteur à scintillation (Liu et Davis, 1981; Miller et al., 1981).

En ce qui nous concerne, nous avons utilisé de l'ADN de kinétoplaste marqué radioactivement, gracieusement fourni par le Docteur Jean-Marie Saucier (UA 147 CNRS - U 140 INSERM, Villejuif), afin d'étudier l'activité de décaténation de différentes lignées cellulaires.

Principe :

L'ADN kinétoplastique (ADN mitochondrial du trypanosome) comprend un réseau de milliers de mini-cercles caténés. La décaténation de l'ADN kinétoplastique s'effectue en présence de la topoisomérase II qui, par des coupures transitoires double-brin, libère les mini-cercles du réseau. Les mini-cercles sont isolés du kADN tritié résiduel par centrifugation. Dans ces conditions, le kADN sédimente dans le fond du tube tandis que les mini-cercles restent dans le surnageant. Une fraction du surnageant prélevée délicatement est directement mise dans du liquide scintillant et la radioactivité qu'elle contient est évaluée.

5.1. PREPARATION DES FRACTIONS NUCLEAIRES

Pour chaque lignée cellulaire mentionnée précédemment, des extraits nucléaires ont été préparés à partir d'environ 10 à 50×10^6 cellules.

En vue de minimiser la protéolyse durant le procédé d'extraction, des inhibiteurs de protéases (phénylméthylsulfonylfluoride, benzamidine, aprotinine et un inhibiteur de trypsine préparé à partir de graines de soja à des concentrations finales respectives de 1 mM, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml et 10 μ g/ml) ont été préparés et ajoutés juste avant utilisation dans les tampons A, A', B, C et dans le PBS.

Les cellules en monocouches sont trypsinisées, centrifugées à 100 g/min durant 10 minutes. Le culot est remis en suspension dans du PBS froid et centrifugé dans les mêmes conditions.

Les étapes ultérieures sont effectuées à 4°C.

Les culots cellulaires sont lysés dans 100 µl de tampon A; 1 ml de tampon A' est ajouté (à l'exception des cellules L-1210 et P-388, ajout de 1 ml de tampon A). La suspension est mélangée doucement durant 10 minutes puis les noyaux, isolés par homogénéisation au Dounce (20 coups), sont déposés sur 10 ml de tampon A/sucrose. Les noyaux sont précipités par centrifugation (1900 g, 4°C, 30 min.).

Les noyaux purifiés sont doucement remis en suspension dans 400 µl de tampon B. Un volume précis de tampon C est ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 0,35 M.

Après 30 minutes, le matériel insoluble est précipité par centrifugation à 12 000 g durant 30 minutes.

Tampons et solutions

* PBS froid

* tampon A : Tris HCl 10 mM pH 7, MgCl₂ 1 mM

* tampon A' : tampon A contenant du NP 40 à 1%

* tampon A/sucrose : tampon A contenant 45% (W/V) de sucrose

* tampon B : NaCl 10 mM, Tris HCl 10 mM pH 7, MgCl₂ 0,6 mM

* tampon C : NaCl 1,5 M, Tris HCl 10 mM pH 7, MgCl₂ 0,6 mM

5.2. DOSAGE DES TOPOISOMERASES DANS LES FRACTIONS NUCLEAIRES

Technique

- Répartir 45 µl de milieu réactionnel dans un tube eppendorf
- Ajouter 5 µl d'enzyme (tampon de dilution de l'enzyme avec de la sérum albumine de boeuf (BSA))
- Incuber 15 minutes à 30°C
- Ajouter 50 µl de NaCl 2M-Na₃EDTA 10 mM

- Centrifuger 10 minutes à 12 000 g/min
- Prélever 50 μ l
- Ajouter 1,35 ml d'eau distillée
2,65 ml de liquide de scintillation Instagel
- Comptage au compteur à scintillation.

Solutions

* ATP neutralisé

107 μ l d'ATP 14 mM
3,4 μ l de NaOH 1N

* Milieu d'incubation

Tris HCl 40 mM pH 8
KCl 100 mM
MgCl₂ 10 mM
Na₃EDTA 0,5 mM
DTT 0,5 mM
ATP 1 mM
BSA 30 μ g/ml

* Milieu de dilution de l'enzyme

Tris HCl 10 mM pH 8
NaCl 10 mM
Na₃EDTA 0,1 mM
DTT 0,5 mM
BSA 300 μ g/ml
glycérol 10 %

* Milieu réactionnel

29,3 μ l d'eau distillée
10 μ l de tampon 5 X
3,7 μ l d'ATP neutralisé
2 μ l de KDNA [³H]

6. MESURE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

Principe

La mesure directe de la concentration de calcium n'a pu être faite que récemment dans les cellules de petite taille, grâce à l'utilisation de marqueurs photochimiques (Carafoli, 1987).

Le quin 2 est devenu, ces dernières années, le plus populaire des marqueurs fluorescents du calcium. Cette molécule lie le calcium avec une très grande spécificité formant un complexe fluorescent à une longueur d'onde déterminée. Cependant, cette sonde ne présentait qu'une fluorescence faible et une extinction rapide.

Deux autres sondes sont ainsi utilisées, le fura-2 et l'indo-1.

Le principe du chargement puis de la rétention de ces molécules est simple. Les sondes ne peuvent traverser la membrane plasmique qu'estérifiées sous forme acétoxyméthylester. Une fois parvenues dans le cytosol, ces molécules estérifiées sont la cible des estérases cellulaires. Les sondes, devenues hydrosolubles, ne peuvent plus franchir la membrane du réticulum endoplasmique.

La sonde choisie dans cette étude est l'indo-1. A une longueur d'excitation de 355 nm, l'indo-1 répond par un spectre d'émission allant de 400 à 480 nm. La propriété de l'indo-1 est de modifier l'allure de son spectre d'émission lorsque les ions calcium se lient aux sites accepteurs présents sur chaque molécule. Le complexe formé par le calcium et l'indo-1 présente un maximum d'absorption à 405 nm alors que le calcium, sous forme libre, présente un maximum à 480 nm (Grynkiewicz et al., 1985).

La concentration en calcium intracellulaire est calculée par la formule suivante :

$$[Ca^{++}]_i \text{ exprimée en nM} = K_d \times \beta \times (R - R_{\min} / R_{\max} - R)$$

Cette formule fait appel

- à β , rapport $F_{480} \text{ libre} / F_{480} \text{ lié}$ (rapport des fluorescences pour une longueur d'onde d'émission de 480 nm en absence de calcium et à saturation)
- au K_d , constante de dissociation de l'indo-1 = 250 nM
- R_{\min} : rapport minimum F_{405}/F_{480} quand il n'y a plus de Ca^{++} lié à l'indo-1
- R_{\max} : rapport maximum F_{405}/F_{480} quand l'indo-1 est saturé en Ca^{++} .

Technique

Le procédé utilisé est le suivant :

- les cellules MCF-7, sensibles et résistantes à l'adriamycine, sont trypsinisées et repiquées sur des lamelles en verre. Les cellules ont été traitées durant 72 heures par quatre chimiosensibilisateurs connus d'après les données de la littérature et permettant de réverser la chimiorésistance (buthionine sulfoximine : 200 μ M, vérapamil : 10 μ g/ml, trifluopérazine : 4 μ M, tamoxifène : 3 μ M).
- après 72 heures, la concentration en calcium est mesurée.
- les lamelles sont incubées durant 75 minutes en présence de 5 μ M d'indo-1/AM (Sigma) à 37°C.

L'indo-1/AM est dilué dans un tampon de pH 7,4 dont la composition est la suivante :

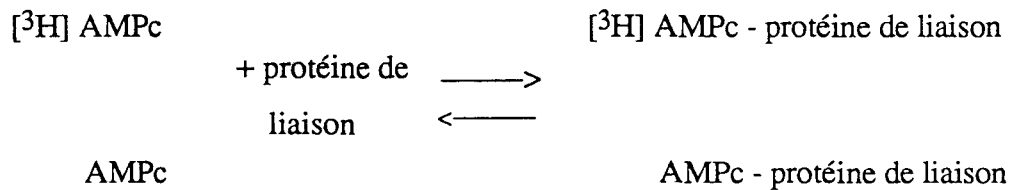
Hépès	20 mM
glucose	5,5 mM
NaCl	145 mM
KCl	5,5 mM
MgCl ₂	0,9 mM
CaCl ₂	1 mM
sérum albumine de boeuf	0,25%
Pluronic	0,15 ‰

- un lavage est effectué avec le même tampon ne contenant pas de sérum albumine de boeuf ni de Pluronic.
- une post-incubation est effectuée en utilisant le même tampon que pour les lavages et les cellules sont ensuite observées sous un microscope NIKON équipé pour la microfluorimétrie à un grossissement de 1000.

