



HAL
open science

Etude du transporteur de multiples drogues MRP1 : caractérisation des NBD, et étude de modulateurs conduisant à la mort des cellules surexprimant le transporteur

Thomas Perrotton

► **To cite this version:**

Thomas Perrotton. Etude du transporteur de multiples drogues MRP1 : caractérisation des NBD, et étude de modulateurs conduisant à la mort des cellules surexprimant le transporteur. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00340658

HAL Id: tel-00340658

<https://theses.hal.science/tel-00340658>

Submitted on 21 Nov 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le
14 décembre 2007

par

M. Thomas PERROTON

**Etude du transporteur de multiples drogues MRP1 :
caractérisation des NBD, et étude de modulateurs conduisant à la
mort des cellules surexprimant le transporteur**

Directeur de thèse :

Docteur Hélène CORTAY

JURY :

Monsieur GILLET Germain	Président
Monsieur FARDEL Olivier	Rapporteur
Monsieur SCHERRMANN Jean Michel	Rapporteur
Monsieur DI PIETRO Attilio	Examineur
Monsieur JACQUET Eric	Examineur
Madame CORTAY Hélène	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEE

Directeur : M. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Je tiens tout d'abord à remercier vivement et chaleureusement le Dr. Attilio Di Pietro pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir fait confiance et surtout d'avoir toujours laissé votre porte ouverte.

Je remercie le Pr. Germain Gillet d'avoir accepté de présider cette soutenance, c'est un grand honneur pour moi.

Je remercie solennellement le Pr. Olivier Fardel, le Pr. Jean-Michel Scherrmann et le Dr. Jean-Michel Gault d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement le Dr. Eric Jacquet pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury.

Mes remerciements vont ensuite au Dr. Hélène Cortay, qui a dirigé mon travail depuis maintenant 4 ans. Ce que je retiendrai surtout de notre relation (hors science bien sûr !), c'est l'humanité et l'écoute dont tu as fait preuve avec moi et tous les autres membres du laboratoire. C'est une qualité rare qu'il faut savoir préserver quoi qu'il en coûte. Comme tu le sais, nous avons eu des hauts et des bas, comme dans tout travail en équipe ; mais notre sens de la discussion, de l'honnêteté et du respect mutuel a toujours eu raison des tempêtes. Je te souhaite vraiment bon vent pour la suite. Ecoute ton instinct et tes envies.

Cette thèse n'aurait pu se dérouler en bonne et due forme sans tous les autres membres du laboratoire, qu'ils aient effectué un bref séjour, ou qu'ils soient là depuis mes débuts. Merci aux anciens pour leurs conseils, Doriane et Cédric. Merci à Hakim (le loukoum) et Olivier pour avoir été sans doute les meilleurs collègues de travail. Je vous ai détesté et en même temps adoré pour vos provocations, blagues lourdes, votre présence au quotidien... je vous ai regretté après votre départ. Merci à Alexandre (Bouba) et Sira (il faut le dire ?), mes deux comparses depuis quelques années ! Nous avons été les meilleurs amis et les pires ennemis, je ne vous oublierai jamais mes braves soldats, merci d'avoir été de toutes les batailles. Merci à tous les autres, Pierre, Agnès, Elodie,

Daniel, Ophélie, Marilia, Alessia, Marie-Ange, vous qui avez participé activement à cette atmosphère si spéciale au laboratoire.

A toi Anne Laure, tu as été celle sur qui j'ai pu compter, une épaule, un sourire, des mélodies, des repas à midi, des larmes, beaucoup, des discussions, encore plus, une femme heureuse, sûrement. Belle vie à toi.

Une mention spéciale aux deux Mélanie : une stagiaire formidable avec qui le travail a été si agréable (un été inoubliable avec le petit monstre), et une pharmacienne au caractère d'acier, et un esprit très joueur...

Merci à Soline avec qui j'ai à peu près tout fait depuis 6 ans maintenant. Elle m'a supporté, et dieu seul sait que cela n'a pas toujours été facile. Nous avons été et nous resterons les meilleurs amis, on ne peut oublier toutes ces aventures et nos malheurs ! En tout cas tu as plus de mots que je n'en n'ai dans la thèse...

Toute ma gratitude et ma reconnaissance à vous papa, maman et adeline. Vous êtes ma famille et je suis là grâce à vous. Ce travail, c'est le vôtre, l'aboutissement de votre présence et de votre amour. Vous n'avez plus à vous en faire, je me débrouille tout seul aujourd'hui !

Merci à Jérôme, qui a supporté les crises et dépresses du thésard. Tu as toujours été là pour moi, et je n'oublierai jamais tout ce que tu m'as apporté. Nos routes se sont séparées, mais je sais que nous ne nous perdrons jamais de vue. Il y a des personnes qui entrent dans une vie et n'en ressortent jamais, et tu en fais partie.

Merci à Lars, une belle rencontre pour un avenir à écrire. Jack så mycket !

Et enfin merci aux civils : Camille (la reine des pestes !), Manu (je t'aime ?), Gaëlle (le réverbère...), les trois qui m'ont épaulé depuis des années ; Alex et Brian (fournisseurs d'alcool du Mode Café, ma drogue pour tenir, je vous dois au moins ça !), avec les habitués : Esther, John, Antoine, Gaëlle,... La Suède, mes anciennes clopes, et bien évidemment tous les gens qui ont eu un rapport de près ou de loin avec ma vie, je ne cite personne d'autre pour ne pas froisser les oubliés !

Une page se tourne,

ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	11
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	15
1. La résistance à de multiples drogues des cancers.....	17
2. Les transporteurs ABC chez l'Homme	19
2.1. Généralités	19
2.2. Classification.....	19
2.3. Implication en pathologie	20
2.4. Topologie générale.....	21
2.4.1. Les domaines transmembranaires (TMD).....	22
2.4.2. Les domaines de fixation des nucléotides (NBD).....	22
2.5. La Glycoprotéine-P	25
2.5.1. Découverte de la Glycoprotéine-P	25
2.5.2. Structure et topologie.....	25
2.5.3. Distribution tissulaire	27
2.5.4. Fonctions physiologiques	27
2.5.5. Substrats de la Glycoprotéine-P.....	28
2.6. Le transporteur ABCG2.....	29
2.6.1. Découverte du transporteur	29
2.6.2. Distribution tissulaire	29
2.6.3. Fonction d'ABCG2 dans les cellules souches.....	30
2.6.4. Localisation cellulaire, structure et fonction	31
2.6.5. Substrats d'ABCG2 et modulation.....	32
2.6.6. Implication clinique d'ABCG2	33
2.7. Mécanisme de transport et « ATP switch model ».....	33
3. La protéine de résistance à de multiples drogues : MRP1	36
3.1. Découverte de MRP1	36
3.2. Evolution de la branche « C » de la superfamille ABC	36
3.2.1. Les ABCC longs et courts.....	36
3.2.2. Une caractéristique des ABCC : un NBD N-proximal atypique.....	37
3.3. Polymorphisme de MRP1	38
3.3.1. Intérêt de l'étude du polymorphisme	38
3.3.2. Polymorphisme de MRP1.....	38
3.3.3. Intérêt du polymorphisme de MRP1 et des autres transporteurs	39
3.4. Localisation membranaire et topologie du transporteur MRP1	39
3.4.1. Modifications post-traductionnelles et localisation membranaire.....	39
3.4.2. Topologie du transporteur MRP1	40
3.5. Localisation et fonction physiologique de MRP1	42
3.5.1. Localisation de MRP1 dans l'organisme.....	42
3.5.2. Rôle physiologique de MRP1	42
3.6. Substrats transportés par MRP1 et spécificité	43

3.7.	Transport de la sphingosine-1-phosphate par MRP1, intérêt en tumorigénèse	44
3.8.	Transport et rôle du GSH.....	45
3.9.	Reconnaissance des substrats par MRP1.....	46
3.9.1.	Rôle du TMD1.....	47
3.9.2.	Moyens d'étude et rôle des TMD2 et TMD3.....	47
3.9.2.1.	Reconnaissance et transport du LTC ₄	48
3.9.2.2.	Sites de reconnaissance des drogues.....	49
3.10.	Mécanisme de transport de MRP1.....	50
3.10.1.	Activité ATPase de MRP1.....	50
3.10.2.	Fonctionnement coopératif des NBD des protéines ABC.....	50
3.10.3.	Fixation et hydrolyse de l'ATP sur les NBD de MRP1.....	51
3.10.4.	Différences structurales et fonctionnelles entre les NBD.....	51
3.10.5.	Structure cristallographique du NBD1 de MRP1.....	53
3.10.5.1.	Site de fixation des nucléotides.....	53
3.10.5.2.	Activité catalytique.....	54
3.10.6.	Cycle du transport de MRP1.....	55
3.10.7.	Illustration avec l'exemple du transport de l'estrone sulfate stimulé par le GSH	56
3.11.	Structure de MRP1.....	57
3.11.1.	Modélisation moléculaire.....	57
3.11.2.	Etudes cristallographiques.....	59
4.	Implication de MRP1 en clinique.....	61
4.1.	Généralités.....	61
4.2.	MRP1 dans les tumeurs solides.....	61
4.2.1.	Cancer du poumon.....	61
4.2.2.	Cancer du sein.....	62
4.2.3.	Cancer de la prostate.....	62
4.2.4.	Neuroblastome.....	63
4.3.	MRP1 et les cancers hématologiques.....	63
5.	Réversion du phénotype MDR induit par MRP1.....	65
5.1.	Généralités.....	65
5.2.	Relation structure-activité des modulateurs de MRP1.....	69
5.3.	Sites de fixation des substrats de MRP1.....	69
5.4.	La modélisation des pharmacophores.....	70
5.4.1.	Les approches <i>in silico</i>	70
5.4.2.	Criblage de bases de données de pharmacophores.....	71
5.4.2.1.	Eléments des pharmacophores.....	72
5.4.2.2.	Criblage des bases de données.....	72
5.4.2.3.	Essais <i>in vitro</i>	72
5.4.3.	Applications pour MRP1.....	73
5.4.4.	Défis futurs dans la modélisation de pharmacophores.....	74
5.5.	Les flavonoïdes.....	75
5.5.1.	Généralités sur les flavonoïdes.....	75
5.5.2.	la chimie des flavonoïdes.....	75
5.5.3.	Rôle des flavonoïdes chez les plantes.....	77
5.5.4.	Pharmacologie des flavonoïdes chez l'animal.....	77
5.5.4.1.	Pharmacodynamique.....	78

5.5.4.2.	Toxicité des flavonoïdes	78
5.5.4.3.	Effets à long terme des flavonoïdes.....	79
5.5.5.	Influence des flavonoïdes sur les cancers	79
5.5.6.	Action des flavonoïdes sur MRP1	79
5.6.	Le vérapamil	81
5.6.1.	Généralités	81
5.6.2.	Pharmacologie des énantiomères du vérapamil	81
5.6.3.	Effet du vérapamil sur le transporteur MRP1 : avantages, inconvénients, et utilisations possibles	82
MATERIELS ET METHODES.....		85
1.	Etude des domaines cytoplasmiques NBD1 et NBD2 de MRP1.....	87
1.1.	Conditions de culture bactériennes	87
1.1.1.	Souches bactériennes.....	87
1.1.2.	Vecteurs plasmidiques	87
1.1.3.	Milieux de culture.....	87
1.2.	Préparation et analyse des domaines recombinants	88
1.2.1.	Surproduction quantitative des protéines recombinantes.....	88
1.2.2.	Purification par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel-Agarose 88	
1.2.3.	Dialyse des protéines	90
1.2.4.	Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide.....	90
1.2.5.	Dosage des protéines selon la méthode de Bradford.....	91
1.2.6.	Photomarquage des domaines par des dérivés azido de l'ATP et ADP ...	91
1.3.	Mesure des interactions protéine-ligand par spectrométrie de fluorescence ...	92
1.3.1.	Principe général de la fluorescence.....	92
1.3.1.1.	Généralités	92
1.3.1.2.	Les caractéristiques spectrales.....	93
1.3.1.3.	Mesure d'un signal de fluorescence.....	93
1.3.1.4.	La fluorescence des protéines.....	94
1.3.2.	Mesures de fluorescence	95
1.3.2.1.	Appareillage.....	95
1.3.2.2.	Conditions de mesure.....	96
1.3.2.3.	Atténuation de fluorescence	97
1.3.2.4.	Expériences de prévention.....	97
1.3.2.5.	Mesure de l'accessibilité des tryptophanes au NaI	98
2.	Etude du transporteur MRP1 entier	100
2.1.	Conditions de cultures cellulaires	100
2.1.1.	Les souches cellulaires	100
2.1.2.	Maintien des cultures cellulaires.....	100
2.1.3.	Conservation des lignées cellulaires.....	101
2.2.	Etude cellulaire du transporteur	101
2.2.1.	Test de prolifération cellulaire MTT	101
2.2.2.	Dosage du glutathion intracellulaire	102
2.2.3.	Mesure du transport de la calcéine par cytométrie en flux.....	104
2.2.3.1.	Principe général de la cytométrie en flux.....	104
2.2.3.2.	Mesure du transport de la calcéine par MRP1.....	105

2.3. Etude biochimique de MRP1	108
2.3.1. Purification du transporteur MRP1	108
2.3.2. Détection de MRP1 par immunomarquage	110
2.3.3. Mesure de l'activité ATPase de MRP1, basée sur le dosage du phosphate inorganique	110
2.3.4. Mesure de la fixation du vérapamil sur MRP1 par spectrométrie de fluorescence	111
2.3.4.1. Atténuation de fluorescence	111
2.3.4.2. Mesure de l'accessibilité des Tryptophanes au NaI	111
2.3.5. Mesure du transport de [³H] LTC₄ dans les vésicules membranaires inversées enrichies en MRP1	111
2.3.5.1. Préparation des vésicules membranaires enrichies en MRP1	112
2.3.5.2. Transport de [³H] LTC₄ dans les vésicules membranaires inversées enrichies en MRP1	113
 RESULTATS ET DISCUSSION	 115
 1. Etudes de la fonctionnalité des domaines cytoplasmiques de MRP1	 117
1.1. Les domaines cytoplasmiques de MRP1 : une asymétrie fonctionnelle encore inconnue	117
1.2. Limite des domaines NBD1 et NBD2 pour la surproduction	117
1.3. Purification des domaines NBD1 et NBD2	117
1.4. Mesure des spectres d'émission de fluorescence des NBD	119
1.5. Comportement asymétrique des NBD en présence des nucléotides : une caractéristique intrinsèque des domaines	120
1.6. Fixation des nucléotides sur les NBD préparés en absence de détergent	122
1.7. Deux modulateurs de MRP1, le MK571 et le NMeOH₂, interagissent avec les NBD	123
1.8. Interaction différentielle des diverses classes de substrats de MRP1 entre les deux NBD	125
1.9. La vincristine et la vinblastine interagissent au même site que le MK571 sur les NBD	127
1.10. Implication de ces résultats sur la fonctionnalité des NBD au sein de MRP1	128
 2. Activité différentielle des énantiomères du vérapamil sur MRP1	 131
2.1. Pourquoi étudier les énantiomères du vérapamil ?	131
2.2. Toxicité cellulaire des énantiomères du vérapamil	131
2.3. Effet sélectif des énantiomères du vérapamil sur le contenu intracellulaire en GSH	132
2.4. Inhibition du transport de calcéine par MRP1 par les énantiomères du vérapamil	134
2.5. Inhibition du transport de LTC₄ par MRP1 par les énantiomères du vérapamil	135
2.6. Réversion du phénotype MDR par le R-vérapamil	137
2.7. Implication moléculaire des deux énantiomères sur MRP1 purifié	138
2.7.1. Purification de MRP1	138
2.7.2. Effet des énantiomères du vérapamil sur l'accessibilité des Trp au NaI	140
2.7.3. Fixation des énantiomères du vérapamil sur MRP1, et effet du GSH	141

2.7.4.	Effet des énantiomères du vérapamil sur l'activité ATPase de MRP1 ...	143
2.7.5.	Intérêts mécanistiques et thérapeutiques des énantiomères du vérapamil	145
3.	Relation structure/activité des dérivés iodés du vérapamil.....	149
3.1.	Synthèse et structure des dérivés iodés du vérapamil.....	149
3.2.	Toxicité cellulaire des dérivés iodés du vérapamil.....	150
3.3.	Effet des dérivés iodés du vérapamil sur le transport de GSH par MRP1.....	152
3.4.	Relation structure/activité.....	153
4.	Relation structure/activité de dérivés des flavonoïdes.....	155
4.1.	Synthèse et structure des dérivés des flavonoïdes.....	155
4.2.	Toxicité cellulaire des dérivés des flavonoïdes.....	156
4.3.	Effet des dérivés des flavonoïdes sur le transport de GSH par MRP1.....	157
4.4.	Relation structure/activité.....	158
CONCLUSION.....		159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		165
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....		195
PUBLICATIONS.....		199

ABREVIATIONS

ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AFB ₁	Aflatoxine B ₁
AML	Leucémie myéloïde aigüe
AMPPNP	Adénosine 5'-(β,γ-imido)-triphosphate
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BET	Bromure d'Ethidium
BHK-21	Baby Hamster Kidney-21
BL	milieu de Luria Bertani
BSA	Bovine Serum Albumin
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Da	Dalton
DMSO	DiMéthyl-SulfOxide
D.O.	Densité Optique
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid
E ₂ 17βG	17β-oestradiol 17-(β-D-glucuronide)
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HECAMEG	6-O-(N-heptylcarbamoyle)-méthyl-α-D-glucopyranoside
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazidin-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HUGO	Human Genome Organisation
IC ₅₀	Inhibitory Concentration (50% effect)
ICD	Intra Cellular Domain
IMV	Inverted Membrane Vesicles
IPTG	IsoPropyl-β-D-Thio-Galactopyranoside
K _d	Constante de dissociation
K _M	Constante de Michaëlis et Menten
KO	Knock-Out
KPi	Phosphate de potassium
LDAO	Lauryldiméthylamine oxide
LTC ₄	Leucotriène C ₄
MDR	MultiDrug Resistance
MRP	Multidrug Resistance Protein
MTT	3-(4,5-diméthyl thiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tetrazolium bromide
MXR	Mitoxantrone Resistance Protein
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide
NATA	N-acétyl-tryptophanamide
NBD	Nucleotide-Binding Domain
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
P-gp	P-glycoprotéine
Pi	Phosphate inorganique
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride
Q	Rendement quantique

Rh123	Rhodamine 123
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SVF	Sérum de veau foetal
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TBE	Tris borate EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-TetraMéthyl-Ethylene Diamine
TM	Segment TransMembranaire
TMD	TransMembrane Domain
Tris	tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	Ultra-Violet
Vi	Orthovanadate
Vm	Vitesse maximale
VP-16	étoposide
Wt	Wild-type

INTRODUCTION

L'Homme est chaque jour confronté à son environnement qui influe sur sa manière de vivre, mais aussi sur son organisme. L'évolution de notre espèce est une résultante de ces facteurs environnementaux. Malheureusement, l'environnement et la nature biologique de l'Homme ont permis l'émergence d'une maladie : le cancer. C'est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale, due à l'acquisition par une cellule de propriétés spéciales : l'immortalité, l'altération morphologique, la perte de l'inhibition de contact, la construction d'amas cellulaires et la dérégulation des récepteurs aux facteurs de croissance. Ces modifications cellulaires sont dues à des dérèglements génétiques héréditaires ou provenant de pressions environnementales (alimentation, pollution, irradiation).

Sans traitement, le cancer entraîne le patient jusqu'à la mort par altération des fonctions vitales. L'Homme a ainsi depuis longtemps étudié cette maladie afin de trouver des thérapies efficaces capables de contrer un mal qui ronge de plus en plus la société. Les traitements usuels et les plus rencontrés sont l'exérèse de la tumeur, la radiothérapie et la chimiothérapie. Dans ce dernier cas, on injecte au patient des médicaments s'attaquant aux cellules cancéreuses. Ces substances chimiothérapeutiques fonctionnent principalement par arrêt de la mitose, en ciblant les cellules se divisant très rapidement. La majorité de ces molécules sont des agents alkylants (cisplatine), des anti-métabolites (méthotrexate), des alcaloïdes végétaux (vincristine, taxanes), des inhibiteurs de la topoisomérase (anthracyclines), ou des antibiotiques antitumoraux (doxorubicine).

Malheureusement, l'utilisation de ces médicaments a entraîné l'émergence d'un phénomène aujourd'hui bien connu : la chimiorésistance. Ce phénomène ne représente pas un mécanisme artificiel visant à gêner la thérapie, mais un moyen pour la cellule de se protéger contre de graves agressions, et ce mécanisme résulte de millions d'années d'adaptation. Ce phénomène de résistance à de multiples drogues (MDR : MultiDrug Resistance) a été mis en évidence à la fin des années soixante-dix sur différentes lignées de cellules cancéreuses rendues résistantes *in vitro* à des médicaments antinéoplasiques comme les alcaloïdes ou les anthracyclines. Très rapidement, un gène (*mdr1*) a été mis en évidence et le transporteur membranaire codé par ce gène, la Glycoprotéine-P (P-gp) a été caractérisé biochimiquement. Ce transporteur fait partie de la famille des protéines ABC (ATP Binding Cassette), qui comporte comme autres membres, deux autres transporteurs impliqués dans le phénotype MDR : MRP1 (MultiDrug Resistance Protein 1) découverte en 1992, et BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) en 1998. Ces transporteurs, dont le rôle physiologique est la détoxification de l'organisme, peuvent être surexprimés dans les cellules tumorales. Ainsi, ces transporteurs ont la capacité de faire diminuer la concentration intracellulaire en agents chimiothérapeutiques, limitant alors leur efficacité. Les cellules tumorales ne meurent plus et continuent leur invasion.

La compréhension fonctionnelle de ces transporteurs, et la recherche de moyens de les contrer, représentent un défi dans la lutte contre le cancer depuis de nombreuses années. Ainsi, le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse s'est spécialisé depuis longtemps dans l'étude de ces transporteurs, en débutant par des recherches sur la P-gp, et actuellement sur MRP1 et BCRP. L'activité de recherche du laboratoire s'est initialement portée sur l'étude des NBD (Nucleotide Binding Domain) de la P-gp, puis sur des études beaucoup plus fonctionnelles des transporteurs, et la recherche d'inhibiteurs efficaces, notamment le vérapamil et des composés naturels tels que les flavonoïdes. Nous travaillons actuellement sur le transporteur MRP1, une protéine membranaire qui catalyse le transport d'anions organiques, et de conjugués à des glucuronates, sulfonates, ou à du glutathion. MRP1 comporte deux NBD, les domaines moteurs hydrolysant l'ATP, qui sont fonctionnellement asymétriques, à la différence de la P-gp par exemple. MRP1 comporte de plus trois domaines transmembranaires impliquant la reconnaissance et le transport des substrats. Enfin, il a été montré que le

vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques cardiaques, stimulait le transport de GSH par MRP1.

La première étape de ce travail de thèse a consisté en l'étude des NBD surexprimés et purifiés de manière isolée. Cette étude a été initiée par le Dr. Doriane Trompier, qui a effectué le clonage des domaines et mis au point leur purification. Nous avons alors entrepris d'étudier le comportement des NBD de MRP1 en présence des nucléotides, mais aussi de modulateurs et substrats de MRP1. Le rôle exact de l'asymétrie des NBD de MRP1 est encore méconnu, et la relation entre les NBD et le site substrat est encore assez floue. Cette étude apporte ainsi quelques indices en ce qui concerne les caractéristiques fonctionnelles de ces domaines.

En 2003, le Dr. Doriane Trompier a terminé ses travaux de thèse sur une découverte importante : le vérapamil a la capacité d'induire la mort des cellules surexprimant MRP1 par apoptose, et ce phénomène est dû à un stress oxydatif généré par l'efflux massif et brutal de glutathion hors de la cellule, transport médié par MRP1. Cette découverte ouvre la porte vers une nouvelle possibilité thérapeutique : la mort ciblée, par apoptose, des cellules surexprimant MRP1. Cependant, l'utilisation du vérapamil en clinique est limitée par l'effet cardiotoxique de ce composé sur les cardiomyocytes. Le vérapamil existe sous forme énantiomérique, et il est connu que la cardiotoxicité est due à l'isomère S. Par ailleurs, le vérapamil est un inhibiteur de la P-gp, et il n'y a pas d'effet énanti-sélectif sur l'inhibition de ce transporteur. Une partie de ce travail a donc consisté à étudier l'effet des énantiomères du vérapamil sur l'activité de MRP1. Les énantiomères ont ainsi montré des effets différentiels sur MRP1, le S-vérapamil stimulant l'efflux du GSH et induisant l'apoptose, et le R-vérapamil inhibant le transport de substrats. C'est la première fois que les énantiomères d'une molécule montrent des effets différents sur l'activité d'un tel transporteur, et les conséquences d'un point de vue thérapeutique et en terme de compréhension du mécanisme de MRP1 sont très intéressantes. Cela pointe alors la nécessité d'étudier les énantiomères des différents inhibiteurs, pouvant ainsi améliorer leur efficacité.

En parallèle de cette étude, différents dérivés du vérapamil ont été synthétisés, et leur capacité à stimuler l'efflux du GSH et à induire la mort des cellules surexprimant MRP1 a été analysée. Ces études permettent de déterminer les groupements chimiques indispensables à l'efficacité de la molécule, tout en ayant une faible toxicité sur les cellules contrôles.

Une étude similaire a été réalisée en ce qui concerne les flavonoïdes, des composés naturels ayant pour certains la capacité de stimuler l'efflux de GSH par MRP1. L'avantage des flavonoïdes réside dans leur faible toxicité pour l'organisme, sachant que chaque jour l'Homme ingère une grande quantité de ces composés, en majeure partie contenus dans les végétaux.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. La résistance à de multiples drogues des cancers

La chimiothérapie est l'un des outils les plus efficaces de la médecine moderne permettant le traitement de nombreuses infections microbiennes ainsi que les maladies néoplasiques. Alors que « l'ère de la chimiothérapie » a déjà apporté des solutions à de nombreux problèmes cliniques, son potentiel n'est pas entièrement exploité et le développement de nouveaux médicaments, plus efficaces et plus sélectifs, est un besoin urgent. Malheureusement, la consécration de la chimiothérapie est entachée par le développement de mutations ou de résistances phénotypiques d'organismes pathologiques envers ces traitements, les rendant ainsi inefficaces. Le phénomène concerne tous les pathogènes soumis à des traitements chimiothérapeutiques, incluant les cellules cancéreuses.

Durant les cinquante dernières années, l'utilisation d'agents anticancéreux est devenue l'un des principaux moyens de contrôle des cancers. Leur action a pour objectif la mort des cellules cancéreuses par nécrose ou apoptose. Malheureusement, l'émergence de la résistance aux drogues a actuellement invalidé l'action de nombreux agents chimiothérapeutiques.

Le contrôle de la résistance aux drogues des tumeurs s'est compliqué lors de l'émergence d'un nouveau type de résistance, découvert en 1976 par Juliano et Ling (Juliano and Ling, 1976), la résistance à de multiples drogues ou MDR (Multiple Drug Resistance), qui est devenu une cause majeure des échecs de la chimiothérapie. Les cellules présentant un phénotype MDR ont des résistances croisées à de nombreux agents chimiothérapeutiques, qui n'ont bien souvent aucune similitude chimique et fonctionnelle. Le phénotype MDR apparaît à travers l'expression ou la surexpression de glycoprotéines ayant un spectre large en termes de substrats, qui sont capables de transporter activement les agents chimiothérapeutiques hors de la cellule contre un gradient de concentration. Ces pompes fonctionnent au dépend de la consommation d'énergie, conduisant à une diminution de la concentration intracellulaire en agents chimiothérapeutiques. En conséquence, les tumeurs peuvent échapper à l'effet cytotoxique des drogues et devenir résistantes à leur action.

Ces glycoprotéines qui effluent les drogues appartiennent à une grande famille de protéines membranaires qui sont les transporteurs ABC. Il est à noter que ces transporteurs sont présents de manière constitutive dans de nombreux tissus, tels que les cellules épithéliales du colon, les reins, le pancréas, le foie, ce qui complique substantiellement le développement d'agents qui pourraient contrecarrer le phénotype MDR. Le rôle physiologique des protéines ABC comprend le transport actif d'endo- et xénobiotiques, incluant les processus de détoxification. Ainsi, les tumeurs dérivant de ces tissus peuvent exhiber le phénotype de résistance avant d'être en présence de ces agents. Les tumeurs résistantes dérivant d'autres tissus peuvent acquérir ce phénotype par induction des agents chimiothérapeutiques.

Le phénotype MDR cellulaire résulte de changements structuraux et fonctionnels au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme, des compartiments cellulaires ou du noyau.

Trois changements majeurs sont visibles dans les cellules présentant le phénotype MDR :

- La diminution de l'accumulation des drogues cytotoxiques
- Des changements dans l'activité ou l'expression de certaines protéines cellulaires
- Des modifications physiologiques de la cellule affectant par exemple de pH cytoplasmique ou bien le trafic intracellulaire membranaire

Ces changements majeurs aboutissent à quatre grands mécanismes de résistance (Figure 1).

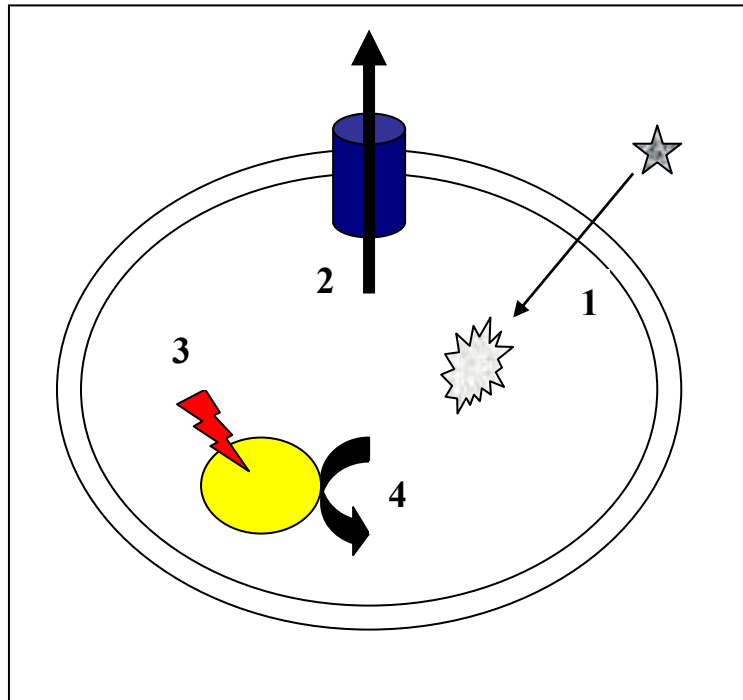


Figure 1: Les quatre grands mécanismes de résistance :
1- Inactivation moléculaire.
2- Efflux actif en dehors de la cellule (transporteurs ABC).
3- Altération de la cible moléculaire (ADN topoisomérases).
4- Anomalies de réponses (apoptose, augmentation de la réparation de l'ADN).

2. Les transporteurs ABC chez l'Homme

2.1. Généralités

Les protéines ABC constituent la plus large famille de protéines connues (Henikoff et al., 1997), la plupart étant des protéines membranaires (ou transporteurs « ABC ») actives dans le transport d'une large variété de substances à travers la membrane cellulaire. Le nom de transporteur ABC a été introduit pour la première fois par Christopher Higgins en 1992 (Higgins, 1992). Il est basé sur la présence d'une séquence hautement conservée, dite « ATP-Binding-Cassette », qui est spécifique de cette superfamille.

Les transporteurs ABC sont retrouvés dans toutes les espèces depuis les microorganismes jusqu'à l'Homme. Ils représentent ainsi 4.8% du génome d'*Escherichia coli* codant pour 70 transporteurs (Linton and Higgins, 1998), ayant des fonctions allant du transport de substrats dans la bactérie, à l'export de protéines et de polysaccharides et à la résistance aux antibiotiques. 28 gènes distincts de transporteurs ABC sont présents dans le génome de la levure (Bauer et al., 1999). Il y aurait approximativement 50 transporteurs codés par le génome humain (Dean et al., 2001). La localisation de ces transporteurs dans l'organisme humain est très étendue.

2.2. Classification

Pour comprendre la complexité et la diversité de la superfamille des ABC, des études phylogéniques *in silico* ont permis la classification de plus de 600 protéines à domaine ATPase. Ce travail a conduit à la classification des protéines ABC en trois classes majeures :

- 1- les exportateurs
- 2- les systèmes sans domaines transmembranaires connus
- 3- les importateurs et autres systèmes moins caractérisés

Ainsi, tous les gènes humains et murins des protéines ABC ont désormais une nomenclature standard qui a été développée par l'organisation HUGO (« HUMan Genome Organisation ») (Klein et al., 1999). Le détail de cette nomenclature concernant les gènes humains peut être consulté sur le site internet : www.nutrigenet.com/humanabc.htm, et concernant les gènes humains et murins sur le site www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily.abc.html (Figure 2).

Sept sous-familles ont été identifiées, classées selon une nomenclature de A à G, avec à l'intérieur de chaque sous-famille un numéro correspondant à chaque transporteur.

Cette nomenclature est en accord avec l'arbre phylogénétique des gènes ABC humains. La sous-famille ABCA comprend 12 transporteurs entiers et est divisée en deux sous-groupes. Cette sous-famille contient certains des plus grands gènes, avec des protéines allant jusqu'à 2100 acides aminés. La sous-famille ABCB (MDR/TAP) contient à la fois des demi-transporteurs et des transporteurs entiers. Le transporteur ABCB1 (P-gp ou Glycoprotéine-P) a été le premier transporteur humain cloné et caractérisé pour sa capacité à conférer le phénotype de résistance à de multiples drogues des cellules cancéreuses. La sous-famille ABCC (CFTR/MRP/SUR) comporte 12 transporteurs entiers. La sous-famille ABCD comporte 4 gènes codant des demi-transporteurs. Les sous-familles ABCE et ABCF ne sont pas connues pour être impliquées dans une fonction de transport. La sous-famille ABCG (BCRP) est composée de 6 demi-transporteurs dont les NBD se situent du côté N-terminal.

Les transporteurs ABC chez l'Homme

Symbol	Alias	Location	Mouse Location	Expression	Function
ABCA1	ABC1	9q31.1	4 23.1	Ubiquitous	Cholesterol efflux onto HDL
ABCA2	ABC2	9q34	2 12.6	Brain	Drug resistance
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3		Lung	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	3 61.8	Rod photoreceptors	N-retinylidene-PE efflux
ABCA5		17q24	11 69	Muscle, heart, testes	
ABCA6		17q24	11 69	Liver	
ABCA7		19p13.3	10 44	Spleen, thymus	
ABCA8		17q24	11 69	Ovary	
ABCA9		17q24	11 69	Heart	
ABCA10		17q24		Muscle, heart	
ABCA12		2q34		Stomach	
ABCA13		7p11-q11		Low in all tissues	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	5 1.0	Adrenal, kidney, brain	Multidrug resistance
ABCB2	TAP1	6p21	17 18.6	All cells	Peptide transport
ABCB3	TAP2	6p21	17 18.6	All cells	Peptide transport
ABCB4	PGY3	7q21.1	5 1.0	Liver	PC transport
ABCB5		7p14		Ubiquitous	
ABCB6	MTABC3	2q36		Mitochondria	Iron transport
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	X 39	Mitochondria	Fe/S cluster transport
ABCB8	MABC1	7q36		Mitochondria	
ABCB9		12q24		Heart, brain	
ABCB10	MTABC2	1q42	8 67	Mitochondria	
ABCB11	SPGP	2q24	2 39	Liver	Bile salt transport
ABCC1	MRP1	16p13.1	16	Lung, testes, PBMC	Drug resistance
ABCC2	MRP2	10q24	19 43	Liver	Organic anion efflux
ABCC3	MRP3	17q21.3		Lung, intestine, liver	Drug resistance
ABCC4	MRP4	13q32		Prostate	Nucleoside transport
ABCC5	MRP5	3q27	16 14	Ubiquitous	Nucleoside transport
ABCC6	MRP6	16p13.1		Kidney, liver	
CFTR	ABCC7	7q31.2	6 3.1	Exocrine tissues	Chloride ion channel
ABCC8	SUR	11p15.1	7 41	Pancreas	Sulfonylurea receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	6 70	Heart, muscle	
ABCC10	MRP7	6p21		Low in all tissues	
ABCC11		16q11-q12		Low in all tissues	
ABCC12		16q11-q12		Low in all tissues	
ABCD1	ALD	Xq28	X 29.5	Peroxisomes	VLCFA transport regulation
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	15 E-F	Peroxisomes	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	3 56.6	Peroxisomes	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	12 39	Peroxisomes	
ABCE1	OABP, RNS4I	4q31		Ovary, testes, spleen	Oligoadenylate binding protein
ABCF1	ABC50	6p21.33	17 20.5	Ubiquitous	
ABCF2		7q36	13 40	Ubiquitous	
ABCF3		3q25	16 22	Ubiquitous	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	17 A2-B	Ubiquitous	Cholesterol transport?
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	6 28-29	Placenta, intestine	Toxin efflux, drug resistance
ABCG4	White2	11q23	5 59	Liver	
ABCG5	White3	2p21	17	Liver, intestine	Sterol transport
ABCG8		2p21	17	Liver, intestine	Sterol transport

PBMC, peripheral blood mononuclear cells; VLCFA, very long chain fatty acids.

Figure 2: Protéines ABC chez l'Homme selon la nomenclature HUGO.

2.3. Implication en pathologie

Chez l'Homme, de nombreux transporteurs sont associés à une maladie connue (Tableau 1).

- La **mucoviscidose** est causée par des mutations dans le gène codant pour CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), identifié en 1989 par le Pr. J. R. Riordan (Riordan et al., 1989). Plus de cent mutations différentes ont été découvertes, cependant dans 70% des cas de maladie, c'est la délétion de la phénylalanine 508 qui est impliquée.
- Le **syndrome de Tangier** est une maladie autosomique récessive détectée à l'origine parmi les habitants de l'île de Tangier. Elle se manifeste par une coloration orange des amygdales, un foie et une rate hypertrophiés et une réduction importante de la concentration plasmatique en lipoprotéines de haute densité (HDL). Cette maladie est

causée par des mutations dans le gène ABCA1, codant pour un transporteur de cholestérol ainsi que de phospholipides (Bodzioch et al., 1999).

- Le **syndrome de Dubin-Johnson** a été décrit pour la première fois en 1954. C'est une maladie autosomique récessive caractérisée par une hyperbilirubinémie associée au dépôt de pigments dans les cellules hépatiques. L'hyperbilirubinémie est due à un défaut d'excrétion de divers anions organiques, parmi lesquels la bilirubine. Cette absence de transport est causée par l'absence de MRP2 dans les membranes canaliculaires (Kartenbeck et al., 1996).
- L'**adrénoleucodystrophie** est une maladie génétique neurodégénérative liée au chromosome X, et est associée à un défaut de peroxydation des acides gras à longues chaînes. La maladie affecte les adultes et les enfants. Elle est due à plusieurs mutations du gène ABCD1, qui code pour un demi-transporteur ABC péroxisomal appelé ALDP (Mosser et al., 1993).
- La **chimiorésistance** des cancers, cause d'échec des chimiothérapies, est en général causée par la surexpression des transporteurs ABC : Glycoprotéine-P, MRP1 et BCRP, qui sont capables d'exporter des molécules cytotoxiques et de conférer à la cellule tumorale une résistance à de nombreux agents anticancéreux (doxorubicine, vinblastine, étoposide, taxol,...).

Tableau 1 : Transporteurs ABC impliqués dans des pathologies humaines.

Transporteur	Nomenclature	Maladie
MDR1, MRP1, BCRP	ABCB1, ABCC1, ABCG2	Cancer
CFTR	ABCC7	Mucoviscidose
ABCR	ABCA4	Maladie de Stargardt et dégénérescence maculaire
ABC1	ABCA1	Maladie de Tangier et déficience familiale en HDL
MDR2	ABCB4	Cholestase familiale de type 3
MRP2	ABCC2	Syndrome de Dubin-Johnson
MRP6	ABCC6	Pseudoxanthome élastique
SUR1, SUR2	ABCC8, ABCC9	Hyperinsulinisme familial
ABC7	ABCB7	Anémie sidéroblastique et ataxie
ALD	ABCD1	Adrénoleucodystrophie
	ABCG5, ABCG8	Sitostérolémie
TAP1, TAP2	ABCB2, ABCB3	Déficience immunitaire

2.4. Topologie générale

Les transporteurs ABC ont en général une organisation structurale commune comprenant 4 domaines :

- Deux domaines transmembranaires hydrophobes ou TMD (TransMembrane Domain)
- Deux domaines cytoplasmiques hydrophiles de fixation des nucléotides ou NBD (Nucleotide Binding Domain)

Les domaines peuvent être exprimés séparément, sous la forme de deux, trois, ou quatre polypeptides différents, comme c'est le cas de la majorité des transporteurs bactériens. Les domaines peuvent être fusionnés au sein d'une seule protéine, et c'est le cas de la plupart des

transporteurs eucaryotes (CFTR, Glycoprotéine-P ou MRP1) (Ambudkar et al., 1998). Si l'un des NBD ou l'un des TMD est absent, il se forme alors un homodimère pour apporter le complément (Thanabalu et al., 1998) (Figure 3).

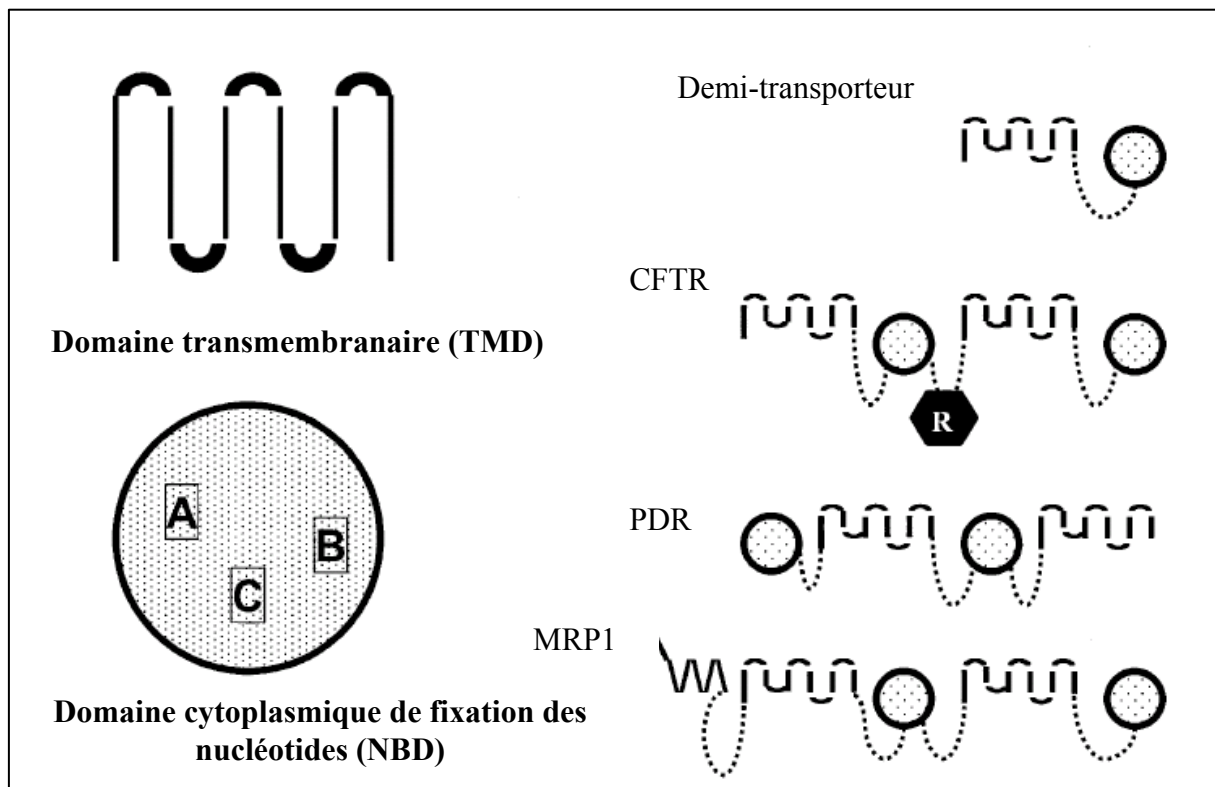


Figure 3: Les éléments structuraux fondamentaux des transporteurs ABC, et les différentes organisations générales des transporteurs (Gottesman and Ambudkar, 2001).

2.4.1. Les domaines transmembranaires (TMD)

Les deux TMD effectuent plusieurs passages dans la membrane plasmique sous forme d'hélices α transmembranaires. Il y a typiquement 6 hélices α transmembranaires par TMD et un total de 12 par transporteur. 10 à 12 hélices transmembranaires semblent être le minimum nécessaire pour former un pore au travers duquel divers substrats pourront traverser la membrane plasmique (Chang and Roth, 2001; Locher et al., 2002). Les TMD déterminent la spécificité de substrat, de par leurs sites de fixation des substrats, bien que certaines protéines auxiliaires périplasmiques puissent jouer un rôle chez certains transporteurs (cas des protéines MalE pour le transporteur de maltose MalKFG₂ par exemple). Pour plusieurs transporteurs ABC, comme la Glycoprotéine-P, il existe plus d'un site de fixation des substrats par transporteur, bien que les acides aminés impliqués dans ces sites, ainsi que le positionnement de ces sites au sein du transporteur, ne soient par encore clairement définis.

2.4.2. Les domaines de fixation des nucléotides (NBD)

Les domaines de fixation des nucléotides, ou NBD, sont hydrophiles et interagissent avec les boucles intracellulaires des TMD du côté cytoplasmique de la membrane.

Ces domaines cytoplasmiques comprennent environ 215 acides aminés chacun et contiennent deux motifs caractéristiques des protéines fixant l'ATP, ou motifs A et B de Walker, ainsi qu'un motif C, véritable signature (S) des transporteurs ABC (Figure 4-5). C'est

ATP et est également proposée pour intervenir dans la communication entre le site catalytique et les TMD (Karpowich et al., 2001; Jones and George, 2002). Elle se situe approximativement à égale distance entre les motifs A et B de Walker dans la séquence peptidique.

- Enfin, une histidine, également hautement conservée, est portée par une boucle à 30-40 acides aminés en aval du motif B de Walker, et est appelée « **H-loop** ». Il semblerait qu'elle soit capable de polariser une molécule d'eau pour l'hydrolyse de l'ATP (Hopfner et al., 2000), ou qu'elle ait un rôle dans la transduction du signal entre les NBD et les TMD.

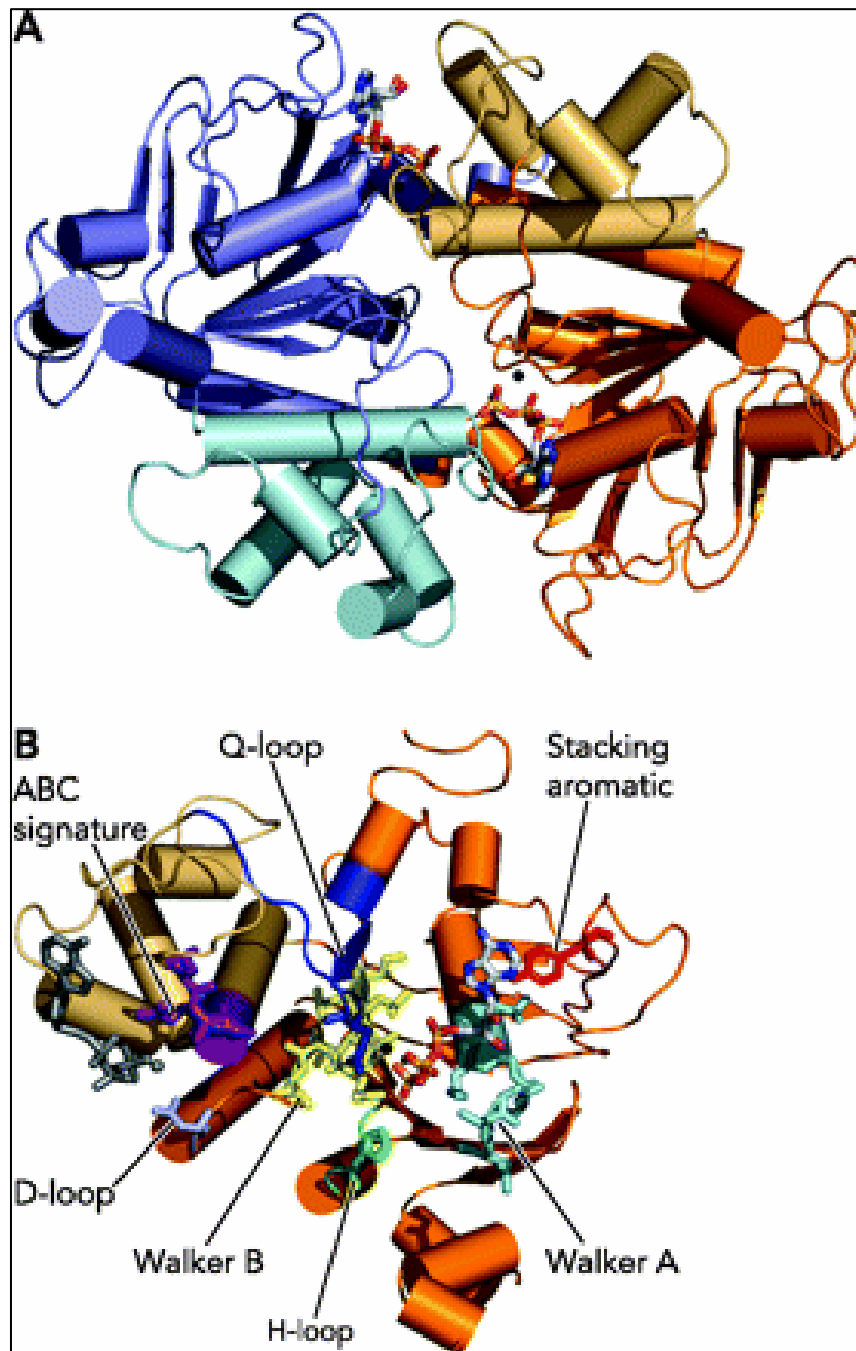


Figure 5: A) Structure un dimère fermé de NBD. B) Positionnement des différents motifs présents sur les NBDs.

2.5. La Glycoprotéine-P

2.5.1. Découverte de la Glycoprotéine-P

En 1972, Dano décrit un mécanisme de résistance aux drogues dû à un transport actif des agents chimiothérapeutiques hors des cellules (Dano, 1973). Les cellules tumorales sélectionnées en présence de daunorubicine, expulsent la daunorubicine de manière énergie-dépendante et ce transport peut-être inhibé par la vinblastine, et les anthracyclines. Ce phénotype de résistance à de multiples drogues a ensuite été caractérisé plus en détails (Beck et al., 1979; Riordan and Ling, 1979). Les lignées cellulaires tumorales, sélectionnées dans les différents laboratoires par la vincristine ou la daunorubicine, sont devenues également résistantes à d'autres agents anticancéreux de structure non apparentée, et se caractérisent par l'augmentation de l'expression d'une protéine membranaire glycosylée de 170 kDa, appelée glycoprotéine-P (Perméase).

La Glycoprotéine-P existe naturellement dans les cellules, ayant alors pour rôle la détoxification de l'organisme des xénobiotiques, et pourrait représenter 50% des cas de résistance tumorale chez l'Homme (Gottesman and Pastan, 1993).

2.5.2. Structure et topologie

Le séquençage du gène de la Glycoprotéine-P humaine (Chen et al., 1986) a permis de déterminer la structure primaire de la protéine, qui contient 1280 acides aminés, avec une masse moléculaire de 141 kDa. Le transporteur est constitué de deux moitiés homologues de 610 acides aminés, provenant vraisemblablement de la duplication d'un gène ancestral (Chen et al., 1990). La protéine est alors composée de deux domaines transmembranaires, comportant chacun 6 hélices α prédites. Les régions transmembranaires possèdent une très faible homologie de séquence, lorsque l'on compare les deux moitiés homologues. Ces segments membranaires sont reliés par des boucles extracellulaires courtes, et des boucles intracellulaires assez longues. La protéine contient en plus deux domaines de fixation des nucléotides, cytoplasmiques, de 250 acides aminés environ. Ils incluent les motifs qui ont été décrits précédemment.

La Glycoprotéine-P est biosynthétisée sous forme d'un précurseur non glycosylé, d'une masse d'environ 140 kDa, qui subit ensuite une maturation avec une demi-vie chez l'Homme allant de 1 à 2 h (Richert et al., 1988). La forme mature de la Glycoprotéine-P possède une masse moléculaire de 170 kDa. Seule la première boucle cytoplasmique du TMD1 est glycosylée, et ce au niveau de trois résidus : Asn⁹¹, Asn⁹⁴ et Asn⁹⁹ (Schinkel et al., 1993a; Robert, 1994). Les deux moitiés homologues de la Glycoprotéine-P sont séparées par un domaine appelé « région linker », qui est potentiellement phosphorylable par les protéines kinases A et C. Le rôle de la phosphorylation de la Glycoprotéine-P et l'identification des protéines kinases impliquées ont été l'objet de nombreuses études, car le mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation a été envisagé comme pouvant avoir un rôle régulateur de l'activité du transporteur (Carlsen et al., 1977; Center, 1983; Hamada et al., 1987). La Glycoprotéine-P est essentiellement phosphorylée par la protéine kinase C, et il a été montré que le phénotype MDR est souvent associé avec un niveau cellulaire élevé en protéine kinase C (Mellado and Horwitz, 1987; Posada et al., 1989a; Posada et al., 1989b). La protéine peut également être phosphorylée par la protéine kinase A (Staats et al., 1990; Sampson et al., 1993).

Enfin, les extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le cytoplasme (Figure 6).

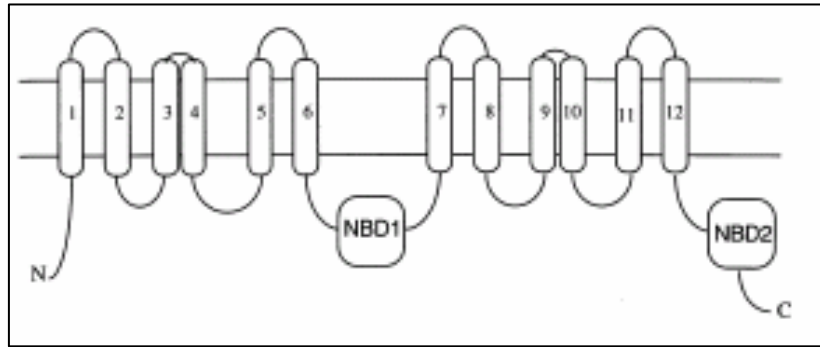


Figure 6: Topologie membranaire prédite de la glycoprotéine-P.

Une structure à basse résolution (25 Å) de la Glycoprotéine-P a été obtenue par microscopie électronique (Rosenberg et al., 1997), et les résultats suggèrent que la protéine aurait la forme d'un cylindre de 10 nm de diamètre et de 8 nm de hauteur. Les TMD formeraient alors un pore de 50 Å de diamètre dans la membrane, qui serait obstrué à la face cytoplasmique par les NBD, formant des lobes de 3 nm, et ouvert à la face extracellulaire (Figure 7).

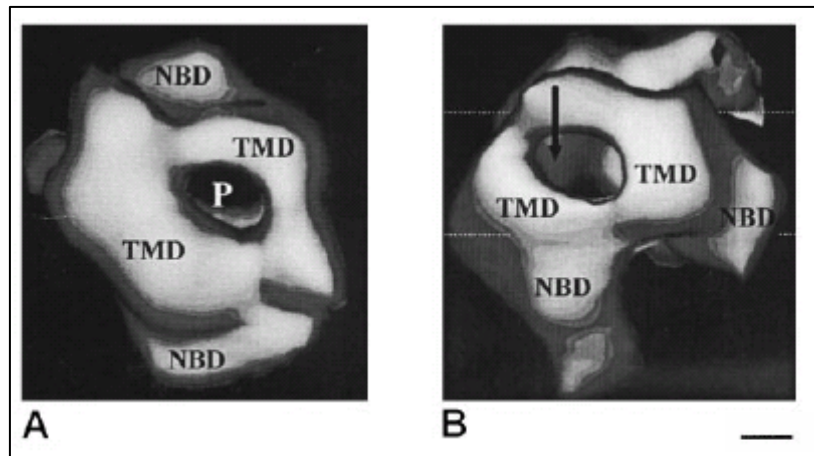


Figure 7: Structure de la glycoprotéine-P par microscopie électronique (25 Å de résolution). A) Vue perpendiculaire à la surface de la membrane lipidique. B) Vue de profil. Les lignes en pointillé correspondent à la position de la bicouche lipidique. (Echelle 1.7 nm) (Rosenberg et al., 1997).

Dans l'objectif d'obtenir une meilleure résolution, des cristaux 2-D de la Glycoprotéine-P ont été obtenus (Rosenberg et al., 2001b), permettant d'atteindre une résolution de 10 Å, et ont confirmé la structure visualisée en microscopie électronique (Figure 8). Récemment, une autre structure en 3-D a été obtenue avec une résolution de 20 Å, qui suggère que les TMD sont constitués d'hélices α (Rosenberg et al., 2003).

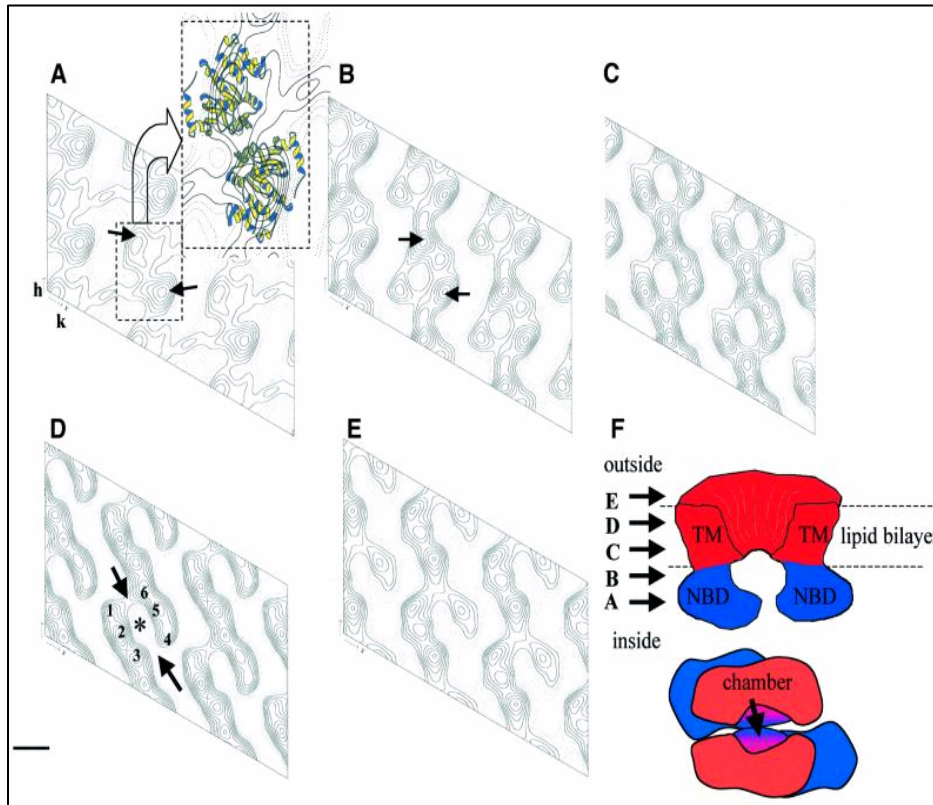


Figure 8: Structure de la Glycoprotéine-P (F) reconstruite à partir des coupes A, B, C, D et E, d'épaisseur 10 Å (du côté intracellulaire vers extracellulaire) obtenus à partir de cristaux-2D (10 Å de résolution). Les NBD et les TMD apparaissent en bleu et en rouge, respectivement. Les nombres de 1 à 6 indiquent les sites de grande densité, et les flèches des trous entre les deux TMD. (Echelle 28 Å) (Rosenberg et al., 2003).

2.5.3. Distribution tissulaire

La Glycoprotéine-P possède une distribution tissulaire assez étendue, et on retrouve une forte expression de ce transporteur dans les glandes surrénales, rein, placenta, colon, foie, jéjunum, rectum, poumons. La protéine est rencontrée aussi, mais avec une expression plus faible, dans la peau, les muscles squelettiques, ainsi que dans les cellules endothéliales des capillaires de la barrière hémato-encéphalique et des testicules (Fojo et al., 1987).

2.5.4. Fonctions physiologiques

Dans les cellules épithéliales du tractus digestif inférieur (duodénum, jéjunum, iléum et colon), la Glycoprotéine-P est exprimée à la membrane apicale des cellules, participant ainsi à la fonction excrétrice et/ou sécrétrice de la muqueuse intestinale (Cordon-Cardo et al., 1990).

La présence de ce transporteur dans la barrière hémato-encéphalique, le placenta, et les testicules, suggère un rôle de protection de ces tissus vis-à-vis des xénobiotiques (Sugawara et al., 1988; Cordon-Cardo et al., 1989; Thiebaut et al., 1989).

La Glycoprotéine-P a été mise en évidence dans les cellules formant les tubules proximaux du rein (Thiebaut et al., 1987). Dans le foie, c'est dans les canalicules biliaires que le transporteur est retrouvé. Cette localisation pourrait être expliquée par le rôle de la Glycoprotéine-P dans l'excrétion de xénobiotiques et endobiotiques hors de l'organisme (Ambudkar et al., 1999).

Si certaines cellules hématopoïétiques expriment faiblement la Glycoprotéine-P (Chaudhary and Roninson, 1991), il a été montré en revanche que les leucocytes expriment également ce transporteur, ainsi que les macrophages et les lymphocytes T (Klimecki et al., 1994). Cependant la signification biologique de cette présence n'est pas encore comprise.

La Glycoprotéine-P pourrait ainsi avoir plusieurs fonctions dans l'organisme, suivant dans quel tissu elle est exprimée :

- **Barrière hémato-encéphalique** : l'efflux de glutamate dans cette barrière est liée à la présence de la Glycoprotéine-P (Liu and Liu, 2001). Le transporteur aurait la capacité de transporter l'énaminone (un anti convulsant utilisé dans le traitement de l'épilepsie), affectant ainsi le traitement de cette pathologie (Cox et al., 2001).
- **Phospholipides-translocases (« flippases »)** : La Glycoprotéine-P semble avoir la capacité d'agir comme une translocase de phospholipides, pouvant ainsi transporter la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline (Higgins and Gottesman, 1992).
- **Métabolisme du cholestérol** : La Glycoprotéine-P pourrait avoir un rôle dans la biosynthèse du cholestérol (Liscovitch and Lavie, 2000). La protéine serait nécessaire pour transporter les stérols de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique. Dans les tubules proximaux du rein, la Glycoprotéine-P serait responsable du transport du cholestérol (Zager, 2001).
- **Résistance vis-à-vis des infections virales** : Les cellules présentant le phénotype MDR et surexprimant la Glycoprotéine-P sont également résistantes à l'infection des virus pénétrant dans la cellule à travers la membrane plasmique (Raviv et al., 2000). La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane est bloquée par la présence de la Glycoprotéine-P. Cette étude suggère que le phénomène de résistance à de multiples drogues pourrait ainsi protéger les cellules de l'infection par un des virus importants tels que le HIV (Human Immunodeficiency Virus) et le HSV (Herpes Simplex Virus).

2.5.5. Substrats de la Glycoprotéine-P

Une des caractéristiques de la Glycoprotéine-P est sa capacité à transporter une grande variété de substrats. Tous ces substrats ont en commun le fait d'être hydrophobes. Cependant, les éléments nécessaires à la définition d'un substrat de la Glycoprotéine-P sont encore assez peu connus (Tableau 2).

Tableau 2: Substrats de la glycoprotéine-P.

Anthracyclines	Daunorubicine, doxorubicine, épirubicine, idarubicine
Vinca-alcaloïdes	Vinblastine, vincristine, vindésine, vinorelbine
Anthracènes	Bisantrène, mitoxantrone
Epipodophyllotoxines	Etoposide, téniposide
Inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules	Colchicine, paclitaxel (taxol), docétaxel
Antibiotiques peptidiques	Gramicidine D, actinomycine D
Inhibiteurs de protéases virales	Ritonavir, indinavir, saquinavir
Fluorophores	Fluo-3-AM, Fura-2-AM, Rhodamine 123, Hoechst 33342/33258, Calcéine-AM
Dérivés de la camptothécine	CPT-11, topotécan

D'une manière générale, la reconnaissance des substrats se ferait par la mise en place de liaisons hydrogènes, beaucoup plus spécifiques que les liaisons ioniques ou les interactions hydrophobes (Seelig, 1998a; Seelig, 1998b; Seelig et al., 2000).

2.6. Le transporteur ABCG2

2.6.1. Découverte du transporteur

Le transporteur BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) a été cloné pour la première fois par Doyle et al. (Doyle et al., 1998), à partir d'une lignée cancéreuse de sein résistante à un agent chimiothérapeutique malgré la présence d'un inhibiteur de la Glycoprotéine-P, le vérapamil. Cette lignée résistante (MCF-7/AdrVp) présente une réduction, dépendante de l'ATP, de l'accumulation intracellulaire d'anthracyclines, malgré l'absence de la surexpression de transporteurs connus, tels que la Glycoprotéine-P ou MRP1. Bien que son expression ne soit pas particulièrement élevée dans le cancer du sein, la protéine a été appelée BCRP. Un ADNc identique à BCRP a été isolé de manière indépendante, à partir de placenta par Allikmets et al. (Allikmets et al., 1998; Miyake et al., 1999), et par Miyake et al. (Miyake et al., 1999), à partir d'une lignée cellulaire de carcinome de colon hautement résistante à la mitoxantrone.

L'analyse phylogénétique de BCRP avec d'autres transporteurs ABC révèle que BCRP est assez distante de la Glycoprotéine-P et MRP1, mais très proche de ABCG1, un orthologue humain du gène « white » chez la drosophile (Croop et al., 1997). BCRP appartient alors à la sous-famille des gènes codants pour les protéines ABCG, que l'on a alors nommé ABCG2. La sous-famille G des transporteurs ABC a un arrangement inverse des domaines comparé à la plupart des autres transporteurs ABC, où le NBD est situé à l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique (Figure 9).

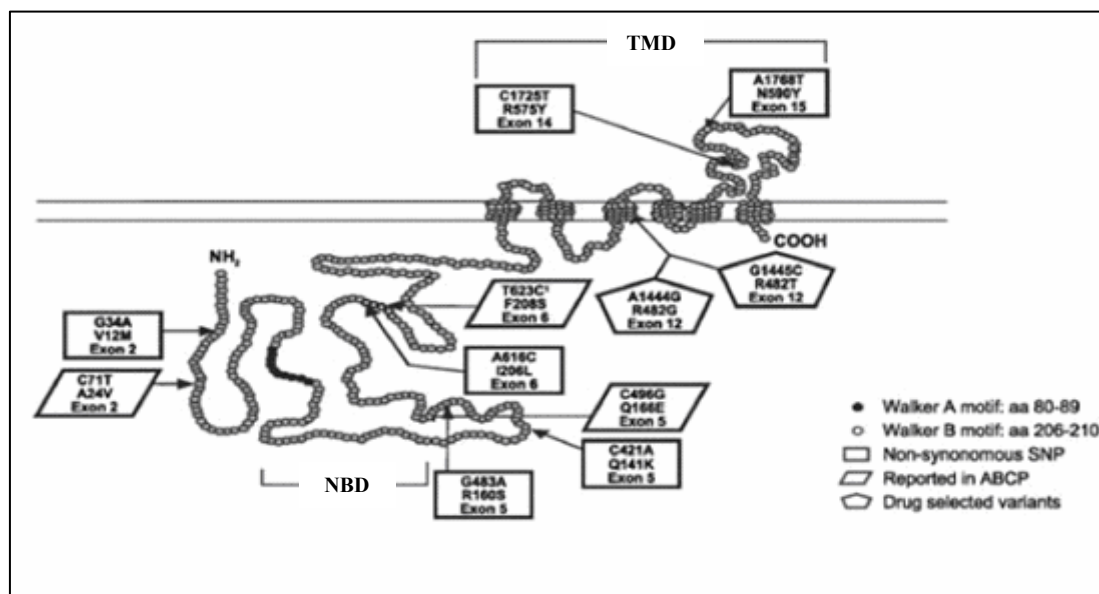


Figure 9: Topologie membranaire d'ABCG2 (Krishnamurthy and Schuetz, 2006).

2.6.2. Distribution tissulaire

Une étude récente a montré qu'il n'y avait pas d'expression d'ABCG2 dans plus de 50 tissus humains tels que le cœur, poumon, muscle squelettique, rein, pancréas, rate, thymus, et leucocytes (Doyle and Ross, 2003). Le placenta a été montré comme étant le tissu ayant le plus haut niveau d'expression d'ABCG2, ainsi que dans le foie et le petit intestin (Allen et al.,

1999). Des études immunohistologiques ont confirmé une expression dans le syntytiotrophoblaste du placenta (Maliepaard et al., 2001). Cela suggérerait que ABCG2 aurait un rôle dans la protection du fœtus en effluant les drogues et les toxines du placenta vers la circulation sanguine de la mère. Il existe aussi une expression d'ABCG2 dans la membrane canaliculaire des hépatocytes, ce qui est à mettre en relation avec la capacité d'ABCG2 à transporter les stéroïdes et xénobiotiques conjugués à des sulfates (Suzuki et al., 2003). ABCG2 est aussi exprimée dans les villosités intestinales, au niveau de la membrane apicale (Maliepaard et al., 2001; Jonker et al., 2002). Cette localisation est idéale pour un rôle de limitation de l'absorption intestinale de composés ingérés.

ABCG2 est de plus exprimée dans les cellules endothéliales des veinules et capillaires. Par contraste, un marquage sporadique d'ABCG2 est observable dans les artérioles. Cette prédominance d'ABCG2 dans les veinules peut être reliée à une régulation de ce transporteur par le taux d'oxygénation du sang (Maliepaard et al., 2001).

2.6.3. Fonction d'ABCG2 dans les cellules souches

De nombreux indices tendent à montrer que les transporteurs ABC jouent un rôle crucial dans la protection des cellules souches hématopoïétiques, et peut être d'autres cellules souches. L'importance d'ABCG2 dans ce type de cellules a été observée par rapport à d'autres transporteurs ABC (Glycoprotéine-P et MRP1). De plus, ABCG2 est fortement sous régulée lors de la différenciation de ce type cellulaire. Néanmoins, une réapparition de l'expression d'ABCG2 dans des lignées matures suggère une fonction endogène dans ces cellules (Zhou et al., 2001).

La question est donc de connaître le rôle d'ABCG2 dans les cellules souches. Son expression à la fois dans les cellules hématopoïétiques et d'autres types de cellules comme les muscles, pancréas, cerveau, et les cellules souches embryonnaires, suggère que le transporteur doit avoir un rôle important (Zhou et al., 2001). Des résultats ont montré qu'ABCG2 aurait une fonction de maintien des cellules primaires dans un état indifférencié. La transplantation de moelle osseuse surexprimant ABCG2 dans une souris, ayant subi une irradiation létale, conduit à une production plus faible de cellules hématopoïétiques matures (Zhou et al., 2002). Ainsi, ABCG2 pourrait avoir un rôle dans l'efflux de molécules impliquées dans la différenciation cellulaire, et son taux d'expression doit être finement régulé. Cependant ABCG2 conserve tout de même un rôle protecteur des cellules hématopoïétiques.

