



Étude fonctionnelle de la région intracellulaire d'ABCG2 et modulation d'ABCG2 et ABCB1 humains par des petidomimétiques non compétitifs

Ophélie Arnaud

► To cite this version:

Ophélie Arnaud. Étude fonctionnelle de la région intracellulaire d'ABCG2 et modulation d'ABCG2 et ABCB1 humains par des petidomimétiques non compétitifs. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT: 2011LYO10091 . tel-00846207

HAL Id: tel-00846207

<https://theses.hal.science/tel-00846207>

Submitted on 18 Jul 2013

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.

N° d'ordre : 91-2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE DES SCIENCES ET SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 9 juin 2011

par

ARNAUD Ophélie

ETUDE FONCTIONNELLE DE LA REGION INTRACELLULAIRE D'ABCG2
ET MODULATION D'ABCG2 ET ABCB1 HUMAINS PAR DES PEPTIDOMIMETIQUES
NON COMPETITIFS

Directeurs de thèse :
M le docteur Pierre Falson
M le docteur Attilio DiPietro

JURY : M le docteur Jean-Michel Jault
M le docteur Stéphane Orlowski
M le professeur Charles Dumontet
Mme le professeur. Joëlle Paris
M le docteur. Pierre Falson
M le docteur. Attilio DiPietro

Rapporteur
Rapporteur
Président du jury
Invitée
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

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 G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

REMERCIEMENTS

Ma thèse s'est déroulée au sein du laboratoire « Mécanisme et modulation de la résistance aux médicaments ». Je remercie très chaleureusement le Dr Attilio DiPietro, directeur du laboratoire et mon co-directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces 4 années et également pour sa disponibilité au quotidien.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au Dr Pierre Falson qui m'a encadrée au cours de cette thèse, dans la continuité de mon master recherche. Je le remercie pour son encadrement, sa disponibilité et également pour sa confiance et pour la liberté qu'il m'a accordée au cours de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux rapporteurs de cette thèse, les Dr Stéphane Orlowski et Dr Jean-Michel Jault pour avoir accepté de juger mon travail.

Que le Pr Charles Dumontet soit assuré de ma gratitude pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour l'honneur qu'il me fait de présider mon jury de soutenance.

Je suis très sensible à la présence dans ce jury du Pr Joëlle Paris, avec qui j'ai collaboré au cours de ces 4 années ; je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance d'interagir avec de nombreuses personnes. Je tiens à apporter mes remerciements :

à l'ensemble du personnel du laboratoire de Chimie thérapeutique qui participé à la synthèse des composés testés ici, et plus particulièrement au Dr Laurent Ettouati et au Dr Marie-Emmanuelle Million avec qui j'ai activement collaboré pendant ces 4 années,

au Dr Léa Payen avec qui j'ai effectué les tests *in vivo*. Merci pour ton encadrement et ton enseignement. J'associe également à ces remerciements Mylène Honorat, alors doctorante sous la direction du Dr Léa Payen,

au Dr Raphaël Terreux qui m'a enseigné les notions de bioinformatique, modélisation et docking que j'ai acquises au cours de cette thèse,

à nos collaborateurs de la Faculté de Pharmacie de Grenoble, les Dr Annabelle Gèze et Ahcène Boumendjel,

à Sébastien Dussergey et Thibault Andrieu du plateau de cytométrie en flux ainsi qu'à Isabelle Grosjean et Annie Chaboud du plateau de production et d'analyse de protéines pour leur disponibilité et l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de ma thèse.

Remerciements

Je remercie bien évidemment l'ensemble de l'équipe du laboratoire :

Elodie et Doriane, mes voisines de bureau, merci pour votre soutien au cours de ces 4 années, pour votre bonne humeur, pour avoir écouté mes états d'âmes quand j'en avais besoin, et merci tous nos papotages de filles,

Rima, merci pour ton soutien, pour nos discussions, scientifiques ou non, et merci pour tes corrections d'anglais...,

Sandrine, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tous nos repas partagés.

Je remercie également toutes les autres personnes du laboratoire Lorena pour ton enthousiasme communicatif, Glaucio mon nouveau voisin de bureau, Charlotte, Hélène, Moez, Vincent, Julien, Lauriane et Jessica,

sans oublier les « anciens » du labo dont je garde un très bon souvenir : Céline, Sira et Fred.

Je tiens bien évidemment à remercier mes stagiaires, Cyrielle, Sarah et plus particulièrement Laura pour l'aide qu'elles m'ont apportées ponctuellement au cours de cette thèse.

Je remercie toutes les personnes de l'IBCP qui ont fait que je garderais de ces 4 années de thèse un très bon souvenir : Nicolaï, Julien P, Julien T, Aurélie, Magalie, Alexandra, Aurélie B, Jennifer,

Je remercie également nos gestionnaires, Karine et Dorothée, pour leur disponibilité.

Je tiens également à remercier mes amis.

Emilie, merci d'être toujours là quand il faut ...

Je voudrais également remercier mes frère et sœurs et leur conjoints respectifs, Nad et Jp, Stève et Céline et Daph' et Fred pour leur soutien et leurs encouragements.

Un énorme merci à mes parents qui ont toujours cru en moi et m'ont apporté un soutien quotidien. Sans vous, je ne serais certainement pas là aujourd'hui ... Merci pour tout.

Et enfin Ben, mon amour. Merci d'être là, de me soutenir constamment et de croire en moi. Merci pour le bonheur que tu m'apportes tous les jours. Cette thèse m'aura permis de te rencontrer et juste pour cette merveilleuse découverte, je recommencerais sans hésiter. Je t'aime.

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	5
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	17
INTRODUCTION	23
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	27
I. LE CANCER.....	29
1. <i>Développement d'un cancer</i>	29
2. <i>Traitements</i>	30
2.1. Chirurgie	30
2.2. Radiothérapie	31
2.3. Chimiothérapie	31
2.3.1. Principe général.....	31
2.3.2. Les différentes classes d'agents anticancéreux	32
3. <i>Mécanismes de résistance</i>	33
3.1. Mécanismes non cellulaires de résistance.....	33
3.2. Mécanismes cellulaires de résistance.....	34
3.2.1. Mécanisme dépendant de la cible.....	35
3.2.2. Modification de la disponibilité intra-tumorale du médicament	36
3.2.2.1. Au niveau de l'influx par diminution de l'entrée de la drogue	37
3.2.2.2. Au niveau de l'efflux par augmentation de la sortie de la drogue.....	37
3.2.2.3. Par inactivation de la drogue	37
3.2.2.3.1. Par Modification par le cytochrome P450	38
3.2.2.3.2. Modification de la glutathion S-transférase	38
3.2.2.3.3. Les TME : Tumor-Expressed Metabolizing Enzymes.....	38
3.2.3. Mécanisme indépendant de la cible ou de la drogue.....	39
3.2.3.1. Modification génomique des cellules cancéreuses	39
3.2.3.2. Réparation de l'ADN	39
3.2.3.3. Echappement à l'apoptose	40
II. LES TRANSPORTEURS ABC	41
1. <i>Classification des transporteurs ABC</i>	41
2. <i>Topologie générale des transporteurs ABC</i>	43
2.1. Les domaines transmembranaires.....	45
2.2. Les «Nucleotide Binding Domain».....	45
2.2.1. Données structurales.....	46
2.2.2. Les motifs conservés	48
2.2.2.1. Le Walker A, ou boucle P	48
2.2.2.2. Le motif Walker B	49
2.2.2.3. La signature S.....	49
2.2.2.4. La région Centre ou boucle Q	51
2.2.2.5. La région Switch ou boucle H.....	51
2.2.2.6. Le résidu catalytique.....	51
2.2.3. Le fonctionnement d'un NBD	51
3. <i>Structure des exportateurs ABC</i>	52
4. <i>Mécanisme des transporteurs ABC</i>	55
5. <i>Les transporteurs ABC humains</i>	58
5.1. Les différentes classes	59
5.1.1. ABCA.....	59
5.1.2. ABCB.....	59
5.1.3. ABCC.....	59
5.1.4. ABCD.....	60
5.1.5. ABCE et ABCF.....	60
5.1.6. ABCG.....	60

5.2.	Régulation transcriptionnelle des transporteurs ABC.....	61
5.3.	Le rôle physiologique et la localisation tissulaire des transporteurs ABC.....	62
5.4.	Les transporteurs ABC dans les maladies	62
5.4.1.	Les maladies causées par l'inactivation d'un transporteur	63
5.4.2.	Les maladies causées par la surexpression d'un transporteur	64
6.	<i>La glycoprotéine P</i>	65
6.1.	Découverte	65
6.2.	Localisation tissulaire et cellulaire	66
6.3.	Rôles physiologiques	67
6.3.1.	Barrières Hémato-tissulaire.....	68
6.3.2.	Transport d'hormones.....	68
6.3.3.	Le transport de lipides.....	68
6.3.4.	Intestins-foie-reins	68
6.4.	Polymorphisme.....	69
6.5.	Topologie et structure d'ABCB1.....	70
6.5.1.	Topologie d'ABCB1	70
6.5.2.	Structure chez l'homme ou chez la souris	70
6.6.	Substrats/allocrites	75
6.6.1.	Le spectre des substrats transportés.....	75
6.6.2.	Les caractéristiques des substrats.....	76
6.6.3.	« MultiDrug Binding Pockets »	78
7.	<i>La Breast Cancer Resistance Protein</i>	80
7.1.	Découverte	80
7.2.	Localisation tissulaire et cellulaire	81
7.3.	Rôles physiologiques	82
7.3.1.	Barrières hémato-tissulaire	82
7.3.2.	Intestins-colon-foie-reins	83
7.3.3.	Glandes mammaires.....	83
7.3.4.	Cellules souches	83
7.4.	Polymorphisme.....	84
7.5.	La mutation R482T/G.....	84
7.6.	Mécanisme- topologie	85
7.6.1.	Topologie.....	85
7.6.2.	Dimérisation	86
7.6.3.	Données structurales.....	87
7.7.	Substrats transportés	88
7.7.1.	Le spectre des substrats	88
7.7.1.1.	Les dérivés porphyriques	88
7.7.1.2.	Les molécules thérapeutiques	91
7.7.2.	Les différents sites de fixations	92
III.	LES INHIBITEURS DES TRANSPORTEURS ABC	93
1.	<i>Anticancéreux non transportés</i>	94
2.	<i>Inhibiteurs</i>	94
2.1.	Les inhibiteurs d'ABCB1.....	95
2.1.1.	Première génération d'inhibiteurs	95
2.1.2.	Seconde génération d'inhibiteurs	96
2.1.3.	Troisième génération d'inhibiteurs	97
2.1.4.	Inhibiteurs compétitifs ou non compétitifs	100
2.2.	Les inhibiteurs d'ABCG2.....	101
2.2.1.	Les inhibiteurs spécifiques.....	101
2.2.2.	Les inhibiteurs non spécifiques	102
2.2.3.	Les flavonoïdes et leurs dérivés.....	103
2.2.4.	Autres types d'inhibiteurs	104
2.3.	Le cas particulier du curcumin	105
2.4.	Les échecs des essais cliniques	106
3.	<i>Combinaison d'inhibiteurs</i>	108
4.	<i>Formulation des anticancéreux ou des inhibiteurs</i>	109
5.	<i>Les peptides spécifiques et les anticorps</i>	110
6.	<i>Inhibition de l'expression des transporteurs ABC</i>	110
6.1.	Inhibition de la transcription des transporteurs ABC.....	111
6.2.	Inhibition de la traduction des transporteurs ABC	111
6.2.1.	Oligonucléotides antisens ciblant l'ARNm	111

6.2.2.	« Hammerhead ribozymes »	112
6.2.3.	Les siRNA	112
6.2.4.	Les “short hairpin RNA” (shRNA)	113
7.	<i>Mort sélective des cellules multiresistantes</i>	113
MATERIELS ET METHODES		117
I.	ETABLISSEMENT D’UNE NOUVELLE LIGNEE CELLULAIRE, FLP-IN TM -293 ABCG2 ET ETUDE FONCTIONNELLE D’ABCG2 ...	119
1.	<i>Clonage d’ABCG2 dans le vecteur pcDNA5/FRT</i>	119
1.1.	Plasmides utilisés	120
1.2.	Préparation du plasmide pcDNA5/FRT-H6-ABCG2	120
1.2.1.	Polymerase Chain Reaction	120
1.2.2.	Purification des produits de PCR ou des produits de digestion	121
1.2.3.	Restriction des ADN	122
1.2.4.	Ligature	122
1.3.	Amplification du plasmide pcDNA5/FRT-H6-ABCG2	122
1.3.1.	Souche bactérienne	122
1.3.2.	Préparation des bactéries compétentes	122
1.3.3.	Transformation des bactéries compétentes	123
1.3.4.	Préparation analytique d’ADN	123
1.3.5.	Préparation quantitative d’ADN	124
1.4.	Analyse du plasmide obtenu	124
1.4.1.	Par gel d’électrophorèse	124
1.4.2.	Par séquençage	124
2.	<i>Réalisation de mutants de pcDNA5/FRT-H6-ABCG2 par mutagenèse dirigée</i>	125
2.1.	Amorces utilisées	126
2.2.	Introduction de la mutation par PCR	127
2.3.	Digestion du brin parental	127
3.	<i>Transfection cellulaire</i>	127
3.1.	Principe	127
3.2.	Protocole	128
II.	BIOLOGIE CELLULAIRE	129
1.	<i>Les lignées cellulaires</i>	129
1.1.	NIH3T3 et NIH3T3-MDR G185	129
1.2.	HEK-293 pcDNA3.1 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482	129
1.3.	Les FLP-IN TM -293	130
2.	<i>Culture cellulaire</i>	130
3.	<i>Stockage des cellules</i>	130
3.1.	Décongélation	130
3.2.	Congélation	130
4.	<i>Numération cellulaire</i>	131
5.	<i>Cytométrie en flux</i>	131
5.1.	Principe	131
5.2.	Appareillage	132
5.3.	Les paramètres étudiés	132
5.4.	Etude de l’adressage des protéines	134
5.5.	Mesure de l’activité de transport des mutants	134
5.6.	Mesure de l’activité inhibitrice des composés testés	136
6.	<i>Test de croissance cellulaire par le test au MTT</i>	137
6.1.	Principe	137
6.2.	Protocole	137
7.	<i>Tests de chimiosensibilisation</i>	138
8.	<i>Immunofluorescence</i>	138
III.	BIOCHIMIE	139
1.	<i>Extraction des protéines</i>	139
1.1.	Extraction des protéines totales de cellules de mammifères	139
1.2.	Extraction des protéines membranaires	139
1.3.	Extraction des protéines de tumeurs	139
2.	<i>Dosage des protéines</i>	140
2.1.	Dosage par Bradford (Bradford, 1976)	140
2.2.	Dosage par BCA (Smith <i>et al.</i> , 1985)	140
3.	<i>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide</i>	140

3.1.	Séparation des protéines.....	140
3.2.	Coloration au bleu de coomassie.....	141
3.3.	Coloration au nitrate d'argent.....	141
4.	Analyse par immunodetection : le western-blot.....	141
5.	Activité ATPasique.....	142
5.1.	Activité ATPasique basale.....	142
5.2.	Activité ATPasique stimulée positivement ou négativement.....	142
6.	Mesure de l'hème par HPLC.....	143
6.1.	Préparation des cellules.....	143
6.2.	Mesure par HPLC.....	143
7.	Purification.....	144
IV.	TEST IN VIVO.....	145
1.	Les souris.....	145
2.	Les molécules testées.....	145
3.	Tests de toxicité aigüe.....	146
4.	Tests de chimioréversion.....	146
4.1.	Les souris.....	146
4.2.	Protocole.....	147
4.3.	Implantation des tumeurs.....	148
4.4.	Déroulement du test.....	148
4.5.	Sacrifice des souris.....	148
5.	Tests de pharmacocinétique.....	149
6.	Dosage de l'irinotécan et du SN-38.....	149
6.1.	Extraction <i>in vitro</i>	149
6.2.	Extraction <i>in vivo</i>	149
6.3.	Dosage par HPLC.....	150
V.	BIO-INFORMATIQUE.....	150
1.	3D-QSAR.....	150
2.	Docking.....	151
	RESULTATS ET DISCUSSION.....	153
I.	ETUDE D'ABCG2 PAR MUTAGENESE DIRIGEE.....	155
1.	La lignée Flp-In TM -293.....	157
2.	Comparaison de 2 lignés cellulaires.....	159
2.1.	Expression d'ABCG2.....	159
2.1.1.	Taux d'expression d'ABCG2.....	159
2.1.2.	Adressage d'ABCG2 à la membrane plasmique.....	159
2.2.	Transport de substrats.....	161
2.3.	Activité d'hydrolyse d'ATP.....	163
3.	Les mutants.....	165
3.1.	Le choix des mutants.....	165
3.2.	Taux d'expression d'ABCG2 muté dans les cellules Flp-In TM -293.....	165
3.2.1.	Taux d'expression total.....	165
3.2.2.	Taux d'expression à la membrane plasmique.....	167
3.3.	Caractérisations des mutants.....	169
3.3.1.	Transport de substrats.....	169
3.3.1.1.	Cytométrie en flux.....	169
3.3.1.2.	Dosage de l'efflux d'hémine par chromatographie liquide haute performance.....	171
3.3.1.3.	Chimiosensibilisation.....	175
3.3.2.	Activité d'hydrolyse d'ATP.....	179
3.3.2.1.	Activité d'hydrolyse d'ATP basale.....	179
3.3.2.2.	Activité ATPase stimulée.....	183
3.3.3.	Essais de purification.....	185
II.	DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS D'ABCG2 ET ABCB1.....	195
1.	Les inhibiteurs testés et leurs effets.....	197
1.1.	Les classes d'inhibiteurs.....	197
1.1.1.	Les peptidomimétiques.....	199
1.1.1.1.	Modification des chaînes latérales, de leurs substituants et de la liaison peptidique.....	199
1.1.1.2.	Les composés de type tyr-gly.....	199
1.1.1.3.	Ajout d'une glycine dans la chaîne principale.....	201
1.1.1.4.	Les composés contraints.....	201

1.1.1.5.	Ajout d'un groupement sulfone	201
1.1.1.6.	Autres composés	201
1.1.2.	Les azapeptides	201
1.1.2.1.	1 ^{ère} série	203
1.1.2.2.	2 ^{ème} série	203
1.1.2.3.	3 ^{ème} série	203
1.1.2.4.	4 ^{ème} série	205
1.1.2.5.	5 ^{ème} série	205
1.2.	Efficacité d'inhibition sur ABCB1	207
1.2.1.	Les peptidomimétiques	207
1.2.1.1.	Efficacité d'inhibition	207
1.2.1.2.	Les relations structure-activité	209
1.2.1.3.	3D-Quantitative Structure-Activity Relationship	211
1.2.2.	Les azapeptides	213
1.2.2.1.	Efficacité d'inhibition	213
1.2.2.2.	Relations structure-activité	215
1.3.	Efficacité d'inhibition d'ABCG2	217
1.3.1.	Les peptidomimétiques	217
1.3.1.1.	Efficacité d'inhibition	217
1.3.2.	Les azapeptides	219
1.3.2.1.	Efficacité d'inhibition	219
1.3.2.2.	Les relations structure-activité	219
1.4.	Tests d'efficacité d'inhibition d'ABCC1	221
1.5.	Comparaison des efficacités d'inhibition sur 3 transporteurs ABC.....	223
2.	<i>Caractérisation des inhibiteurs d'ABCB1</i>	227
2.1.	Demi-concentration inhibitrice des réversines	227
2.2.	Chimiosensibilisation	229
2.3.	Cytotoxicité.....	231
2.4.	Mécanisme d'inhibition	233
2.4.1.	La réversine CT1321	235
2.4.2.	La réversine CT1336	237
2.4.3.	La réversine CT1347	239
2.5.	Simulation de docking	241
3.	<i>Caractérisations des inhibiteurs d'ABCG2</i>	247
3.1.	Concentrations de demi-inhibition des meilleures réversines pour ABCG2	247
3.2.	Chimiosensibilisation	249
3.3.	Cytotoxicité des réversines.....	251
3.4.	Caractérisation de la réversine CT1364	253
3.4.1.	Mécanisme d'inhibition	253
3.4.2.	La réversine CT1364 ne se fixe pas sur ECL3	257
3.4.3.	Diminution de l'activité d'hydrolyse de l'ATP	259
3.4.4.	Efficacité d'inhibition de l'efflux de substrats par le mutant ABCG2 ^{R482T}	261
3.4.5.	Diminution de l'expression d'ABCG2.....	263
3.4.5.1.	Diminution de l'expression totale d'ABCG2.....	263
3.4.5.2.	Expression membranaire d'ABCG2 constante	265
3.4.6.	Tests in vivo	269
3.4.6.1.	Mise en place du test.....	269
3.4.6.1.1.	Le choix des cellules	269
3.4.6.1.2.	Le choix de l'agent anticancéreux et de l'inhibiteur témoin	269
3.4.6.1.2.1.	L'irinotécan	269
3.4.6.1.2.2.	Le géfitinib.....	271
3.4.6.1.3.	Le protocole utilisé	271
3.4.6.2.	Toxicité	275
3.4.6.3.	Efficacité	277
3.4.6.3.1.	Validation des contrôles.....	277
3.4.6.3.2.	Effets du CT1364 dans une solution aqueuse d'éthanol 6%.....	279
3.4.6.4.	Expression d'ABCG2 dans les tumeurs.....	281
3.4.6.5.	Essais de formulation in vitro	283
3.4.6.5.1.	En lipides	283
3.4.6.5.2.	En nanoparticules	283
3.4.6.5.3.	Avec l'alcool benzylique	285
3.4.6.5.4.	Avec du DMSO.....	285
III.	CARACTERISATION DES SITES R, H ET P D'ABCB1	287

1.	<i>Etude de docking préliminaire</i>	287
2.	<i>Concentration de demi-efficacité d'inhibition</i>	293
3.	<i>Cytotoxicité des inhibiteurs QZ59</i>	295
4.	<i>Additivité des efficacités d'inhibition</i>	297
4.1.	Hoechst 33342	299
4.2.	La daunorubicine	301
5.	<i>Type d'inhibition</i>	303
5.1.	L'inhibiteur QZ59-(RRR)	305
5.1.1.	Mécanisme d'inhibition de l'efflux de daunorubicine	305
5.1.2.	Mécanisme d'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342	307
5.2.	L'inhibiteur QZ59-(SSS)	309
5.2.1.	Mécanisme d'inhibition de l'efflux de daunorubicine	309
5.2.2.	Mécanisme d'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342	311
5.2.2.1.	A forte concentration en Hoechst 33342.....	313
5.2.2.2.	A faible concentration en Hoechst 33342.....	313
5.2.3.	Mécanisme d'inhibition de l'efflux de prazosine	317
IV.	AUTRES TESTS	321
1.	<i>Tests in vivo de l'inhibiteur MBLI-87</i>	321
1.1.	Rappels (publiés dans Boumendjel et al., 2007)	321
1.2.	Tests <i>in vitro</i> supplémentaires.....	321
1.2.1.	Modulation de l'efflux de l'irinotécan par ABCG2	321
1.2.2.	Cytotoxicité de la formulation	323
1.3.	Tests in vivo	325
1.3.1.	Toxicité	325
1.3.2.	Pharmacocinétique	327
1.3.3.	Réversion du phénotype MDR.....	327
1.3.4.	Taux d'expression d'ABCG2 dans les xénogreffes	331
2.	<i>Activité d'ABCG2 purifiée</i>	335
	CONCLUSION	337
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	341
	COMMUNICATIONS	375
	PUBLICATIONS	379