7. DOSAGE DE L'AMP CYCLIQUE

Principe

L'utilisation du kit Amersham est basée sur le principe d'une compétition entre l'AMPc non marquée et une quantité fixe d'AMPc marquée pour leur liaison à une protéine de haute affinité et spécificité pour l'AMPc.



La quantité de complexe formé entre l'[^3H] AMPc liée à une protéine de liaison est inversement proportionnelle à la quantité d'AMPc présente dans l'échantillon.

Technique

Les cellules MCF-7 utilisées pour cette étude ont été traitées dans les mêmes conditions que celles réalisées pour la mesure du calcium intracellulaire.

Après trypsinisation, comptage au bleu trypan (colorant d'exclusion), les cellules sont centrifugées à 100g/min durant 10 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du PBS et recentrifugé dans les mêmes conditions.

Utilisation de mini-colonnes (Amprep - Amersham) échangeuses d'ions

Les cellules sont déposées sur ces mini-colonnes.

Au préalable, les colonnes sont conditionnées :
2 ml de méthanol
2 ml d'eau.

Après lavage des colonnes avec 3 ml de méthanol, l'AMPc est récupérée par élution avec 3 ml d'eau acidifiée 0,1N.

L'AMPc ainsi obtenue est ensuite lyophilisée.

Dosage de l'AMPc

- A 50 μ l d'échantillon (dilué dans un tampon 50 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA pH 7,5), on ajoute 50 μ l d' $[^3\text{H}]$ AMPc et 100 μ l de protéine de liaison.
- Les tubes sont alors laissés dans un bain de glace à 4°C durant au moins 2 heures.
- La séparation de l'AMPc sous forme liée de la forme libre est obtenue par adsorption de la forme libre sur du charbon de bois (100 μ l) suivie d'une centrifugation (12 000 g durant 2 minutes).
- Le comptage au compteur à scintillation est effectué sur un aliquot du surnageant.
- La quantité d'AMPc non marquée dans l'échantillon est déduite d'une droite d'étalonnage.

8. MODELISATIONS MOLECULAIRES

8.1. INTERACTION GLUTATHION - MINIVERSION DU SITE ACTIF DE LA GLUTATHION PEROXYDASE

La structure du glutathion a été créée initialement dans le logiciel Chem Draw (Cambridge Scientific) et transférée dans le logiciel Chem 3D Plus (Cambridge Scientific). La structure ainsi obtenue a été minimisée pour son énergie stérique avant d'être soumise à une dynamique moléculaire rapide (température de régime : 310°K; 3 Kcal/atome/psec; temps d'évolution à 13 psec par pas de 2 fsec). La structure résultante fait alors l'objet d'un second cycle plus long (température de régime : 310°K; 1,5 Kcal/atome/psec; temps d'évolution à 30 psec par pas de 1 fsec). Les structures initiale et finale à l'issue de ce traitement sont comparées.

La structure du segment peptidique de l'environnement immédiat du site catalytique de la glutathion peroxydase a été créée initialement dans le logiciel Chem 3D Plus en utilisant les structures préformées présentes dans la banque de structures; la présence d'un pont hydrogène interne (mise en évidence préalablement par données cristallographiques) a été prise en compte dans la construction du modèle.

Dans un premier temps, ce modèle où la cystéine remplace initialement la sélénocystéine (*) du site catalytique est minimisé pour son énergie potentielle. Dans un deuxième temps, le sélénium est introduit pour remplacer le soufre de la fonction thiol de la cystéine du site catalytique. Le glutathion est alors incorporé dans le centre catalytique via une liaison sélénium-soufre et la conformation de l'adduit glutathion-enzyme est minimisée du point de vue de l'énergie potentielle.

Ceci produit un *moule* dans lequel ont pu être installés d'autres substrats potentiels en remplacement du glutathion. Le nouveau modèle est minimisé au niveau de l'énergie potentielle en rigidifiant la *coque* peptidique. Ont pu ainsi être modélisés non seulement l'adduit glutathion-glutathion peroxydase mais aussi divers adduits pharmacomolécules-glutathion peroxydase.

(*) Ceci pour des raisons pragmatiques, certains paramètres du sélénium n'étant pas directement disponibles dans le programme de modélisation moléculaire utilisé.

8.2. INTERACTION GLUTATHION - SITE ACTIF DE LA GLUTATHION PEROXYDASE

Le dispositif informatique utilisé se compose

- d'un Vax 6210
- du matériel de graphisme : écran de visualisation (PS350 (picture system 350) de la société Evans et Sutherland), boîtier de potentiomètres
- de logiciels permettant, de visualiser des molécules à partir des paramètres de la cristallographie contenus dans des banques de données mais aussi, de les manipuler, les modifier, les comparer et les faire interagir avec des substrats.

La présence insolite d'un atome de sélénium a posé quelques problèmes dans la connection de la sélénocystéine, le logiciel ne reconnaissant pas cet élément. La difficulté a été tournée en construisant un résidu où le sélénium est remplacé par un atome de soufre doté d'une géométrie analogue à l'élément initial et respectant l'encombrement spatial de l'atome.

Il s'agit ensuite de modéliser le site actif isolé de la protéine, afin de vérifier les positions des acides aminés. Cette opération est réalisée en sélectionnant les résidus intervenant dans ce site et définis par l'analyse radiocristallographique. Ce site est ensuite étendu en prenant en compte les sous-structures voisines. Le glutathion y est alors placé ("docking"). Celui-ci, choisi sous une forme stable, correspond à la conformation obtenue après une minimisation par le programme Maximin développé pour le logiciel Sybyl. Maximin utilise une méthode empirique, encore appelée mécanique moléculaire, pour minimiser l'énergie.

Une fois dans le site, le cofacteur doit y être ajusté par différentes contraintes, afin de reproduire le modèle de l'interaction proposé par les travaux de Epp et coll. (Epp et al., 1983) (voir Section INTRODUCTION / Paramètres impliqués dans la chimiorésistance).

Le docking étant réalisé, il est alors possible de minimiser l'énergie du complexe. Les résidus se modifient de façon à acquérir une conformation de plus basse énergie et donc plus probable, le glutathion étant lui-même affecté par ces changements.

9. PREPARATIONS ENZYMATIQUES TISSULAIRES ET CELLULAIRES

9.1. FOIE DE RAT

Les foies de rat sont homogénéisés par ultra-turrax dans un tampon sucrose 0,25 M/ 1mM EDTA/ 3 mM imidazole, pH 7,2-7,4. La fraction cytosolique est obtenue après ultra-centrifugation (100 000 g pendant 60 minutes) de cet homogénat.

9.2. CELLULES EN CULTURE

Les cellules MCF-7 sont décollées par trypsinisation, neutralisées par leur milieu et sédimentées par centrifugation (100 g/min pendant 10 minutes). Le culot cellulaire est remis en suspension dans un tampon phosphate (PBS 1X) puis soumis à une sonication (3 expositions de 10 secondes espacées de 30 secondes). La fraction cytosolique est obtenue par ultra-centrifugation (100 000 g pendant 60 minutes) du sonicat cellulaire.

10. DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines ont été dosées par la méthode à l'acide bicinchoninique (Smith et al., 1985)

Principe

L'acide bicinchoninique (BCA) réagit en présence de cuivre (Cu^{2+}) avec les protéines en milieu alcalin produisant un complexe cuivrique (BCA- Cu^+), de coloration pourpre, absorbant à une longueur d'onde de 562 nm.

Un étalonnage est effectué avec la sérum albumine bovine pour des concentrations protéiques comprises entre 100 et 1200 $\mu\text{g/ml}$.

Technique

Le test est réalisé au moyen de plaques de microtitration.

A 10 μl d'échantillon sont ajoutés 200 μl d'une solution constituée du réactif A (BCA en milieu alcalin) et du réactif B (sulfate de cuivre en solution à 4%) dans un rapport 50/1.

Après agitation, la microplaque est incubée 30 minutes à 37°C avant lecture à 562 nm.

11. MILIEUX ET SOLUTIONS POUR CULTURE CELLULAIRE

* Milieu RPMI 1640 (Gibco)

1 flacon de poudre RPMI 1640

1 l d'eau déminéralisée

10 ml d'une solution de pénicilline (10 000 UI/ml) - streptomycine (10 000 µg/ml)

Ce milieu de base est passé sur filtre (dont les pores ont un diamètre de 0,22 µm) sous une hotte à flux laminaire.