La capacité des cellules souches à se diviser dans des conditions pauvres en oxygène a poussé l'évaluation de la régulation d'ABCG2 par des facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie (HIF). L'analyse des cellules primaires *Abcg2*^{+/+} et *Abcg2*^{-/-} révèle la faible survie des cellules *Abcg2*^{-/-} en condition hypoxique. De plus, l'inhibition de la fonction d'ABCG2 dans les cellules primaires *Abcg2*^{+/+} réduit la survie des cellules dans des conditions de croissance hypoxiques (Wierdl et al., 2003; Wadkins et al., 2004). La diminution de la survie des cellules *Abcg2*^{-/-} est causée par l'accumulation d'hème (porphyrine), puisqu'il est possible de sauver les cellules en utilisant un inhibiteur de la biosynthèse des hèmes. Ainsi, la régulation d'ABCG2 par HIF et la capacité d'ABCG2 à interagir avec les porphyrines, montre que ce transporteur est important pour le maintien de l'homéostasie des hèmes dans les cellules primaires dans des conditions hypoxiques (Krishnamurthy et al., 2004).

2.6.4. Localisation cellulaire, structure et fonction

D'une manière générale, ABCG2 est localisée à la membrane plasmique de la cellule. Lorsque ABCG2 est exprimée dans des cellules polarisées, la protéine est retrouvée au niveau de la membrane apicale, et non basolatérale (Xia et al., 2005).

La structure prédite d'ABCG2 diffère de celle de la Glycoprotéine-P ou MRP1, puisque ABCG2 ne comporte qu'un seul NBD et un seul TMD de 6 passages transmembranaires, à la manière d'un demi-transporteur. ABCG2 est une glycoprotéine et contient trois sites de N-glycosylation (Mohrmann et al., 2005). Des études utilisant un système en cellules d'insectes comme système de transfection, montrent une expression de la protéine à la membrane et une fonction de transport ne nécessitant pas de glycosylation (Ozvegy et al., 2001). De récentes études montrent que la glycosylation sur le résidu asparagine 596 n'est pas utile pour la fonction et la localisation de la protéine (Diop and Hrycyna, 2005). Néanmoins, il est possible que d'autres asparagines ou d'autres modifications post-traductionnelles aient un effet sur la fonction et la localisation d'ABCG2 dans les cellules mammifères, comme dans le cas de la Glycoprotéine-P (Schinkel et al., 1993b; Gribar et al., 2000).

De nombreux demi-transporteurs ABC fonctionnent en formant des homodimères ou des hétérodimères. Les protéines ABCG5 et ABCG8 fonctionnent sous forme d'hétérodimères, et n'ont pas la capacité à s'homodimériser (Graf et al., 2003). L'activité fonctionnelle d'ABCG2 dans deux systèmes hétérologues prouve son fonctionnement sous forme homodimérique. L'expression d'ABCG2 en cellules d'insectes est fonctionnelle malgré l'absence d'autre partenaire hétérodimérique. De plus, un mutant non fonctionnel d'ABCG2 (K86M dans le motif A de Walker, dans le NBD) agit comme un inhibiteur dominant de l'activité d'ABCG2 quand cette construction est cotransfectée avec ABCG2 non muté. La dimérisation d'ABCG2 se produirait par l'intermédiaire de ponts disulfures (Ozvegy et al., 2002). Et une étude récente montre que la séquence hautement conservée G(X)₃G, importante dans l'association d'hélices, est impliquée dans la dimérisation d'ABCG2 (Polgar et al., 2004). De plus, il a été suggéré que ABCG2 pouvait exister sous forme d'oligomères et que le tétramère serait la forme active de la protéine. L'extraction d'ABCG2 avec du Triton X-100 de cellules MCF-7/AdrVp 3000, surexprimant le transporteur, montre que la forme prédominante d'ABCG2 est un homotetramère, au lieu d'un monomère ou d'un dimère (Xu et al., 2004).

La localisation de certains transporteurs membranaires est régulée par certaines voies de signalisation. Croce et al. ont montré que ABCG2 était localisée dans le cytoplasme des cellules sensibles HT 29, alors qu'elle était localisée à la membrane dans les cellules HT 29 résistantes (Fojo et al., 1987). La voie de signalisation phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K/Akt) pourrait expliquer cette différence de localisation. L'activation d'Akt est corrélée avec la translocation de Glut 4 (Transporteur de glucose) à la membrane plasmique et augmente le transport de glucose. Takada et al. ont montré que l'inhibition de l'activité de PI3K par la wortmannine conduit à la translocation d'ABCG2 dans les compartiments intracellulaires. D'autre part, l'utilisation de l'inhibiteur LY294002 de la PI3K dans les cellules hématopoïétiques induit la translocation d'ABCG2 de la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires (Misra et al., 1998; Mogi et al., 2003; Ugi et al., 2004; Takada et al., 2005) (Figure 10).

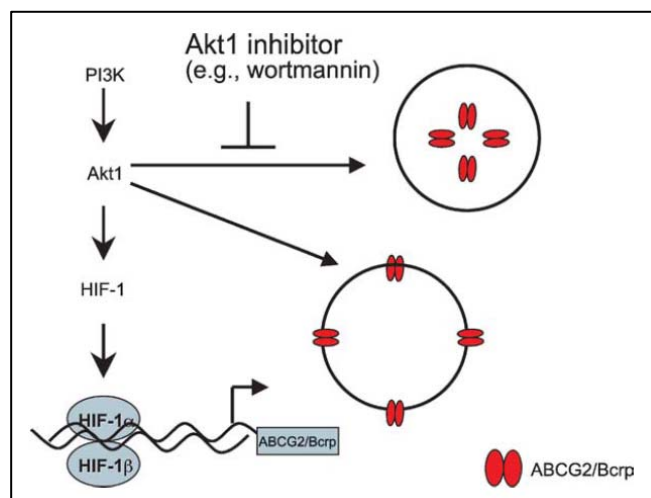


Figure 10: Détermination de la localisation membranaire d'ABCG2 par Akt1, un régulateur de HIF-1 (Krishnamurthy and Schuetz, 2006).

2.6.5. Substrats d'ABCG2 et modulation

ABCG2 est capable de transporter une grande variété de substrats, qui recouvre dans certains cas ceux de la Glycoprotéine-P et MRP1 (Tableau 3). Une grande résistance à la mitoxantrone caractérise les cellules surexprimant ABCG2. De la même manière que les autres transporteurs, ABCG2 montre une activité ATPase induite par les substrats, et transporte des composés hydrophobes chargés positivement ou négativement. Cependant, ABCG2, comme la Glycoprotéine-P, ne requiert pas de GSH pour le transport de substrats. ABCG2 interagit avec la porphyrine et les composés analogues à la porphyrine, et de récentes études suggèrent fortement que ces composés naturels soient des substrats. Le phéophorbide est un métabolite de la chlorophylle, utilisé comme photosensibilisateur dans le traitement de tumeurs, et a été montré être un substrat d'ABCG2.

L'inhibition de la fonction d'ABCG2 représente une stratégie anticancéreuse selon deux axes :

- Dans les cancers ayant naturellement un niveau d'expression d'ABCG2 (tumeurs cérébrales, tumeur des cellules germinales), l'inhibition d'ABCG2 peut permettre l'augmentation du niveau intracellulaire en agent chimiothérapeutiques, augmentant ainsi la cytotoxicité
- La viabilité des souris knockout sur ABCG2 et l'augmentation de la biodisponibilité des drogues administrées oralement dans ces souris suggèrent que l'inhibition de la fonction d'ABCG2 *in vivo* augmenterait le taux systémique en drogue

Deux inhibiteurs récents de tyrosine kinases, l'imatinib (Gleevec, ST1-571) et le gefitinib (Iressa, ZD1839) (Nakamura et al., 2005), interagissent avec une grande affinité avec ABCG2, bien qu'ils aient été développés pour interagir sélectivement avec leur cible intracellulaire, les kinases Bcr-Abl et Erb1, respectivement. A faible concentration (<1 μM), l'imatinib est transporté par ABCG2 et est capable de stimuler l'activité ATPase, vanadate

sensible (Houghton et al., 2004). A plus haute concentration, l'imatinib inhibe l'activité ATPase d'ABCG2 et ne se comporte pas comme un substrat d'ABCG2 (Ozvegy-Laczka et al., 2004).

Tableau 3: Substrats et inhibiteurs d'ABCG2.

Drogues anticancéreuses	9-aminocamptothécine, bisantrene, diflomotecan, doxorubicine, daunomycine, daunorubicine, épirubicine, étoposide, flavopyridol, GV 196771, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone, NB-506, quinazoline, SN-38, imatinib, topotecan, teniposide 3
Nucléosides	Lamivudine, zidovudine
Composés naturels	Flavonoïdes, phéophorbide, porphyrines, estrogènes sulfatés
Substrats fluorescents	Hoechst 33342, Lysotracker, Rhodamine 123
inhibiteurs	Anticorps monoclonal anti-ABCG2 (5D3), inhibiteurs de protéases HIV, C11033, futremorgrine C, GF120998, KO143, imatinib, pantoprazole, reserpine, gefitinib

2.6.6. Implication clinique d'ABCG2

Après avoir identifié ABCG2 dans les cellules résistantes aux drogues, sa présence dans les cellules cancéreuses a été étudiée afin de déterminer son rôle dans la résistance aux drogues et l'effet de son taux d'expression dans les tissus normaux sur la réponse thérapeutique. Il a été trouvé que 30% des patients atteints de leucémie myéloïde ont un fort taux d'ABCG2, et de nombreuses études ont montré une relation entre l'expression d'ABCG2 et la résistance dans ce type de cancer (Ross et al., 2000). L'analyse de l'expression dans des prélèvements de 150 tumeurs non traitées révèle la présence d'ABCG2 dans plus de 40% des échantillons, avec une forte expression dans les carcinomes du tractus digestif (colon, œsophage, estomac) (Diestra et al., 2002; Diestra et al., 2003). Les ostéosarcomes montrent un faible taux d'expression d'ABCG2. L'augmentation de l'expression d'ABCG2 dans les métastases hépatiques de tumeurs du colon après traitement à l'irinotecan, suggère que l'expression d'ABCG2 dans une sous population de cellules tumorales pourrait conduire à un échec thérapeutique (Candeil et al., 2004). Environ 65% des neuroblastomes révèlent un fort niveau d'expression d'ABCG2 (Hirschmann-Jax et al., 2004). Il faut de plus noter la présence d'ABCG2 dans de nombreuses tumeurs solides (carcinome ovarien, carcinome de poumon à petites cellules, sarcome d'Ewing, cancer de la prostate). Ces résultats montrent ainsi le rôle crucial d'ABCG2 dans la résistance clinique aux drogues des tumeurs solides et suggère que ce transporteur a une importance dans le pronostic vital des patients.

2.7. Mécanisme de transport et « ATP switch model »

De nombreuses études biochimiques ont tenté d'expliquer le mécanisme de transport des substrats par les transporteurs ABC. Il apparaît que l'hydrolyse de l'ATP apporte l'énergie nécessaire au transport, et que les NBD fonctionnent de manière alternée et seraient couplés à différentes étapes du transport. Cependant, les résultats montrent que la fixation de l'ATP, et non l'hydrolyse de l'ATP, pourrait permettre le transport.

Higgins a décrit l'« ATP switch model » (Higgins and Linton, 2004), qui implique la communication, dans les deux directions, entre les NBD et les TMD. Il n'y a pas de changements conformationnels impliquant des interactions non covalentes avec d'autres protéines intermédiaires. Au cœur de ce système se trouve les deux états conformationnels des NBD : une conformation fermée lors de la fixation de deux molécules d'ATP à l'interface du

dimère ; et la dissociation du dimère facilitant l'hydrolyse de l'ATP. Le passage entre ces deux conformations induit alors des modifications conformationnelles dans les TMD, nécessaires au transport du substrat à travers la membrane.

Les différentes étapes du mécanisme de transport peuvent être décrites de la manière suivante (Figure 11) :

- **Étape 1 :** La fixation du substrat sur les TMD initie le cycle du transport, les NBD sont en conformation ouverte, les NBD ont une haute affinité pour les nucléotides. La fixation du substrat sur les TMD induit des changements conformationnels, transmis par les ICL (IntraCellular Loop) des TMD, qui sont en interaction avec les NBD. La proximité des ICL et de la Q-loop et le motif A de Walker suggère que le substrat peut directement influencer l'affinité des NBD pour les nucléotides.
- **Étape 2 :** La fixation de l'ATP induit une conformation fermée des NBD, conduisant à de larges changements conformationnels dans les TMD suffisant pour le transport du substrat. La fixation de l'ATP induit la formation d'un dimère de NBD, libérant une énergie libre significative, qui est utilisée pour reconfigurer les TMD. Ces changements impliquent la rupture de liaisons entre les hélices α des TMD et la formation de nouveaux contacts avec de nouveaux partenaires. Ces changements induisent alors des modifications dans la localisation et l'affinité du site de fixation du substrat, qui sont capables, dans le cas de la P-gp, de faire passer la vincristine à un site de faible affinité, qui doit correspondre à l'étape de transport.

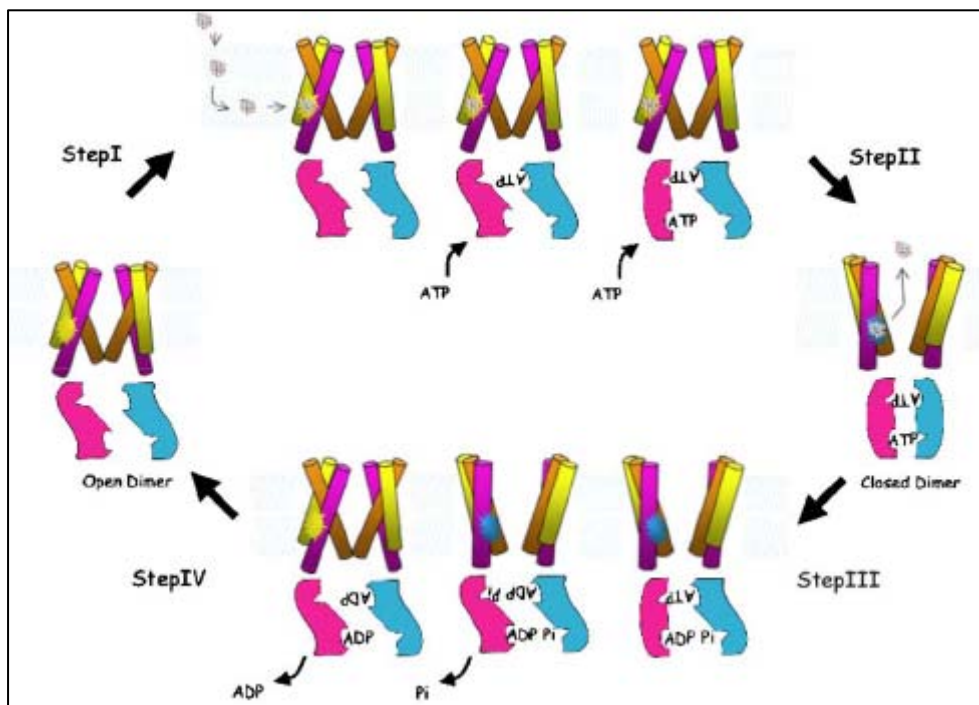


Figure 11: Modèle du cycle du transport des transporteurs ABC. Le mécanisme présenté est celui d'un exportateur (Higgins and Linton, 2004).

- **Étape 3 :** L'hydrolyse de l'ATP initie la dissociation du dimère de NBD. L'hydrolyse de l'ATP déstabilise le dimère de NBD.

- **Etape 4 :** *Relarguage de l'ADP et du Pi, et retour du transporteur à l'état initial, avec un site à haute affinité pour le substrat.* Après hydrolyse, le phosphate est libéré, et des modifications conformationnelles s'opèrent, permettant à un nouveau substrat de se fixer au site de haute affinité. L'affinité de l'ADP est faible pour le transporteur, l'ADP ne pouvant alors former un dimère de NBD.

3. La protéine de résistance à de multiples drogues : MRP1

3.1. Découverte de MRP1

Le transporteur MRP1 a été découvert en 1992 à la suite de recherche de nouvelles protéines ayant la capacité de conférer le phénotype MDR, qui était alors exclusivement associé au transporteur Pgp. Ainsi, à la fin des années 80, de nombreuses lignées cellulaires sélectionnées par différentes drogues avaient les caractéristiques classiques du phénotype MDR, mais ceci sans augmentation de l'expression de la Pgp. Une de ces lignées, H69AR (Mirski et al., 1987), dérivée de la lignée cellulaire de cancer à petites cellules H69, par sélection à la doxorubicine, était alors résistante à une grande variété de drogues naturelles telles que les anthracyclines, les *Vinca* alcaloïdes et les épipodophyllotoxines (Cole, 1990). Une analyse différentielle des ARNm de la lignée H69AR en comparaison avec la lignée H69 a montré l'expression d'un nouveau transporteur ABC. Cette protéine, initialement appelée multidrug resistance-associated protein ou MRP puis MRP1, est alors devenu le membre fondateur d'une grande sous-famille de la superfamille des transporteurs ABC, les MRPs (ABCC) (Cole et al., 1992; Cole and Deeley, 1993).

3.2. Evolution de la branche « C » de la superfamille ABC

La branche « C » est l'une des plus grandes des 7 branches des protéines de la superfamille des ABC, et chez l'Homme, cette sous-famille est composée de 13 protéines. En plus des 10 membres de la famille des MRPs, la branche « C » inclue CFTR et le récepteur aux sulfonilurées SUR1 et SUR2A/B. Ainsi, les MRPs 1-6 et MRPs 7-10 ont été désignés ABCC1-6 et ABCC10-13, respectivement, alors que CFTR, SUR1, et SUR2A/B sont désignés par ABCC7, ABCC8, et ABCC9, respectivement (Dean et al., 2001).

3.2.1. Les ABCC longs et courts

Basée sur la prédiction topologique des domaines transmembranaires, les protéines ABCC (à l'exception de MRP9) peuvent être classées en deux groupes (Figure 12). CFTR, MRP4, 5, 8, et ABCC13 ont une structure typique des ABC transporteurs avec deux TMD contenant chacun 6 hélices transmembranaires, alors que les autres membres de la sous-famille ABCC, les MRPs et SURs, ont une région N-terminale additionnelle d'environ 200 acides aminés (Bakos et al., 1996; Hipfner et al., 1997; Kast and Gros, 1997; Bera et al., 2001; Hopper et al., 2001). Cette extension chez les ABCC dits « longs », est relativement peu conservée, et son caractère hydrophobe en fait un domaine transmembranaire contenant de quatre à six passages transmembranaires. La plupart des transporteurs dits « longs », sont relativement proches de MRP1 (45, 56 et 44% d'homologie pour MRP2, 3, et 6 respectivement). Au contraire, les transporteurs ne comportant pas cette extension partagent une identité de séquence en acides aminés avec CFTR. Les exceptions avec cette généralisation sont MRP7 et ABCC13. MRP7 contient une extension N-terminale, mais elle partage plus d'identité avec MRP1 (31%), qu'avec les SURs (28 et 26% avec SUR1 et SUR2 respectivement) (Hopper et al., 2001).

La comparaison des séquences en acides aminés des ABCC longs et courts révèle que la partie N-terminale de CFTR et des MRPs courts s'alignent par une séquence relativement conservée

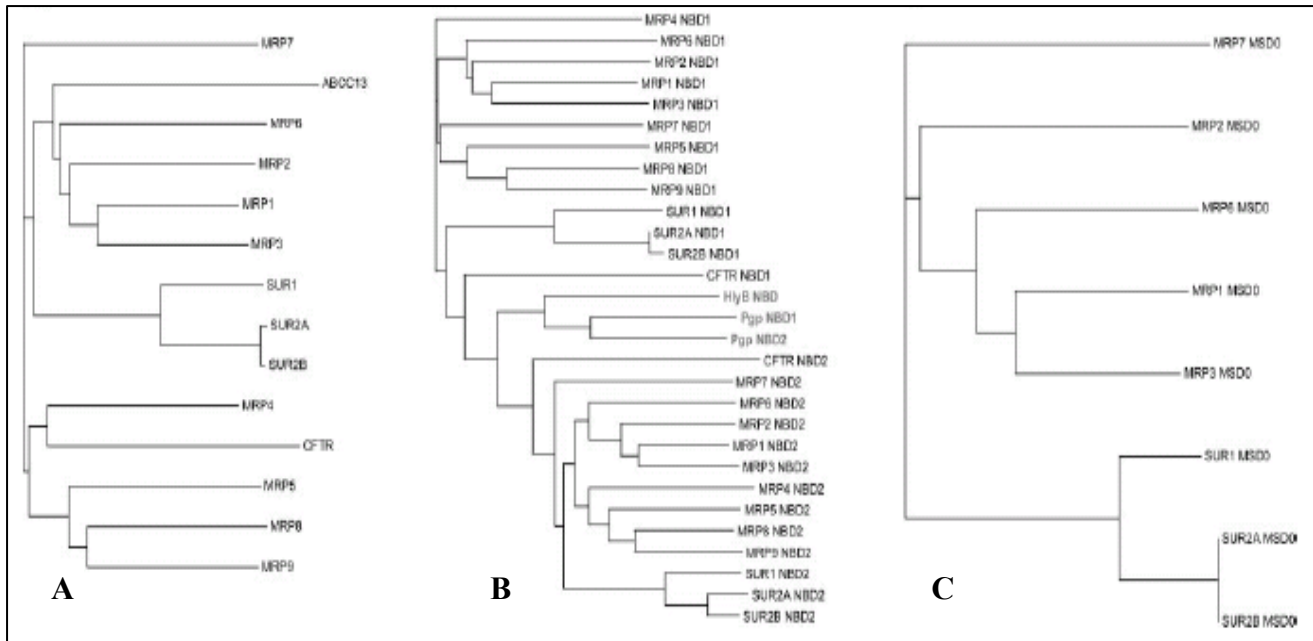


Figure 12: Diagrammes des similarités structurales des protéines de la sous-famille ABCC. A: diagramme des protéines ABCC humaines basé sur la séquence totale. B: diagramme des NBD des protéines ABCC humaines. C: diagramme des TMD0s des ABCC "longs" (Deeley et al., 2006).

3.2.2. Une caractéristique des ABCC : un NBD N-proximal atypique

Bien que les MRPs aient des structures différentes, ils partagent certains domaines hautement conservés tels que les NBD, particulièrement le NBD1, spécifique de toute la famille. Ces domaines sont aussi bien conservés chez CFTR et SUR, apportant la preuve d'un ancêtre commun à tous les membres de la sous-famille ABCC (Deeley and Cole, 1997; Dean et al., 2001). De la même manière que les autres protéines de la famille ABC, les NBD des protéines de la branche C contiennent les motifs A et B de Walker, ainsi qu'une copie de la séquence C qui est la signature des NBD ABC (Higgins et al., 1986). Néanmoins, dans la sous-famille des protéines ABCC, ces éléments divergent sur certains points en ce qui concerne l'organisation commune, en comparaison avec les autres protéines ABC. Par exemple, l'acide aminé qui suit le motif B de Walker est un glutamate chez la plupart des ABC, et ce résidu est critique pour le clivage de la liaison β - γ phosphodiester de l'ATP (2002; Smith et al., 2002). Bien que ce résidu soit présent sur le NBD2 des protéines ABCC, il est remplacé par un aspartate, chez CFTR, on trouve une sérine. L'existence de ce glutamate a un effet important sur la fixation de l'ATP et les caractéristiques hydrolytiques du NBD, et ainsi des conséquences importantes sur le cycle catalytique de MRP1 et des autres protéines ABCC. D'autre part, la séquence de la signature spécifique des ABC dans le NBD2 des protéines ABCC diffère de la séquence usuellement trouvée chez les autres membres de la superfamille. Cependant, les conséquences fonctionnelles de cette divergence sont moins bien définies (Szentpetery et al., 2004; Payen et al., 2005).

En plus de ces variations de séquence, un alignement des séquences des NBD des ABCC révèle des domaines structuraux supplémentaires qui distinguent ces protéines de la plupart des autres transporteurs de type ABC. Chez la plupart des protéines ABC, les NBD sont structurellement équivalents. Par exemple, chez la Pgp, les NBD peuvent être intervertis sans modification de la fonction et de l'activité du transporteur (Chen et al., 1986; Beaudet and Gros, 1995). Au contraire, les NBD N-terminaux des protéines ABCC sont assez divergents

de leurs équivalents C-terminaux, qui ont une structure proche de celle des NBD des autres transporteurs. La différence la plus importante est la diminution de l'espace entre le motif A de Walker et le motif C (Hopper et al., 2001). Ce changement est attribuable à une délétion de 13 acides aminés, chez MRP7, cette délétion n'est que de 10 acides aminés. Ces modifications structurales modifient ainsi le rôle fonctionnel des deux NBD dans le cycle catalytique des protéines ABCC (voir chapitre 3.10).

3.3. Polymorphisme de MRP1

3.3.1. Intérêt de l'étude du polymorphisme

Les variations génétiques des enzymes de métabolisation des médicaments et des cibles de ces derniers sont apparues comme déterminantes dans la réponse des individus lors de l'exposition à des agents chimiques ou à des médicaments que l'on retrouve dans l'environnement, dans l'alimentation ou lors de traitements (Evans and McLeod, 2003). Depuis plusieurs années, de nombreuses données ont été apportées en ce qui concerne les variations des gènes codant pour les enzymes de métabolisation des médicaments de Phase I et de phase II, donnant alors des renseignements précieux en ce qui concerne l'efficacité de nombreux agents thérapeutiques (Jazwinska, 2001; Krynetski and Evans, 2003).

Récemment, un grand intérêt a été porté dans l'étude de la variation des gènes codant pour les protéines membranaires, celles-ci ayant un rôle important dans l'action des médicaments et la toxicité des agents chimiques. Les transporteurs de type ABC font ainsi partie de cette recherche.

3.3.2. Polymorphisme de MRP1

La majorité des variations génétiques concernant les transporteurs de la sous-famille MRP sont des Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (Conrad et al., 2001; Ito et al., 2001b; Oselin et al., 2003). A l'heure actuelle, une douzaine de ces SNPs ont été identifiés sur le gène de MRP1, et sont localisés dans des régions non codantes du gène. L'occurrence de ces SNPs se fait différemment et à des fréquences variables selon la population étudiée et entre différentes populations. Par exemple, le SNP G3140C sur l'exon 23 causant la substitution d'une cystéine (Cys¹⁰⁴⁷) en sérine paraît avec une fréquence de 4,5 % dans la population américaine d'origine africaine, alors qu'elle n'a pas du tout été détectée dans la population caucasienne. A ce jour, aucun des polymorphismes de MRP1 n'a été associé avec des réponses inhabituelles à divers médicaments, sachant tout de même que le nombre d'individus étudiés est relativement faible.

Nombre de ces mutations ont été étudiée par mutagenèse dirigée puis par transfection du gène dans des cellules mammifères, et les résultats montrent qu'aucune mutation n'inactive complètement le transporteur ou ne modifie totalement sa présence à la membrane. Par exemple, la mutation G1299T sur l'exon 10 résultant de la substitution de l'acide aminé conservé Arg⁴⁵³ à l'interface cytoplasmique du TM8 en résidu sérine, diminue significativement le transport d'anions organiques alors qu'elle augmente la résistance à la doxorubicine (Conrad et al., 2001; Conrad et al., 2002). De plus, la mutation G128C sur l'exon 2 résultant de la substitution du résidu Cys⁴³ en sérine sur le TM1, modifie la localisation de MRP1 à la membrane (Ito et al., 2001b; Leslie et al., 2003c). Les cellules HeLa transfectées avec cette mutation du gène présentent alors une diminution de la résistance à l'arsénite et à la doxorubicine, alors que le transport des anions organiques tels que le GSH, le LTC₄ ou le E₂17βG reste similaire (Leslie et al., 2003c).

3.3.3. Intérêt du polymorphisme de MRP1 et des autres transporteurs

Les résultats des études biochimiques sur les diverses mutations de MRP1 révèlent la capacité qu'ont de nombreux acides aminés à changer de manière significative l'expression et/ou l'activité du transporteur. Ainsi, les connaissances actuelles sur la structure et la fonction du transporteur sont telles, qu'il peut-être assez aisé de prédire l'effet des mutations sur la fonction du transporteur, alors que les méthodes biochimiques ne permettent pas encore de prédire l'effet phénotypique.

Les meilleurs exemples de polymorphisme génétique altérant la réponse aux médicaments chez l'Homme sont les caractères monogéniques qui affectent le métabolisme des médicaments. Sur la base des connaissances structurales, fonctionnelles et de la diversité génétique des gènes de la famille MRP, il est possible que la plupart des polymorphismes de ces gènes contribuent en partie à la variabilité globale dans la réponse aux médicaments et autres agents chimiques. Il est rare que la réponse aux xénobiotiques soit déterminée par une simple protéine, et il est généralement accepté que dans la plupart des cas, cette variabilité soit d'ordre multigénique. Ainsi, une approche pharmacogénomique dans l'objectif d'identifier les déterminants génétiques serait forte intéressante, ce qui pourrait permettre l'identification des réactions individuelles vis-à-vis de divers traitements. Il serait alors possible de déterminer dans quelle mesure les transporteurs de la sous-famille MRP contribuent à la variabilité des réponses aux médicaments dans les différentes populations humaines.

3.4. Localisation membranaire et topologie du transporteur MRP1

3.4.1. Modifications post-traductionnelles et localisation membranaire

Sur la base de la séquence en acides aminés de MRP1, la protéine a une masse moléculaire prédite de 170 kDa. Des études biochimiques ont montré que la protéine était phosphorylée sur un résidu sérine et N-glycosylée, une modification post-traductionnelle qui varie selon le type cellulaire. La protéine mûre a alors une masse apparente de 180-190 kDa (Almquist et al., 1995; Bakos et al., 1996). La fonction de ces modifications n'est actuellement toujours pas élucidée.

La détermination des asparagines nécessaires à la N-glycosylation a permis d'apporter des indices importants en ce qui concerne la topologie du transporteur. La mutation de certaines asparagines a permis de déterminer quels résidus parmi les 14 sites potentiels de N-glycosylation sont utilisés. Deux sont localisées à proximité de l'extrémité N-terminale, sur les résidus 19 et 23, apportant la preuve expérimentale que la partie N-terminale de la protéine est extracellulaire. Cette localisation extracellulaire a été confirmée par l'étude de l'insertion d'épitopes. Le troisième site de N-glycosylation se situe sur Asn¹⁰⁰⁶, confirmant la localisation extracellulaire de la première boucle du TMD en position C-terminale (Hipfner et al., 1997).

En ce qui concerne la biosynthèse de la protéine, la maturation du précurseur de 170 kDa depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi et la membrane cellulaire prend approximativement 90 min, et le temps de demi-vie de MRP1 est d'environ 20 h.

Dans la plupart des cellules, MRP1 mature est présente au niveau de la membrane plasmique, bien qu'elle puisse être détectée dans des vésicules intracellulaires dans certains types cellulaires et sous certaines conditions. Dans les cellules polarisées, MRP1 se retrouve

au niveau de la membrane basolatérale, à l'exception du syncytiotrophoblaste, où MRP1 a été observée dans la membrane apicale.

3.4.2. Topologie du transporteur MRP1

Un certain nombre de topologies ont été proposées pour MRP1, dont la plupart prédisent trois domaines transmembranaires (TMD) contenant 17 hélices transmembranaires et deux domaines de fixation des nucléotides (NBD) (Figure 13). De nombreux algorithmes soutiennent un modèle dans lequel les TMD0 et TMD1 contiendraient 5 et 6 hélices transmembranaires respectivement. La topologie du TMD2 reste encore incertaine à l'heure actuelle. L'algorithme le plus utilisé prédit un TMD2 contenant seulement 4 hélices transmembranaires (Hipfner et al., 1999). Cependant, aucun résultat expérimental ne supporte ce modèle, et la cartographie des épitopes et l'utilisation de séquences de glycosylation serait en faveur de 6 hélices transmembranaires (Kast and Gros, 1997).

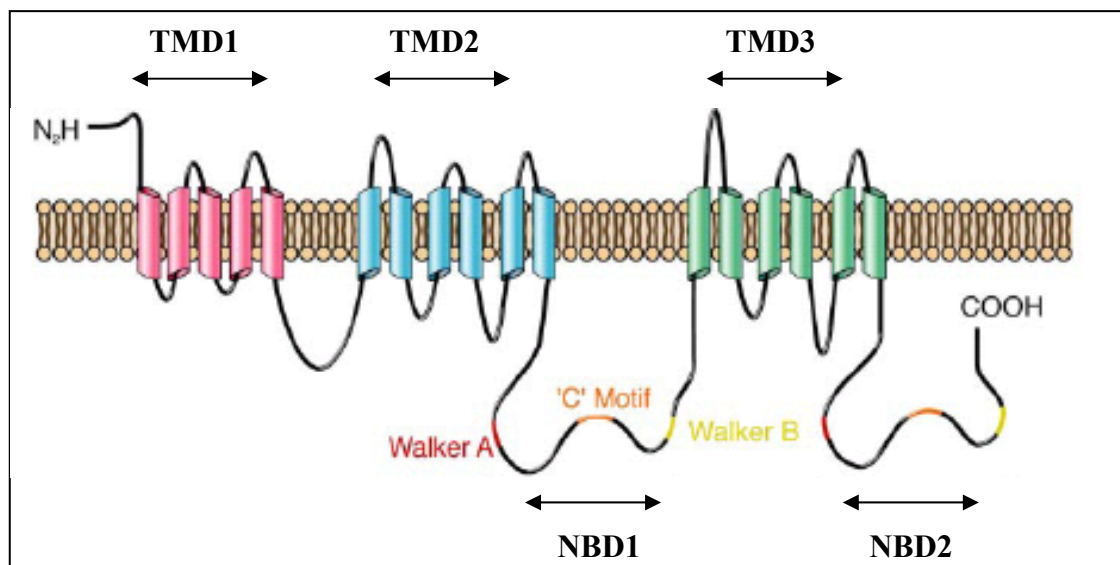


Figure 13: Topologie du transporteur MRP1.

A l'heure actuelle, les données structurales concernant le transporteur MRP1 sont encore très rares. La structure de MRP1 purifiée à partir de membranes de H69AR a été examinée par microscopie électronique (Rosenberg et al., 2001a) (Figure 14). Les résultats montrent une « image » prédominante de MRP1 sous forme monomérique, formant un anneau pentagonal entourant un pore, avec un diamètre d'environ 35 Å. En plus de cette structure en « doughnut », similaire à celle observée pour la Pgp (Rosenberg et al., 1997), une projection de l'extérieur de l'anneau pourrait représenter la localisation du TMD0.

La structure bidimensionnelle obtenue à partir de cristaux 2-D est cohérente avec les études de microscopie électronique, mais il y a des différences significatives :

- l'unité de la cellule est constituée d'un dimère de MRP1, chacun apparaissant sous forme elliptique et non pentagonale, avec un long axe similaire au diamètre de la molécule
- aucune structure contenant un pore n'est visible au sein de la molécule de MRP1

Ces discordances pourraient être expliquées de la même manière que pour la P-gp : la structure représentant un pore serait une vue de la molécule depuis la face extracellulaire, alors que le pore à la face cytoplasmique serait caché par les NBD et/ou les boucles cytoplasmiques. Il reste alors à comprendre si le dimère de MRP1 existe dans les membranes plasmiques de manière naturelle.

D'autre part, selon des résultats encore non publiés (Mark F. Rosenberg. Location of the extra transmembrane domain of multidrug resistance protein 1. ABC meeting 2006. March 4-10 2006, Innsbruck, Austria), des études ont été effectuées sur la position du TMD0 par cristallographie. A une résolution intermédiaire de 20 Å, des domaines de la protéine peuvent être visualisés, et à 6-10 Å, des structures secondaires peuvent être visualisables, telles que les hélices α . MRP1 a alors été produite de manière native et sans TMD0 et analysée par microscopie électronique à une résolution de 10 Å. La comparaison entre les deux protéines suggère que le TMD0 serait un domaine séparé à la périphérie de la molécule.

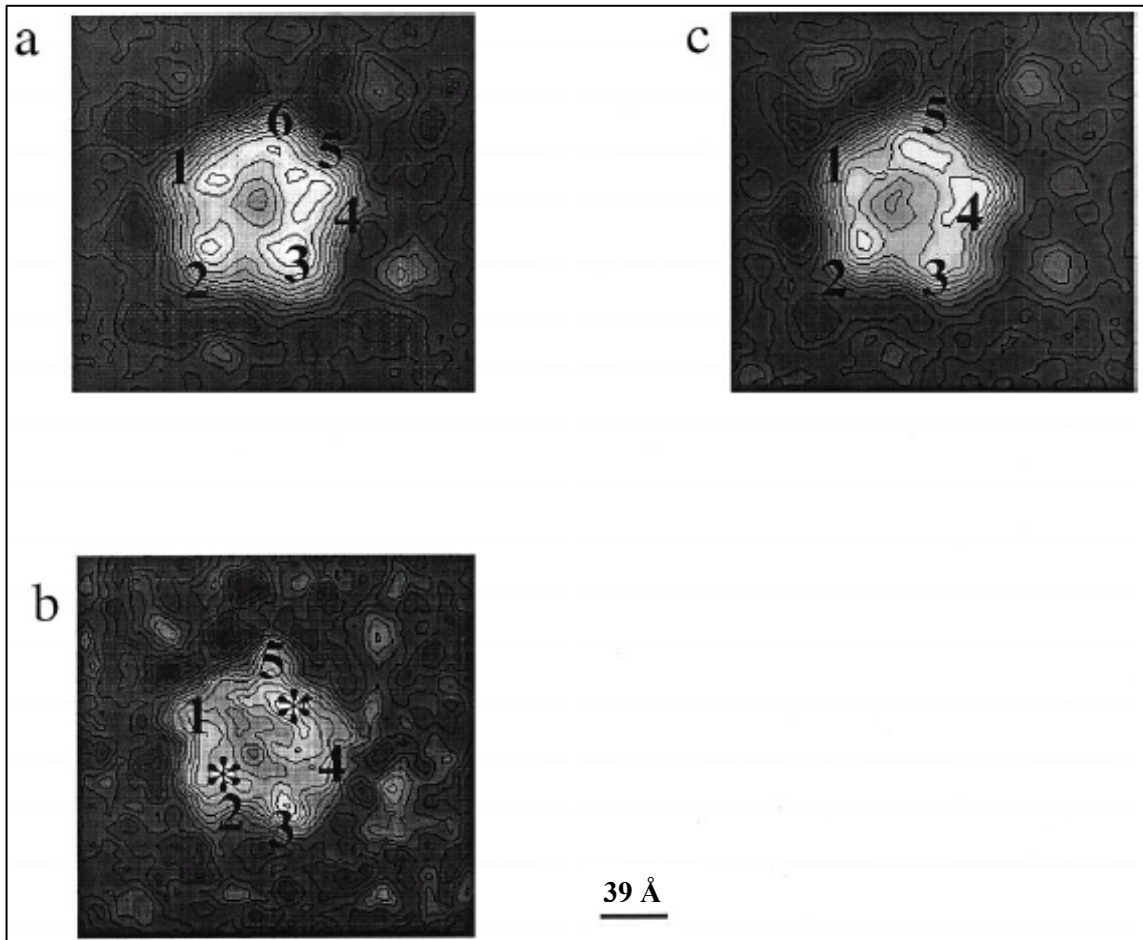


Figure 14: Carte de projection de MRP1 solubilisée calculée par single-particle analysis. Les trois différentes classes de MRP1 sont annotées a, b et c, elles diffèrent selon leur orientation (Rosenberg et al., 2001a).

3.5. Localisation et fonction physiologique de MRP1

3.5.1. Localisation de MRP1 dans l'organisme

La distribution tissulaire et subcellulaire des différents membres de la sous-famille des MRP est très variable. Dans le cas de MRP1, ce transporteur est largement exprimé dans tout l'organisme, avec de hauts niveaux d'expression dans les poumons, les testicules, les reins, les muscles squelettiques et cardiaques, et dans le placenta (Cole et al., 1992; Flens et al., 1996). De manière intéressante, MRP1 est faiblement détectable dans le foie humain adulte, alors que dans les hépatocytes en prolifération et dans les lignées cancéreuses hépatiques, telles que HepG2, l'expression de MRP1 est considérablement augmentée (Roelofsen et al., 1997).

Bien que la localisation de MRP1 soit distribuée dans tout l'organisme, on a retrouvé ce transporteur dans certaines lignées cellulaires bien spécifiques : les cellules épithéliales bronchiques, les pneumocytes hyperplasiques de type II dans le poumon, les cellules de Sertoli et de Leydig dans les testicules, les cellules de Paneth dans le colon, les syncytiotrophoblastes du placenta, les mastocytes et les érythrocytes dans le système circulatoire (Peng et al., 1999; Atkinson et al., 2003; Nagashige et al., 2003; Leslie et al., 2005). MRP1 est aussi exprimée dans le cerveau dans un type cellulaire spécifique, comme dans la barrière hématoencéphalique et le plexus choroïde de la barrière cérébrospinale (de Lange, 2004; Mercier et al., 2004).

3.5.2. Rôle physiologique de MRP1

La diversité des substrats et la distribution étendue de MRP1 suggèrent la possibilité de nombreuses fonctions physiologiques, dont beaucoup restent à confirmer. L'étude de souris *Mrp1^{-/-}* a révélé des fonctions de MRP1 prévisibles, mais aussi d'autres inattendues (Lorico et al., 1997; Schultz et al., 2001; Lorico et al., 2002; Gennuso et al., 2004). Le substrat physiologique préférentiel de MRP1 est le LTC₄. Le LTA₄ est à l'origine des leucotriènes conjugués et non conjugués, et il est synthétisé à partir de l'acide arachidonique, à l'aide de la 5-lipoxygénase (Samuelsson et al., 1987). Le LTA₄ est converti en LTB₄, un agent important dans la réponse inflammatoire, par la LTA₄ hydrolase, et en LTC₄ par la LTC₄ synthase, qui conjugue le leucotriène avec le GSH en position C₆. Le LTC₄ est produit dans les mastocytes, basophiles, éosinophiles, cellules dendritiques, macrophages, neutrophiles, plaquettes, reins et cerveau. De plus, le LTC₄ peut être synthétisé dans les microsomes du foie et les cellules endothéliales par la LTC₄ synthase. Une fois hors de la cellule, le LTC₄ est rapidement converti en LTD₄, puis LTE₄ par une γ -glutamyltranspeptidase et une dipeptidase respectivement. Les cystéinyls leucotriènes sont impliqués dans les mécanismes se produisant lors d'une réaction anaphylactique. Le LTD₄ et le LTE₄ ont la capacité de se fixer aux récepteurs couplés aux protéines G CysLT₁ et CysLT₂, associés aux réactions asthmatiques. Dans le cas des souris *Mrp1^{-/-}*, le transport de LTC₄ est diminué dans les mastocytes et les éosinophiles en réponse à une inflammation induite par des IgE. La souris engendre alors une réponse immunitaire déficiente en réponse à ce stimulus. De manière inattendue, les souris sont devenues beaucoup plus résistantes à des infections par *Streptococcus pneumoniae* (Schultz et al., 2001). Ce phénomène a été attribué à une accumulation intracellulaire de LTC₄ dans les macrophages alvéolaires, inhibant alors la synthèse de LTC₄ synthase et en réponse, une augmentation de la production de LTA₄ et LTB₄. L'augmentation de la résistance aux infections est alors attribuable à l'effet stimulateur du LTB₄ sur l'activité phagocytaire des macrophages (Bailie et al., 1996).

Les tissus qui expriment de manière constitutive MRP1, tels que les testicules, les reins, les muqueuses oropharyngées, sont très sensibles à l'étoposide chez les souris *Mrp1*^{-/-}. La présence de MRP1 dans les barrières entre le sang et d'autres tissus comme le plexus choroïde, suggèrent aussi que le transporteur contribue à la protection de sites vitaux de l'organisme. En effet, chez les souris *Mrp1*^{-/-}, il y a augmentation du passage de substrats de MRP1 du sang vers le liquide cérébrospinal. De manière similaire, MRP1 dans le placenta aurait le pouvoir de protéger le développement du fœtus des xénobiotiques et favoriserait la prévention de l'accumulation fœtale d'endobiotiques, comme le E₂17βG (St-Pierre et al., 2000; Leslie et al., 2005). D'autre part, l'efflux d'estrone sulfate par les cellules de Leydig pourrait aider à protéger les testicules des effets féminisant de l'estrogène (Qian et al., 2001b). Enfin, il y a des preuves montrant que l'expression de MRP1 est plus élevée dans le foie de rat, suggérant qu'il participerait à la protection du foie de l'accumulation de conjugués de la bilirubine à taux élevé (Jedlitschky et al., 1997; Lorico et al., 1997).

La capacité de MRP1 à transporter le GSH et le GSSG indique la possibilité que le transporteur pourrait contribuer à maintenir le potentiel redox de la cellule. Des études utilisant des lignées cellulaires surexprimant MRP1 et la détermination du taux de GSH dans les tissus de souris *Mrp1*^{-/-} supporte cette suggestion (Lorico et al., 1997). Le taux de GSH libre est diminué dans les cellules surexprimant MRP1 et diminue dans les tissus de souris *Mrp1*^{-/-}. Le taux de MRP1 a aussi été montré être augmenté de deux à trois fois après exposition à des agents qui induisent un stress oxydatif, par activation d'un facteur de transcription de réponse antioxydant, le facteur Nrf2. Par ailleurs, MRP1 peut aussi contribuer à l'efflux de GSSG sous certaines conditions, où la production de GSSG est augmentée. De cette manière, MRP1 protège les astrocytes de rats contre une exposition au H₂O₂ (Hirrlinger et al., 2001). De plus, MRP1 est impliqué dans le transport de produits de l'oxydation de lipides, tels que le 4-hydroxynonenal-GS, qui est produit durant des périodes de stress oxydatif (Renes et al., 2000; Leslie et al., 2005).

3.6. Substrats transportés par MRP1 et spécificité

La plupart des études se sont focalisés sur les substrats xénobiotiques en raison du rôle potentiel de MRP1 dans le phénomène de chimiorésistance et dans la protection de l'organisme contre les agents toxiques environnementaux. D'autres études ont cherché à identifier des substrats endogènes dans l'objectif de mieux comprendre les fonctions physiologiques de la protéine. Dans le cas de MRP1, de nombreuses drogues ont été montrées être transportées. Tel est le cas de nombreux produits naturels cytotoxiques, comme les anthracyclines, les épipodophyllotoxines, les *Vinca* alkaloïdes, ainsi que certains métaux lourds anioniques. Le premier substrat à être identifié par transport *in vitro* a été l'agent pro inflammatoire LTC₄, avec une très haute affinité. Cette découverte a permis de mettre à jour la possibilité que MRP1 puisse être un transporteur de substrats très différents. En effet, des études *in vitro* du transport en vésicules ont confirmé que MRP1 avait la capacité de transporter une gamme étendue de conjugués organiques. MRP1 est ainsi capable de transporter non seulement le GSH, mais aussi des conjugués au GSH, à des glucuronides ou à des sulfates de xéno ou endobiotiques (Tableau 4). Par conséquent, MRP1 contribue à l'efflux hors de la cellule et à l'élimination de produits hydrophiles de Phase II qui sont souvent retrouvées dans les processus de détoxification de xénobiotiques hydrophobes, tels que l'antifongique carcinogène aflatoxin B₁. MRP1 transporte aussi des conjugués du leucotriène tels que le LTC₄ et ses métabolites le LTD₄ et le LTE₄. Les stéroïdes et les sels biliaires sont également des substrats physiologiques de MRP1 (Leier et al., 1994; Jedlitschky et al., 1996; Loe et al., 1996a; Loe et al., 1996b; Jedlitschky et al., 1997; Loe et al., 1997; Keppler et al., 1998; Loe et al., 1998; Hooijberg et al., 1999; Renes et al., 1999; Bakos et al., 2000b).

Tableau 4 : Substrats de MRP1.

Composés	Exemples
<i>Médicaments /xénobiotiques</i>	
Antinéoplasiques	- Antimétabolites (methotrexate, edatrexate, ZD1694) - Anthracyclines (doxorubicine, épirubicine) - Alkaloides (étoposide, vincristine, vinblastine, paclitaxel, irinotecan)
Antiviraux	Saquinavir, ritonavir
Antibiotiques	Difloxacin, grepafloxacin
Metalloïdes	Arsénite, arséniate, antimoine
Sondes fluorescentes	Calcéine, Fluo-3, BCECF, SNARF
Toxines	Aflatoxine B ₁ , chloroprotham, fenitrothion, methoxychlor
<i>Médicaments/xénobiotiques conjugués</i>	
Conjugués au GSH	2,4-Dinitrophényl-SG, bimane-SG, N-éthylmaléimide-SG, doxorubicine-SG, thioepta-SG, cyclophosphamide-SG, melphalan-SG, chlorambucil-SG, acide ethacrynique-SG, metolachlor-SG, atrazine-SG, sulforaphane-SG, aflatoxine B ₁ -epoxyde-SG, 4-nitroquinoline 1-oxyde-SG, As(SG) ₃
Conjugués à des glucuronides	Etoposide-Gluc, 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)-3β-O-Gluc, SN-38-Gluc, 4-méthylumbelliferyl-β-D-Gluc, 6-hydroxy-5,7-diméthyl-2-méthylamino-4-(3-pyridylméthyl)benzothiazole sulphate (E3040S)-Gluc
<i>Composés naturels</i>	
Conjugués au GSH	Leucotriène C ₄ , prostaglandine A ₂ -SG, 15-deoxy-Δ ^{12,14} prostaglandine J ₂ -SG, hydroxynonenal-SG
Conjugués à des glucuronides	17β-Estradiol-17-β-D-Gluc, glucuronosylbilirubine, bis-lucuronosylbilirubine, hyodesoxycholate-6-α-Gluc
Conjugués à des sulfates	Estrone-3-sulfate, deshydroepiandrosterone sulfate, sulfatolithocholate
Folates	Acide folique, L-leucovorine
Peptides	GSH, GSSG
Autres	Bilirubine

3.7. Transport de la sphingosine-1-phosphate par MRP1, intérêt en tumorigénèse

La sphingosine-1-Phosphate (S1P) est un lipide médiateur qui est impliqué dans des processus tels que le cancer, l'immunité, et l'allergie. La S1P est un ligand qui se fixe au récepteur S1PRs, qui sont eux-mêmes couplés à des protéines G, qui régulent différentes réponses biologiques telles que la croissance, la survie, la différenciation cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, la mobilité cellulaire, l'angiogenèse, et les fonctions des mastocytes.

La S1P est produite par phosphorylation de la sphingosine (Sph), l'élément principal des sphingolipides, catalysée par deux isoenzymes, les Sph kinases.

La sécrétion de S1P n'a été montrée que dans un très faible nombre de types cellulaires (plaquettes, astrocytes, et mastocytes), et cette sécrétion nécessite une translocation à travers la membrane plasmique où se situe la Sph. Il a été montré que S1P a un rôle critique dans la réponse migratoire des cellules de cancer du sein, et permettrait d'induire la migration des mastocytes vers les sites inflammatoires.

Une étude récente (Mittra et al., 2006) montre que MRP1 serait à l'origine de ce transport. Ce transport est ainsi indépendant de la dégranulation des mastocytes, et est sensible au MK571, un inhibiteur spécifique du transporteur MRP1, alors que des inhibiteurs spécifiques de P-gp ou BCRP n'ont aucune action. De plus, la régulation négative de MRP1 en utilisant des ARN interférents, diminue l'expression de MRP1, à la membrane et diminue aussi la

sécrétion de S1P. Il a été montré que MRP1 est exprimé dans de nombreuses tumeurs solides et hématologiques, et que sa présence pouvait être un indice négatif en termes de pronostic. Les Sph kinases sont souvent régulées positivement dans de nombreux types de cancer. Ainsi, un anticorps se fixant à la S1P avec une très haute affinité et spécificité diminue significativement la progression tumorale et l'angiogenèse associée dans de nombreux modèles cancéreux humains. La capacité de S1P à agir de manière autocrine et paracrine, combinée à son action sur l'angiogenèse et la progression tumorale, suggère que l'augmentation de la sécrétion de S1P par les cellules cancéreuses pourrait impliquer le transporteur MRP1 dans la tumorigenèse.

3.8. Transport et rôle du GSH

MRP1 transporte peu de drogues non modifiées ce qui suggère que la protéine peut conférer une résistance en effluant les drogues sous forme conjuguées (Jedlitschky et al., 1996; Loe et al., 1996b). MRP1 est ainsi capable de transporter de l'étoposide conjuguée à des glucuronides et la doxorubicine conjuguée à du GSH (Priebe et al., 1998; Sakamoto et al., 1999). Le transport de nombreuses drogues non modifiées, telles que la vincristine et la doxorubicine, est dépendant et/ou stimulée par le GSH (Loe et al., 1996b; Loe et al., 1998; Renes et al., 1999)(Figure 15). Le premier indice prouvant la nécessité du GSH provient d'une étude montrant que la déplétion cellulaire en GSH diminuait l'efflux de drogues dans les cellules surexprimant MRP1 (Schneider et al., 1995).

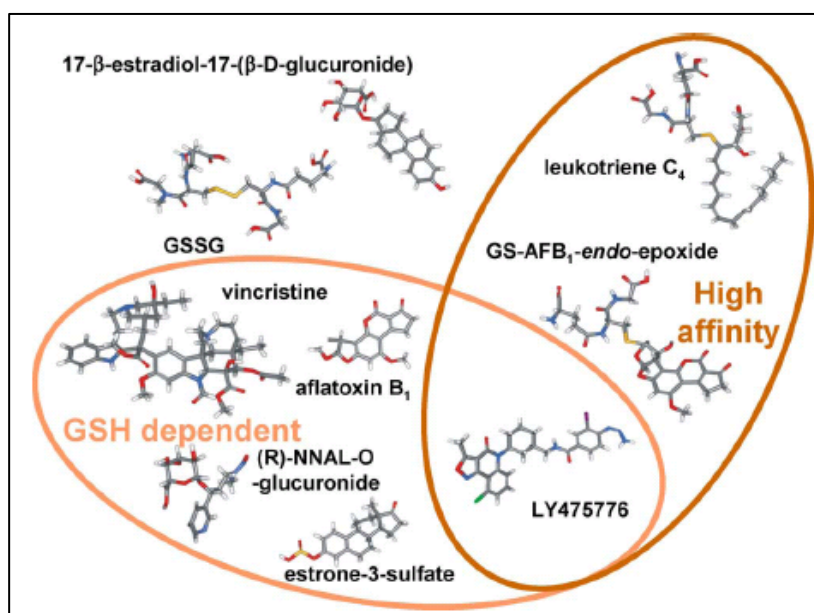


Figure 15: Structures de certains composés se fixant ou étant transportés par MRP1 de manière dépendante ou non au GSH (Deeley and Cole, 2006).

Le mécanisme par lequel le GSH stimule le transport est complexe et partiellement compris (Loe et al., 1998; Leslie et al., 2001a; Salerno and Garnier-Suillerot, 2001). Le GSH lui-même est un mauvais substrat de MRP1, puisque son K_m est supérieur à 1 mM. Au contraire, le GSSG est transporté par MRP1 avec un plus haut V_m et K_m d'environ 100 μ M (Leier et al., 1996). Néanmoins, en présence de substrats dont le transport est dépendant du GSH ou de modulateurs de MRP1, ce K_m pour le GSH peut diminuer jusqu'au niveau du GSSG. La stimulation réciproque du GSH et du second substrat (vincristine, aflatoxin B₁, ...)

a aussi été observée, indiquant une coopération positive entre la fixation des deux substrats (Loe et al., 1997; Loe et al., 1998; Evers et al., 2000; Mao et al., 2000). L'estimation de la stoechiométrie du transport du GSH et d'une drogue comme la vincristine est compatible avec la possibilité que le transport des deux substrats soit couplé. De plus, de nombreux exemples montrent que des composés stimulent fortement le transport de GSH d'environ dix fois, sans que ces composés soient eux-mêmes transportés. Ils incluent des drogues telles que le vérapamil et les bioflavonoïdes (apigénine) (Loe et al., 2000a; Leslie et al., 2001c; Leslie et al., 2003b).

La stimulation du transport des substrats de MRP1 par le GSH n'est pas dépendant du potentiel réducteur du peptide, puisque le S-méthyl-GSH, un analogue du GSH de taille variable, ou l'acide ophtalmique, un tripeptide ne contenant pas de soufre, sont aussi efficaces que le GSH (Loe et al., 1998; Leslie et al., 2001b; Qian et al., 2001b; Leslie et al., 2003a). Cependant, l'efficacité du S-méthyl-GSH tend à diminuer avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyl, ce qui peut-être dû à une compétition entre les chaînes alkyls de plus en plus larges avec le transport du second substrat. Les analogues du GSH dans lesquels le résidu cystéine a été remplacé par d'autres résidus, sont aussi capables de stimuler le transport. L'efficacité de ces composés augmente avec l'hydrophobicité de la chaîne latérale des résidus, suggérant que la cystéine du GSH peut se trouver au sein d'une région relativement hydrophobe dans la poche de fixation des substrats de la protéine. Le transport de métaux lourds anioniques peut aussi dépendre du GSH, et il pourrait se réaliser par un mécanisme de cotransport analogue à celui des substrats organiques. D'autre part, des études ont montré que l'arsénite triglutathion était un substrat de très haute affinité ($K_m \leq 1 \mu M$) (Leslie et al., 2004). L'existence d'autres métaux lourds transportés sous forme conjuguée ou en cotransport avec le GSH n'est pas encore connue.

3.9.Reconnaissance des substrats par MRP1

A la différence de nombreux transporteurs ABC bactériens pour lesquels les domaines transmembranaires et les domaines de fixation des nucléotides sont formés chacun par un polypeptide, la structure en quatre domaines des transporteurs eucaryotes est contenue en un seul ou deux polypeptides. Ainsi, les protéines ont évolué en incluant les régions cytoplasmiques qui connectent les différents domaines. Cependant, il n'a pas encore été déterminé si ces régions ont acquis des fonctions autres que celle de liaison entre les différents domaines. De plus, la détermination des régions importantes pour la reconnaissance et le transport des substrats des transporteurs tels que MRP1 est complexe du fait de la difficulté de la création de mutations entre les domaines, particulièrement la délétion d'un grand nombre d'acides aminés, sans interférer sur la conformation et la topologie globale de la protéine. Par ailleurs, les différents domaines des transporteurs eucaryotes conservent une capacité d'assemblage même lorsqu'ils ne sont physiquement liés. Ainsi, il est possible de co-exprimer différents domaines du transporteur et de suivre leur capacité à s'associer en un transporteur fonctionnel. De telles approches peuvent alors être précieuses dans le cas de la détermination des sites de reconnaissances des substrats par MRP1.

Malgré la grande diversité structurale des substrats de MRP1, dans la plupart des cas, ceux-ci entrent en compétition les uns avec les autres d'un point de vue du transport, et ce même si il n'y a aucune similarité structurale entre les composés. Cela suggère que chaque substrat établit une interaction mutuelle exclusive avec la protéine. La question est donc de savoir à quel point ces interactions entre substrat et protéine sont partagées à l'échelle atomique.

3.9.1. Rôle du TMD1

La délétion partielle du TMD1 de MRP1 et la mutation de certains acides aminés de ce domaine interfèrent avec sa biosynthèse et son activité. Néanmoins, il apparaît que ces délétions influencent la conformation correcte de ce domaine précis, alors que la délétion totale du domaine (acides aminés 1-203) aboutit à la formation d'une protéine qui conserve la capacité à être adressée normalement à la membrane, avec une localisation basolatérale. La protéine sans TMD1 a de plus la capacité de transporter un grand nombre de substrats. Cependant, bien que non indispensable à l'adressage de la protéine à la membrane et à l'activité de transport, le TMD1 est requis pour la rétention efficace de MRP1 à la surface de la cellule (Bakos et al., 1998; Gao et al., 1998).

La démonstration montrant que MRP1 conserve son activité de transport en absence du TMD1 indique que les déterminants majeurs de la fixation des substrats et de la translocation sont localisés dans la région principale de MRP1.

3.9.2. Moyens d'étude et rôle des TMD2 et TMD3

Récemment, la création d'un modèle d'énergie minimum des TMD2 et TMD3 de MRP1 a été développé. Ce modèle donne l'opportunité d'intégrer des données fonctionnelles provenant d'études par mutagenèse avec une structure tridimensionnelle hypothétique de la voie de translocation du substrat. De cette manière, la recherche et la compréhension des régions importantes pour la fixation et le transport des substrats deviennent plus accessibles.

La cartographie des régions et acides aminés isolés impliqués dans la fixation des substrats et le transport par MRP1 a été rendue possible en utilisant la mutagenèse dirigée de sites uniques ou le cross-linking de substrats photoactivables et autres ligands. Des études de photomarquage ont été menées avec différents composés :

- LTC₄ non modifié ainsi qu'un dérivé arylazido du LTC₄ (Loe et al., 1996b; Qian et al., 2001a).
- dérivés azido-GSH (Qian et al., 2002; Karwatsky et al., 2003).
- azidoagosterol-A, dont la fixation sur la protéine est dépendante du GSH (Chen et al., 2001; Ren et al., 2001).
- isoxasole tricyclique LY475776 (Qian et al., 2002).
- dérivés iodoaryl azido de la quinoline, N-(hydrocinchonidin8'-yl)-4-azido-2-hydroxybenzamide (IACI) et rhodamine 123 (IAARh123) qui fixent MRP1 de manière moins spécifique (Daoud et al., 2000a; Daoud et al., 2000b).

L'étude de la co-expression de fragments de MRP1, la protéolyse partielle, et plus récemment, l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI TOF après digestion protéolytique complète, ont été utilisés afin de localiser les régions de la protéine où ces composés se sont fixés (Wu et al., 2005).

D'une manière générale, les sites majeurs de marquage détectés par co-expression et protéolyse limitée semblent impliquer les passages transmembranaires TMs 10 et 11 du

TMD2, ainsi que les TMs 16 et 17 du TMD3. Cependant, la distribution de ce marquage dépend du type d'agent utilisé.

3.9.2.1. Reconnaissance et transport du LTC₄

Les approches décrites précédemment ont été utilisées pour déterminer l'importance des régions reliant le NBD1 au TMD3 et le TMD1 au TMD2, ainsi que le TMD1 et le TMD2. Ces études ont montré que la région reliant le NBD1 au TMD3 pouvait être enlevé sans altérer le transport du LTC₄, et ainsi que cette région n'est pas requise pour sa fixation. Cependant, bien que l'élimination du TMD1 et celle d'une partie du linker entre le TMD1 et le TMD2 jusqu'à l'acide aminé 204 aient peu d'effet sur le transport du LTC₄, l'élimination d'une séquence en acides aminés de 228 à 281 abroge toute activité du transporteur. La délétion de la région entre les acides aminés 204 et 281, ou la substitution avec la région homologue de MRP2, inactive aussi la protéine. Par ailleurs, l'activité peut-être restaurée en co-exprimant les fragments correspondants aux acides aminés 1-281 ou 204-281, mais pas 1-228. Ainsi, de manière générale, la région entre les acides aminés 204 et 281 est essentielle pour l'activité du transporteur (Bakos et al., 1998; Gao et al., 1998; Bakos et al., 2000a).

Des études de mutagenèse dirigée ont montré l'importance des TM 11 et 17 pour le transport du LTC₄. Les résidus Asn⁵⁹⁰, Arg⁵⁹³, Phe⁵⁹⁴ et Pro⁵⁹⁵ localisés sur le TM11 sont importants pour la fixation du LTC₄ (Campbell et al., 2004; Haimeur et al., 2004; Koike et al., 2004; Zhang et al., 2004). La substitution du résidu Asn⁵⁹⁰ en Ala affecte le transport de nombreux substrats, en réduisant la fixation de l'ATP par NBD1 (Zhang et al., 2004). D'un autre côté, la substitution du résidu Phe⁵⁹⁴ en Ala élimine toute fixation du LTC₄ et toute activité de transport. Bien que des études de photomarquage aient impliqué la région comprenant les TMs 10 et 11 comme site majeur de fixation des dérivés du glutathion et conjugués, aucun autre résidu polaire, aromatique ou ionisable sur ces TMD ont été identifiés pour affecter spécifiquement le transport du LTC₄. Ainsi, il apparaît que ces régions soient critiques pour la reconnaissance du GSH, du LTC₄ et probablement d'autres conjugués au GSH.

D'autre part, le TM6 peut-être un autre candidat à la reconnaissance des substrats (Haimeur et al., 2002; Haimeur et al., 2004; Wu et al., 2005), car il contient de nombreux résidus chargés, dont la mutation affecte l'activité du transporteur de manière globale (Asp³³⁶), ou diminue spécifiquement le transport du LTC₄ et du GSH (Lys³³² ou His³³⁵). Enfin, des analyses en spectrométrie de masse ont montré que le TM6 fait partie du site de fixation du LTC₄.

Tous ces résultats ont été confirmés en utilisant l'analyse des sites d'interaction du LTC₄ par spectrométrie de masse MALDI TOF. Les résultats montrent que six fragments correspondent à des zones de fixation du LTC₄, qui sont les TMs 6, 7, 10, 17 et la partie C-proximale du linker entre le TMD1 et le TMD2 (Figure 16) (Wu et al., 2005).

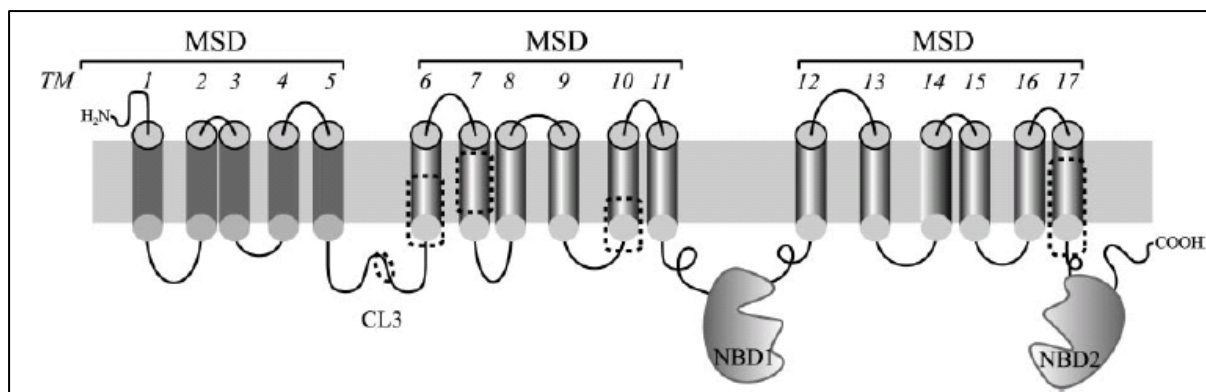


Figure 16 : Topologie illustrant les régions possibles d'interaction du LTC₄ avec MRP1, en utilisant la spectrométrie de masse MALDI TOF (Deeley and Cole, 2006).

3.9.2.2. Sites de reconnaissance des drogues

MRP1 a été photomarcqué par l'IACI (N-(hydrocinchonidin-8'-yl)-4-azido-2-hydroxybenzamide, un dérivé de la quinoline, et à la rhodamine123 (IAARh123) (Daoud et al., 2000a; Daoud et al., 2000b). Ces dérivés azido, qui ne sont pas des conjugués anioniques, peuvent inhiber la fixation du LTC₄, suggérant qu'ils interagissent avec des régions similaires de la protéine. En utilisant des versions modifiées de MRP1 par délétion de certains fragments, il a été possible d'identifier deux fragments, les TMs 10 et 11 du TMD2, ou les TMs 16 et 17 du TMD3, qui sont préférentiellement photomarcqués par les deux composés. Il pourrait alors exister deux sites substrats sur la protéine, ou un seul site qui pourrait prendre deux conformations différentes.

Cependant, les résultats obtenus précédemment diffèrent de ceux observables en utilisant un dérivé azido de l'acétate de stérol polyhydroxylé d'éponge marine, l'Agostérol-A (AG-A). Tout d'abord, la fixation de l'azido-AG-A est GSH dépendante. Le photomarcage a montré que l'interaction se situait sur un fragment contenant le TMD3 et le NBD2 de la protéine, donc une implication éventuelle des TMs 16 et/ou 17 (Ren et al., 2002; Ren et al., 2003).

La mutation du TM 17 dans MRP1 révèle que de nombreux acides aminés polaires et/ou aromatiques ont des effets non négligeables sur la spécificité des substrats, tels que les conjugués anioniques, comme le E₂17BG et le LTC₄, ainsi que le methotrexate. La majorité de ces acides aminés se trouvent sur le TM 17 se trouvant vraisemblablement à la face interne de la membrane plasmique (Ito et al., 2001a; Oleschuk et al., 2003; Situ et al., 2004). La plupart de ces résidus sont impliqués dans la reconnaissance et le transport de nombreuses drogues et conjugués à des glucuronides (Figure 17).

Les études des différents mutants de MRP1 ont permis d'identifier des acides aminés importants pour la reconnaissance et le transport d'une grande variété de substrats, supportant l'idée d'un site commun de fixation ou d'une large poche. De plus, une coopérativité positive de la fixation a été observée entre certains substrats et des composés qui ne sont pas transportés par MRP1. L'ensemble de ces expériences suggèrent que les substrats établissent des interactions recouvrant plusieurs acides aminés formant une assez grande poche de fixation.

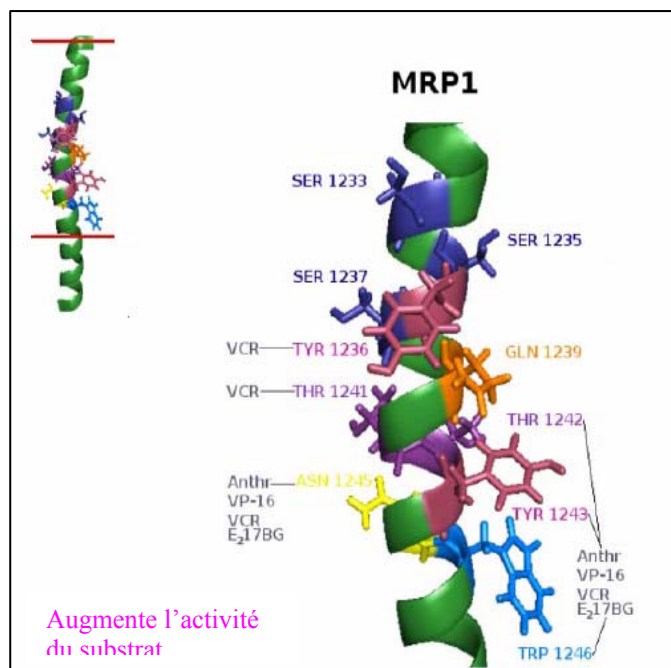


Figure 17: Effets des mutations de résidus du TM17 de MRP1 sur la spécificité des substrats. Les acides aminés présentés ont une influence sur la fixation ou le transport, et sont mis en relation avec les molécules reconnues. (Deeley et al., 2006).

3.10. Mécanisme de transport de MRP1

3.10.1. Activité ATPase de MRP1

L'activité ATPase de MRP1 est beaucoup plus faible que celle observée pour certains transporteurs ABC procaryotes et la Glycoprotéine-P. Ainsi, il est assez difficile d'étudier les propriétés hydrolytiques de ces protéines en utilisant des membranes de cellules exprimant le transporteur. MRP1 native a donc été purifiée à partir des cellules H69AR, et une forme couplée à un tag 6-histidines a été purifiée à partir de la lignée cellulaire BHK (Baby Hamster Kidney) et de levures (*P. pastoris*) (Chang et al., 1997; Chang et al., 1998; Mao et al., 1999; Manciu et al., 2000; Mao et al., 2002). Lorsque MRP1 est reconstituée en protéoliposomes, le transporteur a une activité ATPase de 5-10 nmol/mg de protéine. En plus d'avoir une V_{\max} plus faible que la Glycoprotéine-P, MRP1 a une très haute affinité pour l'ATP avec un K_m de 100-300 μM (Shapiro and Ling, 1994). Les raisons possibles de cette faible activité ATPase, en comparaison avec d'autres protéines ABC, ont été apportées par des études de fixation de l'ATP et des caractéristiques hydrolytiques de chaque NBD, de manière isolée (Gekeler et al., 1995; Gao et al., 2000; Hou et al., 2000; Hou et al., 2002; Hou et al., 2003).