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Echappement à la chimiothérapie des cellules cancéreuses.	35
Figure 2 : Mécanismes de résistance intervenant sur la concentration intracellulaire de drogues.	36
Figure 3 : Arbre phylogénétique des transporteurs ABC et protéines constituant les différentes classes.	42
Figure 4: Topologie des transporteurs ABC.	44
Figure 5: Représentation du transporteur BtuCD d' <i>E. coli</i> (code PDB 1L7V).	44
Figure 6 : Structure d'un NBD monomérique de l'histidine perméase périplasmique de <i>S.</i> <i>typhimurium</i>	46
Figure 7 : Structures quaternaires proposées pour les NBD.	47
Figure 8 : Représentation schématique des NBD et des différents motifs conservés.	48
Figure 9: Interaction de l'ATP avec le Walker A et la signature S de 2 NDB adjacents de <i>E.</i> <i>coli</i> MalK.	50
Figure 10 : Structure de l'homodimère des NBD H662A inactivés de HlyB de <i>E. coli</i> (pdb 1XEF) avec 2 molécules d'ATP liées (en orange).	50
Figure 11 : Structure de 2 exportateurs ABC cristallisés.	54
Figure 12 Structure de MsbA obtenue par cristallisation sous 3 conformations différentes. ..	55
Figure 13 : Cycle de transport par un transporteur ABC.	56
Figure 14 : Changement de conformation des NBD de MalK lors du cycle de transport et des TMD de MsbA.	57
Figure 15 : Localisation tissulaire des transporteurs ABC multidrogues.	62
Figure 16 : Localisation tissulaire d'ABCB1.	67
Figure 17 : Structure d'ABCB1 cristallisée avec les inhibiteurs QZ59.	71
Figure 18 : Acides aminés d'ABCB1 de souris interagissant avec les inhibiteurs QZ59 et le vérapamil.	72
Figure 19 : Acides aminés impliqués dans la poche de fixation des drogues de la forme ouverte ou fermée d'ABCB1 humaine.	73
Figure 20 : Cavité de fixation des substrats d'un modèle d'ABCB1 humain établi par homologie de séquence avec ABCB1 murin.	73
Figure 21 : Rotation des TMs lors du passage de la conformation ouverte à la conformation fermée d'ABCB1.	75
Figure 22 : Exemples de substrats d'ABCB1.	76
Figure 23 : Modèle des 2 sites de reconnaissance des substrats d'ABCB1 représenté par 2 pharmacophores.	78
Figure 24 : ABCB1 possède 3 sites de fixation pour les substrats (P, R et H).	79
Figure 25 : Localisation tissulaire schématique d'ABCG2.	82
Figure 26 : Topologie d'ABCG2.	85
Figure 27 : Résidus de cystéines impliqués dans la dimérisation d'ABCG2.	86
Figure 28 : Image de microscopie électronique de la face intracellulaire de His ₆ -ABCG2.	87
Figure 29 : Spectre des substrats des 3 transporteurs ABC principalement impliqués dans le phénotype MDR.	88
Figure 30 : Structure de 3 dérivés porphyriques transportés par ABCG2, l'hème, le phéophorbide a et la protoporphyrine IX.	89
Figure 31 : Phototoxicité induite par l'accumulation de phéophorbide a chez les souris <i>abcg2</i> - /-.	90
Figure 32 : ABCG2 ^{R482G} posséderait 3 sites de fixation des drogues distincts.	92
Figure 33 : Stratégies envisagées pour contrer le phénotype MDR.	93

Figure 34 : Structure de la cyclosporine A, inhibiteur de 1 ^{ère} génération d'ABCB1.....	96
Figure 35 : Structure de 2 inhibiteurs d'ABCB1 de 2 ^{ème} génération, le R-vérapamil et le PSC-833.....	97
Figure 36 : Structure de 2 inhibiteurs de 3 ^{ème} génération : l'élacridar et le zosuquidar.....	99
Figure 37 : Structure du tariquidar (XR9576).....	100
Figure 38 : Structure de 2 inhibiteurs spécifique d'ABCG2 : la fumitremorgine C et le Ko143.....	102
Figure 39 : Structure de 2 inhibiteurs non spécifiques d'ABCG2 : le diéthylstilbestrol et le TAG-139.....	103
Figure 40 : Structure de 2 flavonoïdes inhibiteurs d'ABCG2, la 6 prénylchrysine et la tectochrysine.....	103
Figure 41 : Structure de 2 inhibiteurs des tyrosine kinases également inhibiteurs d'ABCG2, le géfitinib et l'imatinib.....	104
Figure 42 : Structure de 2 inhibiteurs des protéases du VIH également inhibiteurs d'ABCG2 : le ritonavir et le saquinavir.....	105
Figure 43 : Structure des curcuminoïdes.....	106
Figure 44 : photo de la lignée cellulaire Flp-In TM -293.....	119
Figure 45 : Plasmides utilisés pour le clonage et l'expression d'ABCG2 dans le système Flp-In TM -293.....	120
Figure 46 : Schémat de la mutagenèse dirigée par PCR.....	125
Figure 47 : Plasmide pOG44.....	128
Figure 48 : Photos des lignées cellulaires NIH3T3 (A) et NIH3T3-MDR G185 (B).....	129
Figure 49 : Photos des lignées cellulaires HEK-293 pcDNA3.1 (A) et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482 (B).....	130
Figure 50 : Paramètres mesurés par le cytomètre en flux.....	131
Figure 51 : cytomètre en flux.....	132
Figure 52 : cytogramme représentant la granulosité des cellules en fonction de leur taille...	133
Figure 53 : Elimination des doublets.....	133
Figure 54 : Mesure de la fluorescence intracellulaire dans le canal le plus approprié.....	133
Figure 55 : Protocole de cytométrie en flux pour la mesure de transport de substrats ou pour la mesure de l'activité inhibitrice d'un composé.....	135
Figure 56 : Exemple de l'augmentation de la fluorescence intracellulaire lorsque l'on ajoute des concentrations croissantes d'un inhibiteur.....	136
Figure 57 : Mesures effectuées pour déterminer l'efficacité d'inhibition d'un composé testé et calcul de son efficacité.....	137
Figure 58 : Principe du système Flp-In TM	156
Figure 59 : Taux d'expression d'ABCG2 dans le système Flp-In TM -293 comparé aux cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2.....	158
Figure 60 : Quantification de l'adressage d'ABCG2 à la membrane plasmique dans les 2 systèmes cellulaires étudiés.....	158
Figure 61 : Quantification de l'efflux de mitoxantrone par ABCG2 dans 2 systèmes d'expression.....	160
Figure 62 : Comparaison de l'activité d'hydrolyse d'ATP vanadate-sensible sur un extrait total de protéines membranaires des 2 systèmes étudiés.....	162
Figure 63 : Modèle topologique en 2D d'ABCG2. Les résidus mutés sont encadrés en rouge.....	164
Figure 64 : Quantification du taux d'expression d'ABCG2 muté.....	164
Figure 65 : Taux d'expression membranaire d'ABCG2 naturelle et H457A.....	166
Figure 66 : Comparaison de l'expression membranaire d'ABCG2 naturelle ou mutée.....	166
Figure 67 : Activité de transport d'ABCG2 naturelle ou mutée.....	168

Figure 68 : Quantification du taux résiduel d'hémine et de protoporphyrine IX dans les cellules exprimant ABCG2.	172
Figure 69 : Cytotoxicité induite par différents substrats d'ABCG2 sur des cellules exprimant la protéine naturelle ou mutée.	174
Figure 70 : Activité d'hydrolyse de l'ATP dans des préparations de membranes de cellules exprimant ABCG2 naturelle ou mutée.	178
Figure 71 : Activité d'hydrolyse de l'ATP, sur des préparations de membranes exprimant ABCG2 naturelle ou mutée, après stimulation.	182
Figure 72 : Purification d'ABCG2 à partir de membranes de cellules de mammifère.	184
Figure 73 : Purification d'ABCG2 avec une double solubilisation OG 0,5% puis DDM 4%.	186
Figure 74 : Spectre d'émission de fluorescence intrinsèque de la protéine purifiée, après excitation à 295 nm.	186
Figure 75 : Modèle topologique d'ABCG2 prédit par Wang et collaborateurs.	190
Figure 76 : Structure de la réversine 121, inhibiteur d'ABCB1.	196
Figure 77 : Modifications structurales de la réversine 121.	196
Figure 78 : Efficacité d'inhibition par les peptidomimétiques de l'efflux de mitoxantrone par ABCB1.	206
Figure 79 : 3D-QSAR des dérivés de la réversine.	210
Figure 80 : Efficacité d'inhibition par les azapeptides de l'efflux de mitoxantrone par ABCB1.	212
Figure 81 : Efficacité d'inhibition par les peptidomimétiques de l'efflux de mitoxantrone par ABCG2.	216
Figure 82 : Efficacité d'inhibition par les azapeptides de l'efflux de mitoxantrone par ABCG2.	218
Figure 83 : Efficacité d'inhibition par les peptidomimétiques sur l'efflux de substrats par ABCC1.	220
Figure 84 : Comparaison des efficacités d'inhibition de l'efflux de mitoxantrone par les meilleurs composés inhibiteurs d'ABCB1 ou ABCG2.	222
Figure 85 : Diagramme de Venn représentant le spectre des inhibiteurs de 3 transporteurs ABC.	224
Figure 86 : Efficacité de réversion de l'efflux de mitoxantrone par la réversine 121, CT1300, et par les composés CT1347, CT1336 et CT1321.	226
Figure 87 : Les 3 réversines CT1321, CT1336 et CT1347 chimiosensibilisent les cellules NIH3T3-MDR-G185 exprimant ABCB1.	228
Figure 88 : Les 3 réversines, CT1321, CT1336 et CT1347 sont peu, ou pas, cytotoxiques.	230
Figure 89 : CT1321 inhibe l'efflux de daunorubicine avec un mécanisme non compétitif.	234
Figure 90 : CT1336 inhibe l'efflux de daunorubicine de façon non compétitive mais inhibe l'efflux de Hoechst 33342 de façon compétitive.	236
Figure 91 : CT1347 inhibe l'efflux de daunorubicine et de Hoechst 33342 de manière non compétitive.	238
Figure 92 : Structures des réversines CT1336 et CT1347.	240
Figure 93 : Modèle d'ABCB1 humaine et représentation des 4 zones utilisées pour les études de docking.	240
Figure 94 : Docking de la réversine CT1347, du Hoechst 33342 et de la rhodamine 123 sur ABCB1 humaine.	242
Figure 95 : IC ₅₀ de 4 réversines inhibitrices d'ABCG2.	246
Figure 96 : Les 4 réversines CT1328, CT1364, CT1366 et CT1361 chimiosensibilisent les cellules exprimant ABCG2.	248

Figure 97 : Les réversines CT1328, CT1364, CT1366 et CT1361 ne sont pas ou peu cytotoxiques.	250
Figure 98 : CT1364 inhibe l'efflux des 3 substrats testés (mitoxantrone, Hoechst 33342 et rhodamine 123) de façon non compétitive.	252
Figure 99 : CT1364 n'empêche pas la fixation de l'anticorps 5D3 sur la 3 ^{ème} boucle extracellulaire d'ABCG2.....	256
Figure 100 : Courbe de saturation de l'interaction d'inhibiteurs d'ABCG2 avec ECL3.	256
Figure 101 : Diminution de l'activité d'hydrolyse de l'ATP de 50% avec 5 µM de CT1364.	258
Figure 102 : Mesure de l'accumulation de substrat dans les cellules exprimant la forme sauvage ou mutée d'ABCG2.....	260
Figure 103 : La réversine CT1364 n'inhibe pas ou peu la forme mutée ABCG2 ^{R482T}	260
Figure 104 : CT1364 induit une diminution de l'expression d'ABCG2.....	264
Figure 105 : CT1364 n'affecte pas l'adressage d'ABCG2 à la membrane plasmique.	266
Figure 106 : Métabolisation de l'irinotécan en SN-38, son métabolite actif.	268
Figure 107 : Structure du géfitinib	270
Figure 108 : Protocole utilisé pour les tests de réversion <i>in vivo</i>	272
Figure 109 : Validation des contrôles lors du test de chimioréversion <i>in vivo</i>	276
Figure 110 : Effets chimiosensibilisants du CT1364 ou de l'éthanol 6% combiné ou non avec l'irinotécan.	278
Figure 111 : Expression d'ABCG2 dans les tumeurs extraites des souris.	280
Figure 112 : Efficacité d'inhibition d'ABCG2 par le composé CT1364 en intralipide.	282
Figure 113 : Coopérativité positive entre les sites de fixation de substrats d'ABCB1.	286
Figure 114 : Poches A à E dans lesquelles ont été effectué les simulations de docking.....	288
Figure 115 : Schéma permettant une visualisation des zones préférentielles pour le docking des substrats et des inhibiteurs étudiés.	290
Figure 116 : Concentration de demi-inhibition maximale des QZ59 avec 2 µM de daunorubicine ou 2 µM de Hoechst 33342.	292
Figure 117 : Cytotoxicité des 2 inhibiteurs QZ59 sur les cellules NIH3T3 et NIH3T3-MDR-G185.....	294
Figure 118 : Schématisation des effets additifs dans le cas de 2 inhibiteurs qui se fixent au même site d'une protéine (A) ou à des sites différents (B).	296
Figure 119 : Additivité des efficacités d'inhibition des 2 inhibiteurs QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS).	298
Figure 120 : Additivité des efficacités d'inhibition des 2 inhibiteurs QZ59-(RRR) (A) et QZ59-(SSS) (B) avec l'inhibiteur CT1347.	298
Figure 121 : Additivité des efficacités d'inhibition des 2 énantiomères du QZ59 avec le CT1347.....	300
Figure 122 : Mécanisme d'inhibition par le QZ59-(RRR) de l'activité d'efflux de daunorubicine par ABCB1.	304
Figure 123 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(RRR) vis-à-vis du Hoechst 33342.....	306
Figure 124 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis de la daunorubicine.....	308
Figure 125 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis du Hoechst 33342 à forte concentration.	312
Figure 126 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis du Hoechst 33342 à faible concentration.	314
Figure 127 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis de la bodipy-prazosine.....	316
Figure 128 : Structures du GF120918 et du MBLI-87, son analogue structural.....	320

Figure 129 : Mesure de l'accumulation d'irinotécan dans les cellules exprimant ou non ABCG2 en présence ou en absence de 5 μ M de MBLI-87, 5 μ M de GF120918 ou 10 μ M de fumitrémorgine C.	322
Figure 130 : Cytotoxicité des nanoparticules seules et du MBLI-87 formulé dans les nanoparticules.....	322
Figure 131 : Représentation de la concentration plasmatique d'irinotécan et de SN-38 en fonction du temps.	326
Figure 132 : Activité du MBLI-87, des nanoparticules et de l'irinotécan, seuls ou en combinaison, sur les xénogreffes exprimant ou non ABCG2.	328
Figure 133 : Taux d'expression d'ABCG2 dans les xénogreffes des souris après traitements.	330
Figure 134 : Activité d'hydrolyse de l'ATP d'ABCG2 solubilisé dans 2 détergents, le DDM ou le DOTM.	334

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différentes classes d'agents chimiothérapeutiques.....	32
Tableau 2 : Motifs conservés avec leur séquence et leur fonction.....	48
Tableau 3 : Liste des gènes des transporteurs ABC humains avec leurs localisations chromosomiques, cellulaires ou tissulaires, ainsi que leur fonction principale.....	58
Tableau 4 : Transporteurs ABC impliqués dans des maladies génétiques.....	63
Tableau 5 : Principaux substrats médicamenteux d'ABCB1.....	76
Tableau 6: Principaux substrats médicamenteux d'ABCG2.....	91
Tableau 7 : Essai clinique des inhibiteurs de 3 ^{ème} génération.....	98
Tableau 8 : Principaux inhibiteurs connus d'ABCG2.....	101
Tableau 9 : Exemples de composés induisant l'apoptose chez les cellules exprimant un transporteur ABC.....	114
Tableau 10 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée d'ABCG2.....	126
Tableau 11 : Groupes de 3 souris pour le test de toxicité des composés.....	146
Tableau 12 : Groupes de souris établis pour le test <i>in vivo</i> de réversion du phénotype MDR.....	147
Tableau 13 : Résistance des cellules exprimant ou non ABCG2 naturelle ou mutée.....	176
Tableau 14 : Résistance des cellules exprimant ou non ABCG2 naturelle ou mutée rapportée au taux d'expression membranaire.....	176
Tableau 15 : Paramètres cinétiques de l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'ABCG2 naturelle ou mutée.....	180
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des modifications induites par mutation sur l'expression, le transport de substrats, la sensibilisation des cellules aux agents anticancéreux et l'activité d'hydrolyse de l'ATP basale et stimulée.....	188
Tableau 17 : Premier groupe de composés permettant d'évaluer l'importance de la liaison peptidique, des chaînes latérales et de leurs substituants.....	198
Tableau 18 : Composés de type tyr-gly.....	198
Tableau 19 : Composés permettant l'étude du rôle de la liaison peptidique sur l'inhibition.....	200
Tableau 20 : Composés contraints.....	200
Tableau 21 : Composés possédant un groupement sulfone.....	200
Tableau 22 : Composés autres.....	200
Tableau 23 : 1 ^{ère} série de composés aza-peptidomimétiques.....	202
Tableau 24 : 2 ^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.....	202
Tableau 25 : 3 ^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.....	202
Tableau 26 : 4 ^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.....	204
Tableau 27 : 5 ^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.....	204
Tableau 28 : IC ₅₀ des peptidomimétiques les plus efficaces pour inhiber ABCB1.....	206
Tableau 29 : IC ₅₀ des azapeptides les plus actifs pour inhiber ABCB1.....	212
Tableau 30 : IC ₅₀ des azapeptides les plus actifs pour inhiber ABCG2.....	218
Tableau 31 : Constantes cinétiques de l'inhibition du transport de daunorubicine par CT1321.....	234
Tableau 32 : Constantes cinétiques de l'inhibition par le CT1336 de l'efflux de 2 substrats.....	236
Tableau 33 : Valeurs des R_{max} et K_M du CT1347 avec la daunorubicine et le Hoechst 33342.....	238
Tableau 34 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de substrats par CT1364.....	254
Tableau 35 : CScores de chaque molécule positionnée par docking sur les 6 poches choisies.....	290

Tableau 36 : Constantes cinétiques du mécanisme d'inhibition du QZ59-(RRR) avec la daunorubicine.	304
Tableau 37 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342 par le QZ59-(RRR).	306
Tableau 38 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de daunorubicine par le QZ59-(SSS).	310
Tableau 39 : Constantes cinétiques de l'inhibition par de fortes concentrations de QZ59-(SSS) de l'efflux du Hoechst 33342.	312
Tableau 40 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342 par de faibles concentrations de QZ59-(SSS).	314
Tableau 41 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de bodipy-prazosine par le QZ59-(SSS).	316

ABREVIATIONS

5-FU : 5-FluoroUracile

Å : Angstrom

ABC : ATP Binding Cassette

ABCP : ABC-Placenta (ABCG2)

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ADME : absorption, distribution, métabolisation, élimination

AON : oligonucléotides antisens

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)

BHE : Barrière Hémato-encéphalique

BPD : Binding Protein-Dependent

BSA : Bovine Serum Albumin

CFTR :Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CPT-11 : 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin ou irinotécan

CYP3A4 : cytochrome P450 3A4

Da : Dalton

DMEM : Dulbecco modified Eagle's minimal

DMSO : DiMéthylSulfOxide

ECL : Extracellular Loop

EDTA : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

EGFR : récepteur de facteur de croissance épidermique

EMT-6 : cellules provenant de tumeurs des glandes mammaires de souris

ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementing 1 protein

ES : cellules souches embryonnaires (Embryonnaires souches)

FRT : Flp Recombination Target

FTC : fumitrémorgine C

g : gramme

GSH : glutathion

HDL : High density lipoprotein

h : heures

HEK-293 : Human Embryonic Kidney 293

HPLC : High-performance liquid chromatography

HUGO : HUman Genome Organization

Abréviations

ICL0 : intracellular Loop

IC₅₀ : concentration de demi-inhibition

IP : intrapéritonéale

K562 : cellules erythroleucemiques

K : kilo

K_I : constante d'inhibition

K_M : constante de Michaelis

KO : Knock Out

l : litre

LB : Milieu de Luria Bertani

LOO : leave one outside

m : mètre

M : molaire

min : minute

MCF7/adrVP : cellules provenant de cancer du sein exprimant ABCG2

MDR : MultiDrug Resistance

MMR : Mismatch repair

MRP1 : Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1)

MTT : bromure de 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

MXR : mitoxantrone-resistance associated gene (ABCG2)

NBD : Nucleotide Binding Domain

ng : nanogramme

nm : nanomètre

nmol : nanomoles

Ni²⁺-NTA :Nickel nitriloacétique acide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : paraformaldéhyde

PBS : Phosphate Buffer Saline

PC : PhosphatidylCholine

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : PhycoErythrine

P-gp : P-glycoprotéine (ABCB1, MDR1)

Pi : Phosphate inorganique

PPIX : protoporphyrine IX

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship

Abréviations

REN : Réparation par excision de nucleotide

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

$R_{\max}$: taux résiduel maximum

ROS : espèces réactives à l'oxygène

s : seconde

S1-M1-80 : cellules provenant de cancer du colon exprimant ABCG2

SBP : Substrate Binding Protein

SCID : Severe Combined Immunodeficiency

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Sf9 : cellules d'insectes de *Spodoptera frugiperda*

shRNA : short hairpin RNA

SLC : Solute Carrier

SN-38 : 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin

SNP : single-nucleotide polymorphism

SP : side population

SVF : Sérum de Veau Foetal

TBS : Tris Buffer Saline

TEME : Tumor-Expressed Metabolizing Enzymes

TEMED : *N,N,N',N'*-tétraméthyl-éthylène-diamine

TFA : acide trifluoroacétique

TM : passage transmembrnaire

TMD : TransMembrane Domain

U : unité

UV_{254nm} : ultraviolet à 254 nm

V : volt

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

$V_{\max}$: vitesse maximale de réaction

$V_{\max}'$: vitesse maximale de réaction rapportée au taux d'expression de la protéine

XPA : Xéroderma pigmentosum

μ : micro

INTRODUCTION

Le cancer demeure un grave problème de santé publique en France mais également de part le monde. Cette pathologie est responsable de 7,8 millions de décès en 2005 et son incidence ne cesse d'augmenter. Il existe 3 traitements majeurs pour lutter contre cette maladie, la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière est quelque fois la seule capable de traiter certains cancers tels que les leucémies ou les cancers métastasés. Cependant, des phénomènes de résistance à ces traitements chimiothérapeutiques rendent certains cancers non traitables. Cette résistance peut être due à l'environnement de la tumeur par le biais de mécanismes non cellulaire ou être induite par les cellules cancéreuses elles-mêmes (mécanismes cellulaire de résistance), soit de manière innée, soit par pression de sélection des agents chimiothérapeutiques, conduisant alors à ce qu'on appelle la résistance à de multiples drogues (phénotype MDR).

Les transporteurs ABC (« ATP binding Cassette ») constituent une famille de protéines impliquées dans de nombreuses maladies génétiques et elles sont également responsables du phénotype MDR. Trois transporteurs ABC sont particulièrement impliqués dans cette résistance : ABCB1 (aussi appelé P-gp), ABCC1 (ou MRP1) et ABCG2 (ou BCRP, MXR ou ABCP). Ces protéines sont notamment exprimées à la membrane plasmique des cellules où elles permettent l'export d'une grande variété de substrats qui peuvent être structurellement très différents. Les cellules cancéreuses surexpriment ces transporteurs membranaires leur permettant alors d'expulser les agents chimiothérapeutiques et ainsi de résister à ces traitements. La polyspécificité est une caractéristique essentielle de ces transporteurs qui est en partie due à la présence de sites distincts de fixation des substrats sur ces protéines. Ainsi, il est maintenant admis qu'ABCB1 possède au moins 3 sites de fixation des substrats, le site R (reconnaissant préférentiellement la rhodamine 123 ou les anthracyclines), le site H (fixant préférentiellement le Hoechst 33342) et le site P (reconnaissant préférentiellement la prazosine ou la progestérone). Quant à ABCG2, les sites de fixation des substrats sont peu connus ; cette protéine en posséderait également au moins 2 mais peu de données sont actuellement connues sur ces sites.

Depuis plusieurs années, le laboratoire étudie ces transporteurs ABC afin, d'une part de mieux comprendre leur fonctionnement, et d'autre part, de développer des inhibiteurs de ces transporteurs ce qui permettrait alors de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques. Ma thèse s'est ainsi inscrite dans la continuité de ces 2 thèmes.

Dans une première partie, je me suis intéressée au fonctionnement d'ABCG2 et plus particulièrement à l'importance des boucles intracellulaires. J'ai étudié l'impact des mutations de 4 résidus sur l'activité de transport de substrat ainsi que sur l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Trois mutants, H350A, H375A et H457A, ont une influence positive ou négative sur l'activité de transport d'ABCG2 mais également sur son activité d'hydrolyse de l'ATP. Ces résultats, particulièrement intéressants, laissent supposer que ces résidus pourraient être impliqués soit dans la reconnaissance des substrats, soit directement dans la fixation des substrats sur ABCG2. Le quatrième mutant, W379A, conduit à des résultats assez différents. L'activité de transport est fortement augmentée pour tous les substrats testés tandis que l'activité d'hydrolyse de l'ATP n'est que faiblement affectée. Nous supposons que ce résidu pourrait être situé sur le passage des substrats, de la même façon que le résidu R482. Ainsi, la mutation d'un résidu tryptophane par un résidu alanine « ouvrirait » la voie de passage pour les substrats conduisant à une augmentation du transport.