* Milieu RPMI complet

Pour 100 ml :

86,4 ml de RPMI 1640

10 ml de sérum de veau foetal (SVF) inactivé par la chaleur

2,6 ml de bicarbonate 7,5%

1 ml de glutamine (200 mM).

* Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) (Gibco)

1 flacon de poudre DMEM

1 l d'eau déminéralisée

10 ml d'une solution de pénicilline (10 000 UI/ml) - streptomycine (10 000 µg/ml)

Ce milieu de base est passé sur filtre (dont les pores ont un diamètre de 0,22 µm) sous une hotte à flux laminaire.

* Milieu DMEM complet

Pour 100 ml :

86,6 ml de DMEM

10 ml de sérum de veau foetal (SVF) inactivé par la chaleur

2,4 ml de bicarbonate 7,5%

1 ml de glutamine (200 mM).

* Solution saline avec tampon phosphate de Dulbecco (PBS)

solution 10 X

CaCl₂ 1 g/l

KCl 2 g/L

KH₂PO₄ 2 g/L

MgCl₂.6H₂O 1 g/l

NaCl 80 g/l

Na₂HPO₄.7H₂O 21,6 g/L

REFERENCES

- Anderson, C. & Morgenstern, R., Chemical modification of rat liver microsomal glutathione transferase defines residues of importance for catalytic function.
Biochem. J., 1990, 272, 479-484.

- Andrews, P. & Howell, S., Cellular pharmacology of cisplatin : perspectives on mechanism of acquired resistance.
Cancer Cells, 1990, 2, 35-43.

- Andrews, P. & Albright, K., Mitochondrial defects in cis-diamminedichloroplatinum (II) resistant human ovarian carcinoma cells.
Cancer Res., 1992, 52, 1895-1901.

- Aquino, A., Hartman, K., Knode, M., Grant, S., Huang, K., Niu, C. & Glazer, R., Role of protein kinase C in phosphorylation of vinculin in adriamycin resistant HL-60 leukemic cells.
Cancer Res., 1988, 48, 3324-3329.

- Ardiet, C., Bastian, G., Favre, R., Gouyette, A., Hecquet, E., Lokiec, F., Robert, J., Serre-Debeauvais, F. & Tranchand, B., La résistance aux médicaments anticancéreux.
Dans "Guide pratique de pharmacocinétique clinique en oncologie". Ed. Frison-Roche, 1989.

- Awasthi, S., Sharma, R., Awasthi, Y., Belli, J. & Frenkel, P., The relationship of doxorubicin binding to membrane lipids with drug resistance.
Cancer Lett., 1992, 63, 109-116.

- Babson, J. & Reed, D., Inactivation of glutathione reductase by 2-chloroethylnitrosourea-derived isocyanates.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, 83, 754-762.

- Barbacid, M., Oncogenes and human cancer : cause or consequence?
Carcinogenesis, 1986, 4, 1037-1042.

- Bartoszek, A. & Wolf, C., Enhancement of doxorubicin toxicity following activation by NADPH cytochrome P450 reductase.
Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 1449-1457.

- Basu, A., Kozikowski, A., Sato, K. & Lazo, J., Cellular sensitization to cis-diamminedichloroplatinum (II) by novel analogues of the protein kinase C activator lyngbyatoxin A.
Cancer Res., 1991, 51, 2511-2514.
- Basu, A. & Lazo, J., Sensitization of human cervical carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum (II) by bryostatin I.
Cancer Res., 1992, 52, 3119-3124.
- Batist, G., Tulpule, A., Sinha, B., Katki, A., Myers, C. & Cowan, K., Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells.
J. Biol. Chem., 1986, 261, 15544-15549.
- Batist, G., Schechter, R., Woo, A., Greene, D. & Lehnert, S., Glutathione depletion in human and in rat multi-drug resistant breast cancer cell lines.
Biochem. Pharmacol, 1991, 41, 631-635.
- Beck, W., Do anti-P-glycoprotein antibodies have a future in the circumvention of multidrug resistance?
J. Nat. Cancer Inst., 1991, 83, 1364-1366.
- Begleiter, A., Lam, H., Grover, J., Froese, E. & Goldenberg, G., Evidence for active transport of melphalan by two amino acid carriers in L5178Y lymphoblasts in vitro.
Cancer Res., 1979, 39, 353-359.
- Bellamy, W., Dalton, W., Meltzer, P. & Dorr, R., Role of glutathione and its associated enzymes in multidrug-resistant human myeloma cells.
Biochem. Pharmacol, 1989, 38, 787-793.
- Belpomme, D., Diversité des mécanismes de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses.
Med. Sci., 1991, 7, 465-472.
- Berridge, M., Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers.
Biochem. J., 1984, 220, 345-360.
- Bhushan, A., Abramson, R., Chiu, J. & Tritton, T., Expression of *c-fos* in human and murine multidrug-resistant cells.
Mol. Pharmacol., 1992, 42, 69-74.

- Biedler, J., Genetic aspects of multidrug resistance.
Cancer, 1992, 70, 1799-1809.

- Bishop, J., The molecular genetics of cancer.
Science, 1987, 235, 305-311.

- Bishop, J., Molecular themes in oncogenesis.
Cell, 1991, 64, 235-248.

- Black, S., Beggs, J., Hayes, J., Bartoszek, A., Muramatsu, M., Sakai, M. & Wolf, C.,
Expression of human glutathione S-transferases in *Saccharomyces Cerevisiae* confers
resistance to the anticancer drug adriamycin and chlorambucil.
Biochem. J., 1990, 268, 309-315.

- Bobichon, H., Okiemi, M.G., Broglio, C., Ploton, D. & Dufer, J., Adriamycin resistance is
characterized by ultrastructural changes in human leukaemic K562 cells in vitro.
Biol. Cell., 1992, 74, 287-297.

- Boiocchi, M. and Toffoli, G., Mechanism of multidrug resistance in human tumour cell lines
and complete reversion of cellular resistance.
Eur. J. Cancer, 1992, 28A, 1099-1105.

- Bos, J., *ras* oncogenes in human cancer : a review.
Cancer Res., 1989, 49, 4682-4689.

- Bradley, G., Juranka, P. & Ling, V., Mechanism of multidrug resistance.
Biochim. Biophys. Acta, 1988, 948, 87-112.

- Buller, A., Clapper, M. & Tew, K., Glutathione S-Transferases in nitrogen mustard
resistant and sensitive cell lines.
Mol. Pharmacol., 1987, 31, 575-578.

- Burgess, G., Dooley, R., McKinney, J., Nanberg, E. & Putney, J., Further studies on the
interactions between the calcium mobilization and cyclic AMP pathways in guinea pigs
hepatocytes.
Mol. Pharmacol., 1986, 30, 315-320.

- Burk, R., Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J.*, 1991, 5, 2274-2279.
- Burt, R., Garjeid, S., Johnson, K. & Thorgeirson, S., Transformation of rat liver epithelial cells with *v-H-ras* or *v-raf* causes expression of MDR-1, glutathione-S-transferase-P and increased resistance to cytotoxic chemicals. *Carcinogenesis*, 1988, 9, 2329-2332.
- Carafoli, E., Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, 56, 395-433.
- Carlberg, I. & Mannervik, B., Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 5475-5480.
- Carmagnol, F., Sinet, P.M., & Jerome, H., Selenium-dependent and non-selenium dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 759, 49-57.
- Carter, S., Adriamycin. A review. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1975, 55, 1265-1274.
- (a) Chambers, T., McAvoy, E., Jacobs, J. & Eilon, G., Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 7679-7686.
- (b) Chambers, T., Chalikonda, I. & Eilon, G., Correlation between protein kinase C translocation, P-glycoprotein phosphorylation and reduced drug accumulation in multidrug resistant human KB cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 169, 253-259.
- Chao, C., Huang, Y., Ma, C., Chou, W. & Lin-Chao, S., Overexpression of glutathione S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug-resistant human colon cancer cell line. *Mol. Pharmacol.*, 1992, 41, 69-75.