3.10.2. Fonctionnement coopératif des NBD des protéines ABC

Une des principales caractéristiques de tous les transporteurs ABC est une activité ATPase hautement dépendante des interactions coopératives entre les deux NBD. Si de nombreuses études ont montré une activité ATPase des NBD isolés, l'interprétation des résultats reste à nuancer, car l'interdépendance des NBD dans la protéine entière est très importante. Les raisons de cette interdépendance ont été initialement suggérées par la

structure de la protéine bactérienne Rad50, qui dimérise en présence d'ATP (Hopfner et al., 2000; Hopfner and Tainer, 2003). Ces études ont été appuyées par la découverte des structures de MsbA de *Vibrio cholera* et de BtuCD (Locher et al., 2002; Chang, 2003). Les structures de Rad50, MsbA et BtuCD indiquent que le Walker A et le Walker B d'un NBD coopère avec le motif C du NBD opposé, pour former un site de fixations des nucléotides composite (NBS). Ainsi, l'implication des deux NBD dans la formation de chaque NBS apporte l'explication de la coopérativité observée durant le cycle de transport des protéines ABC telles que Glycoprotéine-P et quelques transporteurs bactériens (Bakos et al., 1997; Davidson, 2002; Loo et al., 2002; Higgins and Linton, 2004).

3.10.3. Fixation et hydrolyse de l'ATP sur les NBD de MRP1

La plupart des indices prouvant la différence entre les NBD de MRP1 proviennent d'études de la fixation et du photomarquage de l'ATP et de l'ADP avec des dérivés de l'ATP tels que le γ - ou α -[32 P]8-azido-ATP (Gao et al., 2000; Hou et al., 2000; Nagata et al., 2000). A 4°C, ces dérivés permettent d'examiner la fixation des nucléotides dans des conditions défavorables à leur hydrolyse, et la fixation définitive des nucléotides peut-être créée par irradiation aux ultraviolets. A température physiologique, la fixation de l'azido-ADP généré par hydrolyse peut-être retenue par l'utilisation d'orthovanadate, mimant ainsi l'état post-hydrolytique.

Il a ainsi été montré que la fixation de l'ATP est dépendante du Mg^{2+} , et ce majoritairement sur NBD1, alors que l'ADP en présence d'orthovanadate se retrouve principalement au niveau de NBD2 (Gao et al., 2000; Hou et al., 2000; Nagata et al., 2000; Koike et al., 2004; Payen et al., 2005). D'autres études ont montré que l'affinité de NBD1 pour l'ATP est deux à trois fois plus forte que sur NBD2, et que ce dernier est le site principal de l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, le NBD1 de MRP1 serait incapable d'hydrolyser l'ATP. Cependant, cette différence entre les deux NBD est plus compliquée qu'il n'y paraît. En effet, bien que la fixation et l'hydrolyse de l'ATP sur NBD2 soient dépendantes de la fixation de l'ATP sur NBD1, la fixation de l'ATP sur NBD1 est beaucoup moins dépendante de l'état de NBD2 (Gao et al., 2000; Hou et al., 2000). Par exemple, la fixation de l'ATP sur NBD1 ne diminue pas lorsque la fixation ou l'hydrolyse de l'ATP sur NBD2 est abolie par mutation de résidus essentiels sur ses Walker A ou Walker B. De plus, l'expression sous forme soluble et isolée des deux NBD a montré que NBD1 est capable de fixer l'ATP avec une bonne affinité en absence de NBD2, alors que aucune fixation ne peut-être détectée dans les mêmes conditions sur NBD2. Ces observations indiquent que la fixation étroite de l'ATP peut se produire sur NBD1 indépendamment de son interaction avec NBD2, alors que la fixation de l'ATP sur NBD2 est fortement dépendante de la fixation de l'ATP sur NBD1. Il n'existe pas alors d'équivalence fonctionnelle entre les deux NBD de MRP1.

3.10.4. Différences structurales et fonctionnelles entre les NBD

La comparaison des séquences des NBD des protéines ABC révèle que, en plus des motifs A et B de Walker et du motif C, d'autres éléments appelés boucles Q, D et H contiennent des résidus Glu, Asp et His sont très conservés. Les structures de nombreux NBD de protéines ABC ont été résolues, incluant HisP (Hung et al., 1998), MJ0796, MalK (Diederichs et al., 2000; Schmitt et al., 2003), HlyB, GlcV, BtuD (Locher et al., 2002), et MsbA (Chang and Roth, 2001), et plus récemment le NBD1 de CFTR (Lewis et al., 2005). Bien qu'il existe des régions structurellement uniques au sein de ces différents NBD, une conformation commune en huit hélices α (α 1-8) et neuf feuillets β (β 1-9) est en général

observée. Les domaines prennent alors une forme en L qui sont fonctionnellement divisés en deux parties : la partie I, une unité de fixation de l'ATP F1-like comprenant les motifs A et B de Walker, et une partie II, contenant le motif C (Higgins, 2001). D'une manière générale, la base adénine de l'ATP interagit avec un résidu aromatique conservé à l'extrémité du feuillet $\beta 1$, alors que les chaînes latérales des résidus situés sur le linker entre les feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$ stabilisent le ribose (Hung et al., 1998; Diederichs et al., 2000; Lewis et al., 2005). Les résidus dans le motif A de Walker interagissent avec les phosphates α , β et γ , et les résidus chargés négativement dans le motif B de Walker lient le Mg^{2+} et stabilisent l'ADP dans le site de fixation des nucléotides par des interactions avec l'eau. De manière similaire, les résidus Asp et His dans les boucles D et H sont en contact avec l'eau qui stabilise la fixation des nucléotides, alors que le résidu Gln de la boucle Q interagit avec le Mg^{2+} et attaque la molécule d'eau (Figure 18).

La principale différence entre les NBD de MRP1 est une délétion d'une séquence de 13 acides aminés, hautement conservée, entre le Walker A et la boucle Q de NBD1. Sur la base de la structure énoncée précédemment, cette modification élimine un feuillet β ainsi qu'une hélice α située entre les feuillets $\beta 4$ et $\beta 5$. La manière dont cette modification contribue à la fixation à haute affinité de l'ATP pour NBD1 n'est pas encore très bien connue. Néanmoins, l'insertion de la séquence de 13 acides aminés de la Glycoprotéine-P, correspondant à la délétion chez MRP1, élimine la fixation à haute affinité de l'ATP et modifie la conformation du domaine.

La plupart des NBD des protéines ABC contiennent un résidu Glu directement en aval du motif B de Walker, qui sert de base catalytique pour le clivage du groupement γ -phosphate. Bien que ce résidu soit présent au même site sur le NBD2 des protéines ABCC, l'acide aminé correspondant sur NBD1 est un résidu Asp. La conversion du résidu Asp en Glu sur le NBD1 de MRP1 devrait alors augmenter le taux de transport du substrat. Mais paradoxalement, une telle mutation diminue le transport du LTC₄ d'environ 80% (Payen et al., 2003), tout en augmentant de manière significative la fixation du groupement γ -phosphate de l'ATP. La mutation a aussi pour conséquence une forte diminution du marquage de l'ADP sur NBD2, suggérant que l'occupation du site de fixation des nucléotides de NBD1 par l'ADP prévient l'hydrolyse de l'ATP sur NBD2.

En plus du motif B de Walker atypique sur NBD1, le motif C sur NBD2 de MRP1 est assez inhabituel. La séquence de ce motif est alors LSVGQ, au lieu de LSGGQ. Ainsi, puisque le motif C de NBD2 est impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP sur NBD1, il apparaît que cette modification contribue à la faible activité ATPase du NBD1 de MRP1. La mutation du résidu Gly conservé dans le motif C de NBD1 et NBD2 inactive totalement ou partiellement le transport de LTC₄, bien que la fixation de l'azido-ATP parait ne pas être affecté. La mutation du motif C prévient la transition du substrat vers un site de faible affinité (Payen et al., 2005). Ces observations peuvent alors être la conséquence d'une mauvaise association des deux NBD en dimère.

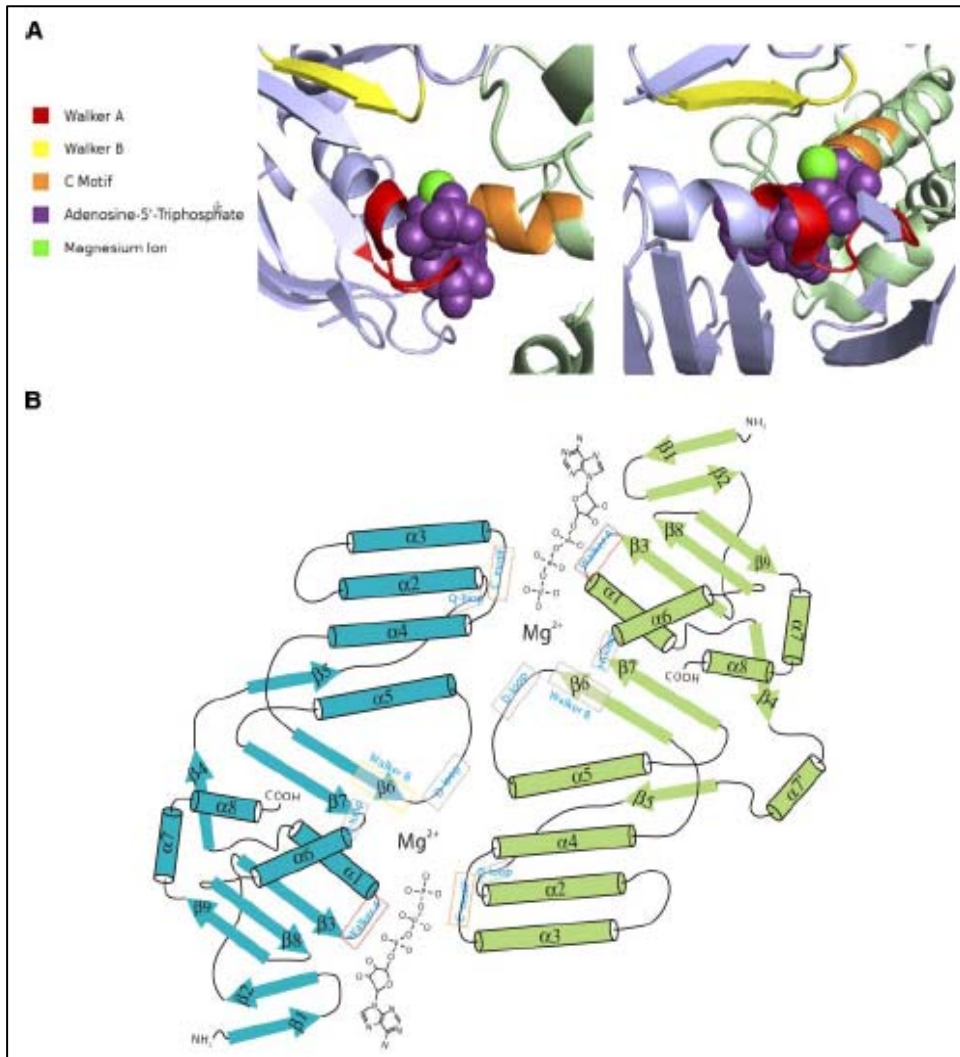


Figure 18: A: site de fixation de l'ATP selon la structure du dimère des NBD de HlyB. B: schéma du dimère de NBD avec deux molécules d'ATP.

3.10.5. Structure cristallographique du NBD1 de MRP1

Contrairement aux NBD des transporteurs procaryotes, le niveau d'activité hydrolytique du NBD1 de MRP1 est très faible, permettant ainsi d'obtenir la structure cristallographique de NBD1 en complexe avec de l'ATP/Mg²⁺. La structure révèle de manière inattendue une conformation non productive du site catalytique, apportant une explication à la faible activité hydrolytique de NBD1 (Ramaen et al., 2006).

3.10.5.1. Site de fixation des nucléotides

Le cristal de NBD1 de MRP1 a été obtenu en présence d'ATP et de Mg²⁺. L'ATP se fixe sur le NBD1 par l'intermédiaire de nombreuses interactions. La base adénosine interagit avec le résidu aromatique Trp⁶⁵³, par l'engagement de liaisons π - π . L'ATP est principalement stabilisé par l'interaction du groupement phosphate avec des résidus du motif A de Walker. Le phosphate α de l'ATP se lie avec le résidu Ser²⁸⁶ par une liaison hydrogène, et les

phosphates β et γ avec les résidus Gly⁶⁸³, Lys⁶⁸⁴ et Ser⁶⁸⁵. Le groupement phosphate γ crée une liaison ionique avec la chaîne latérale de Lys⁶⁸⁴. Les groupements β et γ de l'ATP sont complexés à un ion Mg²⁺. Cet ion métallique est coordonné par le résidu Ser⁶⁸⁵ du motif A de Walker et la Gln⁷¹³ de la boucle Q. Le Mg²⁺ interagit de plus avec le résidu aspartate, Asp⁷⁹², du motif B de Walker, ce qui est suggéré comme contribuant à la formation du site catalytique. La liaison hydrogène entre Asp⁷⁹² et Ser⁶⁸⁵ complète le site de fixation des nucléotides (Ramaen et al., 2006) (Figure 19).

3.10.5.2. Activité catalytique

Alors que la structure du NBD1 de MRP1 est similaire à celle des autres transporteurs, les résidus Asp⁷⁹³ et His⁸²⁷, deux résidus impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, adoptent une orientation inhabituelle. D'une manière générale, le résidu glutamate du motif B de Walker (ici substitué par Asp⁷⁹³) est connu comme étant la « base catalytique » du NBD, et l'histidine de la boucle H interagit avec le phosphate γ de l'ATP et coordine une molécule d'eau, qui se retrouve dans une position favorable à agir comme catalyseur. Dans la structure du NBD1 de MRP1, de nombreuses molécules d'eau ont été cristallisées entre ces deux résidus. Cependant, l'espace entre ces deux acides aminés est trop large pour que l'une de ces molécules d'eau ait un rôle catalytique. Cette substitution du glutamate en aspartate pourrait alors expliquer la très faible activité ATPase du domaine NBD1 isolé en présence ou en absence de son partenaire NBD2.

La structure montre ainsi une conformation non productive du site catalytique (non due à une mauvaise conformation du domaine isolé), avec une liaison hydrogène entre l'histidine de la boucle H et l'aspartate catalytique du motif B de Walker. La liaison hydrogène oriente ces résidus dans une autre direction que celle de l'ATP et pourrait expliquer la faible activité ATPase. Cela peut aussi expliquer les bases de la coopérativité entre les deux NBD et l'influence du NBD2 sur l'activité ATPase, agissant comme senseur de l'occupation du NBD1 par les nucléotides. L'activité ATPase du transporteur entier doit ainsi nécessiter la dimérisation des deux NBD. Expérimentalement, l'hétérodimère de NBD1-NBD2 apparaît un complexe transitoire, insuffisant pour induire la coopérativité des NBD. Cette interaction labile suggère que les interactions avec les TMD contribueraient à activer le mécanisme catalytique (Ramaen et al., 2005).

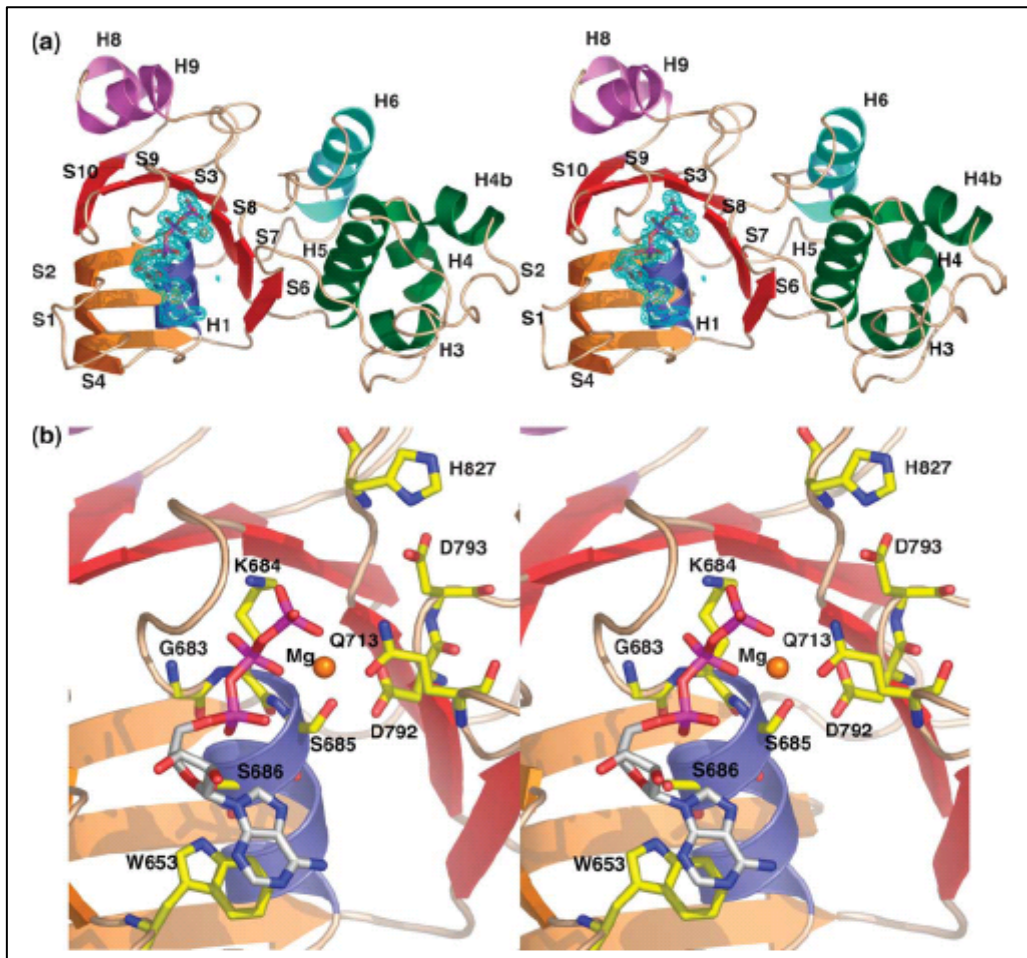


Figure 19: Représentation stéréoscopique du NBD1 de MRP1. (aa) La région correspondant au site de fixation de l'ATP F1-like est représenté en rouge, le sous domaine ABC-β en orange, l'hélice H1 en bleu, l'hélice H6 en cyan, les hélices H8 et H9 en magenta et les sous domaines ABC-α en vert. (b) Site de fixation de l'ATP (Ramaen et al., 2006).

3.10.6. Cycle du transport de MRP1

Le cycle de transport de MRP1 peut être découpé en six étapes différentes (Deeley and Cole, 2006; Rothnie et al., 2006) (Figure 20):

- 1. Fixation du substrat (et du GSH si le transport du substrat est dépendant du GSH) à un site de haute affinité.
- 2. La fixation de l'ATP sur NBD1 stabilise l'interaction entre les NBD en établissant des contacts avec le motif C de NBD2, facilitant ainsi la fixation de la seconde molécule d'ATP.
- 3. La fixation de la seconde molécule d'ATP complète la formation du dimère de NBD et cause des changements conformationnels dans NBD2. Les changements conformationnels résultants de la fixation de l'ATP sont transmis aux TMD causant une diminution de l'affinité pour le substrat.

- 4. La protéine maintient un état de faible affinité après hydrolyse de l'ATP sur NBD2, tant que NBD1 est occupé par l'ATP et que l'ADP n'a pas été relargué du NBD2. Cependant, bien que les étapes dans le modèle menant à la formation un état de faible affinité pour le substrat soient très bien décrites, le retour à l'état initial de la protéine reste à déterminer.
- 5. Si le NBD1 n'a pas d'activité ATPasique, le retour de la protéine à l'état initial se fait après relarguage de l'ADP de NBD2, ou requiert le relarguage de l'ADP de NBD2 et de l'ATP de NBD1.
- 6. Il peut être possible que l'hydrolyse de l'ATP par NBD1 soit requise.

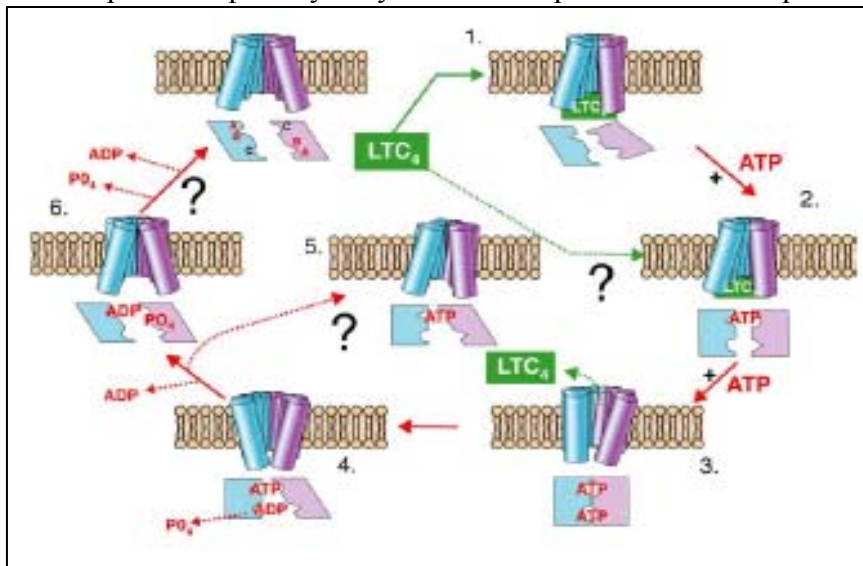


Figure 20: Modèle hypothétique du cycle du transport par MRP1 (Deeley and Cole, 2006)

3.10.7. Illustration avec l'exemple du transport de l'estrone sulfate stimulé par le GSH

Le fonctionnement de MRP1 est souvent évalué en mesurant l'efflux dépendant de l'ATP de substrats radiomarqués à l'aide de vésicules membranaires inversées préparées à l'aide de cellules surexprimant le transporteur. Ce type de transport de substrats donne, d'une manière générale, une idée sur le processus de transport. Tout d'abord, le substrat se fixe à un site de haute affinité à la face cytoplasmique de la membrane. Ce site de fixation du substrat est ensuite réorienté vers la face extracellulaire de la membrane où l'affinité est diminuée afin que le substrat puisse être relargué. L'étape finale du cycle de transport est le retour du site de fixation à son état initial de haute affinité. Pour MRP1, et d'autres transporteurs ABC, ces étapes du cycle de transport sont couplées à la fixation et à l'hydrolyse de l'ATP ; cependant les détails précis de ce couplage sont encore méconnus. Ainsi, dans une étude de Rothnie et al (Rothnie et al., 2006), une technique de fixation de radioligand a permis de déterminer directement la fixation de l'estrone sulfate sur MRP1, afin de mesurer les effets du GSH sur la fixation de ce substrat, et de montrer de quelle manière la fixation de l'estrone sulfate et du GSH est affectée par la fixation des nucléotides et leur hydrolyse.

Cette étude a permis de créer un modèle de transport de l'estrone sulfate stimulé par le GSH en huit étapes. Dans ce modèle, le GSH se fixe sur MRP1 en induisant des changements

conformationnels de la protéine (dans la partie C-terminal), ce qui conduit au dévoilement d'un site de fixation de haute affinité pour l'estrone sulfate (ES) (étapes I-III). Lorsque l'ATP se fixe aux deux NBD, un changement conformationnel au sein de MRP1 réoriente le site de fixation de l'estrone sulfate vers un état de faible affinité, probablement à la face extracellulaire de la membrane, permettant ainsi le relargage de l'estrone sulfate, alors que le site de fixation du GSH n'est pas affecté (étapes IV-VII). L'hydrolyse de l'ATP sur NBD2 cause alors une diminution de l'affinité de MRP1 pour le GSH, et le tripeptide est ainsi relargué de son site à la face cytoplasmique de la membrane (étape VIII). Ce modèle permet de cette manière de comprendre comment le GSH peut stimuler le transport d'estrone sulfate par MRP1, sans être transporté lui-même (Figure 21).

Cependant, ce modèle reste assez succinct, car il ne présente pas les étapes de restauration du site de haute affinité pour l'estrone sulfate. De plus, le mécanisme précis par lequel le GSH stimule le transport d'un substrat est encore méconnu. Mais la technique utilisée pour cette étude représente un outil puissant dans la compréhension des différentes étapes aboutissant au transport d'un substrat.

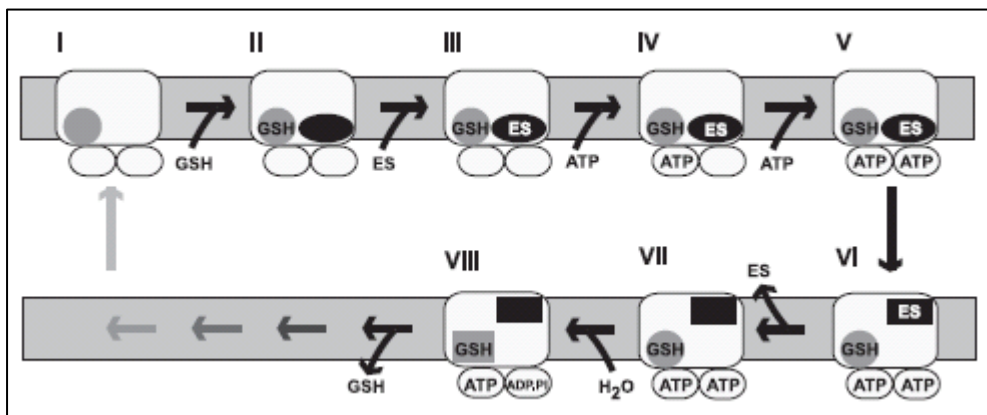


Figure 21: Modèle du transport de l'estrone sulfate stimulé par le GSH par MRP1 (Rothnie et al., 2006).

3.11. Structure de MRP1

3.11.1. Modélisation moléculaire

En l'absence de structure cristalline de haute résolution, il n'est pas aisé d'interpréter les résultats d'études de mutagenèse, car il est difficile de savoir si une mutation affecte directement la fixation d'un substrat ou altère les contacts moléculaires avec le substrat, soit en changeant l'architecture du site de fixation soit en modifiant la capacité à induire les changements conformationnels nécessaires au transport du substrat. Ainsi, la modélisation de la structure tertiaire des deux TMD principaux de MRP1 a été effectuée par homologie, par simulation moléculaire dynamique et a été utilisée pour indiquer la possible disposition des résidus de la protéine qui ont été montrés affecter la spécificité vis-à-vis des substrats et l'activité de transport (Campbell et al., 2004). Ces modèles atomiques sont basés sur les structures cristallographiques du transporteur de lipides MsbA de *V. cholera*, ainsi que du modèle de la Glycoprotéine-P. Puisque la Glycoprotéine-P et MsbA partagent une assez forte homologie, la Glycoprotéine-P a été initialement modélisée sur la structure de MsbA. Le modèle ainsi construit a ensuite été manipulé pour accommoder les données de microscopie électronique obtenues par cristallographie 2D, ainsi que les données de cross-linking des

La protéine de résistance à de multiples drogues : MRP1

cystéines de la Pgp (Loo and Clarke, 2000a; Loo and Clarke, 2000b; Loo and Clarke, 2001; Loo et al., 2002; Loo and Clarke, 2002; Loo et al., 2003). Bien que la similarité entre MsbA et MRP1 soit faible comparé à la Glycoprotéine-P, il a été possible d'identifier deux régions homologues, correspondant aux résidus 325-596 et 1019-1249 dans le TMD2 (Campbell et al., 2004). Ces régions ont été utilisées pour construire un modèle d'énergie minimum de TMD1 et TMD2 de MRP1. Ainsi, la structure ne comprend pas le TMD0, l'ICL3, les autres régions en boucle, les NBD et la région C-terminale de la protéine (Figure21).

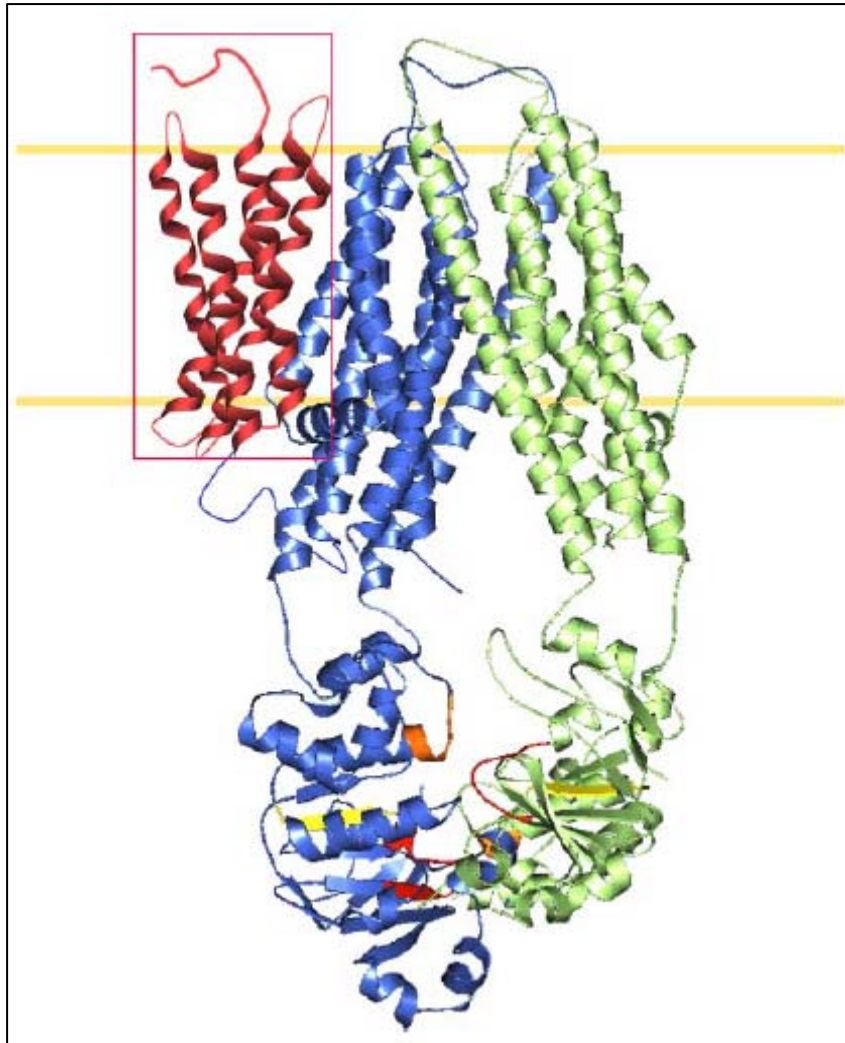


Figure 22: Modélisation 3D de MRP1 basée en partie sur le modèle d'énergie minimum de TMD1 (bleu) et TMD2 (vert) de MRP1. NBD1 (bleu) a été modélisé à l'aide de la structure du NBD1 de CFTR, et NBD2 (vert) à l'aide de HlyB. Les motifs A et B de Walker, ainsi que le motif C, sont en rouge, jaune et orange, respectivement. Les 5 TMs de TMD0 sont en rouge.

Les modèles de MRP1 prédisent que de nombreux résidus aromatiques, dont la mutation influence la spécificité de substrat (Trp⁵⁵³ TM10, Trp¹¹⁹⁸ TM16, et Trp¹²⁴⁶ TM17) (Ito et al., 2001b; Koike et al., 2002), sont localisés à proximité de l'interface membrane/cytosol avec leurs chaînes latérales se projetant vers une poche formée par les hélices des deux TMD. Basé sur ce modèle, le résidu Phe⁵⁹⁴ (TM6) serait localisé dans la région du feuillet interne de la membrane avec sa chaîne latérale se projetant aussi dans cette poche. La position de ce résidu suggère qu'il pourrait être un composant de la « corbeille aromatique » formée par les résidus

Trp et Tyr précédemment identifiés. En effet, la mutation de Phe⁵⁹⁴ en Ala réduit drastiquement le transport de quatre différents substrats et supprime le photomarquage par le LTC₄. La substitution conservative du résidu Trp en Tyr affecte de manière différentielle le transport de substrats. Ainsi, la mutation du résidu Trp diminue le transport de E₂17βG et du methotrexate mais pas de l'estrone sulfate et du GSH, alors que la mutation opposée du résidu Tyr a un effet opposé. Cette altération sélective dans le transport suggère que Phe⁵⁹⁴ pourrait interagir directement avec quelques substrats, et est consistante avec la possibilité que l'entrée du pore de translocation soit définie par un anneau aromatique.

3.11.2. Etudes cristallographiques

Les études cristallographiques de la Glycoprotéine-P, CFTR et MRP1 ont apporté des structures 3D avec des résolutions de 8, 20 et 22 Å, respectivement (Rosenberg et al., 2001a; Rosenberg et al., 2004; Rosenberg et al., 2005). Les trois protéines montrent une pseudo symétrie avec un anneau de protéine entourant une cavité ou un tonneau de taille et de forme variable, qui pourrait correspondre au pore de translocation. La structure de MRP1 est actuellement moins fine que celle des deux autres transporteurs, mais l'analyse de la pseudo symétrie révèle deux zones électroniquement denses à la périphérie du pore. Une de ces deux régions pourrait être attribuable au troisième TMD N-terminal. Néanmoins, la résolution des hélices de ce TMD n'est pas encore claire, et les images de MRP1 n'apportent pas d'information quant à la manière dont les hélices sont arrangées, ou dont elles pourraient interagir avec la région principale de MRP1. De plus, au contraire de la Glycoprotéine-P et CFTR, le cristal bidimensionnel de MRP1 révèle une unité d'un dimère de protéine. Cependant, cet arrangement pourrait être un artéfact de cristallisation, et bien que des études biochimiques et biophysiques ait montré que, sous forme native, CFTR et MRP1 formeraient un dimère (Eskandari et al., 1998), les preuves restent faibles pour les deux protéines.

4. Implication de MRP1 en clinique

4.1. Généralités

De nombreux indices provenant d'études *in vitro* et d'essais sur des animaux ont montré la capacité des transporteurs ABC à augmenter la résistance à de nombreux agents chimiothérapeutiques. L'étude de la contribution de MRP1 à la résistance clinique des cancers n'en est aujourd'hui qu'à ses premiers stades, et il n'existe que très peu d'éléments prouvant l'association entre l'expression et la réponse aux traitements chimiothérapeutiques. Ce manque de données peut être attribuable à de grandes difficultés à mener et à interpréter les informations des études cliniques. De telles études devraient utiliser des protocoles fiables dans l'objectif de déterminer les profils d'expression des transporteurs dans les tumeurs des patients avant et après traitement. Les études cliniques présentent des difficultés à établir une corrélation entre les données, l'expression des transporteurs et l'étude de leur inhibition. De nombreux essais cliniques portant sur des agents de réversion du phénotype MDR induit par la Glycoprotéine-P très prometteurs ont donné des résultats très décevants (Sikic et al., 1994; Fisher et al., 1995; Fisher and Sikic, 1995a; Fisher and Sikic, 1995b; Bradshaw and Arceci, 1998). En effet, l'interprétation des résultats est souvent altérée par la non prise en compte de l'existence de transporteurs alternatifs. De plus, les premiers agents de réversion de la Glycoprotéine-P étaient relativement peu spécifiques et de faible affinité, bien que dans certains cas, ils ont été montrés avoir des effets pharmacocinétiques significatifs. Récemment, des agents réversants de la Glycoprotéine-P, de haute affinité et de haute spécificité, ont été développés. Le zosuquidar (LY335979) a montré des effets pharmacocinétiques minimales, confirmés par une inhibition de la Glycoprotéine-P dans des essais cliniques de phase I pour des tumeurs solides et hématologiques (Fracasso et al., 2004; Gerrard et al., 2004). Cependant, les résultats des essais de phase II et III ne sont pas encore connus.

A ce jour, aucun essai comparable n'a été mené pour des agents réversants des MRPs. Néanmoins, des biopsies cliniques ont révélé une distribution répandue des MRPs dans de nombreuses tumeurs, particulièrement dans le cas de MRP1 (Leonard et al., 2003).

4.2. MRP1 dans les tumeurs solides

L'expression répandue de MRP1 dans les tissus sains implique de nombreuses précautions à prendre dans l'étude de l'expression de ce transporteur dans les biopsies cliniques. C'est un problème délicat dans le cadre d'approches techniques telles que la RT-PCR ou les immunomarquage d'échantillons de tumeurs qui pourraient contenir en partie du tissu sain. Néanmoins, les approches d'immunohistochimie, utilisant des anticorps spécifiques de MRP1, ont apporté des preuves convaincantes d'une forte expression de MRP1 dans de nombreuses tumeurs solides, incluant les cancers du poumon, du sein et de la prostate. Le cas le plus intéressant du rôle de MRP1 dans la résistance clinique provient de l'étude de cancer du poumon.

4.2.1. Cancer du poumon

Une expression fréquente de MRP1 à des taux élevés a été trouvée dans les cancers du poumon à non petites cellules (NSCLC- Non Small Cell Lung Cancer), dans plus de 75% de ce type de cancer du poumon (Sugawara et al., 1995; Nooter et al., 1996). Les NSCLC, au

contraire des cancers du poumon à petites cellules (SCLC), sont résistants à de nombreuses drogues, et des niveaux modérés ou élevés de MRP1 ont été trouvés dans une grande proportion d'adénocarcinomes non traités et de carcinomes à cellules squameuses, les deux formes majeures de NSCLC. Des hauts niveaux de MRP1 ont été corrélés avec un haut niveau de différenciation des NSCLC, particulièrement les adénocarcinomes. Bien que cela suggérerait que MRP1 soit prévalent dans des tumeurs moins agressives ayant un meilleur pronostic, deux études ont conclu que des niveaux élevés de MRP1 sont un indicateur négatif, impliquant une faible réponse aux traitements chimiothérapeutiques.

La fréquence de l'expression de MRP1 dans les SCLC non traitées est plus faible que dans les NSCLC. Lorsque le transporteur est présent, la protéine apparaît être limitée à des zones bien précises au sein des tumeurs et à leur périphérie, au lieu d'une expression uniforme observée dans les NSCLC (Berger et al., 2005). Néanmoins, la présence de MRP1 dans les tumeurs non traitées a été montrée être le signe d'une faible réponse à la chimiothérapie (Hsia et al., 2002).

4.2.2. Cancer du sein

De nombreuses études indépendantes montrent que l'expression de MRP1 est un pronostic négatif pour de nombreux types de cancers du sein. Trois d'entre elles ont conclu que la présence de MRP1 à un stade précoce de cancers du sein était associée à une rechute rapide après chimiothérapie (Nooter et al., 1997a; Nooter et al., 1997b). Les résultats de ces investigations ont été confirmés par des analyses de l'expression de MRP1 chez 500 femmes en période de pré-ménopause ayant un cancer du sein au premier stade. Cette étude indique une forte association entre l'expression de MRP1 et un temps réduit avant rechute, et une réduction de l'espérance de vie.

Les niveaux de MRP1 dans les tumeurs de cancers de patients en rechute après une première chimiothérapie ont été montrés être supérieurs à ceux des tumeurs initiales (Filipits et al., 1996). Cependant, l'élévation de l'expression de MRP1 n'est pas corrélée à la réponse à la chimiothérapie. L'analyse de l'expression de MRP1 dans des nodules lymphatiques de cancers du sein indique que le niveau de MRP1 était plus élevé dans les métastases que dans la tumeur primaire, alors que l'inverse se produit pour la Glycoprotéine-P.

4.2.3. Cancer de la prostate

La surexpression de MRP1 a été montrée comme étant un mécanisme de résistance dans les lignées cellulaires issues de cancers de la prostate après sélection à la doxorubicine. La protéine est exprimée à des niveaux modérés dans l'épithélium prostatique sain, et à hauts niveaux dans les cancers intra épithéliaux prostatiques, ainsi que dans les adénocarcinomes prostatiques. Le niveau de MRP1 est augmenté avec l'avancée du cancer et durant le processus invasif (Sullivan et al., 1998), et il est positivement associé avec le statut de la mutation p53 des tumeurs, une association également observée dans les cancers NSCLC (Kuo et al., 2003). La corrélation clinique de hauts niveaux de MRP1 et la mutation p53 est supportée par des études *in vitro* de la régulation du gène *mrp1* qui montrent que la protéine sauvage p53 est un puissant suppresseur de la transcription du gène *mrp1*. Le fait que des molécules très utilisées telles que le flutamide antiandrogène et son métabolite actif, l'hydroxyflutamide, soient effluées par les cellules surexprimant MRP1, augmente la possibilité pour MRP1 de contribuer au développement de formes réfractaires aux hormones de maladies pour lesquelles il n'y a actuellement pas de thérapie efficace (Grzywacz et al., 2003). A ce jour, l'essai clinique de la combinaison mitoxantrone/prednisone est arrivé

jusqu'en phase II en présence d'un agent réversant, le VX-710, ayant une action sur MRP1 et la Glycoprotéine-P, dans le traitement des cancers de la prostate réfractaires aux hormones (Rago et al., 2003). Les résultats ont montré néanmoins le peu d'effet de cet agent. Néanmoins, la capacité de MRP1 à transporter la mitoxantrone n'a pas encore été clairement définie.

4.2.4. Neuroblastome

Le neuroblastome est le cancer solide extracrânial le plus commun chez les enfants (Matthay, 1995). Un des indicateurs moléculaires des plus négatifs est l'amplification du gène NMYC (Cotterill et al., 2000). L'expression du gène de MRP1 a été montrée être positivement corrélée avec l'amplification de NMYC, et être un indicateur négatif du pronostic. Des études de l'expression de MRP1 dans les cellules de neuroblastome indiquent le rôle important de NMYC comme régulateur positif de la transcription du gène *mrp1*. La modulation du niveau de NMYC influence la résistance aux drogues qui sont connues comme substrats de MRP1, et le VX-70 sensibilise les cellules de neuroblastomes qui expriment MRP1 (Haber et al., 1999).

4.3.MRP1 et les cancers hématologiques

De nombreuses analyses de l'expression de MRP1 dans les leucémies chroniques et aiguës montrent des résultats discordants. De la même manière que les tumeurs solides, la signification clinique de l'expression de MRP1 dans les cellules leucémiques est compliquée par le fait que la protéine est exprimée de façon constitutive dans toutes les lignées de cellules hématopoïétiques (Poulain et al., 2000; Consoli et al., 2002). Dans les leucémies myéloblastiques aiguës (AML), l'expression de MRP1 n'est généralement pas un indicateur de réponse à la chimiothérapie. Cependant, elle peut être corrélée avec les différents stades de l'AML et peut-être de l'espérance de vie. Par contre, l'expression de MRP1 dans les leucémies lymphocytaires chroniques est en générale très élevée et peut avoir une signification clinique (Consoli et al., 2002).

5. Réversion du phénotype MDR induit par MRP1

5.1. Généralités

Le mécanisme le plus simple conduisant à la résistance d'une cellule est la réduction de la concentration intracellulaire en drogues. Une réduction du niveau intracellulaire en drogues conduit à la réduction de la quantité de composé qui peut atteindre sa cible, et de là une réduction de la cytotoxicité. D'un point de vue de la cellule, c'est la manière la plus simple et la plus efficace pour atteindre le phénotype de résistance.

Depuis la découverte de la première lignée cellulaire résistante il y a 30 ans, beaucoup de choses ont été démontrées, mais il en reste encore beaucoup à accomplir. Depuis cette époque, de nombreux laboratoires ont mis au point des sélections *in vitro* de lignées cellulaires à l'aide de produits naturels tels que le paclitaxel, la doxorubicine ou la vinblastine. Dans la majorité de ces modèles, le développement de la résistance était accompagné par un phénomène de résistance croisé avec de nombreux composés. Ce phénomène a alors été mis en relation avec la présence de la Glycoprotéine-P au niveau de la membrane cellulaire. Dans les années 80, des études ont montré la réversion de ce phénomène de résistance *in vitro* par le vérapamil.

La première stratégie utilisée pour inhiber la fonction de la Glycoprotéine-P a été d'identifier des agents non chimiothérapeutiques ayant des propriétés d'inhibiteurs. Il a alors été conclu que si ces composés n'étaient pas cytotoxiques, il serait possible de les administrer en grande quantité. Puisque la Glycoprotéine-P est une pompe effluant une grande diversité de substrats hydrophobes, il était alors relativement aisé de découvrir des inhibiteurs potentiels. Néanmoins, le développement de pharmacophores, dans le but d'augmenter la capacité des inhibiteurs, s'est avéré une tâche beaucoup plus difficile qu'il n'y paraissait.

La plupart des agents réversants de la chimiorésistance induite par le transporteur MRP1 n'ont pas été optimisés initialement pour inhiber spécifiquement MRP1, comme par exemple le probénécide et le MK571, composés les plus utilisés en tant qu'inhibiteurs de MRP1 (Evers et al., 1996). Ces composés nécessitent de fortes concentrations afin d'obtenir une activité inhibitrice de MRP1, faisant alors de ces molécules de mauvais candidats à des études cliniques.

Plusieurs modulateurs de la Glycoprotéine-P ont été évalués quant à leur capacité à inhiber MRP1 (Tableau 5). Ces composés sont le VX710, la cyclosporine A, le MS-209, le vérapamil, et le GF120918 (Germann et al., 1997). Parmi eux, le VX710 semble être le plus puissant avec des concentrations efficaces allant de 0.5 μM à 5 μM .

Tableau 5 : Inhibiteurs du phénotype MDR induit par MRP1 (Avendano and Menendez, 2002; Jedlitschky and Keppler, 2002).

Classe des composés	Composés
Analogues des leucotriènes	MK571
Stéroïdes	ZK112993, LY329146
Bloqueurs de canaux calciques	Vérapamil, PAK-104P, nicardipine, NIK 250
Nucléotides antisens	ISIS-7597
Cyclosporines	Cyclosporine A, PSC833
Flavonoïdes	Génistéine, quercitine
Divers	Probénécide, VX-710, MS-209, difloxacin, GF109203X, indométhacine, dipyridamole, LY415975

Au laboratoire, les recherches se sont focalisées sur le vérapamil et les bioflavonoïdes. En effet, il a été montré que le vérapamil induisait la stimulation de l'efflux de GSH par MRP1, pouvant dans certains types cellulaires induire la mort des cellules par apoptose. Cette nouvelle stratégie représente un potentiel intéressant en terme de thérapie, c'est pour cette raison que des travaux ont été entrepris. D'autre part, le laboratoire a une forte spécialisation en ce qui concerne les bioflavonoïdes, des composés naturels capables d'induire notamment le même effet que le vérapamil sur MRP1. Les études se sont ainsi axées sur ces deux classes de composés, tant d'un point de vue de l'amélioration de ces molécules par modification chimique, que par l'étude moléculaire de leur action sur MRP1. Les caractéristiques de ces composés seront traités plus loin dans l'exposé.

Les principales molécules connues à ce jour ayant une activité sur MRP1 sont les suivantes :

- **Agostérol A et ses analogues**

L'agostérol A est un stérol naturel polyhydroxylé (Figure 23) isolé en 1998 d'une éponge marine et qui a la capacité d'inhiber le transporteur MRP1 (Aoki et al., 2001). La synthèse de l'agostérol A et ses analogues a été entièrement décrite, et l'étude de la relation structure-activité montre l'importance des groupements 3,4,6-acetoxy ainsi que des groupements hydroxyls en position 11 et 22 dans l'activité du composé (Ren et al., 2001). L'agostérol A inhibe fortement par compétition le transport de LTC₄, et sa fixation à MRP1 est dépendante du GSH.

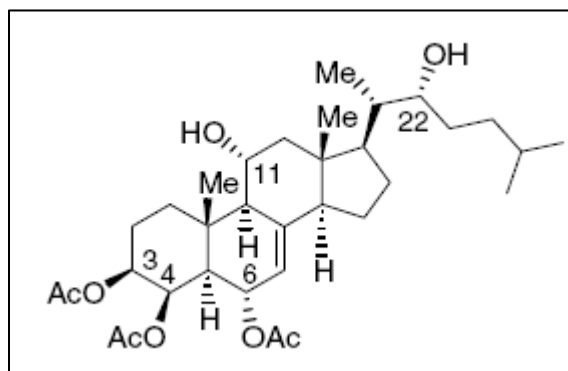


Figure 23: Structure de l'agostérol A.

- **Le vérapamil et ses dérivés et les flavonoïdes**

Voir les chapitres consacrés à ces composés.

- **Inhibiteurs basés sur le Raloxifène**

Le raloxifène est un agoniste/antagoniste non stéroïdien des récepteurs à estrogènes, développé par Eli Lilly comme modèle pharmacophore afin de concevoir des modulateurs sélectifs de MRP1 (Figure 24). Cette approche a conduit à la découverte d'une série d'analogues du raloxifène ayant des activités *in vitro* et *in vivo*. Les analogues LY117018 et le LY329146 sont capables de réverser la résistance à la doxorubicine des cellules surexprimant MRP1.

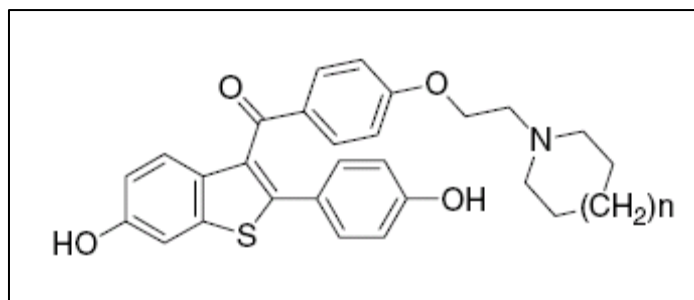


Figure 24: Structure du raloxifène.

- **Piperazine et composés dérivés de la piperadine**

En 2002, Degenhardt et Eichkofft ont montré l'utilisation de la piperazine N, N-disubstituée dans l'inhibition des transporteurs impliqués dans le de phénotype MDR (Figure 25). Ces composés inhibent la Glycoprotéine-P et MRP1. La recherche de modulateurs moins toxiques, et plus solubles dans l'eau, a conduit à la découverte de piperidylfluorendiones azotés. Néanmoins, ces molécules manquent de sélectivité puisqu'ils inhibent la Glycoprotéine-P, MRP1 et MRP2.

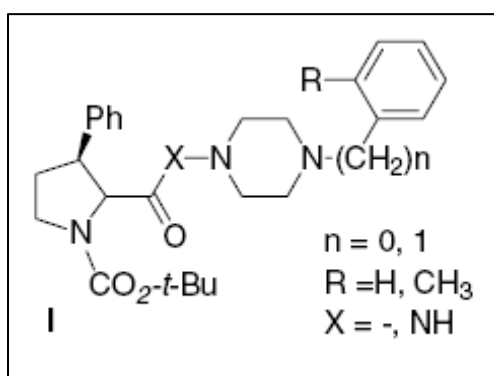


Figure 25: Structure de la piperazine.

- **Composés basés sur l'isoxasole**

Le noyau isoxasole est une structure commune connue dans de nombreux médicaments utilisés en clinique (Figure 26). Récemment, à l'aide de criblages et modifications chimiques, une nouvelle série de dérivés de l'isoxasole ont été mis au point par Elli Lilly. Le LY402913 a été identifié comme un modulateur potentiel de MRP1, en améliorant la cytotoxicité induite par la doxorubicine et en augmentant l'activité anti proliférative de la vincristine. Ce composé inhibe le transport du LTC₄, et aurait une forte sélectivité pour MRP1.

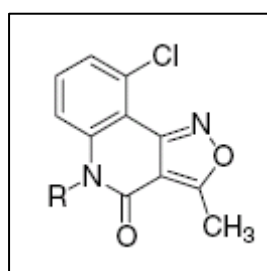


Figure 26: Structure de l'isoxasole.

- **Modulation par les peptides, pseudo-peptides et peptidomimétiques**

Il a été établi que MRP1 avait la capacité de transporter les drogues conjuguées à du GSH ou en co-transport avec du GSH libre. La formation des conjugués au GSH est catalysée par la glutathion-S-transférase (GST), et la surexpression de la GST a souvent été associée avec la résistance aux agents chimiothérapeutiques. Ainsi, cette enzyme peut être la cible d'inhibiteurs, et deux classes de modulateurs de MRP1 ont été étudiées : les composés qui miment le GSH, et les conjugués au GSH.

Trois types de composés ont été utilisés pour cibler la GST. Le premier concerne les composés de structure différente du GSH, incluant l'acide ethacrynique (Tew et al., 1988; Hansson et al., 1991), les dérivés du gossypol (Ford et al., 1991) ou le disulfiram. L'inconvénient de ces composés est leur grande activité dans d'autres domaines thérapeutiques, les rendant peu utilisables dans le traitement du phénotype MDR.

Le second type d'inhibiteurs de la GST consiste en l'étude d'analogues du GSH, qui fonctionneraient comme des compétiteurs du substrat. En 1999, O'Brien (O'Brien et al., 1999) a décrit la modulation de MRP1 par un analogue du GSH, le TER199 (Flatgaard et al., 1993). Ce composé a été obtenu en substituant le résidu Gly du GSH par une phényl glycine, la benzoylation du groupement thiol et l'estérification des deux acides carboxyliques. Le TER199 peut ainsi facilement traverser la membrane, et après être entré dans la cellule, les esters sont hydroxylés et des acides carboxyliques sont formés. Le TER199 a une affinité 1000 fois supérieure pour la GST que le GSH.

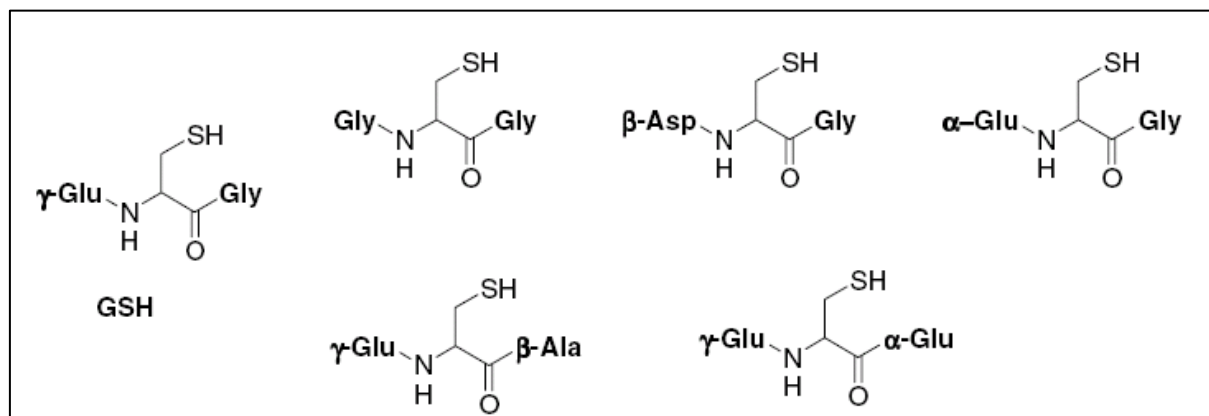


Figure 27: Structure du GSH et de ses analogues, des substrats potentiels de MRP1.

Dans de récentes études, Leslie a montré l'interaction d'analogues du GSH avec MRP1 (Leslie et al., 2003a). Ces composés ont été obtenus en remplaçant le résidu γ -Glu du GSH par d'autres acides aminés (Gly, β -Asp, α -Glu) ou le résidu Gly par β -Ala ou α -Glu, dans l'objectif d'établir les éléments structuraux nécessaires à l'interaction du GSH avec MRP1. Les résultats indiquent que la partie γ -Glu est indispensable à l'activité, alors que la substitution du résidu Gly est tolérable. De plus, la substitution du résidu Gly par des acides aminés hydrophobes, tels que Leu ou Phe, augmente l'activité des peptides (Figure 27).

Le troisième type d'inhibiteur de la GST consiste en des composés dérivés de conjugués du GSH. Pour augmenter l'activité des peptidomimétiques, le groupement sulfate

de la cystéine a été conjugué à l'acide ethacrynique, basé sur le fait que le conjugué GSH-acide ethacrynique est un bon substrat de MRP1 et a un effet inhibiteur de la GST Afin de protéger ces molécules des peptidases, les liaisons peptidiques ont été remplacées par des N-méthylamides, des amides réduites, et des liaisons méthylènes (Ploemen et al., 1990; Awasthi et al., 1993; Burg and Mulder, 2002).

5.2.Relation structure-activité des modulateurs de MRP1

La principale difficulté de la recherche d'inhibiteurs des transporteurs ABC provient de la grande variété de substrats reconnus par ces protéines. Il est alors difficile d'établir un modèle de modulateurs. De plus, la multiplicité des systèmes biologiques utilisés dans le criblage des modulateurs rend l'étude de ces modèles encore plus compliquée.

Depuis que les recherches d'inhibiteurs de MRP1 ont débuté, deux classes de molécules se sont distinguées :

- Les composés agissant par la voie du GSH ou de la GST, qui sont généralement des peptidomimétiques
- Les composés dont le mécanisme d'action ne prend pas en compte le GSH et qui ainsi ont une activité indépendante de la GST

Le traitement des résultats provenant de ces composés doit alors se faire de manière séparée. Il est tout de même possible de déterminer des éléments importants dans la modélisation de modulateurs actifs sur MRP1 :

- La présence d'au moins deux noyaux aromatiques et/ou hétéroaromatiques.
- La présence d'amines tertiaires ou imines est souvent observée.
- La présence de groupements polaires tels que les hydroxyles, amines primaires ou acides carboxyliques est rare, alors que la présence de groupement carbonyles est fréquente, se qui laisse supposer que ces composés ont une tendance à être des accepteurs de liaisons hydrogènes, plutôt que des donneurs.

Une approche supplémentaire de la modélisation de modulateurs de MRP1 et des éléments chimiques nécessaires à leur activité peut provenir de l'utilisation de logiciels tels que Catalyst, afin de construire des pharmacophores.

Enfin, en l'absence d'une structure de haute résolution du transporteur MRP1, une des stratégies possibles est de s'appuyer sur la découverte des acides aminés nécessaires à la fixation des substrats de MRP1. Ainsi, il serait possible de concevoir des molécules pseudo-peptides, capables de mimer les acides aminés nécessaires à l'interaction du GSH avec MRP1.

5.3.Sites de fixation des substrats de MRP1

Les questions concernant le site de fixation des modulateurs, et leur mécanisme d'action, reste encore à l'heure actuelle non résolues. Ces questions ont déjà été très étudiées en ce qui concerne la Glycoprotéine-P, mais l'absence de structures cristallographiques de la Glycoprotéine-P ne permet pas non plus de répondre à ce questionnement. La polyspécificité

des transporteurs impliqués dans le phénotype MDR contribue de plus à l'incompréhension des divers mécanismes mis en jeu.

Dans de récentes études, des différences structurales significatives ont été trouvées entre la Glycoprotéine-P et MRP1 durant le cycle de transport comparé au cycle hydrolytique de l'ATP. Borst et al (Borst et al., 1999), a proposé un modèle de MRP1 pour lequel il y aurait deux sites de fixation des substrats, dont un interagissant avec le GSH (site G) et un second ayant une forte affinité pour le substrat (site D). En 2001, Ren et al (Ren et al., 2001) localisent deux sites dans la boucle L₀ et la moitié C-terminale, respectivement. En utilisant un série de mutants de MRP1, Daoud et al (Borst et al., 1999) ont tenté de déterminer plus précisément les sites de fixation, et conclurent que les différents transporteurs ABC avaient des sites de fixation des substrats similaires. L'utilisation de diverses molécules photomarquables a confirmé l'existence de deux sites accueillant les substrats sur MRP1 (Karwatsky and Georges, 2004). Ainsi, toutes ces données moléculaires peuvent aider à la modélisation d'inhibiteurs spécifiques, ayant la capacité de réverser *in vivo* le phénotype MDR induit dans les cellules tumorales.

5.4. La modélisation des pharmacophores

La capacité d'identification de ligands de transporteurs est une étape importante dans la découverte de médicaments et dans leur développement. Cela peut améliorer de façon significative la recherche de molécules ayant de meilleures propriétés pharmacocinétiques, et cela peut conduire à la découverte de nouvelles entités chimiques ciblant les transporteurs. Des approches *in silico*, spécialement basées sur des méthodes de criblage de bases de données de pharmacophores, apportent un grand potentiel dans l'amélioration de l'identification de nouveaux ligands, permettant d'augmenter la qualité des touches. Récemment, ces méthodes de criblage de bases de données ont permis d'identifier de nouveaux ligands ayant une signification pharmacologique intéressante, d'un point de vue de la modulation de transporteurs tels que la Glycoprotéine-P, MRP1 ou BCRP (Chang et al., 2006).

5.4.1. Les approches *in silico*

L'augmentation de la puissance informatique et l'amélioration continue des programmes de modélisation, ont permis aux ordinateurs de pénétrer virtuellement au sein des différentes étapes de recherche et de développement pharmaceutique (Chang and Swaan, 2006). Ces approches de modélisation *in silico* peuvent ainsi être utilisées pour la modélisation de transporteurs tels que MRP1. Ainsi, l'étude de l'interaction des transporteurs avec différentes molécules peut être visualisée de deux manières :

- la modélisation du transporteur, liée à la structure tridimensionnelle des transporteurs, souvent basé sur l'homologie avec des structures déjà existantes de protéines génétiquement et fonctionnellement reliées (Pleban et al., 2005).
- ou d'un point de vue du ligand, basée sur la relation structure/activité de manière quantitative (QSAR) et la modélisation de pharmacophores.

Bien que le peu de structures existantes complexifie la modélisation des transporteurs, d'autres difficultés sont à prendre en compte, quant à l'identification des domaines de fixation des ligands. Cela est généralement du à la nature dynamique du processus de translocation du

ligand. Ainsi, le processus de transport peut être divisé en différentes étapes : la reconnaissance du ligand, les changements conformationnels, le passage du ligand à travers différents sites de fixation, la translocation et le relargage de l'autre côté de la membrane. De plus, de multiples sites de fixation peuvent exister, et la fixation des ligands à ces sites peut être temporaire ou diffuse.

Il existe deux méthodes pour le design ou l'identification de nouveaux ligands de transporteurs :

- l'approche *de novo*, un modèle quantitatif (un modèle 3D-QSAR ou une prédiction de l'affinité des molécules) est tout d'abord généré, qui guide ensuite la synthèse chimique de composés plus actifs. Cette étape est généralement suivie de tests *in vitro*, apportant de nouvelles informations pour des synthèses plus affinées.
- l'approche de criblage virtuel prend l'avantage de la disponibilité d'un grand nombre de composés dans des banques de données commercialisées. Les critères décrivant les conditions de transport peuvent être utilisés pour cribler ces banques de données afin de sélectionner des molécules possédant une affinité pour le transporteur ciblé. Ainsi, les synthèses coûteuses et les longs temps de travail requis par l'approche *de novo* sont évitées, en sélectionnant des composés déjà existants (Shoichet, 2004) (Figure 28).

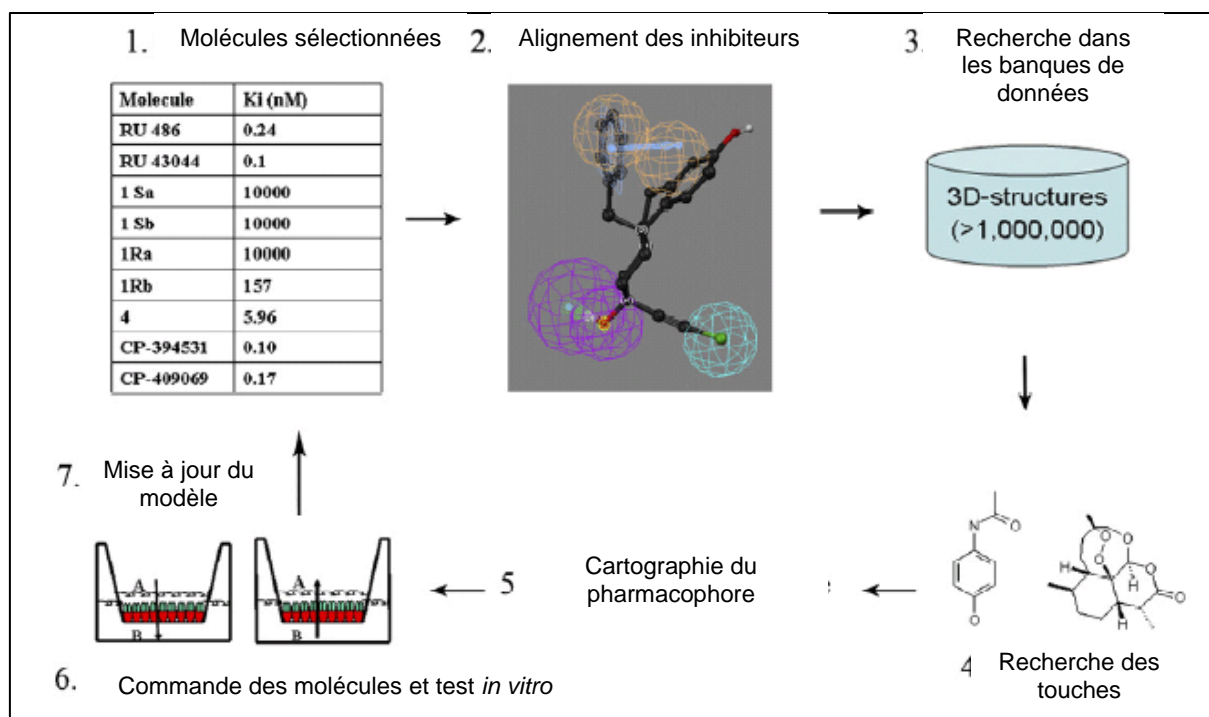


Figure 28: Schéma du processus de recherche dans une banque de données de pharmacophores dans l'objectif de découvrir de nouvelles molécules actives.

5.4.2. Criblage de bases de données de pharmacophores

La notion de pharmacophore a été introduite au début des années 1900 par Paul Ehrlich, donnant une définition de ce concept : une structure moléculaire qui transporte (phoros) des éléments essentiels, responsables de l'activité biologique d'un composé (pharmacon) (Kristiansen et al., 2004). Avec l'augmentation des connaissances sur la structure tridimensionnelle des molécules, ce concept s'est étendu à la compréhension des

arrangements spatiaux des éléments essentiels des molécules, comme par exemple les caractéristiques stériques et électrostatiques ou les fonctions des liaisons hydrogènes (Loew et al., 1993). Un pharmacophore peut dériver du site de fixation d'un récepteur (méthode directe), ou d'une gamme de molécules actives (méthode indirecte). Selon les connaissances actuelles, il n'y a pas de modèles de pharmacophores basés sur des protéines telles que les transporteurs, ce qui est principalement dû au manque de données sur le site de fixation des ligands.

Avant l'introduction de programmes informatiques, les modèles de pharmacophores étaient manipulés manuellement par les chimistes, en se fiant à l'intuition quant à l'analyse des relations structure/fonction. En 1987, le travail de Mayer et ses collègues a ouvert la voie à la génération des pharmacophores assistée par ordinateur (Mayer et al., 1987).

5.4.2.1. Eléments des pharmacophores

Habituellement, les pharmacophores sont représentés par des atomes spécifiques et des groupements chimiques tels que les fonctions phényles ou carbonyles. L'introduction d'éléments fonctionnels tels que les liaisons hydrogènes, hydrophobes, à charges négatives ou positives et les noyaux aromatiques en 1990, a permis la découverte de nombreux ligands pour différentes cibles. Ainsi, la corrélation entre les données d'études de relations structure fonction et le rôle de ces éléments essentiels dans la construction de modèles, augmente l'exactitude globale du modèle.

5.4.2.2. Criblage des bases de données

Il existe quatre types de formats de bases de données qui ont été créés pour la recherche de modèles de pharmacophores :

- Chem-X (Chemical Design, Ltd.) et UNITY (Tripos, Inc.) génèrent et répertorient les conformations 3D.
- Catalyst (Accelrys Software, Inc.) et MACCS-3D (MDL Information Systems, Inc.) calculent et conservent les multiples conformations de chaque structure durant la génération de la base de données.

5.4.2.3. Essais *in vitro*

Le criblage de bases de données de pharmacophores doit être validé en combinant des tests *in vitro* afin de tester l'activité des composés candidats. Les modèles expérimentaux *in vitro* identifiés à ce jour décrivent l'absorption des médicaments *in vivo*. De nombreux outils *in vitro* sont disponibles dans l'objectif d'étudier les interactions entre composé et transporteur (Hidalgo et al., 1989; Stewart et al., 1995; Irvine et al., 1999). Les méthodes disponibles peuvent être classées en deux catégories, selon qu'elles fassent appel à des techniques basées sur la culture cellulaire ou non. Les tests basés sur les cellules utilisent des monocouches différenciées de cellules mammifères afin de conduire une gamme d'études impliquant la détermination de K_i ou d' IC_{50} , ou des paramètres cinétiques de Michaelis-Menten dans le cas de tests d'accumulation.

Un grand choix de cellules mammifères est disponible afin de conduire des criblages *in vitro*. Les essais en cellules entières utilisent des cellules exprimant de manière constitutive les transporteurs ou des cellules transfectées qui surexpriment un transporteur donné. Les lignés cellulaires les plus communément utilisées sont les lignées Caco-2 (Glycoprotéine-P)

(Hunter et al., 1993; Polli et al., 2001; Irie et al., 2006), SKPT-0193 Cl.2 (Brandsch et al., 1995), MDCK (Doyle et al., 1998), ou les lignées sélectionnées par des drogues comme MCF7 (BCRP). L'utilisation de la Calcein-AM est aussi un outil important dans le criblage de nombreux composés. Par ailleurs, la sensibilité des tests et les hauts niveaux de concentrations requis pour les recherches sont limités par la solubilité et la disponibilité des composés.

Les tests qui ne sont pas basés sur les cellules utilisent des fractions membranaires qui expriment les transporteurs et impliquent généralement des tests colorimétriques ou de fluorescence pour la quantification de l'activité des composés. Ces tests ont été très utilisés pour les recherches sur la Glycoprotéine-P, en utilisant la stimulation de l'activité ATPase durant le transport de composés.

5.4.3. Applications pour MRP1

Un exemple de construction d'un modèle de pharmacophore pour MRP1 a été effectué en utilisant cinq puissants inhibiteurs de MRP1 (LY329146, LY402913, dehydrosylibine, indolopyrimidine et phenoxy méthylquinoxaline II) (Boumendjel et al., 2005), et le modèle a été généré en utilisant CatalystHIPHOP. Le modèle contient trois noyaux aromatiques (Figure 29). Le modèle a été utilisé pour cribler une base de données de 500 médicaments utilisés en clinique, et le résultat a donné huit touches (candesartan, eprosartan, fexofenadine, losartan, sulfasalazine, telmisartan, vancomycine et zafirlukast).

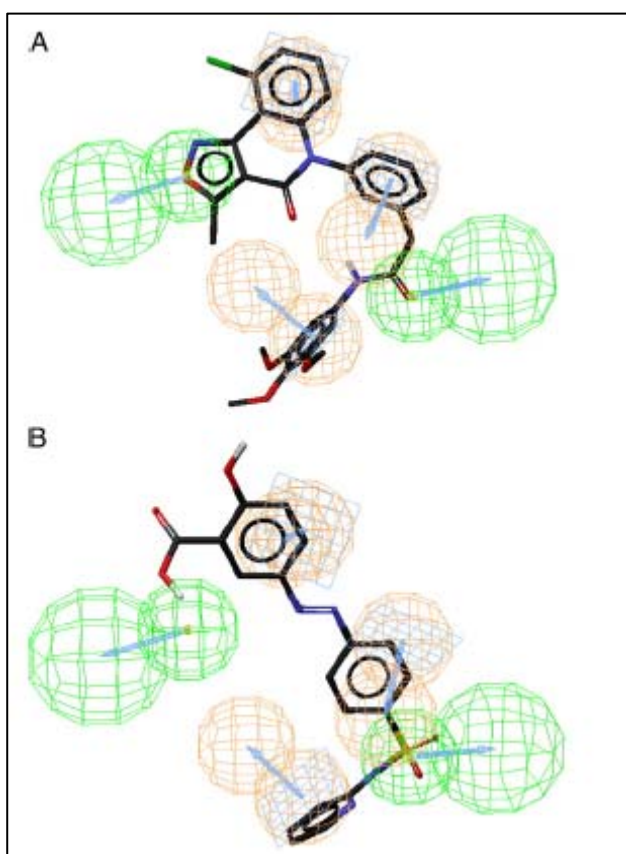


Figure 29: Modèle du pharmacophore pour l'inhibition de MRP1, cartographié en présence de LY402913 (A) qui est connu pour inhiber MRP1, et en présence du sulfasalazine (B), une des touches de la recherche. (Jaune, noyau aromatique; vert, liaison hydrogène) (Chang et al., 2006)

Parmi ces composés, trois médicaments ont déjà montré avoir une forte affinité pour MRP1 (losartan, sulfasalazine et zafirlukast). De plus, de récentes études indiquent que les composés tétrazolés sont susceptibles d'être efflués par la P-gp et MRP1. Cela suggère que le candesartan, qui contient un tétrazole, pourrait alors inhiber MRP1.