Dans une 2^{ème} partie, j'ai étudié une nouvelle classe de composés potentiellement inhibiteur d'ABCB1 et/ou d'ABCG2, les peptidomimétiques. Cette étude a permis d'une part la caractérisation de composés inhibant de manière spécifique et efficace ABCB1. Ces composés se sont révélés non cytotoxiques à forte concentration (jusqu'à 5 fois leur IC₅₀), restaurant la sensibilité des cellules aux agents chimiothérapeutiques et, pour la 1^{ère} fois, non compétitifs de 2 sites de fixation des substrats, le site R et le site H d'ABCB1, limitant ainsi leur capacité à être expulsé par un transporteur ABC. Une classe particulière de ces peptidomimétiques, les azapeptides, se sont révélés très efficaces pour inhiber ABCG2. Un composé, le CT1364, a été particulièrement étudié et possède des caractéristiques essentielles à un développement clinique : non cytotoxique, chimiosensibilisant et non compétitif des substrats ; de plus il semble inhiber ABCG2 par plusieurs voies : inhibition du transport de substrat, diminution de l'expression du transporteur et diminution de l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Les premiers tests *in vivo* ont également mis en évidence son efficacité, certes limitée mais réelle, à augmenter l'efficacité des agents chimiothérapeutiques.

Enfin, une dernière étude, initiée très récemment a consisté en l'étude des sites de fixation des substrats sur ABCB1. En effet, leur localisation précise dans la protéine n'est pas connue. Nous avons imaginé positionner ces sites par le biais de 2 inhibiteurs, QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS) co-cristallisés avec ABCB1 et donc dont les sites de fixation sont connus. Les premiers résultats sont assez encourageants et tendent à montrer que le site H pourrait être recouvrant avec le site de fixation du QZ59-(SSS).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le cancer

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Selon l'OMS, en 2005, le cancer était responsable de 7,6 millions de décès dans le monde et ce chiffre pourrait augmenter à 84 millions au cours des 10 prochaines années si aucune mesure n'était prise. En France, en 2007, le cancer représente la première cause de mortalité d'après l'Institut de veille sanitaire. L'incidence globale du cancer a augmenté de 60% entre 1980 et 2000 en raison du vieillissement de la population et des causes environnementales, mais également grâce à la généralisation des techniques d'exploration et de dépistage.

Les cancers les plus répandus chez l'homme sont le cancer de la prostate, du poumon, le cancer colorectal et de l'œsophage tandis que chez la femme ce sont le cancer du sein, du poumon, de l'estomac, le cancer colorectal et le cancer du col de l'utérus.

Un plan national de lutte contre le cancer (2003-2007) fut créé par le Ministère de la Santé, répertoriant les différents facteurs de risque. Le rapport de l'OMS paru en 2008 explique notamment que l'incidence des cancers liés aux causes environnementales est probablement sous-estimée. Celui-ci insiste, entre autres sur l'importance des méthodes de dépistage. On sait aujourd'hui que 30% des décès pourraient être évités s'ils étaient détectés à temps ou si les comportements humains étaient modifiés.

1. Développement d'un cancer

Le cancer est un terme général qui désigne un ensemble de maladies touchant de nombreux organes. Il est caractérisé par une division anarchique des cellules qui échappent alors aux systèmes de protection. Les cellules cancéreuses perdent leurs spécificités et peuvent se diviser à l'infini. Elles sont autocrines c'est-à-dire qu'elles n'ont pas besoin de stimuli externes pour leur développement. Ainsi, les cellules produisent elle-même leurs propres hormones ou cytokines.

La cancérogénèse implique 2 catégories de gènes : ceux intervenant dans les fonctions intracellulaires (contrôle du cycle cellulaire, apoptose, réplication et réparation de l'ADN, différenciation) et ceux intervenant dans les fonctions extracellulaires (adhésion, protéases, angiogénèse).

Le cancer est une maladie multifactorielle. Le processus est long et comporte de nombreuses étapes. On distingue 3 phases :

- l'étape d'initiation : elle est provoquée par un ou plusieurs carcinogènes puissants, chimiques, physiques ou viraux qui peuvent déterminer des mutations ponctuelles. Des enzymes de réparation interviennent alors plus ou moins efficacement. Les agents carcinogènes peuvent être présents dans notre environnement naturel (soleil, polluants, ...) ou artificiel (tabagisme, médicaments,...). Cette phase est essentielle et dépend notamment de nos prédispositions génétiques à métaboliser les pro-carcinogènes en carcinogènes, ou à réparer plus ou moins efficacement les lésions à l'ADN.

- La phase de promotion ou de facilitation : de nombreux cofacteurs peuvent intervenir, agissant pendant longtemps ou de manière répétitive, avec des effets cumulatifs en stimulant les cellules initiées. Ces facteurs peuvent être environnementaux, endogènes (statut immunitaire, ...), iatrogènes, comportementaux (alcool, tabac, ...), viraux ou nutritionnels.

- La phase de conversion puis de prolifération : les promoteurs de la 1^{ère} phase permettent aux cellules mutées d'échapper aux systèmes de réparation et de contrôle de l'organisme et de proliférer sans se différencier.

Un facteur aggravant du pronostic est l'apparition de métastases. Elles correspondent à des cellules malignes qui migrent, parfois loin, de leur site d'origine. Ceci se produit lorsque les cellules tumorales acquièrent des caractères métastatiques. Un faible pourcentage de cellules arrive alors à passer dans la circulation sanguine ce qui lui permet d'atteindre un nouveau tissu.

2. Traitements

Il existe plusieurs traitements possibles pour lutter contre un cancer. La 1^{ère} méthode décrite ici est par voie invasive : la chirurgie ou exérèse des cellules tumorales. Les 2 autres méthodes, la radiothérapie et la chimiothérapie, utilisent des agents pour tuer les cellules cancéreuses. Le principal désavantage de ces 2 méthodes non invasives est qu'elles ne ciblent pas spécifiquement les cellules cancéreuses. D'autres traitements tels que l'hormonothérapie et l'immunothérapie existent mais ils ne seront pas abordés ici. Le choix d'une ou plusieurs méthodes dépend du type de la tumeur, de sa localisation, du stade de développement du cancer et de l'état général du patient.

2.1. Chirurgie

La chirurgie fut la 1^{ère} thérapie utilisée pour traiter un cancer. Elle a pour but l'exérèse des cellules cancéreuses. Elle peut avoir lieu de manière préventive (permettant alors d'établir

un diagnostic) ou de manière curative. Dans ce dernier cas, la chirurgie est fréquemment associée à un autre traitement (radiothérapie, chimiothérapie). La chirurgie peut être pratiquée d'emblée, afin de diminuer la taille de la tumeur, facilitant ainsi le 2^{ème} traitement. Mais, elle permet également d'éliminer les dernières cellules cancéreuses à la suite d'un 1^{er} traitement. Cette thérapie est efficace dans les stades tumoraux précoces, mais se révèle inefficace en cas de métastases.

2.2. Radiothérapie

La radiothérapie consiste à irradier un tissu afin d'altérer l'ADN des cellules et ainsi empêcher leur division. Elle cible donc particulièrement les cellules à croissance rapide (telles que les cellules cancéreuses). C'est une méthode locorégionale permettant de cibler une zone traitée. Ceci permet de minimiser les dégâts occasionnés aux tissus sains (Brown and Giaccia, 1998). Elle peut être utilisée en traitement unique ou en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie.

2.3. Chimiothérapie

2.3.1. Principe général

La chimiothérapie consiste en l'administration d'une substance chimique dans le but de tuer les cellules cancéreuses. Ces molécules thérapeutiques, encore appelées cytotoxiques, ciblent les cellules à division rapide en stoppant leur division cellulaire et conduisent à leur mort. Les cellules cancéreuses ne sont malheureusement pas les seules touchées. Les entérocytes de la muqueuse intestinale, hématologiques ou encore celles responsables de la pousse des cheveux sont également atteintes. Elle est la cause de la majorité des effets indésirables qui peuvent être assez lourds selon la molécule administrée. Afin de diminuer ces effets indésirables, on peut proposer un « traitement de support » au patient.

Un traitement chimiothérapeutique s'administre par voie intraveineuse mais également par voie intramusculaire ou orale. Selon le type de tumeur, sa localisation, son stade et l'état du patient, on peut décider d'administrer une seule molécule chimiothérapeutique (monochimiothérapie) ou un cocktail d'agents anticancéreux (polychimiothérapie).

2.3.2. Les différentes classes d'agents anticancéreux

Il existe un très grand nombre de molécules chimiothérapeutiques. Elles peuvent être classées selon leur mode d'action (Tableau 1).

Les antimétaboliques	1- <u>Les antifolates</u> - <i>Le methotrexate</i> 2- <u>Les analogues des bases puriques</u> - <i>Le 6-mercaptopurine</i> 3- <u>Les analogues des bases pyrimidiques</u> - <i>Le 5-fluoro-uracile (5-FU)</i> - <i>La cytarabine</i> - <i>La gemcitabine</i>
Les agents agissant sur l'ADN	1. <u>Les agents alkylants</u> a- Les moutardes azotées ou chloréthylamines - <i>Le cyclophosphamide</i> - <i>Le chlorambucil</i> b- Les esters disulfoniques c- Les éthylènes amines d- Les alkyles nitrosurés e- Les dialkyletriazènes f- Les dérivés organiques - <i>Le cisplatine</i> 2. <u>Les agents intercalants</u> a- Les inhibiteurs de la topoisomérase I : les camptothécines - <i>L'irinotécan</i> - <i>Le topotecan</i> b- Les inhibiteurs de la topoisomérase II - <i>La mitoxantrone</i> - <i>L'étoposide</i> - <i>Les anthracyclines : la daunorubicine</i> <i>la doxorubicine</i> 3. <u>Les autres intercalants</u> - <i>La bléomycine</i>
Les antimitotiques	1- <u>Les alcaloïdes de la pervenche</u> - <i>La vinblastine</i> - <i>La vincristine</i> 2- <u>Les dérivés de l'if : les taxanes</u> - <i>Le paclitaxel</i> - <i>Le docétaxel</i>
Les inhibiteurs des protéines kinases	- <i>L'imatinib</i> - <i>Le géfitinib</i>

Tableau 1 : Les différentes classes d'agents chimiothérapeutiques.

Les exemples cités correspondent à des agents chimiothérapeutiques cités ou utilisés dans la suite du manuscrit.

3. Mécanismes de résistance

A l'heure actuelle, la chimiothérapie est utilisée pour traiter un grand nombre de cancers. Certains, comme les leucémies ou encore les cancers métastasés ne peuvent être traités que par la chimiothérapie. Malheureusement, de plus en plus de phénomènes de résistance apparaissent. C'est ce qu'on appelle la chimiorésistance ou phénotype de multirésistance lorsque les cellules cancéreuses développent une résistance à plusieurs médicaments non reliées structurellement. Ce phénotype a été décrit pour la 1^{ère} fois en 1970 (Biedler and Riehm, 1970). Nous savons maintenant qu'il est multifactoriel et non pas la résultante d'un seul mécanisme mis en place par les cellules cancéreuses (Larsen and Skladanowski, 1998).

Les mécanismes de résistance peuvent avoir 2 origines : non cellulaire (c'est-à-dire reliés à la physiologie des tumeurs) ou alors cellulaire (imposée par pression de sélection des traitements chimiothérapeutiques).

3.1. Mécanismes non cellulaires de résistance

L'importance de l'environnement tumoral a été mise en évidence en 1990 par Teicher et collaborateurs. Des cellules EMT-6 provenant de tumeurs des glandes mammaires de souris deviennent résistantes à différents agents anticancéreux après plusieurs semaines de traitement *in vivo* mais ne présentent pas de résistance lorsqu'elles sont soumises aux mêmes traitements *in vitro* (Teicher *et al.*, 1990). Ceci suppose que des facteurs extérieurs propres à la tumeur, mais dans son environnement proche, interviennent dans les phénomènes de résistance. On peut citer 2 mécanismes principaux (Brown and Giaccia, 1998) :

- Le réseau sanguin tumoral :

Dans les tissus sains, les vaisseaux sanguins sont organisés de manière ordonnée avec un flux régulier. Dans une tumeur, on trouve 2 types de vaisseaux sanguins : les vaisseaux des tissus sains par lesquels se sont développée la tumeur et les vaisseaux produits par de nouveaux facteurs pro-angiogéniques provenant des cellules tumorales (néovascularisation). Il y a donc une croissance perpétuelle de nouveaux vaisseaux sanguins. Les 2 types de vaisseaux développent des anomalies : ils sont tortueux, perméables et ont un flux irrégulier et lent (Dewhirst *et al.*, 1989 ; Endrich *et al.*, 1979 ; Grunt *et al.*, 1985 ; Shah-Yukich and Nelson, 1988). Dans le cas d'un traitement chimiothérapeutique, ceci conduit à une délivrance faible et irrégulière des agents chimiothérapeutiques. On voit ainsi apparaître des résistances aux traitements chimiothérapeutiques du fait de cette vascularisation particulière dans les tumeurs.

- L'oxygénation :

L'oxygénation des tissus sains est constante. Elle peut être hétérogène mais l'on retrouve rarement des régions privées d'oxygène. Dans un environnement tumoral, du fait de la croissance rapide, les cellules doivent croître à des distances supérieures à celle possible pour la diffusion de l'oxygène créant ainsi fréquemment des régions en état d'hypoxie (Thomlinson and Gray, 1955).

En 1953, Gray et collaborateurs montrent que la sensibilité des cellules et des tissus aux radiations dépend de leur oxygénation au moment de l'irradiation (Gray *et al.*, 1953). En effet, les radiations produisent des dommages à l'ADN par le biais de radicaux qui se forment grâce à l'oxygène. L'hypoxie est également responsable d'une diminution de l'efficacité des chimiothérapies. Les cellules en hypoxie se divisant moins (Bedford and Mitchell, 1974; Rodriguez *et al.*, 1994 ; Tannock, 1968), les agents anticancéreux, qui généralement ciblent les cellules en division, seront moins efficaces contre ces cellules cancéreuses (Durand, 1994). Enfin, les cellules en hypoxie sont éloignées des vaisseaux sanguins et donc sont moins accessibles aux agents anticancéreux.

3.2. Mécanismes cellulaires de résistance

Les cellules cancéreuses résistent aux traitements par le biais de plusieurs mécanismes qui permettent normalement aux cellules saines de se protéger contre des toxines. Ces systèmes ont été adaptés par les cellules cancéreuses. Ainsi, la résistance développée par les cellules cancéreuses peut être innée ou acquise (Figure 1). La résistance innée (ou résistance primaire) se développe dès le premier contact avec la drogue anticancéreuse. Dans ce cas, il est probable que d'autres oncogènes ou des facteurs de carcinogénèse qui ne sont pas inhibés par l'agent anticancéreux soient impliqués. Un nouvel agent anticancéreux ou un cocktail d'anticancéreux permettra de pallier cette résistance. La résistance acquise (ou résistance secondaire) apparaît généralement en 2 étapes : la 1^{ère} est une sélection de clones tolérants qui sont la plupart du temps à l'état quiescent. La 2^{ème} étape consiste en une instabilité génomique de ces clones quiescents qui développent alors une croissance rapide tout en acquérant des mécanismes de résistance indépendants de la drogue ou de la cible (Rochat, 2009).

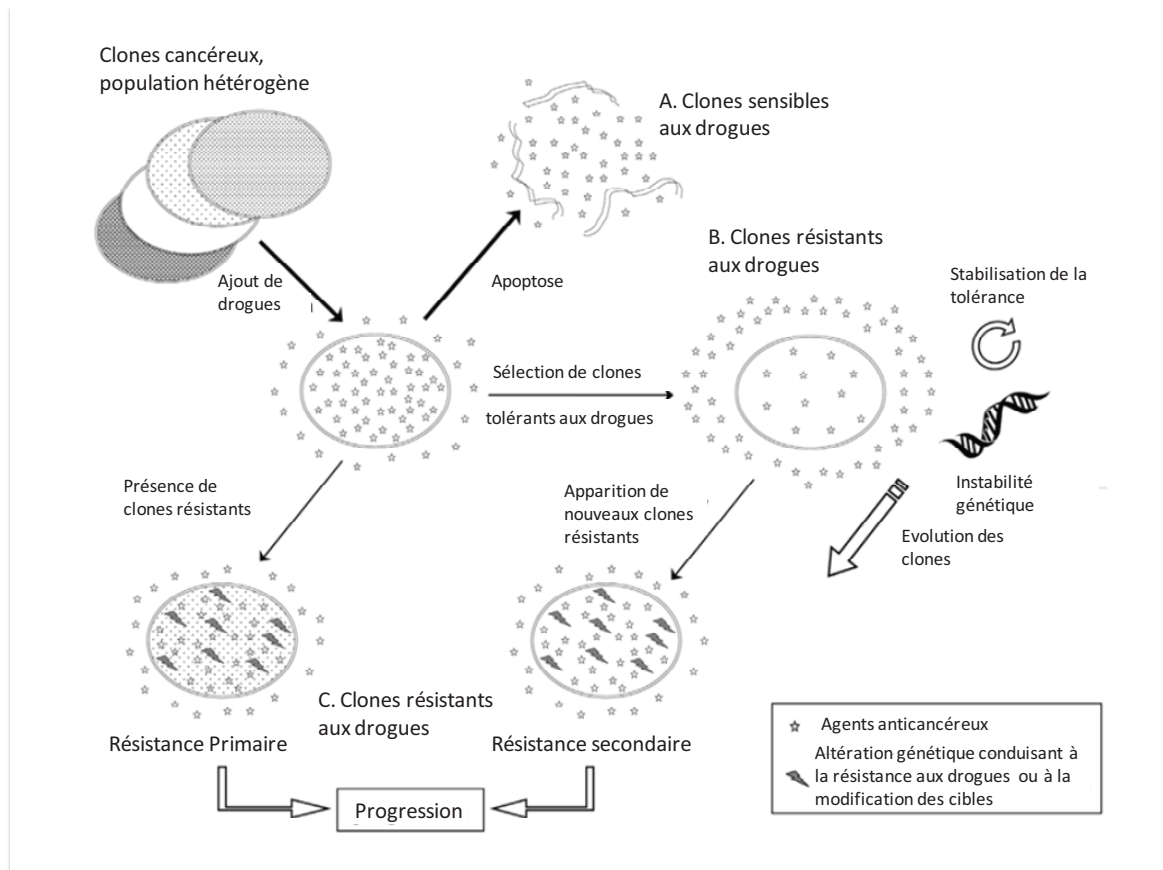


Figure 1 : Echappement à la chimiothérapie des cellules cancéreuses.

La résistance peut survenir de 2 façons : soit de manière innée ou résistance primaire, soit de manière acquise ou résistance secondaire.
 (Rochat, 2009).

Un point important à noter est la grande variabilité génétique des cellules cancéreuses (Bayani *et al.*, 2007; Bielas *et al.*, 2006 ; Gollin, 2004). Les modifications des cibles des agents anticancéreux ou l'apparition de nouveaux mécanismes peut donc se produire aisément.

Les différents mécanismes de résistance cellulaire peuvent être classés en 3 catégories.

3.2.1. Mécanisme dépendant de la cible

Le mécanisme de résistance développé par la cellule conduit à une diminution de l'affinité de la drogue pour sa cible, principalement du fait de mutations. La cible peut être affectée de 2 manières :

- par une modification : la cible ne sera alors plus ou mal reconnue par l'agent anticancéreux. L'efficacité du traitement va ainsi diminuer.

- par amplification : les doses d'agents anticancéreux administrées seront trop faibles pour inhiber totalement la cible. L'efficacité du traitement en sera diminuée. L'imatinib est un très bon exemple. Des mutations de sa cible, la protéine kinase Bcr-Abl, ont été détectées chez 50% des patients développant une résistance secondaire à l'imatinib (Al-Ali *et al.*, 2004 ; Lahaye *et al.*, 2005 ; Shah and Sawyers, 2003 ; Soverini *et al.*, 2006). Même si ce n'est pas le seul phénomène responsable d'une résistance à ce médicament, cela témoigne de la capacité des cellules cancéreuses à s'adapter aux traitements administrés.

Un exemple pourrait être celui du 5-fluoro-uracile. En effet, il a été démontré que les patients homozygotes pour un polymorphisme du promoteur de la thymidylate synthétase augmentant son expression, répondent moins favorablement aux traitements chimiothérapeutiques à base de 5-fluorouracile (Marsh and McLeod, 2001).

3.2.2. Modification de la disponibilité intra-tumorale du médicament

Dans ce cas, la concentration de la drogue anticancéreuse diminue dans les cellules ou dans la circulation plasmatique. Les doses sont alors trop faibles pour être efficaces et il y a donc apparition de résistance. Il existe 3 mécanismes pouvant fonctionner indépendamment ou en synergie (Figure 2).

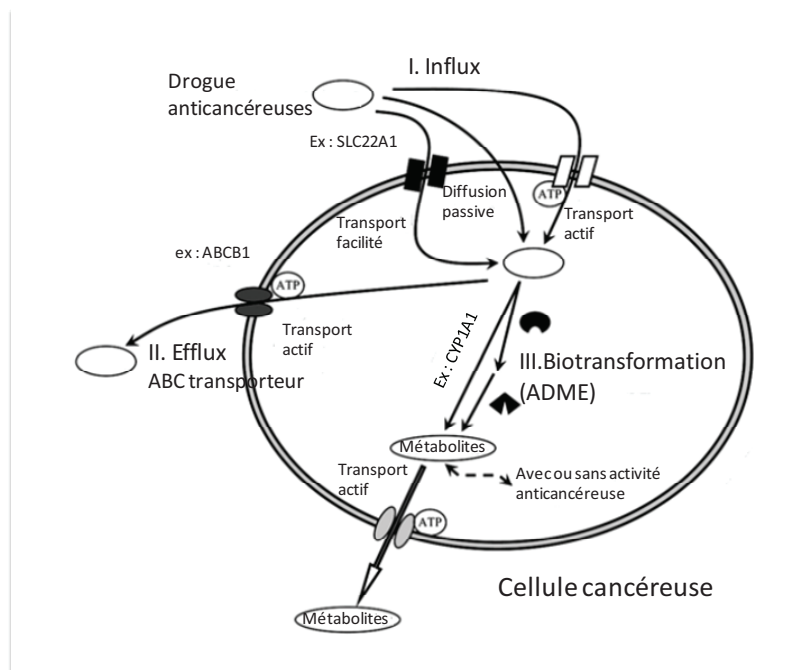


Figure 2 : Mécanismes de résistance intervenant sur la concentration intracellulaire de drogues.
La cellule cancéreuse peut diminuer la concentration intracellulaire de drogues en modulant son entrée (I. Influx), en favorisant sa sortie (II. Efflux) ou en augmentant sa métabolisation (III. Biotransformation).
Adapté de (Rochat, 2009).

3.2.2.1. *Au niveau de l'influx par diminution de l'entrée de la drogue*

Les protéines de la famille des SLC (« solute carrier ») sont principalement impliquées dans cet influx. Plusieurs études ont montré *in vitro* l'importance de ces protéines. Ainsi, le cisplatine, le carboplatine ou encore l'oxaliplatine pénètrent dans les cellules via le transporteur SLC31A (Holzer *et al.*, 2006). Des cellules transfectées exprimant SLC22A4 se révèlent 4 fois plus sensibles à la mitoxantrone et à la doxorubicine que les cellules contrôles (Okabe *et al.*, 2008). Enfin, certains auteurs ont montré qu'une lignée de cellules de leucémie est résistante au méthotrexate (jusqu'à 3500 fois) lorsque l'influx par SLC19A1 est réduit (Kaufman *et al.*, 2006).

L'influence de ces systèmes est difficile à interpréter *in vivo* mais plusieurs études se sont révélées très intéressantes, notamment en 2004. Il a été montré que le pronostic chez des patients ayant une faible expression de SLC22A1 était plus mauvais que chez les autres patients (Thomas *et al.*, 2004), ce qui est en accord avec le fait que ce transporteur facilite l'influx de l'imatinib dans les cellules (Lee *et al.*, 2004).

3.2.2.2. *Au niveau de l'efflux par augmentation de la sortie de la drogue*

Le système permettant l'efflux de drogues de la cellule cancéreuse est ATP dépendant et catalysé par les transporteurs ABC. Il existe au moins 12 transporteurs de cette famille impliqués dans la résistance des cellules aux drogues *in vitro*. Les 3 principaux, impliqués dans des résistances observées en clinique, sont ABCB1 (Juliano and Ling, 1976), ABCC1 (Cole *et al.*, 1992) et ABCG2 (Allikmets *et al.*, 1998 ; Doyle *et al.*, 1998 ; Miyake *et al.*, 1999).

La famille des transporteurs ABC est détaillée dans la suite du manuscrit.