- Chen, C., Chin, J., Ueda, K., Clark, D., Pastan, I., Gottesman, M. & Roninson, I., Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 1986, 47, 381-389.
- Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I. & Gottesman, M., Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*, 1992, 255, 459-462.
- Chow, K., Macdonald, T. & Ross, W., DNA binding by epipodophyllotoxins and N-acyl anthracyclines : implications for mechanism of topoisomerase II inhibition. *Mol. Pharmacol.*, 1988, 34, 467-473.
- Chu, F., Esworthy, R., Akman, S. & Doroshow, J., Modulation of glutathione peroxidase expression by selenium : effect on human MCF-7 breast cancer cell transfectants expressing a cellular glutathione peroxidase cDNA and doxorubicin-resistant MCF-7 cells. *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 1531-1539.
- Chu, G. & Chang, E., Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 3324-3327.
- Cole, S., Downes, H., Mirski, S. & Clements, D., Alterations in glutathione and glutathione-related enzymes in a multidrug-resistant small cell lung cancer cell line *Mol. Pharmacol.*, 1989, 37, 192-197.
- Cole, S., Chanda, E., Dicke, F., Gerlach, J. & Mirski, S., Non- P- glycoprotein-mediated multidrug resistance in a small cell lung cancer cell line : evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. *Cancer Res.*, 1991, 51, 3345-3352.
- Coles B. & Ketterer, B., The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 1990, 25, 47-70.
- Crescimanno, M., Armata, M.G., Florena, A.M., Leonardi, V., Rausa, L. & Alessandro, N., Antioxidant defenses in a B16 melanoma line resistant to doxorubicin : an *in vivo* study. *Anti-Cancer Drugs*, 1991, 2, 481-486.

- Cros, S., Guilbaud, N., Berlion, M., Dunn, T., Regnier, G., Dhainaut, A., Atassi, G. & Bizzari, J.P., In vivo evidence of complete circumvention of vincristine resistance by a new triazinoaminopiperidine derivative S 9788 in P388/VCR leukemia model.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1992, 30, 491-494.
- Cuvier, C., Roblot-Treupel, L., Millot, J., Lizard, G., Chevillard, S., Manfait, M., Couvreur, P. & Poupon, M., Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance.
Biochem. Pharmacol., 1992, 44, 509-517.
- Deffie, A., Alam, T., Seneviratne, C., Beenken, S., Batra, J., Shea, T., Henner, W. & Goldenberg, G., Multifactorial resistance to adriamycin : relationship of DNA repair, glutathione transferase activity, drug efflux and P-glycoprotein in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and resistant P388 leukemia.
Cancer Res., 1988, 48, 3595-3602.
- de Jong, S., Timmer-Bosscha, H., de Vries, E. & Mulder, N., Increased topoisomerase II activity in a cisplatin resistant cell line.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1990, 31, 337.
- Deleve, L. & Kaplowitz, N., Importance and regulation of hepatic glutathione.
Seminars in liver disease, 1990, 10, 251-266.
- Delvenne, C., Winkler-Gol, R., Piccart, M., Hustin, J., Michaux, D., Leclercq, G., Nogaret, J.M., & Austier, P., Expression of *c-erb* B2, TGF- β 1 and pS2 genes in primary human breast cancers.
Eur. J. Cancer, 1992, 28, 700-705.
- Doroshow, J., Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase.
Cancer Res., 1983, 43, 4543-4551.
- Douglas, K., Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes.
Adv. Enzymol., 1987, 59, 103-167.
- Drlica, K. & Franco, R., Inhibitors of DNA topoisomerases.
Biochemistry, 1988, 27, 2253-2259.

- Eastman, A., Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes.
Chem.-Biol. Inter., 1987, 61, 241-248.
- Efferth, T. , Lathan, B. & Volm, M., Selective growth-inhibition of multidrug-resistant CHO cells by the monoclonal antibody 265/F4.
Brit. J. Cancer, 1991, 64, 87-89.
- Eliopoulos, A., Kerr, D. & Spandidos, D., The effect of cisplatin and carboplatin on *c-myc* promoter in erythroleukemic cells.
Anti-Cancer Drugs, 1991, 2, 597-601
- Epand, R.F. & Epand, R.M., The new potent immunosuppressant FK-506 reverses multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells.
Anti-Cancer Drug Des., 1991, 6, 189-193.
- Epp, O., Ladenstein, R. & Wendel, A., The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution.
Eur. J. Biochem., 1983, 133, 51-69.
- Evan, G., Wyllie, A., Gilbert, C., Littlewood, T., Land, H., Brooks, M., Waters, C., Penn, L. & Hancock, D., Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein.
Cell, 1992, 69, 119-128.
- Evans, C., Bodell, W., Tokuda, K., Doane-Setzer, P. & Smith, M., Glutathione and related enzymes in rat brain tumor cell resistance to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and nitrogen mustard.
Cancer Res., 1987, 47, 2525-2530.
- Fairchild, C., Moscow, J., O'Brien, E. & Cowan, K., Multidrug resistance in cells transfected with human genes encoding a variant P-glycoprotein and glutathione S-transferase- π .
Mol. Pharmacol, 1990, 37, 801-809.
- Fallowfield, L., Behavioural interventions and psychological aspects of care during chemotherapy.
Eur. J. Cancer, 1992, 28A, S39-S41.

- Farber, E., Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals : G.H.A. Clowes memorial lecture.
Cancer Res., 1984, 44, 5463-5474.

- Fichtinger-Schepman, A., van der Veer, J., den Hartog, J., Lohman, P. & Reedijk, J., Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA : formation, identification and quantitation.
Biochemistry, 1985, 24, 707-713.

- Fine, R., Patel, J. & Chabner, B., Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 582-586.

- Fitzgerald, D., Willingham, M., Cardarelli, C., Hamada, H., Tsuruo, T., Gottesman, M. & Pastan, I., A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1987, 84, 4288-4292.

- Flohé, L., Günzler, W. & Schock, H., Glutathione peroxidase : a selenoenzyme.
FEBS Lett., 1973, 32, 132-134.

- Flohé, L., Günzler, W. & Ladenstein, R., Glutathione peroxidase.
Dans "Glutathione : metabolism and function". Ed. Arias, I., Jakoby, W., Raven Press, New York, 1976, 115-138.

- Flohé, L., The glutathione peroxidase reaction : molecular basis of the antioxidant function of selenium in mammals.
Curr. Topics Cell. Regul., 1985, 27, 473-478.

- Foglesong, P., Reckord, C. & Swink, S., Doxorubicin inhibits human DNA topoisomerase I.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1992, 30, 123-125.

- Fojo, A., Ueda, K., Slamon, D., Poplack, D., Gottesman, M. & Pastan, I., Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 265-269.

- Ford, J., Walter, C. & Hait, W., Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.*, 1989, 35, 105-115.
- Ford, J. & Hait, W., Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.*, 1990, 42, 155-199.
- Gabizon, A., Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res.*, 1992, 52, 891-896.
- Ganapathi, R. & Grabowski, D., Enhancement of sensitivity to adriamycin in resistant P388 leukemia by the calmodulin inhibitor trifluoperazine. *Cancer Res.*, 1983, 43, 3696-3699.
- Genne, P., Dimanche-Boitrel, M., Mauvernay, R., Gutierrez, G., Duchamp, O., Petit, J., Martin, F. & Chauffert, B., Cinchonine, a potent efflux inhibitor to circumvent anthracycline resistance in vivo. *Cancer Res.*, 1992, 52, 2797-2801.
- Gilman, A., G proteins : transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, 615-649.
- Godwin, A., Meister, A., O'Dwyer, P., Huang, C., Hamilton, T. & Anderson, M., High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 3070-3074.
- Golden, A. & Brugge, J.S., The *src* oncogene. Dans "The oncogene handbook". Ed. Reddy, E.P., Skalka, A.M. & Curran, T., Elsevier, 1988.
- Gottesman, M. & Pastan, I., Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Trends Pharmacol. Sci*, 1988, 9, 54-58.

- Griffith, O. & Meister, A., Potent and specific inhibition of glutathione by buthionine sulfoximine (S-n-butylhomocysteine sulfoximine).
J. Biol. Chem., 1979, 254, 7558-7560.
- Gros, P., Croop, J. & Housman, D., Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins.
Cell, 1986, 47, 371-380.
- Gros, P., Dhir, R., Croop, J. and Talbot, F., A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse *mdr1* and *mdr3* drug efflux pumps.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 7289-7293.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R., A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.
J. Biol. Chem., 1985, 260, 3440-3450.
- Guellaën, G., Rôle physiologique de la γ -glutamyltranspeptidase.
Med. Sci., 1989, 5, 637-644.
- Günzler, W., Steffens, G., Grossmann, A., Kim, S., Ötting, F., Wendel, A. & Flohé, L., The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1984, 365, 195-212.
- Gusovsky, F. & Gutkind, J., Selective effects of activation of protein kinase C isozymes on cyclic AMP accumulation.
Mol. Pharmacol., 1991, 39, 124-129.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B., Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 7130-7139.
- Hacker, M., Commentary on the hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs.
Toxicol. Lett., 1990, 50, 121-122.

- Hait, W. & Aftab, D., Rational design and pre-clinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance.
Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 103-107.