5.4.4. Défis futurs dans la modélisation de pharmacophores

A ce jour, 38 pharmacophores de 15 transporteurs de drogues ont été générés et publiés, et seulement quelques modèles (pour la Glycoprotéine-P, BCRP et MRP1) ont été appliqués à l'identification de nouveaux ligands en utilisant l'approche de recherche dans des bases de données. Actuellement, la majorité des modèles de pharmacophores ont été effectués après synthèse chimique et essais *in vitro*. Ils sont en général pertinents dans l'explication des relations structure-activité. Cependant, la plupart des études n'amène pas à l'identification de nouveaux ligands pour les transporteurs, et ce pour trois raisons :

- En utilisant l'approche de criblage virtuel, de nombreux test *in vitro* sont nécessaires pour valider les modèles prédictifs. Cela demande alors une forte collaboration entre la partie scientifique expérimentale et la partie informatique pour affiner les modèles.
- Les expériences de transport *in vitro* sont compliquées par le choix entre les différentes lignées cellulaires disponibles, la variabilité des tests effectués entre chaque laboratoire (conditions, techniques de passage,...). De grandes différences en termes d'affinité peuvent être observées entre les laboratoires, en ce qui concerne l'activité de transport ainsi que le niveau de passage des lignées cellulaires. Ainsi, la capacité d'effectuer des tests de validité *in vitro* dans des conditions identiques ou similaires est un élément important.
- Actuellement, la recherche de nouveaux ligands pour les transporteurs est beaucoup moins importante que pour les récepteurs. Avec une caractérisation et une description des implications cliniques des transporteurs qui n'en n'est qu'à ses balbutiements, de nombreuses cibles cliniques significatives ne sont pas encore découvertes. De plus, le rôle critique des transporteurs dans la biodisponibilité des médicaments (absorption, distribution et excrétion), ainsi que les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, nécessitent la détermination de l'affinité des médicaments très tôt dans le processus de développement. Cela éviterait l'échec de composés à des stades avancés, du aux propriétés prédictibles des interactions médicamenteuses et les autres effets cliniques secondaires potentiels.

5.5. Les flavonoïdes

5.5.1. Généralités sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments de plantes qui sont synthétisés à partir de phénylalanine, et sont généralement responsables des couleurs que l'on peut observer dans les pétales des fleurs ; ils émettent de la fluorescence quand ils sont excités par une lumière UV, et sont ubiquitaires dans les cellules des plantes vertes. Environ 6500 composés différents ont été décrits. Les flavonoïdes régulent la croissance des plantes par inhibition de l'exocytose de l'auxine, ou par induction de l'expression de gènes, et ils influencent de nombreuses autres voies biologiques. Les flavonoïdes inhibent ou tuent de nombreuses souches bactériennes, inhibent d'importantes enzymes virales, comme les transcriptases reverse ou des protéases, et détruisent des pathogènes protozoaires. Cependant, leur cytotoxicité envers les cellules animales est relativement faible. Les flavonoïdes sont des composés actifs majeurs de nombreuses préparations médicales utilisées depuis des temps très anciens. L'absorption quotidienne de flavonoïdes dans la nourriture habituelle, comme les fruits et autres légumes, est d'environ 1-2 g. Le soja est une source riche en isoflavones tels que le génisteine et daidzeine, et chaque gramme de graine de soja contient 1 mg de ces composés. Le thé vert et le vin rouge sont riches en catechine, et le contenu de ces composés peut atteindre 1 g/L. La médecine moderne utilise de manière croissante les flavonoïdes afin de traiter de nombreuses maladies, en utilisant leur capacité à inhiber spécifiquement certaines enzymes, pour stimuler certaines hormones ou neurotransmetteurs, et pour piéger les radicaux libres (Havsteen, 2002).

5.5.2. la chimie des flavonoïdes

Le terme flavonoïde est un nom collectif pour les pigments de plantes, principalement dérivés du benzo- γ -pyrone, qui est un synonyme de chromone. Ce sont donc des composés phénoliques (Harborne and Paxman, 1964; Croft, 1998; Hassig et al., 1999) (Figure 30).

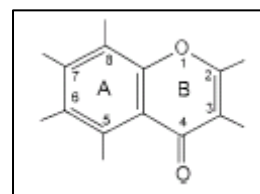
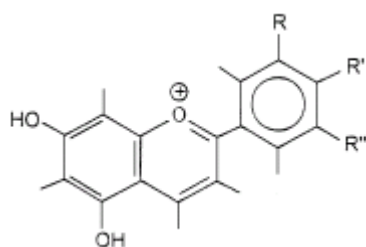


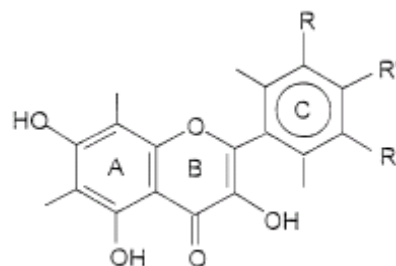
Figure 30: Structure du benzo- γ -pyrone

Le groupe des flavonoïdes comprend de nombreuses familles :

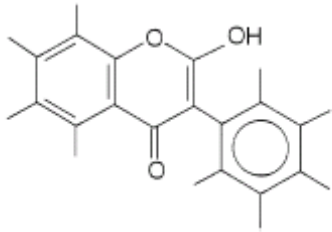
- Anthocyanidine



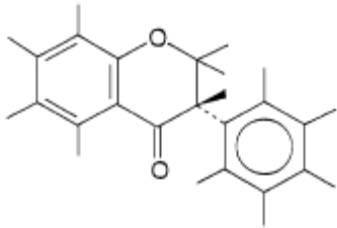
- Flavonoles



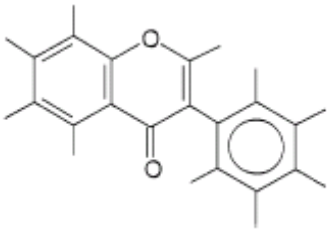
- Iso-flavonoles



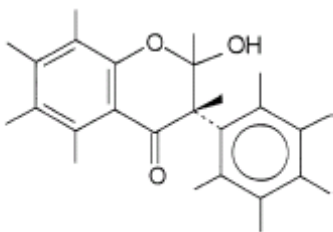
- Iso-flavonones



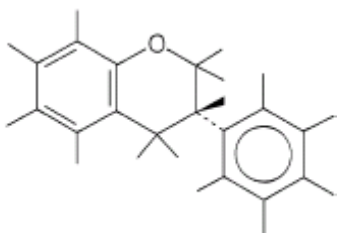
- Iso-flavones



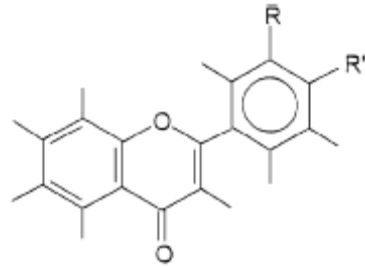
- Iso-flavanols



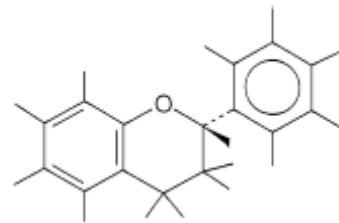
- Iso-flavanes



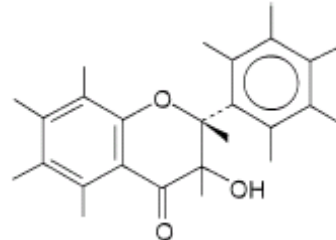
- Flavones



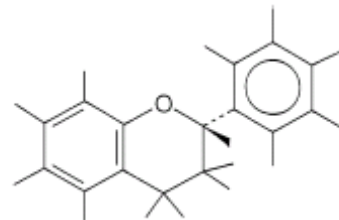
- Flavanes



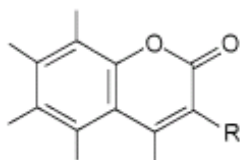
- Flavanols (catéchines)



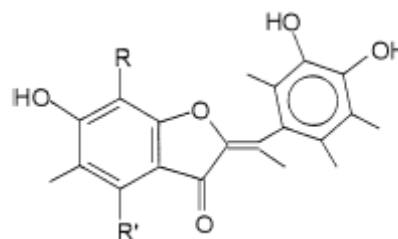
- Flavanes



- Coumarines



- Aurone



5.5.3. Rôle des flavonoïdes chez les plantes

Les flavonoïdes sont des constituants essentiels des cellules de plantes supérieures. Ils ressemblent, en ce qui concerne leurs propriétés régulatrices, aux vitamines liposolubles, mais servent de plus, de vecteurs de communication avec l'environnement de la plante (Brouillard and Cheminat, 1988; Middleton and Teramura, 1993). Ils sont reconnus par de nombreux pollinisateurs, contribuant à la dissémination des pollens. La régulation de la croissance des plantes par les flavonoïdes a attiré de nombreux scientifiques car ils représentent un élément majeur de l'économie agricole et de la santé mondiale (Moyano et al., 1996). Et cette activité régulatrice des flavonoïdes apporte des questions quant à leur possible action sur le métabolisme des cellules animales, y compris humaines.

L'effet des flavonoïdes sur la croissance des plantes, est en partie indirect et associé avec l'action des auxines. L'acide acétique indolyl (IAA), synthétisé à partir de Tryptophane, est l'une des représentants majeurs des auxines. Sa synthèse se déroule dans le cytoplasme, et cette hormone de croissance est libérée hors de la cellule pour se disperser dans la plante par l'intermédiaire du système vasculaire. Les flavonoïdes ont la capacité d'augmenter la concentration d'IAA dans la cellule par prévention de sa libération, agissant ainsi comme un modulateur de la croissance de la plante.

Un autre effet connu des flavonoïdes est l'inhibition par la quercétine du transfert d'énergie durant la photophosphorylation (Mukohata et al., 1978).

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans le métabolisme de l'azote, en induisant la nodulation des racines des plantes (Mortenson and Thorneley, 1979). Le principal effet des flavonoïdes est probablement l'induction de gènes exprimant les protéines requises par les cellules des nodules.

Les flavonoïdes pourraient aussi être un signal de symbiose, une coopération qui nécessite de la communication et de l'organisation entre les organismes (Srivastava et al., 1999). Dans le cas de la symbiose entre les bactéries fixant l'azote et les légumineuses, les flavonoïdes jouent de nombreux rôles en tant que substance signal.

5.5.4. Pharmacologie des flavonoïdes chez l'animal

Depuis longtemps, la pharmacologie a concentré ses efforts sur le pouvoir toxique des plantes sur l'Homme, et sur les composés naturels pouvant avoir une application médicale. Cependant, l'effet des composés naturels ingérés quotidiennement dans l'alimentation a été très peu exploité (Wilson et al., 1976; Hughes and Wilson, 1977). Et les flavonoïdes font partie de cette dernière catégorie. En effet, puisque ces composés, qui sont ingérés régulièrement, pourraient avoir un effet sur la santé à long terme, par accumulation dans les

organes majeurs, une attention croissante devrait alors portée sur leurs possibles effets. D'autre part, ces composés pourraient avoir une influence sur le métabolisme des médicaments.

Une importante raison de la faible toxicité des flavonoïdes vient de la faible solubilité de ces composés dans l'eau et le métabolisme rapide des noyaux pyrones par le foie. La faible solubilité des flavonoïdes dans l'eau présente de plus certains problèmes dans leur application médicale. Ainsi, le développement de flavonoïdes semi-synthétiques, comme par exemple dans le traitement de l'hypertension, a été une avancée importante (Di Carlo et al., 1999; Wada et al., 1999).

De nombreuses études ont montré que les flavonoïdes avaient un rôle antioxydant, anti-carcinogène, antiviral, anti-inflammatoire et anti-estrogène. Un apport important en flavonoïdes est relié à une réduction du risque de cancer, des maladies cardiovasculaires, de l'ostéoporose et d'autres maladies dégénératives liées à la vieillesse. Des études épidémiologiques ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir des propriétés anticancéreuses. Le faible taux de cancer et de mortalité au Japon a été attribué à la grande consommation de soja, contenant de nombreux isoflavonoïdes.

5.5.4.1. Pharmacodynamique

Les flavonoïdes alimentaires sont absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal (Crespy et al., 1999; Pforte et al., 1999), alors que les flavonoïdes thérapeutiques sont administrés directement dans le tissu malade, dans la peau, ou dans une zone menant à la cible. Dans la nature, la plupart des flavonoïdes existent sous forme de glycosides, mais ils sont en général absorbés sous forme aglycone. Après métabolisation par les bactéries dans l'intestin, 15% des flavonoïdes aglycones sont absorbés par l'intermédiaire des micelles de bile par les cellules épithéliales et passent ainsi dans la lymphe (Spencer et al., 1999). Quelques flavonoïdes inhibent la diffusion facilitée des monosaccharides dans les cellules épithéliales de l'intestin. Les flavonoïdes résiduels sont alors excrétés dans les selles. La lymphe transporte les flavonoïdes jusqu'au foie, et la majorité (80%) des composés est absorbée au premier passage, l'autre partie se fixant sur l'albumine sérique (Casley-Smith, 1986). Les hépatocytes transfèrent les flavonoïdes vers l'appareil de Golgi et les peroxyosomes, dans lesquels ils sont dégradés, ou conjugués par glucuronidation ou sulfatation, notamment par l'action du cytochrome P450.

Les produits de dégradation sont sécrétés par des transporteurs d'acides organiques dans le sang et excrétés ensuite par les reins (Graefe et al., 1999; Graefe and Veit, 1999). La demi-vie d'un flavonoïde dans l'organisme est d'environ 1-2 h. Ainsi, les flavonoïdes sont assez bien éliminés par l'organisme, et ne sont pas accumulés dans le foie

5.5.4.2. Toxicité des flavonoïdes

Par injection de grandes quantités de flavonoïdes dans le sang de rats, il a été possible de déterminer une valeur maximale de 2 g/kg de masse corporelle. Ainsi, du fait de la faible solubilité des flavonoïdes dans l'eau, du passage court des flavonoïdes dans l'intestin, et de leur faible coefficient d'absorption, il n'est vraisemblablement pas possible pour l'Homme de souffrir d'effets toxiques par leur consommation, à l'exception de réactions allergiques. La marge de sécurité de l'utilisation thérapeutique des flavonoïdes est alors beaucoup plus grande et surpasse probablement celle des médicaments utilisés couramment.

5.5.4.3. Effets à long terme des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont consommés par l'Homme depuis l'arrivée de la vie humaine, c'est-à-dire il y a environ 4 millions d'années. La consommation de flavonoïdes par les Hommes a probablement été constante durant cette période, puisque la consommation de végétaux est restée approximativement la même. En conséquence, la forte exposition aux flavonoïdes tout au long de la vie ne peut avoir de graves conséquences sur la santé. Néanmoins, puisque les flavonoïdes sont connus pour induire l'expression de certains gènes, et que les flavonoïdes ont induit des mutations dans les cellules humaines en culture, l'exposition quotidienne aux flavonoïdes pourrait avoir certaines conséquences, bien que leur demi-vie ne soit que de quelques heures. Des études toxicologiques ont montré que la consommation de fortes doses de flavonoïdes peut conduire à la modification de la membrane des hépatocytes, aboutissant à la nécrose cellulaire et éventuellement à la mort de l'animal. L'Homme ne peut cependant pas se permettre de les éliminer de son quotidien, ce qui impliquerait un arrêt de la consommation de végétaux qui sont vitaux à la vie humaine.

5.5.5. Influence des flavonoïdes sur les cancers

Les flavonoïdes sont capables d'influencer la croissance des cellules humaines, mais ils doivent être délivrés vers leur cible pour être efficaces. L'inhibition par les flavonoïdes de la topoisomérase II montre que la quercétine et des flavonoïdes similaires pouvaient induire une mutation, sur un simple brin, et pouvait induire le relargage l'enzyme de réparation. Mais la plupart de ces mutations sont sans conséquences car elles touchent des zones non importantes de l'ADN.

Les mécanismes proposés dans la prévention des cancers par les flavonoïdes sont multiples :

- Activité anti-oxydante des flavonoïdes
- Effets sur les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse
- Modulation de l'activité des aromatasés, enzymes clés dans la biosynthèse des estrogènes
- Modulation des enzymes nécessaires à l'activation métabolique de procarcinogènes et à la détoxification

5.5.6. Action des flavonoïdes sur MRP1

L'interaction des flavonoïdes avec MRP1 a été montrée la première fois par Versantvoort en 1993 (Versantvoort et al., 1993; Versantvoort et al., 1994), qui a démontré que la genistéine, la biochanine A, l'apigénine et la quercétine pouvaient inhiber l'activité de transport de MRP1. Depuis ces études, de nombreux articles ont été publiés, montrant que d'autres flavonoïdes aglycones tels que la morine, chalcone, silymarine, phloretine, chrysin, kaempferol, naringénine, myricétine, galangine, baicaleine, luteoline, robinétine, diosmétique, chrysoeriol, tamarixétine et la isorhamnétine, pouvaient inhiber le transport par MRP1 à différents degrés. La valeur des IC_{50} de ces différents composés pour l'inhibition de MRP1 a été montrée être en dessous de 50 μ M, avec quelques uns tels que la diosmétique, chrysoeriol et la tamarixétine en dessous de 10 μ M. Les glycosides flavonoïdes tels que la genistéine et la naringénine ont des IC_{50} encore plus faibles pour MRP1 (Figure 31). Il faut noter que

Réversion du phénotype MDR

l'inhibition de MRP1 par les flavonoïdes se fait par les molécules « parentales », puisque les études des flavonoïdes tels que la génistéine, naringénine, apigénine, quercitine et myricétine ont été effectuées sur des vésicules membranaires, où la conjugaison de ces composés n'est pas possible.

Le mécanisme d'interaction entre MRP1 et les flavonoïdes pourrait impliquer la fixation aux NBD et/ou les sites de fixation des substrats (Conseil et al., 1998; Trompier et al., 2003). Quelques flavonoïdes tels que la quercitine, myricétine, apigénine et naringénine, ont été montrés stimuler le transport de GSH par MRP1 (Leslie et al., 2003b). De là, la déplétion du GSH cellulaire, un cofacteur du transport de drogues chimiothérapeutiques par MRP1, pourrait représenter un nouveau mécanisme d'inhibition de MRP1 par ces composés.

Les éléments structuraux nécessaires à l'inhibition du transport de MRP1 ont été récemment décrits et la structure plane due à la présence de la double liaison 2,3 dans le noyau C, et le nombre de groupements méthoxyles et hydroxyles apparaît être important.

L'interaction potentielle *in vivo* des flavonoïdes avec les drogues est encore mal définie.

Flavonoïde		IC ₅₀ (µM)		
		LTC ₄ transport		DNP-SG efflux
		- GSH	+ GSH	
Myricétine	<i>3,5,7,3',4',5'-OH flavonol</i>	7-12	7-12	5.9
Quercétine	<i>3,5,7,3',4'-OH flavonol</i>	7-12	7-12	1.3
Kaempferol	<i>3,5,7,4'-OH flavonol</i>	7-12	7-12	4.8
Naringénine	<i>5,7,4'-OH flavanone</i>	66	9.5	
Apigénine	<i>5,7,4'-OH flavone</i>	25	7.4	
Genistéine	<i>5,7,4'-OH isoflavone</i>	> 100	65	
Glycosyl-naringénine		> 200	98	
Glycosyl-genistéine		> 200	> 200	
Luteolin	<i>5, 7 3',4'-OH flavone</i>			0.8
Taxifolin	<i>3, 5, 7, 3', 4'-OH flavanonol</i>			> 50
Galangin	<i>3, 5, 7-OH flavonol</i>			6.2
DHS	<i>3, 5, 7-OH, 3', 4'-0-monolignol flavonol</i>	1.1	1.1	
8-prenyl-DHS		3.9	1.6	
6-prenyl-DHS		6.8	1.7	
8-geranyl-DHS		7.7	4.1	
6-geranyl-DHS		15	1.1	
Silybin	<i>3, 5, 7-OH, 3', 4'-0-monolignol flavonol</i>		16	4.7

Figure 31: Relation structure-fonction de flavonoïdes ayant une activité inhibitrice sur le transport de LTC₄ et l'efflux de DNP-SG par MRP1 (Boumendjel et al., 2005).

5.6. Le vérapamil

5.6.1. Généralités

Le vérapamil est un dérivé de diphenylalkylamine (Figure 32) qui présente de nombreuses activités biologiques, telles que l'inhibition de plusieurs protéines ionophores. L'une des cibles les plus importantes est le canal calcique de type L voltage dépendant. On parle alors de bloqueur de canaux calciques. En effet, il antagonise l'influx de calcium à travers les canaux lents des cellules cardiaques. En réduisant la concentration intracellulaire en calcium libre, le vérapamil induit une vasodilatation coronaire et périphérique, diminue la contractilité myocardique et l'activité électrique dans les nœuds auriculo-ventriculaires. Cette molécule est donc indiquée dans les cas d'hypertension, de certains types d'arythmies, mais fortement déconseillée en cas d'insuffisance cardiaque.

Après administration orale, le vérapamil est complètement absorbé dans l'intestin, mais sa biodisponibilité est très rapidement diminuée du fait de son métabolisme dès le premier passage hépatique. Le début d'action du vérapamil, dans le cas d'une formulation à distribution immédiate, est relativement rapide, de l'ordre de 0.5-2 h. La durée d'action du vérapamil est assez courte, puisque son élimination peut prendre de 2 à 7 heures. Cependant, la sélectivité tissulaire de ce composé est assez faible, puisque le ratio de l'effet vasculaire/cardiaque est d'environ 3. L'effet secondaire le plus important du vérapamil provient de la vasodilatation, pouvant alors induire des maux de tête, mais cependant assez peu prononcés.

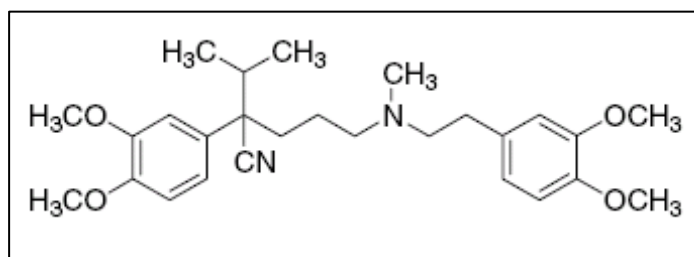


Figure 32: Structure du vérapamil.

5.6.2. Pharmacologie des énantiomères du vérapamil

En thérapeutique, le vérapamil est utilisé de manière racémique, contenant ainsi un mélange égal de S- et R-vérapamil. La pharmacologie du vérapamil est compliquée par le fait que les énantiomères diffèrent dans leurs propriétés pharmacodynamiques : le S-vérapamil est pharmacologiquement beaucoup plus efficace que le R-vérapamil (20 fois plus en terme d'effet inotrope et chronotrope), mais il est beaucoup mieux métabolisé. En conséquence, le taux sérique de S-vérapamil est plus faible que celui du R-vérapamil moins actif, et le ratio sérique de R/S est de 2 après administration intraveineuse et 5 après administration orale, respectivement. Le haut ratio après administration orale du vérapamil est causé par un métabolisme stéréosélectif important après le premier passage hépatique, qui est la cause d'une faible biodisponibilité du vérapamil (environ 20% et 50% pour le S- et R-vérapamil respectivement).

5.6.3. Effet du vérapamil sur le transporteur MRP1 : avantages, inconvénients, et utilisations possibles

Le vérapamil est généralement considéré comme un inhibiteur de référence pour la Glycoprotéine-P (Tsuruo et al., 1981; Tsuruo et al., 1983a; Tsuruo et al., 1983b; Huet and Robert, 1988; Teodori et al., 1999). Cependant, le vérapamil a été montré n'avoir que très peu, voire aucun effet sur la restauration de la sensibilité aux drogues des cellules surexprimant MRP1 (Tsuruo et al., 1981; Tsuruo et al., 1983a; Tsuruo et al., 1983b; Huet and Robert, 1988; Cole et al., 1994; Davey et al., 1995; Teodori et al., 1999). Néanmoins, alors que le vérapamil, seul, inhibe très peu le transport du LTC₄ par MRP1, son inhibition en présence du GSH est augmentée de plus de 20 fois (Loe et al., 1996b; Loe et al., 2000a; Cullen et al., 2001). En présence de 1 mM de GSH, le K_i apparent pour le vérapamil est de 1,2 µM, et en présence de 100 µM de vérapamil, le K_i apparent pour le GSH est de 77 µM. Le vérapamil n'est pas transporté par MRP1. Néanmoins, le vérapamil stimule fortement l'efflux de GSH par des vésicules membranaires de manière concentration dépendante. En présence de 100 µM de vérapamil, le K_m apparent et la V_{max} de l'efflux de GSH sont de 83 µM et 55 pmol/min/mg, respectivement. La capacité variable du vérapamil à moduler l'efflux de GSH par MRP1 dans différentes lignées cellulaires peut être intimement reliée à son effet sur la quantité de GSH dans les cellules et sa capacité à inhiber le transporteur lui-même.

- Dans ce cadre, quelques études ont été effectuées, dans le but de trouver des dérivés du vérapamil ayant une forte affinité et activité sur MRP1, tout en ayant une faible activité myocardique. L'équipe de Cole (Loe et al., 2000b) a synthétisé des analogues structuraux du vérapamil dans cet objectif. La capacité du N-(3,4-diméthoxyphényl)-N-méthyl-2-(2-naphthyl)-*m*-dithiane-2-propylamine (DMP), et une série de dérivés dithiane et dithiane tétraoxyde du vérapamil ont été testés dans le cadre de la modulation de l'activité de transport de MRP1. Les dérivés dithianes stimulent le transport de GSH, alors que les dithianes tetroxydes n'ont pas cette capacité. De plus, il réside une différence dans l'action des énantiomères des dithianes vis-à-vis de l'efflux de GSH, bien que le transport de LTC₄ soit comparable. Ainsi, ces résultats indiquent que l'activité de transport de GSH peut être dissociée du transport d'anions conjugués.
- Une étude récente effectuée par Trompier et al (Trompier et al., 2004) a montré l'effet de dérivés iodés du vérapamil sur des cellules transfectées par le gène *mrp1*. De manière inattendue, le vérapamil et son dérivé NMeOHI₂ (Figure 33) se comportent comme des activateurs de l'apoptose dans les cellules transfectées, alors qu'aucune mort cellulaire n'est observable dans les cellules contrôles. Ce phénomène apoptotique est induit par un efflux massif de GSH, et il semble que la mort cellulaire soit le résultat d'une déplétion cellulaire en GSH. Le NMeOHI₂ a été modifié sur le noyau B (Teodori et al., 1999), connu pour avoir des effets cardiovasculaires importants, et son activité est 10 fois plus forte que le vérapamil. Ce nouveau mécanisme d'induction de l'apoptose des cellules résistantes représente une nouvelle approche dans le traitement sélectif des cellules tumorales exprimant MRP1.

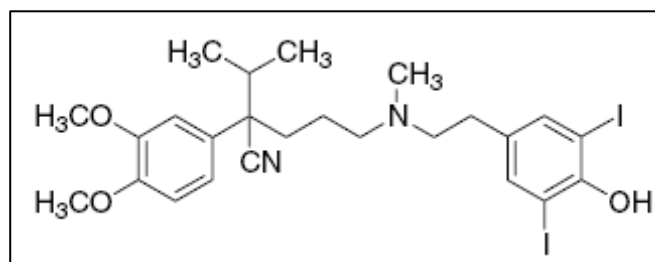


Figure 33: Structure du NMeOHI₂.

- Une autre étude de Salerno et al (Salerno et al., 2004), a montré la relation entre la capacité de certains composés à moduler l'efflux de GSH par MRP1 et à inhiber l'efflux de daunorubicine. Les résultats montrent, notamment, que le vérapamil a une activité complètement différente sur MRP1 de celle du MK571. Il a été décrit précédemment que le GSH avait un rôle important dans le transport de certains substrats de MRP1, mais la relation entre MRP1 et le GSH n'est pas encore clairement définie. Il a été montré que le GSH et la daunorubicine avaient des sites de fixation différents. Si l'on appelle le site de la daunorubicine « site D », et le site du GSH « site G », de nombreuses études ont montré que les deux sites étaient reliés l'un à l'autre. Par ailleurs, il est possible de classer les modulateurs de MRP1 en deux catégories :
- Classe I : les composés inhibant le transport de substrats par MRP1. C'est le cas du MK571
 - Classe II : les composés ayant la capacité de moduler le transport de substrats par MRP1, de manière dépendante de leur structure, par inhibition ou stimulation. C'est le cas du vérapamil, car il stimule le transport de GSH et inhibe le transport de daunorubicine

Il est bien établi que des composés tels que le LTC₄ ne requièrent pas de GSH pour être transportés par MRP1. Ces composés, ainsi que le GSH, peuvent être alors définis par le site G, alors que les composés nécessitant le GSH pour être transportés sont définis par le site D.

Il a donc été proposé un modèle où il existe une interdépendance entre les sites G et D. Le site G est le site permettant d'utiliser l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP lorsque le site est occupé par un substrat. Le site D est inerte et ne peut fonctionner que lorsqu'il est connecté au site G. En présence de GSH et de daunorubicine, les deux sites fonctionnent et expulsent une molécule de GSH et une molécule de daunorubicine. Les inhibiteurs de classe I comme le MK571 bloquent complètement le système en agissant sur le site G. Les inhibiteurs de classe II comme le vérapamil déconnectent les deux sites, ainsi, le site G fonctionne beaucoup plus rapidement. Ce modèle est supporté par le fait que les composés se fixant sur le site G stimulent l'activité ATPase, ce qui n'est pas le cas des substrats du site D, montrant l'importance du site G dans la conversion de l'énergie hydrolytique de l'ATP. Cela peut expliquer pourquoi le vérapamil n'inhibe le transport du LTC₄ qu'en présence de GSH, puisque le vérapamil augmente l'affinité du GSH pour le site G et ainsi entre en compétition avec le LTC₄.

Le modèle proposé dans lequel MRP1 est composé de deux sites interdépendants, pourrait alors expliquer que certaines molécules inhibent le transport de GSH et de daunorubicine, alors que d'autres molécules inhibent l'efflux de daunorubicine mais stimulent le transport de GSH (Figure 34).

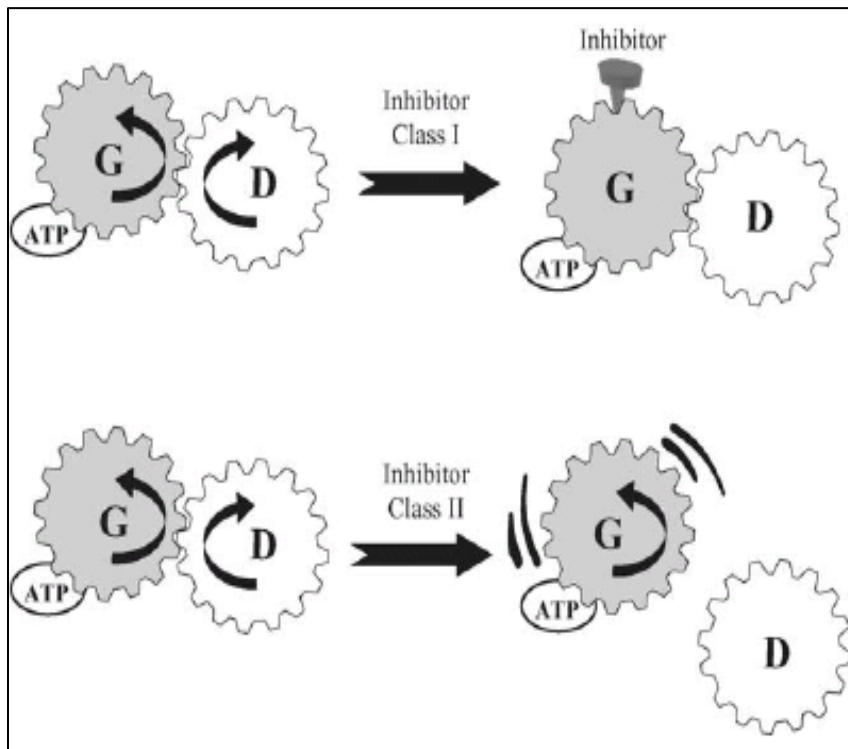


Figure 34: Modèle du mécanisme de transport par MRP1 avec la représentation des sites D et G. Le site G peut fixer les substrats tels que le GSH et le LTC₄. Le site G est l'unité permettant de transformer l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. Le site D est entièrement dépendant de l'état du site G. Les inhibiteurs tels que le MK571 bloquent complètement le système en agissant sur le site G, bloquant ainsi le site D. Les inhibiteurs tels que le vérapamil déconnectent les deux sites, laissant le site G fonctionné moins rapidement, alors que le site D ne fonctionne plus (Salerno et al., 2004).

MATERIELS ET METHODES

1. Etude des domaines cytoplasmiques NBD1 et NBD2 de MRP1

1.1. Conditions de culture bactériennes

1.1.1. Souches bactériennes

- **BL21(λ DE3)** de génotype : hsdS gal (LcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1 (λ DE3))

1.1.2. Vecteurs plasmidiques

Le plasmide utilisé pour la surexpression des domaines cytoplasmiques de MRP1 est le pT_{7.7}/6His. Ce plasmide, dérivé du plasmide pT_{7.7} contient le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 en amont du site multiple de clonage. L'ARN polymérase du phage T7 est synthétisé par la bactérie hôte BL21 (λ DE3) après induction par l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). Le plasmide code pour six résidus histidine fusionnés à l'extrémité N-terminale de la protéine surproduite. Le vecteur possède le gène de résistance à l'ampicilline. Le travail de clonage a été effectué par le Dr. Doriane Trompier.

1.1.3. Milieux de culture

Les milieux sont préparés selon Miller (1972). Le milieu LB contient 10 g de bactotryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl par litre, et est ajusté à pH 7.5 avant autoclavage à 120 °C pendant 20 min. Le milieu LB + glucose contient en plus du glucose stérile à 0.2% final.

Les cultures sont réalisées en milieu liquide, sous agitation (250 rpm), à 37 °C. La croissance bactérienne est suivie en mesurant la D.O à 600 nm. L'ampicilline est ajoutée au milieu de culture à une concentration de 100 μ g/ml.

1.2. Préparation et analyse des domaines recombinants

1.2.1. Surproduction quantitative des protéines recombinantes

Principe :

La protéine d'intérêt, prédite comme un domaine cytoplasmique, est attendue sous forme hydrosoluble. Le protocole consiste donc à éclater les bactéries, puis à en extraire les protéines solubles.

Mode opératoire :

1 l de milieu de culture (LB pour NBD1 et LB + 0.2% glucose pour NBD2) estensemencé à $D.O_{600\text{ nm}} = 0.2$ à partir d'une préculture de bactéries transformées par le plasmide recombiné. Lorsque la culture atteint une $D.O = 0.7$, la surproduction est induite par 0.4 mM d'IPTG. Après 2 h et 4 h d'induction pour NBD1 et NBD2 respectivement, à 25 °C sous agitation, les bactéries sont centrifugées à 5500 g pendant 10 min à 4 °C. Le culot est repris par un tampon 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 7 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 2% LDAO (lauryldiméthylamine oxide), dans un volume final de 20 ml. La suspension bactérienne est ajustée avec 2 mM PMSF (Fluorure de Phénylméthane Sulfonyle - inhibiteur des protéases à sérine et cystéine), 5 μ M leupeptine (inhibiteur des protéases à sérine et cystéine), et 5 μ M pepstatine (inhibiteur des protéases à aspartate), afin d'inhiber toute activité protéolytique, ainsi que 1 μ g/ml de DNase et RNase pour réduire la viscosité du lysat bactérien.

Après éclatement des cellules à l'aide d'une presse de French SLM AMINCO de volume 40ml (1000 psi maximum), étape répétée deux fois, l'homogénat est centrifugé à 30.000 g pendant 25 min, ce qui permet d'éliminer les débris cellulaires et les protéines insolubles. La fraction soluble de la protéine surproduite est analysée dans le surnageant. A chaque étape de la purification, un échantillon est prélevé et analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

1.2.2. Purification par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel-Agarose

Principe :

La chromatographie d'affinité sur Nickel-Agarose utilise un adsorbant NTA (Nitrilo-Triacetic-Acid) chélateur de métal (Nickel), fixé sur une résine agarose de type CL-6B (Figure 35).

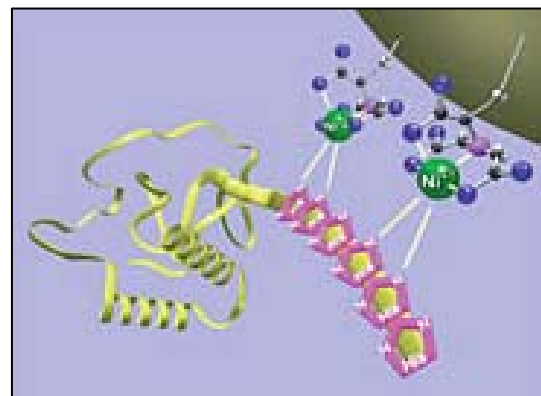


Figure 35 : Interaction entre les résidus histidine et le Ni-NTA de la résine.

Le site de clonage du plasmide pT_{7.7}/6His contient une séquence codant pour 6 résidus histidine. L'ADN codant pour la protéine est cloné dans ce plasmide, et après induction par l'IPTG, une protéine fusionnée à 6 histidines à son extrémité N-terminale est produite. Cette protéine se lie par des interactions électrostatiques avec le Nickel par l'intermédiaire des 6 histidines, et peut ainsi être retenue sélectivement sur la colonne, puis spécifiquement éluée par de l'imidazole (Figure 36). La résine Nickel-Agarose (Ni-NTA, Qiagen) peut fixer de 5 à 10 mg de protéines par millilitre.

La préparation des domaines est effectuée en présence et en absence de détergent, afin d'étudier les caractéristiques de NBD1 et NBD2.

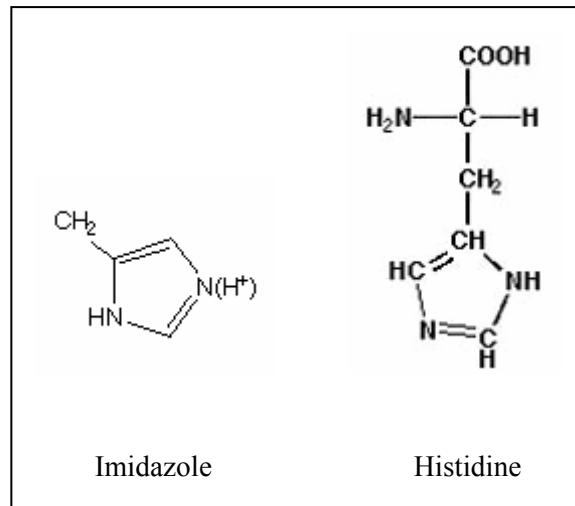


Figure 36 : Structure de l'imidazole et de l'histidine.

Mode opératoire :

Le surnageant de centrifugation obtenu après éclatement des cellules bactériennes à la presse de French est dilué deux fois par du tampon de dilution 2X, puis le tout est mis en présence à 3 ml de résine Nickel-Agarose, préalablement lavée par 10 volumes d'eau et équilibrée par 10 volumes de tampon d'équilibration, pendant 30 min à 4 °C sous agitation. La suspension est ensuite déposée dans une colonne de 1.5 x 4.5 cm. La fraction non retenue est collectée. Dans le cas du protocole de purification en présence de détergent, la colonne est lavée par 100 volumes de tampon intermédiaire appauvri en LDAO, puis par un second tampon contenant l'HECAMEG (tampon changement de détergent). Après une étape de pré-élution, en présence de 70 mM d'imidazole (ou 25 mM pour le protocole sans détergent), l'élution de la protéine est réalisée par un tampon contenant 250 mM d'imidazole (ou 90 mM pour le protocole sans détergent). Le contenu en protéine est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 16% puis dosé par la méthode de Bradford.

Les tampons utilisés pour les deux types de purification sont les suivants :

- **Purification des domaines en présence de détergent :**
 - *Tampon d'équilibration 1X* : 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 0.3% LDAO, 25 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoéthanol

-
- *Tampon changement de détergent* : 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 0.01% HECAMEG, 25 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoéthanol
 - *Tampon de pré-élution* : 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 0.01% HECAMEG, 70 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoéthanol
 - *Tampon d'élution* : 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 0.01% HECAMEG, 250 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoéthanol
 - **Purification des domaines sans détergent :**
 - *Tampon d'équilibration 1X* : 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 25 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoéthanol
 - *Tampon de pré-élution* : 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 90 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoéthanol
 - *Tampon d'élution* : 50 mM Hepes pH 7.8, 500 mM NaCl, 10% glycérol, 250 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoéthanol

1.2.3. Dialyse des protéines

Afin d'éliminer l'imidazole dans le cadre des études de spectrométrie de fluorescence, les protéines sont dialysées en changeant deux fois le bain de dialyse, contre 1000 volumes de tampons ayant la même composition que le tampon d'élution sans l'imidazole. La membrane de dialyse utilisée a un seuil de coupure de 12-14.000 Da (Spectrapor, diamètre 16 mm, volume/longueur : 2 ml/cm).

1.2.4. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide

Principe :

Les protéines sont incubées en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium) qui les dénature et leur confère une charge globale négative par formation de micelles mixtes protéines-détergent. Elles sont ensuite séparées sous l'influence d'un champ électrique en fonction de leur masse moléculaire, par passage à travers les mailles du réseau de polyacrylamide. Le système utilisé pour la migration est le « Mini Protean III » (Biorad) (Laemmli, 1970).

Mode opératoire :

A partir d'un échantillon protéique contenant de 1 à 10 μ g de protéines, un tampon de dépôt 5X est ajouté de manière à obtenir une solution finale de dépôt 1X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 5% β -mercaptoéthanol, 0.001% bleu de Bromophénol). Les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 100 °C avant d'être déposés sur le gel d'électrophorèse.

Préparation des gels de 0.75 mm d'épaisseur :

- *Gel de séparation* : 10%, 12% ou 15% acrylamide, 0.32% bisacrylamide, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% persulfate d'ammonium. La polymérisation s'effectue en ajoutant du TEMED (N,N,N,N'-tétraméthyl-éthylène-diamine), à raison de 0.3 µg.ml de gel
- *Gel de concentration* : 5% acrylamide, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% persulfate d'ammonium. La polymérisation s'effectue en ajoutant du TEMED à raison de 0.78 µg/ml de gel

La migration des échantillons s'effectue à 200 V dans un tampon de migration contenant 25 mM Tris-HCl pH 8.8, 192 mM glycine et 0.1% SDS.

La coloration des protéines est effectuée par un bain de 15 min du gel dans une solution contenant 0.1% de bleu de Coomassie R250, 40% éthanol, 10% acide acétique. Le gel est ensuite décoloré par une solution contenant 40% éthanol, 10% acide acétique.

1.2.5. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

Le standard utilisé pour tous les dosages est l'albumine de sérum bovin (BSA - Pierce) (Bradford, 1976). La gamme de sensibilité de cette technique permet de détecter de 1 à 15 µg de protéines par essai. La solution de BSA est utilisée à 0.5 mg/ml.

Principe :

La fixation du bleu de Coomassie R250 sur les protéines, principalement par interaction de type ionique, déplace le maximum d'absorption du colorant de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu). Cependant, de nombreux composés, tels les détergents, peuvent interférer avec cette technique de dosage : il est alors nécessaire d'en contrôler l'effet.

Mode opératoire :

Le dosage est effectué en plaque 96 puits, où l'échantillon d'un volume final de 20 µl contient de 1 à 15 µg de protéines. 500 µl de réactif de Bradford sont alors ajoutés. Après homogénéisation, la D.O est lue à 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaques. Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions.

1.2.6. Photomarquage des domaines par des dérivés azido de l'ATP et ADP

Le photomarquage a été effectué à l'aide d'une lampe au xénon en exposant directement l'échantillon dans une cuvette en quartz de 1 ml, positionnée entre deux autres cuvettes en quartz contenant du toluène, un filtre à UV (de Wet et al., 2001). Le milieu de photomarquage est composé de 50 mM MES pH 6.0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) HECAMEG, 20% (v/v) glycérol, 0.05 mg NBD/ml, et les quantités nécessaires en 8N₃-[γ-³²P]ATP ou en 8N₃-[γ-³²P]ADP afin d'obtenir les concentrations voulues. L'échantillon (0.075 ml) est irradié pendant 1 à 2 min, puis est placé dans la glace avec 8 µl de solution de solubilisation (20 % (w/v) SDS, 5.4 M β-mercaptoéthanol, et du bleu de bromophénol), puis l'échantillon est déposé sur SDS-PAGE 7%, suivi par une quantification des bandes

radiomarquées à l'aide d'un Packard InstantImager 2024. La conversion des cpm en moles de sondes a été effectuée en incorporant des quantités connues en radionucléotides sur un papier filtre et soumis à la même SDS-PAGE.

Ces expériences ont été effectuées par le Dr. David McIntosh, Département of Chemical Pathology, University of Cape Town Medical School, Cape Town (South Africa).

1.3. Mesure des interactions protéine-ligand par spectrométrie de fluorescence

1.3.1. Principe général de la fluorescence

1.3.1.1. Généralités

La capacité d'absorption de la lumière par une molécule dépend de l'arrangement des électrons autour des noyaux constituant sa structure. Un photon est absorbé si l'énergie qu'il renferme correspond exactement à une transition énergétique possible de la molécule absorbante. Par absorption d'un photon, une transition électronique fait passer un chromophore de son état fondamental à un état excité qui est instable. Le retour à l'état fondamental, et par conséquent la restitution de l'énergie absorbée, peut se faire par échange d'énergie au sein de la molécule (conversion interne) ou avec d'autres molécules lors de collisions. Il s'agit alors d'une désexcitation non radiative où l'excédent énergétique est dissipé sous forme de chaleur (Figure 37).

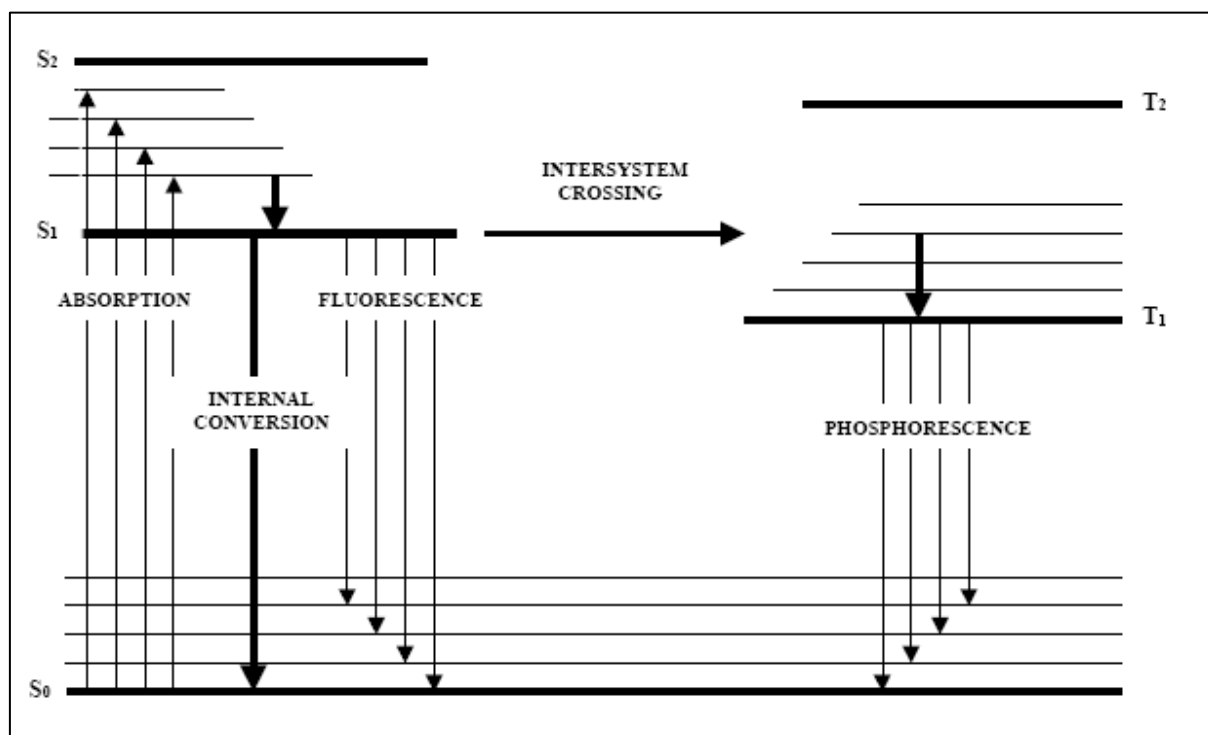


Figure 37 : Diagramme de Jablonski.

Il se peut aussi que la molécule se désexcite en émettant un photon dans toutes les directions de l'espace, donnant lieu à un phénomène de luminescence. Absorption et émission sont des événements rapides (10^{-15} s). Le phénomène de fluorescence ou de phosphorescence dépendra de la stabilité de l'état excité.

La fluorescence est marquée par une demi-vie de l'état excité de 10^{-9} à 10^{-6} s, et met en jeu, lors de la réémission, une transition électronique entre deux états autorisés.

La phosphorescence pour sa part présente une stabilité beaucoup plus importante de l'état excité, de l'ordre de 10^{-2} à 10^{+2} s. Elle s'accompagne d'une transition intermédiaire par un état dit triplet.

La fluorescence est un phénomène physique dans lequel une molécule absorbe de l'énergie provenant d'une source lumineuse (laser, lampe à vapeur de mercure...). Il y a ainsi passage d'un état fondamental S_0 à un état excité S_2 avec changement d'orbitale des électrons. Cet état excité S_2 a une durée de vie très courte (de l'ordre de la nanoseconde). Des changements conformationnels et des interactions avec les molécules environnantes font passer la molécule de l'état excité S_2 à un état excité plus stable S_1 : c'est la conversion interne (Internal Conversion). Le passage de l'état excité S_1 à l'état fondamental S_0 se fait avec libération d'un photon d'énergie inférieure donc de longueur d'onde supérieure à celui qui a été absorbé.

Le retour à l'état fondamental ne s'accompagne pas obligatoirement d'une émission de fluorescence, la probabilité relative de fluorescence est liée au rendement quantique de fluorescence de la molécule (ϕ). Le rendement ϕ correspond au rapport entre le nombre de photons émis par une molécule sur le nombre de photons qu'elle a absorbé. Il caractérise l'efficacité du phénomène de fluorescence. La valeur du rendement quantique est fonction de facteurs propres à chaque molécule et de facteurs externes. Bien que tous les molécules soient théoriquement fluorescentes, seules certaines possèdent un rendement quantique suffisamment élevé pour que leur fluorescence soit mesurable.

1.3.1.2. Les caractéristiques spectrales

La lumière émise par retour des molécules excitées à leur état basal, au cours du processus de fluorescence, est toujours d'une longueur d'onde plus élevée, donc d'énergie plus faible, que la lumière absorbée (la perte d'énergie étant due à des conversions internes qui ramènent la molécule au plus bas niveau d'énergie de l'état excité ou fondamental respectivement après absorption ou réémission). Le décalage du spectre d'émission par rapport au spectre d'excitation s'appelle le décalage de Stokes.

1.3.1.3. Mesure d'un signal de fluorescence

Le spectre d'émission est mesuré en faisant varier la longueur d'onde du faisceau incident et en mesurant l'émission à une valeur précise. Le spectre d'émission est mesuré en excitant le fluorophore à une longueur d'onde précise, c'est-à-dire en choisissant une transition isolée parmi toutes celles possibles et en enregistrant toutes les transitions possibles à la réémission. L'intensité d'émission de fluorescence maximale s'obtient en excitant au maximum d'absorption. Le phénomène d'absorption ne dépend pas de l'environnement de la molécule car sa demi-vie est très courte, de l'ordre de la femtoseconde. La fluorescence, dont la demi-vie est plus longue, est au contraire très sensible à l'environnement. En effet, le rendement quantique est très dépendant des changements de l'environnement des groupements fluorophores de la molécule, et le spectre d'émission de la plupart des fluorophores dépend du solvant.

Le nombre de photons émis, c'est-à-dire l'intensité de fluorescence (F), est proportionnel à la fois à l'absorbance et au rendement quantique de fluorescence (ϕ). Les fluorophores les plus efficaces sont donc ceux qui combinent les valeurs les plus élevées de rendement quantique et d'absorptivité molaire (ϵ).

$$F = I_A \cdot \Phi \cdot Z$$

I_A , l'intensité de la lumière absorbée, est reliée à l'équation de Beer-Lambert par la relation : $I_A = (I_T - I_0) = I_0 \cdot (1 - e^{-\epsilon \cdot l \cdot c})$, avec I_T l'intensité de la lumière transmise, I_0 l'intensité de la lumière incidente. Z est un paramètre instrumental rendant compte de la fraction de la fluorescence collectée par l'appareillage.

Toutes les mesures de fluorescence obtenues sont corrigées en fonction de la fluorescence propre du tampon, des variations d'énergies de la lampe et de la dilution par ajout des différents effecteurs. Une correction supplémentaire consiste à prendre en compte l'effet de filtre interne des composés ajoutés. Ainsi, des mesures de fluorescence sont effectuées en parallèle et dans les mêmes conditions, sur une solution standard de NATA (N-acétyl-tryptophanamide), qui mime les propriétés du résidu tryptophane en solution. La variation du signal du NATA dans les conditions expérimentales permet le calcul d'un paramètre correctif que l'on applique à la valeur du signal de la protéine.

1.3.1.4. La fluorescence des protéines

Les protéines possèdent une fluorescence intrinsèque due aux groupements fluorophores constitués par les chaînes latérales des trois acides aminés aromatiques : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine (Figure 38).

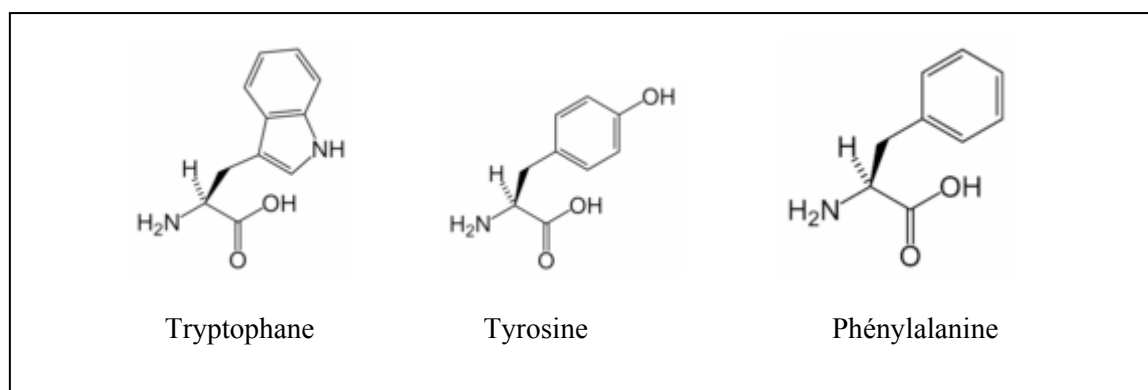


Figure 38 : Structure des trois acides aminés aromatiques.

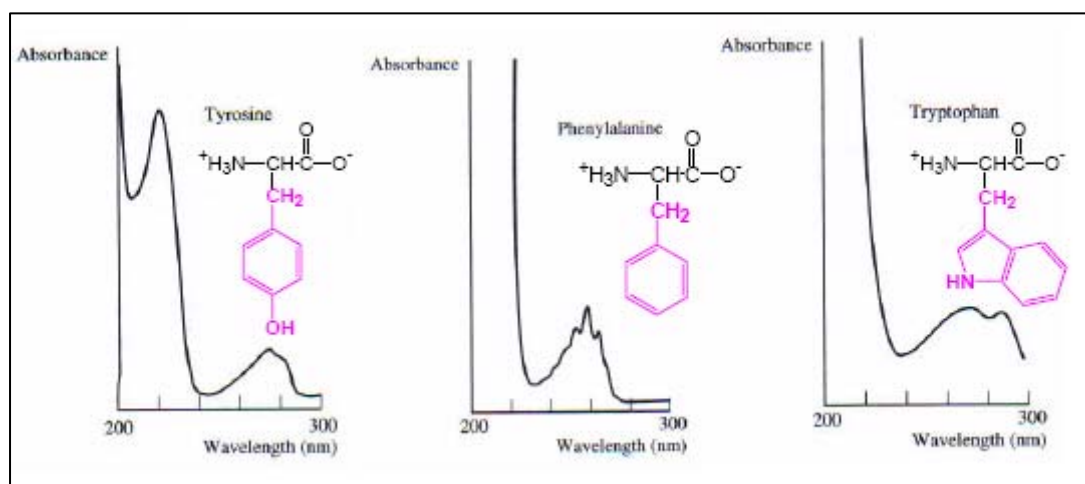
Ces acides aminés diffèrent par leur longueur d'onde maximale d'excitation et d'émission, et par leur rendement quantique (Tableau 6).

Tableau 6 : Propriétés de fluorescence des trois acides aminés aromatiques en solution aqueuse, pH 7.0.

	Absorbance		Fluorescence en solution	
	λ_{Max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)	Rendement quantique
Phe	257.4	197	282	0.04
Tyr	274.6	1420	303	0.21
Trp	279.8	5600	348	0.2

Le tryptophane est un acide aminé rare dans les protéines, et sa présence est souvent corrélée à une fonction importante. Il est ainsi intéressant d'étudier la fluorescence d'une protéine en excitant uniquement les résidus tryptophanes à 295 nm, afin que la fluorescence spécifique ne soit pas contaminée par celle des résidus tyrosine et phénylalanine (Figure 39). Selon sa position dans la protéine, la fluorescence du tryptophane sera plus ou moins influencée par les conditions physico-chimiques de son environnement, ce qui peut être visualisé lors de variations nommées décalage de Stokes.

Le suivi de l'interaction protéine-ligand est possible en mesurant la fluorescence intrinsèque de la protéine en présence du ligand, par variation de la fluorescence des résidus tryptophanes.

**Figure 39** : Spectre d'absorption des acides aminés aromatiques.

1.3.2. Mesures de fluorescence

1.3.2.1. Appareillage

Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un pectrofluorimètre PTI quanta-master QM1, dont la source lumineuse est une lampe à Xénon de 75 watts, délivrant une lumière continue de 210 à 850 nm.

L'appareil est constitué de trois parties (Figure 40):

- un bloc contenant la lampe et le monochromateur pour l'excitation
- un bloc dédié à l'échantillon
- un bloc contenant le monochromateur et un photomultiplicateur

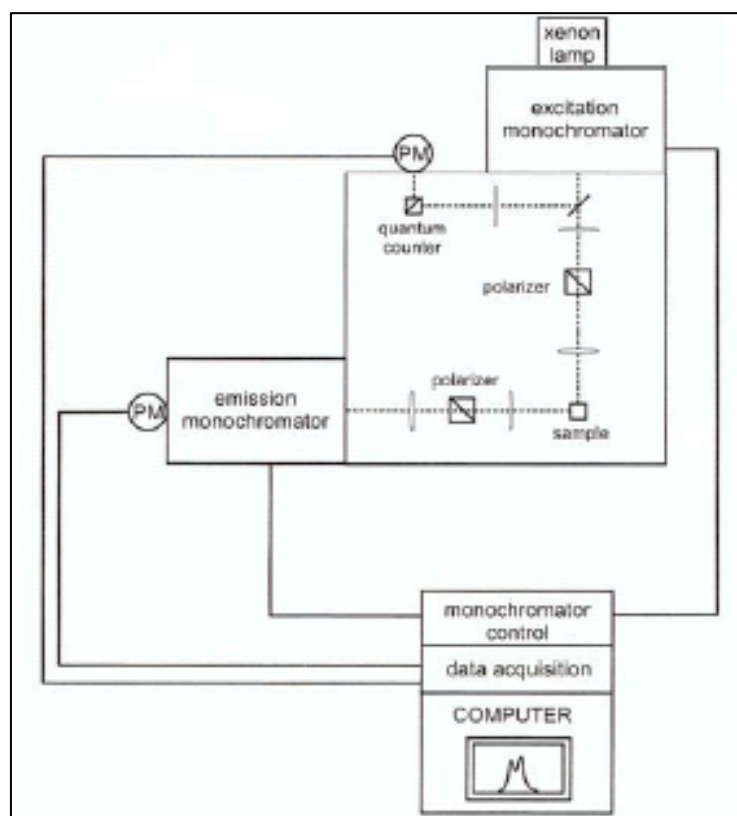


Figure 40 : Organisation classique d'un fluorimètre.

Deux monochromateurs permettent de faire varier la longueur d'onde, nanomètre par nanomètre, sur une gamme de 210 à 850 nm.

Le monochromateur d'excitation permet une variation continue de la longueur d'onde excitatrice sur l'échantillon placé dans une cuve de mesure en quartz, puis une série de miroirs permet de focaliser la lumière monochromatique sur l'échantillon. Le monochromateur d'émission, placé à 90° du faisceau incident, permet de sélectionner la longueur d'onde réémise, dont l'intensité est amplifiée et mesurée par un photomultiplicateur couplé à un ordinateur de type PC.

Dans le porte cuve, un régulateur de température permet de maintenir l'échantillon à température constante. Un agitateur magnétique intégré permet d'homogénéiser en permanence le milieu réactionnel.

1.3.2.2. Conditions de mesure

Pour tous les essais, les conditions standards utilisées sont les suivantes :

- puissance de la lampe : 75 watts
- ouverture des fentes d'excitation : 4 nm
- ouverture des fentes d'émission : 4 nm
- constante de temps de mesure : 0.1 s
- température : 25 ± 0.1 °C

Le tampon de fluorescence utilisé est composé de 50 mM Hepes pH 7.8, 10% glycérol, 500 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, \pm 0.01% HECAMEG si le domaine a été purifié en présence ou en absence de détergent.

Les domaines NBD1 et NBD2 possèdent respectivement 2 et 1 résidus tryptophane. Les spectres d'émission de fluorescence intrinsèque sont obtenus en fixant la longueur d'onde d'excitation à 295 nm, et en balayant l'émission de 310 à 360 nm.

1.3.2.3. Atténuation de fluorescence

L'atténuation du rendement quantique de fluorescence d'un fluorophore est due à une diminution de la durée de vie de son état singulet excité le plus bas, sans modification des niveaux d'énergie intermédiaires impliqués dans l'émission de fluorescence. On appelle « agent atténuateur » les molécules provoquant une telle atténuation.

Deux composantes peuvent intervenir dans ce phénomène :

- une **atténuation dynamique ou collisionnelle**, correspondant à une dissipation de l'énergie de l'état excité d'un fluorophore sous forme d'énergie thermique lors de la collision avec l'agent atténuateur
- une **atténuation statique**, correspondant à une diminution du nombre de molécules de fluorophores excitées : cette atténuation est due à la formation d'un complexe stable entre l'atténuateur et le fluorophore (complexe noir), empêchant l'excitation du fluorophore. On n'observe alors que la fluorescence des fluorophores non complexés.

L'atténuation de fluorescence se mesure par addition à une solution de protéines, des quantités croissantes d'agent atténuateur. Les spectres obtenus sont corrigés de l'effet de filtre interne de l'agent atténuateur.

La représentation des résultats se fait sous forme de la diminution de fluorescence en fonction de la concentration en agent atténuateur. L'exploitation des résultats par le logiciel Grafit (Erathicus Software) permet de définir le F_{\max} (fluorescence maximale), le F_{\min} (fluorescence minimale) et le K_d (constante de dissociation) de l'agent atténuateur, en utilisant l'équation suivante :

$$F = F_{\max} - (F_{\max} - F_{\min}) \cdot [(Et + L + K_d) - [(Et + L + K_d)^2 - 4Et \cdot L]^{1/2}] / 2Et$$

Où F est la fluorescence résiduelle, Et la concentration en protéines, L la concentration en agent atténuateur.

1.3.2.4. Expériences de prévention

Les expériences de prévention consistent à mettre en évidence l'inhibition de la fixation d'un ligand fluorescent par un autre ligand non fluorescent (inhibiteur).

Les valeurs d'atténuation de fluorescence sont analysées en traçant la représentation de Linweaver-Burk. Cette représentation permet de déterminer le K_M du substrat sans inhibiteur, et le K_{Mapp} du substrat en présence de l'inhibiteur. Il est alors possible de déterminer la constante d'inhibition K_i , dans le cas d'une inhibition compétitive, par l'équation :

$$K_i = [I] / [(K_{Mapp}/K_M) - 1]$$

Où K_i est la constante d'inhibition, K_M la constante de Michaëlis-Menten, K_{Mapp} constante de Michaëlis-Menten apparente, et $[I]$ la concentration de l'inhibiteur.

1.3.2.5. Mesure de l'accessibilité des tryptophanes au NaI

Certains ions ou molécules de taille et de structure très variées peuvent provoquer, lorsqu'ils se trouvent en présence de fluorophore, une diminution de l'intensité de fluorescence de ces derniers. Les molécules sont appelées des agents atténuateurs (Voir chapitre « atténuation de fluorescence »).

Dans le cas des protéines, on utilise soit des molécules neutres pénétrantes, comme l'acrylamide, qui diffusent vers les zones hydrophobes de la protéine, soit des molécules chargées peu pénétrantes, comme l'iodure de sodium, qui diffusent vers les zones polaires et atténuent les fluorophores localisés en surface de la protéine. Les mesures d'atténuation de fluorescence permettent de déterminer la localisation, l'accessibilité et l'environnement de ces tryptophanes, ainsi que l'influence de substrats ou effecteurs de la protéine.

En mesurant l'intensité de fluorescence en présence de concentrations croissantes en agent atténuateur, il est possible de tracer la représentation de Stern-Volmer :

$$F_0/F = (1 + K_{SV}[Q])e^{V[Q]}$$

Où $[Q]$ est la concentration en agent atténuateur, K_{SV} la constante de Stern-Volmer, définissant l'accessibilité de l'agent atténuateur au fluorophore, V la constante d'atténuation statique.

Trois cas d'atténuation de fluorescence peuvent être définis selon la représentation de Stern-Volmer :

- *une droite* : il y a alors uniquement atténuation collisionnelle ($V=0$) et l'équation devient :

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$$

- *une courbe à concavité vers le haut* : il y a alors atténuation statique et collisionnelle. Il est possible de déterminer l'atténuation collisionnelle par la pente de la tangente à l'origine de la courbe
- *une courbe à concavité vers le bas* : il y a atténuation collisionnelle sur une partie des fluorophores. La fraction des fluorophores accessibles est alors déterminée en utilisant l'équation de Lehrer :

$$F_0/\Delta F = (1/f_a \cdot K_a \cdot [Q]) = 1/f_a$$

Où f_a est la fraction de fluorescence accessible à l'agent atténuateur, K_a la constante d'accessibilité dynamique.

Les conditions de mesures sont identiques à celles réalisées pour la mesure de l'atténuation de fluorescence. La mesure de l'accessibilité est réalisée par une gamme d'iodure de sodium (NaI) à partir d'une solution de NaI 8 M, 0.1 mM Na₂S₂O₃. Les spectres obtenus sont corrigés du tampon et des variations de volumes et traités par le logiciel Grafit. L'effet de fortes concentrations en sels est mesuré en effectuant la même gamme de concentration en NaCl sur la protéine, et l'atténuation de fluorescence est mesurée.

2. Etude du transporteur MRP1 entier

Les études de MRP1 au niveau cellulaire ont été effectuées à partir de cellules BHK-21 transfectées ou non, généreusement données par le Dr. Xiu-Bao CHANG, Mayo Clinic Scottsdale, U.S.A., courant de l'année 2000. Ces lignées ont été rapportées par le Dr. Doriane Tromprier qui a alors débuté les études du transporteur dans ce type de cellules.

2.1. Conditions de cultures cellulaires

2.1.1. Les souches cellulaires

Dans le cadre de ce travail, les souches utilisées sont des lignées cellulaires fibroblastiques mammifères immortalisées de reins de bébé hamster ou BHK-21 (Baby Hamster Kidney).

Deux souches étaient à disposition pour ce travail :

- La souche BHK-21 sauvage, servant de contrôle. Un western Blot effectué sur le lysat cellulaire a montré l'absence du transporteur MRP1 et de la Glycoprotéine-P.
- La souche BHK-21 transfectée de manière stable par le gène *mrp1* à l'aide du plasmide pNUT (Palmiter et al., 1987), permettant un haut niveau d'expression de la protéine MRP1. La protéine se trouve préférentiellement dans la membrane plasmique des cellules, avec quelques traces autour du noyau, correspondant à sa biosynthèse dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Chang et al., 1997).

2.1.2. Maintien des cultures cellulaires

La culture des lignées cellulaires précédemment décrites se fait dans le milieu suivant :

- DMEM-F12 (milieu de Eagle modifié Dulbecco, Life Technologies Inc.)
- 5% de sérum de veau fœtal ou SVF (Sigma)
- 1% de pénicilline-streptomycine (Sigma), inhibiteur de la synthèse des parois bactériennes et inhibiteur de la synthèse des protéines procaryotes, respectivement
- 200 μ M de methotrexate (Rhône-Poulenc, 50 mg/ml) dans le milieu de culture des cellules transfectées par le gène *mrp1*, qui constitue l'agent de sélection, puisque le vecteur pNUT contient le gène de la DHFR

Les cellules sont cultivées en incubateur thermostaté à 37 °C, en présence de 5% CO₂ dans une atmosphère humide.

Lors du passage des lignées, les cellules sont lavées avec du tampon PBS 1X (Phosphate Buffer Saline), avant d'être détachées des boîtes de cultures par la trypsine/EDTA (Sigma), qui coupe les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire. L'action de l'enzyme est arrêtée par rajout de milieu de culture complet.

Le comptage des cellules s'effectue à l'aide d'une cellule de Malassez (Figure 41). La cellule est composée de 100 rectangles, subdivisés chacun de 20 carrés. Chaque carré visible correspond à $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{L}$. Le comptage s'effectue en comptant les cellules de 20 carrés, ce qui correspond à X cellules dans $0,01 \mu\text{L}$. Il suffit alors de multiplier le nombre X par $1 \cdot 10^4$ pour trouver le nombre de cellules par millilitres.

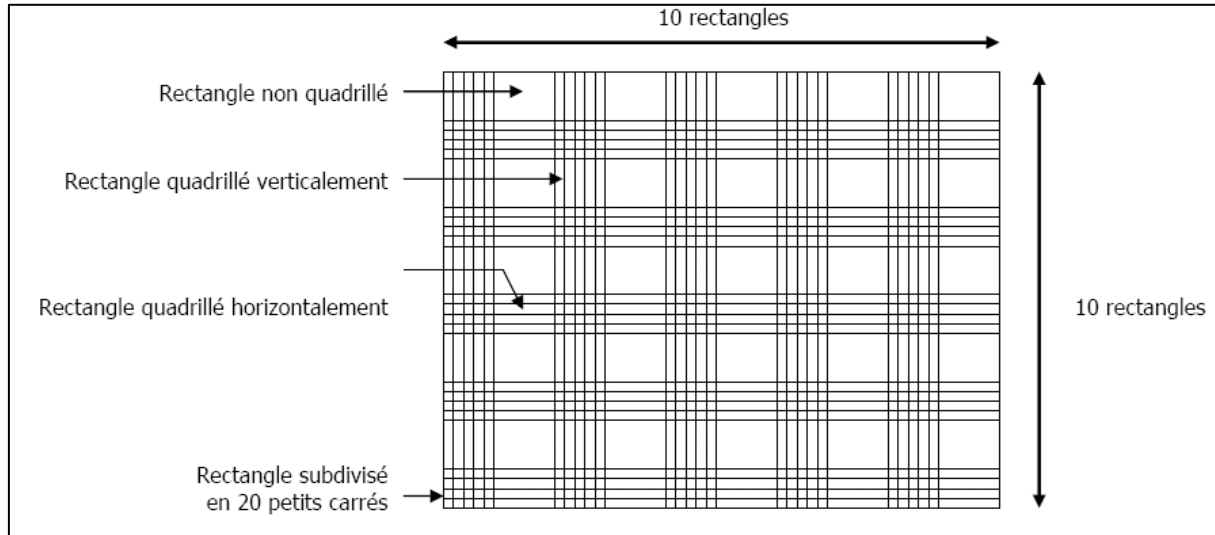


Figure 41: Cellule de comptage de Malassez.