3.2.2.3. *Par inactivation de la drogue*

La métabolisation d'une drogue est un processus retrouvé dans tous les tissus sains. Elle permet l'inactivation et l'élimination de cette drogue. Une augmentation de la métabolisation d'un agent anticancéreux peut entraîner son inefficacité. Différentes enzymes de métabolisation sont impliquées. On trouve notamment des isoformes du cytochrome P450, des UDP-glucuronosyl transférases ou des glutathion S-transférases ainsi que des alko-keto réductases, des carbonyl réductases, des aldéhyde déshydrogénases, ... (Rochat, 2009).

Plusieurs enzymes métaboliques sont surexprimées dans les cellules tumorales (Yu *et al.*, 2001).

3.2.2.3.1. Par Modification par le cytochrome P450

Une corrélation négative a été montrée, *in vitro*, entre l'activité du cytochrome P450 et la sensibilité des cellules à plus de 50 composés cytotoxiques (Yu *et al.*, 2001). Son implication en clinique dans la chimiorésistance a notamment été démontrée par l'étude menée en 2002 par Miyoshi et collaborateurs : l'expression du CYP3A4 était 4 fois plus faible chez les sujets répondant au traitement par le docetaxel (un substrat du CYP3A4) que les patients résistants (Miyoshi *et al.*, 2002).

3.2.2.3.2. Par modification par la glutathion S-transférase

Une étape clé de l'inactivation des drogues est la formation de conjugué entre le glutathion (GSH) et les drogues (Meijer *et al.*, 1992). Ainsi, les médicaments, notamment ceux contenant du platine (cisplatine, oxiplatine,...), se fixent de façon covalente au GSH entraînant leur reconnaissance et leur expulsion à l'extérieur de la cellule par des systèmes d'efflux du glutathion tel qu'ABCC1 (Ishikawa and Ali-Osman, 1993). Cette conjugaison est catalysée par la glutathion S-transférase. Un fort taux d'expression de cette enzyme est retrouvé dans des cellules résistantes aux sels de platine (Kelland, 1993).

3.2.2.3.3. Les TME : Tumor-Expressed Metabolizing Enzymes

Certaines enzymes métaboliques sont faiblement exprimées dans le foie mais sont fortement exprimées dans les cellules tumorales (Bieche *et al.*, 2007). L'expression de ces enzymes provient de l'induction de gènes ou de la variabilité génétique des cellules cancéreuses, et est indépendante du type de tumeur (Zhang *et al.*, 2006). Ces enzymes peuvent être surexprimées dans des tumeurs, augmentant ainsi la métabolisation des agents anticancéreux et donc parfois leur inactivation. Ces TME pourraient donc être une cible intéressante en vue de l'augmentation de l'efficacité des traitements anticancéreux. De plus, elles pourraient être utilisées pour l'activation de prodrogue, spécifiquement ou principalement dans les cellules cibles. Ceci permettrait de diminuer considérablement les effets indésirables des chimiothérapies.

Ces 3 systèmes sont étroitement liés. Leur expression est régulée par des récepteurs nucléaires similaires et certains inducteurs des enzymes de métabolisation diminuent l'activité d'influx des transporteurs (Cheng *et al.*, 2005). Enfin, les métabolites de certaines drogues

sont plus facilement expulsés par les transporteurs ABC (Jeong *et al.*, 2005) ; (Paul *et al.*, 1989). On peut notamment citer l'exemple du SN-38, métabolite actif de l'irinotécan, dont les groupes hydroxyles rajoutés par la métabolisation facilitent son transport par ABCG2 (Ishikawa *et al.*, 2005).

3.2.3. Mécanisme indépendant de la cible ou de la drogue

3.2.3.1. Modification génomique des cellules cancéreuses

Il existe 3 grandes catégories de gènes impliqués dans les pathologies cancéreuses : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN. Le matériel génétique des cellules cancéreuses étant très instable (Bayani *et al.*, 2007; Bielas *et al.*, 2006 ; Gollin, 2004), des mutations peuvent fréquemment intervenir (Fojo, 2007). Une mutation de ces gènes peut entraîner les mécanismes de résistance développés ci-dessous.

3.2.3.2. Réparation de l'ADN

Toute cellule, saine ou cancéreuse, possède des systèmes de réparation de l'ADN. Il existe 6 grandes voies de réparation de l'ADN dont la vitesse dépend de nombreux facteurs intrinsèques (type, âge, ...) ou extrinsèques (liés à son environnement). Lorsque la réparation n'est pas possible, la cellule entre en apoptose.

Les systèmes des cellules cancéreuses sont plus efficaces et plus rapides que ceux d'une cellule saine. Plusieurs d'entre eux sont impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. En effet, certains agents chimiothérapeutiques ciblant l'ADN, cette réparation élevée peut conduire à des phénomènes de résistance. Ainsi, l'importance de la réparation par excision de nucléotide (REN) a été mise en évidence dans la résistance au cisplatine (Chaney and Sancar, 1996). Deux facteurs de ce système de réparation sont particulièrement étudiés : l'ERCC1 (« excision repair cross-complementing 1 protein ») et le XPA (*xeroderma pigmentosum*). Il a ainsi été montré :

- une corrélation entre l'augmentation de l'expression de ERCC1 et la résistance au cisplatine (Youn *et al.*, 2004),
- une corrélation entre le taux élevé de ERCC1 et la résistance au traitement combiné de cisplatine et 5-FU chez des patients atteints de cancer du poumon « non à petites cellules », gastrique ou ovarien (Dabholkar *et al.*, 1994 ; Lord *et al.*, 2002 ; Metzger *et al.*, 1998),

- une surexpression de XPA dans les tumeurs résistantes au cisplatine (Dabholkar *et al.*, 1994).

Un 2^{ème} système de réparation est particulièrement impliqué dans la résistance aux traitements chimiothérapeutiques : le « mismatch repair » (MMR). De nombreuses études précliniques ont également montré son implication dans la résistance aux inhibiteurs de topoisomérase II (Drummond *et al.*, 1996 ; Fedier *et al.*, 2001).

3.2.3.3. Echappement à l'apoptose

Outre l'efficacité de leur système de réparation de l'ADN, les cellules cancéreuses peuvent résister aux traitements chimiothérapeutiques en échappant à l'apoptose induite par les traitements. L'inhibition de facteurs pro-apoptotiques ou l'activation de facteurs anti-apoptotiques sont le plus fréquemment responsables de cette résistance à l'apoptose. On trouve notamment :

- la protéine p53, régulateur important du cycle cellulaire qui est activé en réponse à des dommages de l'ADN. Elle permet l'entrée de la cellule en apoptose. Ce gène est muté dans près de 50% des cellules tumorales, conduisant à la diminution de son expression ou à la production d'une protéine non fonctionnelle (Levine, 1997). Les cellules cancéreuses concernées n'entrent alors pas en apoptose et résistent aux traitements chimiothérapeutiques.

- les protéines Bax, Bad, Bid, ..., pro-apoptotiques, induisant l'apoptose via le relarguage du cytochrome c par la mitochondrie (Hengartner, 2000). Ces protéines sont parfois sous-exprimées dans certaines tumeurs les rendant alors insensibles à la chimiothérapie (Makin and Dive, 2001).

- les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Nr13, ... inhibent l'insertion des protéines pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale nécessaire à la libération du cytochrome c ; retardant ainsi l'apoptose et induisant une résistance à la chimiothérapie (Youle and Strasser, 2008). La surexpression de Bcl-2 constitue un facteur de mauvais pronostic dans les cancers de la vessie, les lymphomes et les leucémies myéloïdes (Allouche *et al.*, 1997).

II. Les transporteurs ABC

Les transporteurs à ATP-Binding Cassette (ABC) constituent l'une des plus grandes familles de protéines, tant par leur nombre que par leur implication dans diverses maladies génétiques. En 2001, plus de 2000 protéines ou domaines ABC avaient été identifiés. Le nombre est proche de 6000 si l'on tient compte de leurs partenaires (Dassa and Bouige, 2001). Les transporteurs ABC sont étudiés depuis les années 1950 chez les bactéries. Il a maintenant été démontré qu'ils sont présents chez les 3 branches majeures du vivant : les archaebactéries, les procaryotes et les eucaryotes. Chez *Escherichia coli*, les transporteurs ABC représentent 5% du génome (Higgins, 1992).

Bien que certains membres de cette superfamille ne soient pas impliqués dans un phénomène de transport (Belfield *et al.*, 1995 ; Thiagalingam and Grossman, 1993), la grande majorité des protéines ABC ont pour fonction principale le transport unidirectionnel de substrats à travers les membranes biologiques (Saurin *et al.*, 1999).

Chez l'homme, cette famille de protéines est très étudiée du fait de son implication dans des maladies génétiques et dans les phénomènes de multi-résistance aux antibiotiques, antifongiques et anticancéreux.

1. Classification des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC possèdent des motifs communs (Walker A, Walker B et signature C), ainsi que des séquences homologues, suggérant une origine commune. Une première analyse phylogénétique de 250 transporteurs ABC a permis de séparer ces protéines en 2 classes majeures. A la différence d'autres familles de transporteurs, ils ne sont pas classés par rapport à leur origine eucaryotique ou procaryotique mais par rapport à leurs caractéristiques fonctionnelles d'import ou d'export. En effet, les eucaryotes ne possèdent que des systèmes d'export alors que les procaryotes possèdent à la fois des systèmes d'export et d'import (Saurin *et al.*, 1999). Cette séparation par fonction et non par origine suggère que les transporteurs ABC se sont probablement spécialisés très tôt, avant l'émergence des 3 ordres d'organismes vivants.

En 2001, Dassa et Bouige analysent les domaines nucléotidiques de 600 transporteurs ABC par alignements multiples couplés à une étude phylogénétique (Dassa and Bouige, 2001). Ils séparent alors les transporteurs ABC en 3 classes (Figure 3).

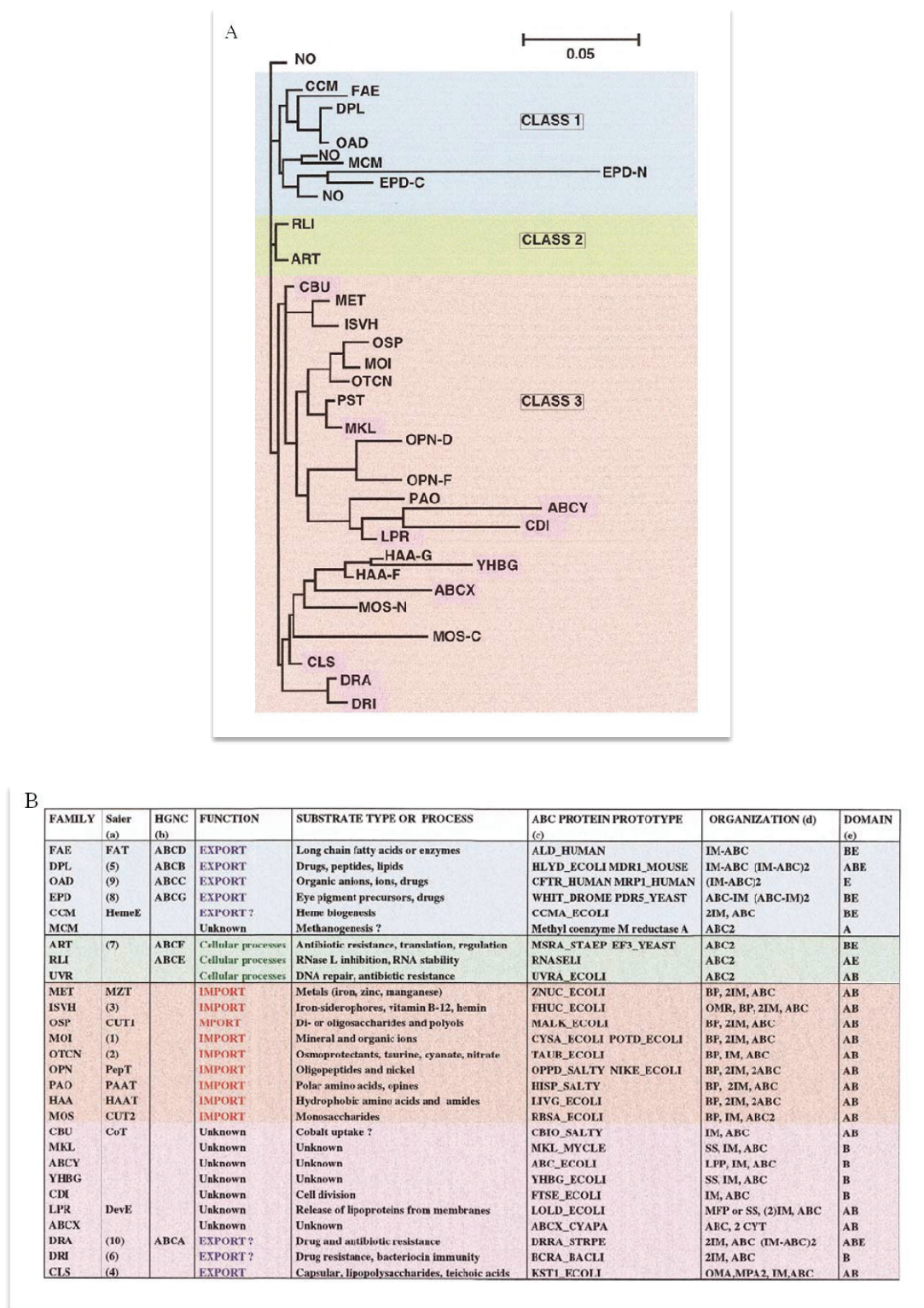


Figure 3 : Arbre phylogénétique des transporteurs ABC et protéines constituant les différentes classes.

Les différentes classes sont représentées par 3 couleurs : la classe 1 en bleu correspondant essentiellement aux exportateurs, la classe 2 en vert représentée par les ABC non impliqués dans un phénomène de transport et la classe 3 en rose correspondant aux importateurs.

Les abréviations retrouvées dans la figure A sont indiquées dans la figure B.

(Dassa and Bouige, 2001).

L'arbre phylogénétique établi par cette étude (Figure 3A), comprend 33 groupes correspondant à 29 familles de protéines qui sont listées dans la Figure 3B. La première classe, qui comprend la majorité des systèmes d'export connus, regroupe les protéines eucaryotes ainsi que des protéines procaryotes. Elles possèdent des domaines nucléotidiques liés aux domaines transmembranaires. La classe 2, qui contient tous les systèmes non impliqués dans un phénomène de transport, n'est constituée que des domaines nucléotidiques. Enfin la classe 3, qui correspond majoritairement aux systèmes d'import avec les BPD (« binding protein-dependent »), comprend des domaines nucléotidiques non liés covalamment aux domaines transmembranaires (Dassa and Bouige, 2001).

Il est intéressant de noter que la classe 3 contient 3 familles qui ne sont pas impliquées dans un processus d'import. Ainsi, malgré l'origine commune, les systèmes peuvent évoluer dans le temps : un importateur peut évoluer et devenir un exportateur.

2. Topologie générale des transporteurs ABC

Toutes les protéines appartenant à la famille des transporteurs ABC possèdent la même structure caractéristique, décrite par Schneider et Hunke, incluant un domaine transmembranaire (TMD) suivi ou précédé d'un domaine liant et hydrolysant l'ATP appelé « Nucleotide-Binding Domain » (NBD) (Schneider and Hunke, 1998). Cette structure est dupliquée dans les transporteurs entiers tels qu'ABCB1 (aussi appelé P-gp ou MDR1) (Figure 4A) tandis que les demi-transporteurs tels qu'ABCG2 (appelé aussi BCRP) (Figure 4B) possèdent 1 seul TMD et 1 seul NBD. ABCG2 a également la particularité d'avoir une structure inversée : le NBD est positionné du côté N-terminal, contrairement à ABCB1 ou ABCC1. Enfin, les transporteurs de la famille ABCC (hormis ABCC4, ABCC5, ABCC11 et ABCC12) possède du côté N-terminal un TMD supplémentaire (TMD0) (Figure 4C) qui n'est pas indispensable pour la fonction de transport (Bakos *et al.*, 2000).

Chaque transporteur ABC contient un nombre variable de glycosylations sur les boucles extracellulaires.

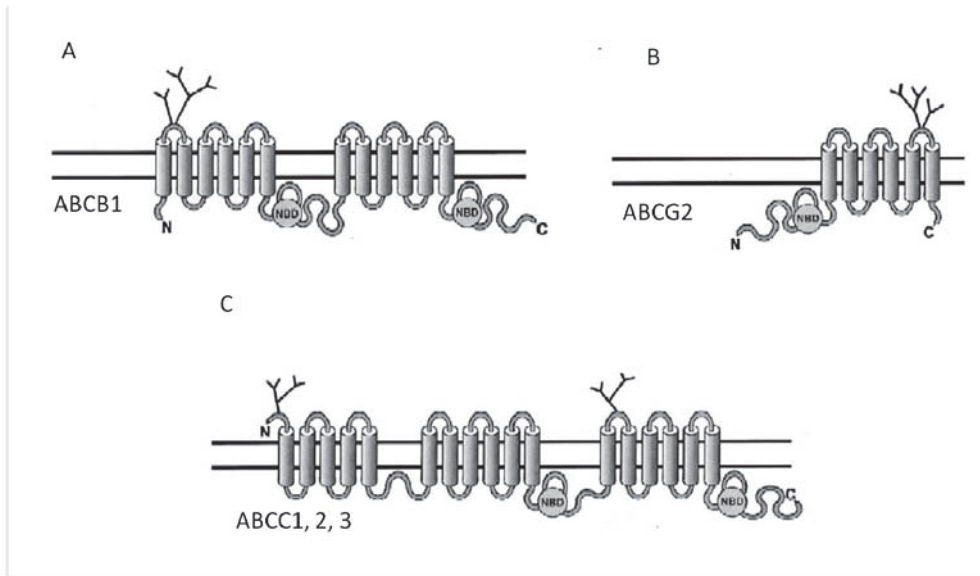


Figure 4: Topologie des transporteurs ABC.

- A : ABCB1 est un transporteur entier. Il possède 2 TMD et 2 NBD formé d'une seule chaîne polypeptidique.
 B : ABCG2 est un demi-transporteur. Formé d'1 NBD et d'1 TMD, il doit se dimériser pour être actif.
 C : ABCC1 est un transporteur entier. Il possède 3 TMD dont 1 TMD0 supplémentaire et 2 NBD.
 (Scotto, 2003).

La structure active correspond au minimum à celle du transporteur entier. De ce fait, les demi-transporteurs doivent être associés sous forme d'homo- ou hétéro-dimères pour être actifs (Higgins, 1992). Dans cette structure minimale, illustrée sur la Figure 5, les TMD forment un pore à travers la membrane plasmique permettant le transport de substrats. Les NBD permettent la liaison et l'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie nécessaire à la protéine pour réaliser le transport des solutés contre leur gradient de diffusion passive.

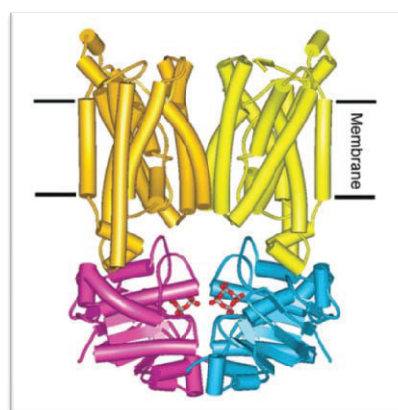


Figure 5: Représentation du transporteur BtuCD d'*E. coli* (code PDB 1L7V).

Les TMD sont représentés en orange et jaune, et les NBD en violet et bleu. Les TMD enchâssés dans une membrane forment un pore permettant le transport de substrat à travers celle-ci.
 (Locher *et al.*, 2002).

Classiquement, chez les eucaryotes les transporteurs ABC sont formés d'une seule chaîne polypeptidique tandis que chez les bactéries, les sous-unités sont codées séparément ; les

TMD et NBD s'associent alors pour constituer un transporteur complet (Higgins, 1992). Enfin, les systèmes d'import bactériens, aussi appelés « binding protein-dependent (BPD) », sont associés à une protéine extracellulaire qui recrute les substrats avant de les présenter aux transporteurs ABC (Quioco and Ledvina, 1996). Cette protéine, nommée SBP pour « Substrate Binding Protein », peut être fusionnée au TMD, liée à la membrane par un peptide transmembranaire ou par un lipide d'ancrage ou encore être libre dans le périplasme (van der Heide and Poolman, 2002).

2.1. Les domaines transmembranaires

Les domaines transmembranaires sont des domaines hydrophobes enchâssés dans une membrane biologique. Ils sont formés par des hélices alpha et permettent le passage de substrats contre un gradient de concentration, d'un compartiment à un autre. En règle générale, chaque TMD est formé de 6 passages transmembranaires, élevant à 12 le nombre d'hélices alpha d'un transporteur entier (Mourez, 2000). Cependant, ce nombre peut varier de 5 à 11 passages transmembranaires pour les différents TMD (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

A la différence des domaines nucléotidiques, la séquence primaire des domaines transmembranaires est peu conservée dans les espèces. Ceci s'explique par le fait, d'une part, que les TMD sont impliqués dans la reconnaissance de substrats très variés et, d'autre part, que c'est le caractère hydrophobe des résidus qui prédomine pour constituer ces domaines. En effet, il a été montré que des mutations dans les TMD de CFTR (Anderson *et al.*, 1991) ou ABCB1 (Taguchi *et al.*, 1997) affectent la reconnaissance des substrats par ces protéines. Cependant, la localisation précise des sites de fixation des substrats sur les TMD n'est pas connue. Enfin, il faut noter que les 2 TMD semblent participer de façon équivalente à la reconnaissance du substrat (Ewart *et al.*, 1994 ; Loo and Clarke, 1997).

2.2. Les «Nucleotide Binding Domain»

Pour être fonctionnel, un transporteur ABC doit contenir 2 domaines de liaison aux nucléotides (NBD). Contrairement aux TMD, ces domaines sont hydrophiles ; ils fixent et hydrolysent de l'ATP, étape indispensable dans le cycle de transport.

2.2.1. Données structurales

Depuis 1998, un grand nombre de NBD a été cristallisé, permettant de bien connaître leur organisation et leur fonctionnement. Le premier NBD cristallisé, à une résolution de 1,5 Å, a été celui de la protéine périplasmique de l'histidine perméase de *Salmonella typhimurium* aussi appelé HisP (Hung *et al.*, 1998). Actuellement, plus d'une dizaine de NBD de différentes espèces a été cristallisé, seul ou en présence de nucléotide. On trouve ainsi HisP de *S. typhimurium* (Hung *et al.*, 1998), MalK de *T. litoralis* (Diederichs *et al.*, 2000), MalK de *E. coli* (Chen *et al.*, 2003a), MJ1267 et MJ0796 de *M. jannaschii* (Karpowich *et al.*, 2001) ; (Yuan *et al.*, 2001) ; (Smith *et al.*, 2002), TAP1 de *H. sapiens* (Gaudet and Wiley, 2001), HlyB de *E. coli* (Schmitt *et al.*, 2003), GlcV de *S. solfataricus* (Verdon *et al.*, 2003), CysA de *A. acidocaldanus* (Scheffel *et al.*, 2005), NBD1 de ABCC7 de *mus musculus* (Lewis *et al.*, 2004) et NBD1 de ABCC1 de *H sapiens* (Ramaen *et al.*, 2006). Le NBD de ArsA de *E. coli*, protéine non ABC mais apparentée a également été cristallisé (Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000)

La première structure cristallisée d'un NBD a permis de mieux appréhender son organisation. Ainsi, Hung et collaborateurs décrivent le monomère NBD de HisP en forme de « L » (Figure 6A) : le 1^{er} bras est formé d'hélices α et de feuillets β ($\alpha 1$ et $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 4$ - $\beta 7$) correspondant à la poche de fixation à l'ATP avec notamment le Walker A et le Walker B. Le bras 2 est formé d'hélices α ($\alpha 3$ - $\alpha 9$) dans lesquelles se trouve la signature S. Enfin, 6 feuillets β ($\beta 3$, $\beta 8$ -12) séparant les 2 bras contiennent les boucles H et Q (Figure 6B) (Hung *et al.*, 1998).