- Hamilton, T., Winker, M., Louie, K., Batist, G., Behrens, B., Tsuruo, T., Grotzinger, K., Mc Koy, W., Young, R. & Ozols, R., Augmentation of adriamycin, melphalan and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and -sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion.
Biochem. Pharmacol., 1985, 34, 2583-2586.

- Harada, S. & Abei, M., Human glutathione S-transferases.
In "Pharmacogenetics of drug metabolism". Ed. Werner Kalow. Pergamon Press, New York, 1992, 249-259.

- Hayes, J. & Wolf, C., Molecular mechanism of drug resistance.
Biochem. J., 1990, 272, 281-295.

- Hercbergs, A., Brok-Simoni, F., Holtzman, F., Bar-Am, J., Leith, J. & Brenner, H., Erythrocyte glutathione and tumour response to chemotherapy.
The Lancet, 1992, 339, 1074-1076.

- Herskovic, A., Martz, K., Al-Sarraf, M., Leichman, L., Brindle, J., Vaitkevicius, V., Cooper, J., Byhardt, R., Davis, L. & Emami, B., Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus.
New. Engl. J. Med., 1992, 326, 1593-1598.

- Higgins, C. and Gottesman, M., Is the multidrug transporter a flippase?
Trends Biochem. Sci., 1992, 17, 18-21.

- Hindenburg, A., Baker, M., Gleyzer, E., Stewart, V., Case, N. & Taub, R., Effect of verapamil and other agents on the distribution of anthracyclines and on reversal of drug resistance.
Cancer Res., 1987, 47, 1421-1425.

- Hoban, P., Robson, C., Davies, S., Hall, A., Cattan, A., Hickson, I. & Harris, A., Reduced topoisomerase II and elevated α class glutathione S-transferase expression in a multidrug resistant CHO cell line highly cross-resistant to mitomycin C.
Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 685-693.

- Hong, Y., Li, C., Burgess, J., Chang, M., Salem, A., Srikumar, K. & Reddy, C., The role of selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in the formation of prostaglandin F_{2α}*.
J. Biol. Chem., 1989, 264, 13793-13800.
- Hosking, L., Whelan, R. & Hill, B., Identification of a relationship between glutathione metabolism and drug sensitivities in a panel of human tumor cell lines.
Biochem. Soc. Trans., 1990, 18, 4, 621-622.
- Hospers, G., Mulder, N., de Jong, B., de Ley, L., Uges, D., Fichtinger-Schepman, A-M., Scheper, R. & de Vries, E., Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in vitro.
Cancer Res., 1988, 48, 6803-6807.
- Hunter, T., Cooperation between oncogenes.
Cell, 1991, 64, 249-270.
- Isonishi, S., Hom, D., Thiebaut, F., Mann, S., Andrews, P., Basu, A., Lazo, J., Eastman, A. & Howell, S., Expression of the *c-Ha-ras* oncogene in mouse NIH 3T3 cells induces resistance to cisplatin.
Cancer Res., 1991, 51, 5903-5909.
- Jaffrézou, J-P, Herbert, J-M, Levade, T., Gau, M-N, Chatelain, P. & Laurent, G., Reversal of multidrug resistance by calcium channel blocker SR33557 without photoaffinity labelling of P-glycoprotein.
J. Biol. Chem., 1991, 266, 19858-19864.
- Jiao, L., Fyunato, T., Wang, W., Tone, T., Kashani-Sabet, M. & Scanlon, K.J., The role of the *c-fos* oncogene in cisplatin resistance.
In "Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy", Ed. Howell, S., Plenum Press, New York, 1991, 303-313.
- Juranka, P., Zastawny, R. & Ling, V., P-glycoprotein : multidrug resistance and a superfamily of membrane- associated transport proteins.
FASEB J., 1989, 3, 2583-2592.

- Kadam, S., Maus, M., Poddig, J., Schmidt, S., Ramssen, R., Novosad, E., Plattner, J. & McAlpine, J., Reversal of multidrug resistance by two novel indole derivatives. *Cancer Res.*, 1992, 52, 4735-4740.

- Kaplan, J.C. & Delpuch, M., *Biologie moléculaire et médecine*. Ed. Flammarion, 1989.

- Kartner, N., Riordan, J. & Ling, V., Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 1983, 221, 1285-1288.

- Kartner, N., Everden-Porelle, D., Bradley, G. & Ling, V., Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*, 1985, 316, 820-823.

- Kasahara, K., Fujiwara, Y., Nishio, K., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T. & Saijo, N., Metallothionein content correlates with the sensitivity of human cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res.*, 1991, 51, 3237-3242.

- Kashani-Sabet, M., Wang, W. & Scanlon, K.J., Cyclosporin A suppresses cisplatin-induced *c-fos* gene expression in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 11285-11288.

- Kawai, K., Kamatani, N., Georges, E. & Ling, V., Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 13137-13142.

- (a) Kelland, L., Murrer, B., Abel, G., Giandomenico, C., Mistry, P. & Harrap, K., Ammine/amine platinum (IV) dicarboxylates : a novel class of platinum complex exhibiting selective toxicity to intrinsically cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 1992, 52, 822-828.

- (b) Kelland, L., Mistry, P., Abel, G., Loh, S., O'Neill, F., Murrer, B. & Harrap, K., Mechanism-related circumvention of acquired cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance using two pairs of human ovarian cell lines by ammine/amine platinum (IV) dicarboxylates. *Cancer Res.*, 1992, 52, 3857-3864.

- Klopman, G., Srivastava, S., Kolossvary, I., Epand, R., Ahmed, N. & Epand, R., Structure-activity study and design of multidrug-resistant reversal compounds by a computer automated structure evaluation methodology.
Cancer Res., 1992, 52, 4121-4129.
- Koob, M. & Dekant, W., Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates.
Chem.-Biol. Inter., 1991, 77, 107-136.
- Köpf-Maier, P. & Mühlhausen, S., Changes in the cytoskeleton pattern of tumor cells by cisplatin in vitro.
Chem.-Biol. Inter., 1992, 82, 295-316.
- Kosower, E., Chemical properties of glutathione.
Dans "Glutathione : metabolism and function". Ed. Arias, I., Jakoby, W., Raven Press, New York, 1976, 1-15.
- Kosower, N. & Kosower, E., The glutathione status of cells.
Int. Rev. Cytol., 1978, 54, 109-160.
- Kramer, R., Zakher, G. & Kim, J., Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance.
Science, 1988, 241, 694-697.
- Ladenstein, R., Epp, O., Bartels, K., Jones, A. & Huber, R., Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution.
J. Mol. Biol., 1979, 134, 199-218.
- Lai, G., Moscow, J., Alvarez, M., Fojo, A. & Bates, S., Contribution of glutathione and glutathione-dependent enzymes in the reversal of adriamycin resistance in colon carcinoma cell lines.
Int. J. Cancer, 1991, 49, 688-695.
- Land, H., Parada, L. & Weinberg, R., Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts require at least two cooperating oncogenes.
Nature, 1983, 304, 596-602.

- Lawrence, R.A. & Burk, R.F., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 71, 952-958.

- Lee, F., Sciandra, J. & Siemann, D., A study of the mechanism of resistance to adriamycin in vivo.
Biochem. Pharmacol., 1989, 38, 3697-3705.

- Levy, H. & Christoff, M., A critical appraisal of the effect of oxidized glutathione on hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity.
Biochem. J. , 1983, 214, 959-965.

- Liu, L. & Davis, J., Novel topologically knotted DNA from bacteriophage P4 capsids : studies with DNA topoisomerases.
Nucl. Acids Res., 1981, 9, 3979-3989.

- Lock, R. & Ross, W., DNA topoisomerases in cancer therapy.
Anti-Cancer Drug Des., 1987, 2, 151-164.

- Long, B., Wang, L., Lorico, A., Wang, R., Brattain, M. & Casazza, A., Mechanisms of resistance to etoposide and teniposide in acquired resistant human colon and lung carcinoma cell lines.
Cancer Res., 1991, 51, 5275-5284.

- Los, G., Verdegall, E., Noteborn, H., Ruevekamp, M., De Graeff, A., Meesters, E., Ten Bokkel Huinink, D. & Mc Vie, J., Cellular pharmacokinetics of carboplatin and cisplatin in relation to their cytotoxic action.
Biochem. Pharmacol., 1991, 42, 357-363.

- Maiorino, M., Roveri, A. & Ursini, F., Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.
Phosphorus and Sulfur, 1988, 38, 41-48.

- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M., Warholm, M. & Jornvall, H., Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mamalian species : correlation between structural data and enzymatic properties.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 7202-7206.