2.1.3. Conservation des lignées cellulaires

- Congélation des cellules

Les cellules sont détachées à l'aide de trypsine/EDTA et centrifugées (200 g pendant 5 minutes). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire repris dans 1 à 2 ml de milieu DMEM-F12 contenant 5 % SVF et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde). Cette suspension est refroidie progressivement de $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ grâce une boîte de congélation « Mr Frosty » (contenant de l'isopropanol) (Nalgène) jusqu'à $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ avant d'être stockée dans l'azote liquide à $-180 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Décongélation des cellules

Les cellules sont décongelées le plus rapidement possible dans un bain marie à $37 \text{ }^\circ\text{C}$, puis diluées dans 10 ml de milieu complet. Les cellules sont alors centrifugées à 200 g pendant 5 minutes et le culot cellulaire est repris par 10 ml de milieu complet. Les cellules sont alors réparties dans une boîte de culture et incubées à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sous 5% de CO_2 .

2.2. Etude cellulaire du transporteur

2.2.1. Test de prolifération cellulaire MTT

Principe :

Ce test colorimétrique est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le composé MTT ou 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium bromide, de couleur

jaune, en un produit détectable spectrophotométriquement, le bleu de formazan. En effet, le MTT est clivé en formazan suite à l'action de la succinate-tétrazolium réductase (EC1.3.99.1) qui fait partie de la chaîne respiratoire mitochondriale, et cette enzyme est uniquement active dans les cellules métaboliquement actives (Figure 42).

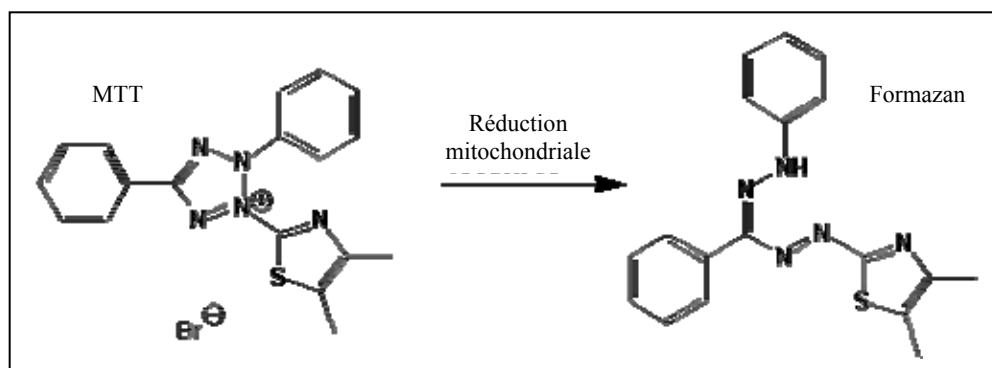


Figure 42: Réduction du MTT en formazan sous l'action de la succinate-tétrazolium réductase de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Ce test colorimétrique (Mosmann, 1983; Carmichael et al., 1987) est semi automatisé et peut ainsi être réalisé en plaques de cultures 96 puits et la détection colorimétrique se fait alors par un lecteur spectrophotométrique de plaque.

Mode opératoire :

Les cellules sontensemencées à raison de $2.5 \cdot 10^3$ cellules/puit, dans une plaque 96 puits traitée à cet effet, dans un volume final de 200 μ l de milieu complet en présence ou non de méthotrexate selon le type cellulaire étudié. Les cellules sont alors incubées pendant 17 h à 37 °C sous 5% CO₂ afin que les cellules adhèrent au support. Le milieu de culture est ensuite remplacé par 200 μ l/puit de milieu neuf complet (sans méthotrexate dans tous les cas) contenant le composé dont on veut tester la cytotoxicité cellulaire (la concentration en DMSO finale est de 0.5 % pour les composés dissous dans ce solvant). Les cellules sont alors incubées pendant 48 h dans les mêmes conditions que précédemment, puis le milieu est changé de la même manière, et s'en suit une deuxième incubation de 48 h.

Le milieu est ensuite enlevé et remplacé par 100 μ l de milieu complet contenant 0.5 mg/ml de MTT. Les cellules sont incubées à 37 °C sous 5% CO₂ pendant 4 h, puis le milieu est retiré et les plaques sont séchées à l'air libre jusqu'au lendemain. Un mélange d'isopropanol : 1 N HCl (24 :1) est alors ajouté à hauteur de 100 μ l par puit afin de solubiliser les cristaux de formazan. L'absorbance est lue à 570 nm à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique de plaque. Chaque point de concentration testée est effectué en triplicate, et les données de prolifération cellulaire sont analysées à l'aide du logiciel Sigma Plot, en traçant le pourcentage de survie cellulaire en fonction de la concentration en composé. Les expériences sont réalisées au moins deux fois lors d'expériences différentes.

2.2.2. Dosage du glutathion intracellulaire

Principe :

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) possédant un groupement thiol libre. Le GSH joue au sein de l'organisme un rôle de protection contre

les agents oxydants et le maintien de la réduction des thiols des protéines. Durant ces réactions, le GSH est converti en GSSG, le rapport GSH/GSSG est diminué du fait de l'accumulation du GSSG. La détermination du rapport GSH/GSSG et du taux de GSSG est un indicateur du stress oxydatif subi par la cellule.

La détermination du contenu total en GSH cellulaire a été effectuée en utilisant la méthode enzymatique de Tietze, adaptée par Anderson (Tietze, 1969; Anderson, 1985). Cette réaction est basée sur l'activité de réduction du GSSG en GSH par la GSH réductase, au dépend de l'oxydation d'une molécule de β -NADPH. Le GSH ainsi formé conduit à la réduction d'une molécule de DTNB en 2 molécules de TNB, qui sont alors quantifiables par absorbance à 412 nm. L'oxydation de 2 molécules conduit aussi à la formation d'une molécule de GSSG qui pourra être à son tour réduite par le GSH réductase (Figure 43). La détermination se fait alors en fonction de la concentration en GSH, dont la quantité va plus ou moins accélérer la réaction, et ainsi former plus ou moins vite de TNB dosable spectrophotométriquement. La lecture de l'absorbance est alors effectuée à la manière d'une cinétique.

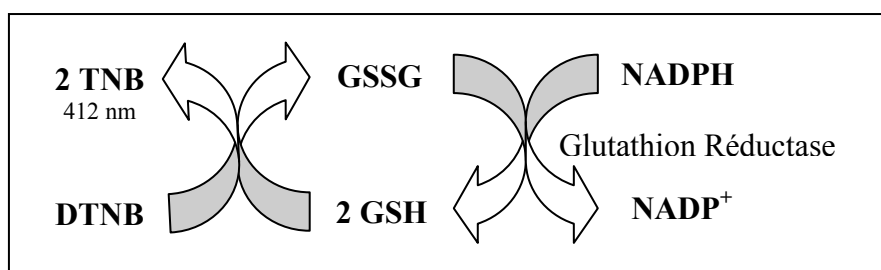


Figure 43: Principe du dosage du GSH cellulaire total et du GSSG.

Mode opératoire :

Les cellules sontensemencées à raison de 1.10^5 cellules par puit dans une plaque 96 puits, dans un volume final de 200 μ l de milieu complet en présence ou non de methotrexate selon le type cellulaire étudié. Les cellules sont alors incubées pendant 17 h à 37 °C sous 5% CO_2 afin que les cellules adhèrent au support. Le milieu de culture est ensuite remplacé par 200 μ l/puit de milieu neuf complet (sans methotrexate dans tous les cas) contenant le composé dont on veut tester l'effet sur l'efflux du GSH (la concentration en DMSO finale est de 0.5 % pour les composés dissous dans ce solvant). Les cellules sont alors incubées pendant le temps voulu dans les mêmes conditions que précédemment. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées 2 fois par 200 μ l de PBS froid, afin d'éliminer le GSH qui a été efflué dans le milieu extracellulaire. Les cellules sont ensuite lysées en rajoutant 50 μ l de PBS contenant 0.1% de Triton X-100 froid, et agitées pendant 30 min à 4 °C. Après lyse, 5 μ l sont prélevés dans chaque puit et transférés dans une nouvelle plaque pour dosage du GSH, et 5 μ l sont transférés dans une autre plaque pour dosage des protéines. Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford, par ajout de 180 μ l de réactif de Bradford, et l'absorbance est lue à l'aide d'un lecteur de plaque à 595 nm. En parallèle de ce dosage, une gamme étalon de BSA est effectuée. Le dosage du GSH est effectué selon la méthode enzymatique précédemment décrite. Il est alors rajouté à chaque puit 125 μ l d'un mélange réactionnel contenant :

- 221.3 μ M β -NADPH
- 462.2 μ M DTNB
- 11 U/ml de GSH réductase
- PBS

L'absorbance est ensuite lue à 412 nm en utilisant un lecteur de plaque, en effectuant une lecture cinétique toutes les 30 s pendant 2 min. En parallèle, une gamme étalon de GSH est effectuée. Les données sont alors traitées, le lecteur de plaque donnant, pour le dosage du GSH, les pentes de chaque cinétique. Il est alors possible de déterminer, en fonction de la gamme étalon de GSH, la concentration en GSH dans chaque échantillon. La concentration en GSH est ensuite ramenée à la concentration en protéines présente dans chaque échantillon, et exprimée en nmol/mg. Toutes les mesures sont effectuées en triple, et chaque expérience est répétée au moins deux fois.

2.2.3. Mesure du transport de la calcéine par cytométrie en flux

2.2.3.1. Principe général de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier. Les premiers cytomètres en flux ont été inventés dans les années 1950.

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de particules isolées (cellules, bactéries...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto fluorescence.
- aux propriétés optiques de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photo-multiplieurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes ou de cytogrammes sur une ou plusieurs populations, dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

Un cytomètre est composé de 5 éléments (Figure 44) :

- une cellule contenant un liquide d'entraînement permettant d'aligner les cellules afin qu'elles passent une à une devant le faisceau laser
- une source de lumière, qui est généralement un laser argon émettant une lumière à 488 nm
- un système d'amplification linéaire ou logarithmique
- un détecteur
- un système informatique pour le traitement et l'analyse des résultats

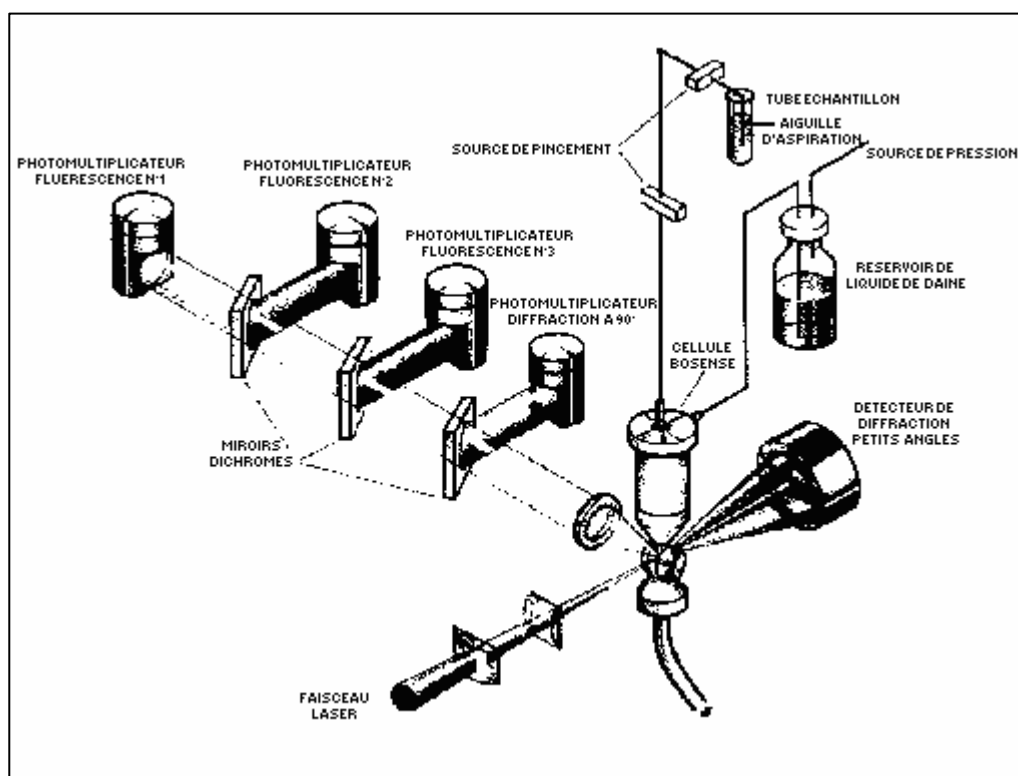


Figure 44: Principe du fonctionnement d'un cytomètre en flux.

Le FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) est un type spécifique de cytométrie en flux. C'est une technique permettant d'analyser chaque cellule selon sa morphologie et sa fluorescence. L'utilisation du FACS nécessite la préparation de cellules séparées, marquées par des anticorps ou des marqueurs fluorescents. La suspension cellulaire est aspirée dans une cellule en flux où chaque cellule passe individuellement devant un faisceau laser. La lumière est alors absorbée ou diffusée lorsqu'elle frappe la cellule. Lorsque la lumière est absorbée, à une longueur d'onde appropriée, une lumière fluorescente peut être réémise par les marqueurs fluorescents. La diffusion de la lumière est dépendante des structures internes de la cellule, de sa taille et de sa forme. La lumière diffusée et la fluorescence sont alors captées par une série de photodiodes et les signaux sont amplifiés. Les signaux électriques résultant sont digitalisés, analysés, et envoyés vers un système informatique. Les résultats proviennent ainsi de chaque cellule analysée, et puisque un grand nombre de cellules peut être analysé dans un temps court (>1000/s), des informations statistiquement fiables peuvent être obtenues d'une population.

2.2.3.2. Mesure du transport de la calcéine par MRP1

Principe :

La calcéine-AM est un composé hydrophobe (Figure 45), non fluorescent, qui peut pénétrer dans la cellule à travers la membrane. Après être entrée dans la cellule, la calcéine-AM est rapidement hydrolysée par des estérases. De ce clivage résulte un dérivé hautement fluorescent qui n'a plus la capacité de sortir seul de la cellule à travers la membrane, il est donc accumulé dans la cellule. La calcéine est un composé fluorescent qui n'altère pas les

fonctions cellulaires et n'entraîne aucune cytotoxicité. La calcéine est excitable à 488 nm, et émet une fluorescence à 520 nm, soit la fenêtre FL1 d'un cytomètre en flux, type FACS.

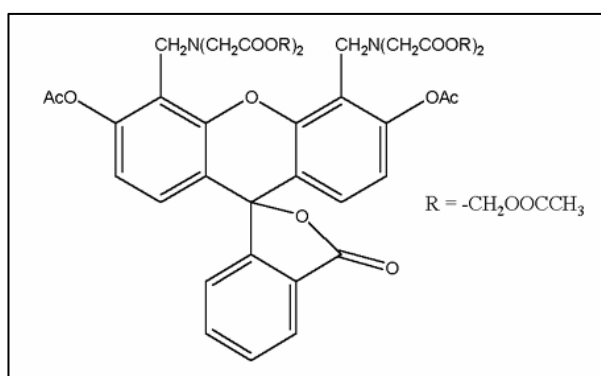


Figure 45: Structure de la calcéine-AM.

Les transporteurs MDR ont la capacité de transporter une grande variété de composés hydrophobes. La calcéine-AM est un très bon substrat de MRP1 et la Glycoprotéine-P. Les transporteurs ont aussi la capacité de transporter la calcéine clivée qui est accumulée dans le cytoplasme. Ainsi, plus les transporteurs à la membrane sont actifs, moins la calcéine peut être accumulée dans le cytoplasme (Figure 46).

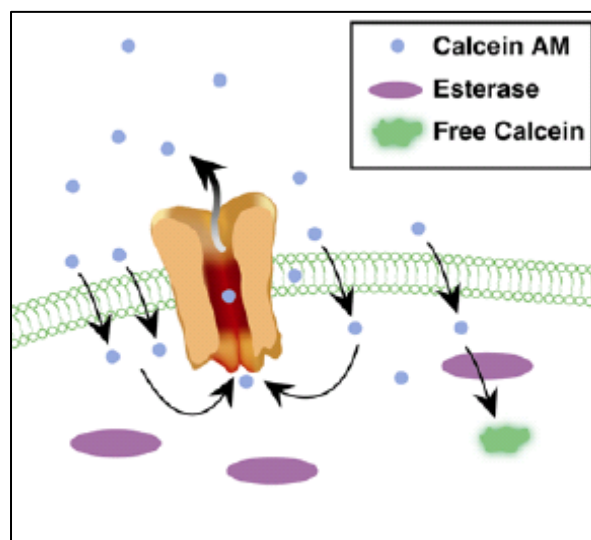


Figure 46: Diminution de l'accumulation de calcéine libre (Free Calcein) dans la cellule due à l'activité des transporteurs MDR.

L'intérêt de ce mécanisme réside dans la recherche d'inhibiteurs de ces transporteurs. En effet, des inhibiteurs de ces transporteurs ont pour effet un blocage du transport de calcéine-AM et de calcéine libre, entraînant ainsi une forte accumulation de calcéine libre dans la cellule. Il est alors possible de déterminer la présence de transporteurs MDR dans une cellule, ou de déterminer l'activité et l'efficacité d'un inhibiteur sur un transporteur (Figure 47).

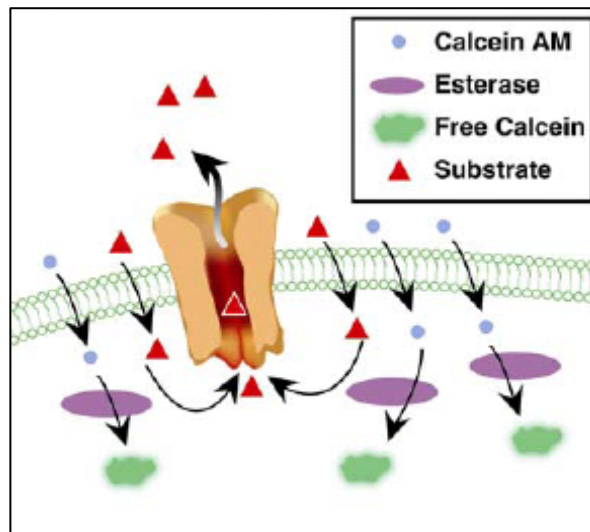


Figure 47: Inhibition de l'efflux de calcéine-AM par des inhibiteurs ou substrats (Substrate) de transporteurs MDR, entraînant une augmentation de l'accumulation en calcéine libre (Free Calcein) fluorescente.

Mode opératoire :

L'activité inhibitrice de composés peut être détectée en mesurant l'accumulation de calcéine dans les cellules transfectées par le gène *mrp1*. Pour cela, les cellules en culture sont détachées à l'aide de Versen (solution de PBS additionnées d'EDTA), et centrifugées à 500 g pendant 5 min, puis resuspendues dans du milieu complet contenant 5 mM EDTA. Les cellules sont ensuite diluées dans 4 ml de milieu complet complété avec 5 mM EDTA à hauteur de $5 \cdot 10^5$ cellules, en présence de $0.2 \mu\text{M}$ Calcéine-AM et $30 \mu\text{M}$ de l'inhibiteur à étudier. Les cellules sont alors incubées pendant 10 min à 37°C à l'obscurité. Enfin, les cellules sont centrifugées à 500 g pendant 5 min, et reprises par $400 \mu\text{l}$ de PBS froid contenant 5 mM EDTA et 0.1% BSA afin que les cellules ne s'agrègent pas. L'intensité de fluorescence est ensuite immédiatement analysée à l'aide d'un cytomètre en flux FACScan (Becton Dickinson) en utilisant la fenêtre de mesure FL1 (Chearwae et al., 2006).

Durant l'acquisition des cytogrammes, la population à étudier est déterminée à partir des cellules BHK-21 contrôles, sans marquage. Par ailleurs, il est nécessaire d'utiliser les cellules BHK-21 contrôles marquées à la calcéine-AM comme témoin négatif, par rapport aux cellules BHK-21-MRP1. Les mesures sont répétées 3 fois avec des cellules différentes.

2.3. Etude biochimique de MRP1

2.3.1. Purification du transporteur MRP1

L'objectif est de purifier MRP1 à partir des cellules BHK-21 transfectées par le gène *mrp1* (Chang et al., 1997). Il s'agit donc d'un système où les modifications post traductionnelles seront correctement effectuées sur la protéine.

Principe :

Le gène de MRP1 a été transfecté à l'aide du vecteur pNUT, et à la fin du gène, une séquence codant pour 10 histidines a été rajoutée à l'extrémité C-terminale. La purification consiste alors à effectuer une chromatographie d'affinité sur Nickel agarose (Qiagen).

Mode opératoire :

La purification est effectuée à partir d'une grande quantité de cellules BHK-21-MRP1, en partant en général de 25 boîtes de 15 cm de diamètre. Les cellules sont mises en culture environ 72 h avant récolte, dans l'objectif d'atteindre une confluence de 80%.

La production de la protéine est augmentée dans les cellules, en rajoutant 17 h avant récolte, 5 mM de butyrate de sodium. En effet, de nombreuses études ont montré l'effet positif du butyrate de sodium sur l'expression de MRP1. Le sodium butyrate est un inhibiteur des déacétylases d'histones, entraînant une altération de la structure chromatinienne, favorisant ainsi l'expression génique au niveau transcriptionnel.

Le jour de la récolte, les cellules sont lavées au PBS froid, puis sont détachées à l'aide de PBS froid complété avec 5 mM EDTA. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 min à 500 g et reprises dans un tampon hypotonique :

Tampon hypotonique :

- 10 mM Tris-HCl pH 7.4
- 1.5 mM MgCl₂
- 10 mM KCl
- Cocktail d'inhibiteurs de protéases pour cellules mammifères (Sigma)

Les cellules sont alors incubées pendant 30 min à 4 °C, jusqu'à ce qu'elles deviennent turgescentes (permettant de mieux les lyser). Elles sont ensuite éclatées à l'aide d'un Potter Helvejem, ce qui permet de casser les membranes tout en conservant les différents compartiments cellulaires intacts. La lyse des cellules est vérifiée par microscopie photonique.

Les cellules lysées sont ensuite centrifugées à 1000 g pendant 15 min à 4 °C, afin d'éliminer les cellules entières, noyaux, et gros débris cellulaires. Une deuxième centrifugation à 10.000 g pendant 10 min à 4 °C permet d'éliminer les mitochondries. Enfin, on récupère les membranes en centrifugeant le surnageant précédent à 100.000 g pendant 60 min à 4 °C.

Les membranes sont ensuite reprises dans un tampon A contenant un détergent, le CHAPS.

Tampon A :

- 20 mM Tris-HCl pH 7.9
- 500 mM NaCl
- 5 mM imidazole
- 10 mM CHAPS
- 20% glycérol

La quantité de protéines dans les membranes est alors dosée par la technique de Bradford, et les membranes sont diluées par du tampon A à une concentration finale de 2 mg/ml. Les membranes sont alors solubilisées pendant 30 min à 4 °C sous agitation. Les membranes solubilisées sont centrifugées à 10.000 g pendant 15 min à 4 °C pour éliminer les membranes non solubilisées.

Le surnageant est ensuite mis en contact avec de la Nickel agarose, préalablement équilibrée avec du tampon A, pendant 60 min à 4 °C et sous agitation. La résine est transférée dans une colonne, l'éluat est récupéré et déposé deux fois sur la résine.

La résine est tout d'abord lavée avec 10 volumes de tampon A1 :

Tampon A1 :

- 20 mM Tris-HCl pH 7.9
- 500 mM NaCl
- 25 mM imidazole
- 5 mM CHAPS
- 20% glycérol

Puis, elle est lavée par 10 volumes de tampon A2 :

Tampon A2 :

- 20 mM Tris-HCl pH 7.9
- 500 mM NaCl
- 40 mM imidazole
- 5 mM CHAPS
- 10% glycérol

Enfin, les protéines sont éluées par 3 volumes de tampon d'éluion A3 :

Tampon A3 :

- 20 mM Tris-HCl pH 7.9
- 500 mM NaCl
- 300 mM imidazole
- 5 mM CHAPS
- 10% glycérol
- 0.05% β -mercaptoéthanol

Le CHAPS est diminué à 5 mM afin de conserver un rapport protéine/détergent de.

Afin d'éliminer l'imidazole, qui est gênant dans les expériences de spectrométrie de fluorescence, les protéines sont dialysées pendant la nuit, à 4 °C, sous agitation, contre 1000 volumes de tampon de dialyse A4, à l'aide d'une membrane de dialyse (SpectraPor), MWCO = 12-14.000 Da, diamètre = 16 mm, volume/longueur = 2ml/cm.

Tampon A4 :

- 20 mM Tris-HCl pH 7.9
- 500 mM NaCl
- 5 mM CHAPS
- 10% glycérol
- 0.05% β -mercaptoéthanol

Après dialyse, les protéines sont dosées, analysées par électrophorèse SDS-PAGE 6% et immunomarquage après transfert sur nitrocellulose, et conservées à 4 °C pour une utilisation dans les 24 h suivant la purification.

2.3.2. Détection de MRP1 par immunomarquage**Mode opératoire :**

Après migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide dénaturant 6%, la protéine est transférée sur une membrane de nitrocellulose 0.2 μ m (BioRad) pendant 2 h à 200 mA à 4 °C dans un tampon de transfert contenant 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glycine et 20% méthanol. La membrane de nitrocellulose est alors saturée par incubation dans un tampon contenant 5% de lait écrémé, dissous dans du tampon TBS (10 mM Tris-HCl pH 7.4 et 150 mM NaCl), pendant 1 h. La réaction avec l'anticorps primaire se fait par incubation pendant 1 h en présence de l'anticorps monoclonal MRPM6 (COGER) avec une dilution au 1/100^{ème}, dans 5 ml de tampon TBS additionné de 1% de lait. La membrane est ensuite lavée trois fois 5 min avec du TBS. La membrane est alors incubée pendant 1 h avec l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à la peroxydase du raifort sauvage (Dako Cytomation) dilué au 1/1000^{ème} dans 5 ml de tampon TBS additionné de 1% de lait écrémé. La membrane est ensuite lavée trois fois avec du tampon TBS. La révélation est effectuée en utilisant le Kit Lumilight (Roche), qui permet la détection des protéines grâce à une réaction de chimiluminescence, en utilisant l'activité de la peroxydase de l'anticorps secondaire sur le luminol. La membrane est alors révélée à l'aide d'un film Kodak BioMax.

2.3.3. Mesure de l'activité ATPase de MRP1, basée sur le dosage du phosphate inorganique**Principe :**

Cette méthode colorimétrique permet de doser à l'aide d'un spectrophotomètre la quantité de Pi (phosphate inorganique) libérée par l'activité ATPase de l'enzyme, pendant un temps donné (Chifflet et al., 1988). Cette méthode est extrêmement sensible puisqu'elle peut détecter 2 nmol de Pi libéré. La réaction est basée sur l'interaction du phosphate, du molybdate et d'agents réducteurs. La réduction du complexe phosphomolybdate dans un acide fort conduit à la formation de bleu de molybdenum.

Mode opératoire :

Les réactions se déroulent dans des plaques 96 puits dans un volume final de 100 μ l. L'activité ATPase de MRP1 est mesurée en incubant 1.5 μ g de MRP1 solubilisée dans du CHAPS, pendant 4 h à 37 °C dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM

dithiothréitol, 10 mM MgCl₂, en présence ou en absence de 5 mM GSH, 1 μM vérapamil et 5 mM ATP. Dans le cas d'une mesure de l'activité ATPase de MRP1 en présence d'asolectine, l'incubation se fait en présence de 0.2% asolectine, pendant 1 h avec 1 μg de protéine solubilisée, l'asolectine augmentant significativement l'activité ATPase de MRP1. La réaction ne nécessite pas de système de régénération de l'ATP, car l'activité ATPase de MRP1 est relativement faible, avec environ 10 nmol/min/mg, la réaction se déroulant alors toujours en concentration saturante en ATP.

La réaction est arrêtée en ajoutant 100 μl de réactif A contenant du SDS, et en incubant pendant 5 min. La réaction colorimétrique est ensuite initiée en rajoutant 100 μl de réactif B, puis en laissant la couleur se développer pendant environ 20 min. L'absorbance est enfin lue à l'aide d'un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 750 nm.

Il est important de réaliser une gamme étalon complète pour chaque plaque, puisque la réaction colorimétrique continue d'évoluer au cours du temps. Les essais, comme chaque point de la gamme étalon, sont réalisés en triplicate afin d'améliorer la précision de la mesure. Cette gamme étalon permet de calculer l'activité ATPase de la protéine en nmol/min/mg. Les essais sont réalisés en triple, et au moins lors de deux expériences indépendantes.

Réactif A: Ce réactif est préparé immédiatement avant l'utilisation. Il est constitué d'un mélange équivolume de deux solutions. La première est une solution de 1% molybdate dans du SDS 12%, qui peut être stockée à température ambiante à l'abri de la lumière pendant plusieurs mois. La seconde, constituée de 6% d'acide ascorbique dans de l'HCl 1%, est à préparer au dernier moment.

Réactif B: Solution de 2% de citrate de sodium / 2% d'arsénite de sodium / 2% acide acétique.

2.3.4. Mesure de la fixation du vérapamil sur MRP1 par spectrométrie de fluorescence

2.3.4.1. Atténuation de fluorescence

La technique utilisée pour mesurer la fixation du vérapamil sur MRP1 est identique à celle décrite dans le paragraphe « mesure de fluorescence » pour les NBD de MRP1.

Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz de 500 μl, en diluant les protéines dans du tampon de dialyse, à une concentration finale de 0.2 μM de MRP1. Pour les expériences en présence d'asolectine, 0.2% d'asolectine ont été rajoutées au tampon de mesure.

2.3.4.2. Mesure de l'accessibilité des Tryptophanes au NaI

La technique utilisée pour mesurer l'accessibilité des tryptophanes de MRP1 au NaI est identique à celle décrite pour les NBD de MRP1. Les conditions de mesures sont aussi identiques aux mesures d'atténuation de fluorescence sur MRP1. Une gamme de NaI est effectuée entre 0 et 0.4 M, et un contrôle de l'effet des sels sur MRP1 est effectué en opérant de la même manière, mais en présence d'une gamme de NaCl. Pour les expériences en présence d'asolectine, 0.2% d'asolectine ont été rajoutées au tampon de mesure.

2.3.5. Mesure du transport de [³H] LTC₄ dans les vésicules membranaires inversées enrichies en MRP1

L'utilisation de membranes vésiculaires enrichies en MRP1 représente une technique intéressante pour suivre le transport de substrats par MRP1 et l'influence de potentiels inhibiteurs.

Les membranes sont préparées à l'aide de cellules surexprimant MRP1. Les membranes sont alors isolées. Les vésicules ainsi produites sont une population mixte de vésicules contenant MRP1 dont les domaines cytoplasmiques sont orientés soit à l'extérieur, soit à l'intérieur. Il est alors possible d'utiliser le terme de « vésicules membranaires inversées » ou IMV pour définir ce type de vésicules, dans le sens où ne seront fonctionnelles que les vésicules inversées, l'ATP nécessaire pour le fonctionnement du transporteur étant ajouté à l'extérieur (Figure 43).

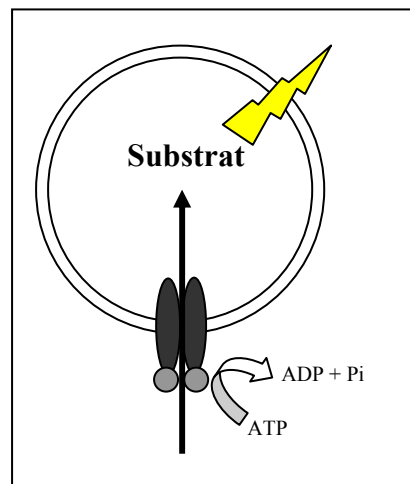


Figure 48: Vésicule membranaire inversée contenant le transporteur MRP1.

La technique de transport consiste à ajouter de l'ATP et un substrat radiomarqué tel que le [^3H] LTC₄, un dérivé tritié du leucotriène C₄. La capacité de transport de MRP1 est alors mesurée en comptant la quantité de radioactivité (par un compteur à scintillation) à l'intérieur des IMV, ce qui correspond directement à la quantité de substrat transporté dans un temps donné. Il est alors possible d'étudier l'effet de modulateurs sur le transport de MRP1 du [^3H] LTC₄.

2.3.5.1. Préparation des vésicules membranaires enrichies en MRP1

La préparation des IMV est effectuée en mettant en culture les cellules BHK-21-MRP1 dans 20 bouteilles roulantes (de surface 850 cm²). Les cellules sontensemencées à raison de 100 ml/bouteille de milieu complet en présence de 200 μM de methotrexate contenant l'équivalent en cellules d'une demi-boîte confluente de 15 cm de diamètre. Les bouteilles sont alors remplies de CO₂ afin de faire virer le rouge phénol présent dans le milieu à l'orange, indiquant un pH proche de la neutralité. Les bouteilles sont placées dans un système de tapis roulant afin de faire circuler le milieu sur toute la surface de la bouteille, dans un incubateur à 37 °C. Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, 2 mM de butyrate de sodium sont ajoutés. Environ 20 heures plus tard, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid, puis détachées du support par ajout de 5 mM EDTA. Les cellules sont collectées et centrifugées à 4000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot cellulaire, d'une masse de

6 à 7 g pour 20 bouteilles, peut être éventuellement congelé à -70°C . Les cellules sont ensuite resuspendues dans 200 ml de tampon I contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM saccharose, 1 mM MgCl_2 , et recentrifugées pendant 15 min à 4000 g à 4°C . Les cellules sont resuspendues dans 50 ml de tampon I contenant en plus 2 $\mu\text{g/ml}$ d'aprotinine (inhibiteur de protéases à sérine), 121 $\mu\text{g/ml}$ de benzamidine (inhibiteur des trypsines), 3.5 $\mu\text{g/ml}$ d'E64 (inhibiteur des protéases à cystéine), 1 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptine (inhibiteur des protéases à sérine et cystéine) et 50 $\mu\text{g/ml}$ de Pefabloc (inhibiteur des protéases à sérine). Les cellules sont équilibrées pendant 20 min à 4°C puis lysées à l'aide d'un Potter Helvejem. La lyse des cellules est contrôlée sous microscope par le test au bleu de trypan. Le lysat cellulaire est dilué par ajout de 200 ml de tampon II contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM saccharose, est centrifugé à 1000 g à 4°C pendant 15 min, afin d'éliminer les cellules non lysées ainsi que les débris, noyaux et autres compartiments cellulaires. Le surnageant est alors chargé sur une solution de saccharose 35% (10ml de tampon III : 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 35 % saccharose) et l'ensemble est centrifugé à 16.000 g pendant 30 min à 4°C . L'interface est collectée, diluée 5 fois dans le tampon IV contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM saccharose, et à nouveau centrifugé à 100.000 g pendant 45 min à 4°C .

Le culot membranaire est resuspendu dans 10 ml de tampon IV contenant 2 $\mu\text{g/ml}$ d'aprotinine, 121 $\mu\text{g/ml}$ de benzamidine, 3.5 $\mu\text{g/ml}$ d'E64, 1 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptine, et 50 $\mu\text{g/ml}$ de Pefabloc. Une sonication pendant quelques secondes permet d'homogénéiser les IMV et le passage à travers une aiguille de 27 Gauge permet d'éliminer les grosses vésicules. Les vésicules membranaires peuvent être conservées à -70°C pendant quelques mois.

2.3.5.2. Transport de [^3H] LTC₄ dans les vésicules membranaires inversées enrichies en MRP1

Le transport ATP-dépendant du [14,15,19,20- ^3H] Leucotriène C₄, ([^3H] LTC₄) (Amersham) dans les vésicules membranaires inversées enrichies en transporteur MRP1 a été réalisé par la technique de filtration rapide.

Ces expériences ont été effectuées sur 3 μg de protéines, contenues dans les IMV, dans un volume réactionnel de 30 μl contenant 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM saccharose, 10 mM MgCl_2 , 200 nM LTC₄ (17.54 nCi de [^3H] LTC₄) et 4 mM ATP. Après incubation à 37°C pendant 6 min, les échantillons sont dilués dans 1 ml de tampon de transport froid 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM saccharose, 10 mM MgCl_2) et filtrés à travers une membrane de nitrocellulose (seuil de coupure de 0.2 μm), préalablement équilibrée par 10 ml de tampon de transport froid 1X. La membrane est ensuite lavée avec 10 ml de tampon de transport 1X froid, séchée et placée dans un pot de scintillation contenant 10 ml de liquide de scintillation biodégradable (Amersham Pharmacia Biotech). La radioactivité [^3H] liée aux membranes de nitrocellulose est comptée dans un compteur de radioactivité (Beckman LS 6000SC).

La radioactivité des essais est corrigée de celle comptée dans un échantillon contrôle contenant 4 mM d'AMP au lieu de 4 mM d'ATP. Toutes les expériences de transport sont effectuées en triple, les résultats montrant la moyenne des valeurs.

Ces expériences ont été effectuées par le Dr. Xiu-Bao Chang, Mayo Clinic Scottsdale, S.C. Johnson Medical Research Center, Scottsdale, Arizona (USA).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etudes de la fonctionnalité des domaines cytoplasmiques de MRP1

1.1. Les domaines cytoplasmiques de MRP1 : une asymétrie fonctionnelle encore incomprise

Le transporteur MRP1 permet l'efflux de nombreux substrats au dépend de l'hydrolyse de l'ATP. MRP1 est composé de deux domaines transmembranaires et de deux domaines de fixation des nucléotides, les NBD. Une des spécificités des NBD de MRP1 est leur asymétrie fonctionnelle et structurale. Il apparaît que NBD1 a un rôle régulateur et NBD2 un rôle catalytique (Hou et al., 2000; Hou et al., 2002; Payen et al., 2003). Cependant, le rôle de l'asymétrie de ces deux domaines dans le transport des substrats n'est pas encore connu. Selon de nombreuses études, les changements conformationnels induits après la fixation de l'ATP sur les NBD, permettent la transition entre un site substrat de haute affinité vers un site de faible affinité (Conseil et al., 1998; Trompier et al., 2003), favorisant le transport hors de la cellule du substrat. Chaque NBD exerce alors un rôle sur le site substrat, mais la question est de savoir si ce rôle est direct ou indirect. Au laboratoire, des travaux précédents ont montré l'interaction de flavonoïdes avec les NBD isolés de la P-gp et MRP1 (Conseil et al., 1998; Trompier et al., 2003). Nous avons donc voulu étudier les propriétés de fixation des nucléotides et les changements conformationnels induits sur les NBD d'une part, et enfin s'il était possible que d'autres molécules telles que les substrats de MRP1 puissent se fixer sur les NBD.

1.2. Limite des domaines NBD1 et NBD2 pour la surproduction

Les limites du domaine NBD1 sont constituées du côté N-terminal par la G⁶³⁹ et du côté C-terminale par la N⁸⁸¹. La séquence contient les deux tryptophanes W¹⁰¹ ou de W³⁸. Il est constitué de 242 acides aminés avec une masse moléculaire de 29000 daltons.

Pour le domaine NBD2, l'extrémité N-terminale est constituée par la Q¹²⁸⁹ et l'extrémité C-terminale par la V¹⁵³¹ de MRP1. Il est constitué de 255 acides aminés avec une masse moléculaire de 28500 Daltons. La séquence contient le W¹²⁴.

1.3. Purification des domaines NBD1 et NBD2

La purification des domaines a été mise au point lors du travail de thèse du Dr Doriane Trompier (de Wet et al., 2001; Trompier et al., 2003), qui a alors effectué le clonage et mis au point la purification des domaines NBD1 et NBD2 recombinants.

La purification des domaines NBD1 et NBD2 a été effectuée de deux manières, d'une part en présence de détergent, de la même manière que ce qui a été effectué par le Dr Doriane Trompier, mais aussi d'autre part en absence de détergent, afin d'obtenir des domaines qui pourraient être utilisés pour des expériences de cristallisation.

- Purification du domaine NBD1 en présence de détergent :

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% des échantillons récupérés lors des différentes étapes de la production et de la purification de NBD1 en présence d'HECAMEG 0.01% est réalisée (Figure 49).

La coloration au bleu de Coomassie R250 du gel montre la présence d'une bande de masse attendue d'environ 30 kDa qui correspond à la protéine recombinante NBD1. Le degré de pureté est assez bon compte tenu des faibles traces de contaminants détectées en comparaison de l'importante quantité de protéines déposée. Le dosage des protéines par la méthode de Bradford, après réunion des fractions d'éluion, donne une concentration de 1.68 mg de protéines par millilitre d'éluion (57.9 μ M), avec une quantité totale importante, de 19.2 mg pour 1 litre de culture initiale.

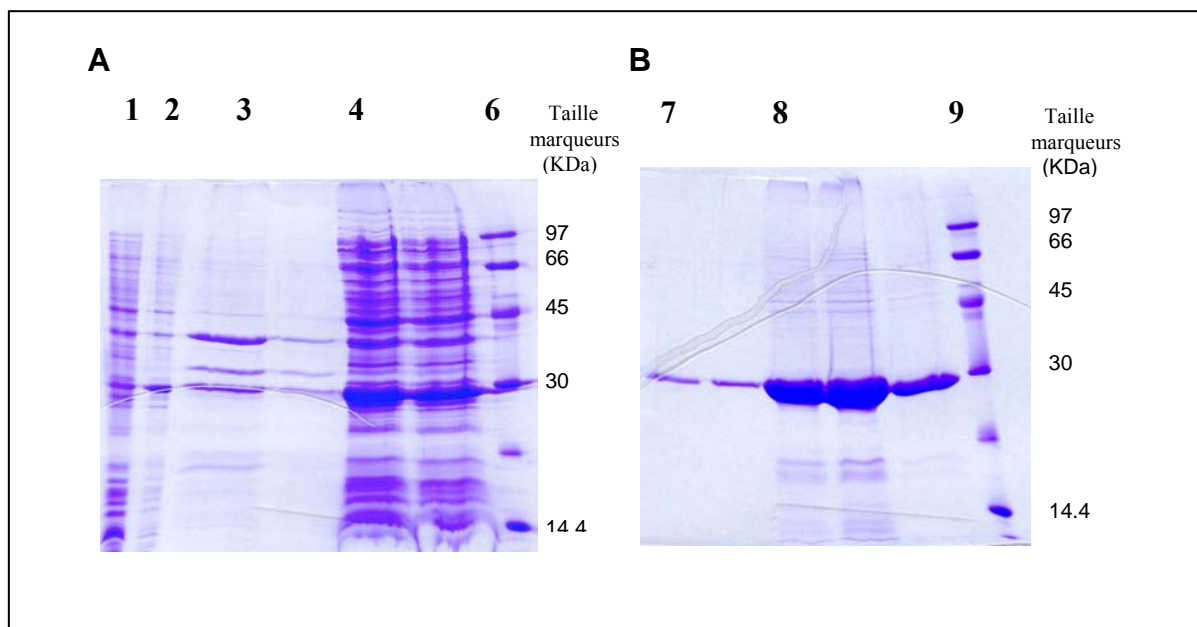


Figure 49: Production et purification de NBD1 en présence de détergent. Pistes 6 et 9 : marqueurs de masse moléculaire. Piste 1 : -IPTG, piste 2 : +IPTG, piste 3 : culot bactérien, piste 4 : surnageant après centrifugation, piste 7 : pré-éluion, piste 8 : éluion.

- *Purification du domaine NBD1 sans détergent:*

La purification du domaine en absence de détergent est réalisée dans le but de faciliter la cristallisation du domaine, la présence de détergent n'étant pas souhaitable pour l'obtention de cristaux. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% des échantillons récupérés lors des étapes de production et purification de NBD1 sans détergent, est présentée (Figure 50).

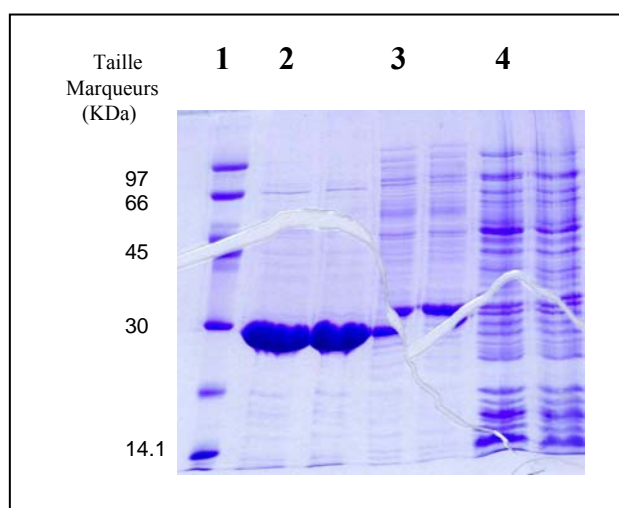


Figure 50: Production et purification de NBD1 sans détergent. Pistes 1 : marqueurs de masse moléculaires. Piste 2 : éluion, piste 3 : pré-éluion, piste 4 : fraction non retenue.

Etudes de la fonctionnalité des domaines cytoplasmiques de MRP1

La coloration au bleu de Coomassie R250 du gel montre la présence d'une bande de masse attendue d'environ 30 kDa qui correspond à la protéine recombinante NBD1.

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford, après réunion des fractions d'élution, donne une concentration de 2.03 mg de protéines par millilitre d'élution (69.8 μ M), avec une quantité totale encore plus élevée, de 45 mg pour deux litres de culture.

Une analyse par chromatographie d'exclusion (non montrée) a été effectuée sur les domaines afin de vérifier leur état d'oligomérisation. Les résultats obtenus montrent que les domaines sont majoritairement (>90 %) monomériques, permettant ainsi leur analyse fonctionnelle.

- Purification de NBD2 avec ou sans détergent :

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% des échantillons récupérés lors des différentes étapes de la production et de la purification de NBD2 en présence d'HECAMEG 0.01% ou en absence de détergent est réalisée (Figure 51).

La coloration au bleu de Coomassie R250 du gel montre la présence d'une bande de taille attendue d'environ 30 kDa qui correspond à la protéine recombinante NBD2. Cependant la quantité éluée est faible comparé aux quantités de NBD1 surproduits. Les volumes d'échantillon déposés étant les mêmes, le dépôt sur la piste 4, correspondant au culot bactérien, est très déformé du fait de la grande quantité de protéines présente. L'essentiel de NBD2 se retrouve donc sous forme de corps d'inclusion.

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford, dans l'élution, donne une concentration de 0.122 mg de protéines par millilitre d'élution (4.48 μ M), avec une quantité totale de 2.75 mg pour un litre de culture pour NBD2 purifié sans détergent ; et 0.3 mg de protéines par millilitre d'élution (10.5 μ M), avec une quantité totale de 3.5 mg pour un litre de culture pour NBD2 purifié avec détergent.

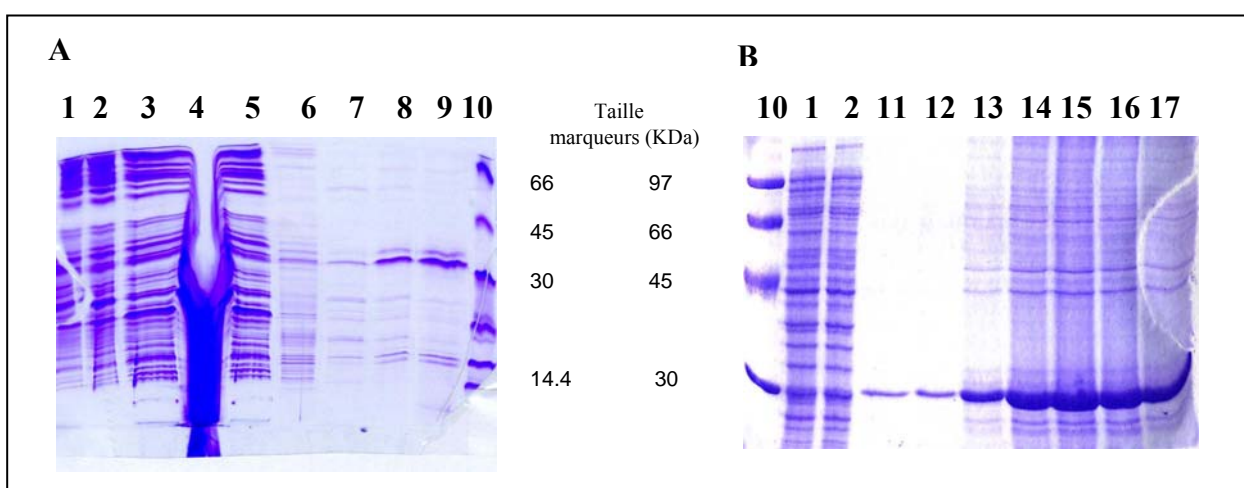


Figure 51: Production et purification de NBD2 sans détergent (A) et NBD2 avec détergent (B). Piste 10 : marqueurs de masse moléculaire. Piste 1 : -IPTG, piste 2 : +IPTG, piste 3 : surnageant après centrifugation, piste 4 : culot bactérien, piste 5 : fraction non retenue, piste 6 : pré-élution, pistes 7, 8 et 9 : fractions d'élution, pistes 11 à 17 : fractions d'élution.

1.4. Mesure des spectres d'émission de fluorescence des NBD

Les domaines de fixation des nucléotides NBD1 et NBD2 de MRP1 montrent, suite à l'excitation à 295 nm des résidus tryptophanes, des spectres d'émission de fluorescence caractéristiques avec un λ_{\max} à 334-335 nm avec détergent, et 340 nm sans détergent (Figure 52). Les tryptophanes des domaines sans détergent présentent un environnement beaucoup moins hydrophobe que les tryptophanes des domaines avec détergent, du fait d'un décalage vers une plus grande longueur d'onde d'émission, et avec une intensité de fluorescence plus forte. Ceci pourrait s'expliquer par l'effet du détergent sur l'environnement des tryptophanes, qui deviendraient plus hydrophobes, avec un rendement quantique apparent plus faible.

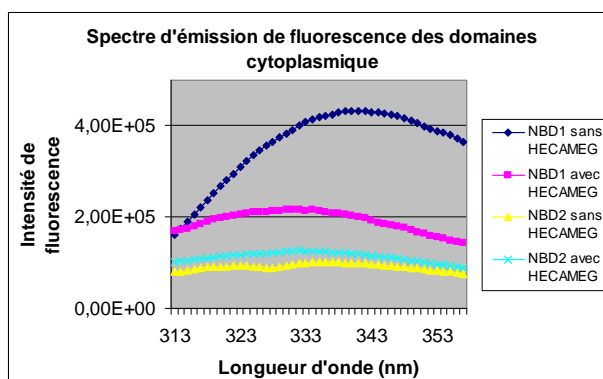


Figure 52: Spectres d'émission de fluorescence des domaines recombinants purifiés NBD1 et NBD2 de MRP1 humain avec ou sans HECAMEG, l'excitation étant effectuée à 295 nm.

1.5. Comportement asymétrique des NBD en présence des nucléotides : une caractéristique intrinsèque des domaines

Jusqu'à présent, la majorité des études fonctionnelles concernant les NBD se sont focalisées sur l'étude de ces domaines au sein du transporteur entier, et ont rendu compte d'une asymétrie fonctionnelle de ces domaines. Nous avons cherché par ce travail à mettre en évidence cette asymétrie d'un point de vue du domaine isolé, afin de savoir si ces caractéristiques fonctionnelles sont inhérentes au domaine lui-même, ou bien si ce comportement provient de contraintes au sein du transporteur entier.

Les deux domaines NBD1 et NBD2 contiennent respectivement deux Trp (W^{653} et W^{716}) et un Trp (W^{1400}), cependant aucun changement de leur fluorescence n'a été observé en présence des nucléotides.

Une étude de l'interaction de dérivés 8-azido de nucléotides avec les NBD isolés (Figure 53) a alors été effectuée. Les résultats montrent que le 8-azido[$\gamma^{32}P$]ATP photomarque efficacement NBD1 à un rendement de 1 mol/mol de NBD, avec un $K_{0.5} = 0.31$ mM ; alors que le 8-azido[$\gamma^{32}P$]ADP photomarque beaucoup moins efficacement, avec 0.26 mol/mol de NBD, indiquant une réactivité différente des dérivés des nucléotides vis-à-vis de NBD1. En ce qui concerne NBD2, les deux dérivés des nucléotides ne photomarquent que très faiblement ce domaine. Il est à noter que l'efficacité du photomarquage des dérivés azido des nucléotides dépend de la proximité d'un centre nucléophile, afin de générer un nitrène. Il apparaît qu'un tel groupement est présent dans NBD1 dans le cas du photomarquage de l'ATP, alors que ce ne serait pas le cas pour l'ADP. Dans le cas de NBD2, soit aucun groupement nucléophile n'est présent à proximité ou les nucléotides ne se fixent pas. Ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés pour le transporteur entier, où il a été montré un fort photomarquage de NBD1

avec le 8-azido[γ ³²P]ATP, mais pas de NBD2, et ces résultats ont été retrouvés sur les domaines produits de manière isolée. De plus, un fort photomarquage par le 8-azido-ADP + vanadate s'opère principalement sur le NBD2, mais seulement en présence d'ATP dans le milieu (Gao et al., 2000; Hou et al., 2000; Hou et al., 2002; Payen et al., 2005).

Ces expériences ont été effectuées par le Dr. David McIntosh, Département de Chemical Pathology, University of Cape Town Medical School, Cape Town (South Africa).

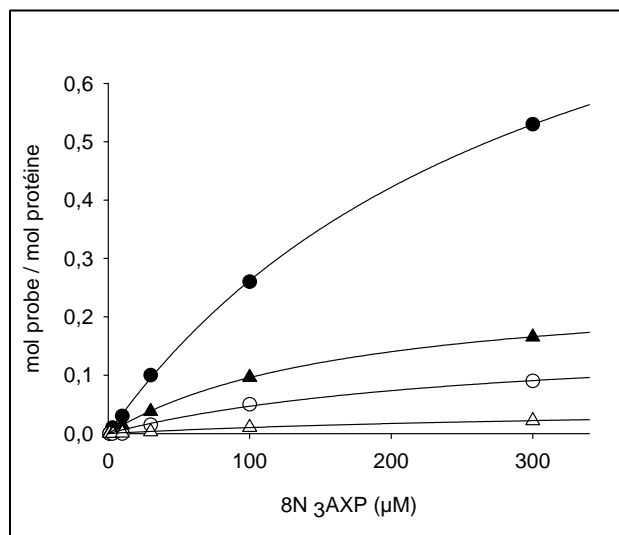


Figure 53: Photomarquage des NBDs par des dérivés des nucléotides: NBD1 (symboles fermés) et NBD2 (symboles ouverts) ont été photomarqués avec des concentrations croissantes en 8-azido-[α -³²P]ATP (cercles) ou 8-azido-[α -³²P]ADP (triangles) en présence de 5 mM MgCl₂.

Afin de suivre la fixation des nucléotides sur NBD1 et NBD2, et de mesurer les éventuels changements conformationnels induits, une étude sur l'accessibilité des Trp au NaI a été effectuée. Les résultats montrent que l'accessibilité des Trp au NaI est fortement modifiée en présence de 2 mM d'ATP ou d'ADP sur NBD1 (Figure 54), et seulement en présence d'ADP sur NBD2 (Figure 55). Néanmoins, les changements conformationnels induits sur NBD1 sont différents. En absence de nucléotides, l'accessibilité des Trp est homogène, en témoigne la droite sur la représentation de Stern-Volmer, avec un K_{sv} de $0,56 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$. En présence de 2 mM d'ADP, l'accessibilité est significativement augmentée ($K_{sv} = 1,32 \pm 0,04 \text{ M}^{-1}$). En présence de 2 mM d'ATP, la courbe de Stern-Volmer devient concave, indiquant deux populations de Trp qui sont alors différemment accessibles au NaI ($f_a = 0,5$, selon l'équation de Lehrer). Ainsi, la fixation des deux nucléotides engendre des changements conformationnels différents. En ce qui concerne NBD2, l'accessibilité en absence de nucléotides a un K_{sv} de $0,52 \pm 0,05 \text{ M}^{-1}$, passant à $0,86 \pm 0,03 \text{ M}^{-1}$ en présence de 2 mM d'ADP, alors que l'ATP n'engendre aucune modification.

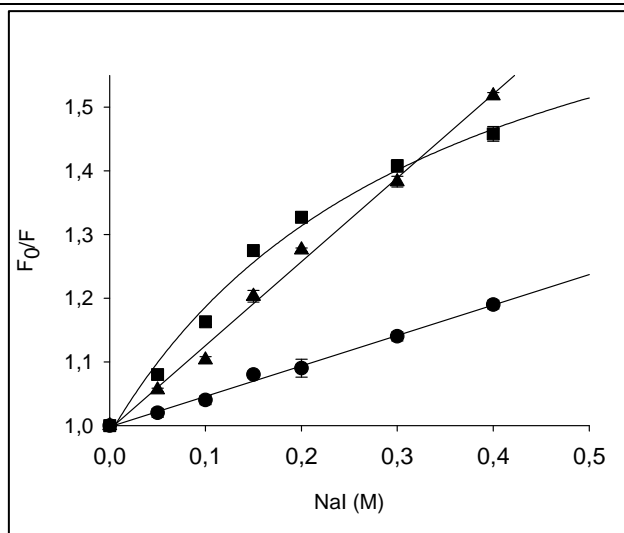


Figure 54: Mesure de l'accessibilité des Trp de NBD1 en fonction de concentrations croissantes en NaI, en absence (●), ou en présence de 2 mM d'ATP-Mg (■) ou ADP-Mg (▲). Les résultats sont analysés à l'aide de la représentation de Stern-Volmer.

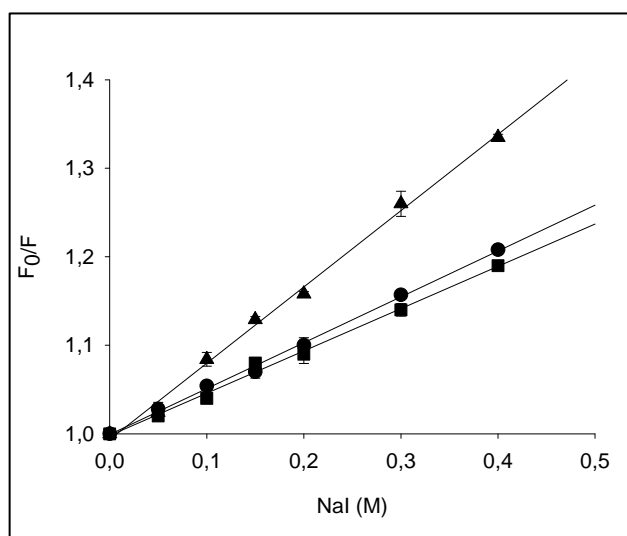


Figure 55: Mesure de l'accessibilité des Trp de NBD2 en fonction de concentrations croissantes en NaI, en absence (●), ou en présence de 2 mM d'ATP-Mg (■) ou ADP-Mg (▲). Les résultats sont analysés à l'aide de la représentation de Stern-Volmer.

1.6. Fixation des nucléotides sur les NBD préparés en absence de détergent

L'effet des nucléotides sur la fluorescence des domaines a été mesuré dans le tampon dans lequel les domaines ont été dialysés, sur une gamme croissante de 0 à 8 mM d'ATP ou d'ADP, en présence de 10 mM de MgCl₂. Sur le domaine NBD1 purifié en présence de d'HECAMEG 0.01%, aucune fixation de l'ATP-Mg ou de l'ADP-Mg n'est visualisable en

direct par atténuation de fluorescence. En revanche, sans détergent, la fixation de l'ATP-Mg et de l'ADP-Mg atténue directement la fluorescence des tryptophanes. L'analyse par le logiciel Grafit permet de déterminer le même K_D apparent pour l'ATP-Mg (0.52 ± 0.08 mM), et pour l'ADP-Mg (0.52 ± 0.03 mM). La fixation de ces nucléotides est dépendante du magnésium.

Sur le domaine NBD2 purifié en présence d'HECAMEG 0.01%, aucune fixation de l'ATP-Mg ou de l'ADP-Mg n'est visualisable en direct par atténuation de fluorescence, comme pour NBD1. Sur le domaine NBD2 purifié sans détergent, l'ADP-Mg, mais pas l'ATP-Mg, atténue la fluorescence des tryptophanes. Les spectres d'atténuation de fluorescence analysés par le logiciel Grafit, permettent de déterminer un K_D apparent pour l'ADP-Mg de 0.46 ± 0.39 mM (non montré ici). Malgré tout, la variation d'atténuation maximale de fluorescence observée est faible, de $11 \pm 2\%$. Nous ne pouvons donc pas, à ce stade, être totalement certain que l'ADP-Mg se fixe bien sur NBD2.

La présence d'HECAMEG semble donc empêcher l'atténuation des tryptophanes par les nucléotides. Il se peut ainsi que les domaines aient subi un changement de conformation, modifiant ainsi l'environnement des tryptophanes en fonction de la présence ou l'absence de détergent. D'autre part, la mise en évidence d'une différence de fixation des nucléotides entre les deux domaines, va dans le sens d'une divergence de fonction entre ces deux domaines.

1.7. Deux modulateurs de MRP1, le MK571 et le NMeOHl₂, interagissent avec les NBD

De récentes études au laboratoire ont montré l'interaction de flavonoïdes sur les NBD isolés de MRP1 et de la P-gp. Il est alors intéressant de savoir si d'autres composés modulant MRP1, tels que le MK571 et le dérivé du vérapamil NMeOHl₂, ont la capacité de se fixer aux NBD de MRP1.

Le MK571, un analogue structural du LTC₄, est inhibiteur spécifique de MRP1, se fixe aux deux NBD avec des affinités comparables ($K_d = 5.8 \pm 0.4$ μ M pour NBD1, $K_d = 8.2 \pm 0.7$ μ M pour NBD2) (Figure 56). De plus, l'incubation de NBD1 en présence MK571 rend inaccessibles les Trp au NaI (résultats non montrés), montrant que le MK571 se fixe à proximité des Trp du domaine, en entraînant probablement leur enfouissement au sein du domaine NBD1, les rendant ainsi inaccessibles au NaI.

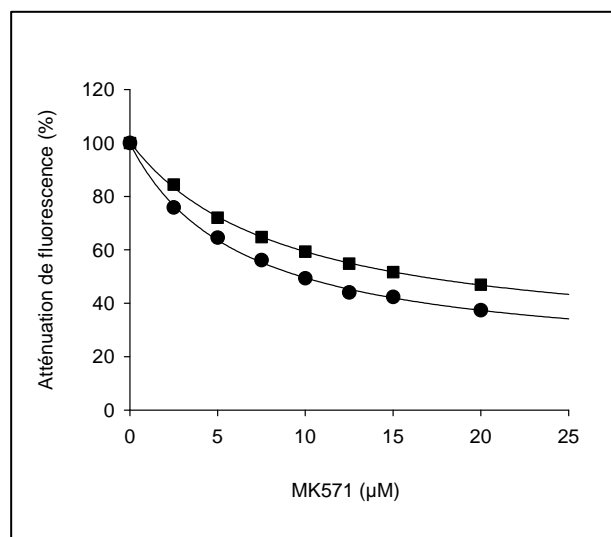


Figure 56 : Interaction du MK571 avec les NBDs. L'atténuation de fluorescence a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes en MK571 à NBD1 (●) et NBD2 (■).

Le vérapamil a été montré stimuler l'efflux du GSH hors de la cellule par MRP1 (Loe et al., 2000a), et induire la mort par apoptose des cellules surexprimant MRP1 (Trompier et al., 2004). Le NMeOHI₂, un dérivé diiodé du vérapamil, a été choisi dans cette étude, car c'est un composé beaucoup plus efficace que le vérapamil. D'autre part, le vérapamil étant lui-même fluorescent, son utilisation s'avère ici difficile. Si la fixation de ce dernier n'engendre pas d'atténuation de fluorescence des Trp, l'accessibilité des Trp de NBD1 (Figure 57) est modifiée en présence de NMeOHI₂, et les résultats donnent une courbe concave en utilisant la représentation de Stern-Volmer, montrant que les deux Trp sont affectés de manière différente ($f_a = 0.5$). Puisque la fixation de l'ATP donne des résultats similaires, NBD1 a été co-incubé en présence de 2 mM d'ATP et de 30 μ M de NMeOHI₂ (Figure 57). Les résultats montrent que les effets de l'ATP et du NMeOHI₂ sont additifs, indiquant que les deux composés peuvent se fixer en même temps et qu'ils ont ainsi deux sites de fixation distincts.

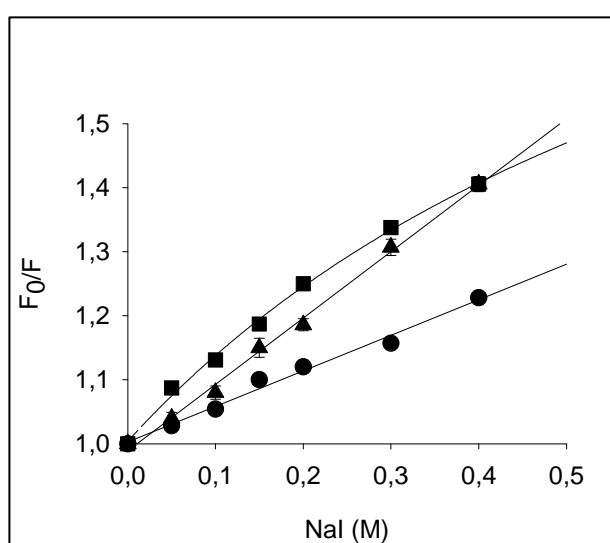


Figure 57: Effet de l'ATP-Mg et/ou du NMeOHI₂ sur l'accessibilité des Trp de NBD1 au NaI. Le domaine a été incubé en absence (●), ou en présence de 30 μ M NMeOHI₂ (■), ou 30 μ M NMeOHI₂ et 2 mM ATP-Mg (▲), et l'atténuation de fluorescence des Trp mesurée en ajoutant des concentrations croissantes en NaI. Les résultats sont analysés à l'aide de la représentation de Stern-Volmer.

L'interaction du NMeOHI₂ avec les NBD est également mise en évidence par prévention de la fixation du MK571 sur les domaines (Figure 58). Pour cela, les domaines ont été incubés en absence et en présence de différentes concentrations en NMeOHI₂, puis l'atténuation de fluorescence des Trp des NBD a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes en MK571. Il apparaît que le NMeOHI₂ prévient la fixation du MK571 sur les deux NBD, et ce à la manière d'une inhibition compétitive, avec un $K_i = 19.3 \pm 0.6 \mu$ M, et $K_i = 11.1 \pm 0.4 \mu$ M, pour NBD1 et NBD2 respectivement.

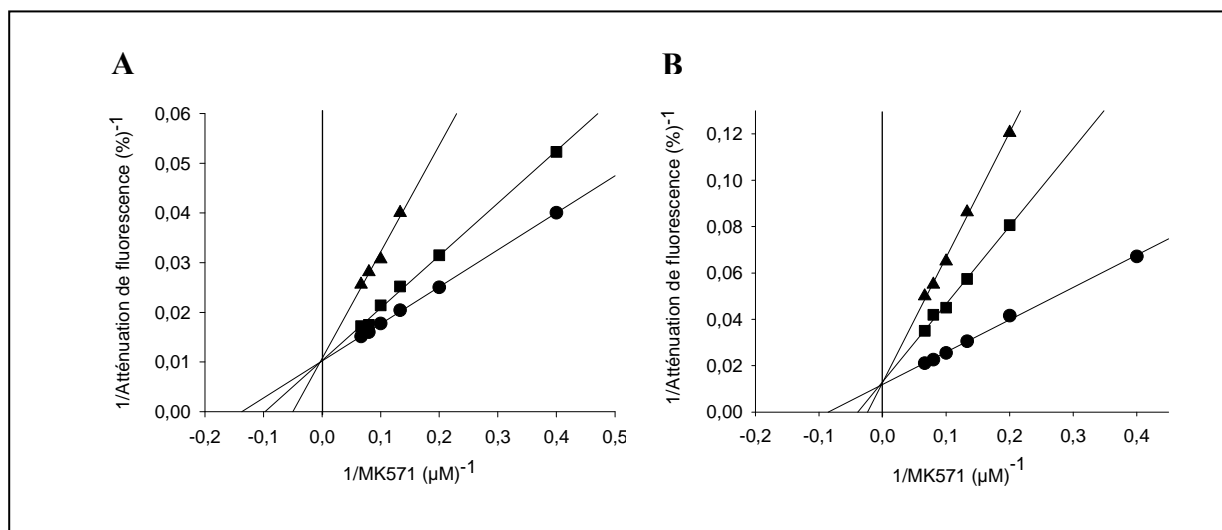


Figure 58: Prévention de la fixation du MK571 par le NMeOHI₂ sur NBD1 (A) et NBD2 (B), en absence (●), ou en présence de 10 (■) ou 30 μM (▲) de NMeOHI₂. L'atténuation de fluorescence est mesurée en ajoutant des concentrations croissantes de MK571. Les résultats sont présentés sous forme de représentation double inverse (Lineweaver-Burk).

1.8. Interaction différentielle des diverses classes de substrats de MRP1 entre les deux NBD

Le LTC₄ est un substrat physiologique préférentiel de MRP1. Il est transporté sans la nécessité d'un co-transport avec le GSH, puisqu'il est déjà couplé à une molécule de GSH. Le LTC₄ se fixe aux deux NBD, résultat obtenu par atténuation de fluorescence des Trp, avec une $K_d = 6.0 \pm 1.3 \mu\text{M}$ et $3.85 \pm 1.6 \mu\text{M}$, pour NBD1 et NBD2 respectivement (Figure 59). Ainsi, le LTC₄ a la capacité de se fixer sur les deux domaines NBD, mais ceci avec une affinité 10 fois inférieure au transporteur entier.

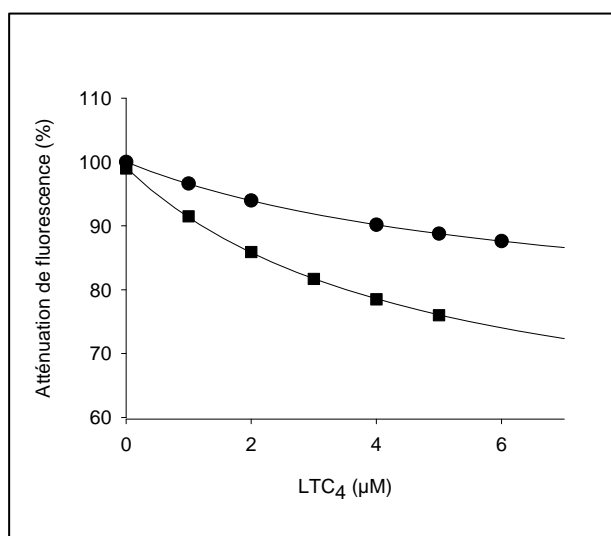


Figure 59 : Fixation du LTC₄ sur NBD1 (●) et NBD2 (■), en mesurant l'atténuation de fluorescence par ajout de concentrations croissantes en LTC₄.