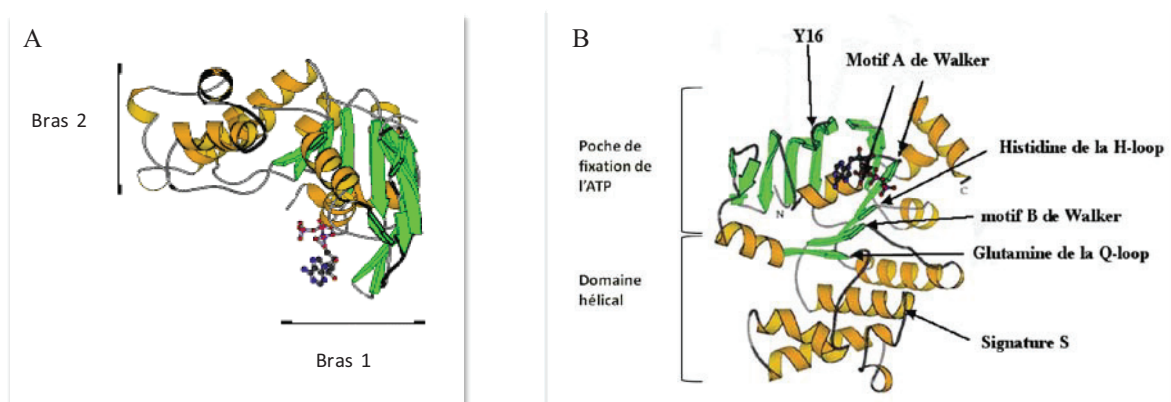


Figure 6 : Structure d'un NBD monomérique de l'histidine perméase périplasmique de *S. typhimurium*.

A : Structure du monomère montrant l'organisation du NBD en forme de « L » avec 2 bras.

B : Cette structure présente la poche de fixation de l'ATP formé par des feuillets β , ici représentés en vert ainsi que le domaine hélical (en jaune-orange). Les motifs conservés des NBD sont indiqués par les flèches noires.

Adapté de (Hung *et al.*, 1998).

D'après les différentes structures des NBD obtenues par cristallisation, 3 conformations de dimères de NBD au sein du transporteur entier sont possibles : dos à dos (Figure 7A), tête-tête (Figure 7B) ou tête-bêche (Figure 7C) (Kerr, 2002).

Dans la conformation dos à dos, représentée par la structure de HisP, les 2 NBD n'interagissent que par le bras 1 des NBD et donc par la boucle P (portant le Walker A) ; la signature S se trouve à l'extérieur et n'interagirait pas avec l'ATP (Hung *et al.*, 1998).

La conformation tête-tête (Figure 7B), représentée par la structure de MalK, ferait interagir les 2 boucles P et les 2 signatures S des 2 monomères ensemble (Diederichs *et al.*, 2000).

Enfin, la dernière conformation proposée, la tête-bêche (Figure 7C), a été définie par la structure de Rad50 où la boucle P d'un monomère interagit avec la signature S du 2^{ème} monomère (Hopfner *et al.*, 2000).

D'après les structures des NBD d'autres transporteurs ABC résolues ultérieurement par cristallisation puis par des études biochimiques, il a été prouvé que cette dernière conformation, tête-bêche, était la conformation physiologique de la plupart des transporteurs ABC. (Davidson and Chen, 2004; Kerr, 2002).

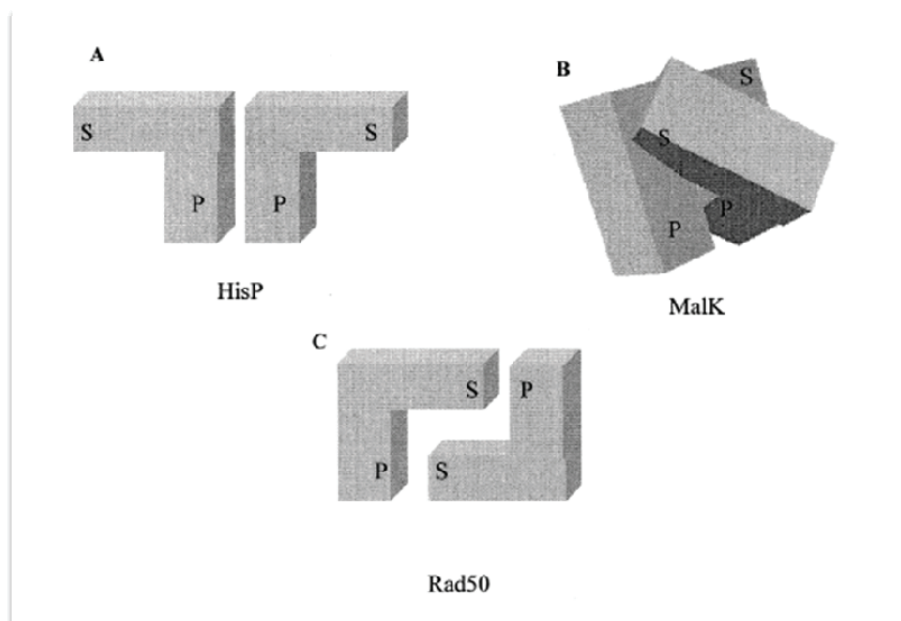


Figure 7 : Structures quaternaires proposées pour les NBD.

D'après les données structurales de divers NBD de transporteurs ABC, 3 conformations sont possibles : dos à dos retrouvée pour HisP (A), tête-tête retrouvée chez MalK (B) ou tête-bêche retrouvée chez Rad50 (C).

Le symbole P correspond à la boucle P portant le Walker A ; le symbole S représente la signature S.

Adaptée de (Kerr, 2002).

2.2.2. Les motifs conservés

Les NDB sont conservés chez les transporteurs ABC avec un pourcentage d'identité de l'ordre de 25% (Kerr, 2002). Cinq motifs caractéristiques sont particulièrement conservés : les Walker A et B, commun à beaucoup de protéines liant l'ATP (Walker *et al.*, 1982), la signature LSGGQ définissant un transporteur ABC, la région centre incluant la boucle Q et la région Switch incluant la boucle H. Les séquences de ces 2 derniers motifs sont moins conservées mais on retrouve des acides aminés fonctionnellement proches (Figure 8 et Tableau 2).

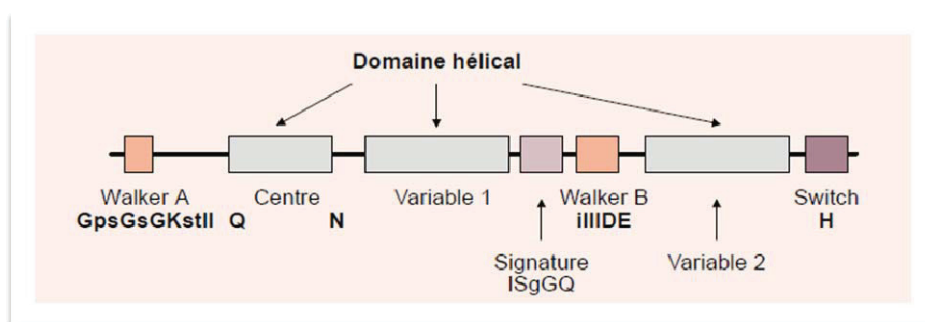


Figure 8 : Représentation schématique des NBD et des différents motifs conservés.
(Mourez , 2000).

Le Tableau 2 présente les différents motifs conservés dans le NBD d'un transporteur ABC avec leur séquence et leur rôle fonctionnel.

Motifs	Séquence consensus	Fonctions
Walker A ou boucle P	GxxxxGxGKST	Fixation de l'ATP
Boucle Q	Q	Liaison NBD-TMD
Signature S	LSGGQxQR	Fixation de l'ATP
Walker B	hhhD	Liaison du Mg ²⁺ accompagnant l'ATP
Résidu catalytique	E	Liaison de l'H ₂ O attaquant le P γ de l'ATP
Switch région	H	Liaison du P γ de l'ATP

Tableau 2 : Motifs conservés avec leur séquence et leur fonction.

2.2.2.1. Le Walker A, ou boucle P

Walker et collaborateurs ont montré en 1982 qu'une séquence nommée Walker A est conservée chez de très nombreuses protéines liant l'ATP. Ce motif est situé sur le feuillet $\beta 3$ du NBD. Diverses études ont montré que le résidu le plus important était la lysine (Abrahams *et al.*, 1994; Fry *et al.*, 1986 ; Pai *et al.*, 1989 ; Story and Steitz, 1992). Elle permet la fixation de l'ATP au NBD par la liaison des phosphates β et γ de l'ATP. Des études de mutagenèse

dirigée montrent que lorsque cette lysine est mutée en arginine, la fixation de l'ATP reste possible (Azzaria *et al.*, 1989; Delepelaire, 1994 ; Schneider *et al.*, 1994) mais son hydrolyse est impossible (Delepelaire, 1994; Schneider *et al.*, 1994). Une étude de Byeon et collaborateurs en 1995 suggère que cette lysine est impliquée dans le bon positionnement de la chaîne triphosphate de l'ATP indispensable à son hydrolyse (Byeon *et al.*, 1995).

2.2.2.2. *Le motif Walker B*

De la même façon que pour le Walker A, Walker et collaborateurs ont montré en 1982 que ce motif est conservé sur le feuillet $\beta 9$ dans le NDB des protéines liant l'ATP. L'acide aminé principal de ce motif est un aspartate conservé qui lierait le Mg^{2+} associé à l'ATP (Abrahams *et al.*, 1994; Fry *et al.*, 1986 ; Pai *et al.*, 1989 ; Story and Steitz, 1992). Cet aspartate est indispensable à la fixation et à l'hydrolyse de l'ATP (Koronakis *et al.*, 1995 ; Panagiotidis *et al.*, 1993 ; Shyamala *et al.*, 1991).

2.2.2.3. *La signature S*

La signature S, qui est spécifique des transporteurs ABC, permet de classer ou non une protéine dans la famille des ABC. Sa séquence est LSGGQ et contrairement aux 2 motifs de Walker, elle se trouve sur une hélice alpha. Dans un monomère d'ABC, cette séquence n'interagit pas avec le nucléotide mais une mutation de la signature empêche l'activité d'hydrolyse de l'ATP du transporteur ABC (Davidson, 2002; Koronakis *et al.*, 1995 ; Schmees *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle du dimère de Rad50 a permis d'établir que la signature S d'un NBD complète le site de liaison de l'ATP du NBD adjacent (Hopfner *et al.*, 2000) (Figure 9 et Figure 10). Ceci explique pourquoi cette interaction n'a pas pu être mise en évidence sur un monomère d'ABC. Ce rôle fonctionnel a été confirmé par l'obtention des structures cristallographiques dimériques de MJ0796 (Smith *et al.*, 2002) et de MalK (Chen *et al.*, 2003a).

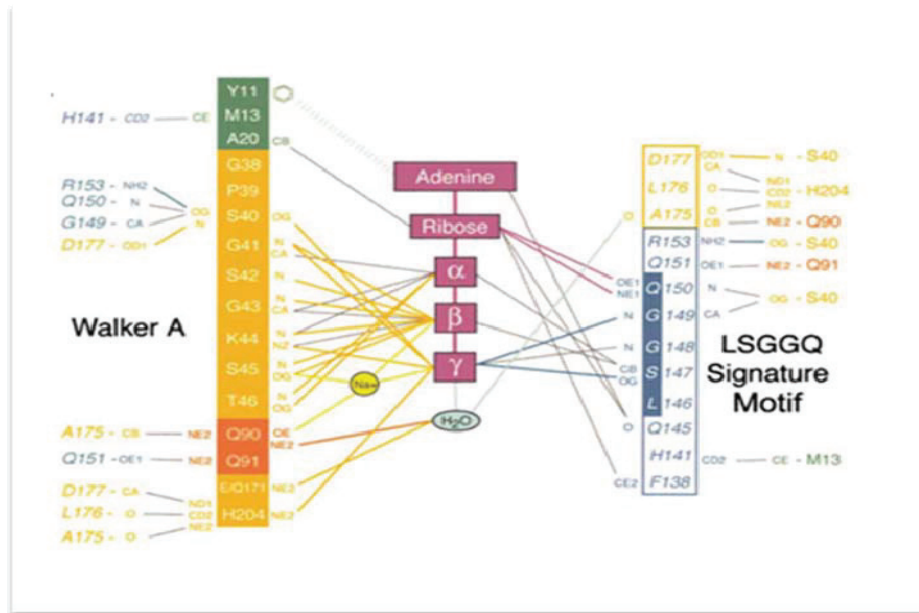


Figure 9: Interaction de l'ATP avec le Walker A et la signature S de 2 NBD adjacents de MJ0796.
 Les liaisons de Van der Waals sont représentées par des lignes noires tandis que les liaisons hydrogènes sont représentées par des lignes colorées avec la couleur des domaines correspondants. Les ponts salins sont représentés par des lignes jaunes tandis que les interactions des cycles aromatiques entre la Tyr11 et l'adénine sont représentées par une ligne grisée.
 (Smith *et al.*, 2002).

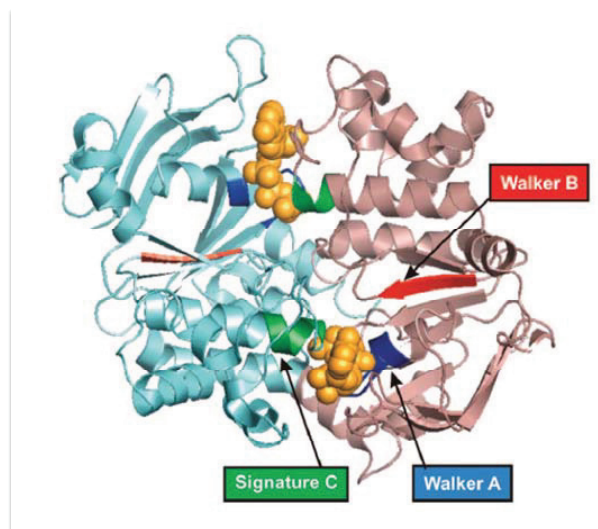


Figure 10 : Structure de l'homodimère des NBD H662A inactivés de HlyB de *E. coli* (pdb 1XEF) avec 2 molécules d'ATP liées (en orange).

Cette structure nous permet de visualiser la position de l'ATP entre les motifs Walker A et la signature S.
 (Eckford and Sharom, 2009).

2.2.2.4. *La région Centre ou boucle Q*

Entre le Walker A et le Walker B se trouve une région appelée Centre ou boucle Q. C'est la région la plus mobile du NBD. Elle permet la liaison entre le NBD et le TMD (Davidson and Chen, 2004).

2.2.2.5. *La région Switch ou boucle H*

Cette région Switch est située à l'extrémité C terminal des NDB. Son rôle n'est pas clairement défini mais elle semble participer activement aux changements de conformations induits par l'hydrolyse de l'ATP (Yoshida and Amano, 1995). Cette région possède également une histidine conservée dans 90% des NDB (Diederichs *et al.*, 2000). Son rôle est peu connu mais elle semble engagée dans un pont hydrogène avec le phosphate γ de l'ATP lui permettant ainsi de récupérer l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (Chen *et al.*, 2003a; Smith *et al.*, 2002). La boucle H transmet ensuite cette énergie aux TMD qui peuvent alors changer de conformation.

2.2.2.6. *Le résidu catalytique*

Le résidu considéré comme résidu catalytique d'un NBD est un glutamate situé juste après le Walker B. Il lie la molécule d'eau permettant l'hydrolyse de la liaison γ de l'ATP (Moody *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002 ; Orelle *et al.*, 2003).

2.2.3. Le fonctionnement d'un NBD

Les NBD ont un rôle essentiel dans le fonctionnement d'un transporteur ABC. Ils hydrolysent l'ATP, fournissant ainsi l'énergie essentielle à la protéine pour le transport des substrats. Ames et collaborateurs ainsi que Dean et collaborateurs ont démontré pour la première fois en 1989, dans des systèmes bactériens d'import du maltose et de l'histidine, que cette hydrolyse était nécessaire et suffisante au transport (Ames *et al.*, 1989 ; Dean *et al.*, 1989). Cette découverte a été par la suite confirmée par 2 équipes en 1989 et 1991 (Bishop *et al.*, 1989 ; Davidson and Nikaido, 1991).

Il est important de noter que la fixation du substrat et l'hydrolyse de l'ATP sont étroitement liées : la fixation du substrat stimule l'hydrolyse de l'ATP (Senior and Bhagat, 1998). Cette même équipe a également montré que 2 molécules d'ATP se fixent sur le transporteur et que les 2 NBD hydrolysent successivement l'ATP. La cristallisation de Rad50

a mis en évidence la coopération des 2 NBD : la poche de l'ATP est formée par le Walker A d'un monomère et est fermée par la signature S du 2^{ème} monomère (Hopfner *et al.*, 2000). En concordance avec cette étude, l'inactivation d'un NBD conduit à l'inactivation de l'activité ATPasique du 2^{ème} monomère (Azzaria *et al.*, 1989).

La caractérisation du site de fixation de l'ATP sur le NBD a été réalisée grâce à la résolution de la structure de la protéine MJ0796 (Smith *et al.*, 2002). Ainsi, il est apparu que cette poche est modérément acide avant la fixation de l'ATP et devient très acide après la liaison du nucléotide. Lors de la dimérisation, la signature S du monomère opposé électrostatiquement neutre, ferme cette poche. De ce fait, après dimérisation, les poches de fixation d'ATP sur les 2 monomères sont fortement chargées négativement (Smith *et al.*, 2002). Différentes études suggèrent que ces charges sont finement régulées (par la présence ou non d'un cation monovalent dans le site actif) et qu'elles ont un rôle crucial dans le fonctionnement du transporteur (Hung *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002).

3. Structure des exportateurs ABC

Plusieurs modèles d'exportateurs ont été obtenus par homologie, ou expérimentalement par microscopie électronique mais avec une résolution insuffisante pour établir de façon certaine l'arrangement des domaines. La cristallisation d'un transporteur ABC est difficile à obtenir car il reste dynamique en solution en présence de détergent, ce qui inhibe la formation d'un cristal parfaitement ordonné. Actuellement, 3 exportateurs ABC ont été cristallisés : Sav1688 de *S. aureus* (Dawson and Locher, 2006), MsbA de *E. coli*, *V. cholerae* et *S. typhimurium* en 2007 (Ward *et al.*, 2007), et ABCB1 de souris (Aller *et al.*, 2009).

Il a été montré que Sav1866 possède une similarité de séquence avec la classe B (soit ABCB1) des transporteurs ABC humains (31% d'identité avec ABCB1). La structure a été établie avec une résolution de 3,0 Å sous sa forme liée à l'ATP. C'est un dimère possédant 2×6 passages transmembranaires (2 TMD contenant chacun 6 hélices transmembranaires) et 2 NBD. Comme le montre la Figure 11C, les NBD sont liés à l'ATP et la partie extracellulaire est ouverte. Cette structure montre un twist des NBD et des TMD qui sont alors étroitement liés (les TMD positionnés à l'arrière de la protéine passent au devant et un NBD passe à l'arrière de la protéine tandis que le 2^{ème} passe au devant de l'autre). Ce mouvement pourrait intervenir dans le transport et plus précisément dans l'étape d'efflux du substrat.

ABCB1 de *mus musculus* a été cristallisée en absence de nucléotides en 2009 par Chang et collaborateurs (Aller *et al.*, 2009) (Figure 11A et B). Les dimensions de cette protéine cristallisée sont de 136 Å du cytosol au milieu extracellulaire, pour 70 Å de large dans la membrane lipidique. Il est composé de 2 TMD contenant chacun 6 hélices α transmembranaires numérotées de TM1 à TM12, et de 2 NBD. Cette cristallisation a permis de visualiser la forme ouverte d'un transporteur avec les TMD formant une cavité ouverte sur le cytoplasme et la membrane interne. Cette cavité, de part sa taille et sa composition (acides aminés aromatiques et hydrophobes), permet la fixation de molécules hydrophiles ou de phospholipides. Avec un volume de 6000 Å³, elle peut lier au moins 2 substrats simultanément.

ABCB1 a, également été co-cristallisée avec 2 inhibiteurs peptidiques : QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS). La fixation de ces 2 stéréoisomères se fait sur des sites différents. Ces co-cristaux indiquent que la forme ouverte est compatible avec la fixation de drogue sur les domaines transmembranaires.

La comparaison des structures ouverte d'ABCB1 et fermée de Sav1866 (Figure 11) donne un aperçu du changement de conformation qui peut intervenir dans le transport des substrats. En passant de la forme ouverte sans ligand à la forme fermée liée aux nucléotides, la protéine subirait un « twist » de 90°.

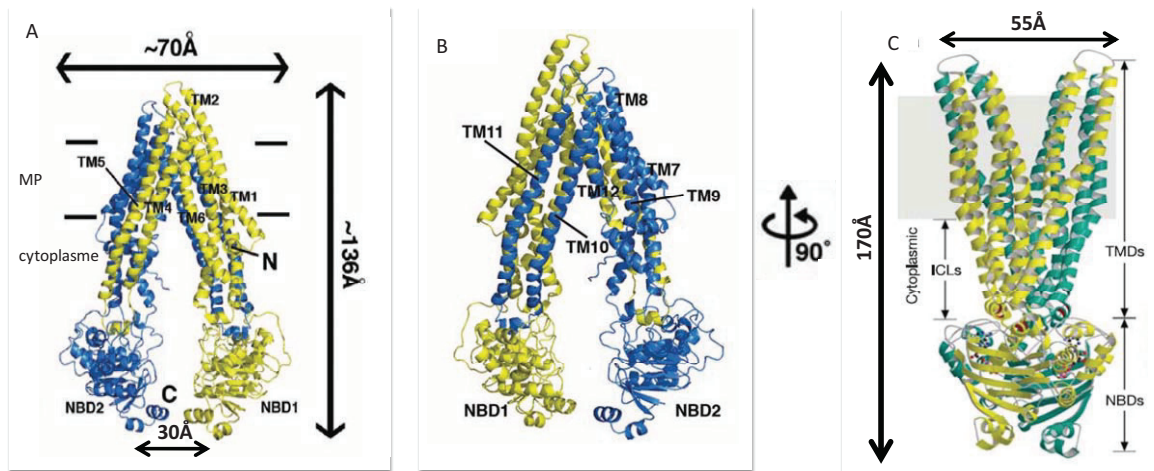


Figure 11 : Structure de 2 exportateurs ABC cristallisés.

A et B: ABCB1 de *mus musculus* cristallisée. Elle est formée de 2×6 passages transmembranaires (numéroté de TM1 à TM6 sur A et de TM7 à TM12 sur B) et de 2×1 NBD. Sa taille est de 136 Å de long et 70 Å de large.

Les 2 NBD sont distants de 30 Å (Aller *et al.*, 2009).

C : Sav1866 cristallisée chez *S. aureus* sous sa forme fonctionnelle, un dimère. Chaque monomère est constitué de 6 passages transmembranaires et de 1 NBD (un monomère en jaune et le 2^{ème} représenté en vert). Sav1866 mesure 170 Å de long et 55 Å de large. Adapté de (Dawson and Locher, 2006).

Le passage des formes ouverte à fermée se visualise également par l'étude de Chang et collaborateurs menée en 2007. Ils ont obtenu la structure cristalline de MsbA (un transporteur bactérien de lipide A possédant une similarité de séquence avec les ABCB) de 3 espèces différentes (*V. cholerae*, *E. coli* et *S. typhimurium*). Les 3 structures correspondent à 3 conformations différentes de MsbA : ouverte (Figure 12A), fermée (Figure 12B) et liée au nucléotide (Figure 12C) (Ward *et al.*, 2007). MsbA est un homodimère présentant la même topologie que Sav1866. De la même façon qu'elle l'avait montré pour la 1^{ère} fois en 2001 avant de retirer son modèle, l'équipe de Chang montre ici le lien entre les hélices cytoplasmique des TMD et les boucles P et A des NBD. Si ces 3 modèles s'avéraient bien être des conformations du même transporteur, et non des formes différentes de la protéine selon les espèces, cela illustrerait bien la grande flexibilité du transporteur lors du cycle d'efflux d'un substrat.

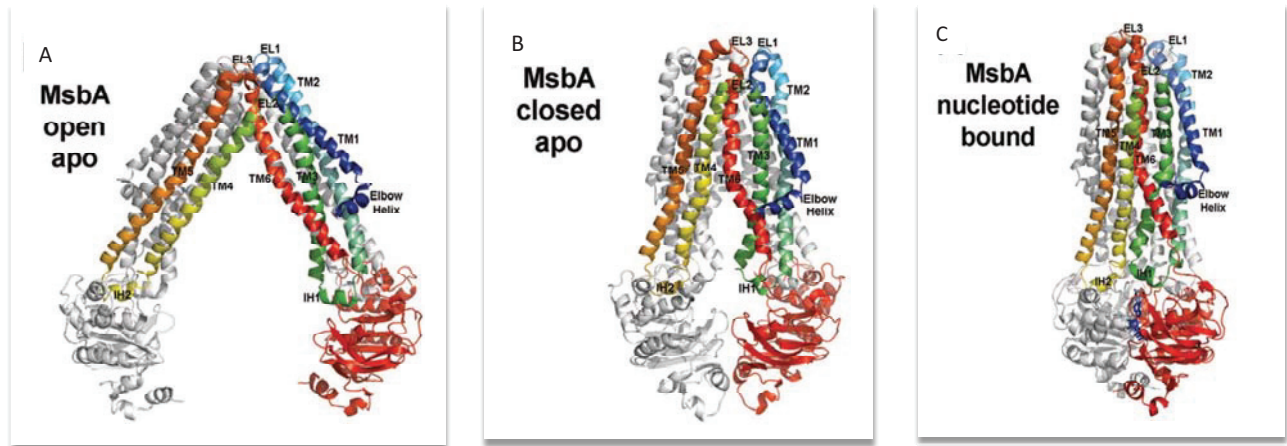


Figure 12 Structure de MsbA obtenue par cristallisation sous 3 conformations différentes.