- Mannervik, B., Roles and functions of glutathione. 620th meeting. Biochem. Soc. Trans., 1986, 15, 717-727.
- Marquardt, D. & Center, M., Drug transport mechanisms in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin : evidence for nuclear drug accumulation and redistribution in resistant cells. Cancer Res., 1992, 52, 3157-3163.
- Marshall, C., Oncogenes and cell proliferation : an overview. Dans "Oncogenes". Ed. Glover, D. & Hames, D. IRL Press, 1989.
- Meister, A. , The fall and rise of cellular glutathione levels : enzyme-based approaches. Current Topics Cell. Regul., 1985, 26, 383-394.
- Meister, A. & Anderson, M., Glutathione. Ann. Rev. Biochem., 1983, 52, 711-760.
- Meyer, D., Coles, B., Pemble, S., Gilmore, K., Fraser, G. & Ketterer, B., Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. Biochem. J., 1991, 274, 409-414.
- Micetich, K., Zwelling, L. & Kohn, K., Quenching of DNA : Platinum (II) monoadducts as a possible mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in L1210 cells. Cancer Res., 1983, 43, 3609-3613.
- Mickisch, G., Pai, L. Gottesman, M. & Pastan, I., Monoclonal antibody MRK 16 reverses the multidrug resistance of multidrug-resistant transgenic mice. Cancer Res., 1992, 52, 4427-4432.
- Mickisch, G., Rahman, A., Pastan, I. & Gottesman, M., Increased effectiveness of liposome-encapsulated doxorubicin in multidrug-resistant-transgenic mice compared with free doxorubicin. J. Nat. Cancer Inst., 1992, 84, 804-805.
- Miller, K., Liu, L. & Englund, P., A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. J. Biol. Chem., 1981, 256, 9334-9339.

- Miller, E. & Miller, J., Mechanisms of chemical carcinogenesis.
Cancer, 1981, 47, 1055-1064.

- Mills, G., Hemoglobin catabolism : glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown.
J. Biol. Chem, 1957, 229, 189-197.

- Mimnaugh, E., Dusre, L. , Atwell, J. & Myers, C., Differential oxygen radical susceptibility of adriamycin-sensitive and-resistant MCF-7 human breast tumor cells.
Cancer Res., 1989, 49, 8-15.

- Miyazaki, M., Kohno, K., Saburi, Y., Matsuo, K., Ono, M., Kuwano, M., Tsuchida, S., Sato, K., Sakai, M. & Muramatsu, M., Drug resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in chinese hamster ovary cell lines transfected with glutathione S-transferase PI gene.
Biochem. Biophys Res. Commun., 1990, 166, 1358-1364.

- Mizuno, K., Furuhashi, Y., Misawa, T., Iwata, M., Kawai, M., Kikkawa, F., Kano, T. & Tomoda, Y., Modulation of multidrug resistance by immunosuppressive agents : cyclosporin analogues, FK 506 and mizoribine.
Anticancer Res., 1992, 12, 21-26.

- Morier-Teissier, E., Mestdagh, N., Bernier, J.L. & Hénichart, J.P., Reduced and oxidized glutathione ratio in tumor cells : comparison of two measurement methods using HPLC and electrochemical detection.
J. Liq. Chromatogr., 1992, sous presse.

- Moscow, J., Townsend, A. & Cowan, K., Elevation of pi class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST π gene and its effect on sensitivity to toxins.
Mol. Pharmacol., 1989, 36, 22-28.

- Müller, M., Wright, K. & Twentyman, P., Differential properties of cisplatin and tetraplatin with respect to cytotoxicity and perturbation of cellular glutathione levels.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1991, 28, 273-276.

- Myers, C., Anthracyclines.
Dans "The cancer pharmacology annual 3", Eds : Chabner, B., Pinedo, H., Elsevier, 1985, 58-84.

- Nakagawara, A., Kadomatsu, K., Sato, S., Kohno, K., Takano, H., Akazawa, K., Nose, Y. & Kuwano, M., Inverse correlation between expression of multidrug resistance gene and *N-myc* oncogene in human neuroblastomas.
Cancer Res., 1990, 50, 3043-3047.

- Nicolson, M., Orr, R., O'Neill, C. & Harrap, K., The role of platinum uptake and glutathione levels in L1210 cells sensitive and resistant to cisplatin, tetraplatin or carboplatin.
Neoplasma, 1992, 30, 189-195.

- Nishimura, S. & Sekiya, T., Human cancer and cellular oncogenes.
Biochem. J., 1987, 243, 313-327.

- Nishizuka, Y., Phospholipid degradation and signal translation for protein phosphorylation.
Trends Biochem. Sci., 1983, 8, 13-16.

- Nooter, K. & Herweijer, H., Multidrug resistance (*mdr*) genes in human cancer.
Brit. J. Cancer, 1991, 63, 663-669.

- O'Brian, C., Fan, D., Ward, N., Seid, C. & Fidler, I., Level of protein kinase C activity correlates directly with resistance to adriamycin in murine fibrosarcoma cells.
FEBS Lett., 1989, 246, 78-82.

- Ogura, R., Sugiyama, M., Haramaki, N. & Hidaka, T., Electron spin resonance studies on the mechanism of adriamycin-induced heart mitochondrial damages.
Cancer Res., 1991, 51, 3555-3558.

- Olinski, R. & Briggs, R., DNA-protein cross-linking in L1210 sensitive and resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II).
Mol. Biol. Rep., 1991, 15, 81-86.

- Olson, R., Mc Donald, J., van Boxtel, C., Boerth, R. Harbison, R., Slonim, A., Freeman, R. & Oates, J., Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of adriamycin.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1980, 215, 450-454.

- Onoda, J., Nelson, K., Taylor, J. & Honn, H., In vivo characterization of combination antitumor chemotherapy with calcium channel blockers and cis-diamminedichloroplatinum (II).
Cancer Res., 1989, 49, 2844-2850.
- Orrenius, S., McConkey, D., Bellomo, G. & Nicotera, P., Role of Ca²⁺ in toxic cell killing
Trends Pharmacol. Sci., 1989, 10, 281-285.
- Oudard, S., Thierry, A., Jorgensen, T. & Rahman, A., Sensitization of multidrug-resistant colon cancer cells to doxorubicin encapsulated in liposomes.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1991, 28, 259-265.
- Palayoor, S., Stein, J. & Hait, W., Inhibition of protein kinase C by antineoplastic agents : implications for drug resistance.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 148, 718-725.
- Parada, L., Land, H., Weinberg, R., Wolf, D. & Rotter, V., Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation.
Nature, 1984, 312, 649-651.
- Parker, R., Eastman, A., Bostick-Bruton, F. et Reed, E., Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation.
J. Clin. Invest., 1991, 87, 772-777.
- Parnham, M.J. & Graf, E., Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions.
Biochem. Pharmacol., 1987, 36, 3095-3102.
- Pastan, I., Willingham, M. & Gottesman, M., Molecular manipulations of the multidrug transporter : a new role for transgenic mice.
FASEB J., 1991, 5, 2523-2528.
- Penn, L., Laufer, E. and Land, H., C-*myc* : evidence for multiple regulatory functions.
Sem. Cancer Biol., 1990, 1, 69-80.

- Per, S., Mattern, M., Mirabelli, C., Drake, F., Johnson, R. & Crooke, S., Characterization of a subline of P388 leukemia resistant to amsacrine : evidence of altered topoisomerase II function.
Mol. Pharmacol., 1987, 32, 17-25.
- Peraino, C., Fry, R., Staffeldt, E., Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene.
Cancer Res., 1971, 31, 1506-1512.
- Perez-Soler, R., Yang, L., Drewinko, B., Lauterzstain, J. & Khokhar, A., Increased cytotoxicity and reversal of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) with entrapment of cis-bis-neodecanoato-trans-R, R,-1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II) in multilamellar lipid vesicles.
Cancer Res., 1988, 48, 4509-4512.
- Pierré, A., Léonce, S., Kraus-Berthier, L., Guilbaud, N., Saint-Dizier, D. & Atassi, G., Caractérisation de la réversion de la résistance multidrogue par le S9788, un nouveau dérivé triazinoaminopipéridine.
Bull. Cancer, 1992, 79, 595-596.
- Piller, G., Leukaemia research fund international research symposium on cytotoxic drug resistance in leukemia and other malignancies.
Leukemia, 1989, 3, 461-467.
- Pitot, H. & Sirica, A., The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta, 1980, 605, 191-215.
- Pitot, H., The natural history of neoplastic development : progression.
Dans "Fundamentals of oncology", third edition, revised and expanded. New York, Madison Avenue, 1986, 165-200.
- Poggioli, J., Mauger, J.P. & Claret, M., Effect of cyclic AMP-dependent hormones and Ca²⁺-mobilizing hormones on the Ca²⁺ influx and polyphosphoinositide metabolism in isolated rat hepatocytes.
Biochem. J., 1986, 235, 663-669.