Après ces résultats, la fixation d'autres substrats de MRP1 a été testée sur les NBD, tels que le GSH, la vincristine et la vinblastine (Figure 60). Ces composés, tout comme le NMeOH₂, n'engendrent pas d'atténuation de fluorescence des Trp. Des mesures d'accessibilité des Trp au NaI ont donc été effectuées en présence de ces différents substrats. Le GSH provoque de larges changements conformationnels sur les deux NBD. De manière intéressante, les drogues chimiothérapeutiques, telles que la vincristine et la vinblastine, modifient l'accessibilité au NaI de NBD1, mais pas de NBD2.

Les mesures de l'accessibilité des Trp ne peuvent en aucun cas prédire la non fixation d'une molécule, si celle-ci n'induit pas de modifications de cette accessibilité. Une molécule peut très bien se fixer sans induire des changements conformationnels. Cependant il est intéressant de voir qu'une même molécule induit des modifications différentes selon le NBD examiné. Les NBD sont deux domaines, dans le cas de MRP1, qui ont une grande similarité structurale, qui peuvent tous deux fixer les nucléotides, mais qui présentent des divergences d'un point de vue de la séquence. De plus, il a été montré que ces domaines étaient fonctionnellement différents. Ainsi, il se peut très bien que les drogues chimiothérapeutiques telles que la vincristine et la vinblastine se fixent sur les deux domaines, mais que la fonction et l'effet de cette fixation soient complètement différents selon le domaine étudié. Dans tous les cas, la vincristine et la vinblastine appartiennent à une même famille de molécules hydrophobes non constituée de GSH, et les résultats montrent qu'elles n'induisent des changements conformationnels que sur NBD1, donc qu'elles se fixent sur NBD1. Alors que le GSH, et le LTC₄ (couplé au GSH), montrent induire des changements conformationnels sur les deux NBD.

Un contrôle négatif a été effectué avec le docetaxel (Figure 60), un substrat spécifique de la P-gp (Szakacs et al., 2006). Ce composé ne modifie aucunement l'accessibilité des Trp des NBD de MRP1. Un autre contrôle négatif a été effectué afin de vérifier la spécificité de fixation des substrats, à l'aide de NBD2 isolé de la P-gp de souris (de Wet et al., 2001). Les résultats montrent que ni le LTC₄, le GSH ou le MK571 n'induisaient de changements conformationnels sur le NBD2, sachant que les deux NBD de la P-gp sont équivalents. La fonctionnalité de ce domaine a été vérifiée à travers la fixation d'un substrat de haute affinité du NBD2 de la P-gp, la 8-prényle-galangine ($K_d = 0.2 \pm 0.02 \mu\text{M}$), comme montré précédemment. Ce composé modifie l'accessibilité du seul Trp de ce domaine (W^{1106}) (Figure 60C), alors que ni le LTC₄, GSH ou MK571 ne le modifie.

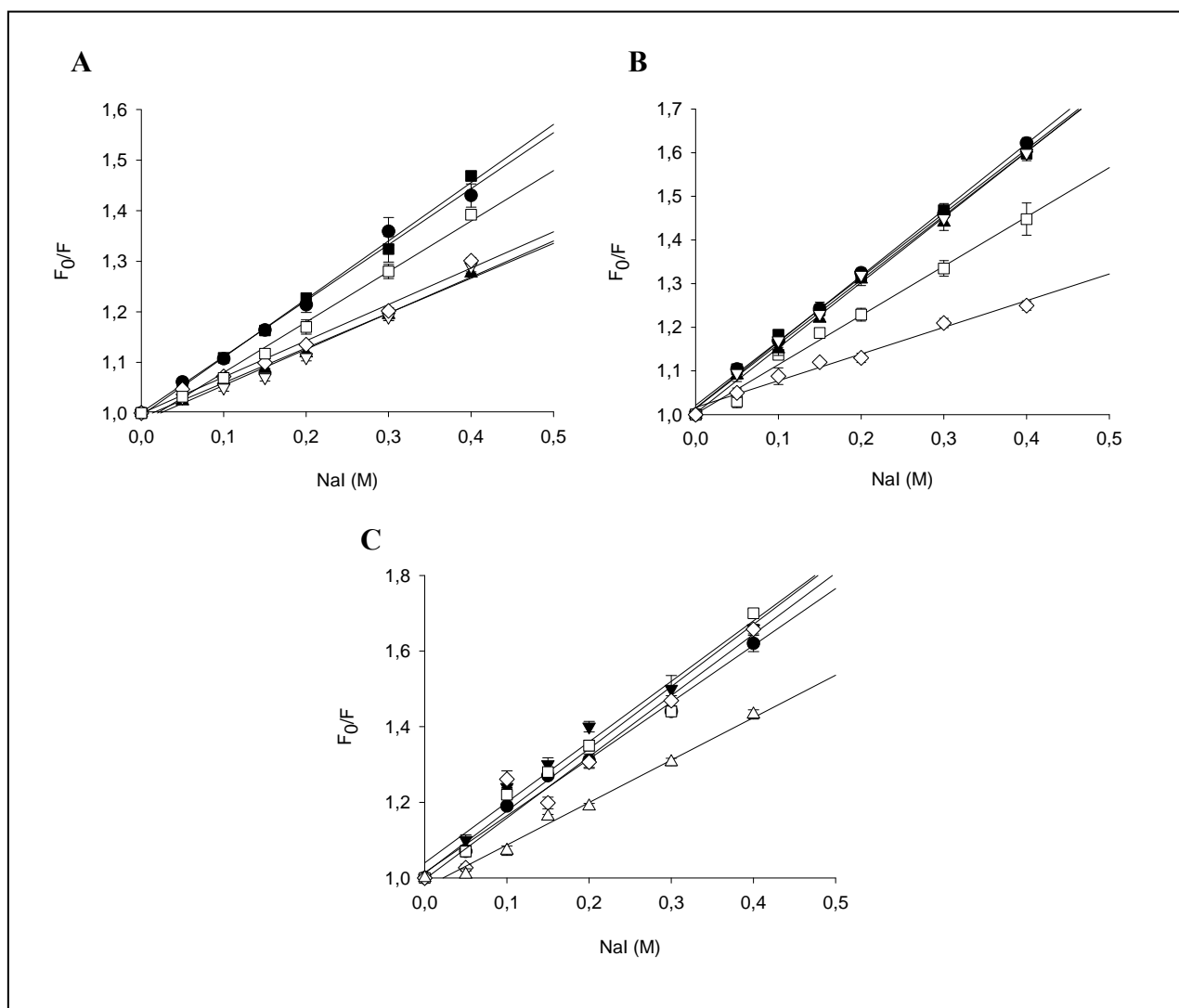


Figure 60 : Modification de l'accessibilité des Trp en présence des substrats de MRP1: le NBD1 (A) et le NBD2 (B) de MRP1 ont été incubés en absence (○) ou en présence de 30 μ M docetaxel (■), 30 μ M vincristine (▲), 30 μ M vinblastine (▼), 5 mM GSH (◇), ou 5 μ M LTC₄ (□), et le NBD2 (C) de la P-gp de souris a été incubé en absence (○) ou en présence de 5 mM GSH (◇), 5 μ M LTC₄ (□), 10 μ M MK571 (■) ou 0.4 μ M 8-prenyl-galangine (▲). L'atténuation de fluorescence a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes en NaI, et les résultats analysés à l'aide de la représentation de Stern-Volmer.

1.9. La vincristine et la vinblastine interagissent au même site que le MK571 sur les NBD

L'interaction des drogues chimiothérapeutiques avec les NBD de MRP1 a été caractérisée plus en détail, en étudiant la capacité de la vincristine et de la vinblastine à prévenir la fixation du MK571 (Figure 61). Les résultats montrent que les deux drogues chimiothérapeutiques préviennent la fixation du MK571 sur NBD1, avec des K_i de $34.5 \pm 0.1 \mu$ M et $25.9 \pm 2.5 \mu$ M, respectivement pour la vincristine et la vinblastine. Cette prévention s'effectue selon le modèle d'une inhibition de type compétitive, démontrant que le MK571 et les drogues chimiothérapeutiques se fixent au même site. De manière surprenante, la présence des deux drogues chimiothérapeutiques ne modifie pas la fixation du MK571 sur NBD2. On peut alors supposer que soit ces composés ne se fixent pas sur le NBD2, ou alors qu'ils se fixent en ne

modifiant pas l'affinité du MK571 pour NBD2. Les résultats confortent ceux obtenus avec l'accessibilité au NaI.

Ainsi, deux techniques différentes, la mesure de l'accessibilité des Trp au NaI, et la mesure de l'atténuation de la fluorescence, montrent que les substrats tels que le LTC₄ et le GSH se fixent sur les deux NBD, alors que les drogues cytotoxiques ne se fixent apparemment que sur NBD1.

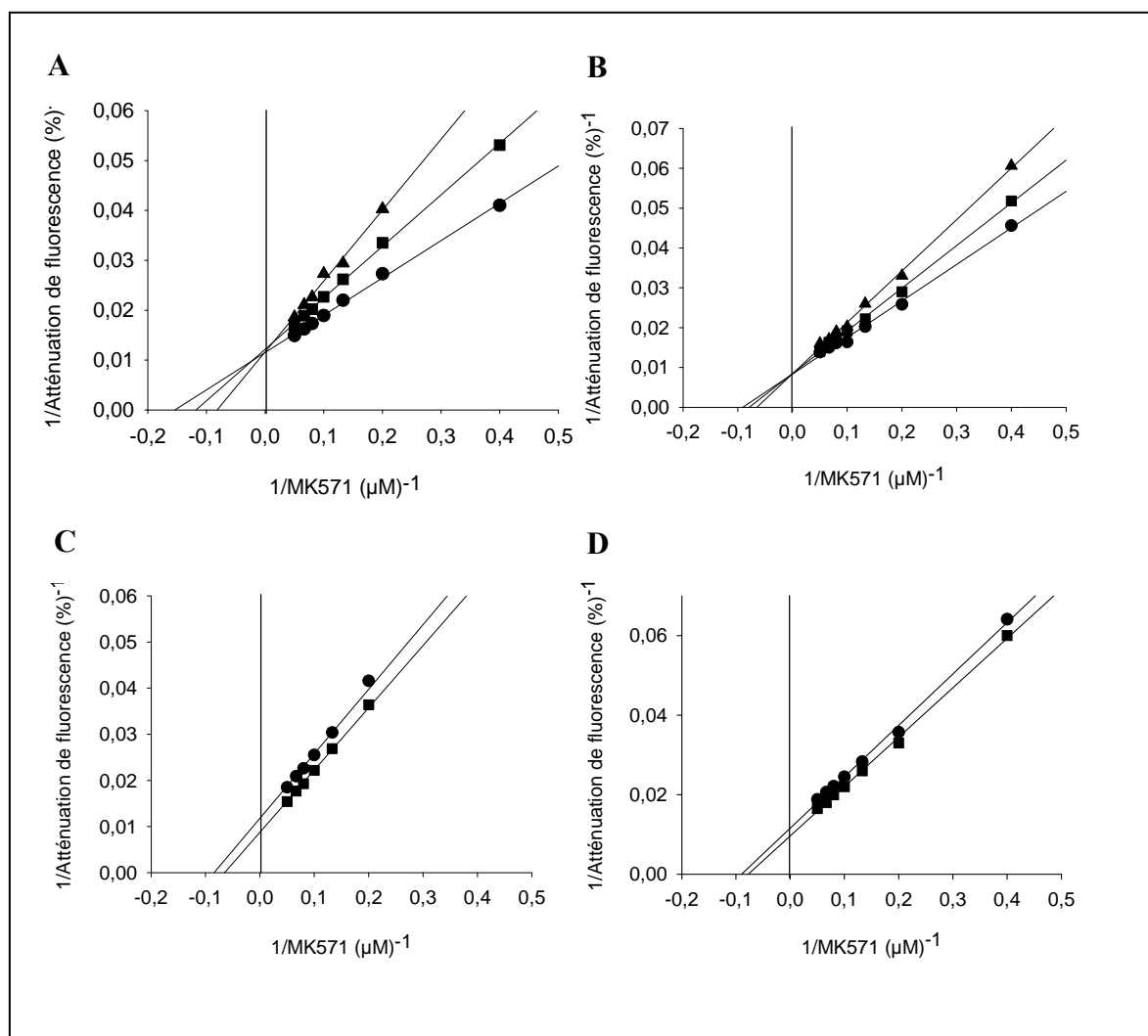


Figure 61 : Prévention de la fixation du MK571 sur NBD1 et NBD2 par la vincristine et la vinblastine. Prévention par la vincristine (panneau de gauche) ou la vinblastine (panneau de droite) de la fixation du MK571 sur NBD1 (A, B) ou NBD2 (C, D). Les NBD ont été incubés en absence (●) ou en présence de 20 (■) ou 30 μM (▲) de drogues cytotoxiques, et l'atténuation de fluorescence a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes de MK571. Les résultats sont présentés sous forme de représentation double inverse (Lineweaver-Burk).

1.10. Implication de ces résultats sur la fonctionnalité des NBD au sein de MRP1

Cette étude montre pour la première fois le comportement asymétrique des NBD isolés de MRP1 envers les nucléotides. Les deux NBD apparaissent intrinsèquement asymétrique en ce qui concerne la fixation des nucléotides, et ce en l'absence de l'interaction avec les TMD. De

plus, les deux NBD fixent spécifiquement des substrats tels que le LTC₄ et le GSH, alors que les drogues cytotoxiques telles que la vincristine et la vinblastine n'entraînent des modifications conformationnelles que sur NBD1. Les modulateurs, tels que le MK571 et le NMeOHI₂, interagissent de manière similaire avec les deux NBD. L'affinité des NBD pour le LTC₄ et le MK571 est environ dix fois plus faible que celle observée pour le transporteur entier, avec un K_m pour le LTC₄ de 0.366 μM (Mao et al., 2000), indiquant que les NBD, s'ils participent au site de fixation des substrats et modulateurs, ne représentent qu'une petite partie du site, le site principal se trouvant sur les TMD. La spécificité de ces résultats est appuyée par les contrôles négatifs effectués sur le NBD2 de la P-gp de souris, et le docetaxel, un composé non transporté par MRP1.

Ces observations vont dans le sens de la proximité entre les sites de fixation des nucléotides et des substrats, ce qui pourrait avoir des répercussions intéressantes quant au mécanisme de transport, et en particulier dans la manière dont les substrats sont transportés et dans la transduction du signal entre les NBD et les TMD.

De nombreuses études ont montré que les NBD de MRP1 étaient fonctionnellement asymétriques, NBD1 fixant l'ATP lui conférant un rôle régulateur, et NBD2 ayant une activité hydrolytique permettant de fournir l'énergie nécessaire au transport du substrat. L'étude de l'activité hydrolytique des NBD isolés n'a jamais permis de mettre en évidence cette différence, du fait d'une activité très faible (Kern et al., 2000; Trompier et al., 2003; Ramaen et al., 2005). Les résultats présentés ici montrent le comportement asymétrique des NBD vis-à-vis des nucléotides, démontrant ainsi que cette différence réside dans la structure primaire des NBD, c'est-à-dire dans leur séquence. La fixation de l'ATP sur NBD1 provoque un changement conformationnel important, qui pourrait être à l'origine de l'amorçage de la fixation de l'ATP sur NBD2, comme évoqué dans le modèle « ATP switch » (Higgins and Linton, 2004). De plus, la fixation de l'ADP sur NBD1 engendre un changement conformationnel différent de celui de l'ATP, ce qui met en évidence le rôle important de l'ATP sur NBD1, qui pourrait initier le cycle du transport. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hou et al (Hou et al., 2002), dont les travaux sur le transporteur entier montrent que la fixation de l'ATP sur NBD1, et non son hydrolyse, est responsable de larges changements conformationnels dans MRP1. Par ailleurs, la fixation de l'ATP sur NBD2 semble ne produire aucun changement, alors que l'ADP induit des changements non négligeables. Ces résultats sont à mettre en rapport avec le rôle de l'ADP dérivant de l'hydrolyse de l'ATP sur NBD2, permettant de produire des changements conformationnels importants dans le transporteur, permettant ainsi le retour vers son état initial, étape clé du cycle du transport (Manciu et al., 2000; Manciu et al., 2001; Manciu et al., 2003; Zhao and Chang, 2004; Binyamin et al., 2005; Yang et al., 2005). Ces résultats, dans leur ensemble, corroborent ainsi correctement ce qui a été trouvé sur le transporteur entier. En conclusion, les NBD comportent l'information nécessaire à l'asymétrie de ces domaines, ne nécessitant aucunement la présence des TMD, et ces résultats mettent en valeur la fonction de chaque NBD dans les différentes étapes du cycle de transport de MRP1.

La fixation des substrats et modulateurs de MRP1 sur les NBD signifie que les NBD pourraient participer directement à la reconnaissance des substrats. Ils formeraient ainsi une partie du site de fixation des substrats à la face cytoplasmique du transporteur. La structure des transporteurs qui ont été cristallisés montre que les NBD sont en contact avec les TMD sur une large interface, et dans le modèle de Cole et Deeley (Deeley and Cole, 2006), le site substrat se trouve à proximité des NBD. De plus, la mutation d'acides aminés considérés à l'interface cytoplasmique des TMD, et ainsi à proximité des NBD, influence la spécificité des substrats et la fixation de l'ATP sur NBD1, et il en est de même pour quelques mutations sur

les NBD (Beudet and Gros, 1995; Beudet et al., 1998; Zhang et al., 2004). Par ailleurs, le comportement asymétrique des NBD envers les drogues cytotoxiques suggère une orientation des sites de fixation des substrats dans l'espace, et les NBD ne pourraient participer de la même manière à ces sites. Ces résultats sont en accord avec les différents travaux réalisés sur le positionnement des sites substrats sur MRP1, où le site de fixation du GSH et du LTC₄ engloberait les régions comprenant le CL3, TMD2, TMD3 (Qian et al., 2001b; Karwatsky et al., 2005) et une partie des deux NBD, alors que le site de fixation des substrats tels que les drogues cytotoxiques, ne comprenant pas de GSH, se situe au niveau du TMD3 (Stride et al., 1999; Zhang et al., 2001a; Zhang et al., 2001b) et du NBD1 (Figure 62). Tous ces résultats indiqueraient une interaction spatiale entre différentes parties du transporteur, qui ne sont pas proches dans la séquence. Cependant, les sites de fixation des modulateurs et substrats sur les NBD se représenteraient que des sites secondaires, qui seraient nécessaires à un moment pour la transduction du signal vers les NBD, et ainsi enclencher le cycle de transport par la fixation des nucléotides. Des expériences de photomarquage avec du [³H]LTC₄ sur les NBD n'ont pas donné de résultats, pouvant s'expliquer par le fait que le photomarquage nécessite un positionnement particulier des substrats en direction de fonctions chimiques spécifiques, nécessaire à la réaction. De plus, les nombreuses expériences de photomarquage sur le transporteur entier n'ont jamais décrit les NBD comme étant des sites de fixation potentiels de substrats. Il faut néanmoins interpréter les résultats d'expériences de photomarquage avec mesure, car d'une part l'affinité des substrats pour les NBD est beaucoup moins élevée que sur le transporteur entier, et que d'autre part le photomarquage dépend d'une orientation spéciale du substrat dans l'espace, ce qui ne permet pas d'accéder de manière efficace au véritable site de fixation.

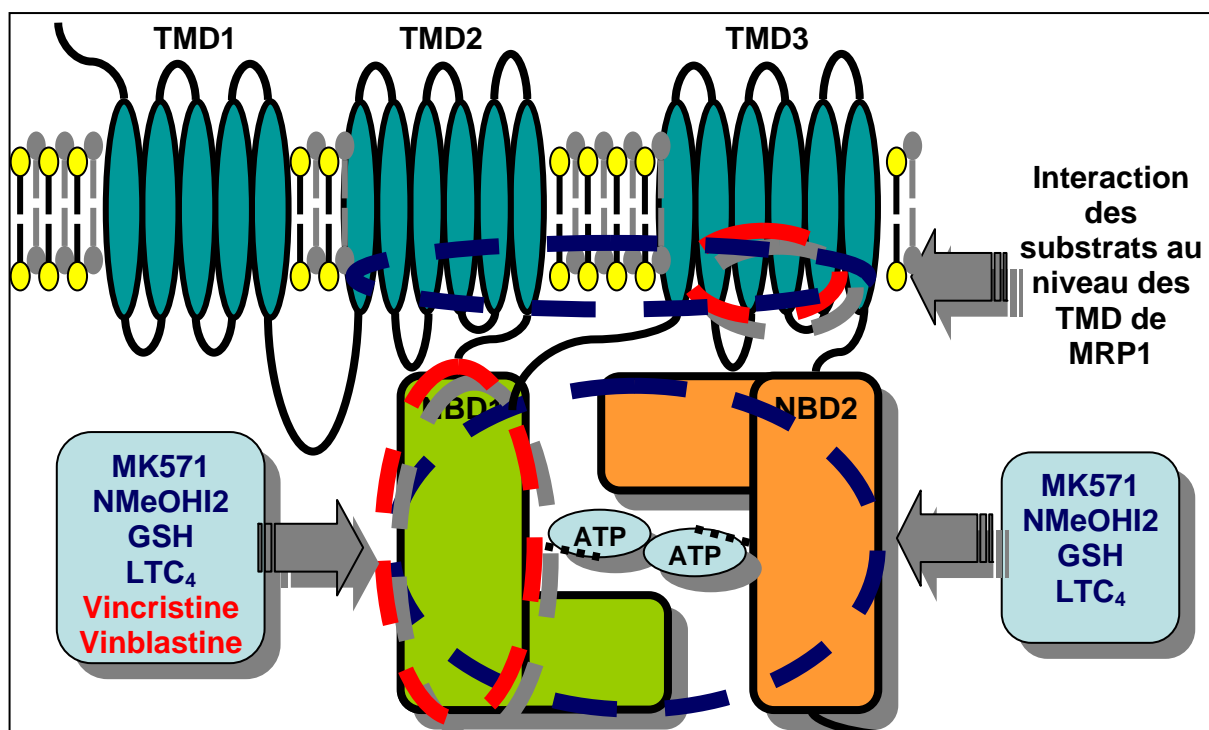


Figure 62 : Interaction différentielle des substrats et modulateurs au niveau des NBD de MRP1. Mise en relation de cette différence avec l'asymétrie de fixation de ces composés avec les TMD de MRP1

2. Activité différentielle des énantiomères du vérapamil sur MRP1

2.1. Pourquoi étudier les énantiomères du vérapamil ?

En chimie, les énantiomères (provenant du grec « ἐνάντιος », opposé, et « μέρος », partie) sont des stéréo-isomères qui ne sont pas superposables, et qui sont l'image l'un de l'autre dans un miroir, de la même manière que les deux mains sont identiques mais opposées.

Les énantiomères ont dans l'environnement, des propriétés chimiques et physiques identiques, à l'exception de leur pouvoir rotatoire sur la lumière polarisée qui se fait dans deux directions opposées. Un mélange égal des deux énantiomères est appelé mélange racémique, et a un pouvoir rotatoire net qui est nul.

L'utilisation et la séparation des énantiomères dans la vie quotidienne sont des faits très importants, et chaque année, les USA dépensent plus de 60 milliards de dollars dans cette activité. Du fait de cette asymétrie au niveau moléculaire, les formes R et S d'une molécule, d'un médicament par exemple, peuvent avoir des effets physiologiques différents voire antagonistes. Les relations entre les activités biologiques de chaque stéréo-isomère pur et celles de leurs mélanges sont souvent très complexes et leur analyse nécessite des études approfondies et détaillées. Cependant, il arrive que deux énantiomères aient des activités similaires. Ainsi, l'analyse et la séparation des énantiomères sont capitales pour l'avancée des recherches dans la plupart des domaines scientifiques. Les exemples de quelques médicaments peuvent mettre en lumière l'importance des énantiomères en thérapie. Le thalidomide est un exemple de médicament racémique, dont l'un des énantiomères est efficace contre les nausées, alors que l'autre énantiomère a un effet tératogène chez la femme enceinte. Dans le cas du zopiclone (Sanofi-Aventis), un hypnotique utilisé dans les cas d'insomnie, un seul des deux énantiomères est actif, ainsi la FDA a permis la séparation des énantiomères et le dépôt d'un brevet sur l'utilisation de l'énantiomère actif sous un autre nom. Enfin, dans d'autres cas, tels que l'ibuprofène, il n'est pas économiquement faisable de séparer les énantiomères, et c'est sous forme racémique que le médicament est commercialisé, en doublant alors la dose recommandée.

Il nous est alors apparu intéressant de savoir si les énantiomères du vérapamil pouvaient avoir une activité différente sur le fonctionnement de MRP1. Il a été montré précédemment que le vérapamil a la capacité de stimuler le transport de GSH par MRP1, conduisant à une déplétion forte du contenu intracellulaire en GSH, pouvant mener dans certains types cellulaires à l'apoptose (Trompier et al., 2004; Laberge et al., 2007). Il est aussi connu que le vérapamil est un inhibiteur de référence de la glycoprotéine-P (Tsuruo et al., 1981). Cependant des études ont montré que les deux énantiomères sont tous deux des inhibiteurs de la glycoprotéine-P, et qu'il n'y a pas de différence entre les deux isomères (Kwon et al., 1996). Par ailleurs, l'activité du vérapamil étant tellement différente de celle trouvée sur la glycoprotéine-P, et les substrats des deux transporteurs étant assez divergents, il nous est apparu pertinent d'étudier la différence potentielle d'activité des énantiomères du vérapamil sur MRP1.

2.2. Toxicité cellulaire des énantiomères du vérapamil

Le vérapamil a la capacité d'induire la mort cellulaire par apoptose en stimulant le transport de GSH par MRP1 (Trompier et al., 2004). Cependant, aucune étude n'a déterminé le rôle de chaque énantiomère dans ce mécanisme. Il a donc été intéressant, tout d'abord, de

contrôler la toxicité cellulaire, par test MTT, de chaque énantiomère afin de déterminer le rôle de chaque isomère dans ce mécanisme.

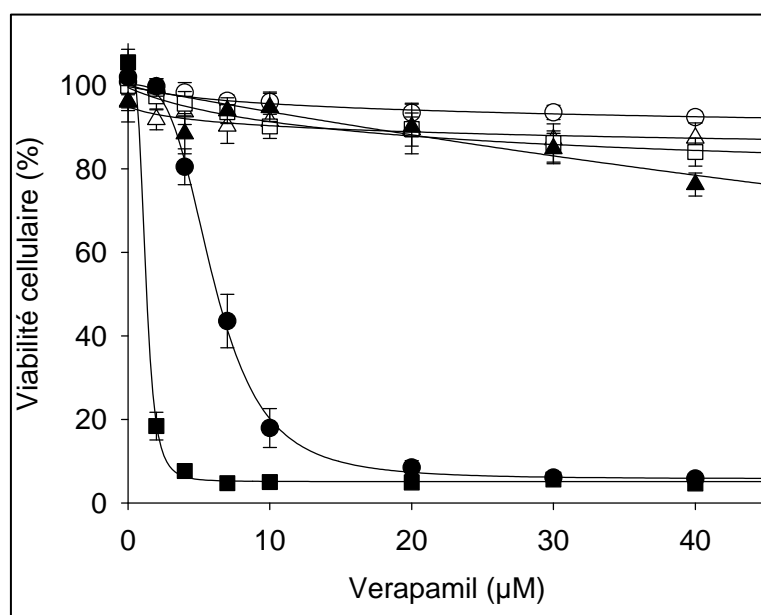


Figure 63 : Toxicité cellulaire induite par le vérapamil et ses énantiomères. Les cellules BHK-21 (symboles ouverts) et les cellules BHK-21 transfectées par *mrp1* (symboles fermés) ont été cultivées pendant 72 h, en présence de concentrations croissantes de mélange racémique (○, ●), R-verapamil (Δ, ▲), ou S-verapamil (□, ■).

De manière surprenante, les résultats montrent que seul l'énantiomère S du vérapamil a la capacité d'induire la mort cellulaire. Le mélange racémique a une IC_{50} de, alors que l'énantiomère a une IC_{50} de. Par ailleurs, les deux isomères ont une très faible toxicité sur les cellules non transfectées. Le mélange racémique du vérapamil est ainsi composé de deux entités chirales n'ayant pas les mêmes propriétés biologiques en ce qui concerne le transporteur MRP1. Il est donc intéressant de comprendre dans quelle mesure ils n'ont pas les mêmes propriétés, et quel serait l'intérêt de cette découverte.

2.3.Effet sélectif des énantiomères du vérapamil sur le contenu intracellulaire en GSH

Une des caractéristiques du vérapamil sur MRP1 est son effet stimulant du transport du GSH. L'efflux massif du GSH hors de la cellule induit un stress oxydatif au niveau de la cellule, qui se traduit par une activation de la voie des caspases, conduisant alors au processus apoptotique. Ainsi, la mesure de l'efflux du GSH dans les cellules transfectées par *mrp1* peut-être reliée à la mort cellulaire dans le type cellulaire étudié dans ce cas précis. Ainsi, à la suite des résultats précédents, nous avons voulu tester l'effet de chaque isomère à induire l'efflux du GSH par MRP1, en mesurant la cinétique d'efflux du GSH intracellulaire en présence du mélange racémique et des deux énantiomères (Figure 63).

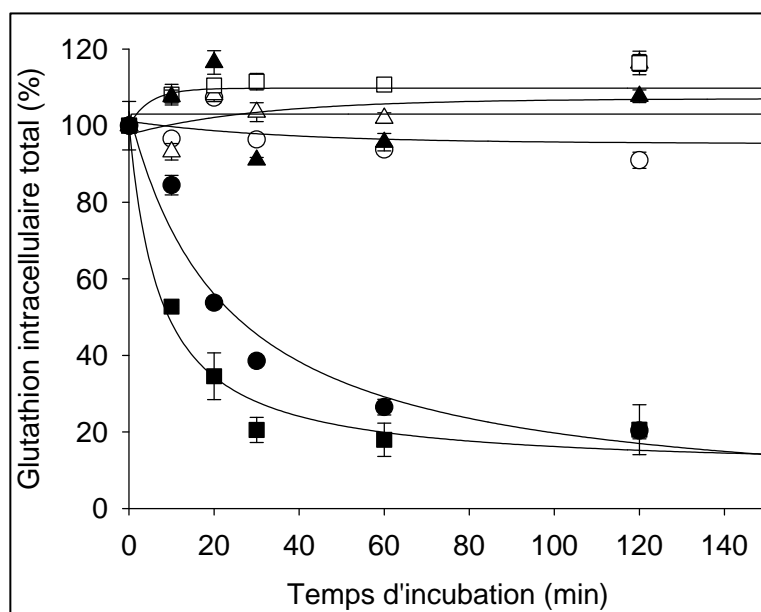


Figure 64 : Effet du vérapamil et de ses énantiomères sur le contenu intracellulaire total en GSH. Les cellules BHK-21 (symboles ouverts) et les cellules BHK-21 transfectées par *mrp1* (symboles fermés) ont été cultivées en présence de 10 μM de mélange racémique (○, ●), 5 μM de R-verapamil (Δ, ▲), ou 5 μM de S-verapamil (□, ■).

Les résultats montrent que seul l'énantiomère S, parmi les deux isomères, est capable d'induire l'efflux du GSH, et ce uniquement dans les cellules transfectées par *mrp1*. Et ces résultats confirment les résultats précédents de toxicité cellulaire. Ainsi, dans le mélange racémique, seul l'isomère S du vérapamil peut stimuler le transport de GSH par MRP1. Cependant, le mélange racémique du vérapamil est un mélange égal des deux énantiomères. On devrait alors s'attendre à ce que l'effet de l'énantiomère S à 5 μM soit le même que celui du mélange racémique à 10 μM . Or, l'isomère S a une activité plus importante que le mélange racémique. Il est alors possible d'émettre une hypothèse selon laquelle l'isomère R aurait une influence sur l'activité de l'isomère S dans le mélange racémique. L'isomère R ne serait pas neutre et pourrait aussi avoir une action sur le transporteur MRP1.

Nous avons testé l'effet de concentrations croissantes d'énantiomères R sur la stimulation du transport de GSH induite par l'énantiomère S, afin de déterminer le rôle de l'énantiomère R (Figure 64).

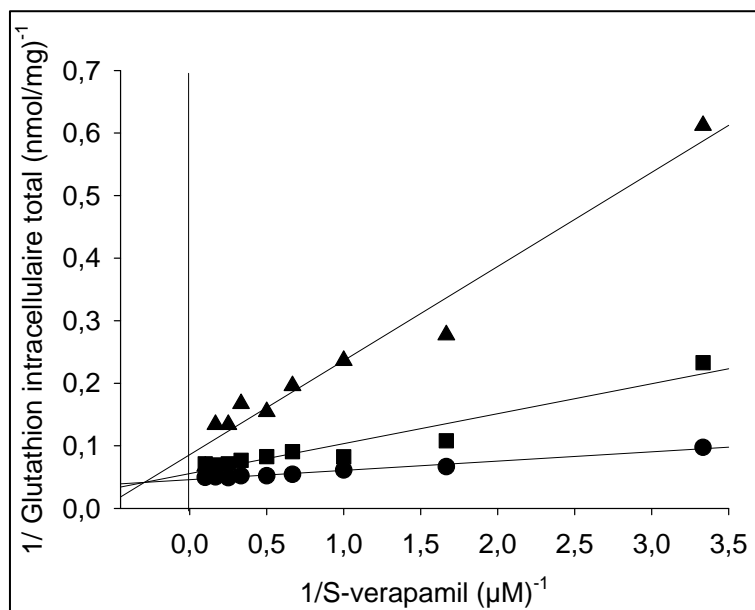


Figure 65 : Effet du R-vérapamil sur le transport du GSH par MRP1 stimulé par le S-vérapamil. Le contenu total en GSH des cellules transfectées par le gène *mrp1* a été mesuré en présence de concentration croissante de S-vérapamil, sans (●), et avec 2 μM de R-verapamil (■) ou 4 μM de R-verapamil (▲), après incubation à 37°C pendant 30 min. Les résultats sont représentés à l'aide de la représentation de Lineweaver-Burk.

Les résultats montrent que, de la même manière que ce qui a été monté précédemment, le vérapamil S stimule fortement l'efflux du GSH hors de la cellule. Or, l'ajout de concentration croissante en vérapamil R diminue significativement l'efflux en GSH. Cela montre l'antagonisme du vérapamil R sur l'activité de transport de MRP1. La représentation de Lineweaver-Burk montre qu'il s'agirait d'une inhibition de type mixte, où le R vérapamil inhiberait l'effet du S-vérapamil, mais probablement à distance, après fixation à un autre site. Cependant, cette dernière donnée demande à être confirmée en étudiant le transporteur à l'état purifié.

Le vérapamil racémique serait ainsi composé de deux isomères ayant des fonctions bien distincts sur le transporteur. Il s'agit alors de comprendre l'activité du R-vérapamil sur MRP1, à savoir si celui-ci n'a qu'une activité sur la stimulation par le S-vérapamil, ou si celui-ci possède d'autres propriétés sur le transporteur.

2.4. Inhibition du transport de calcéine par MRP1 par les énantiomères du vérapamil

La mesure du transport de la calcéine par MRP1 est une technique permettant de déterminer si une molécule a le pouvoir d'inhiber cette activité. Nous avons testé l'influence des deux énantiomères, en comparaison de celle du MK571, sur le transport de calcéine par MRP1 (Figure 65).

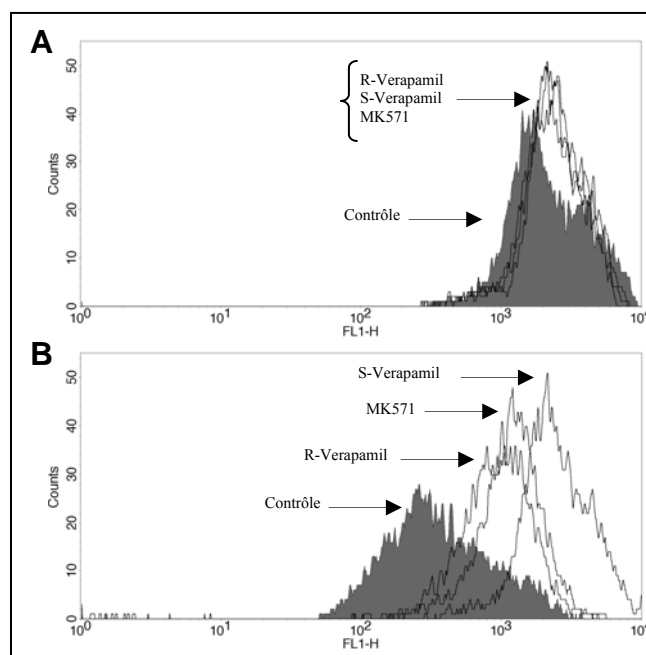


Figure 66 : Inhibition du transport de la calcéine par le S- et R-vérapamil, (A) sur les cellules BHK-21 et (B) sur les cellules BHK-21 transfectées par *mrp1*. Les cellules ont été traitées par 30 μ M de S-, R-vérapamil ou MK571, puis la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux.

Les cytogrammes montrent que dans le cas des cellules BHK-21, il y a une forte accumulation de calcéine dans les cellules, non dépendante des différents modulateurs. Dans le cas des cellules BHK-21 transfectées par *mrp1*, en absence de modulateur il y a une diminution de la fluorescence cellulaire correspondant au transport de la calcéine par MRP1. Cependant, en présence des modulateurs, il y a décalage des pics vers de plus fortes intensités de fluorescence, indiquant une augmentation de l'accumulation de calcéine, et donc une inhibition de son transport. L'énantiomère S a un plus fort potentiel que le MK571. L'inhibition par le S-vérapamil n'est probablement pas dû à une activité inhibitrice du composé, mais puisqu'il stimule le transport du GSH, le transport de calcéine pourrait s'en trouver empêché. Par ailleurs, de manière surprenante, le R-vérapamil a la capacité d'inhiber le transport de la calcéine, avec cependant une moins forte propension que le MK571 ou le S-vérapamil. Ainsi, le R-vérapamil a la capacité d'agir comme un inhibiteur.

2.5. Inhibition du transport de LTC₄ par MRP1 par les énantiomères du vérapamil

Le LTC₄ est le substrat physiologique préférentiel de MRP1 qui ne nécessite pas de GSH pour être transporté, car il contient déjà un GSH dans sa structure. Il a été montré précédemment que le vérapamil inhibait le transport du LTC₄ uniquement en présence de GSH. Nous avons ainsi voulu étudier la capacité des énantiomères à inhiber, de manière isolée, le transport du LTC₄ en présence ou en absence de GSH.

La mesure du transport du LTC₄ est effectuée à l'aide de vésicules membranaires inversées préparées à l'aide des cellules BHK-21-MRP1, surexprimant le transporteur MRP1.

La méthode de préparation des membranes fait appel à l'utilisation d'un Potter Elvehjem, qui permet de rompre la membrane cellulaire en libérant les différents organites. Il est alors possible de séparer les membranes plasmiques des membranes intracellulaires.

A la fin de la préparation, et après dosage des protéines, la concentration obtenue est d'environ 0.25 mg/ml. La qualité des membranes est alors analysée par électrophorèse SDS-PAGE et immunomarquage (Figure 66).

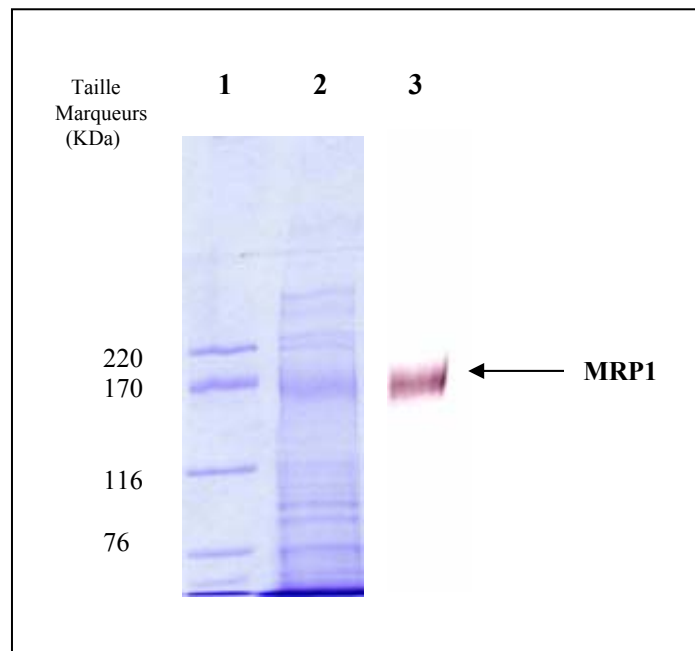


Figure 67: Préparation de vésicules membranaires inversées. La piste 2 contient 5 µg de protéines vésiculaires issues de la préparation traitée au Potter, séparées par électrophorèse SDS-PAGE 6% et colorées au bleu de Coomassie. La piste 3 contient la même quantité de vésicules, révélées par immunomarquage par l'anticorps MRPm6. Piste 1 : marqueurs de masse moléculaire.

L'analyse par électrophorèse et immunomarquage montre une quantité relativement importante en protéine MRP1 dans les vésicules membranaires inversées. Les membranes peuvent donc être utilisées pour étudier le transport du LTC₄, les résultats sont présentés Figure 67.

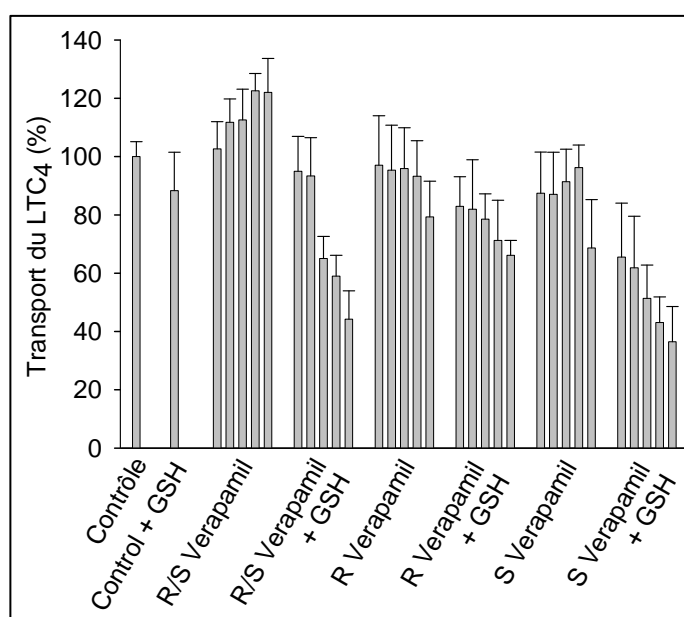


Figure 68 : Effet des énantiomères du vérapamil sur le transport de [³H] LTC₄ par MRP1. Le transport a été effectué en utilisant des IMV contenant le transporteur MRP1. Les membranes ont été incubées avec des concentrations croissantes de S- et R-vérapamil (0, 1, 4, 16, 64, 256 μM), en présence ou en absence de 3 mM GSH.

Tout d'abord, Les résultats montrent que le mélange racémique n'inhibe le transport du LTC₄ qu'en présence du GSH, et ce de manière concentration dépendante, comme attendu. Chaque énantiomère, en absence de GSH, n'entraîne qu'une inhibition faible du transport du LTC₄. En ajoutant 3 mM de GSH, alors que le R-vérapamil n'inhibe toujours que faiblement le transport du LTC₄, le S-vérapamil inhibe plus fortement le transport que le mélange racémique. Ils confirment également ceux trouvés pour le transport de la calcéine, mais avec un substrat différent. Ces données confirment aussi l'effet antagoniste du R-vérapamil sur le S-vérapamil dans le mélange racémique, puisque le S-vérapamil seul a une plus forte activité que le mélange racémique.

Ces expériences ont été effectuées par le Dr. Xiu-Bao Chang, Mayo Clinic Scottsdale, S.C. Johnson Medical Research Center, Scottsdale, Arizona (USA).

2.6. Réversion du phénotype MDR par le R-vérapamil

Les résultats précédents montrent que le R-vérapamil a la capacité d'inhiber le transport de substrats par MRP1 et n'a pratiquement pas d'activité toxique envers les cellules BHK-21 dans les mêmes conditions. Nous avons voulu vérifier ce fait en testant la capacité du R-vérapamil à réverser le phénotype de résistance en présence de vincristine, un substrat connu de MRP1. Les deux types cellulaires BHK-21 et BHK-21-MRP1 ont été cultivés en présence de concentrations croissantes en vincristine, avec 0, 5 ou 15 μM de R-vérapamil, puis soumises à un test MTT (Figure 68).

Activité différentielle des énantiomères du vérapamil sur MRP1

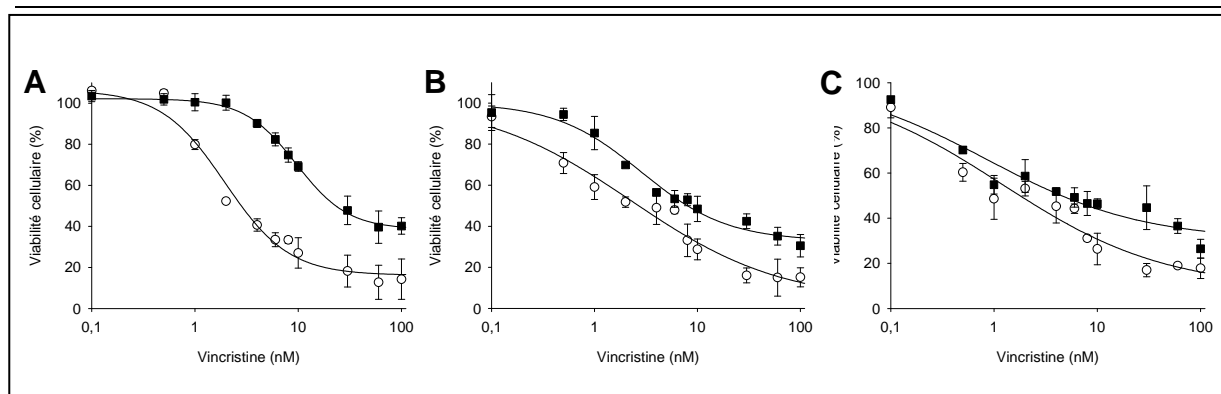


Figure 69 : Réversion du phénotype MDR par le R-vérapamil sur les cellules BHK-21 (○) et les cellules BHK-21-MRP1 (■). Les cellules ont été cultivées pendant 72 h, en présence de concentrations croissantes en vincristine, en absence (A), ou en présence de 5 µM (B) ou 15 µM (C) de R-vérapamil. La survie cellulaire est mise en évidence par le test MTT.

Les résultats montrent que le R-vérapamil est capable de réverser la chimiorésistance à la vincristine des cellules surexprimant MRP1. L'énantiomère R agit donc comme un inhibiteur du transport de vincristine par MRP1. Les données montrent qu'à 15 µM, il y a presque réversion totale du phénotype MDR, le vérapamil R est ainsi un inhibiteur assez puissant (Tableau 7). Il est à noter en ce qui concerne la toxicité des cellules BHK-21 que la vincristine et le R-vérapamil ont une certaine toxicité, mais qui est sans rapport à l'effet du R-vérapamil et de la vincristine sur les cellules BHK-21-MRP1.

Tableau 7: Effet du R-vérapamil sur la résistance des cellules BHK-21 et BHK-21-MRP1 à la vincristine

R-Verapamil (µM)	IC ₅₀ (nM) de la vincristine		
	0	5	15
BHK-21	1,51 ± 0,4	1,48 ± 0,27	1,06 ± 0,38
BHK-21-MRP1	9,42 ± 0,23	2,87 ± 0,42	1,02 ± 0,18

2.7. Implication moléculaire des deux énantiomères sur MRP1 purifié

Les expériences précédentes ont montré la fonction cellulaire des deux énantiomères du vérapamil. Le S-vérapamil est responsable de la stimulation de l'efflux du GSH par MRP1, conduisant à la mort des cellules surexprimant MRP1. Au contraire, le R-vérapamil ne provoque pas de stimulation de l'efflux de GSH, mais il est capable d'antagoniser l'effet du S-vérapamil. Il se comporte d'autre part comme un inhibiteur de MRP1 en inhibant le transport de substrats comme la calcéïne ou le LTC₄. Il est donc intéressant de comprendre comment se comportent, au niveau moléculaire, les énantiomères sur le transporteur purifié. Ces expériences peuvent apporter des données intéressantes sur l'affinité des énantiomères pour le transporteur, mais aussi des informations quant aux implications mécanistiques sur le transporteur.

2.7.1. Purification de MRP1

Pour effectuer ces expériences, le transporteur a été extrait à partir de membranes de cellules surexprimant MRP1. La protéine a été ensuite purifiée à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur résine de Nickel-agarose, puisque la protéine est couplée à un Tag 10-histidines à son extrémité C-terminale.

Activité différentielle des énantiomères du vérapamil sur MRP1

Le protocole utilisé a été adapté à partir du protocole de purification de Chang X.B (Chang et al., 1997), et le choix du détergent de solubilisation s'est porté sur le CHAPS, un détergent zwitterionique qui combine les propriétés des sels biliaires et des N-alkyl sulfobétaïnes, et qui permet la solubilisation des protéines membranaires sous forme native et évitant une interaction entre les protéines.

De plus, certaines expériences ont été menées en présence de lipides afin de mimer l'environnement membranaire du transporteur. Le choix s'est porté sur l'asolectine, car MRP1 a déjà été purifiée et reconstituée à l'aide de l'asolectine. L'asolectine est un mélange proportionnel de lécithine, céphaline et phosphatidylinositol, avec un faible taux de phospholipides et de lipides polaires. Environ 24% des acides gras sont saturés, 14% mono-insaturés et 62% poly-insaturés. Le mélange de lipides a alors été rajouté aux protéines après dialyse, à une concentration de 0.2%.

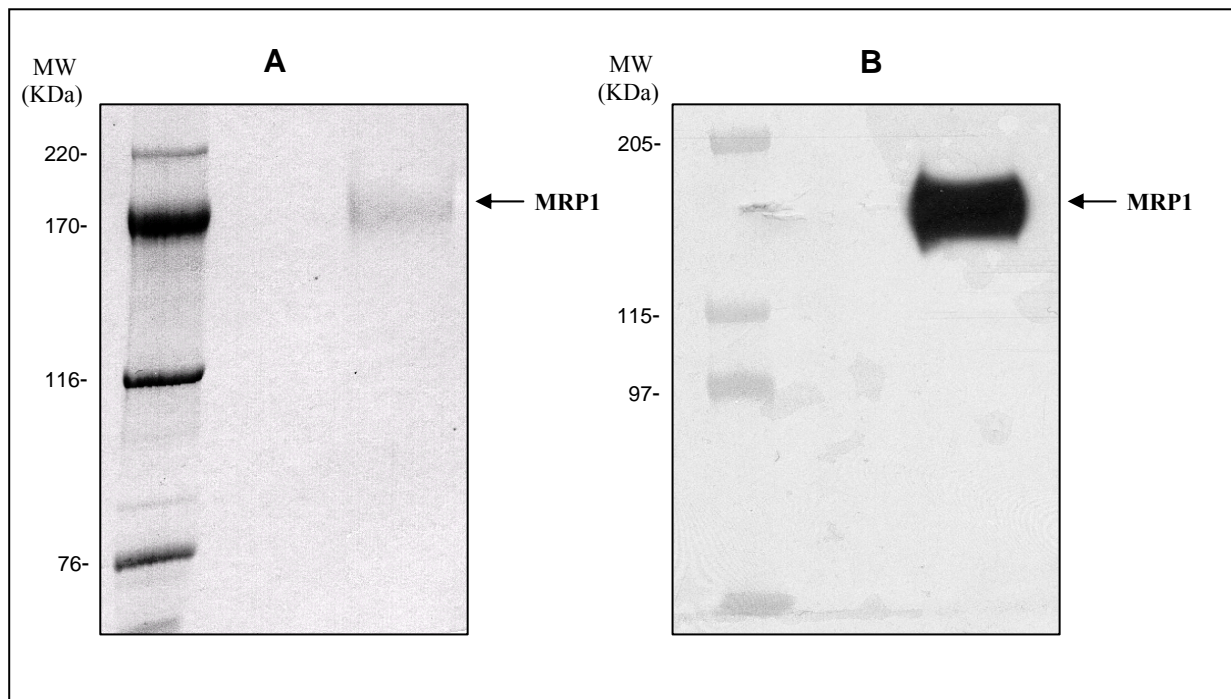


Figure 70 : Analyse de MRP1 purifiée (1.5 µg de protéines) sur SDS-PAGE 6% par coloration au bleu de Coomassie (A) et Western Blot en utilisant l'anticorps primaire MRPm6, un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et un système de révélation au luminol (B).

Le rendement de la purification est très faible. En effet, à partir de 20 boîtes de cultures de 15 cm de diamètre, ayant une confluence de 80% et après traitement avec 5 mM de sodium butyrate, le protocole permet de purifier au maximum 210 µg de protéines à une concentration de 0.07 µg/µl. Par ailleurs, une des étapes limitantes est le fractionnement des cellules au Potter Helvejem. Le rendement d'obtention des membranes après passage au Potter Helvejem est un indice important du rendement final de la purification de la protéine. Des tests de lyse des cellules par sonication ont été effectués sans grand succès, car il est très difficile d'obtenir une grande quantité de membranes après sonication.

Dans tous les cas, la protéine est assez pure lorsque celle-ci est contrôlée sur SDS-PAGE 6%, et elle ne présente pas de signe de protéolyse lorsqu'elle est identifiée par Western Blot (Figure 69). De plus, après dialyse, la protéine n'a pas tendance à précipiter.

2.7.2. Effet des énantiomères du vérapamil sur l'accessibilité des Trp au NaI

Les deux énantiomères induisent des effets très différents sur l'activité du transporteur MRP1. La fixation des énantiomères sur MRP1 doit conduire à des modifications conformationnelles différentes, pouvant induire un mécanisme d'inhibition pour le R-vérapamil, et de stimulation du transport du GSH par le S-vérapamil.

Ces modifications conformationnelles peuvent être visualisées en mesurant la modification de l'accessibilité des tryptophanes au NaI. Lors de la fixation des énantiomères sur MRP1, si ceux-ci induisent des changements conformationnels différents, l'environnement et le positionnement des tryptophanes peuvent être modifiés, et il en sera de même de leur accessibilité au solvant, donc au NaI.

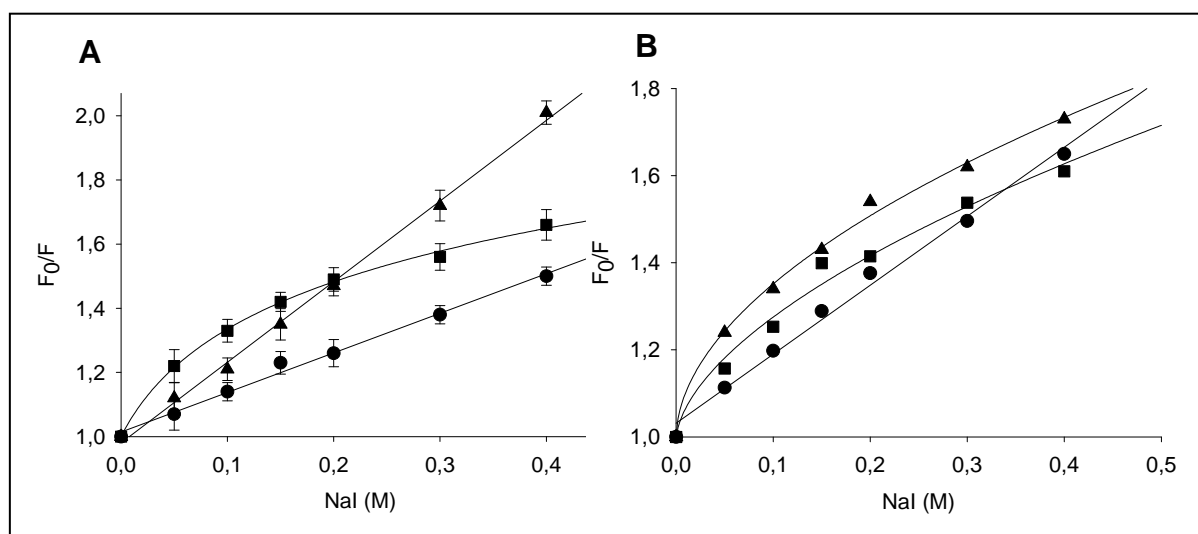


Figure 71 : Effet des énantiomères sur l'accessibilité des tryptophanes au NaI. La fluorescence des tryptophanes a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes en NaI, en absence (●), ou en présence de 0.5 μM de S-vérapamil (■) ou 0.5 μM de R-vérapamil (▲). (A) en absence de lipides, (B) en présence de 0.2% d'asolectine. Les données ont été analysées par la représentation de Stern-Volmer.

Dans le cas de la protéine préparée en absence d'asolectine (Figure 70A), les tryptophanes de MRP1 apparaissent être accessibles au NaI de manière équivalente, car la représentation de Stern-Volmer donne une droite, avec un K_{SV} de $1.23 \pm 0.15 \text{ M}^{-1}$. En présence de 0.5 μM de R-vérapamil, il y a augmentation de l'accessibilité des tryptophanes, mais ceux-ci sont toujours homogène, avec un K_{SV} de $2.51 \pm 0.17 \text{ M}^{-1}$. En revanche, en présence de 0.5 μM de S-vérapamil, la courbe prend une concavité vers le bas indiquant que l'accessibilité des tryptophanes n'est plus homogène, et il est alors possible de calculer une fraction d'accessibilité, f_a , qui a une valeur dans ce cas de 0.45. Ainsi, la moitié des tryptophanes ont une accessibilité au NaI qui a été modifiée.

Ces résultats montrent que la fixation des énantiomères induit deux changements conformationnels très différents, qui peuvent alors expliquer les effets différents des énantiomères sur l'activité des MRP1.

Les mêmes expériences ont été menées sur la protéine préparée avec 0.2% d'asolectine (Figure 70B). Les résultats montrent que la protéine seule a un K_{SV} de $1.46 \pm 0.23 \text{ M}^{-1}$.

Cependant, en présence des deux énantiomères, les courbes prennent toutes deux une concavité vers le bas, avec des f_a de 0.42 et 0.48, pour le S- et R-vérapamil, respectivement. La différence réside dans une augmentation plus ou moins grande de l'accessibilité entre les deux énantiomères. Ces résultats sont à pondérer par la présence des lipides autour du transporteur. L'accessibilité est mesurée avec du NaI, un composé hydrophile qui ne peut pénétrer au cœur de la molécule. Ainsi, l'hydrophobicité des lipides peut empêcher la diffusion du NaI dans le transporteur, et grandement modifier les résultats, en comparaison avec la protéine sans lipides. Cependant, même si les résultats sont moins significatifs, les énantiomères induisent des changements conformationnels non négligeables, et dans une certaine mesure, différents l'un de l'autre. Il faudrait peut-être alors essayer de refaire ces mesures en présence d'acrylamide, un agent pénétrant hydrophobe.

2.7.3. Fixation des énantiomères du vérapamil sur MRP1, et effet du GSH

Dans les expériences expliquant l'activité des énantiomères au niveau cellulaire, ceux-ci ont montré avoir une action sur le transporteur MRP1. Les deux énantiomères doivent ainsi pouvoir se fixer au transporteur. Il s'agit alors de déterminer leurs constantes de fixation, de connaître le positionnement de leurs sites de fixation, et quelle relation leurs sites ont avec le site de fixation du GSH.

La mesure de l'atténuation de la fluorescence des tryptophanes par les énantiomères R- et S- se fixent sur MRP1 est présentée Figure 71.

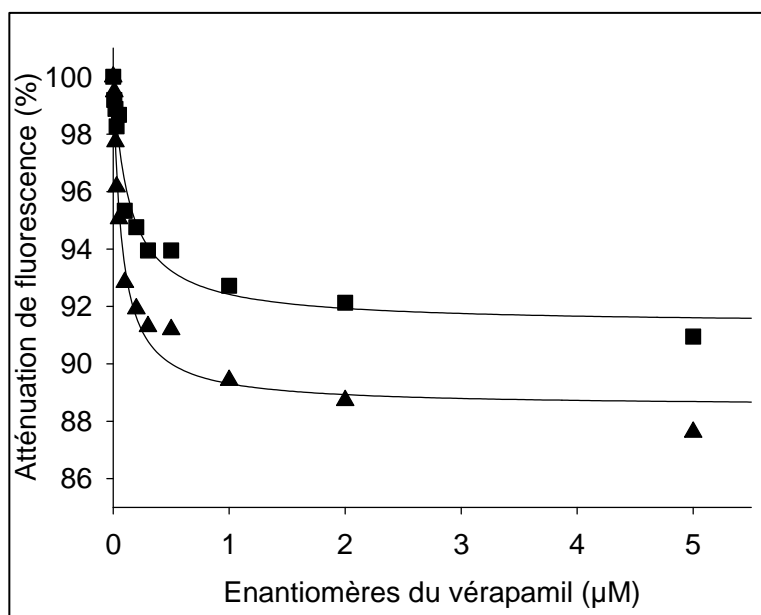


Figure 72 : Fixation des deux énantiomères sur MRP1 sans asolectine. L'atténuation de fluorescence est mesurée en ajoutant des concentrations croissantes de R-vérapamil (▲) et de S-vérapamil (■)

Les deux énantiomères, le R-vérapamil et le S-vérapamil, se fixent avec une très forte affinité pour MRP1, avec des K_d respectifs de 47.7 ± 4 nM et 92.5 ± 5 nM. Ce qui traduit une

forte affinité des énantiomères pour MRP1, le R-vérapamil étant deux fois plus affiné que le S-vérapamil.

L'étude de la relation entre les deux sites de fixation des deux énantiomères du vérapamil a été effectuée par une expérience de prévention de la fixation du S-vérapamil par différentes concentrations en R-vérapamil. La méthode consiste à suivre la fixation du S-vérapamil par atténuation de la fluorescence, en pré-incubant les protéines avec différentes concentrations en R-vérapamil (Figure 72).

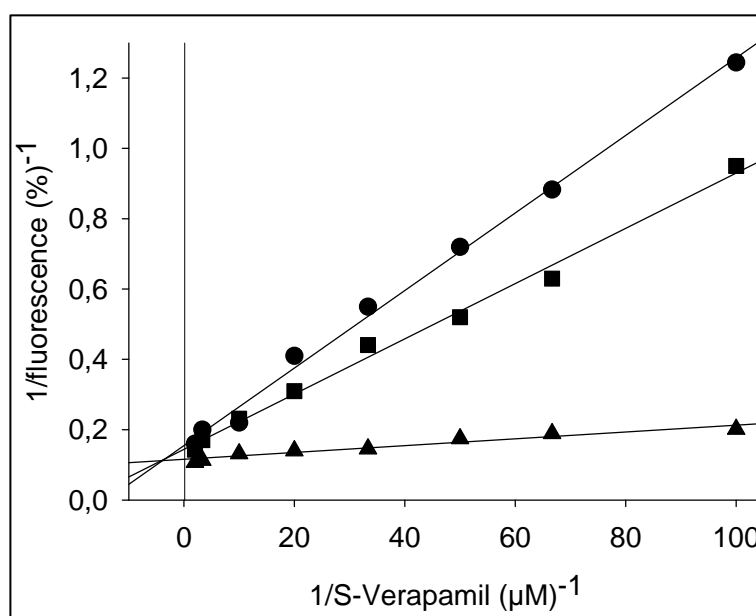


Figure 73 : Effet du R-vérapamil sur la fixation du S-vérapamil sur la protéines sans asolectine. L'atténuation de fluorescence a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes de S-vérapamil, en absence (▲), ou en présence de 0.05 µM (■) ou 0.5 µM de R-vérapamil (●). Les résultats sont analysés à l'aide de la représentation de Lineweaver-Burk.

En absence de R-vérapamil, le K_d de fixation du S-vérapamil est similaire à celui trouvé précédemment, c'est-à-dire 112.8 ± 5 nM. En présence de 0.05 et 0.5 µM de R-vérapamil, l'affinité du S-vérapamil est significativement diminuée. Lorsque les résultats sont analysés par la représentation de Lineweaver-Burk, les droites se coupent dans le premier cadran, ce qui indique une inhibition de type mixte entre les deux sites de fixation des énantiomères. Le R-vérapamil diminue ainsi à distance l'affinité du S-vérapamil pour son site de fixation sur MRP1. Ces résultats confirment ceux obtenus au niveau cellulaire, où le R-vérapamil antagonise la stimulation de l'efflux du GSH par le S-vérapamil. Il y a donc une bonne corrélation entre les résultats biochimiques et cellulaires, confirmant l'effet du R-vérapamil sur MRP1.

Enfin, il est intéressant de comprendre la relation entre le site de fixation du GSH et les sites de fixation des énantiomères. Il a été montré dans les expériences précédentes que le S-vérapamil était l'isomère stimulant l'efflux du GSH par MRP1. A l'heure actuelle, ce mécanisme de stimulation n'est toujours pas connu. Cependant, on peut penser que l'énantiomère S agit sur le site de fixation du GSH, soit en diminuant ou en augmentant son affinité, car l'efflux de GSH est un phénomène rapide et massif, qui demande une mécanistique particulière pour le transport du GSH. De plus, le R-vérapamil a la capacité

d'interagir avec l'activité du S-vérapamil, mais il peut aussi inhiber le transport de nombreux substrats.

Les résultats présentés Figure 73 montrent que dans les deux cas le GSH prévient la fixation du R- et du S-vérapamil. La représentation de Linweaver-Burk montre une inhibition de type mixte. Il existe bien une relation entre les sites de fixation des énantiomères et le site de fixation du GSH. Cependant, il n'est pas sûr que les deux sites de fixation des énantiomères soient en relation avec le même site de fixation du GSH. En effet, il semble, selon la littérature, qu'il existerait deux sites de fixation du GSH, dont un vrai site substrat qui impliquerait le transport, et un autre site modulateur, comme par exemple dans le cas du transport de l'estrone sulfate. Les expériences présentées ici ne peuvent faire la distinction entre ces sites hypothétiques. Cependant, l'interrelation entre les sites de fixation des énantiomères et celui du GSH permet de comprendre ce qui pourrait se passer au niveau du mécanisme de transport. En effet, la relation entre le site de fixation du S-vérapamil et celui du GSH pourrait permettre de comprendre la cause de ce transport stimulé du GSH, alors que celle entre le site de fixation du R-vérapamil et celui du GSH pourrait expliquer les phénomènes d'inhibition du transport.

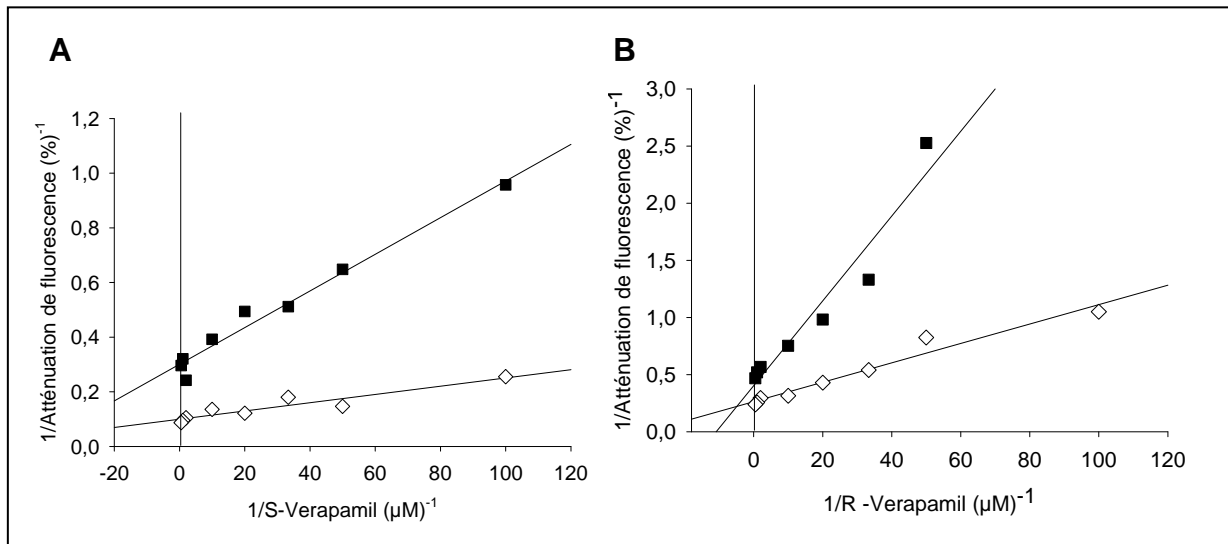


Figure 74 : Effet du GSH sur la fixation du S-vérapamil (A) et du R-vérapamil (B) sur la protéine avec 0.2% d'asolectine. Les mesures de fluorescence ont été effectuées en ajoutant des concentrations croissantes de S- ou R-vérapamil, en absence (\diamond), ou en présence de 0.5 mM de GSH (\blacksquare). Les données ont été analysées à l'aide de la représentation de Linweaver-Burk.

2.7.4. Effet des énantiomères du vérapamil sur l'activité ATPase de MRP1

La mesure de l'activité ATPase permet d'accéder à d'autres paramètres mécanistiques. Dans le cas de MRP1, il a été montré que les substrats tels que le GSH ou la vincristine peuvent stimuler l'activité ATPase. Il nous a alors paru intéressant d'étudier l'effet des énantiomères sur l'activité ATPase de MRP1 en présence ou en absence du GSH.

Les mesures ont été effectuées en présence et en absence de 0.2% d'asolectine, car il a été montré notamment pour la P-gp, que les lipides peuvent améliorer significativement l'activité ATPase du transporteur.

Activité différentielle des énantiomères du vérapamil sur MRP1

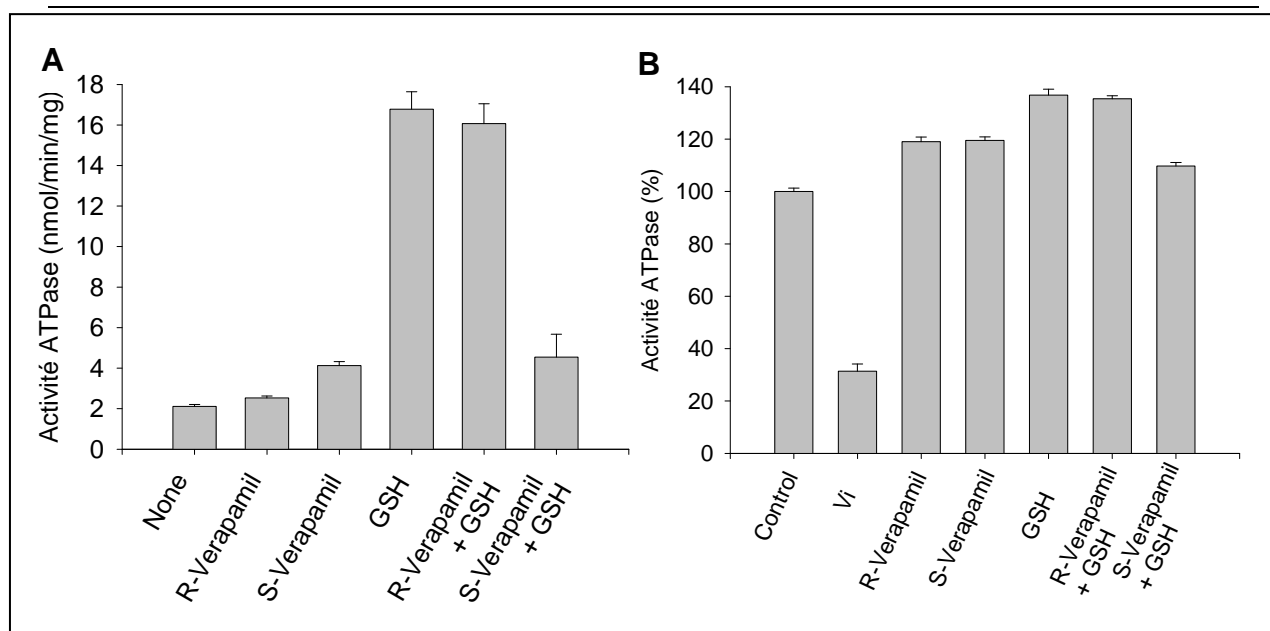


Figure 75 : Effet des énantiomères et du GSH sur l'activité ATPase de MRP1. (A) L'activité ATPase a été mesurée sur 1.5 μ g de protéines après incubation pendant 4 h à 37 °C, en absence ou en présence de 5 mM GSH, et/ou 1 μ M de S- ou R-vérapamil. (B) L'activité ATPase a été mesurée sur 1 μ g de protéines + 0.2% asolectine, après incubation pendant 1h à 37 °C, en absence ou en présence de 5 mM GSH, et/ou 1 μ M de S- ou R-vérapamil, ou 0.8 mM vanadate. En (A), les résultats sont représentés en nmol/min/mg, du fait de la faible activité de MRP1, et en (B) l'activité est représentée en pourcentage de l'activité basale, du fait d'une plus forte activité.