A : MsbA de *E. coli* dans sa forme ouverte.

B : MsbA de *V. cholerae* dans sa forme fermée.

C : MsbA de *S. typhimurium* fermée avec un nucléotide lié.

Sur les 3 figures, un monomère est coloré par un gradient en arc-en-ciel (N-terminal en bleu et C-terminal en rouge) tandis que le 2^{ème} monomère est en gris.

(Ward *et al.*, 2007).

Chang et collaborateurs proposent que la forme ouverte soit celle sur laquelle se lie le substrat. La forme fermée correspond à la fixation du substrat sur les TMD. La Figure 12C représente la forme de la protéine après liaison du nucléotide sur les NBD.

4. Mécanisme des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC ne fixent pas et n'hydrolysent pas l'ATP de manière équivalente sur leur 2 NBD. De plus, le fait que les 2 poches de liaison d'ATP soient à l'interface du dimère suggère que les 2 NBD fonctionnent ensemble et non pas au cours d'étapes différentes du transport. Jusqu'en 2001, l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP était associée à l'expulsion du substrat mais des données plus récentes remettent en cause cette hypothèse. En effet, il a été montré que la fixation de l'ATP, et non pas son hydrolyse fournit l'énergie permettant l'expulsion du substrat (Higgins and Linton, 2004).

Le modèle proposé (Figure 13) nécessite 7 étapes successives pour permettre le passage du transporteur de la forme « ouverte » à la forme « fermée ». Ce modèle correspond à « l'ATP switch model ».

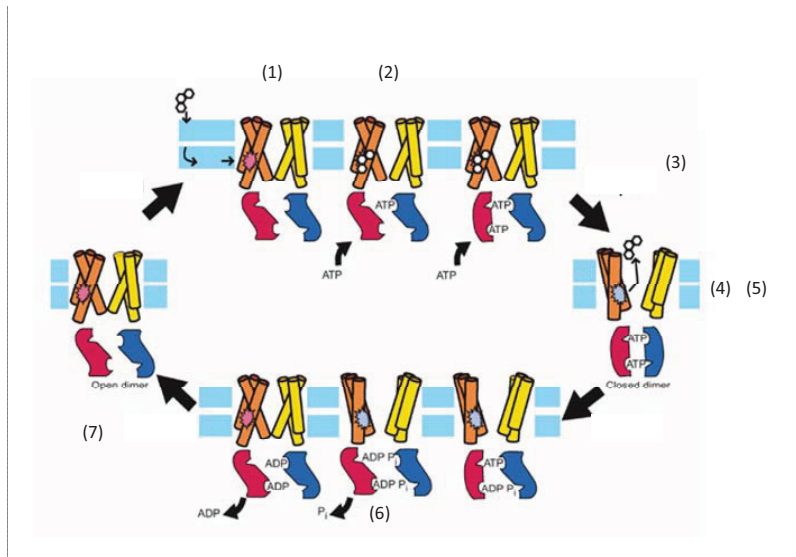


Figure 13 : Cycle de transport par un transporteur ABC.

Les TMD sont représentés par des cylindres orange et jaune, les NBD en rouge et bleu, le substrat par des billes blanches. Le cycle de transport se décompose en 7 étapes successives : (1) Fixation du substrat sur les TMD du transporteur « ouvert ». (2) Rapprochement des NBD et fixation des 2 molécules d'ATP. (3) Passage du transporteur sous sa forme fermée. (4) Ouverture du transporteur du côté extracellulaire. (5) Expulsion du substrat. (6) Hydrolyse des 2 molécules d'ATP. (7) Passage du transporteur sous sa forme ouverte.

Adapté de (Higgins and Linton, 2004).

(1) Au commencement du cycle, le transporteur est dans sa forme « ouverte » et le substrat se fixe sur les TMD. Différentes études sur les transporteurs bactériens de maltose et d'histidine sont en accord avec l'initiation du cycle de transport par la fixation du substrat sur les TMD (Davidson *et al.*, 1992; Petronilli and Ames, 1991).

(2) La fixation du substrat induit un changement de conformation qui rapproche les 2 NBD, permettant ainsi la fixation de 2 molécules d'ATP. Les changements de conformation des NBD après fixation du substrat sur les TMD a été clairement mis en évidence pour plusieurs transporteurs : ABCB1 (Liu and Sharom, 1996 ; Sonveaux *et al.*, 1999), TAP (Neumann *et al.*, 2002), MRP1 (Manciu *et al.*, 2003) et les transporteurs bactériens d'histidine (Kreimer *et al.*, 2000) et de maltose (Mannering *et al.*, 2001).

(3) Le transporteur passe alors sous sa forme « fermée » lorsque 2 molécules d'ATP sont fixées sur les NBD (Chen *et al.*, 2003a). Ce changement de conformation est illustré par la Figure 14. MalK de *E. coli* a été cristallisé dans 3 conformations : ouverte, semi-ouverte et fermée. En superposant les domaines régulateurs on voit très clairement le mouvement des NBD. La distance entre les résidus histidines 89 des 2 NBD passe de 52,5 Å pour la conformation ouverte à 36,2 Å (Figure 14A) pour la semi-ouverte et finalement 27,2 Å pour la conformation fermée (Figure 14B) dans laquelle on retrouve 2 molécules d'ATP fixées. Ce

changement de conformation est également illustré sur la Figure 14C. En superposant les passages membranaires TM 1, 2, 3 et 6, on visualise le mouvement des autres hélices des domaines transmembranaires qui se rapprochent jusqu'à être quasiment accolées (Ward *et al.*, 2007).

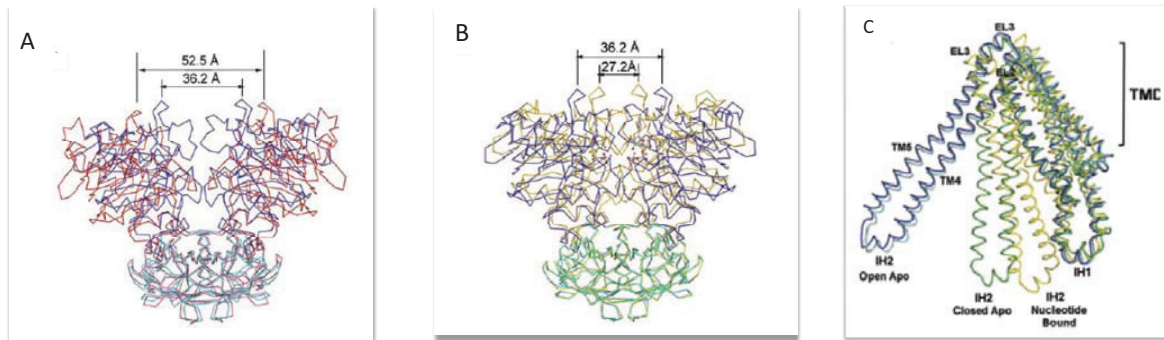


Figure 14 : Changement de conformation des NBD de MalK lors du cycle de transport et des TMD de MsbA.

A et B : Superposition de la conformation semi-ouverte des NBD de MalK (en bleue) et de la conformation ouverte (en rouge) (A) ; ou de la conformation fermée (en jaune) qui lie 2 molécules d'ATP et de la structure semi-ouverte sans ATP (B). La distance indiquée en Å correspond à celle séparant les 2 résidus H89 des 2 NBD (Chen *et al.*, 2003a).

C : Superposition de la structure des TMD de MsbA dans leur forme ouverte (en bleu), fermée (en vert) et avec un nucléotide fixé(en jaune). (Ward *et al.*, 2007).

(4) La liaison de l'ATP sur les NBD provoque un nouveau changement de conformation du transporteur. Le site de fixation du substrat est alors orienté du côté extracellulaire et son affinité est diminuée. (5) Le substrat est alors libéré dans le compartiment opposé (Higgins and Linton, 2004).

(6) Les 2 molécules d'ATP sont hydrolysées successivement. Cette étape est peu connue. Il semblerait que la libération du substrat provoque un changement de conformation des NBD qui sont alors capables d'hydrolyser l'ATP (Higgins and Linton, 2004). Une 2^{ème} hypothèse serait que cette hydrolyse soit spontanée. Ceci serait en concordance avec la difficulté d'obtenir un cristal NBD + ATP (Nikaido *et al.*, 1997; Verdon *et al.*, 2003).

(7) L'hydrolyse de l'ATP déstabilise le dimère des NBD du fait d'une répulsion électrostatique entre l'ADP et le Walker A, d'une part, et du Pi et de la signature S, d'autre part (Smith *et al.*, 2002). L'ADP et le Pi sont alors relargués et le transporteur retrouve sa conformation « ouverte ».

Un nouveau cycle peut alors commencer.

5. Les transporteurs ABC humains

Chez l'homme, 49 gènes codent pour des protéines de la famille des transporteurs ABC. Le Tableau 3 décrit les localisations chromosomiques, cellulaires ou tissulaires ainsi que la fonction principale des différents gènes. Comme on peut le remarquer, les gènes sont très dispersés dans le génome humain et leur localisation est relativement ubiquitaire dans l'organisme.

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.

Tableau 3 : Liste des gènes des transporteurs ABC humains avec leurs localisations chromosomiques, cellulaires ou tissulaires, ainsi que leur fonction principale.

(Dean *et al.*, 2001a).

La classification, que l'on nomme HUGO (« HUMAN Genome Organisation »), est basée sur la similarité structurale des protéines codées par les gènes (demi-transporteur ou transporteur entier), sur l'ordre des domaines (du côté N- ou C-terminal) et sur les homologies de séquence des domaines de liaison aux nucléotides ou les domaines transmembranaires. Elle

permet de classer les transporteurs ABC humains en 7 sous familles allant de ABCA à ABCG (Dean *et al.*, 2001a).

5.1. Les différentes classes

5.1.1. ABCA

Cette famille est composée de 12 transporteurs entiers classés en 2 groupes selon leur positionnement chromosomique. Le 1^{er} groupe est formé de 7 protéines codées par 7 gènes dispersés sur 6 chromosomes : ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA7, ABCA12, ABCA13. Le 2^{ème} groupe contient les protéines codées par 5 gènes localisés dans le locus 17q24 (ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9 et ABCA10) (Dean *et al.*, 2001a). Deux protéines de cette famille sont particulièrement étudiées du fait de leur implication dans des maladies génétiques : ABCA1 et ABCA4.

5.1.2. ABCB

La famille ABCB est composée de transporteurs entiers et de demi-transporteurs. C'est la seule famille où l'on retrouve les 2 types de transporteurs. Elle contient 4 transporteurs entiers [ABCB1 (P-gp), ABCB4 (MDR3), ABCB5 et ABCB11] et 7 demi-transporteurs (ABCB2, ABCB3, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9 et ABCB10). Les gènes de ces transporteurs sont dispersés dans le génome (chromosome 1, 2, 6, 7 et 12). Les transporteurs entiers sont localisés dans la membrane plasmique alors que les demi-transporteurs sont adressés à des organelles : la mitochondrie pour ABCB6, ABCB7, ABCB8 et ABCB10, les lysosomes pour ABCB9 et le réticulum endoplasmique pour ABCB2 et ABCB3 (TAP1 et TAP2). Ces dernières s'associent en hétérodimère et sont impliquées dans la réponse immunitaire. Les cellules et protéines exogènes digérées en peptides sont transportées dans le réticulum endoplasmique par ce complexe ABCB2–ABCB3 : les peptides peuvent alors être présentés à la surface cellulaire sous forme de complexe avec les protéines de classe I du complexe d'histocompatibilité.

5.1.3. ABCC

Cette famille contient 12 transporteurs entiers principalement impliqués dans le transport d'ions, de toxines ou dans la transduction du signal. Les gènes codant pour ces transporteurs sont dispersés dans le génome (chromosome 3, 7, 10, 11, 12, 16 et 17). La famille ABCC

contient plusieurs protéines responsables de maladies génétiques. On trouve notamment ABCC7 ou CFTR, dont la délétion de la phénylalanine en position 508 induit la mucoviscidose (Riordan *et al.*, 1985). ABCC8 (SUR1) et ABCC9 (SUR2) codent un récepteur aux sulfonylurées (SUR) qui constitue une sous-unité d'un canal K^+ /ATP.

La famille ABCC est également composée de 9 gènes codant pour les protéines de la sous famille des MRP (« Multidrug Resistance proteins »). Ces protéines sont des transporteurs actifs d'anion organiques ou de drogues hydrophobes qui sont, dans certains cas (ABCC1, ABCC2 et ABCC3), conjuguées au glutathion, glucuronyl ou sulfate avant d'être transportées. Ces protéines sont impliquées dans le phénotype de résistance à de multiples drogues.

5.1.4. ABCD

Quatre demi-transporteurs forment cette famille. Ils sont actifs sous forme dimérisée. Des études de co-immunoprécipitation ont démontré l'homodimérisation de ABCD1, l'hétérodimérisation des couples ABCD1/ABCD2, ABCD1/ABCD3 et ABCD2/ABCD3 (Liu *et al.*, 1999). Ils sont localisés exclusivement dans le peroxyosome et interviennent dans le métabolisme des acides gras à chaîne très longue.

5.1.5. ABCE et ABCF

Malgré leur différence structurale, ces protéines appartiennent à la famille des transporteurs ABC. Elles ne contiennent pas de domaine transmembranaire mais seulement les domaines de liaisons des nucléotides. Elles sont appelées « Non membrane ABC transporters ». La famille ABCE contient une seule protéine qui pourrait être impliquée dans la réponse immunitaire innée (Dean *et al.*, 2001b). La famille ABCF contient 3 protéines ubiquitaires donc ABCF1 qui semble impliquée dans l'activation de la protéine kinase eIF-2 (Tyzack *et al.*, 2000).

5.1.6. ABCG

Cette famille comprend 5 demi-transporteurs. La topologie de ces protéines est inversée : le domaine de fixation des nucléotides est du côté N-terminal tandis que le domaine transmembranaire est du côté C-terminal. La protéine ABCG2 est la plus étudiée dans cette classe. Elle est impliquée dans un phénotype de résistance à de multiples drogues.

La protéine ABCG1 et l'hétérodimère ABCG5/ABCG8 transportent du cholestérol ainsi que d'autres stérols. Quant à la protéine ABCG4, elle est retrouvée principalement dans le foie où sa fonction n'est pas connue.

5.2. Régulation transcriptionnelle des transporteurs ABC

Du fait de l'implication de ces transporteurs ABC non seulement dans de nombreux rôles physiologiques mais également dans des maladies génétiques ou dans la résistance à de multiples drogues, il est intéressant de comprendre comment est régulée la transcription de leurs gènes.

Les gènes codant pour les transporteurs ABC possèdent une séquence MED-1 et pas de TATA box. L'altération de l'expression de facteur de croissance ou de protéines contrôlant la mort cellulaire modifie la transcription et l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux drogues et donc affecte les thérapies anticancéreuses (Scotto, 2003). Cette transcription peut être influencée par l'expression d'un ou plusieurs facteurs ou d'oncogènes :

- **p53** : l'expression d'ABCB1 (Chin *et al.*, 1992) ainsi que d'ABCC1 (Bahr *et al.*, 2001; Sullivan *et al.*, 2000 ; Wang and Beck, 1998) est réprimée par p53. De plus, sa perte d'expression est corrélée dans le cancer colorectal à une augmentation d'expression de MRP1 (Fukushima *et al.*, 1999).
- **Ap-1** (complexe composé des oncogènes Fos et Jun) : les promoteurs d'ABCB1 (Daschner *et al.*, 1999) et d'ABCC1 (Kurz *et al.*, 2001) contiennent un site de fixation pour Ap-1 qui semble activer leur transcription.
- **APC** (gène répresseur de tumeur muté dans plus de 80% des cancers du colon héréditaire) : la perte de fonction d'APC active le complexe de transcription TCF/LEF. Or, une étude montre que ce complexe active la transcription d'ABCB1. Ceci pourrait être une possible explication de la surexpression d'ABCB1 dans de nombreux cancers colorectaux (Yamada *et al.*, 2000).
- **Ras/Raf** : ce complexe participe également à la régulation de la transcription d'ABCB1 et probablement d'autres transporteurs de drogues (Scotto, 2003).

L'expression des transporteurs ABC est également influencée par des signaux de stress tel que choc thermique, inflammation, hypoxie, substances cancérigènes, traitements chimiothérapeutiques, ... comme détaillé dans la revue de (Scotto, 2003).

5.3. Le rôle physiologique et la localisation tissulaire des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC humains ont une distribution relativement ubiquitaire dans tout l'organisme. Un de leurs rôles physiologiques est la détoxification. Ils sont donc retrouvés au niveau des barrières physiologiques : hémato-encéphalique, placentaire, ou encore hépatique. Cette localisation ubiquitaire est résumée dans la Figure 16. La localisation et le rôle physiologique d'ABCB1 et ABCG2 seront développés ultérieurement.

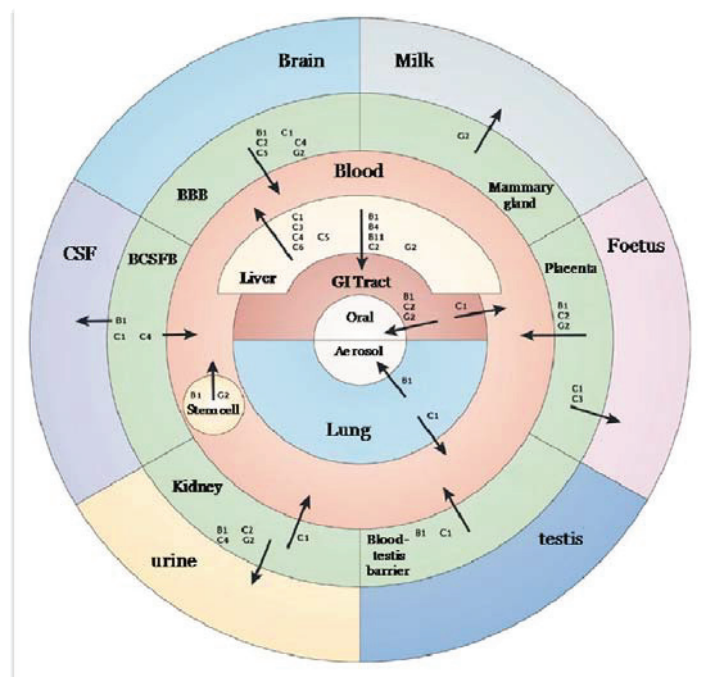


Figure 15 : Localisation tissulaire des transporteurs ABC multidrogues.
(Szakacs *et al.*, 2006).

5.4. Les transporteurs ABC dans les maladies

Les transporteurs ABC sont impliqués dans plusieurs maladies génétiques humaines. Le Tableau 4 présente les transporteurs et les maladies dans lesquelles ils sont impliqués. Ces maladies peuvent être séparées en 2 classes : celles causées par l'inactivation d'un transporteur et celles causées par la surexpression d'un transporteur.

Classification HUGO	Transporteurs ABC	Maladie associée au transporteur ABC
Transporteurs dont l'inactivation cause une maladie génétique		
ABCC7	CFTR	Mucoviscidose
ABCC8	SUR	Hyperinsulinisme familial
ABCC2	cMOAT (MRP2)	Syndrome de Dubin-Johnson
ABCD1	ALD	Adrénoleucodystrophie
ABCB11	PMP70	Syndrome de Zellweger
ABCA4	ABCR	Maladie de Stargardt
ABCA1	ABC1	Maladie de Tangier
ABCB3	MDR3	Cholestase familiale de type 3
ABCB2-ABCB3	TAP	Immunodéficience
ABCB3	SPGP	Cholestase familiale de type 2
Transporteurs dont la surexpression provoque une résistance		
ABCC	MRP	Résistance des cellules cancéreuse aux drogues cytotoxiques
ABCB1	MDR1 (P-gp)	Résistance des cellules cancéreuse aux drogues cytotoxiques
ABCG2	BCRP	Résistance des cellules cancéreuse aux drogues cytotoxiques

Tableau 4 : Transporteurs ABC impliqués dans des maladies génétiques.
(Adapté de (Mourez , 2000).

5.4.1. Les maladies causées par l'inactivation d'un transporteur

- **La mucoviscidose** : Elle concerne 1 enfant sur 2500 aux Etats-Unis. C'est une maladie génétique récessive causée par différentes mutations ponctuelles du gène CFTR (ABCC7). La mutation la plus fréquente est une délétion de la phénylalanine en position 508 empêchant l'adressage de la protéine CFTR (un canal chlorure) à la surface des cellules. La principale conséquence de cette pathologie est une obstruction pulmonaire chronique due à l'accumulation de mucus dans les bronches ce qui conduit à des infections pulmonaires puis progressivement à une insuffisance respiratoire. Cette pathologie se caractérise aussi par une insuffisance pancréatique, intestinale et la stérilité chez les hommes.

- **L'hyperinsulinisme familial** : provoquée par des mutations du gène SUR, cette pathologie concerne 1 enfant sur 40000. Elle est due à un défaut de l'activité des canaux à ions potassique dépendants de l'ATP dans les cellules β du pancréas. Cette inactivation induit une sécrétion constante d'insuline provoquant des hypoglycémies sévères (Thomas *et al.*, 1995).

- **Le syndrome de Dubin-Johnson** : Cette pathologie autosomique récessive touche 1 personne sur 1300. Elle est causée par la mutation du gène MRP2 impliqué dans la

détoxication des anions toxiques vers la bile tel que la bilirubine à partir des hépatocytes (Wada *et al.*, 1998). L'absence de détoxication conduit à une hyperbilirubinémie.

- **L'adrénoleucodystrophie** : c'est une maladie neurodégénérative grave liée au chromosome X. Elle touche 1 personne sur 20000 (Mosser *et al.*, 1993) et est due à une mutation du gène ABCD1.

- **La maladie de Stargadt** : cette pathologie est une des plus communes des dégénérescences maculaires. Elle concerne 1 personne sur 10000. Cette maladie génétique récessive est liée à des mutations du gène ABCA4, qui est impliqué dans le transport des dérivés du rétinol. Ce gène est également responsable de diverses autres maladies oculaires.

- **Le syndrome de Tangier** : causée par des mutations du gène d'ABCA1, qui est impliqué dans le transport du cholestérol, cette pathologie se caractérise par un défaut d'efflux des lipides des macrophages, et par un taux faible de lipoprotéines de haute densité (« High density lipoprotein » : HDL). Elle se manifeste par une coloration orange des amygdales et une atrophie de la rate et du foie. Enfin, elle est surtout caractérisée par une athérosclérose précoce.

- **Les cholestases intra-hépatiques familiales** : maladies récessives infantiles causées par une mutation d'ABCB4 et ABCB11, elles sont généralement fatales dans les 10 premières années de la vie (de Vree *et al.*, 1998; Strautnieks *et al.*, 1998).

- **L'immunodéficience** : Des mutations dans les gènes codant pour TAP1 et TAP2 (ABCB2 et ABCB3) sont associées à des déficits immunitaires sévères (de la Salle *et al.*, 1994 ; de la Salle *et al.*, 1999). Ces protéines sont impliquées dans la présentation du peptide endogène au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Ce défaut de transport est généralement fatal pour les enfants.

5.4.2. Les maladies causées par la surexpression d'un transporteur

La surexpression de 12 transporteurs ABC a été démontrée, *in vitro*, comme étant impliquée dans la résistance des cellules aux médicaments (Szakacs *et al.*, 2006). L'implication de ces transporteurs en clinique est plus difficile à prouver. Cependant, ceci a été démontré pour 3 transporteurs ABC : ABCB1, ABCC1 et ABCG2. En effet, une étude menée par Benderra et collaborateurs a établi un rapport entre la surexpression d'ABCB1 et

ABCG2 et la survie des patients atteints de cancer. Dans une cohorte de 149 individus atteints de leucémie myéloïde aigüe, l'espérance de vie à 4 ans des patients est divisée par 4 en cas d'expression des 2 transporteurs (Benderra *et al.*, 2004).