- Pommerenke, E., Osswald, H., Hahn, E. & Volm, M., Activity of various amphiphilic agents in reversing multidrug resistance of L1210 cells.
Cancer Lett., 1990, 55, 17-23.

- Poupon, M. & Ling, V., L'évolution des tumeurs malignes.
Pour la Science, 1990, 149, 72-79.

- Rabier, M., Bruno, N. & Slate, D., Multifactorial resistance in LS174T human colon carcinoma cells selected with doxorubicin.
Int. J. Cancer, 1991, 49, 601-607.

- Ramu, A., Cohen, L. & Glaubiger, D., Oxygen radical detoxification enzymes in doxorubicin-sensitive and -resistant P388 murine leukemia cells.
Cancer Res., 1984, 44, 1976-1980.

- Rayter, S., Iwata, K., Michtisch, R., Sorvillo, J., Valenzuela, D. & Foulkes, J., Biochemical functions of oncogenes.
Dans "Oncogenes". Ed. Glover, D. & Hames, D. IRL Press, 1989.

- Redmond, S., Joncourt, F., Buser, K., Ziemiecki, A., Altermatt, H., Fey, M., Margison, G. & Cerny, T., Assessment of P-glycoprotein, glutathione-based detoxifying enzymes and O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase as potential indicators of constitutive drug resistance in human colorectal tumors.
Cancer Res., 1991, 51, 2092-2097.

- Reed, D.J., Regulation of reductive processes by glutathione
Biochem. Pharmacol., 1986, 35, 7-13.

- Reed, E., Ormond, P., Bohr, V., Budd, J. & Bostick-Bruton, F., Expression of the human DNA repair gene ERCC-1 relates to cisplatin drug resistance in human ovarian-cancer cells.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1989, 30, 448.

- Richon, V., Schulte, N. & Eastman, A., Multiple mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in murine leukemia L1210 cells.
Cancer Res., 1987, 47, 2056-2061.

- Richter, C. & Kass, G., Oxidative stress in mitochondria : its relationship to cellular homeostasis, cell death, proliferation and differentiation.
Chem.-Biol. Inter., 1991, 77, 1-23.

- Ripamonti, M., Pezzoni, G., Pesenti, E., Pastori, A., Farao, M., Bargiotti, A., Suarato, A., Spreafico, F. & Grandi, M., In vivo anti-tumour activity of FCE 23762, a methoxymorpholinyl derivative of doxorubicin active on doxorubicin-resistant tumour cells.
Brit. J. Cancer, 1992, 65, 703-707.

- Rittmann-Grauer, L., Yong M., Sanders, V. & Mackensen, D., Reversal of vinca alkaloid resistance by anti-P-glycoprotein monoclonal antibody HYB-241 in a human tumor xenograft.
Cancer Res., 1992, 52, 1810-1816.

- Rogan, A., Hamilton, T. & Young, R., Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer.
Science, 1984, 224, 994-996.

- Roninson, I., The role of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo.
Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 95-102.

- Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J. & Mansour, V., Platinum compounds : a new class of potent antitumour agents.
Nature, 1969, 222, 385-386.

- Rosenberg, S., Contre le cancer : l'immunothérapie adoptive.
Pour la Science, 1990, 153, 26-34.

- Rotruck, J., Pope, L., Swanson, A., Hafeman, D. & Hoekstra, W., Selenium : biochemical role as a component of glutathione peroxidase.
Science, 1973, 179, 588-590.

- Rubin, C. & Rosen, O., Protein phosphorylation.
Ann. Rev. Biochem., 1975, 44, 831-887.

- Salmon, S. & Sartorelli, A., Cancer chemotherapy.
Dans : "1989 Basic and Clinical Pharmacology". Fourth edition. Ed. Katzung, B., Prentice-Hall International Inc., 1989, 683-715.

- Santos, E. & Nebreda, A., Structural and functional properties of *ras* proteins.
FASEB J., 1989, 3, 2151-2163.

- Sato, W., Fukazawa, N., Suzuki, T., Yusa, K. & Tsuruo, T., Circumvention of multidrug resistance by a newly synthesized quinoline derivative, MS-073.
Cancer Res., 1991, 51, 2420-2424.

- Scanlon, K.J., Kashani-Sabet, M., Cashmore, A., Pallai, M., Moroson, B. & Saketos, M., The role of methionine in methotrexate-sensitive and methotrexate-resistant mouse leukemia L1210 cells.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1987, 19, 25-29.

- Scanlon, K.J., Kashani-Sabet, M. & Miyachi, H., Differential gene expression in human cancer cells resistant to cisplatin.
Cancer Invest., 1989, 7, 581-587.

- Scanlon, K.J., Wang, W. & Han, H., Cyclosporin A suppresses cisplatin-induced oncogene expression in human cancer cells.
Cancer Treat. Rev., 1990, 17 (suppl A), 27-35.

- Scanlon, K.J., Kashani-Sabet, M., Tone, T. & Funato, T., Cisplatin resistance in human cancers.
Pharmacol. Ther., 1992, 52, 385-406.

- Schinkel, A., Roelofs, M. & Borst, P., Characterization of the human *MDR3* P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies.
Cancer Res., 1991, 51, 2628-2635.

- Sharma, R., Inoue, S., Roitelman, J., Schimke, R. & Simoni, R., Peptide transport by the multidrug resistance pump.
J. Biol. Chem., 1992, 267, 5731-5734.

- Shellard, S., Hosking, L. & Hill, B., Anomalous relationship between cisplatin sensitivity and the formation and removal of platinum-DNA adducts in two human ovarian carcinoma cell lines *in vitro*.
Cancer Res., 1991, 51, 4557-4564.

- Singh, S., Nair, S., Ahmad, H., Awasthi, Y. & Krishan, A., Glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in doxorubicin-resistant murine leukemic P 388 cells.
Biochem. Pharmacol., 1989, 38, 3505-3510.

- Skalski, V., Yarosh, D., Batist, G., Gros, P., Feindel, W., Kopriva, D. & Panasci, L., Mechanisms of resistance to (2-chloroethyl)-3-sarcosinamide-1-nitrosourea (SarCNU) in sensitive and resistant human glioma cells.
Mol. Pharmacol., 1990, 38, 299-305.

- Sklar, M., Increased resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in NIH 3T3 cells transformed by *ras* oncogenes.
Cancer Res., 1988, 48, 793-797.

- Sklar, M. & Prochownik, E., Modulation of *cis*-platinum resistance in Friend erythroleukemia cells by *c-myc*.
Cancer Res., 1991, 51, 2118-2123.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C., Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal. Biochem., 1985, 105, 76-85.

- Solary, E., Bidan, J-M., Calvo, F., Chauffert, B., Caillot, D., Mugneret, F., Gauville, C., Tsuruo, T., Carll, P-M. & Guy, H., P-glycoprotein expression and *in vitro* reversion of doxorubicin resistance by verapamil in clinical specimens from acute leukaemia and myeloma.
Leukemia, 1991, 5, 101-106.

- Somfai-Relle, S., Suzukake, K., Vistica, B. & Vistica, D., Reduction in cellular glutathione by buthionine sulfoximine and sensitization of murine tumor cells resistant to L-phenylalanine mustard.
Biochem. Pharmacol., 1984, 33, 485-490.

- Somlyo, A., Bond, M. & Somlyo, A., Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly in vivo.
Nature, 1985, 314, 622-625.
- Soudon, J., Berlion, M., Bizzari, J.P. & Calvo, J., Réversion complète de la résistance pléiotropique (MDR) par un nouvel agent le S9788 sur une lignée humaine leucémique lymphoblastique T sans potentialisation de la toxicité de la vinblastine et de la doxorubicine sur les CFU-GM et BFU-E.
Bull. Cancer., 1992, 79, 592-596.
- Stéhelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.K., DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA.
Nature, 1976, 260, 170-173.
- Studzinski, G., Oncogenes, growth and the cell cycle : an overview.
Cell. Tissue Kinet., 1989, 22, 405-424.
- Su, T., Chou, T. & Watanabe, K., DNA topoisomerase targeted anticancer agents : new trends and developments.
Curr. Opin. Ther. Pat., 1992, 1121-1125.
- Sugawara, I., Iwahashi, T., Okamoto, K., Sugimoto, Y., Ekimoto, H., Tsuruo, T., Ikeuchi, T. & Mori, S., Characterization of an etoposide-resistant human K 562 cell line, K/eto.
Jpn. J. Cancer Res., 1991, 82, 1035-1043.
- Sullivan, D., Latham, M., Rowe, T. & Ross, W., Purification and characterization of an altered topoisomerase II from a drug-resistant chinese hamster ovary cell line.
Biochemistry, 1989, 28, 5680-5687.
- Sutcliffe, J., Gootz, T. & Barrett, J., Biochemical characteristics and physiological significance of major DNA topoisomerases.
Antimicrob. Agents Chemother., 1989, 33, 2027-2033.
- Szasz, G., A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase.
Clin. Chem., 1969, 15, 124-136.