Au premier abord, et de manière surprenante, l'activité ATPase de MRP1 est fortement augmentée en présence de l'asolectine, car le niveau basal du transporteur passe de 2.11 ± 0.1 nmol/min/mg à 16.2 ± 0.4 nmol/min/mg. Néanmoins, ces valeurs restent comparables à celles trouvées dans la littérature. Il est à noter que la présence des lipides a tendance à diminuer la stimulation de l'activité ATPase par le GSH. En présence d'asolectine (Figure 74B), la stimulation fait augmenter l'activité ATPase à environ 140% par rapport au niveau basal, ce qui est faible, mais comparable aux stimulations trouvées dans la littérature. Par ailleurs, le R-vérapamil et le S-vérapamil stimulent l'activité ATPase. Mais le fait le plus important provient des essais effectués en présence du GSH et du R-vérapamil, où le R-vérapamil n'a aucune influence sur l'activité ATPase ; alors que lors des essais effectués en présence du GSH et du S-vérapamil, l'activité ATPase retourne à un niveau entre l'activité basale et celle mesurée pour le S-vérapamil seul.

Ces résultats ont une valeur importante en termes de compréhension du mécanisme induit par les énantiomères. Le R-vérapamil, qui est un inhibiteur de MRP1, stimule l'activité ATPase, mais n'a presque plus aucune action lorsque le GSH est présent. En outre, le S-vérapamil stimule lui aussi légèrement l'activité ATPase, cependant en présence de GSH, l'activité hydrolytique retourne à un niveau entre l'activité basale et celle induite par l'énantiomère S. On pourrait alors penser qu'en présence de S-vérapamil, le GSH n'a plus aucune activité sur le transporteur, soit parce qu'il ne s'y fixe plus, soit parce que son site de fixation est modifié, et qu'il ne peut plus alors exercer son rôle sur le transporteur. Ces résultats montrent encore une fois la différence mécanistique importante sur le fonctionnement des deux énantiomères, qui ont révélés des activités sur le transporteur MRP1 complètement opposées.

2.7.5. Intérêts mécanistiques et thérapeutiques des énantiomères du vérapamil

Ces résultats montrent pour la première fois les effets différentiels des deux isomères sur le fonctionnement et l'activité du transporteur MRP1. Ils ont un intérêt double : pour la compréhension du mécanisme de fonctionnement de MRP1 et des perspectives qui peuvent en découler, et l'intérêt thérapeutique que cette découverte peut représenter.

Tout d'abord, d'un point de vue moléculaire, les effets du vérapamil sur MRP1 représentent une controverse depuis de nombreuses années. Alors que l'équipe de Cole n'a jamais mis en évidence son rôle dans l'inhibition du transport par MRP1 (Cole et al., 1994), l'équipe de Davey a montré une faible chimiosensibilisation à la daunorubicine (Davey et al., 1995; Cullen et al., 2001). L'effet du vérapamil n'était alors pas clairement établi. Cependant, il a été clairement décrit que le vérapamil stimulait l'efflux du GSH hors de la cellule par MRP1, et qu'il était capable d'inhiber le transport du LTC₄ en présence du GSH (Loe et al., 2000a; Tromprier et al., 2004). On remarque alors que la fonction du vérapamil est intimement liée au GSH.

Les résultats de ce travail montrent pour la première fois l'effet différentiel des énantiomères du vérapamil, ce qui permet ainsi de répondre aux questions posées précédemment. Tout d'abord, les résultats montrent que l'énantiomère S du vérapamil est le seul responsable de la stimulation de l'efflux du GSH par MRP1, alors que l'énantiomère R n'a pas cette capacité. Ainsi, c'est l'énantiomère S qui induit la mort des cellules surexprimant MRP1 par une fuite brutale et massive du GSH, induisant un stress oxydatif au niveau de la cellule. Cependant, l'énantiomère R n'est pas neutre sur la fonction de MRP1, car il réduit la capacité de l'énantiomère S à stimuler l'efflux du GSH. Les expériences de transport de la calcéine et du LTC₄ montrent que les deux énantiomères peuvent inhiber le transport des substrats de MRP1. De plus, le R-vérapamil peut restaurer la sensibilité à la vincristine des cellules surexprimant MRP1. Ces résultats apportent alors la preuve que le vérapamil peut inhiber le transport par MRP1. Cependant, lors de l'utilisation du mélange racémique, l'effet du S-vérapamil sur l'efflux du GSH masque l'effet inhibiteur des deux énantiomères sur le transport de diverses drogues par MRP1, ce qui donne une explication à la controverse présentée précédemment. Ainsi, l'énantiomère S stimule le transport du GSH par MRP1, ce qui a pour effet l'inhibition du transport des autres substrats ; alors que le R-vérapamil est un inhibiteur pur de la fonction de MRP1.

Ces résultats ont un intérêt dans la compréhension du mécanisme moléculaire de MRP1. Deux mêmes molécules ont une fonction complètement différente sur MRP1. Les études moléculaires sur MRP1 purifié ont montré que les deux énantiomères se fixent à des sites différents sur MRP1, mais intimement liés. De plus, le GSH diminue l'affinité des deux énantiomères pour MRP1. Ainsi, les sites de fixation des énantiomères du vérapamil et le site de fixation du GSH, et même des substrats, sont interdépendants. Les changements conformationnels provoqués par les deux énantiomères sont différents, démontrant alors encore une fois le rôle différent de chaque énantiomère sur MRP1. Les études de l'effet des énantiomères du vérapamil sur l'activité ATPase de MRP1 montrent que les énantiomères augmentent faiblement l'activité ATPase de MRP1, de la même manière que le GSH. Cependant, bien qu'en présence de S-vérapamil la stimulation de l'activité ATPase par le GSH est abolie, ce n'est pas le cas avec le R-vérapamil. Ces résultats démontrent la différence mécanistique imposée par les deux énantiomères. Le S-vérapamil a un effet drastique sur l'activité ATPase, comme si le GSH n'avait plus aucun rôle sur le transporteur. Ces données permettent alors d'entrevoir un mécanisme où il pourrait y avoir un découplage entre le site de fixation du GSH et le mécanisme permettant son transport. Des études supplémentaires sont

nécessaires afin de déterminer les modifications d'affinité du GSH en présence du S-vérapamil au cours du cycle catalytique du transporteur. La même étude en présence du R-vérapamil permettrait de différencier les mécanismes d'inhibition et de stimulation. Il serait notamment intéressant d'utiliser des dérivés photomarquables du GSH, afin de déterminer l'effet des énantiomères du vérapamil sur l'affinité du GSH au cours des différentes étapes du cycle catalytique. Ces expériences pourraient apporter des résultats fondamentaux quant au mécanisme impliqué par ces molécules. En effet, différents travaux montrent que MRP1, en présence de vérapamil, a la capacité d'effluer jusqu'à 80% du GSH intracellulaire en moins de 30 min. C'est alors un mécanisme rapide et drastique, qui vide la cellule de son contenu en GSH. Ce phénomène pose alors la question de l'efficacité du transporteur. Le transporteur lui-même est-il capable d'effluer la majeure partie du GSH cellulaire en si peu de temps, sachant que le GSH a une concentration cellulaire moyenne de 5 mM? On peut donc émettre l'hypothèse suivante : MRP1 pourrait se comporter tel un pseudo canal? Est-ce que le vérapamil ne pourrait-il pas diminuer fortement l'affinité du GSH et permettre ainsi son transport de manière efficace et rapide? De plus, le vérapamil est utilisé comme un inhibiteur des canaux calciques. Ainsi cette molécule possède un rôle ambigu en ce qui concerne les transporteurs membranaires.

La découverte de stéréo-isomères d'une même molécule ayant des propriétés différentes sur MRP1 pourrait alors être un bon moyen d'étudier la manière dont les substrats se fixent sur MRP1 et quelles régions du transporteur sont nécessaires au transport des substrats.

D'un point de vue thérapeutique, ces résultats apportent des éléments importants quant à l'utilisation du vérapamil en thérapie. Cette étude pointe le rôle différentiel des deux stéréo-isomères du vérapamil, et ainsi la nécessité d'utiliser ces isomères de manière séparée afin de cibler deux mécanismes différents. Les travaux du laboratoire ont conduit à l'émergence d'un nouveau principe thérapeutique ciblant MRP1 : l'utilisation de molécules induisant spécifiquement l'apoptose des cellules surexprimant MRP1, par un efflux massif du GSH. Cette nouvelle possibilité thérapeutique est confortée par des résultats très récents démontrant cette activité du vérapamil sur des cellules tumorales sélectionnées, surexprimant MRP1, les HL69AR. L'autre méthode, plus commune, consistant à inhiber les transporteurs impliqués dans la chimiorésistance, afin de restaurer la sensibilité des cellules résistantes aux agents chimiothérapeutiques. L'étude des énantiomères du vérapamil apporte une donnée intéressante en terme de recherche de nouvelles molécules ciblant les transporteurs de la famille ABC. Il semble important de s'attacher à étudier les énantiomères des molécules ayant une action sur ces transporteurs, afin de déterminer la configuration optimale des modulateurs, et de là, de pouvoir utiliser des concentrations encore plus faibles *in vivo* de ces modulateurs. Dans le cas de MRP1, il faut utiliser les énantiomères du vérapamil de manière séparée afin de cibler deux mécanismes différents, afin que chaque isomère ne masque pas l'action de l'autre. L'utilisation du S-vérapamil pourrait avoir un intérêt dans le traitement des cancers résistants surexprimant MRP1, car cette molécule ciblerait spécifiquement ces cellules, et induirait leur mort par apoptose. D'un autre côté, l'utilisation du R-vérapamil permettrait de restaurer la sensibilité des cellules surexprimant MRP1 vis-à-vis d'un agent chimiothérapeutique.

Il faut cependant prendre en considération l'effet inhibiteur du S-vérapamil sur les canaux calciques des cardiomyocytes. De précédentes études ont montré que la modification de la partie « ouest » de la molécule pouvait diminuer ce pouvoir inhibiteur (Teodori et al., 1999). Au laboratoire, une étude sur des dérivés diiodés du vérapamil, modifié sur la partie « ouest », a montré que ces molécules étaient dix fois plus efficaces que la molécule initiale (Trompier et al., 2004). Il sera alors intéressant de synthétiser les dérivés diiodés des

énantiomères du vérapamil, de tester leur efficacité en termes d'efflux du GSH et d'inhibition du transport des substrats de MRP1, mais aussi en termes de toxicité sur les cardiomyocytes. De tels dérivés du vérapamil, réversant le phénotype MDR induit par la P-gp, ont été trouvés par Pereira et al. (Pereira et al., 1995). Cela pourrait ouvrir la porte à de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules tumorales, et ce de manière efficace et ayant peu d'effet sur le reste de l'organisme.

Il ne faut cependant pas perdre de vue que la mort cellulaire induite par le vérapamil est un phénomène qui ne s'opère pas dans tous les types cellulaires. C'est ainsi que, actuellement, une étude de l'influence du type cellulaire sur la mort cellulaire induite par le vérapamil sur les cellules surexprimant MRP1 est conduite au laboratoire. Elle permettra de comprendre s'il existe une relation entre le taux basal en GSH intracellulaire, le taux d'expression du transporteur, et la capacité du vérapamil à induire l'apoptose de ces cellules. En effet, alors qu'une récente étude a montré la mort par apoptose des cellules H69AR et HeLa^{ABCC1} par efflux massif du GSH induit par MRP1 (Laberge et al., 2007), d'autres études démontrent un efflux de GSH sans mort cellulaire (Loe et al., 2000a; Cullen et al., 2001). Ce travail s'inscrit ainsi dans une dynamique actuelle tendant à mettre au jour des molécules ou des méthodes thérapeutiques ciblant des types cellulaires bien spécifiques, dans certains types de cancers. Dans ce sens, si les dérivés diiodés énantiomériques du vérapamil s'avèrent beaucoup plus efficaces que le vérapamil lui-même, tout en ayant une toxicité cardiaque réduite, l'étape suivante devrait se porter sur l'étude de ces composés sur un modèle animal, en ciblant alors un type cellulaire particulièrement réceptif.

3. Relation structure/activité des dérivés iodés du vérapamil

3.1. Synthèse et structure des dérivés iodés du vérapamil

L'étude sur les énantiomères du vérapamil a montré l'importance d'analyser l'effet de l'énantiométrie sur le transport de substrats par MRP1. Le vérapamil représente ainsi une classe de molécules intéressante d'un point de vue thérapeutique. Il est nécessaire d'optimiser la structure du vérapamil afin de trouver des dérivés beaucoup plus efficaces et ayant des effets secondaires moindres.

Dans ce cadre, différents dérivés du vérapamil, notamment porteurs de groupements iodés, ont été synthétisés par le Dr. R. Barattin et le Dr. A. d'Hardemare (Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, Université Joseph Fourier - Grenoble). A l'origine, l'objectif de ces synthèses était de concevoir des molécules permettant le diagnostic par scintigraphie de la chimiorésistance des tumeurs. En effet, le vérapamil interagit avec les deux principaux transporteurs responsables du phénotype MDR : La P-gp et MRP1. Des relations structure-activité du vérapamil ont montré que sa partie « ouest » est responsable de l'activité anti-MDR et que la partie « est » est nécessaire pour l'activité inhibitrice des canaux calciques (Figure 75). L'utilisation clinique du vérapamil pour son activité réversante du phénotype MDR est alors compliquée par les effets secondaires sur les canaux calciques. Il a donc été décidé de modifier la partie « est » du vérapamil afin de tenter de réduire l'activité inhibitrice des canaux calciques.

Ainsi, de nombreux dérivés du vérapamil ont été synthétisés, et une première étape a consisté à tester leur capacité à stimuler l'efflux du GSH, et ainsi à induire l'apoptose des cellules surexprimant MRP1, comme cela a été montré pour le vérapamil et son dérivé diiodé, le NMeOHI₂, tout en conservant une faible toxicité pour les cellules contrôles.

La synthèse a consisté en une modification de la taille du linker du vérapamil, et/ou à une iodation de la partie « est ». Les caractéristiques structurales des dérivés sont décrites dans le tableau 8.

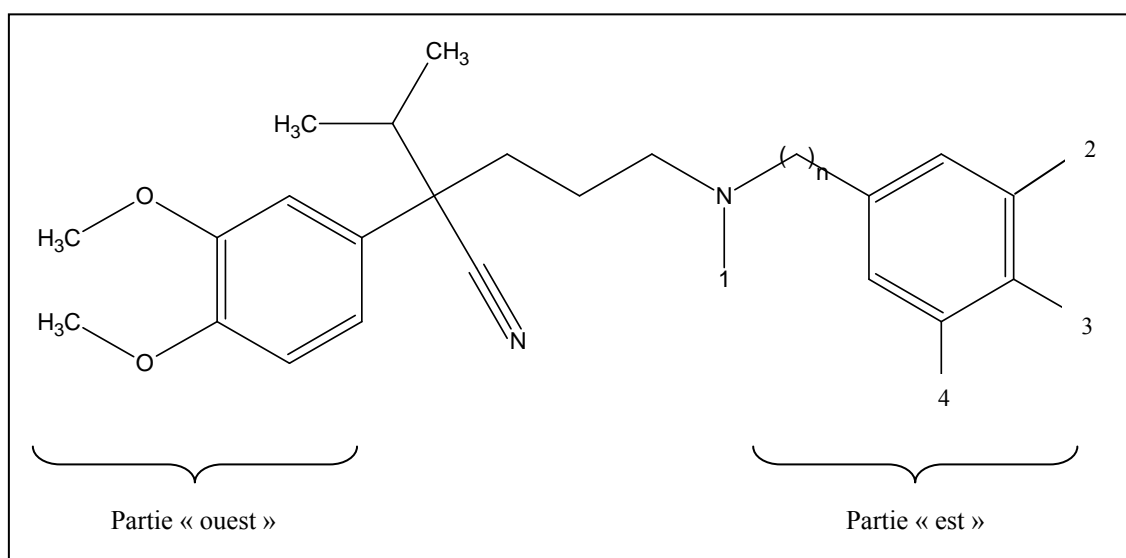


Figure 76 : Structure du vérapamil et position des modifications apportées.

Tableau 8 : Caractéristiques des modifications chimiques apportées au vérapamil, dans le cadre de synthèses de nouveaux dérivés du vérapamil.

Composés	Type de modification chimique				
	1	2	3	4	n
Verapamil	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-	2
NMeOMe	CH ₃	-	OCH ₃	-	2
NMeOMeI	CH ₃	I	OCH ₃	-	2
NMeOMeI ₂	CH ₃	I	OCH ₃	I	2
NMeOH	CH ₃	-	OH	-	2
NMeOHI	CH ₃	I	OH	-	2
NMeOHI ₂	CH ₃	I	OH	I	2
Verapamil C	CH ₃	-	OH	-	3
Verapamil CI	CH ₃	-	OH	I	3
Verapamil CI ₂	CH ₃	I	OH	I	3
Verapamil D	CH ₃	-	OH	-	1
Verapamil DI	CH ₃	-	OH	I	1
Verapamil DI ₂	CH ₃	I	OH	I	1
NHOH	H	-	OH	-	2
NHOHI	H	I	OH	-	2
NHOHI ₂	H	I	OH	I	2

3.2. Toxicité cellulaire des dérivés iodés du vérapamil

Le vérapamil a été montré avoir que peu ou pas d'effet sur la chimiosensibilisation des cellules surexprimant MRP1. Cependant, le vérapamil induit la mort des cellules surexprimant MRP1, en stimulant un efflux massif et brutal du GSH cellulaire, conduisant à un stress oxydatif des cellules. L'étude de l'efficacité des dérivés du vérapamil consiste ainsi tout d'abord à tester la capacité de ces composés à induire la mort des cellules, et ce uniquement en ce qui concerne les cellules BHK-21-MRP1. Pour cela, le test MTT de prolifération cellulaire a été utilisé (Tableau 9 et Figure 76).

Les résultats montrent, tout d'abord, que le vérapamil a une très faible toxicité sur les cellules contrôles dans les conditions utilisées, alors qu'il induit la mort des cellules BHK-21-MRP1, avec une IC₅₀ de 10.6 ± 0.5 µM, comme attendu (Figure 76 et tableau 9).

Le NMeOMe, n'est pas mieux comparé au vérapamil ; de plus l'iodation de ce dérivé augmente la toxicité cellulaire de la même manière pour les BHK-21 et les BHK-21-MRP1, indiquant que cette toxicité accrue implique d'autres effecteurs cellulaires.

Le NMeOH, augmente la toxicité cellulaire de la même manière pour les deux lignées. Le NMeOMe et le NMeOH sont moins intéressants que le vérapamil et leur iodation augmente leur effet toxique aussi bien pour les BHK-21 que pour les BHK-21-MRP1, impliquant donc d'autres effecteurs cellulaires. Pour le NMeOHI₂, la présence de deux atomes d'iode augmente significativement l'efficacité du composé, tout en conservant une faible toxicité pour la lignée contrôle (Figure 76).

Activité différentielle des énantiomères du vérapamil sur MRP1

Les dérivés C et D du vérapamil, caractérisés par une modification de la longueur du linker, montrent une assez forte toxicité envers les cellules BHK-21-MRP1, et les cellules contrôles, que ce soit pour les composés iodés ou non.

Enfin, en ce qui concerne les composés de la famille du NHOH, l'iodation permet l'obtention de composés très efficaces en ce qui concerne la toxicité pour les cellules BHK-21-MRP1, même si la toxicité envers les cellules contrôles est augmentée (Figur 76).

Tableau 9 : Calcul des IC₅₀ de survie cellulaire après traitement des cellules BHK-21 et BHK-21-MRP1 par les différents dérivés du vérapamil. Les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes en composés pendant 72 h à 37 °C, puis analysées par test MTT.

Composés	IC ₅₀ (μM)	
	BHK-21-MRP1	BHK-21
Verapamil	10.6 ± 0.5	≥ 100
NMeOMe	17.2 ± 1.0	33.6 ± 7.7
NMeOMeI	4.7 ± 0.6	13.0 ± 0.5
NMeOMeI ₂	1.7 ± 0.9	8.9 ± 0.3
NMeOH	11.7 ± 0.3	55.9 ± 0.8
NMeOHI	8.6 ± 1.2	32.8 ± 0.9
NMeOHI ₂	1.1 ± 0.9	54.7 ± 7.1
Verapamil C	20.9 ± 1.4	≥ 100
Verapamil CI	9.3 ± 1.4	9.4 ± 0.2
Verapamil CI ₂	6.0 ± 0.8	33.1 ± 5.1
Verapamil D	6.6 ± 0.9	28.5 ± 1.6
Verapamil DI	13.0 ± 1.2	14.1 ± 0.3
Verapamil DI ₂	6.6 ± 1.2	27.4 ± 2.6
NHOH	38.1 ± 0.3	≥ 100
NHOHI	0.78 ± 0.7	14.2 ± 0.3
NHOHI ₂	1.96 ± 0.4	13.8 ± 0.5

Activité différentielle des énantiomères du vérapamil sur MRP1

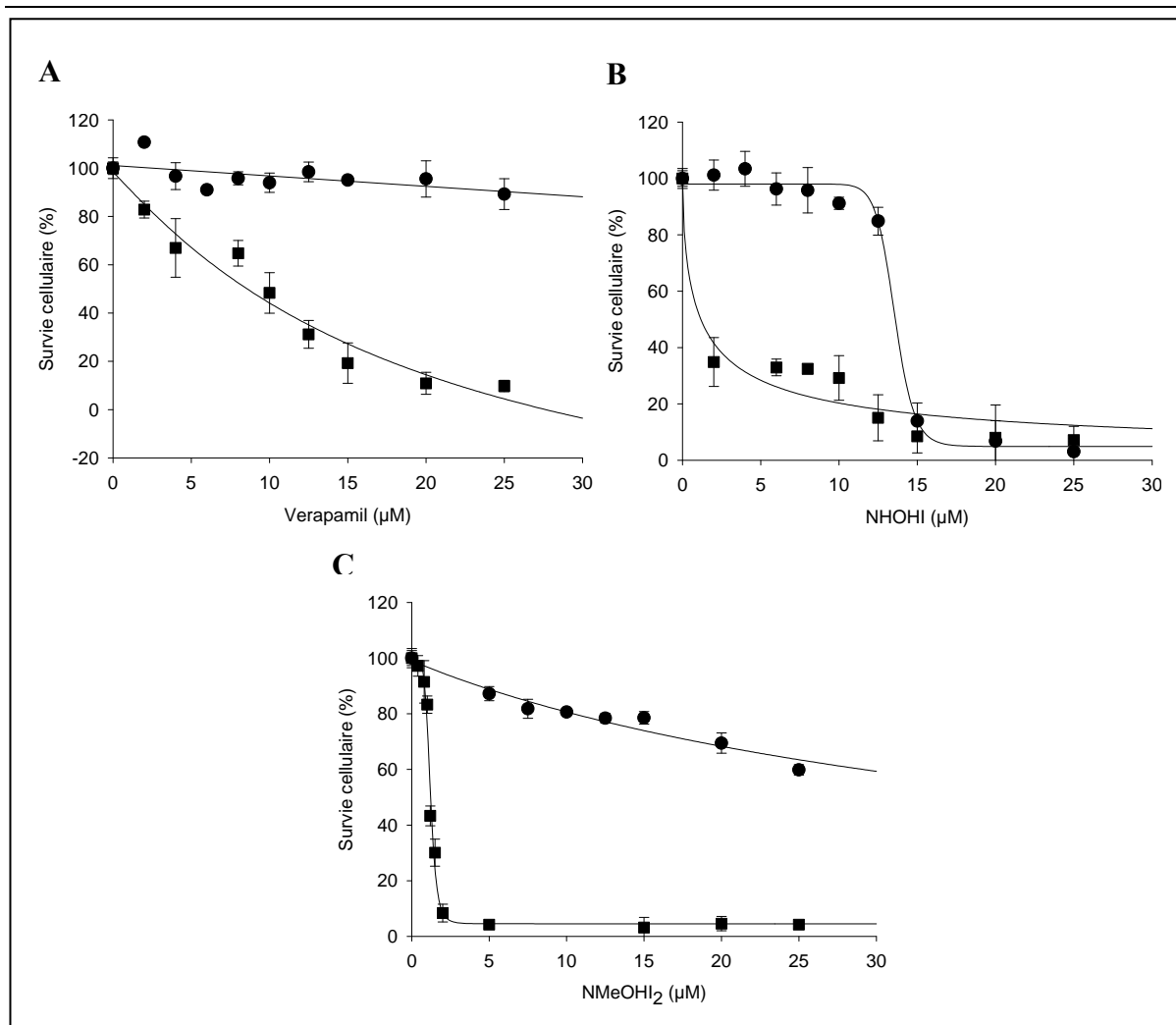


Figure 77 : Toxicité cellulaire induite par le vérapamil et ses dérivés. Les cellules BHK-21 (●) et les cellules BHK-21-MRP1 (■) ont été cultivées pendant 72 h à 37 °C, en présence de concentrations croissantes des composés : vérapamil (A), NHOHI (B) et NMeOHI₂(C), puis analysées par test MTT.

3.3.Effet des dérivés iodés du vérapamil sur le transport de GSH par MRP1

L'étude de la stimulation de l'efflux du GSH par les dérivés du vérapamil permet de savoir si ces composés interagissent avec MRP1, en permettant l'efflux du GSH, ou si ces composés agissent sur d'autres effecteurs cellulaires. L'efficacité des composés a été testée en.

Les composés dérivés du NMeOMe stimule l'efflux du GSH de manière comparable au vérapamil.

En ce qui concerne les composés dérivés du NMeOH, la di-iodation diminue fortement le temps nécessaire à l'efflux de 50% du GSH.

La modification de la taille du linker, pour le vérapamil C et D, augmente drastiquement le temps d'efflux, alors que l'iodation diminue ce temps. Enfin, le NHOH montre une faible efficacité à stimuler le GSH, alors que l'iodation diminue fortement le temps d'efflux.

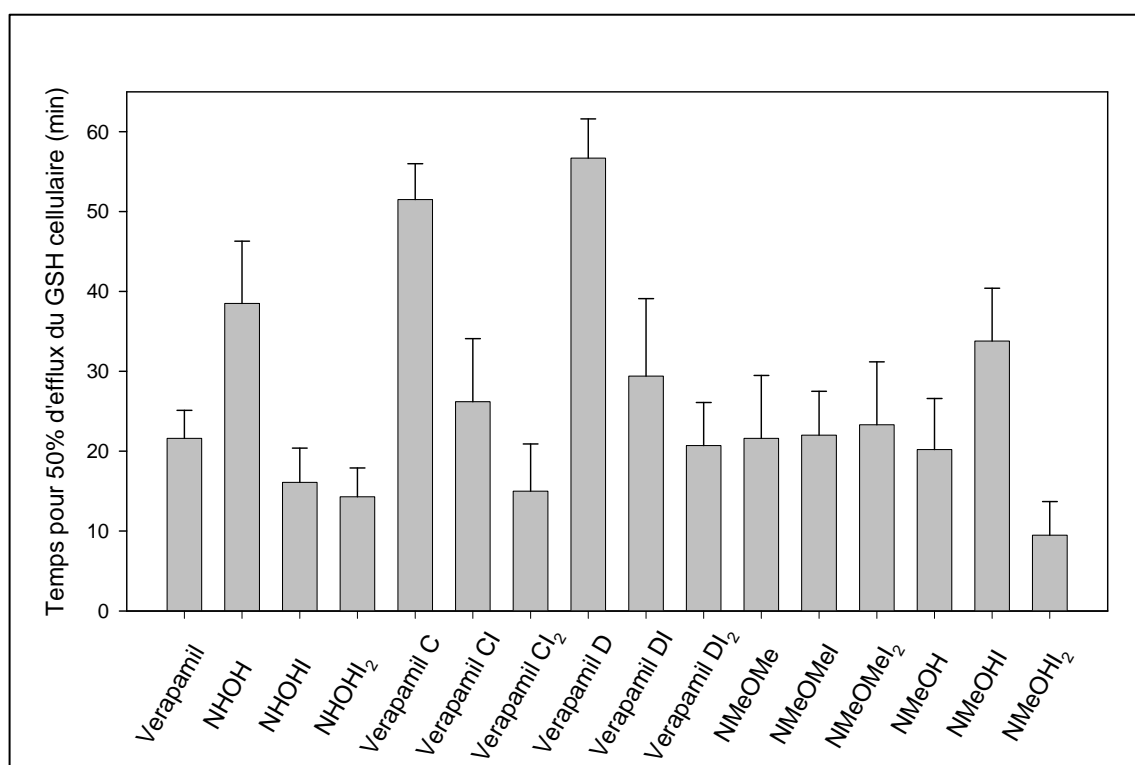


Figure 78 : Effet des dérivés du vérapamil sur le contenu cellulaire en GSH. Les cellules BHK-21-MRP1 ont été incubées en présence de 10 μ M des différents composés pendant différents temps à 37 °C. Le contenu cellulaire en GSH a été ensuite mesuré, et le temps nécessaire à l'efflux de 50% du GSH cellulaire déterminé.

3.4. Relation structure/activité

Très peu de travaux concernant l'étude de dérivés du vérapamil sur la fonction de MRP1 ont été effectués à ce jour. Une étude sur la relation structure/fonction de composés dithianes a été menée par l'équipe de Cole (Loe et al., 2000b), et a montré que les composés lipophiles étaient les meilleurs inhibiteurs du transport du LTC₄. Dans l'étude, de nombreux dérivés du vérapamil ont été synthétisés, afin de tirer profit du pouvoir stimulant du vérapamil sur le transport du GSH. Les modifications chimiques ont porté sur la longueur du linker, la substitution de méthyles par des hydroxyles, et l'ajout d'atomes d'iode.

Les résultats montrent tout d'abord, que dans le cas des dérivés C et D du vérapamil, le raccourcissement ou l'allongement du linker n'apporte pas de bénéfice en ce qui concerne la vitesse d'efflux du GSH. L'ajout d'atomes d'iodes permet d'augmenter cette vitesse, cependant la toxicité cellulaire est accrue.

Le remplacement des groupements méthyles par des hydroxyles (NHOH) ne favorise pas l'efflux du GSH, mais ne modifie pas la toxicité cellulaire. Cependant, l'ajout d'un atome d'iode en position 2 permet d'accroître fortement la vitesse d'efflux du GSH, induisant alors une forte toxicité pour les cellules surexprimant MRP1.

En ce qui concerne la famille de dérivés NMeOMe, l'ajout d'iode favorise l'efflux du GSH, mais cet aspect positif est contrecarré par une toxicité qui augmente avec l'ajout d'iode.

Enfin, en ce qui concerne la famille de dérivé NMeOH, l'ajout de deux atomes d'iode aboutit à une molécule qui favorise fortement la stimulation du transport du GSH, et une forte toxicité des cellules surexprimant MRP1, alors que la toxicité des cellules contrôles reste acceptable.

En conclusion, la modification de la taille du linker n'apporte pas une efficacité supplémentaire à la molécule. Mais d'une manière générale, l'ajout d'atome d'iode augmente la capacité de la molécule à stimuler l'efflux du GSH. Cependant, la présence d'iode peut se révéler un inconvénient en termes de cytotoxicité cellulaire. Il faut ainsi faire la part entre la toxicité cellulaire induite par le stress oxydatif dû à l'efflux du GSH, et la toxicité propre de la molécule sur les autres effecteurs cellulaires. La seule mesure de la toxicité cellulaire ne permet pas d'accéder à ce paramètre. La mesure de l'efflux du GSH permet de contrôler l'interaction directe de la molécule avec MRP1, prouver l'efficacité de cette molécule sur sa cible et ainsi démontrer l'avantage de modifications chimiques. L'exemple de cette observation peut être donné par le NMeOMe, où l'efflux du GSH n'est pas augmenté avec l'iodation, alors que la toxicité cellulaire est accrue. Ainsi, dans ce cas, les modifications chimiques n'ont pas d'incidence sur la fonction du transporteur, mais elles ont une influence sur la toxicité cellulaire par le biais s'autres cibles. Enfin, en comparant le NMeOMe avec le NMeOH et le vérapamil, les résultats montrent que les substituants de la position 3 n'ont pas d'influence sur la fonction de MRP1, alors que la présence d'un méthyle en position 1 semble plus efficace qu'une fonction hydroxyle.

A partir de ces résultats, deux molécules semblent être relativement efficaces, le NMeOH₂ et le NHOHI. Cependant, la toxicité cellulaire des cellules contrôles reste encore assez élevée, et l'utilisation de ces composés *in vivo*, compte tenu des IC₅₀, reste encore assez improbable du fait de la toxicité cardiaque. Il faudrait ainsi tester ces composés en ce qui concerne leur cardiotoxicité ; mais aussi séparer les énantiomères de ces composés et tester leur activité sur MRP1 et sur les canaux calciques des cardiomyocytes. Cette dernière approche, au vu des résultats précédents sur les énantiomères du vérapamil, permettrait peut-être de synthétiser des molécules encore plus efficaces, et avec une faible toxicité cellulaire et cardiaque.

4. Relation structure/activité de dérivés des flavonoïdes

4.1. Synthèse et structure des dérivés des flavonoïdes

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont montré l'intérêt thérapeutique des flavonoïdes en ce qui concerne le traitement du phénotype MDR. Dans le cas de la P-gp ou de BCRP, ces composés naturels ont la capacité d'inhiber la fonction de transport de ces protéines. Ils ont été de plus montré interagir avec les NBD de la P-gp ou de MRP1, pouvant ainsi influencer la fonctionnalité de ces domaines. L'intérêt de ces molécules réside dans leur faible toxicité envers l'organisme humain. En effet, quotidiennement l'Homme ingère une grande quantité de flavonoïdes à travers son alimentation composée en grande partie de végétaux.

En ce qui concerne MRP1, l'effet de certains flavonoïdes sur le transporteur est assez surprenant, rappelant l'action du vérapamil. Ils ont la capacité de stimuler l'efflux du GSH, et d'induire la mort des cellules surexprimant MRP1. L'équipe de Cole avait déjà décrit la stimulation du transport du GSH par les bioflavonoïdes. Très récemment, l'apigénine a été montrée induire la mort des cellules de type Hela surexprimant MRP1 (Laberge et al., 2007). Alors que le problème du vérapamil réside dans sa cardiotoxicité, les flavonoïdes pourraient représenter une bonne approche thérapeutique, tant d'un point de vue pharmacodynamique et pharmacocinétique, que de l'effet sur la fonction de MRP1, touchant ainsi spécifiquement les cellules tumorales surexprimant MRP1.

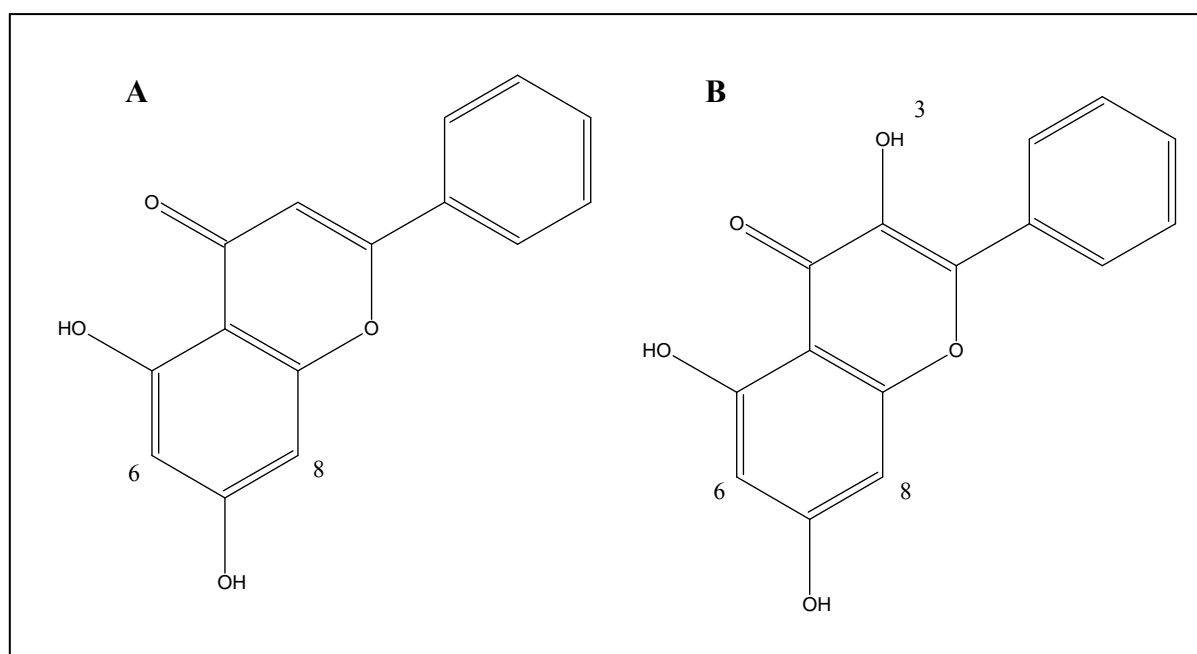


Figure 79 : structure de la chrysin (A) et de la galangine (B), et position des modifications chimiques apportées.

Nous nous sommes alors attachés à étudier deux classes de flavonoïdes, la chrysin et la galangine (Figure 78), en testant différents dérivés de ces composés sur le transporteur MRP1 (Tableau 11). Les modifications chimiques concernent majoritairement l'ajout de fonctions géranyles et/ou prényles. Les flavonoïdes sont d'une part testés en termes de toxicité cellulaire à l'aide des deux lignées cellulaires BHK-21 et BHK-21-MRP1 en utilisant le test MTT, et d'autre part en testant l'effet de ces composés sur la stimulation de l'efflux du GSH

par MRP1. Cette étude vise à mieux comprendre les structures chimiques nécessaires à l'efficacité de la molécule tout en ayant une faible toxicité cellulaire.

Tableau 10 : Position des modifications apportées à la chryisine et à la galangine. DMA = diméthylallyle, OMe = O-méthyle.

Composés	Position des modifications chimiques		
	6	8	3
8 prényle chryisine		X	
6,8 diprényle chryisine	X	X	
6 géranyle chryisine	X		
8 géranyle chryisine		X	
6,8 digéranyle chryisine	X	X	
6(1,1 DMA) chryisine	X		
8(1,1 DMA) chryisine		X	
6 prényle chryisine	X		
8 prényle galangine		X	
3 OMe galangine			X
8 prényle OMe galangine		X	
8(1,1 DMA) galangine		X	

4.2. Toxicité cellulaire des dérivés des flavonoïdes

La toxicité cellulaire des dérivés de la chryisine et de la galangine est présentée dans le Tableau 12. Malheureusement ces tests sont de grands consommateurs en composés, et certaines analyses n'ont pu être effectuées faute de quantités suffisantes. De précédents résultats ont montré que la chryisine avait une IC_{50} supérieure à 50 μM pour les BHK-21-MRP1, et la galangine une IC_{50} de 35.7 μM .

D'une manière générale, les flavonoïdes ont une assez forte toxicité envers les cellules contrôles BHK-21, que ce soit pour les dérivés de la chryisine ou de la galangine. Cependant, tous les composés ont une toxicité plus importante pour les BHK-21-MRP1, comparé à la toxicité pour les BHK-21. Le meilleur composé semble être la 8 géranyle chryisine, avec une IC_{50} de $14.47 \pm 0.23 \mu\text{M}$ pour les BHK-21, et $2.56 \pm 0.17 \mu\text{M}$ pour les BHK-21-MRP1, donnant alors un rapport de 7 (IC_{50} BHK-21/ IC_{50} BHK-21-MRP1).

Tableau 11 : Calcul des IC₅₀ sur la survie cellulaire des cellules BHK-21 et BHK-21-MRP1 des différents dérivés de la chryisine et de la galangine. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes en composés pendant 72 h à 37 °C, puis analysées par test MTT.

Composés	IC ₅₀ (µM)	
	BHK-21	BHK-21-MRP1
8 prényle chryisine	20.0 ± 2.32	5.9 ± 1.21
6,8 diprényle chryisine	ND	ND
6 géranyle chryisine	7.47 ± 0.3	2.68 ± 0.23
8 géranyle chryisine	14.47 ± 0.23	2.56 ± 0.17
6,8 digéranyle chryisine	ND	ND
6(1,1 DMA) chryisine	ND	ND
8(1,1 DMA) chryisine	12.5 ± 0.37	7.5 ± 0.12
6 prényle chryisine	ND	ND
8 prényle galangine	7.5 ± 0.98	6.2 ± 1.32
3 OMe galangine	> 100	25 ± 1.56
8 prényle-OMe galangine	15 ± 1.1	7.2 ± 0.89
8(1,1 DMA) galangine	8.3 ± 0.66	4.2 ± 0.45

4.3. Effet des dérivés des flavonoïdes sur le transport de GSH par MRP1

La mesure de la capacité de stimulation de l'efflux du GSH par les flavonoïdes permet de rendre compte de l'interaction des composés avec le transporteur. En effet, si les toxicités cellulaires observées entre les deux lignées sont équivalentes ou proches, ces résultats ne peuvent démontrer le réel effet des molécules sur la fonction du transporteur, car il faut prendre en compte les autres effecteurs cellulaires qui peuvent entraîner la mort de la cellule.

Le taux intracellulaire de GSH est analysé en présence de divers flavonoïdes testés précédemment.

Les résultats de ces expériences montrent que certains dérivés de la chryisine ou de la galangine ont des comportements tout à fait différents, et qu'ils conduisent tous plus ou moins à un efflux de GSH hors de la cellule (Tableau 13).

D'une manière générale, le taux de GSH intracellulaire, après traitement par les dérivés de la chryisine des cellules BHK-21, est proche de 100%, démontrant ainsi que ces composés n'ont que peu d'effet sur le contenu en GSH de ces cellules (à l'exception de la 6 prényle chryisine). Cependant, les dérivés de la galangine entraînent un efflux moyen d'environ 30% du contenu intracellulaire en GSH. Ces composés ont donc la capacité d'induire un efflux de GSH, en dehors de la présence de MRP1.

Sur les cellules BHK-21-MRP1, les dérivés de la galangine conduisent à un efflux beaucoup plus massif de GSH, comparé aux dérivés de la chryisine. Il est à noter que ce résultat est à modérer compte tenu de l'effet des dérivés de la galangine sur le contenu intracellulaire en GSH des cellules BHK-21.

Si on analyse les résultats obtenus avec les dérivés de la chryisine montrent que les dérivés prénylés en position 6 ou 8 fonctionnent beaucoup mieux que les dérivés géranylés. La position du groupement hydrophobe n'aurait que peu d'influence sur la capacité à stimuler l'efflux de GSH. Cependant, dans les deux cas, la substitution des deux positions en même temps par des groupements géranyles ou prényles, diminue fortement la capacité des dérivés chryisine à effluer le GSH. En ce qui concerne les dérivés de la galangine, les groupements O-méthyles et 8 prényles conduisent à des molécules ayant une activité satisfaisante, mais

l'ajout des deux groupements sur une même molécule favorise encore plus l'activité de stimulation de l'efflux du GSH.

Tableau 12 : Effet des dérivés de la chryisine et de la galangine sur le contenu cellulaire en GSH. Les cellules BHK-21 et BHK-21-MRP1 sont incubées en présence de 10 μ M des différents composés pendant 60 min à 37 °C. Le contenu cellulaire en GSH a été ensuite mesuré et rapporté à 100%, concentration intracellulaire en GSH des cellules traitées au DMSO.

Composés	Contenu intracellulaire en GSH (%)	
	BHK-21	BHK-21-MRP1
8 prényle chryisine	89.3 \pm 0.8	16.9 \pm 2.6
6,8 diprényle chryisine	86.6 \pm 1.2	54.5 \pm 4.7
6 géranyle chryisine	95.9 \pm 2.5	25.5 \pm 3.5
8 géranyle chryisine	89.4 \pm 2.7	33.4 \pm 2.9
6,8 digéranyle chryisine	88.1 \pm 4.5	54.2 \pm 6.9
6(1,1 DMA) chryisine	101 \pm 1.7	76.1 \pm 4.7
8(1,1 DMA) chryisine	83.7 \pm 3.6	12.9 \pm 3.9
6 prényle chryisine	64.7 \pm 3.8	3.7 \pm 5.9
8 prényle galangine	70.5 \pm 5.9	25.4 \pm 3.6
3 OMe galangine	65.9 \pm 1.8	17.4 \pm 2.9
8 prényle OMe galangine	76.4 \pm 2.1	9.9 \pm 3.9
8(1,1 DMA) galangine	70.9 \pm 4.7	16.4 \pm 4.8

4.4. Relation structure/activité

L'étude de la relation structure/fonction des dérivés de la chryisine ou de la galangine s'avère assez décevante. D'une part, la toxicité de ces composés est assez forte en ce qui concerne les cellules contrôle BHK-21. D'autre part, il faudrait disposer de beaucoup plus de dérivés de ces deux flavonoïdes. Néanmoins, ces quelques résultats préliminaires apportent des informations en ce qui concerne les structures chimiques pouvant améliorer l'efficacité fonctionnelle de ces molécules.

L'ajout de groupements hydrophobes tels que les prényles ou les géranyles n'est pas sans conséquence en termes de toxicité. Ces groupements pourraient avoir une influence sur les membranes ou d'autres cibles cellulaires. En effet, l'ajout d'un substitut O-méthyl conduit à une faible toxicité sur les cellules contrôle. D'autre part, ces résultats montrent que l'ajout de groupements hydrophobes sur les positions 6 ou 8 améliore l'efficacité de la molécule, alors que l'ajout de deux groupements sur la même molécule diminue fortement sa capacité à effluer le GSH. La raison peut alors être une plus faible interaction de la molécule avec le transporteur, car l'ajout de ces deux groupements, qui pointent dans des directions opposées, et qui ont une longueur assez conséquente, peut conduire à un encombrement stérique de la molécule ne lui permettant plus d'accéder au site de fixation de ces modulateurs. Cette donnée apporte alors une information intéressante en ce qui concerne la géométrie de ce site.

Enfin, il serait intéressant, en parallèle des résultats obtenus pour les dérivés du vérapamil, de créer un phamacophore à partir de ces différentes structures. Un tel modèle permettrait d'affiner les données structurales nécessaires à l'activité d'un modulateur.

CONCLUSION

MRP1 est un transporteur de multiples drogues de la famille ABC, que l'on associe à la chimiorésistance chez l'Homme. Son rôle initial de détoxification de l'organisme a été détourné par les cellules tumorales dans l'objectif de les protéger contre les traitements chimiothérapeutiques. Il en résulte une chimiorésistance des cancers qui représente un des principaux échecs des traitements anti cancéreux. L'étude des protéines, tel que MRP1, qui sont impliquées dans ce phénomène représente alors un enjeu médical majeur.

La première partie de ce travail, basée sur l'étude des domaines cytoplasmiques de fixation des nucléotides isolés de MRP1, a permis de mettre en évidence le caractère asymétrique des NBD. Les nucléotides induisent des changements conformationnels différents selon qu'il s'agisse de NBD1 ou NBD2, et qu'il s'agisse de l'ATP ou de l'ADP. Ces résultats mettent ainsi en valeur la fonctionnalité de chaque NBD, et que chaque domaine a une fonction propre. Ces résultats peuvent représenter un intérêt important dans la compréhension de la fonction de chaque NBD dans le cycle catalytique du transporteur. Par ailleurs ils mettent en lumière le caractère intrinsèque de ces fonctionnalités différentielles au sein de chaque NBD. Une autre partie de ce travail a consisté en l'étude de l'interaction des substrats et modulateurs de MRP1 avec les NBD. Les résultats obtenus montrent une interaction assez forte de modulateurs tels que le MK571 sur chaque NBD, mais aussi le NMeOHl₂, un dérivé diodé du vérapamil. D'autres substrats tels que le LTC₄, la vincristine, la vinblastine, interagissent avec les deux NBD. Cependant, il semble que seuls les molécules conjugués à du GSH ou des analogues interagissent avec les deux NBD, alors que les drogues chimiothérapeutiques modifient la conformation de NBD1 uniquement. Ainsi, ces résultats pointent la possible implication des NBD de MRP1 dans la fixation des substrats et modulateurs, ce qui pourrait avoir un intérêt important dans la compréhension de la transmission du signal à travers le transporteur entier lors du transport des substrats. L'ensemble de ce travail contribue ainsi à une meilleure connaissance du mode de fonctionnement de MRP1.

La deuxième partie de ce travail de thèse se focalise sur l'approfondissement des études réalisées sur une nouvelle stratégie possible dans la lutte contre la chimiorésistance des cancers. Jusqu'à présent, les recherches menées sur la réversion du phénotype MDR induit par MRP1 se sont concentrées sur la recherche d'inhibiteurs de la fonction de transport de cette protéine. Cependant, le vérapamil a changé cette donne par le fait qu'il stimule massivement l'efflux par MRP1 du GSH hors de la cellule, induisant dans certains cas à la mort cellulaire par apoptose. Il s'agit là d'une nouvelle stratégie visant à cibler les cellules surexprimant MRP1, et à induire un efflux du GSH hors de la cellule, entraînant un choc oxydatif, conduisant à la mort de la cellule. Cette stratégie a de nombreux intérêts, puisque d'une part, les molécules ciblent uniquement les cellules surexprimant MRP1, et d'autre part, la mort cellulaire par apoptose induite est un type de mort cellulaire « propre » à comparé à la nécrose. Cette étude s'est donc attachée à étudier les deux énantiomères du vérapamil, notamment d'un point de vue de leur potentiel à stimuler l'efflux du GSH et à induire la mort cellulaire, afin d'affiner la structure des molécules pouvant être utilisées dans cette nouvelle stratégie. Les résultats obtenus montrent que seul le S-vérapamil induit une stimulation de l'efflux du GSH hors de la cellule, alors que le R-vérapamil inhibe la fonction de transport de MRP1 et gêne l'action du S-vérapamil. Des études biochimiques sur MRP1 ont de plus mis en

évidence la différence fonctionnelle entre les deux énantiomères au niveau moléculaire. Les deux énantiomères semblent se fixer à des sites différents, mais interdépendants, et la fixation de ces molécules induit des changements conformationnels différents. Ces résultats représentent une première, puisqu'ils montrent l'effet différentiel de deux molécules différentes uniquement au niveau d'un carbone asymétrique en ce qui concerne MRP1. Ces résultats rendent compte de l'importance de l'étude des énantiomères dans la recherche de modulateurs, permettant ainsi dans certains cas d'améliorer l'efficacité d'une molécule. Dans ce cadre, une étude sur des dérivés iodés du vérapamil a été menée, afin de déterminer si des modifications chimiques bien spécifiques au sein de la structure du vérapamil pouvaient conduire à des molécules plus actives. Cette étude sera complétée par l'étude de dérivés iodés des énantiomères du vérapamil, tant d'un point de vue du transporteur, que de leur effet toxique sur les cardiomyocytes. En parallèle, une étude a été menée sur deux classes de dérivés de bioflavonoïdes, composés naturels qui peuvent avoir la capacité d'induire le même effet que le vérapamil. Ces résultats, en complément de ceux du vérapamil, pourraient permettre la modélisation informatique d'un pharmacophore. Ce travail devra alors être suivi par des tests cellulaires et sur des animaux plus poussés, afin de déterminer la toxicité de ces composés, leur efficacité, leur pharmacodynamique et cinétique, et aussi la possibilité de cibler des types cellulaires tumorales spécifiques, puisqu'il apparaît que ce phénomène de mort cellulaire induite soit dépendant du type cellulaire. Cette nouvelle pourrait représenter une stratégie alternative moins contraignante pour le patient d'un point de vue des effets secondaires, et avec un meilleur ciblage des tumeurs chimiorésistantes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J and Schinkel AH (1999) The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res* **59**:4237-4241.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V and Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* **58**:5337-5339.
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP and Deeley RG (1995) Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res* **55**:102-110.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I and Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**:361-398.
- Ambudkar SV, Lelong IH, Zhang J and Cardarelli C (1998) Purification and reconstitution of human P-glycoprotein. *Methods Enzymol* **292**:492-504.
- Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* **113**:548-555.
- Aoki S, Chen ZS, Higasiyama K, Setiawan A, Akiyama S and Kobayashi M (2001) Reversing effect of agosterol A, a spongian sterol acetate, on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* **92**:886-895.
- Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD and Fairbairn LJ (2003) Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**:C584-591.
- Avendano C and Menendez JC (2002) Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR). *Curr Med Chem* **9**:159-193.
- Awasthi S, Srivastava SK, Ahmad F, Ahmad H and Ansari GA (1993) Interactions of glutathione S-transferase-pi with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochim Biophys Acta* **1164**:173-178.
- Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R and Peters-Golden M (1996) Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from Klebsiella pneumonia in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* **157**:5221-5224.
- Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A and Sarkadi B (2000a) Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* **113 Pt 24**:4451-4461.
- Bakos E, Evers R, Sinko E, Varadi A, Borst P and Sarkadi B (2000b) Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol Pharmacol* **57**:760-768.

- Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Varadi A and Sarkadi B (1998) Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* **273**:32167-32175.
- Bakos E, Hegedus T, Hollo Z, Welker E, Tusnady GE, Zaman GJ, Flens MJ, Varadi A and Sarkadi B (1996) Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **271**:12322-12326.
- Bakos E, Klein I, Welker E, Szabo K, Muller M, Sarkadi B and Varadi A (1997) Characterization of the human multidrug resistance protein containing mutations in the ATP-binding cassette signature region. *Biochem J* **323 (Pt 3)**:777-783.
- Bauer BE, Wolfger H and Kuchler K (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**:217-236.
- Beaudet L and Gros P (1995) Functional dissection of P-glycoprotein nucleotide-binding domains in chimeric and mutant proteins. Modulation of drug resistance profiles. *J Biol Chem* **270**:17159-17170.
- Beaudet L, Urbatsch IL and Gros P (1998) Mutations in the nucleotide-binding sites of P-glycoprotein that affect substrate specificity modulate substrate-induced adenosine triphosphatase activity. *Biochemistry* **37**:9073-9082.
- Beck WT, Mueller TJ and Tanzer LR (1979) Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res* **39**:2070-2076.
- Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B and Pastan I (2001) MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med* **7**:509-516.
- Berger W, Setinek U, Hollaus P, Zidek T, Steiner E, Elbling L, Cantonati H, Attems J, Gsur A and Micksche M (2005) Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol* **131**:355-363.
- Binyamin L, Assaraf YG and Reiter Y (2005) Probing ATP-dependent conformational changes in the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) in live tumor cells with a novel recombinant single-chain Fv antibody targeted to the extracellular N-terminus. *Int J Cancer* **116**:703-709.
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ and Schmitz G (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* **22**:347-351.
- Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* **1461**:347-357.

-
- Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Tromprier D, Perrotton T and Di Pietro A (2005) Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev* **25**:453-472.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Bradshaw DM and Arceci RJ (1998) Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol* **16**:3674-3690.
- Brandsch M, Brandsch C, Prasad PD, Ganapathy V, Hopfer U and Leibach FH (1995) Identification of a renal cell line that constitutively expresses the kidney-specific high-affinity H⁺/peptide cotransporter. *Faseb J* **9**:1489-1496.
- Brouillard R and Cheminat A (1988) Flavonoids and plant color. *Prog Clin Biol Res* **280**:93-106.
- Burg D and Mulder GJ (2002) Glutathione conjugates and their synthetic derivatives as inhibitors of glutathione-dependent enzymes involved in cancer and drug resistance. *Drug Metab Rev* **34**:821-863.
- Campbell JD, Koike K, Moreau C, Sansom MS, Deeley RG and Cole SP (2004) Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe594 in transmembrane helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1). *J Biol Chem* **279**:463-468.
- Candeil L, Gourdiere I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F, Orsetti B, Scheffer GL, Ychou M, Khan QA, Pommier Y, Pau B, Martineau P and Del Rio M (2004) ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer* **109**:848-854.
- Carlsen SV, Till JE and Ling V (1977) Modulation of drug permeability in Chinese hamster ovary cells. Possible role for phosphorylation of surface glycoproteins. *Biochim Biophys Acta* **467**:238-250.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**:936-942.
- Casley-Smith JR (1986) The importance of the lymphatic system. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **24**:53.
- Center MS (1983) Evidence that adriamycin resistance in Chinese hamster lung cells is regulated by phosphorylation of a plasma membrane glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **115**:159-166.
- Chang C, Ekins S, Bahadduri P and Swaan PW (2006) Pharmacophore-based discovery of ligands for drug transporters. *Adv Drug Deliv Rev* **58**:1431-1450.
- Chang C and Swaan PW (2006) Computational approaches to modeling drug transporters. *Eur J Pharm Sci* **27**:411-424.

-
- Chang G (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* **330**:419-430.
- Chang G and Roth CB (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**:1793-1800.
- Chang XB, Hou YX and Riordan JR (1997) ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **272**:30962-30968.
- Chang XB, Hou YX and Riordan JR (1998) Stimulation of ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein by nucleoside diphosphates. *J Biol Chem* **273**:23844-23848.
- Chaudhary PM and Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**:85-94.
- Chearwae W, Wu CP, Chu HY, Lee TR, Ambudkar SV and Limtrakul P (2006) Curcuminoids purified from turmeric powder modulate the function of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Cancer Chemother Pharmacol* **57**:376-388.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM and Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**:381-389.
- Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM and Roninson IB (1990) Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* **265**:506-514.
- Chen ZS, Aoki S, Komatsu M, Ueda K, Sumizawa T, Furukawa T, Okumura H, Ren XQ, Belinsky MG, Lee K, Kruh GD, Kobayashi M and Akiyama S (2001) Reversal of drug resistance mediated by multidrug resistance protein (MRP) 1 by dual effects of agosterol A on MRP1 function. *Int J Cancer* **93**:107-113.
- Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R and Tolosa S (1988) A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases. *Anal Biochem* **168**:1-4.
- Cole SP (1990) Patterns of cross-resistance in a multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* **26**:250-256.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM and Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**:1650-1654.
- Cole SP and Deeley RG (1993) Multidrug resistance-associated protein: sequence correction. *Science* **260**:879.
- Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM and Deeley RG (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* **54**:5902-5910.

-
- Conrad S, Kauffmann HM, Ito K, Deeley RG, Cole SP and Schrenk D (2001) Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution. *J Hum Genet* **46**:656-663.
- Conrad S, Kauffmann HM, Ito K, Leslie EM, Deeley RG, Schrenk D and Cole SP (2002) A naturally occurring mutation in MRP1 results in a selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance. *Pharmacogenetics* **12**:321-330.
- Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D and Di Pietro A (1998) Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9831-9836.
- Consoli U, Santonocito A, Stagno F, Fiumara P, Privitera A, Parisi G, Giustolisi GM, Pavone B, Palumbo GA, Di Raimondo F, Milone G, Guglielmo P and Giustolisi R (2002) Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **116**:774-780.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR and Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* **38**:1277-1287.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR and Bertino JR (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:695-698.
- Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA and Imeson J (2000) Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *Eur J Cancer* **36**:901-908.
- Cox DS, Scott KR, Gao H, Raje S and Eddington ND (2001) Influence of multidrug resistance (MDR) proteins at the blood-brain barrier on the transport and brain distribution of enaminone anticonvulsants. *J Pharm Sci* **90**:1540-1552.
- Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C and Remesy C (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* **277**:G120-126.
- Croft KD (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* **854**:435-442.
- Croop JM, Tiller GE, Fletcher JA, Lux ML, Raab E, Goldenson D, Son D, Arciniegas S and Wu RL (1997) Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene* **185**:77-85.
- Cullen KV, Davey RA and Davey MW (2001) Verapamil-stimulated glutathione transport by the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in leukaemia cells. *Biochem Pharmacol* **62**:417-424.
- Dano K (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* **323**:466-483.

- Daoud R, Desneves J, Deady LW, Tilley L, Scheper RJ, Gros P and Georges E (2000a) The multidrug resistance protein is photoaffinity labeled by a quinoline-based drug at multiple sites. *Biochemistry* **39**:6094-6102.
- Daoud R, Kast C, Gros P and Georges E (2000b) Rhodamine 123 binds to multiple sites in the multidrug resistance protein (MRP1). *Biochemistry* **39**:15344-15352.
- Davey RA, Longhurst TJ, Davey MW, Belov L, Harvie RM, Hancox D and Wheeler H (1995) Drug resistance mechanisms and MRP expression in response to epirubicin treatment in a human leukaemia cell line. *Leuk Res* **19**:275-282.
- Davidson AL (2002) Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol* **184**:1225-1233.
- de Lange EC (2004) Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **56**:1793-1809.
- de Wet H, McIntosh DB, Conseil G, Baubichon-Cortay H, Krell T, Jault JM, Daskiewicz JB, Barron D and Di Pietro A (2001) Sequence requirements of the ATP-binding site within the C-terminal nucleotide-binding domain of mouse P-glycoprotein: structure-activity relationships for flavonoid binding. *Biochemistry* **40**:10382-10391.
- Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**:1156-1166.
- Deeley RG and Cole SP (1997) Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* **8**:193-204.
- Deeley RG and Cole SP (2006) Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett* **580**:1103-1111.
- Deeley RG, Westlake C and Cole SP (2006) Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* **86**:849-899.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA and Capasso F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* **65**:337-353.
- Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vonnrhein C, Boos W and Welte W (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *Embo J* **19**:5951-5961.
- Diestra JE, Condom E, Del Muro XG, Scheffer GL, Perez J, Zurita AJ, Munoz-Segui J, Vignes F, Scheper RJ, Capella G, Germa-Lluch JR and Izquierdo MA (2003) Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications. *J Urol* **170**:1383-1387.
- Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germa-Lluch JR and Izquierdo MA (2002) Frequent expression of the multi-drug resistance-associated

-
- protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol* **198**:213-219.
- Diop NK and Hrycyna CA (2005) N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry* **44**:5420-5429.
- Doyle LA and Ross DD (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **22**:7340-7358.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK and Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15665-15670.
- Eskandari S, Wright EM, Kreman M, Starace DM and Zampighi GA (1998) Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11235-11240.
- Evans WE and McLeod HL (2003) Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* **348**:538-549.
- Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J and Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* **83**:375-383.
- Evers R, Zaman GJ, van Deemter L, Jansen H, Calafat J, Oomen LC, Oude Elferink RP, Borst P and Schinkel AH (1996) Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest* **97**:1211-1218.
- Filipits M, Suchomel RW, Dekan G, Haider K, Valdimarsson G, Depisch D and Pirker R (1996) MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res* **2**:1231-1237.
- Fisher GA, Lum BL and Sikic BI (1995) The reversal of multidrug resistance. *Cancer Treat Res* **78**:45-70.
- Fisher GA and Sikic BI (1995a) Clinical studies with modulators of multidrug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am* **9**:363-382.
- Fisher GA and Sikic BI (1995b) Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* **9**:xi-xii.
- Flatgaard JE, Bauer KE and Kauvar LM (1993) Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* **33**:63-70.
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ and Scheper RJ (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* **148**:1237-1247.

- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM and Pastan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:265-269.
- Ford JM, Hait WN, Matlin SA and Benz CC (1991) Modulation of resistance to alkylating agents in cancer cell by gossypol enantiomers. *Cancer Lett* **56**:85-94.
- Fracasso PM, Goldstein LJ, de Alwis DP, Rader JS, Arquette MA, Goodner SA, Wright LP, Fears CL, Gazak RJ, Andre VA, Burgess MF, Slapak CA and Schellens JH (2004) Phase I study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar, in resistant malignancies. *Clin Cancer Res* **10**:7220-7228.
- Gao M, Cui HR, Loe DW, Grant CE, Almquist KC, Cole SP and Deeley RG (2000) Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem* **275**:13098-13108.
- Gao M, Yamazaki M, Loe DW, Westlake CJ, Grant CE, Cole SP and Deeley RG (1998) Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4. *J Biol Chem* **273**:10733-10740.
- Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR and Beck J (1995) The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **208**:345-352.
- Gennuso F, Ferneti C, Tirolo C, Testa N, L'Episcopo F, Caniglia S, Morale MC, Ostrow JD, Pascolo L, Tiribelli C and Marchetti B (2004) Bilirubin protects astrocytes from its own toxicity by inducing up-regulation and translocation of multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2470-2475.
- Germann UA, Ford PJ, Shlyakhter D, Mason VS and Harding MW (1997) Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. *Anticancer Drugs* **8**:141-155.
- Gerrard G, Payne E, Baker RJ, Jones DT, Potter M, Prentice HG, Ethell M, McCullough H, Burgess M, Mehta AB and Ganeshaguru K (2004) Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica* **89**:782-790.
- Gottesman MM and Ambudkar SV (2001) Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr* **33**:453-458.
- Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA and Pastan I (1995) Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet* **29**:607-649.
- Gottesman MM and Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**:385-427.
- Graefe EU, Derendorf H and Veit M (1999) Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* **37**:219-233.

- Graefe EU and Veit M (1999) Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine* **6**:239-246.
- Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC and Hobbs HH (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* **278**:48275-48282.
- Gribar JJ, Ramachandra M, Hrycyna CA, Dey S and Ambudkar SV (2000) Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J Membr Biol* **173**:203-214.
- Grzywacz MJ, Yang JM and Hait WN (2003) Effect of the multidrug resistance protein on the transport of the antiandrogen flutamide. *Cancer Res* **63**:2492-2498.
- Haber M, Bordow SB, Gilbert J, Madafiglio J, Kavallaris M, Marshall GM, Mechetner EB, Fruehauf JP, Tee L, Cohn SL, Salwen H, Schmidt ML and Norris MD (1999) Altered expression of the MYCN oncogene modulates MRP gene expression and response to cytotoxic drugs in neuroblastoma cells. *Oncogene* **18**:2777-2782.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG and Cole SP (2004) Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol* **65**:1375-1385.
- Haimeur A, Deeley RG and Cole SP (2002) Charged amino acids in the sixth transmembrane helix of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) are critical determinants of transport activity. *J Biol Chem* **277**:41326-41333.
- Hamada H, Hagiwara K, Nakajima T and Tsuruo T (1987) Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: effects of verapamil, trifluoperazine, and phorbol esters. *Cancer Res* **47**:2860-2865.
- Hansson J, Berhane K, Castro VM, Jungnelius U, Mannervik B and Ringborg U (1991) Sensitization of human melanoma cells to the cytotoxic effect of melphalan by the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid. *Cancer Res* **51**:94-98.
- Harborne JB and Paxman GJ (1964) Genetics of Anthocyanin Product in the Radish. *Heredity* **19**:505-506.
- Hassig A, Liang WX, Schwabl H and Stampfli K (1999) Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses* **52**:479-481.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* **96**:67-202.
- Henikoff S, Greene EA, Pietrokovski S, Bork P, Attwood TK and Hood L (1997) Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* **278**:609-614.
- Hidalgo IJ, Raub TJ and Borchardt RT (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**:736-749.

-
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**:67-113.
- Higgins CF (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* **152**:205-210.
- Higgins CF and Gottesman MM (1992) Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **17**:18-21.
- Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW and et al. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**:448-450.
- Higgins CF and Linton KJ (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**:918-926.
- Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG and Cole SP (1997) Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J Biol Chem* **272**:23623-23630.
- Hipfner DR, Deeley RG and Cole SP (1999) Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1461**:359-376.
- Hirrlinger J, König J, Keppler D, Lindenau J, Schulz JB and Dringen R (2001) The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem* **76**:627-636.
- Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA and Brenner MK (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:14228-14233.
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ, Borst P, Pinedo HM and Jansen G (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* **59**:2532-2535.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP and Tainer JA (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**:789-800.
- Hopfner KP and Tainer JA (2003) Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol* **13**:249-255.
- Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR and Kruh GD (2001) Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* **162**:181-191.
- Hou Y, Cui L, Riordan JR and Chang X (2000) Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem* **275**:20280-20287.

-
- Hou YX, Cui L, Riordan JR and Chang XB (2002) ATP binding to the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance protein MRP1 increases binding and hydrolysis of ATP and trapping of ADP at the second domain. *J Biol Chem* **277**:5110-5119.
- Hou YX, Riordan JR and Chang XB (2003) ATP binding, not hydrolysis, at the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance-associated protein MRP1 enhances ADP.Vi trapping at the second domain. *J Biol Chem* **278**:3599-3605.
- Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E and Traxler P (2004) Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res* **64**:2333-2337.
- Hsia TC, Lin CC, Wang JJ, Ho ST and Kao A (2002) Relationship between chemotherapy response of small cell lung cancer and P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein expression. *Lung* **180**:173-179.
- Huet S and Robert J (1988) The reversal of doxorubicin resistance by verapamil is not due to an effect on calcium channels. *Int J Cancer* **41**:283-286.
- Hughes RE and Wilson HK (1977) Flavonoids: some physiological and nutritional considerations. *Prog Med Chem* **14**:285-301.
- Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF and Kim SH (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**:703-707.
- Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL and Hirst BH (1993) Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem* **268**:14991-14997.
- Irie M, Terada T, Tsuda M, Katsura T and Inui K (2006) Prediction of glycy sarcosine transport in Caco-2 cell lines expressing PEPT1 at different levels. *Pflugers Arch* **452**:64-70.
- Irvine JD, Takahashi L, Lockhart K, Cheong J, Tolan JW, Selick HE and Grove JR (1999) MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci* **88**:28-33.
- Ito K, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG and Cole SP (2001a) Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J Biol Chem* **276**:15616-15624.
- Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S and Otsubo K (2001b) Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics* **11**:175-184.
- Jazwinska EC (2001) Exploiting human genetic variation in drug discovery and development. *Drug Discov Today* **6**:198-205.
- Jedlitschky G and Keppler D (2002) Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates. *Vitam Horm* **64**:153-184.

- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G and Keppler D (1996) Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res* **56**:988-994.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B and Keppler D (1997) ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J* **327** (Pt 1):305-310.
- Jones PM and George AM (2002) Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12639-12644.
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH and Schinkel AH (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15649-15654.
- Juliano RL and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**:152-162.
- Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ and Hunt JF (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure* **9**:571-586.
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R and Keppler D (1996) Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **23**:1061-1066.
- Karwatsky J, Daoud R, Cai J, Gros P and Georges E (2003) Binding of a photoaffinity analogue of glutathione to MRP1 (ABCC1) within two cytoplasmic regions (L0 and L1) as well as transmembrane domains 10-11 and 16-17. *Biochemistry* **42**:3286-3294.
- Karwatsky J, Leimanis M, Cai J, Gros P and Georges E (2005) The leucotriene C4 binding sites in multidrug resistance protein 1 (ABCC1) include the first membrane multiple spanning domain. *Biochemistry* **44**:340-351.
- Karwatsky JM and Georges E (2004) Drug binding domains of MRP1 (ABCC1) as revealed by photoaffinity labeling. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **4**:19-30.
- Kast C and Gros P (1997) Topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. *J Biol Chem* **272**:26479-26487.
- Keppler D, Jedlitschky G and Leier I (1998) Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein. *Methods Enzymol* **292**:607-616.
- Kern A, Felfoldi F, Sarkadi B and Varadi A (2000) Expression and characterization of the N- and C-terminal ATP-binding domains of MRP1. *Biochem Biophys Res Commun* **273**:913-919.