Les études cliniques sur ABCB1 sont plus avancées que pour ABCG2. Il a ainsi été établi que l'expression d'ABCB1 est corrélée au cancer du sein, aux sarcomes et à certaines leucémies (Szakacs *et al.*, 2006). La réponse à la chimiothérapie est diminuée de 3 fois chez des patientes atteintes de cancer du sein et surexprimant ABCB1 après traitement (étude menée sur 3 patientes) (Trock *et al.*, 1997). De plus, ABCB1 est exprimé dans près de 61% des sarcomes avant traitement où une plus forte expression est notamment retrouvée après traitement à la doxorubicine (Abolhoda *et al.*, 1999). Enfin, après analyse des cellules leucémiques, ABCB1 a été retrouvé dans près d'un tiers des échantillons. Cette expression est corrélée à une diminution de l'efficacité de la chimiothérapie et à une espérance de vie plus faible par rapport aux patients n'exprimant pas ABCB1.

La surexpression des transporteurs peut être très rapide au cours d'un traitement. En 1999, Abolhoda et collaborateurs ont montré que des métastases de sarcome isolées de patients sous traitement chimiothérapeutique (doxorubicine) avaient une induction locale rapide (10 min) de l'expression d'ABCB1 (augmentation de 10 fois) et cette induction n'était pas retrouvée dans les tissus voisins. Cette augmentation rapide suggère une induction de l'expression d'ABCB1 par des facteurs tumoraux, plutôt qu'une sélection des cellules tumorales surexprimant ABCB1 (Abolhoda *et al.*, 1999).

Il faut également noter que les bactéries et les parasites expriment des transporteurs ABC. De la même façon que les cellules cancéreuses transportent les drogues cytotoxiques, les transporteurs ABC de ces microorganismes expulsent les médicaments antiparasitaires ou antibiotiques conduisant à l'échec des traitements. Enfin, certaines bactéries telles que *Bordetella pertusis* ou *Pasteurella haemolytica* expulsent des facteurs de virulence par le biais de transporteurs ABC.

6. La glycoprotéine P

6.1. Découverte

La capacité de ces transporteurs à expulser des drogues anticancéreuses de la cellule a été découverte en 1976 par Juliano et Ling en étudiant des cellules cancéreuses d'ovaires de

hamster chinois résistantes à certaines drogues (cellules CHO). L'étude de la surface de ces cellules leur a révélé la présence d'une protéine de 170 kDa, absente de la surface des cellules non résistantes. Après analyse, cette protéine s'est révélée être une glycoprotéine modifiant la perméabilité des cellules et a donc été nommée P-gp, pour glycoprotéine P. Cette protéine appartient à la classe B de la superfamille des transporteurs ABC. C'est la 1^{ère} découverte de cette classe et elle est donc appelée ABCB1. C'est également le 1^{er} transporteur découvert impliqué dans le phénotype de multirésistance, elle est donc aussi connue sous le nom de MDR1 pour MultiDrugResistance 1 (Juliano and Ling, 1976).

L'identification et le clonage du gène *mdr1*, qui se situe sur le bras court du chromosome 7 (7q21), datent de 1985. La séquence de cette protéine est bien conservée entre les différentes espèces (études chez le hamster, la souris et l'homme) (Riordan *et al.*, 1985).

ABCB1 étant le 1^{er} transporteur ABC découvert pour être impliqué dans le phénotype de multirésistance, on pensait que son inhibition permettrait de contrer ce phénotype et de restaurer la sensibilité des cellules tumorales aux traitements. La découverte d'autres transporteurs ABC impliqués dans ce phénotype a complètement modifiée cette vision qui s'avère beaucoup plus complexe qu'il n'y paraissait alors.

6.2. Localisation tissulaire et cellulaire

ABCB1 est naturellement exprimée dans de nombreux tissus de l'organisme. On la retrouve principalement dans les tissus ayant une fonction de sécrétion, au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales, permettant ainsi l'excrétion des substrats dans l'espace luminal adjacent (Thiebaut *et al.*, 1987). Elle est ainsi exprimée dans le canalicule biliaire des hépatocytes, dans les intestins ou encore dans les cellules épithéliales tubulaires proximales du rein (Schinkel, 1999). ABCB1 est également trouvée au niveau des barrières de protection du cerveau, du placenta et des testicules. Elle y assure une fonction de protection en expulsant les molécules toxiques qui auraient réussi à passer cette barrière (Schinkel and Jonker, 2003). Les principales localisations tissulaires physiologiques d'ABCB1 sont présentées sur le schéma, non exhaustif de la Figure 16.

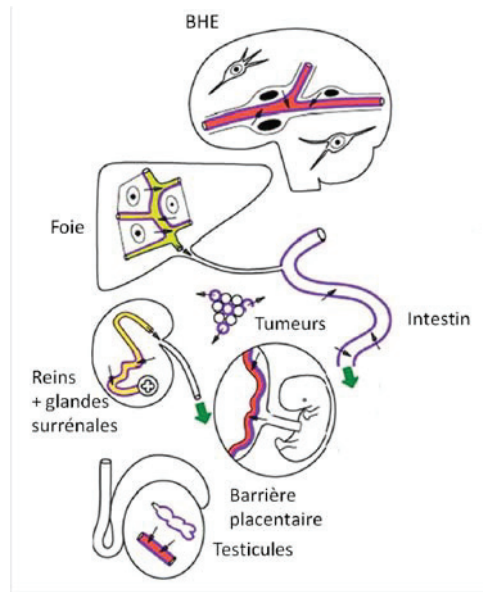


Figure 16 : Localisation tissulaire d'ABCB1.

Les lignes violettes symbolisent la localisation d'ABCB1. Les flèches noires indiquent la direction du transport catalysé par ABCB1. La flèche verte indique le flux des substrats. ABCB1 est présent principalement dans les tissus ayant une fonction d'excrétion (reins, foie, intestins) et dans les barrières protectrices (barrière hémato-encéphalique (BHE), barrière placentaire et testiculaires).

Adapté de (Vlaming *et al.*, 2009).

Il semblerait qu'ABCB1 soit également exprimée dans la membrane interne de la mitochondrie mais cette observation n'a pas été confirmée (Munteanu *et al.*, 2006; Solazzo *et al.*, 2009).

6.3. Rôles physiologiques

De par sa localisation cellulaire et tissulaire, ABCB1 a principalement un rôle de protection. L'étude de souris knock-out (KO) a permis de déterminer la plupart des rôles physiologiques d'ABCB1. Les fonctions physiologiques présentées ci-dessous ne sont pas exhaustives : elles correspondent aux fonctions exercées dans les tissus les plus enrichis en cette protéine.

L'invalidation du gène codant pour ABCB1 n'affecte pas l'espérance de vie des souris. Les fonctions vitales du foie, des intestins, du rein, du cerveau, des ovaires, ou de l'utérus durant une gestation ne sont pas altérées. La même observation est faite pour les cellules souches hématopoïétiques ou le compartiment hématologique en général. Le principal rôle d'ABCB1 a, en fait, été découvert « par hasard ». Les souris *mdr1*^{-/-} exposées à l'invermectine, un pesticide neurotoxique utilisé ici en traitement de l'animalerie contre les mites, décèdent tandis que les souris *mdr1*^{+/+} survivent. Les cellules endothéliales tapissant les capillaires sanguins de la barrière hémato-encéphalique (BHE) sont organisés en jonctions

serrées limitant le passage de substances nocives dans le cerveau. Cependant, de petits composés hydrophobes peuvent diffuser librement à travers la membrane des cellules. ABCB1 va alors les refouler directement dans le sang, protégeant ainsi le cerveau (Leslie *et al.*, 2005; Schinkel *et al.*, 1994). Cette protection n'est pas possible chez les souris *mdr1* *-/-*.

Nous noterons l'importance de la viabilité des souris *mdr1* *-/-*, laissant penser que le traitement d'un cancer par bithérapie associant un inhibiteur d'ABCB1 et un anticancéreux est possible, sans effet secondaire critique.

6.3.1. Barrières Hémato-tissulaire

La présence d'ABCB1 au niveau des différentes barrières témoigne de son rôle de protection. Ce transporteur limite la pénétration de composés toxiques en favorisant leur efflux dans la circulation sanguine (Lankas *et al.*, 1998; Schinkel *et al.*, 1994).

6.3.2. Transport d'hormones

Hormis ce rôle de protection, ABCB1 semble également impliquée dans la reproduction ou dans le transport d'hormones. Elle est très présente dans de nombreux lieux de production d'hormones ou d'organes de reproduction notamment dans les cellules non polarisées du cortex et de la medulla des glandes surrénales (Thiebaut *et al.*, 1987). Nous savons également qu'ABCB1 transporte des corticostéroïdes tels que le cortisol, la corticostérone ou encore l'aldostérone (Ueda *et al.*, 1992 ; Wolf and Horwitz, 1992; Yang *et al.*, 1989).

6.3.3. Le transport de lipides

Il a également été démontré qu'ABCB1 catalyse un efflux de lipide tels que des analogues de la phosphatidylcholine (PC) (van Helvoort *et al.*, 1996) et le cholestérol (Liscovitch and Lavie, 2000).

6.3.4. Intestins-foie-reins

Le rôle de protection d'ABCB1 s'observe également au niveau des tissus excréteurs tels que le foie ou les reins, ou au niveau des tissus impliqués dans l'absorption de composés. ABCB1 favorise l'excrétion de molécules du foie vers la bile ou dans la lumière intestinale où elles seront éliminées. Elle module ainsi la biodisponibilité de nombreux médicaments, substrats de ce transporteur. Ceci a été démontré *in vivo* où la biodisponibilité du paclitaxel

était augmentée chez les souris KO *mdr1*^{-/-} par rapport aux sauvages (Sparreboom *et al.*, 1997).

6.4. Polymorphisme

Il existe plus de 50 polymorphismes d'ABCB1 (Sharom, 2008). Les « single-nucleotide polymorphism (SNPs) » sont des variations d'une seule paire de base du gène pouvant conduire à des SNPs synonymes ou non synonymes. Trois principales sont retrouvées chez ABCB1 :

- la modification de la cytosine 1236 en thymidine (1236C>T). C'est un SNP silencieuse puisque la glycine 411 reste une glycine (Gly411Gly) ;
- le SNP non synonyme 2677G>T/A. Il conduit au changement de l'alanine 893 en sérine ou en thréonine (Ala893Ser/Thr) ;
- le SNP synonyme 3435C>T correspondant au changement Ile1145Ile.

Parmi ces 3 SNPs, un seul est non synonyme et est donc supposé avoir des effets sur l'expression, l'adressage ou la fonctionnalité de la protéine (Ho and Kim, 2005 ; Kurata *et al.*, 2002 ; Meisser, 2002 ; Sun *et al.*, 2004 ; Tanabe *et al.*, 2001 ; Yi *et al.*, 2004). Cependant, en 2007, Kimchi-Sarfaty et collaborateurs ont démontré que même les mutations silencieuses d'ABCB1 peuvent avoir un impact sur la conformation de la protéine (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). Une hypothèse possible est que la mutation d'une base conduit à un codon faiblement utilisé dans le code génétique provoquant une pause dans la transcription ribosomale. Durant ce court laps de temps, la protéine adopte une conformation secondaire différente provoquant des changements dans sa fonctionnalité (Tsai *et al.*, 2008).

En plus de chaque modification fonctionnelle produite par un SNP, il faut imaginer qu'ils peuvent se combiner, augmentant ainsi les différences possibles de fonctionnalité de la même protéine (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). Les conséquences de ces SNPs peuvent être de 2 types : des changements dans le transport (vitesse, modification du spectre des substrats,...) ou la variation du taux d'expression de la protéine (Sissung *et al.*, 2010).

Les études sur le polymorphisme n'en sont qu'à leur début et il n'est pas toujours évident de les relier à des variations de réponses aux traitements, mais ils pourraient s'avérer importants en clinique. Par exemple, il a été démontré que la mutation 3435C>T entraîne une diminution de l'expression d'ABCB1 conduisant à une augmentation du taux plasmatique de

digoxine chez les patients atteints de cette mutation (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Le taux plasmatique de médicaments n'est pas le seul affecté par ces polymorphismes ; la pénétration et l'accumulation des médicaments dans certains tissus (tumeurs, cerveau,...) est également concernée (Lin and Yamazaki, 2003 ; Sissung *et al.*, 2010). Ainsi, on peut imaginer que, dans l'avenir, les traitements soient adaptés en fonction du polymorphisme de ces transporteurs.

6.5. Topologie et structure d'ABCB1

6.5.1. Topologie d'ABCB1

ABCB1 est une glycoprotéine de 1280 acides aminés lui conférant une masse moléculaire de 170 kDa. Elle possède trois sites de N-glycosylation qui varient en nature et en taille suivant le type cellulaire ou le tissu concerné. Ces glycosylations sont situées sur la 1^{ère} boucle extracellulaire. Elles sont nécessaires pour l'adressage de la protéine à la surface cellulaire, mais pas pour sa fonction de transport (Schinkel *et al.*, 1993). Sa topologie est celle décrite dans le §II.2.topologie générale des transporteurs ABC. Elle est formée de 2 TMD et de 2 NBD et elle est produite sous forme d'une seule chaîne polypeptidique.

6.5.2. Structure chez l'homme ou chez la souris

La structure d'ABCB1 de *mus musculus* a été résolue par cristallisation et diffraction aux rayons X par Chang et collaborateurs en 2009 (décrit dans le §II.3.Structure des exportateurs). La forme cristallisée d'ABCB1 a été obtenue seule (code pdb 3G5U) ou avec 2 inhibiteurs hexapeptidiques stéréoisomères : cyclic-*tris*-(R)-valineselenazole (QZ59-(RRR)) (code pdb 3G60) et cyclic-*tris*-(S)-valineselenazole (QZ59-(SSS)) (code pdb 3G61) (Aller *et al.*, 2009).

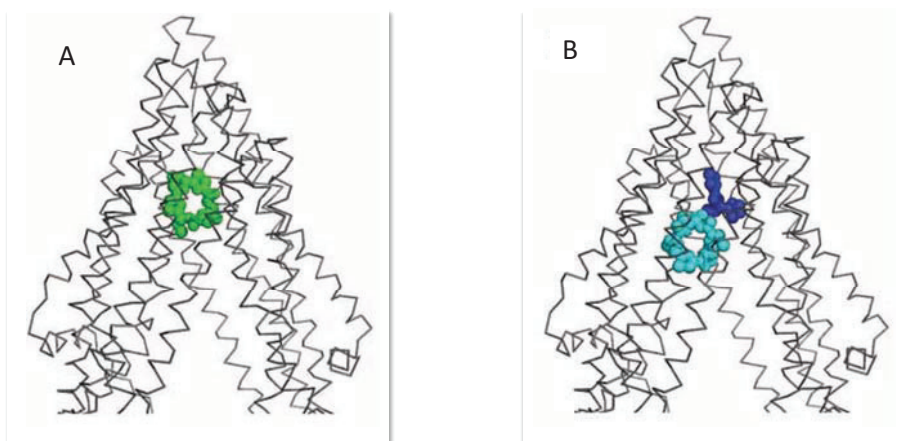


Figure 17 : Structure d'ABCB1 cristallisée avec les inhibiteurs QZ59.

A : ABCB1 co-cristallisée avec QZ59-(RRR) représenté en sphères vertes.

B : ABCB1 co-cristallisée avec 2 QZ59-(SSS), la résolution permet de voir un QZ59-(SSS) entier (représenté en sphères cyans) et la moitié du 2^{ème} (représenté en sphères bleues).

(Aller *et al.*, 2009).

La co-cristallisation nous permet de préciser un site de fixation des inhibiteurs sur ABCB1. La Figure 17A présente ABCB1 co-cristallisé avec QZ59-(RRR). Il existe un site de fixation pour cette molécule, au centre d'ABCB1, qui interagit avec les TM 1, 5, 6, 7, 11 et 12. L'inhibiteur QZ59-(SSS) possède, quant à lui, 2 sites de fixation : un site central interagissant avec les TM 1, 5-12 et l'autre, plus en profondeur que le 1^{er}, interagissant avec les TM 1, 2, 6, 7, 11 et 12. La co-cristallisation de 2 molécules de QZ59-(SSS) est particulièrement intéressante : c'est la 1^{ère} fois que l'on visualise la fixation de 2 molécules d'inhibiteurs sur un transporteur ABC.

Les résidus interagissant avec ces 2 inhibiteurs et avec le vérapamil sont présentés en Figure 18. Comme on peut le voir, les sites se recouvrent partiellement mais sont distincts les uns des autres. D'une manière générale, la moitié supérieure de la poche est constituée d'acides aminés hydrophobes et aromatiques alors que la moitié inférieure comporte des acides aminés polaires (Figure 18A). Plus de 60% des interactions entre ABCB1 et les cyclopeptides se fait grâce aux chaînes latérales des résidus phénylalanine et thréonine. Ainsi, la polyspécificité de ces poches de fixation des inhibiteurs pourrait s'expliquer par l'implication de différents groupes de thréonine et phénylalanine et par la flexibilité des chaînes latérales de ces acides aminés. Cette polyspécificité est également renforcée par les liaisons hydrogènes et hydrophobes ainsi que par les interactions π des cycles aromatiques (Gutmann *et al.*, 2009).

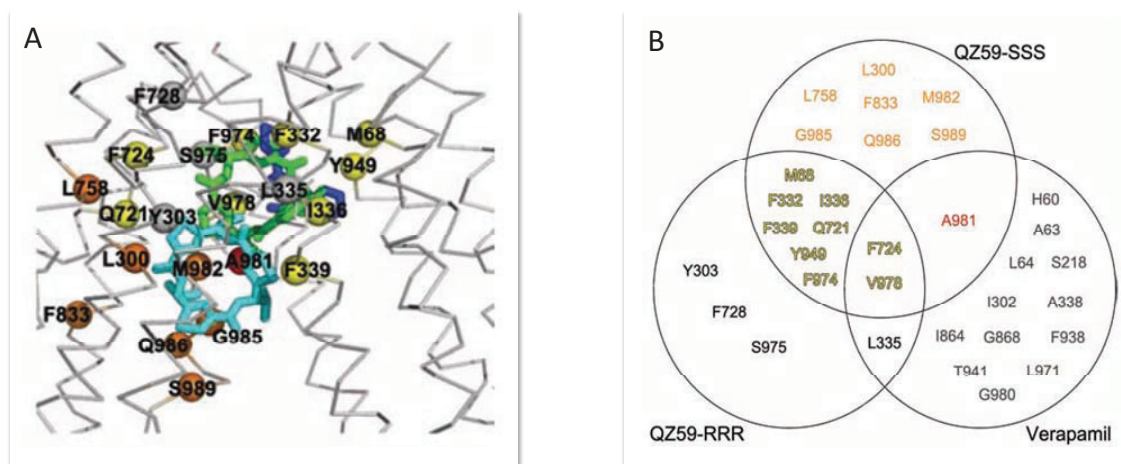


Figure 18 : Acides aminés d'ABCB1 de souris interagissant avec les inhibiteurs QZ59 et le vérapamil.
A : Acides aminés impliqués dans la poche de fixation d'ABCB1, QZ59-(SSS) dans les sites bas (cyan) et haut (bleu) et QZ59-(RRR) dans le site moyen (vert). Les résidus localisés à moins de 5 Å sont représentés par des sphères : résidus en contact seulement avec QZ59-(SSS) (orange pour le site bas et rouge pour le site haut). Les résidus en commun pour les sites des deux QZ59 sont en jaune. Les résidus proches seulement de QZ59-(RRR) sont en gris.

B : Diagramme de Venn représentant les acides aminés interagissant avec les QZ59 et le vérapamil. (Aller *et al.*, 2009).

ABCB1 de souris et ABCB1 humaine ayant 87% d'identité de séquence, Pajeva et collaborateurs ont établi un modèle d'ABCB1 humain par homologie de séquence (Pajeva *et al.*, 2009). En utilisant les résultats de plusieurs études menées précédemment (Loo *et al.*, 2003; Loo and Clarke, 1997 ; 2000 ; 2001 ; 2002), ils présentent un tableau des acides aminés interagissant avec des substrats d'ABCB1 (dibromobinamine, vérapamil et rhodamine) et avec 2 inhibiteurs (QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS)). Ainsi, les TM6, TM9, TM12 semblent former le site R, tandis que le site H est formé par les TM4, TM6, TM8, TM10 et TM12 (Gutmann *et al.*, 2009). Un modèle d'ABCB1 dans sa forme fermée (« outward facing ») avait précédemment été établi par homologie de séquence avec Sav1866 par la même équipe (Globisch *et al.*, 2008). Ceci permet de repérer les acides aminés potentiellement impliqués dans la fixation des substrats de ces 2 formes d'ABCB1 (Figure 19).

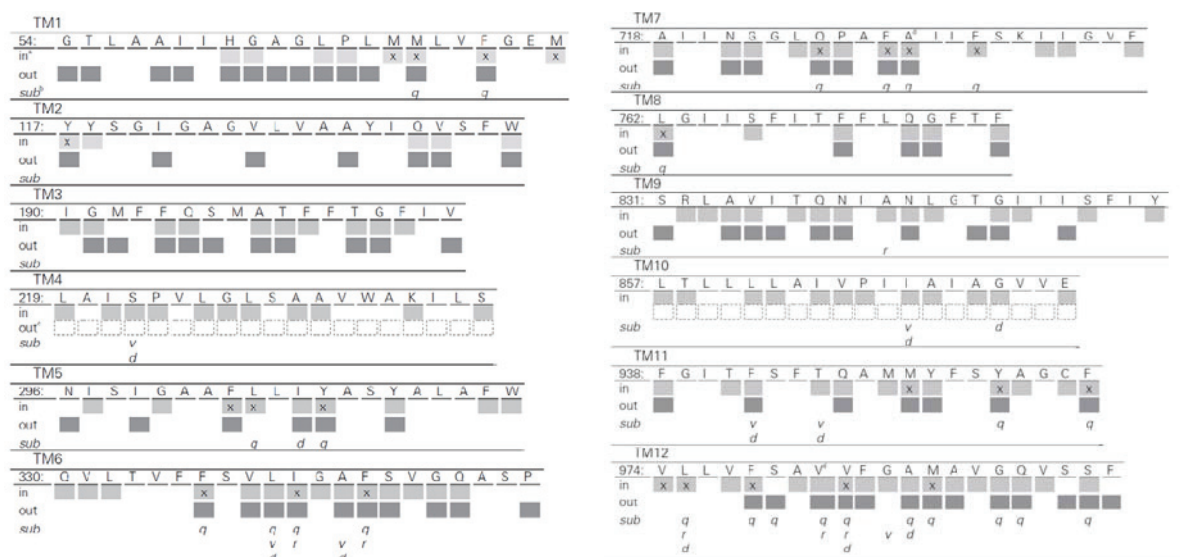


Figure 19 : Acides aminés impliqués dans la poche de fixation des drogues de la forme ouverte ou fermée d'ABCB1 humaine.

Les résidus avec un q sont impliqués dans la fixation des QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS), d : dibromobinamine, r : rhodamine 123, v : verapamil, x : résidus identifiés par docking impliqués dans la fixation des QZ59. (Pajeva *et al.*, 2009).

La Figure 20 illustre la cavité et les poches de fixation dans le modèle d'ABCB1 établi par Pajeva (Pajeva *et al.*, 2009). On note ainsi l'importance du rôle fonctionnel des TM4, TM6, TM10 et TM12 dans l'entrée des substrats jusqu'à leur site de fixation.

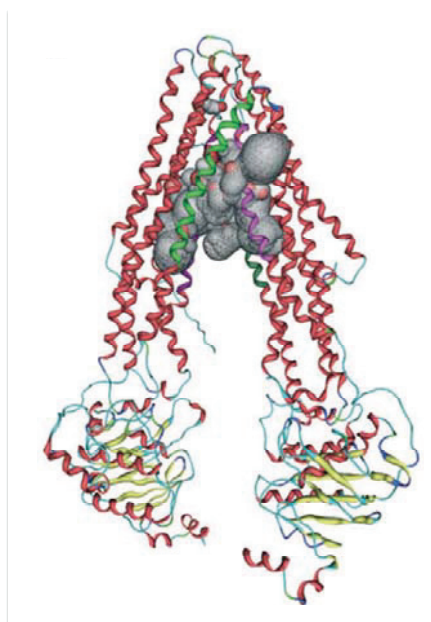


Figure 20 : Cavité de fixation des substrats d'un modèle d'ABCB1 humain établi par homologie de séquence avec ABCB1 murin.

On note l'importance des TM4 (vert clair), TM6 (magenta), TM10 (vert foncé) et TM12 (violet). (Pajeva *et al.*, 2009).

La cavité de fixation des substrats se trouve donc dans la partie haute d'ABCB1. Cependant, la possibilité que ces sites soient reliés à d'autres plus proches du feuillet interne

de la membrane plasmique ou soient situés dans les domaines intracellulaires et/ou les NBD n'est pas exclue (Smriti *et al.*, 2009). Ceci pourrait permettre l'accessibilité à des ligands plus hydrophiles, ou encore d'établir un lien entre la liaison des substrats et l'hydrolyse de l'ATP.