- Talpaz, M., Chernajosky, Y., Troutman-Worden, K., Wetzler, M., Kantarjian, H., Gutterman, J. & Kurzrock, R., Interferon-stimulated genes in interferon-sensitive and -resistant chronic myelogenous leukemia patients.
Cancer Res., 1992, 52, 1087-1090.

- Tashiro, T. & Sato, Y., Characterization of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in mouse leukemia cell lines.
Jpn. J. Cancer Res., 1992, 83, 219-225.

- Tate, S. & Meister, A., γ -glutamyltranspeptidase : catalytic, structural and functional aspects.
Mol. Cell. Biochem., 1981, 39, 357-368.

- Tew, K.D., The involvement of glutathione S-transferases in drug resistance.
Dans "Anticancer drugs". Ed. Tapiero, H., Robert, J. and Lampidis, T.J. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext, 1989, 191, 103-112.

- Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D. & Liu, L.F., Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II.
Science, 1984, 226, 466-468.

- Thierry, A., Dritchilo, A. & Rahman, A., Effect of liposomes on P-glycoprotein function in multidrug resistant cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 187, 1098-1105.

- Timmer-Bosscha, H., Mulder, N. & de Vries, E., Modulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance : a review.
Brit. J. Cancer, 1992, 66, 227-238.

- Tiirikainen, M. & Krusius, T., Multidrug resistance.
Ann. Med., 1991, 23, 509-520.

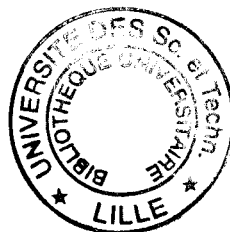
- Torry, D. & Cooper, G., Proto-oncogenes in development and cancer.
Amer. J. Reprod. Immunol., 1991, 25, 129-132.

- Townsend, A., Tu, C. & Cowan, K., Expression of human μ or α class glutathione S-transferases in stably transfected human MCF-7 breast cancer cells : effect on cellular sensitivity to cytotoxic agents.
Mol. Pharmacol., 1992, 41, 230-236.

- Tse, Y., Kirkegaard, K. & Wang, J., Covalent bonds between proteins and DNA : formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA. J. Biol. Chem., 1980, 255, 5560-5565.
- Tsuchida, S. & Sato, K., Glutathione transferases and cancer. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1992, 27, 337-384.
- Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y., Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res., 1981, 41, 1967-1972.
- Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y., Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. Cancer Res., 1982, 42, 4730-4733.
- Tsuruo, T., Lida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y., Circumvention of vincristine and adriamycin resistance *in vitro* and *in vivo* by calcium influx blockers. Cancer Res., 1983, 43, 2905-2910.
- Tsuruo, T., Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 285-296.
- Turner, M., Everman, D., Ellington, S. & Fields, C., Detection of free radicals during the cellular metabolism of adriamycin. Free Rad. Biol. Med., 1990, 9, 415-421.
- Twentyman, P., Cyclosporins as drug resistance modifiers. Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 109-117.
- Ursini, F., Maiorino, M. & Gregolin, C., The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 839, 62-70.
- van Bladeren, P. & van Ommen, B., The inhibition of glutathione S-transferases : mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. Pharmacol. Ther., 1991, 51, 35-46.

- Vendrik, C., Bergers, J., De Jong, W. & Steerenberg, P., Resistance to cytostatic drugs at the cellular level.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1992, 29, 413-429.
- Vos, R. & van Bladeren, P., Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics.
Chem.-Biol. Inter., 1990, 241-265.
- Wang, J., Type I DNA topoisomerases.
Enzymes, 1981, 14, 331-344.
- Wang, J., DNA topoisomerases.
Ann. Rev. Biochem., 1985, 54, 665-697.
- Wang, J., Recent studies of DNA topoisomerases.
Biochim. Biophys. Acta, 1987, 909, 1-9.
- Warren, L., Jardillier, J.C., Malarska, A. & Akeli, M.G. , Increased accumulation of drugs in multidrug-resistant cells induced by liposomes.
Cancer Res., 1992, 52, 3241-3245.
- Watson, J. & Crick, F., A structure for deoxyribose nucleic acid.
Nature, 1953, 171, 737-738.
- Waud, W., Harrison Jr, S., Gilbert, K., Russel Laster Jr, W. & Griswold Jr, D., Antitumor drug cross-resistance in vivo in a cisplatin-resistant murine P388 leukemia.
Cancer Chemother. Pharmacol., 1991, 27, 456-463.
- Webb, C., Latham, M., Lock, R. & Sullivan, D., Attenuated topoisomerase II content directly correlates with a low level of drug resistance in a chinese hamster ovary cell line.
Cancer Res., 1991, 51, 6543-6549.
- Weinberg, R., Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis.
Cancer Res., 1989, 49, 3713-3721.
- West, I., What determines the substrate specificity of the multi-drug resistance pump ?
Trends Biochem. Sci., 1990, 15, 42-46.

- Wheeler, C., Rader, R. & Kessel, D., Membrane alterations associated with progressive adriamycin resistance.
Biochem. Pharmacol., 1982, 31, 2691-2693.
- Wiebe, V., Koetser, S., Lindberg, M., Emshoff, V. Baker, J., Wurz, G. & De Gregorio, M., Toremifene and its metabolites enhance doxorubicin accumulation in oestrogen receptor negative multidrug resistant human breast cancer cells.
Invest. New Drugs, 1992, 10, 63-71.
- Williams, J., A critical examination of the evidence for the reactions of the pentose pathway in animal tissues.
Trends Biochem. Sci., 1980, 5, 315-320.
- Wolf, C., Lewis, A., Carmichael, J., Adams, D., Allan, S. & Ansell, D., The role of glutathione in determining the response of normal and tumour cells to anticancer drugs.
Biochem. Soc. Trans., 1987, 15, 728-730.
- Wright, C., Angus, B., Nicholson, S., Sainsbury, R., Cairns, J., Gullick, W., Kelly, P., Harris, A. & Horne, C.H., Expression of *c-erb B-2* oncoprotein : a prognostic indicator in human breast cancer.
Cancer Res., 1989, 49, 2087-2090.
- Yusa, K. & Tsuruo, T., Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil : direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells.
Cancer Res., 1989, 49, 5002-5006.
- Zamora, J., Pearce, H. & Beck, W., Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells.
Mol. Pharmacol., 1988, 33, 454-462.
- Zernig, G., Widening potential for Ca^{2+} antagonists : non-L-type Ca^{2+} channel interaction.
Trends Pharmacol. Sci., 1990, 11, 38-44.
- Zunino, F. & Capranico, G., DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines.
Anti-Cancer Drug Des., 1990, 5, 307-317.



ABSTRACT

Drug resistance is a major problem in the treatment of human neoplastic diseases. One of the more challenging problems in this area is to understand how tumor cells become resistant to cancer chemotherapeutic agents. Understanding of the molecular basis of drug resistance should allow the onset of rational strategies to exploit or circumvent this resistance.

The purpose of this study is to characterize *in vitro* various different cell lines resistant to adriamycin and/or cis-platine (detection of glycoprotein P, expression of different oncogenes, analysis of the metabolism of glutathione and associated-enzymes, activity of topoisomerase II, role of calcium and cyclic adenosine monophosphate).

These studies will also allow us to examine how glutathione and related enzymes are involved in adriamycin resistance. In this context, adriamycin-resistant cell lines were treated by various known chemosensitizers.

Finally, in an attempt to reverse chemoresistance, we have analyzed the interactions between glutathione and glutathione peroxidase by molecular modelling studies. The concept of inhibitors of glutathione metabolism has lead to the discovery of penicillamine-hydantoin, an analogue of glutathione. We have performed molecular modelling studies between this pharmacomolecule and glutathione peroxidase and studied the effect of this molecule on glutathione peroxidase activity *in vitro*. Penicillamine-hydantoin shows inhibition and inactivation properties towards glutathion peroxidase.