- Klein I, Sarkadi B and Varadi A (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**:237-262.
- Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM and Dalton WS (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* **83**:2451-2458.
- Koike K, Conseil G, Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2004) Identification of proline residues in the core cytoplasmic and transmembrane regions of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) important for transport function, substrate specificity, and nucleotide interactions. *J Biol Chem* **279**:12325-12336.
- Koike K, Oleschuk CJ, Haimeur A, Olsen SL, Deeley RG and Cole SP (2002) Multiple membrane-associated tryptophan residues contribute to the transport activity and substrate specificity of the human multidrug resistance protein, MRP1. *J Biol Chem* **277**:49495-49503.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP and Schuetz JD (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **279**:24218-24225.
- Krishnamurthy P and Schuetz JD (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:381-410.
- Kristiansen JE, Hendricks O and Permin H (2004) [Letters from the Nobellaureter Paul Ehrlich to the Director for the State Serum Institute in Copenhagen, Thorvald Madsen]. *Dan Medicinhist Arbog*:173-191.
- Krynetski E and Evans WE (2003) Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* **22**:7403-7413.
- Kuo TH, Liu FY, Chuang CY, Wu HS, Wang JJ and Kao A (2003) To predict response chemotherapy using technetium-99m tetrofosmin chest images in patients with untreated small cell lung cancer and compare with p-glycoprotein, multidrug resistance related protein-1, and lung resistance-related protein expression. *Nucl Med Biol* **30**:627-632.
- Kwon Y, Kamath AV and Morris ME (1996) Inhibitors of P-glycoprotein-mediated daunomycin transport in rat liver canalicular membrane vesicles. *J Pharm Sci* **85**:935-939.
- Laberge RM, Karwatsky J, Lincoln MC, Leimanis ML and Georges E (2007) Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **73**:1727-1737.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG and Keppler D (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* **314** (Pt 2):433-437.

-
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U and Keppler D (1994) Characterization of the ATP-dependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells. *Eur J Biochem* **220**:599-606.
- Leonard GD, Fojo T and Bates SE (2003) The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**:411-424.
- Leslie EM, Bowers RJ, Deeley RG and Cole SP (2003a) Structural requirements for functional interaction of glutathione tripeptide analogs with the human multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* **304**:643-653.
- Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2001a) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* **167**:3-23.
- Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2003b) Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metab Dispos* **31**:11-15.
- Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**:216-237.
- Leslie EM, Haimeur A and Waalkes MP (2004) Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem* **279**:32700-32708.
- Leslie EM, Ito K, Upadhyaya P, Hecht SS, Deeley RG and Cole SP (2001b) Transport of the beta -O-glucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog. *J Biol Chem* **276**:27846-27854.
- Leslie EM, Letourneau IJ, Deeley RG and Cole SP (2003c) Functional and structural consequences of cysteine substitutions in the NH2 proximal region of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochemistry* **42**:5214-5224.
- Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG and Cole SP (2001c) Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol Pharmacol* **59**:1171-1180.
- Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Connors K, Condon B, Maloney PC, Guggino WB, Hunt JF and Emtage S (2005) Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem* **280**:1346-1353.
- Linton KJ and Higgins CF (1998) The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**:5-13.
- Liscovitch M and Lavie Y (2000) Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem Sci* **25**:530-534.

-
- Liu XD and Liu GQ (2001) P glycoprotein regulated transport of glutamate at blood brain barrier. *Acta Pharmacol Sin* **22**:111-116.
- Locher KP, Lee AT and Rees DC (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-1098.
- Loe DW, Almquist KC, Cole SP and Deeley RG (1996a) ATP-dependent 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids. *J Biol Chem* **271**:9683-9689.
- Loe DW, Almquist KC, Deeley RG and Cole SP (1996b) Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem* **271**:9675-9682.
- Loe DW, Deeley RG and Cole SP (1998) Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* **58**:5130-5136.
- Loe DW, Deeley RG and Cole SP (2000a) Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* **293**:530-538.
- Loe DW, Oleschuk CJ, Deeley RG and Cole SP (2000b) Structure-activity studies of verapamil analogs that modulate transport of leukotriene C(4) and reduced glutathione by multidrug resistance protein MRP1. *Biochem Biophys Res Commun* **275**:795-803.
- Loe DW, Stewart RK, Massey TE, Deeley RG and Cole SP (1997) ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Mol Pharmacol* **51**:1034-1041.
- Loew GH, Villar HO and Alkorta I (1993) Strategies for indirect computer-aided drug design. *Pharm Res* **10**:475-486.
- Loo TW, Bartlett MC and Clarke DM (2002) The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence. *J Biol Chem* **277**:41303-41306.
- Loo TW, Bartlett MC and Clarke DM (2003) Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains. *J Biol Chem* **278**:1575-1578.
- Loo TW and Clarke DM (2000a) Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein is blocked by disulfide cross-linking between the nucleotide-binding sites. *J Biol Chem* **275**:19435-19438.
- Loo TW and Clarke DM (2000b) The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis. *J Biol Chem* **275**:5253-5256.
- Loo TW and Clarke DM (2001) Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J Biol Chem* **276**:36877-36880.

-
- Loo TW and Clarke DM (2002) Vanadate trapping of nucleotide at the ATP-binding sites of human multidrug resistance P-glycoprotein exposes different residues to the drug-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3511-3516.
- Lorico A, Bertola A, Baum C, Fodstad O and Rappa G (2002) Role of the Multidrug Resistance Protein 1 in protection from heavy metal oxyanions: investigations in vitro and in MRP1-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* **291**:617-622.
- Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA and Sartorelli AC (1997) Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res* **57**:5238-5242.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ and Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **61**:3458-3464.
- Manciu L, Chang X, Riordan JR, Buyse F and Ruyschaert JM (2001) Nucleotide-induced conformational changes in the human multidrug resistance protein MRP1 are related to the capacity of chemotherapeutic drugs to accumulate or not in resistant cells. *FEBS Lett* **493**:31-35.
- Manciu L, Chang XB, Buyse F, Hou YX, Gustot A, Riordan JR and Ruyschaert JM (2003) Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem* **278**:3347-3356.
- Manciu L, Chang XB, Riordan JR and Ruyschaert JM (2000) Multidrug resistance protein MRP1 reconstituted into lipid vesicles: secondary structure and nucleotide-induced tertiary structure changes. *Biochemistry* **39**:13026-13033.
- Mao Q, Deeley RG and Cole SP (2000) Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **275**:34166-34172.
- Mao Q, Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (1999) ATPase activity of purified and reconstituted multidrug resistance protein MRP1 from drug-selected H69AR cells. *Biochim Biophys Acta* **1461**:69-82.
- Mao Q, Qiu W, Weigl KE, Lander PA, Tabas LB, Shepard RL, Dantzig AH, Deeley RG and Cole SP (2002) GSH-dependent photolabeling of multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) by [¹²⁵I]LY475776. Evidence of a major binding site in the COOH-proximal membrane spanning domain. *J Biol Chem* **277**:28690-28699.
- Matthay KK (1995) Neuroblastoma: a clinical challenge and biologic puzzle. *CA Cancer J Clin* **45**:179-192.
- Mayer D, Naylor CB, Motoc I and Marshall GR (1987) A unique geometry of the active site of angiotensin-converting enzyme consistent with structure-activity studies. *J Comput Aided Mol Des* **1**:3-16.
- Mellado W and Horwitz SB (1987) Phosphorylation of the multidrug resistance associated glycoprotein. *Biochemistry* **26**:6900-6904.

-
- Mercier C, Masseguin C, Roux F, Gabrion J and Scherrmann JM (2004) Expression of P-glycoprotein (ABCB1) and Mrp1 (ABCC1) in adult rat brain: focus on astrocytes. *Brain Res* **1021**:32-40.
- Middleton EM and Teramura AH (1993) The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. *Plant Physiol* **103**:741-752.
- Mirski SE, Gerlach JH and Cole SP (1987) Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res* **47**:2594-2598.
- Misra S, Ujhazy P, Gatmaitan Z, Varticovski L and Arias IM (1998) The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J Biol Chem* **273**:26638-26644.
- Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S and Spiegel S (2006) Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16394-16399.
- Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T and Bates SE (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* **59**:8-13.
- Mogi M, Yang J, Lambert JF, Colvin GA, Shiojima I, Skurk C, Summer R, Fine A, Quesenberry PJ and Walsh K (2003) Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. *J Biol Chem* **278**:39068-39075.
- Mohrmann K, van Eijndhoven MA, Schinkel AH and Schellens JH (2005) Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Cancer Chemother Pharmacol* **56**:344-350.
- Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF and Thomas PJ (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* **277**:21111-21114.
- Mortenson LE and Thorneley RN (1979) Structure and function of nitrogenase. *Annu Rev Biochem* **48**:387-418.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL and Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**:726-730.
- Moyano E, Martinez-Garcia JF and Martin C (1996) Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers. *Plant Cell* **8**:1519-1532.
- Mukohata Y, Nakabayashi S and Higashida M (1978) Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett* **85**:215-218.

-
- Nagashige M, Ushigome F, Koyabu N, Hirata K, Kawabuchi M, Hirakawa T, Satoh S, Tsukimori K, Nakano H, Uchiumi T, Kuwano M, Ohtani H and Sawada Y (2003) Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta* **24**:951-958.
- Nagata K, Nishitani M, Matsuo M, Kioka N, Amachi T and Ueda K (2000) Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem* **275**:17626-17630.
- Nakamura Y, Oka M, Soda H, Shiozawa K, Yoshikawa M, Itoh A, Ikegami Y, Tsurutani J, Nakatomi K, Kitazaki T, Doi S, Yoshida H and Kohno S (2005) Gefitinib ("Iressa", ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance. *Cancer Res* **65**:1541-1546.
- Nooter K, Bosman FT, Burger H, van Wingerden KE, Flens MJ, Scheper RJ, Oostrum RG, Boersma AW, van der Gaast A and Stoter G (1996) Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **7**:75-81.
- Nooter K, Brutel de la Riviere G, Look MP, van Wingerden KE, Henzen-Logmans SC, Scheper RJ, Flens MJ, Klijn JG, Stoter G and Foekens JA (1997a) The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br J Cancer* **76**:486-493.
- Nooter K, de la Riviere GB, Klijn J, Stoter G and Foekens J (1997b) Multidrug resistance protein in recurrent breast cancer. *Lancet* **349**:1885-1886.
- O'Brien ML, Vulevic B, Freer S, Boyd J, Shen H and Tew KD (1999) Glutathione peptidomimetic drug modulator of multidrug resistance-associated protein. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:1348-1355.
- Oleschuk CJ, Deeley RG and Cole SP (2003) Substitution of Trp1242 of TM17 alters substrate specificity of human multidrug resistance protein 3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G280-289.
- Oselin K, Mrozikiewicz PM, Gaikovitch E, Pahkla R and Roots I (2003) Frequency of MRP1 genetic polymorphisms and their functional significance in Caucasians: detection of a novel mutation G816A in the human MRP1 gene. *Eur J Clin Pharmacol* **59**:347-350.
- Ozvegy C, Litman T, Szakacs G, Nagy Z, Bates S, Varadi A and Sarkadi B (2001) Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**:111-117.
- Ozvegy C, Varadi A and Sarkadi B (2002) Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem* **277**:47980-47990.
- Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Varady G, Ujhelly O, Schuetz JD, Varadi A, Keri G, Orfi L, Nemet K and Sarkadi B (2004) High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol* **65**:1485-1495.

-
- Palmiter RD, Behringer RR, Quaife CJ, Maxwell F, Maxwell IH and Brinster RL (1987) Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* **50**:435-443.
- Payen L, Gao M, Westlake C, Theis A, Cole SP and Deeley RG (2005) Functional interactions between nucleotide binding domains and leukotriene C4 binding sites of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Mol Pharmacol* **67**:1944-1953.
- Payen LF, Gao M, Westlake CJ, Cole SP and Deeley RG (2003) Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J Biol Chem* **278**:38537-38547.
- Peng KC, Cluzeaud F, Bens M, Van Huyen JP, Wioland MA, Lacave R and Vandewalle A (1999) Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem Cytochem* **47**:757-768.
- Pereira E, Teodori E, Dei S, Gualtieri F and Garnier-Suillerot A (1995) Reversal of multidrug resistance by verapamil analogues. *Biochem Pharmacol* **50**:451-457.
- Pforte H, Hempel J and Jacobasch G (1999) Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and wall of rats. *Nahrung* **43**:205-208.
- Pleban K, Kaiser D, Kopp S, Peer M, Chiba P and Ecker GF (2005) Targeting drug-efflux pumps -- a pharmacoinformatic approach. *Acta Biochim Pol* **52**:737-740.
- Ploemen JH, van Ommen B and van Bladeren PJ (1990) Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem Pharmacol* **40**:1631-1635.
- Polgar O, Robey RW, Morisaki K, Dean M, Michejda C, Sauna ZE, Ambudkar SV, Tarasova N and Bates SE (2004) Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry* **43**:9448-9456.
- Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO and Serabjit-Singh CS (2001) Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:620-628.
- Posada J, Vichi P and Tritton TR (1989a) Protein kinase C in adriamycin action and resistance in mouse sarcoma 180 cells. *Cancer Res* **49**:6634-6639.
- Posada JA, McKeegan EM, Worthington KF, Morin MJ, Jaken S and Tritton TR (1989b) Human multidrug resistant KB cells overexpress protein kinase C: involvement in drug resistance. *Cancer Commun* **1**:285-292.
- Poulain S, Lepelley P, Preudhomme C, Cambier N, Cornillon J, Wattel E, Cosson A and Fenaux P (2000) Expression of the multidrug resistance-associated protein in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* **110**:591-598.
- Priebe W, Krawczyk M, Kuo MT, Yamane Y, Savaraj N and Ishikawa T (1998) Doxorubicin- and daunorubicin-glutathione conjugates, but not unconjugated drugs, competitively inhibit leukotriene C4 transport mediated by MRP/GS-X pump. *Biochem Biophys Res Commun* **247**:859-863.

- Qian YM, Grant CE, Westlake CJ, Zhang DW, Lander PA, Shepard RL, Dantzig AH, Cole SP and Deeley RG (2002) Photolabeling of human and murine multidrug resistance protein 1 with the high affinity inhibitor [125I]LY475776 and azidophenacyl-[35S]glutathione. *J Biol Chem* **277**:35225-35231.
- Qian YM, Qiu W, Gao M, Westlake CJ, Cole SP and Deeley RG (2001a) Characterization of binding of leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 1: evidence of differential interactions with NH₂- and COOH-proximal halves of the protein. *J Biol Chem* **276**:38636-38644.
- Qian YM, Song WC, Cui H, Cole SP and Deeley RG (2001b) Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem* **276**:6404-6411.
- Rago RP, Einstein A, Jr., Lush R, Beer TM, Ko YJ, Henner WD, Bubley G, Merica EA, Garg V, Ette E, Harding MW and Dalton WS (2003) Safety and efficacy of the MDR inhibitor Incel (biricodar, VX-710) in combination with mitoxantrone and prednisone in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**:297-305.
- Ramaen O, Leulliot N, Sizun C, Ulryck N, Pamlard O, Lallemand JY, Tilbeurgh H and Jacquet E (2006) Structure of the human multidrug resistance protein 1 nucleotide binding domain 1 bound to Mg²⁺/ATP reveals a non-productive catalytic site. *J Mol Biol* **359**:940-949.
- Ramaen O, Sizun C, Pamlard O, Jacquet E and Lallemand JY (2005) Attempts to characterize the NBD heterodimer of MRP1: transient complex formation involves Gly771 of the ABC signature sequence but does not enhance the intrinsic ATPase activity. *Biochem J* **391**:481-490.
- Raviv Y, Puri A and Blumenthal R (2000) P-glycoprotein-overexpressing multidrug-resistant cells are resistant to infection by enveloped viruses that enter via the plasma membrane. *Faseb J* **14**:511-515.
- Ren XQ, Furukawa T, Aoki S, Nakajima T, Sumizawa T, Haraguchi M, Chen ZS, Kobayashi M and Akiyama S (2001) Glutathione-dependent binding of a photoaffinity analog of agosterol A to the C-terminal half of human multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **276**:23197-23206.
- Ren XQ, Furukawa T, Aoki S, Sumizawa T, Haraguchi M, Che XF, Kobayashi M and Akiyama S (2003) Localization of the GSH-dependent photolabelling site of an agosterol A analog on human MRP1. *Br J Pharmacol* **138**:1553-1561.
- Ren XQ, Furukawa T, Aoki S, Sumizawa T, Haraguchi M, Nakajima Y, Ikeda R, Kobayashi M and Akiyama S (2002) A positively charged amino acid proximal to the C-terminus of TM17 of MRP1 is indispensable for GSH-dependent binding of substrates and for transport of LTC₄. *Biochemistry* **41**:14132-14140.
- Reus J, de Vries EE, Hooiveld GJ, Krikken I, Jansen PL and Muller M (2000) Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochem J* **350 Pt 2**:555-561.

-
- Renes J, de Vries EG, Nienhuis EF, Jansen PL and Muller M (1999) ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br J Pharmacol* **126**:681-688.
- Richert ND, Aldwin L, Nitecki D, Gottesman MM and Pastan I (1988) Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells. *Biochemistry* **27**:7607-7613.
- Riordan JR and Ling V (1979) Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem* **254**:12701-12705.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL and et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**:1066-1073.
- Robert J (1994) [Structure and function of P-glycoprotein]. *Bull Cancer* **81**:400-408.
- Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ, Kuipers F, Koning H, Moshage H, Jansen PL and Muller M (1997) Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology* **112**:511-521.
- Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC and Higgins CF (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* **272**:10685-10694.
- Rosenberg MF, Callaghan R, Modok S, Higgins CF and Ford RC (2005) Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J Biol Chem* **280**:2857-2862.
- Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC and Riordan JR (2004) Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* **279**:39051-39057.
- Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF and Ford RC (2003) Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem* **278**:8294-8299.
- Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG and Cole SP (2001a) The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem* **276**:16076-16082.
- Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, Callaghan R, Schmidlin A, Wooding C, Linton KJ and Higgins CF (2001b) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo J* **20**:5615-5625.
- Ross DD, Karp JE, Chen TT and Doyle LA (2000) Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* **96**:365-368.

- Rothnie A, Callaghan R, Deeley RG and Cole SP (2006) Role of GSH in estrone sulfate binding and translocation by the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *J Biol Chem* **281**:13906-13914.
- Sakamoto H, Hara H, Hirano K and Adachi T (1999) Enhancement of glucuronosyl etoposide transport by glutathione in multidrug resistance-associated protein-overexpressing cells. *Cancer Lett* **135**:113-119.
- Salerno M and Garnier-Suillerot A (2001) Kinetics of glutathione and daunorubicin efflux from multidrug resistance protein overexpressing small-cell lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* **421**:1-9.
- Salerno M, Loechariyakul P, Saengkhae C and Garnier-Suillerot A (2004) Relation between the ability of some compounds to modulate the MRP1-mediated efflux of glutathione and to inhibit the MRP1-mediated efflux of daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **68**:2159-2165.
- Sampson KE, McCroskey MC and Abraham I (1993) Identification of a 170 kDa membrane kinase with increased activity in KB-V1 multidrug resistant cells. *J Cell Biochem* **52**:384-395.
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA and Serhan CN (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**:1171-1176.
- Saraste M, Sibbald PR and Wittinghofer A (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**:430-434.
- Schinkel AH, Arceci RJ, Smit JJ, Wagenaar E, Baas F, Dolle M, Tsuruo T, Mechetner EB, Roninson IB and Borst P (1993a) Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein. *Int J Cancer* **55**:478-484.
- Schinkel AH, Kemp S, Dolle M, Rudenko G and Wagenaar E (1993b) N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem* **268**:7474-7481.
- Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB and Stubbs MT (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol* **330**:333-342.
- Schneider E, Yamazaki H, Sinha BK and Cowan KH (1995) Buthionine sulphoximine-mediated sensitisation of etoposide-resistant human breast cancer MCF7 cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein involves increased drug accumulation. *Br J Cancer* **71**:738-743.
- Schultz MJ, Wijnholds J, Peppelenbosch MP, Vervoordeldonk MJ, Speelman P, van Deventer SJ, Borst P and van der Poll T (2001) Mice lacking the multidrug resistance protein 1 are resistant to *Streptococcus pneumoniae*-induced pneumonia. *J Immunol* **166**:4059-4064.
- Seelig A (1998a) A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **251**:252-261.

-
- Seelig A (1998b) How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Int J Clin Pharmacol Ther* **36**:50-54.
- Seelig A, Blatter XL and Wohnsland F (2000) Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison. *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**:111-121.
- Shapiro AB and Ling V (1994) ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **269**:3745-3754.
- Shoichet BK (2004) Virtual screening of chemical libraries. *Nature* **432**:862-865.
- Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Brophy NA, Yahanda AM, Adler KM and Halsey J (1994) Clinical reversal of multidrug resistance. *Cancer Treat Res* **73**:149-165.
- Situ D, Haimeur A, Conseil G, Sparks KE, Zhang D, Deeley RG and Cole SP (2004) Mutational analysis of ionizable residues proximal to the cytoplasmic interface of membrane spanning domain 3 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1): glutamate 1204 is important for both the expression and catalytic activity of the transporter. *J Biol Chem* **279**:38871-38880.
- Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ and Hunt JF (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* **10**:139-149.
- Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK and Rice-Evans C (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* **458**:224-230.
- Srivastava P, Sharma PK and Dogra RC (1999) Inducers of nod genes of *Rhizobium ciceri*. *Microbiol Res* **154**:49-55.
- Staats J, Marquardt D and Center MS (1990) Characterization of a membrane-associated protein kinase of multidrug-resistant HL60 cells which phosphorylates P-glycoprotein. *J Biol Chem* **265**:4084-4090.
- Stewart BH, Chan OH, Lu RH, Reyner EL, Schmid HL, Hamilton HW, Steinbaugh BA and Taylor MD (1995) Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharm Res* **12**:693-699.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoechli M, Lauper U, Meier PJ and Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**:R1495-1503.
- Stride BD, Cole SP and Deeley RG (1999) Localization of a substrate specificity domain in the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **274**:22877-22883.
- Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S and Mori S (1988) Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* **48**:1926-1929.

-
- Sugawara I, Yamada H, Nakamura H, Sumizawa T, Akiyama S, Masunaga A and Itoyama S (1995) Preferential expression of the multidrug-resistance-associated protein (MRP) in adenocarcinoma of the lung. *Int J Cancer* **64**:322-325.
- Sullivan GF, Amenta PS, Villanueva JD, Alvarez CJ, Yang JM and Hait WN (1998) The expression of drug resistance gene products during the progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res* **4**:1393-1403.
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y and Sugiyama Y (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* **278**:22644-22649.
- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C and Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**:219-234.
- Szentpetery Z, Kern A, Liliom K, Sarkadi B, Varadi A and Bakos E (2004) The role of the conserved glycines of ATP-binding cassette signature motifs of MRP1 in the communication between the substrate-binding site and the catalytic centers. *J Biol Chem* **279**:41670-41678.
- Takada T, Suzuki H, Gotoh Y and Sugiyama Y (2005) Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state of Akt in polarized cells. *Drug Metab Dispos* **33**:905-909.
- Teodori E, Dei S, Quidu P, Budriesi R, Chiarini A, Garnier-Suillerot A, Gualtieri F, Manetti D, Romanelli MN and Scapecchi S (1999) Design, synthesis, and in vitro activity of catamphiphilic reverters of multidrug resistance: discovery of a selective, highly efficacious chemosensitizer with potency in the nanomolar range. *J Med Chem* **42**:1687-1697.
- Tew KD, Bomber AM and Hoffman SJ (1988) Ethacrynic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res* **48**:3622-3625.
- Thanabalu T, Koronakis E, Hughes C and Koronakis V (1998) Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo J* **17**:6487-6496.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7735-7738.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* **37**:159-164.
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**:502-522.

- Trompier D, Baubichon-Cortay H, Chang XB, Maitrejean M, Barron D, Riordon JR and Di Pietro A (2003) Multiple flavonoid-binding sites within multidrug resistance protein MRP1. *Cell Mol Life Sci* **60**:2164-2177.
- Trompier D, Chang XB, Barattin R, du Moulinet D'Hardemare A, Di Pietro A and Baubichon-Cortay H (2004) Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res* **64**:4950-4956.
- Tsuruo T, Iida H, Nojiri M, Tsukagoshi S and Sakurai Y (1983a) Circumvention of vincristine and Adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Res* **43**:2905-2910.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* **41**:1967-1972.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y (1983b) Potentiation of vincristine and Adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* **43**:2267-2272.
- Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kashiwagi A and Olefsky JM (2004) Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**:8778-8789.
- Versantvoort CH, Broxterman HJ, Lankelma J, Feller N and Pinedo HM (1994) Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* **48**:1129-1136.
- Versantvoort CH, Schuurhuis GJ, Pinedo HM, Eekman CA, Kuiper CM, Lankelma J and Broxterman HJ (1993) Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells. *Br J Cancer* **68**:939-946.
- Wada S, He P, Watanabe N, Sakata K and Sugiyama K (1999) Suppression of D-galactosamine-induced rat liver injury by glycosidic flavonoids-rich fraction from green tea. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**:570-572.
- Wadkins RM, Hyatt JL, Yoon KJ, Morton CL, Lee RE, Damodaran K, Beroza P, Danks MK and Potter PM (2004) Discovery of novel selective inhibitors of human intestinal carboxylesterase for the amelioration of irinotecan-induced diarrhea: synthesis, quantitative structure-activity relationship analysis, and biological activity. *Mol Pharmacol* **65**:1336-1343.
- Wierdl M, Wall A, Morton CL, Sampath J, Danks MK, Schuetz JD and Potter PM (2003) Carboxylesterase-mediated sensitization of human tumor cells to CPT-11 cannot override ABCG2-mediated drug resistance. *Mol Pharmacol* **64**:279-288.
- Wilson HK, Hassall C, Price Jones C and Hughes RE (1976) Orange-peel flavonoids and the growth and ascorbic acid status of hypovitaminotic C guinea-pigs [proceedings]. *Proc Nutr Soc* **35**:120A-121A.

- Wu P, Oleschuk CJ, Mao Q, Keller BO, Deeley RG and Cole SP (2005) Analysis of human multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry: toward identification of leukotriene C4 binding sites. *Mol Pharmacol* **68**:1455-1465.
- Xia CQ, Liu N, Yang D, Miwa G and Gan LS (2005) Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* **33**:637-643.
- Xu J, Liu Y, Yang Y, Bates S and Zhang JT (2004) Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* **279**:19781-19789.
- Yang R, McBride A, Hou YX, Goldberg A and Chang XB (2005) Nucleotide dissociation from NBD1 promotes solute transport by MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1668**:248-261.
- Zager RA (2001) P glycoprotein-mediated cholesterol cycling determines proximal tubular cell viability. *Kidney Int* **60**:944-956.
- Zhang DW, Cole SP and Deeley RG (2001a) Identification of a nonconserved amino acid residue in multidrug resistance protein 1 important for determining substrate specificity: evidence for functional interaction between transmembrane helices 14 and 17. *J Biol Chem* **276**:34966-34974.
- Zhang DW, Cole SP and Deeley RG (2001b) Identification of an amino acid residue in multidrug resistance protein 1 critical for conferring resistance to anthracyclines. *J Biol Chem* **276**:13231-13239.
- Zhang DW, Nunoya K, Vasa M, Gu HM, Theis A, Cole SP and Deeley RG (2004) Transmembrane helix 11 of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): identification of polar amino acids important for substrate specificity and binding of ATP at nucleotide binding domain 1. *Biochemistry* **43**:9413-9425.
- Zhao Q and Chang XB (2004) Mutation of the aromatic amino acid interacting with adenine moiety of ATP to a polar residue alters the properties of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem* **279**:48505-48512.
- Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD and Sorrentino BP (2002) Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12339-12344.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H and Sorrentino BP (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* **7**:1028-1034.

PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS

Publications:

1. Boumendjel, A., Baubichon-Cortay H., Tromprier D., **Perrotton T.**, Di Pietro A., *Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents*. Med Res Rev, 2005. **25**(4): p. 453-72.
2. **Perrotton, T.**, Tromprier D., Chang X.B., Di Pietro A, Baubichon-Cortay H., *S- and R-verapamil differentially modulate the multidrug resistance protein MRP1*. J Biol Chem, 2007. (sous presse)

Communications:

1. Substrates binding to MRP1 Nucleotides Binding Domains. **Thomas Perrotton**, Doriane Tromprier, David McIntosh, Attilio Di Pietro and H el ene Baubichon-Cortay. Multi-drug Efflux Systems. Gordon Research Conferences. Magdalen College, Oxford, United Kingdom. 28 Ao t-02 septembre 2005.
2. Nucleotide Binding Domains of Multidrug Resistance Protein 1 participate in natural substrate and drug binding. **Thomas Perrotton**, Doriane Tromprier, David McIntosh, Attilio Di Pietro and H el ene Baubichon-Cortay. ABC Meeting 2006. Innsbruck, Austria. 4-11 mars 2006.
3. Differential use of verapamil enantiomers in order to modulate the MDR phenotype induced by MRP1. **Thomas Perrotton**, Doriane Tromprier, Attilio Di Pietro and H el ene Baubichon-Cortay. Meeting Franco-Belge 2006. Paris, France. 6 octobre 2006.
4. Nucleotide Binding Domains of Multidrug Resistance Protein 1 participate in natural substrate and drug binding. **Thomas Perrotton**, Doriane Tromprier, David McIntosh, Attilio Di Pietro and H el ene Baubichon-Cortay. 10^{ me} Journ e de l'EDISS. Universit  Claude Benard Lyon 1, Villeurbanne, France. 4-11 mars 2006.
5. Differential use of verapamil enantiomers in order to modulate the MDR phenotype I nduced by MRP1. **Thomas Perrotton**, Doriane Tromprier, Attilio Di Pietro and H el ene Baubichon-Cortay. European Youth Scientists Forum. Vienna, Austria. 5-12 juillet 2007.
6. Differential use of verapamil enantiomers in order to modulate the MDR phenotype I nduced by MRP1. **Thomas Perrotton**, Doriane Tromprier, Attilio Di Pietro and H el ene Baubichon-Cortay. 32nd FEBBS Congress. Vienna, Austria. 7-12 juillet 2007.

PUBLICATIONS

(R)- and (S)-Verapamil Differentially Modulate the Multidrug-resistant Protein MRP1*

Received for publication, May 14, 2007, and in revised form, July 19, 2007. Published, JBC Papers in Press, July 22, 2007, DOI 10.1074/jbc.M703964200

Thomas Perrotton[†], Doriane Tromprier[†], Xiu-Bao Chang[‡], Attilio Di Pietro[†], and Hélène Baubichon-Cortay^{†1}

From the [†]Laboratoire des Protéines de Résistance aux Agents Chimiothérapeutiques, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086, IFR 128 BioSciences Lyon-Gerland, CNRS/Université de Lyon, 69367 Lyon Cedex 07, France and the [‡]S. C. Johnson Medical Research Center, Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona 85259

The multidrug-resistant protein MRP1 (involved in the cancer cell multidrug resistance phenotype) has been found to be modulated by racemic verapamil (through stimulation of glutathione transport), inducing apoptosis of human MRP1 cDNA-transfected baby hamster kidney 21 (BHK-21) cells and not of control BHK-21 cells. In this study, we show that the two enantiomers of verapamil have different effects on MRP1 activity. Only the *S*-isomer (not the *R*-isomer) potently induced the death of MRP1-transfected BHK-21 cells. The decrease in cellular glutathione content induced by the *S*-isomer, which was not observed with the *R*-isomer, was stronger than that induced by the racemic mixture, indicating that the *R*-isomer antagonized the *S*-isomer effect. Both enantiomers altered leukotriene C₄ and calcein transport by MRP1. Thus, the *R*-isomer behaved as an inhibitor, which was confirmed by its ability to revert the multidrug resistance phenotype toward vincristine. Molecular studies on purified MRP1 using fluorescence spectroscopy showed that both enantiomers bound to MRP1 with high affinity, with the binding being prevented by glutathione. Furthermore, conformational changes induced by the two enantiomers (monitored by sodium iodide accessibility of MRP1 tryptophan residues) were quite different, correlating with their distinct effects. (*S*)-Verapamil induces the death of potentially resistant tumor cells, whereas (*R*)-verapamil sensitizes MRP1-overexpressing cells to chemotherapeutics. These results might be of great potential interest in the design of new compounds able to modulate MRP1 in chemotherapy.

Resistance of tumors to multiple structurally unrelated anticancer drugs is one of the major obstacles to successful cancer chemotherapy. Failure to achieve complete and long-lasting responses is a common clinical problem that limits the curative potential of anticancer drugs in clinical oncology. Human multidrug resistance (MDR)² is frequently associated with the over-

expression of three transporters belonging to the ATP-binding cassette (ABC) protein superfamily, P-glycoprotein (ABCB1), the multidrug-resistance protein MRP1 (ABCC1), and the breast cancer resistance protein (ABCG2) (1), which can actively extrude anticancer drugs from the cell at the expense of ATP hydrolysis. MRP1 transports organic anions, many of which are conjugated to GSH, sulfate, or glucuronate; physiological substrates of MRP1 include GSH and leukotriene C₄ (LTC₄) (2). Cytotoxic drugs in clinical use against cancer such as vincristine, vinblastine, and daunorubicin are cotransported with GSH (2). Although a number of modulators have been found (3), the mechanism of inhibition is poorly understood. In many cases, a competitive inhibition toward substrate was described, as for the leukotriene antagonist MK571, which is considered a reference inhibitor for MRP1 (4). Interesting but complex results have been obtained with two classes of modulators: flavonoids and verapamil. Dietary flavonoids such as apigenin have been shown to interact with MRP1 (5), and quercetin induces reversion of drug resistance (6). Another flavonoid, dehydrosilybin, efficiently chemosensitizes cell growth to vincristine (7). Some bioflavonoids have been shown to stimulate glutathione transport by MRP1 (6). Verapamil, which is a P-glycoprotein inhibitor (8), has been reported to be ineffective in restoring drug sensitivity of MRP1-overexpressing cells (9–11). However, although verapamil alone poorly inhibits LTC₄ transport by MRP1, the addition of GSH strongly enhances the inhibition (10, 12, 13). Verapamil and its analogs as well as bioflavonoids stimulate glutathione transport by MRP1 (6, 12, 14) but are not transported themselves by MRP1. A new mechanism of modulation of the MDR phenotype induced by MRP1 recently emerged (13) wherein the modulator, *i.e.* verapamil, triggers apoptosis of resistant cells through stimulation of MRP1-mediated glutathione efflux. This new concept could lead to finding new inducers of GSH depletion as suggested (6, 15).

Verapamil being a chiral molecule, Loe *et al.* (14) showed that the enantiomers of various verapamil analogs display differential abilities to stimulate GSH transport. Therefore, in this work, we investigated the individual effects of the two *R*- and *S*-enantiomers of verapamil on MRP1-overexpressing baby hamster kidney 21 (BHK-21) cells. Surprisingly, we found that, whereas the *S*-isomer was responsible for the death of MRP1-overexpressing cells through GSH depletion, in contrast, the

* This work was supported by CNRS, the Université Claude Bernard Lyon 1 (UMR 5086), and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité du Rhône) and in part by NCI Grant CA89078 from the National Institutes of Health. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: Inst. de Biologie et Chimie des Protéines, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France. Tel.: 33-4-7272-2691; Fax: 33-4-7272-2604; E-mail: h.cortay@ibcp.fr.

² The abbreviations used are: MDR, multidrug resistance; ABC, ATP-binding cassette; LTC₄, leukotriene C₄; BHK-21, baby hamster kidney 21; MTT,

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; AM, acetoxymethyl ester; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline.



Different Modulations of MRP1 by Verapamil Enantiomers

R-isomer sensitized the cell growth to vincristine by inhibiting drug transport. In addition, we demonstrate that (*R*)-verapamil antagonized the (*S*)-verapamil-induced GSH efflux and that the two isomers directly bound to purified MRP1. The two isomers induced specific conformational changes in MRP1, likely correlating with their different effects on MRP1 activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Reduced GSH, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), β -NADPH, calcein acetoxymethyl ester (AM), nucleotides, $MgCl_2$, dithiothreitol, verapamil enantiomers, penicillin/streptomycin, mammalian protease inhibitor mixture, aroclorin, and fetal bovine serum were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Triton X-100 was from Merck (Darmstadt, Germany); CHAPS was from Euromedex (Souffelweyersheim, France); and methotrexate was from Rhône-Poulenc (Montrouge, France). ATP and glutathione reductase (EC 1.8.1.7) was from Roche Applied Science (Meylan, France). Bradford reagent was from Pierce (Perbio Science France SA).

Cell Lines—BHK-21 cells were stably transfected with wild-type MRP1 as described previously (16). No MRP1 expression was detected in control BHK-21 cells by Western blot analysis (16). Cells were grown at 37 °C and 5% CO_2 in culture medium containing 1% (v/v) penicillin/streptomycin, 5% (v/v) fetal bovine serum, and 200 μM methotrexate for transfected cells.

Cell Proliferation as Determined by MTT Assay—The MTT colorimetric assay was used to assess the sensitivity of control and MRP1-transfected BHK-21 (MRP1-BHK-21) cells to verapamil enantiomers. Briefly, growth inhibition (IC_{50}) assays were performed by plating cells at a density of 1.0×10^4 cells/well in 96-well plates. Cells were cultured for 17 h before the addition of verapamil enantiomers diluted in complete culture medium in the presence of 0.5% (v/v) Me_2SO . The cells were then incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO_2 . Surviving cells were quantified by the MTT colorimetric assay as described previously (17). The IC_{50} values were derived from a typical MTT assay. Experiments were performed in triplicate and on different days. Results were averaged from triplicates of a typical experiment.

Calcein-AM Assay—To monitor the inhibitory effect of verapamil enantiomers on the transport of calcein by MRP1, cells were detached using EDTA, harvested by centrifugation at $500 \times g$, and resuspended in culture medium supplemented with 5 mM EDTA. Calcein-AM (0.2 μM final concentration) was added to 5.0×10^5 cells in 4 ml of culture medium (supplemented with 5 mM EDTA to avoid cell aggregation) containing either 30 μM MK571 or verapamil enantiomers. The treated cells were incubated at 37 °C in the dark for 10 min and then harvested and resuspended in 400 μl of cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% (w/v) bovine serum albumin. Green fluorescence intensity was immediately analyzed using an FL1 channel of a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Total Cellular Glutathione Determination—The total cellular glutathione content was measured following the enzymatic method as described (18) and adapted (19). Cells were seeded in

96-well plates at a density of 1.0×10^5 cells/well and cultured for 17 h before the addition of verapamil enantiomers, with the Me_2SO concentration not exceeding 0.5% (v/v). After various incubation times, cells were washed twice with 200 μl of cold PBS and then lysed with 50 μl of PBS supplemented with 0.1% (v/v) Triton X-100. The lysate was homogenized, and two aliquots of 5 and 10 μl were transferred to new plates for GSH titration and protein quantification, respectively. GSH titration was performed by adding 120 μl of PBS containing 221.3 μM NADPH, 462.6 μM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), and 11 units/ml GSH reductase. The plate was then placed in a microplate reader, and the absorbance was measured at 412 nm every 30 s for 2 min. The slope was calculated for each sample, and the GSH concentration was determined by comparison with known glutathione standards. Protein titration was performed by the Bradford assay according to the manufacturer's instructions. The total glutathione concentrations measured were expressed as nmol/mg of protein, and the results were averaged from triplicates. The experiment was repeated on different days.

LTC_4 Transport Assay—ATP-dependent LTC_4 transport was assayed by a rapid filtration technique (20, 21) as described (22) in the absence or presence of 3 mM GSH, racemic (*RS*)-verapamil, or each enantiomer at 0, 1, 4, 16, 64, and 256 μM . All experiments were performed in triplicate in the presence of either AMP or ATP at 4 mM. The amount of LTC_4 bound to the membrane vesicles in the presence of 4 mM AMP was considered as the background and subtracted from the corresponding reaction in the presence of 4 mM ATP.

MRP1 Purification—MRP1 purification was performed according to Chang *et al.* (16). BHK-21 cells expressing MRP1 with a C-terminal His₁₀ tag were treated with 4 mM sodium butyrate for 17 h to enhance MRP1 expression. Cells were then washed twice with cold PBS, detached with 5 mM EDTA, and harvested by centrifugation at $500 \times g$. The pellet was resuspended in hypotonic buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM KCl, and 5 mM EDTA (1.5 ml/15-cm diameter dish) and supplemented with a protease inhibitor mixture. Crude membranes were prepared by homogenizing cells with a Potter-Elvehjem homogenizer (Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). Nuclei were removed by centrifugation at $1000 \times g$ for 15 min. The supernatant was then centrifuged at $45,000 \times g$ for 45 min to collect the membranes. The pellet was resuspended in buffer A (20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.5 M NaCl, 10 mM CHAPS, 20% (v/v) glycerol, and 5 mM imidazole) to obtain a final protein concentration of 2 mg/ml. The membranes were solubilized for 30 min at 4 °C under gentle shaking, and the sample was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min. The supernatant was then mixed with nickel-nitrilotriacetic acid-agarose (pre-equilibrated with buffer A) and gently shaken for 1 h at 4 °C. The packed nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column was washed with 10 column volumes of buffer A containing 5 mM CHAPS and 25 mM imidazole and then with 10 column volumes of buffer A containing 5 mM CHAPS, 10% (v/v) glycerol, and 40 mM imidazole. The protein was eluted with 3 column volumes of buffer A containing 300 mM imidazole and 0.05% (v/v) β -mercaptoethanol. The eluate was extensively dialyzed in buffer B (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 5 mM CHAPS, 10% (v/v) glycerol, and 0.05% (v/v) β -mercaptoetha-



Different Modulations of MRP1 by Verapamil Enantiomers

mol). 0.2% (w/v) aolectin was then added. The protein concentration was determined by the Bradford assay. Purified MRP1 was used no later than 24 h after dialysis and was subjected to SDS-PAGE (6% (v/v) polyacrylamide gel), immunoblotted on a nitrocellulose membrane, and probed with antibody MRPM6 (Alexis Biochemicals Corp., San Diego, CA).

ATPase Activity Assay—The ATPase activity of purified MRP1 was measured using a colorimetric ascorbic acid/ammunium molybdate assay (23). Briefly, 1.5 μg of purified MRP1 was incubated at 37 °C for 4 h in 100 μl of assay buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂, and 5 mM ATP in the presence or absence of 5 mM GSH or 1 μM verapamil enantiomers. All experiments were performed twice in triplicate and corrected for the background.

Quenching of the Intrinsic Trp Fluorescence of MRP1 by Verapamil Enantiomers—Fluorescence spectra were recorded with a Photon Technology International QuantaMaster I spectrofluorometer thermostatted at 25 °C using a 2-nm excitation and emission band-pass filter. All experiments were corrected for buffer contribution to fluorescence, and inner filter effects were measured on *N*-acetyltryptophanamide. Measurements were performed using 0.2 μM purified MRP1 in 500 μl of buffer B with an excitation wavelength of 295 nm and an emission scan range of 310–360 nm. The quenching studies were performed twice. Curve fitting and determination of dissociation constants were performed with the GraFit program (Erihtacus Software).

Measurements of Trp Accessibility to Sodium Iodide—Modifications of tryptophan accessibility to sodium iodide from 0 to 400 mM were tested under the same conditions as those used for the quenching of intrinsic fluorescence. The ionic strength effect was controlled with NaCl, and no modification of the MRP1 fluorescence was detected. Quenching data were analyzed using the Stern-Volmer equation: $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$, where F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of the quencher, respectively; K_{SV} is the Stern-Volmer constant; and $[Q]$ is the quencher concentration. The accessibility fraction (f_a) was obtained from the Lehrer equation: $F_0/\Delta F = 1/(f_a K_a [Q]) + 1/f_a$, where ΔF is the difference between F_0 and F and K_a is the accessibility constant. All the measurements were performed three times.

RESULTS

Differential Toxicity of Verapamil Enantiomers in MRP1-BHK-21 Cells—Racemic verapamil was shown previously to specifically kill MRP1-BHK-21 cells by triggering apoptosis through glutathione extrusion by MRP1 (13). In this study, we investigated the individual effects of each enantiomer by comparison with the racemic mixture. The cellular effects were tested on both control and MRP1-BHK-21 cells (Fig. 1). In agreement with previous results (13), racemic verapamil was cytotoxic for MRP1-BHK-21 cells at concentrations <10–20 μM, which were ineffective in control BHK-21 cells. The *R*- and *S*-enantiomers were highly discriminated because (*R*)-verapamil did not exhibit any cytotoxicity for the two types of cell, whereas (*S*)-verapamil displayed a killing activity, even more potent than that observed with the racemic mixture at the same concentration.

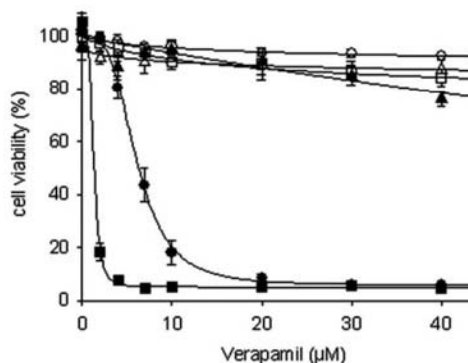


FIGURE 1. Cytotoxicity induced by racemic verapamil and its enantiomers. Control BHK-21 cells (open symbols) and MRP1-BHK-21 cells (closed symbols) were cultured in the presence of increasing concentrations of racemic verapamil (○ and ●), (*R*)-verapamil (△ and ▲), or (*S*)-verapamil (□ and ■). The cytotoxic effect was measured by the MTT assay, and data were analyzed by sigmoidal fitting. Results are the means of triplicate experimental points. Error bars indicate S.D.

Selective Effects of Verapamil Enantiomers on the Intracellular GSH Content—We checked the kinetics of intracellular GSH extrusion upon the addition of either racemic verapamil or its isolated enantiomers to the cell cultures. Fig. 2A shows an expected strong and rapid decrease in the total intracellular GSH content in the presence of racemic verapamil, as reported previously (13). Interestingly, the *R*-enantiomer had no effect on the intracellular GSH content, whereas the *S*-enantiomer induced a strong decrease in the intracellular GSH content, in agreement with the cytotoxicity shown in Fig. 1. In addition, 5 μM (*S*)-verapamil exerted a stronger effect on the intracellular GSH content compared with 10 μM racemic verapamil, which should also contain 5 μM (*S*)-verapamil, suggesting that the *R*-enantiomer might antagonize the *S*-enantiomer-induced modulation of MRP1 activity. To test this hypothesis, we investigated the effect of the *R*-enantiomer on the kinetics of the intracellular GSH decrease induced by the *S*-enantiomer. Double-reciprocal plot analysis indeed showed an inhibition in the micromolar range with mixed-type characteristics (Fig. 2B).

Inhibition by (*S*)- and (*R*)-Verapamil of MRP1-mediated Calcein-AM Transport—The above mixed-type inhibition pattern indicated that both enantiomers were able to interact with MRP1. We investigated their effects on the transport activity of MRP1 by flow cytometry using calcein-AM as a substrate. The control BHK-21 cells accumulated similar amounts of calcein regardless of whether verapamil was present or not (Fig. 3A). In contrast, both *R*- and *S*-enantiomers induced an increase in calcein accumulation in MRP1-overexpressing cells, similar to the MRP1-specific inhibitor MK571 (Fig. 3B), implying that either the *R*- or *S*-enantiomer can efficiently inhibit the function of MRP1.

Inhibition of LTC₄ Transport by (*S*)- and (*R*)-Verapamil in the Presence of GSH—The racemic mixture inhibited LTC₄ transport in a concentration-dependent manner only in the presence of GSH (Fig. 3C). (GSH alone inhibited the transport of ~10%, in agreement with Loe *et al.* (12).) In agreement with the results



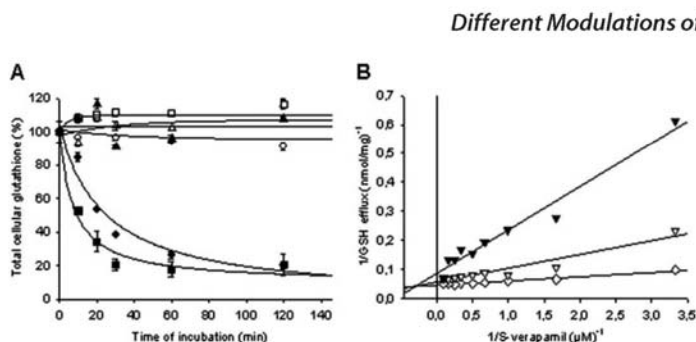


FIGURE 2. Effect of racemic verapamil and its enantiomers on the total cellular glutathione content. A, control BHK-21 cells (open symbols) and MRP1-BHK-21 cells (closed symbols) were cultured in triplicate with 10 μM racemic verapamil (\circ and \bullet), 5 μM (*R*)-verapamil (\triangle and \blacktriangle), or 5 μM (*S*)-verapamil (\square and \blacksquare). Total glutathione levels were determined (the amount of GSH in untreated cells was taken as 100%), and data were analyzed by hyperbola fitting. B, the total glutathione level in MRP1-BHK-21 cells was measured in the presence of increasing concentrations of (*S*)-verapamil without (∇) or with either 2 μM (*R*)-verapamil (∇) or 4 μM (*R*)-verapamil (\diamond). GSH efflux was calculated as the difference between the initial cellular GSH content and the GSH content after 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the presence of the modulator, and results were fitted using a double-reciprocal plot (Lineweaver-Burk representation). Data points represent the means of triplicate determinations in a typical experiment. Error bars indicate S.D.

obtained with the racemic mixture, each individual enantiomer could not efficiently inhibit LTC_4 transport in the absence of GSH (Fig. 3C). Upon the addition of 3 mM GSH, (*R*)-verapamil only slightly inhibited LTC_4 transport, whereas (*S*)-verapamil more strongly inhibited it compared with the racemic mixture. These results are consistent with those derived from Fig. 3 (A and B) on calcein accumulation.

Reversal of MRP1-induced Multidrug Resistance by (*R*)-Verapamil—Because (*R*)-verapamil inhibited MRP1 transport activity (Fig. 3) but showed no cytotoxicity for BHK-21 or MRP1-BHK-21 cells (Fig. 1), we speculated that (*R*)-verapamil might sensitize MRP1-BHK-21 cells to anticancer drugs. To test this hypothesis, the IC_{50} values of vincristine for BHK-21 and MRP1-BHK-21 cells were determined in the absence or presence of 5 or 15 μM *R*-enantiomer. Indeed, (*R*)-verapamil had no significant effect on the IC_{50} values of vincristine for control BHK-21 cells, whereas these values for MRP1-BHK-21 cells decreased from 9.42 to 2.87 nM in the presence of 5 μM *R*-enantiomer and 1.02 nM in the presence of 15 μM *R*-enantiomer (Table 1). 15 μM *R*-enantiomer led to complete reversion of the resistance to vincristine.

Molecular Effects of the Two Verapamil Enantiomers—To investigate the direct interaction of the two enantiomers with the transporter, we purified the MRP1 protein by a procedure adapted from Chang *et al.* (16) in the presence of lipids. Fig. 4A shows that only the purified MRP1 protein was detected on SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue. The purified MRP1 protein was further confirmed on a Western blot probed with the MRP1-specific antibody MRPm6 (Fig. 4B). Quenching of MRP1 tryptophan fluorescence was proportional to the concentration of the *S*-enantiomer (Fig. 4C) or the *R*-enantiomer (Fig. 4D), indicating that both enantiomers indeed bound to MRP1. These results also suggested that the inhibition of MRP1 transport activity by the enantiomers (shown in Fig. 3), resulted from a direct interaction with the transporter. The K_d values for the *R*- and *S*-isomers were 35 ± 7 and 113 ± 24 nM, respectively, indi-

Different Modulations of MRP1 by Verapamil Enantiomers

cating that the two isomers tightly bound to purified MRP1. The addition of GSH prevented the *S*- and *R*-isomers from binding, more efficiently for the *S*-isomer (Fig. 4C) than for the *R*-isomer (Fig. 4D). The direct binding of GSH could not be measured because of the absence of any apparent effect on tryptophan fluorescence. Furthermore, the modification of MRP1 tryptophan accessibility to sodium iodide in the presence of the *S*- and *R*-enantiomers was different (Fig. 4E). Indeed, in the absence of ligand, the emitting tryptophan residues appeared to be equally accessible to sodium iodide as shown by a linear Stern-Volmer plot, with $K_{SV} = 1.46 \pm 0.23 \text{ M}^{-1}$. In the presence of either (*S*)- or

(*R*)-verapamil, the Stern-Volmer plots were curved, indicating that the emitting tryptophan residues were not equally accessible to sodium iodide ($f_a = 0.42$ and 0.48 , respectively, as determined from the Lehrer equation). In both cases, the binding of the isomers led to distinct conformational changes because, in the Lehrer equation, the slope obtained in the presence of (*S*)-verapamil was 0.25, whereas it was 0.16 in the presence of (*R*)-verapamil. This likely correlates with the differential effects produced on MRP1 activity as described above.

An additional functional characterization was achieved by measuring the ATPase activity of MRP1. The basal vanadate-sensitive ATPase activity was slightly stimulated by either (*S*)- or (*R*)-verapamil (Fig. 5). GSH stimulated MRP1 ATPase activity, in agreement with the GSH stimulation reported by Hooijberg *et al.* (24) and Manciu *et al.* (25). The *S*-isomer completely reversed the GSH stimulation, whereas the *R*-isomer had no effect.

DISCUSSION

In this work, we have presented important new features of verapamil enantiomers, one of which revealed two different effects on MRP1. These new findings provide insight into the molecular mechanism of this ABC transporter and could be of great interest in reversion of MRP1-dependent multidrug resistance.

Although verapamil is a well known inhibitor of the P-glycoprotein-induced MDR phenotype (8), the results are controversial for MRP1. Indeed, although Cole *et al.* (9) did not observe any reversion of chemoresistance, Davey *et al.* (11) and Cullen *et al.* (10) described a small chemosensitization to daunomycin. However, verapamil has been clearly demonstrated to stimulate GSH transport (10, 12, 26) and to strongly inhibit LTC_4 transport by MRP1 in the presence of GSH (12, 13). This duality reflects the complex mechanism of verapamil interaction as suggested previously (27). The inhibition of calcein transport observed here with MRP1-BHK-21 cells agrees with previous

Downloaded from www.jbc.org at CNRS on November 13, 2007

Different Modulations of MRP1 by Verapamil Enantiomers

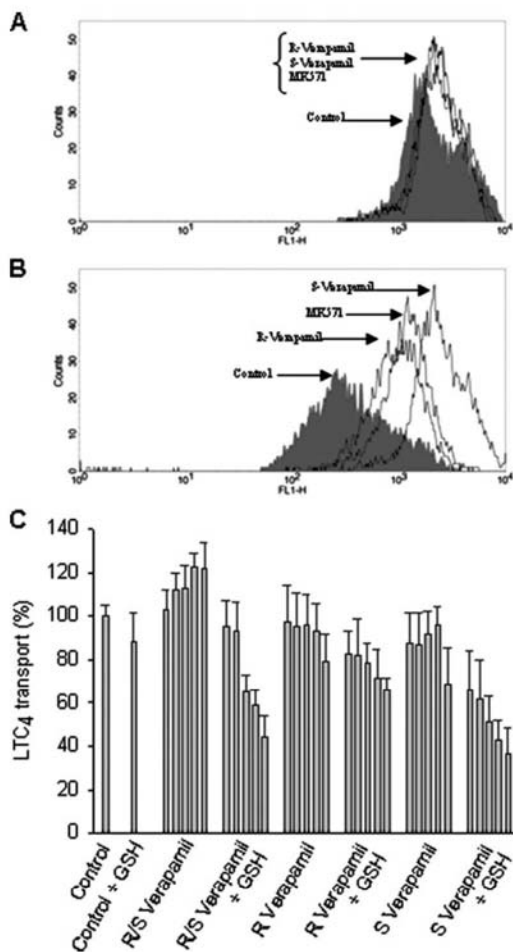


FIGURE 3. A and B, effect of verapamil enantiomers on calcein-AM transport by MRP1 in control BHK-21 and MRP1-BHK-21 cells, respectively. Cells were treated with 30 μM (R)-verapamil, (S)-verapamil, or MK571. Fluorescence intensity was analyzed by flow cytometry. The results of one of three representative experiments carried out in triplicate are shown. C, effect of verapamil enantiomers on [³H]LTC₄ transport by MRP1. LTC₄ transport was performed using membrane vesicles prepared from MRP1-BHK-21 cells as described under "Experimental Procedures." Membranes were incubated with increasing concentrations of (R)- or (S)-verapamil (0, 1, 4, 16, 64, and 256 μM) in the presence or absence of 3 mM GSH. Bars represent the means of triplicate determinations in a typical experiment. Error bars indicate S.D.

results showing an increase in daunomycin accumulation induced by verapamil in MRP1-overexpressing cells (10). Our new findings could explain these divergent observations because, with our cell type, racemic verapamil stimulation of GSH transport by MRP1 leads to apoptosis of MRP1-overexpressing cells (13). This cell death was shown here to be specifically induced by the S-isomer. In the racemic mixture, the latter masked the specific inhibition of (R)-verapamil. Indeed, the kinetics of the intracellular GSH decrease (Fig. 2B) showed a

TABLE 1
Reversion of the MDR phenotype by (R)-verapamil in MRP1-BHK-21 cells

BHK-21 and MRP1-BHK-21 cells were treated with increasing concentrations of vincristine in the absence or presence of 5 or 15 μM (R)-verapamil. After 72 h of incubation, the remaining living cells were estimated by the MTT assay. IC₅₀ values were calculated in triplicate experiments using SigmaPlot software.

	IC ₅₀ for vincristine		
	0 μM (R)-verapamil	5 μM (R)-verapamil	15 μM (R)-verapamil
BHK-21	1.51 \pm 0.4	1.48 \pm 0.27	1.06 \pm 0.38
MRP1-BHK-21	9.42 \pm 0.23	2.87 \pm 0.42	1.02 \pm 0.18

mixed-type inhibition between the two isomers. The isolated R-enantiomer inhibited calcein-AM transport as efficiently as MK571 (Fig. 3) and exhibited an efficient sensitization of MRP1-transfected cell growth to vincristine at the concentrations used in this work. (S)-Verapamil also led to increased calcein accumulation, even more strongly compared with the R-isomer, possibly by diverting MRP1 from substrate transport to the benefit of GSH transport. The S-isomer also inhibited LTC₄ transport and did so much more strongly compared with the R-isomer (Fig. 3C).

To our knowledge, this is the first time that two enantiomers of an MDR phenotype modulator have been described to display different effects. Indeed, for P-glycoprotein, there is no apparent difference in the inhibitory effects of either verapamil enantiomer on daunomycin transport (28) or of tricyclic compounds on drug efflux from MDR cells (29), whereas (R)-propranolol, but not (S)-propranolol, inhibits daunomycin transport (28). In contrast, for MRP1, we demonstrated here the dual activity of chiral verapamil, i.e. (i) the strong killing effect of the S-isomer and (ii) the chemosensitizing effect of the R-isomer. They are both potentially interesting for MDR phenotype modulation, the first to specifically kill potentially resistant tumor cells (13) and the second to increase the sensitivity of tumor cells to chemotherapy. Because the enantiomers bind to the MRP1 protein with high affinity and the bound verapamil is not transported by MRP1 (12), we expect that low concentrations of each enantiomer would have a long-lasting effect without the necessity of reaching high concentrations in chemotherapeutic treatments. However, the two isomers need to be used in separated forms, not in a mixture, because we have shown here that they antagonize each other.

We showed previously that iodination of verapamil leads to a strong increase in the killing potency of racemic verapamil without any increase in the toxicity for control cells (13). Furthermore, iodination has been achieved on the B-phenyl ring of the molecule, known to be important for cardiotoxicity (30). Therefore, the synthesis of the iodinated R- and S-enantiomers of verapamil is in progress. We hope to decrease the effective concentration of each isomer, especially the S-isomer, to escape their cardiocytotoxic effects. Such verapamil analogs, which reverse the MDR phenotype induced by P-glycoprotein, were found by Pereira *et al.* (31). Safety tests of iodinated derivatives will be performed on cardiomyocytes to determine whether iodination of the B-phenyl ring decreases toxicity.

Although GSH has been shown to prevent the binding of the R- and S-isomers, we cannot conversely make conclusions



Different Modulations of MRP1 by Verapamil Enantiomers

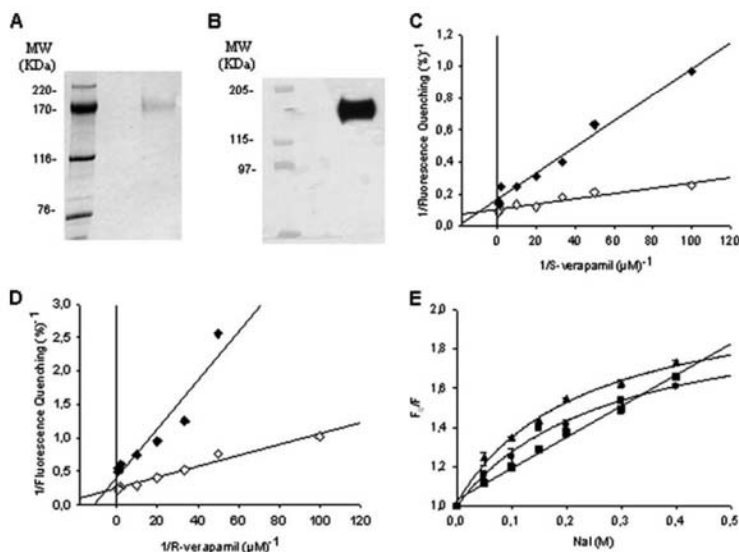


FIGURE 4. Molecular effects of verapamil enantiomers on purified MRP1. MRP1 was purified as described under "Experimental Procedures." Purified MRP1 was analyzed on 6% SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue (A) and by immunoblotting using antibody MRPm6 (B). MRP1 tryptophan fluorescence was measured upon addition of increasing concentrations of (S)-verapamil (C) or (R)-verapamil (D). Quenching fluorescence induced by both verapamil enantiomers was analyzed in the absence (\diamond) or presence (\blacklozenge) of 0.5 mM GSH. Results were fitted using a double-reciprocal plot (Lineweaver-Burk representation). Fluorescence was monitored in presence of increasing concentrations of sodium iodide in the absence (\blacksquare) or presence of 0.5 μ M (S)-verapamil (\bullet) or 0.5 μ M (R)-verapamil (\blacktriangle). Quenching data were analyzed by Stern-Volmer fitting (E). Results are the means of triplicate experimental points. Error bars indicate S.D.

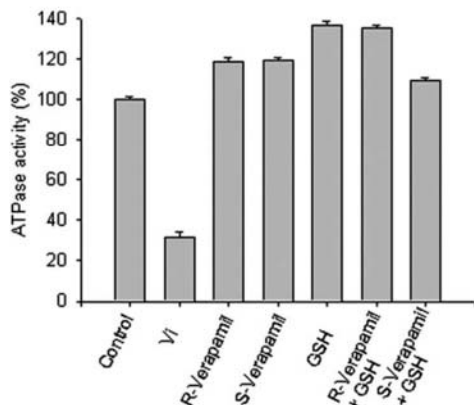


FIGURE 5. Effect of glutathione and verapamil enantiomers on the ATPase activity of purified MRP1. ATPase activity was measured as described under "Experimental Procedures" in the absence or presence of 1 μ M (R)- or (S)-verapamil and/or 5 mM glutathione. All experiments were corrected for the background.

about any effect of verapamil enantiomers on the affinity for GSH because GSH binding cannot be directly monitored by tryptophan fluorescence measurements. However, Karwatsky *et al.* (32) showed that a GSH photoaffinity analog is enhanced in the presence of verapamil. (R)-Verapamil, (S)-verapamil, or

GSH alone moderately stimulated the ATPase activity of purified MRP1 (Fig. 5), implying that binding of each individual compound to MRP1 induced a conformational change in the protein. (R)-Verapamil + GSH enhanced the ATPase activity to the same level as GSH alone (Fig. 5). In contrast, (S)-verapamil + GSH abolished the enhancement effect of GSH (Fig. 5). In the presence of (S)-verapamil, no more stimulation of ATPase activity was observed, whereas (S)-verapamil stimulated GSH transport. We can conclude that the effect of (S)-verapamil does not correlate with ATPase activity. All these results suggest that the S-isomer, but not the R-isomer, could interfere with the GSH site, either directly or through induced conformational changes. This interference could have an impact on the GSH stimulation of ATPase activity. Comprehension of this phenomenon at the molecular level would bring insight to the transport mechanism of MRP1.

We showed previously that cellular GSH efflux leads to apoptosis of MRP1-overexpressing BHK-21 cells (13). A similar phenomenon was described in H69AR and HeLa/ABCC1 cells (33), and Hammond *et al.* (27) demonstrated that glutathione export during apoptosis requires multidrug-resistant proteins. However, other studies reported a GSH extrusion, but cell death was not observed (10, 12, 26). The cell-type dependence for each verapamil enantiomer is therefore under investigation.

Our results could be of great potential interest in future therapy. The verapamil enantiomers exert different effects on MRP1 activity. (S)-Verapamil acts as a "killer" by activation of MRP1-mediated GSH efflux, leading to the death of potentially resistant tumor cells. In contrast, (R)-verapamil acts as an inhibitor to block MRP1-mediated transport, resulting in chemosensitization of MRP1-overexpressing cells to anticancer drugs. In practice, we have to choose between the two enantiomers to obtain the highest modulatory effect of verapamil on cells overexpressing MRP1. The possibility of such a major difference in MRP1-interacting agents raises the important possibility of constructing different GSH transport and drug resistance modifiers. Furthermore, these new findings may prove to be critically important in interpreting data obtained using either verapamil or its derivatives.

Acknowledgments—We thank Yue-xian Hou for technical support and Irene Beauvais for revising the manuscript.

Different Modulations of MRP1 by Verapamil Enantiomers

REFERENCES

1. Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., and Sarkadi, B. (2004) *Curr. Drug Deliv.* **1**, 27–42
2. Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 1103–1111
3. Boumendjel, A., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Perrotton, T., and Di Pietro, A. (2005) *Med. Res. Rev.* **25**, 453–472
4. Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K. H., Ulrich, W. R., and Beck, J. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 345–352
5. Leslie, E. M., Mao, Q., Oleschuk, C. J., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2001) *Mol. Pharmacol.* **59**, 1171–1180
6. Leslie, E. M., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2003) *Drug Metab. Dispos.* **31**, 11–15
7. Trompier, D., Baubichon-Cortay, H., Chang, X.-B., Maitrejean, M., Barron, D., Riordan, J. R., and Di Pietro, A. (2003) *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2164–2177
8. Naito, M., and Tsuruo, T. (1989) *Cancer Res.* **49**, 1452–1455
9. Cole, S. P., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M., and Deeley, R. G. (1994) *Cancer Res.* **54**, 5902–5910
10. Cullen, K. V., Davey, R. A., and Davey, M. W. (2001) *Biochem. Pharmacol.* **62**, 417–424
11. Davey, R. A., Longhurst, T. J., Davey, M. W., Belov, L., Harvie, R. M., Hancox, D., and Wheeler, H. (1995) *Leuk. Res.* **19**, 275–282
12. Loe, D. W., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 530–538
13. Trompier, D., Chang, X.-B., Barattin, R., du Moulinet D'Hardemare, A., Di Pietro, A., and Baubichon-Cortay, H. (2004) *Cancer Res.* **64**, 4950–4956
14. Loe, D. W., Oleschuk, C. J., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 795–803
15. Kachadourian, R., and Day, B. J. (2006) *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 65–76
16. Chang, X.-B., Hou, Y.-X., and Riordan, J. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30962–30968
17. Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63
18. Tietze, F. (1969) *Anal. Biochem.* **27**, 502–522
19. Anderson, M. E. (1985) *Methods Enzymol.* **113**, 548–555
20. Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., and Keppler, D. (1994) *Eur. J. Biochem.* **220**, 599–606
21. Loe, D. W., Almquist, K. C., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9675–9682
22. Hou, Y., Cui, L., Riordan, J. R., and Chang, X. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20280–20287
23. Doige, C. A., Yu, X., and Sharom, F. J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1109**, 149–160
24. Hooijberg, J. H., Pinedo, H. M., Vrasdonk, C., Priebe, W., Lankelma, J., and Broxterman, H. J. (2000) *FEBS Lett.* **469**, 47–51
25. Manciu, L., Chang, X.-B., Buysse, F., Hou, Y.-X., Gustot, A., Riordan, J. R., and Ruyschaert, J. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3347–3356
26. Grech, K. V., Davey, R. A., and Davey, M. W. (1998) *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1283–1289
27. Hammond, C. L., Marchan, R., Krance, S. M., and Ballatori, N. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 14337–14347
28. Kwon, Y., Kamath, A. V., and Morris, M. E. (1996) *J. Pharm. Sci.* **85**, 935–939
29. Szabo, D., and Molnar, J. (1998) *Anticancer Res.* **18**, 3039–3044
30. Teodori, E., Dei, S., Quidu, P., Budriesi, R., Chiarini, A., Garnier-Suillerot, A., Gualtieri, F., Manetti, D., Romanelli, M. N., and Scapecchi, S. (1999) *J. Med. Chem.* **42**, 1687–1697
31. Pereira, E., Teodori, E., Dei, S., Gualtieri, F., and Garnier-Suillerot, A. (1995) *Biochem. Pharmacol.* **50**, 451–457
32. Karwatsky, J., Daoud, R., Cai, J., Gros, P., and Georges, E. (2003) *Biochemistry* **42**, 3286–3294
33. Laberge, R.-M., Karwatsky, J., Lincoln, M. C., Leimanis, M. L., and Georges, E. (2007) *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1727–1737



RESUME

L'acquisition du phénotype de résistance des cancers est souvent corrélée à l'expression de transporteurs membranaires appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette »). Un de ces transporteurs, MRP1 (« Multidrug Resistance Protein 1 »), permet l'efflux de nombreux substrats, de type anioniques, conjugués au GSH, glucuronates ou sulfates, ou en co-transport avec le GSH.

Dans un premier temps, ce travail a porté sur l'étude des domaines de fixation des nucléotides isolés. Une étude biochimique a montré leur caractère fonctionnel asymétrique concernant les nucléotides, prouvant que seul la séquence primaire de ces NBD est responsable de cette fonctionnalité différentielle. L'étude de la fixation de substrats sur les NBD, a montré que ceux-ci pourraient, de part leur proximité avec les domaines transmembranaires, avoir un rôle dans la fixation des substrats.

La deuxième étape de ce travail a concerné la caractérisation de l'activité des énantiomères du vérapamil. Les résultats ont montré que le S-vérapamil est l'isomère responsable de la stimulation du transport du GSH, conduisant à la mort des cellules surexprimant MRP1. Le R-vérapamil est caractérisé comme un inhibiteur de MRP1. Ces résultats ont des répercussions importantes en terme de thérapie.

Deux études préliminaires de relation structure/fonction ont été menées en ce qui concerne des dérivés du vérapamil et des dérivés de flavonoïdes, afin de trouver des molécules plus efficaces contre MRP1.

TITRE

Study of the multidrug transporter MRP1: functional characterization of the NBD, and study of modulators leading to MRP1 overexpressing cell death.

RESUME

The acquisition of cancer resistance phenotype is mostly correlated to the expression of membrane transporters belonging to the ABC transporters super family ("ATP-Binding Cassette"). One of these transporters, MRP1 ("Multidrug Resistance Protein1"), is a transmembrane protein which has the ability to efflux many substrates.

First, this work has focused on the characterisation of the isolated nucleotide binding domains. A biochemical study has shown their asymmetric behaviour towards nucleotides, and their ability to bind substrates, which could lead to the involvement of NBDs in the substrate binding site.

Then, a characterisation of the verapamil enantiomers has been performed, showing that S-verapamil was responsible of glutathione efflux, whereas R-verapamil had an inhibitory effect on MRP1. These results may have great impact in term of therapy.

Finally, structure/function relationships of verapamil and flavonoids derivatives has been accessed, in order to find more potent modulators for MRP1.

DISCIPLINE

Sciences - Biochimie

MOTS-CLES

Cancer, chimiothérapie, résistance à de multiples drogues, phénotype MDR, transporteurs ABC, MRP1, NBD, modulateurs, vérapamil, énantiomères, flavonoïdes.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire des Protéines de Résistance aux Agents Chimiothérapeutiques

Institut de Biologie et Chimie des Protéines

UMR 5086 CNRS/Université Claude Bernard Lyon I, IFR 128 Biosciences Lyon-Gerland

7, passage du Vercors, 69367, LYON Cedex 07