Une des questions essentielles concernant le mécanisme d'efflux d'ABCB1 est de savoir si le passage d'une conformation à l'autre (ouverte/inward versus fermée/outward) module l'affinité d'ABCB1 pour le substrat. En comparant les résultats obtenus pour les modèles de la forme ouverte et de la forme fermée établis par Globisch et collaborateurs en 2008, on note des différences entre les acides aminés impliqués dans la fixation des substrats. Ainsi, les TM4 et TM10 ne seraient plus accessibles dans la conformation fermée de la protéine. Les auteurs suggèrent que ces 2 domaines transmembranaires seraient impliqués dans les interactions faibles lors de l'entrée du ligand dans la cavité, l'empêchant ensuite de ressortir du côté intracellulaire. Ces interactions seraient alors perdues au cours du cycle de transport. Les TM6 et TM12 seraient, quant à eux, impliqués dans les liaisons fortes avec les substrats.

Pajeva et collaborateurs suggèrent cependant que les substrats restent liés aux mêmes résidus de la forme ouverte ou fermée (Pajeva *et al.*, 2009).

Une étude menée par Gutmann et collaborateurs en 2009 suggère un résultat différent : lorsque la protéine change de conformation, les TMs subissent une rotation d'environ 90° (Figure 21) et les chaînes latérales de certains résidus TM 1, 6, 7 et 12 appartenant aux sites de fixation des QZ59 sont alors orientées de manière défavorable pour l'interaction avec le ligand ce qui entraîne une modification d'affinité (Gutmann *et al.*, 2009). L'affinité diminue et les substrats peuvent alors être expulsés hors de la cellule.

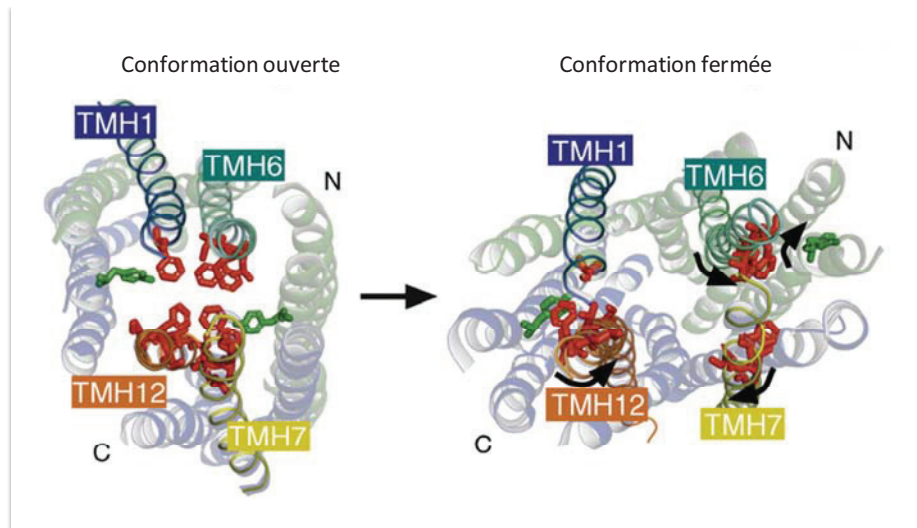


Figure 21 : Rotation des TMs lors du passage de la conformation ouverte à la conformation fermée d'ABCB1.

Lors de ce passage, les acides aminés (représentés en rouge et vert) subissent des changements d'orientation défavorables pour l'interaction avec les substrats.
(Gutmann *et al.*, 2009).

6.6. Substrats/allocrites

Les molécules transportées par les transporteurs ABC ne constituent pas, *stricto sensu*, des substrats puisqu'ils ne subissent pas de transformation moléculaire du type de celle réalisée par une enzyme. Les transporteurs assurent uniquement le changement de compartiment des molécules, et de ce fait, le terme allocrite a été proposé par Barry Holland (Université d'Orsay) pour définir ces molécules. On conservera tout de même ici le terme de « substrat » ou de « substrat de transport » qui est retrouvé dans la plupart des articles.

6.6.1. Le spectre des substrats transportés

ABCB1, comme beaucoup de transporteurs ABC, transporte une grande quantité de molécules, de structures divergentes. Le 1^{er} substrat d'ABCB1 mis en évidence, la colchicine, a permis la découverte de cette protéine (Juliano and Ling, 1976). Depuis, de nombreux substrats ont été identifiés. Ils sont variés tant par leur structure (Figure 22), leur origine (naturelle ou synthétique) que par leur fonction.

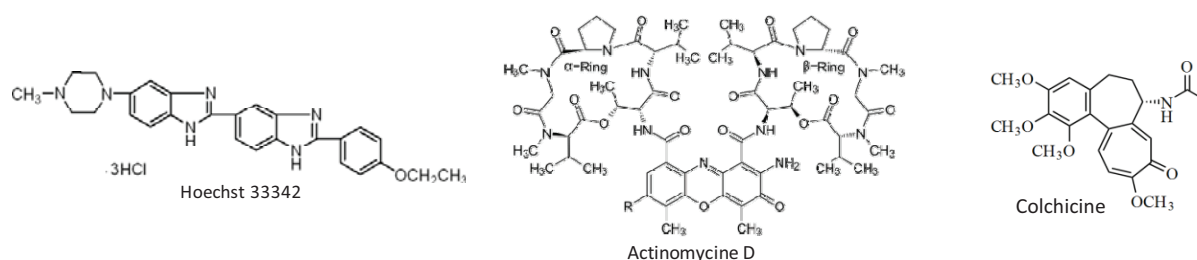


Figure 22 : Exemples de substrats d'ABCB1.

Les structures du Hoechst 33342, de l'actinomycine D et de la colchicine sont très différentes, de part leur taille et leurs substituants.

Parmi les substrats d'ABCB1, se trouvent de nombreuses molécules thérapeutiques, expliquant ainsi l'importance de ce transporteur dans les pathologies humaines. Le Tableau 5 présente les principaux substrats pharmacologiques d'ABCB1.

Antibiotiques	Drogues anticancéreuses	Antifongiques	Cardiovasculaire	Immunosuppresseur
Actinomycine D	Bisphosphonates	Itraconazole	Digoxine	Cyclosporine A
Erythromycine	Daunorubicine	Ketoconazole	Diltiazem	Dexaméthasone
Gramicidine D	Diflomotecan	Antihistaminiques	Ouabain	FK506
Rifampicine	Docetaxel	Certizidine	Quinidine	Hydrocortisone
Salinomycine	Doxorubicine	Fexofenadine	Verapamil	Prednisolone
Sparfloxacin	Epirubicine	Loratadine	Divers	Rapamycin
Valinomycine	Etoposide	Terfenadine	Asimadoline	Tacrolimus
Inhibiteurs des protéases du VIH	Gefitinib	Antihypertenseurs	Cimetidine	Triamcinolone
Abacavir	Imatinib	Losartine	Colchicine	Statines
Amprenavir	Irinotecan	Talinolol	Domperidone	Atorvastatine
Aquinavir	Mitoxantrone	Chlorpromazine	Eletriptan	Cerivastatine
Darunavir	Paclitaxel	Clozapine	Flesinoxan	Lovastatine
Indinavir	Romidepsine	Fluphenazine	Glabridine	
Lopinavir	Teniposide	Olanzapine	Ivermectine	
Nelfinavir	Tipifarnide	Quetiapine	Loperamide	
Ritonavir	Vinblastine	Risperidone	Ondansetron	
Saquinavir	Vincristin		Quinacrine	
			Ranitidine	
			Topiramate	

Tableau 5 : Principaux substrats médicamenteux d'ABCB1.

Liste non exhaustive adaptée de (Sissung *et al.*, 2010).

6.6.2. Les caractéristiques des substrats

Ce sont généralement des molécules organiques, ayant un poids moléculaire compris entre 250 (cimetidine) et 1900 Da (Gramicidine D). ABCB1 transporte essentiellement des substrats hydrophobes mais lorsque l'hydrophobicité est très importante, les substrats peuvent se lier trop fortement à ABCB1 pour pouvoir être expulsés. Ils sont amphiphiles et possèdent fréquemment des cycles aromatiques. On peut également noter que la plupart des substrats

sont cationiques ou non chargés, bien que certains composés acides sembleraient être transportés (comme le méthotrexate) (Ueda *et al.*, 1997). Il est cependant impossible de généraliser ces caractéristiques puisque des molécules identifiées comme substrats d'ABCB1 ne les partagent pas.

Seelig et collaborateurs, en 1998, suggèrent que la distance entre les groupes donneurs d'électrons est une caractéristique importante des substrats. Cette conclusion est basée sur l'analyse d'une centaine de composés connus pour interagir avec ABCB1. Elle a permis de mettre en évidence que les substrats possèdent tous 2 ou 3 groupements donneurs d'électrons distants de 2,5 à 4,6 Å (Seelig, 1998). Une étude tridimensionnelle, plus récente suggère que les molécules possédant 2 groupements accepteurs de liaisons hydrogènes séparés de 11,5 Å ainsi que 2 groupements donneurs de liaisons hydrogènes distantes de 16,5 Å seront des substrats d'ABCB1 (Cianchetta *et al.*, 2005).

Ces 2 études montrent l'importance des liaisons hydrogènes dans la reconnaissance et la fixation des substrats sur ABCB1.

En 2002, Garrigues et collaborateurs ont défini 2 pharmacophores d'ABCB1 basés sur l'analyse d'une série de peptides cycliques contraints ou de molécules proches de ces peptides (Figure 23). La principale information ressortant de cette étude est que la reconnaissance des substrats ne dépend pas des substituants chimiques, contrairement à ce qui est classiquement observé pour une interaction ligand-récepteur. A la place, ABCB1 lie des molécules variées à différents sites en fonction de leur taille, de leur forme et de la distribution de leurs zones hydrophobes et polaires, rendant ainsi possible la reconnaissance de molécules avec des structures très variées (Garrigues *et al.*, 2002).

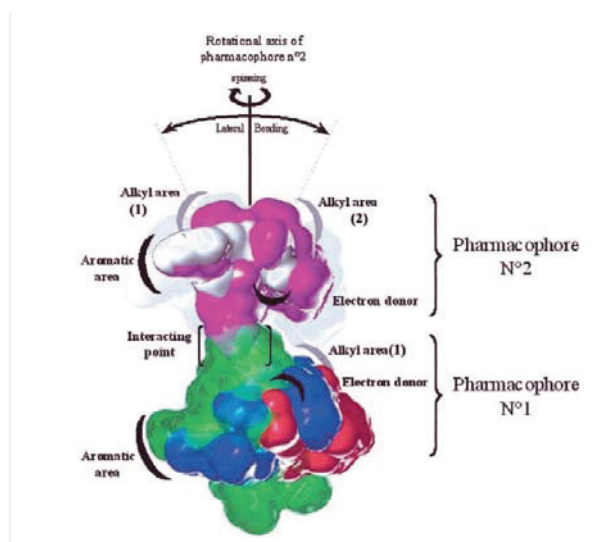


Figure 23 : Modèle des 2 sites de reconnaissance des substrats d'ABCB1 représenté par 2 pharmacophores.

La cyclosporine A, l'actinomycine D et le vérapamil sont en vert, le tentoxine en blanc ; la vinblastine en rose, la bromocriptine en bleu et la pristinamycine en rouge.
(Garrigues *et al.*, 2002).

La 2^{ème} information importante de cette étude est que les 2 pharmacophores sont très proches et se recouvrent partiellement. Les grosses molécules entrent en compétition avec les plus petites. De plus, 2 molécules peuvent se lier simultanément sur ABCB1 si l'une des 2 a une taille inférieure à 750 Da.

6.6.3. « MultiDrug Binding Pockets »

Deux hypothèses sont possibles pour les sites de fixation des substrats : la présence de plusieurs sites distincts spécifiques pour une ou plusieurs drogues, ou la présence d'une grande poche de fixation commune.

En 1997, l'utilisation de [¹²⁵I]iodoarylazidoprazosine met en évidence l'existence de 2 sites distincts de fixation allostérique pour la prazosine, un sur la partie N-terminale et un du côté C-terminal d'ABCB1. Ces 2 sites semblent intervenir à des phases différentes de transport (Dey *et al.*, 1997). La même année, Martin et collaborateurs proposent qu'ABCB1 possède plusieurs sites de fixation des drogues, interagissant allostériquement. En effet, ils démontrent que le SR33557 module, de manière non compétitive, l'activité ATPasique stimulée par le vérapamil (Martin *et al.*, 1997).

En se basant sur l'impact des substrats sur l'activité ATPasique d'ABCB1, Orłowski et ses collaborateurs ont également montré l'existence de sites de fixation distincts des substrats sur cette protéine (Orłowski *et al.*, 1996 ; Garrigos *et al.*, 1997 ; Pascaud *et al.*, 1998).

Ensuite, Shapiro et collaborateurs démontrent qu'il existe au moins 3 sites de fixation distincts reconnaissant et fixant préférentiellement certains substrats. Ainsi, comme le présente la Figure 24, le site P reconnaît préférentiellement la prazosine et la progestérone tandis que le site H lie le Hoechst 33342, la quercétine et la colchicine, alors que le site R fixe préférentiellement la rhodamine 123 et les anthracyclines (daunorubicine et doxorubicine) (Shapiro *et al.*, 1999; Shapiro and Ling, 1997). Cette fixation sur un site plutôt que l'autre est réversée à haute concentration : à plus de 2 μM , le Hoechst 33342 se fixe également sur le site R, de même que la rhodamine 123 se lie au site H à cette même concentration.

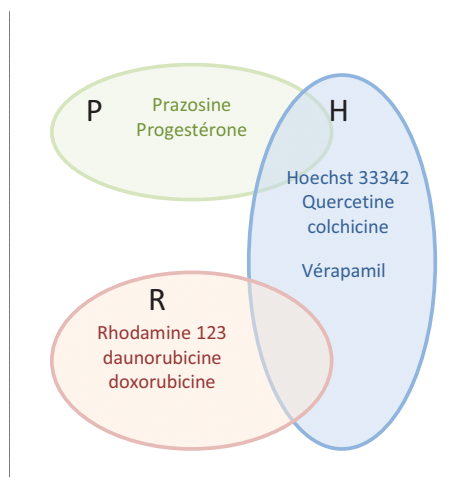


Figure 24 : ABCB1 possède 3 sites de fixation pour les substrats (P, R et H).

Certains substrats se fixent préférentiellement sur le site H (tel que le Hoechst 33342) ou sur le site R (la rhodamine 123 ou les anthracyclines).

Les 3 sites de fixation fonctionnent selon une coopérativité positive, c'est-à-dire que la fixation d'une drogue sur son site favorise le transport d'une autre drogue après fixation sur le 2^{ème} site. Plusieurs études avaient déjà fait référence à une coopérativité positive ou négative entre différentes drogues (Sharom *et al.*, 1996; Spoelstra *et al.*, 1994) corroborant la théorie de Shapiro et collaborateurs (Shapiro *et al.*, 1999; Shapiro and Ling, 1997). Le fait que les drogues se fixant sur le site P sont peu ou pas transportées, suggère que ce site serait un site régulateur plus qu'un site de transport (Shapiro *et al.*, 1999).

Cependant, en 1994, Pajeva et collaborateurs suggèrent que cette capacité d'adaptation est due à la présence d'une seule large poche de fixation des substrats (Pajeva *et al.*, 1994). Cette poche contiendrait des « sous-chambres ». Les substrats se fixent avec une meilleure affinité

selon les résidus présents dans celles-ci. Cette hypothèse semble se confirmer par la résolution de la structure 3D cristallographique d'ABCB1 (Aller *et al.*, 2009), mais ne remet nullement en cause les découvertes précédentes, notamment celle de Shapiro et collaborateurs. Cette large poche contient en effet des groupements hydrophiles donneurs ou accepteurs d'électrons, des acides aminés aromatiques et chargés qui créent des sous-sites où se fixent spécifiquement certains substrats (Eckford and Sharom, 2009). La reconnaissance des substrats se fait grâce à des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques.

La taille de cette large poche a été déterminée par modification chimiques de cystéines. Ainsi, selon Loo et Clark, elle aurait une largeur de 9 à 25 Å en son milieu et pourrait atteindre 50 Å à la sortie du site (Loo and Clarke, 2001).

La position exacte des sites de fixation des drogues est difficile à définir. Loo et Clarke ont, par mutagenèse dirigée, étudiés de nombreux acides aminés qu'ils supposaient interagir avec la rhodamine ou encore le vérapamil (Figure 19). Différentes études semblent indiquer que le site R est formé par les TM 6, 9 et 12 tandis que le site H est créé par les résidus des TM 4, 6, 10, 11 et 12 (Gutmann *et al.*, 2009). Il est cependant difficile de déterminer précisément le contour de ces sites. Même lorsque la mutation de certains résidus diminue la fixation des substrats, ceci peut être dû à un changement de conformation d'ABCB1 qui réduit l'accessibilité aux sites de fixation et non pas à une altération directe du site de fixation.

7. La Breast Cancer Resistance Protein

7.1. Découverte

Malgré la découverte d'ABCB1 en 1976 (Juliano and Ling, 1976) puis de ABCC1 en 1992 (Cole *et al.*, 1992), la résistance aux chimiothérapies dans les cancers du sein n'était pas clairement expliquée. En 1998, trois équipes découvrent à quelques mois d'intervalle, un nouveau transporteur ABC impliqué dans la chimiorésistance. Doyle et collaborateurs ont, les premiers, cloné et ainsi montré l'existence d'une protéine de 795 résidus, dans les cellules MCF7/adrVP de cancer de sein résistantes à certains médicaments anticancéreux. Ils la nomment BCRP pour « Breast Cancer Resistance Protein » (Doyle *et al.*, 1998). Quelques mois plus tard, Allikmets et collaborateurs clonent le gène d'un nouveau transporteur ABC très fortement exprimé dans le placenta (100 fois plus que dans d'autres tissus) et la nomment donc ABCP pour ABC-Placenta (Allikmets *et al.*, 1998). Début 1999, l'équipe de Bates clone un nouveau gène dans des cellules de carcinomes de colon humain S1-M1-80 résistantes à la

mitoxantrone. Ce gène est appelé MXR pour « mitoxantrone-resistance associated gene » (Miyake *et al.*, 1999).

Ces 3 protéines découvertes quasiment simultanément correspondent au même transporteur ABC, le second membre de la sous famille G, ABCG2.

En 2000, Knutsen et collaborateurs déterminent par analyse cytogénétique la localisation du gène d'ABCG2 sur le bras court du chromosome 4 (4q21-4q22) (Knutsen *et al.*, 2000). C'est le seul transporteur ABC localisé sur ce chromosome.

7.2. Localisation tissulaire et cellulaire

Contrairement à la plupart des demi-transporteurs, ABCG2 est principalement localisé à la membrane plasmique des cellules, en accord avec sa fonction de pompe d'efflux (Rocchi *et al.*, 2000). Cette localisation a été confirmée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal, BXP34 (Scheffer *et al.*, 2000). ABCG2 est également retrouvée, bien que dans une proportion moindre, dans les lysosomes (Rajagopal and Simon, 2003) et dans la membrane interne de la mitochondrie (Solazzo *et al.*, 2009).

ABCG2, comme beaucoup de transporteur ABC est naturellement exprimée dans de nombreux tissus. Les principaux sont présentés en Figure 25. Le placenta est le tissu le plus enrichi en cette protéine (Doyle *et al.*, 1998). Hormis les tissus excréteurs, comme foie, reins et intestins, ABCG2 est exprimée dans les cellules souches et les cellules hématopoïétiques (Zhou *et al.*, 2002). On retrouve également ABCG2 au niveau des barrières du cerveau, du placenta et des testicules.

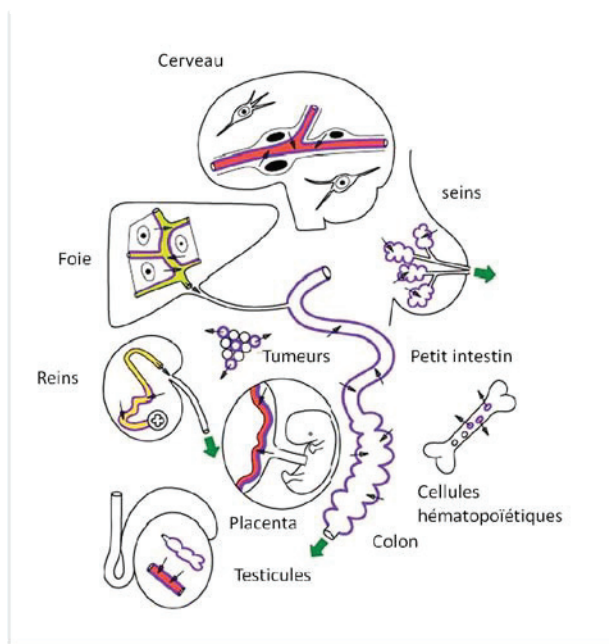


Figure 25 : Localisation tissulaire schématique d'ABCG2.

Les lignes violettes symbolisent la localisation d'ABCG2. Les flèches noires indiquent la direction du transport réalisé par ABCG2. La flèche verte indique le flux des substrats d'ABCG2. ABCG2 est localisé principalement au niveau des tissus excréteur (intestin, reins, foie) ou au niveau des barrières de protection (cerveau, placenta, testicules,...).

Adapté de (Vlaming *et al.*, 2009).

7.3. Rôles physiologiques

Outre son implication dans la résistance à de multiples médicaments, ABCG2 possède des rôles physiologiques essentiels. De même qu'ABCB1, ABCG2 a principalement une fonction de protection des organes.

7.3.1. Barrières hémato-tissulaire

- Barrière hémato-encéphalique (BHE) : les études sur le rôle d'ABCG2 dans la BHE sont contradictoires. Certaines, comme celle de Cisternino et collaborateurs s'accordent sur un rôle protecteur d'ABCG2 (Cisternino *et al.*, 2004) tandis que l'étude de Lee et collaborateurs proposent un rôle limité pour cette protéine (Lee *et al.*, 2005). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait qu'ABCB1 est prédominant dans la BHE. Ainsi, les composés qui sont des substrats des 2 transporteurs seront d'abord transportés par celui-ci. ABCG2 intervient, quant à lui pour exporter des composés non pris en charge par ABCB1 ou lors d'une saturation de ce transporteur (Vlaming *et al.*, 2009).

- Barrière hémato-placentaire : ABCG2 est exprimé dans les syncytiotrophoblastes du placenta. Il transporte les composés du fœtus au placenta, protégeant ainsi le fœtus de composés toxiques (Cygalova *et al.*, 2008; Jonker *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2007).
- Barrière hémato-testiculaire : ABCG2 a également une fonction de protection à ce niveau en limitant la pénétration de composés exogènes dans les testicules (Enokizono *et al.*, 2008 ; Enokizono *et al.*, 2007).

7.3.2. Intestins-colon-foie-reins

ABCG2 possède ici, un rôle dans l'excrétion des composés toxiques endogènes ou exogènes (Maliepaard *et al.*, 2001). Jonker et collaborateurs avaient déjà montré, en 2000, qu'ABCG2 module la biodisponibilité du topotécan, administré oralement, par un transport actif de cette molécule vers la lumière intestinale et dans la bile (Jonker *et al.*, 2000). Ce rôle dans l'élimination de certains médicaments a depuis été démontré en clinique (Kruijtz *et al.*, 2002).

7.3.3. Glandes mammaires

L'expression d'ABCG2 dans les glandes mammaires augmente fortement au cours de la lactation (Jonker *et al.*, 2005). Nous savons qu'il participe à l'excrétion dans le lait de certaines vitamines, telle que la vitamine B2 ou riboflavine (van Herwaarden *et al.*, 2007). Cependant, il permet également le passage de molécules toxiques dans le lait, exposant ainsi l'enfant à celles-ci ; le rôle d'ABCG2 dans les glandes mammaires doit donc être éclairci par de nouvelles études.

7.3.4. Cellules souches

ABCG2 est un marqueur d'une population particulière de cellules souches hématopoïétiques, la « side-population (SP) » (Zhou *et al.*, 2001). ABCG2 pourrait, ici, prévenir l'accumulation de molécules nécessaires à la différenciation des cellules souches.

Enfin, en 2008, un rôle protecteur d'ABCG2 dans les cellules souches a été suggéré. En effet, sa capacité à expulser la protoporphyrine IX dans les cellules souches ES protège ces dernières de l'accumulation de ce composé toxique (Susanto *et al.*, 2008). La même année, il a été montré qu'ABCG2 protège les cellules SP en cas de stress oxydatif (Martin *et al.*, 2008).

7.4. Polymorphisme

Il existe plus de 80 « single-nucleotide polymorphism (SNPs) » d'ABCG2. A ce jour, 5 SNPs synonymes ainsi que 8 SNPs non synonymes sont connues chez des patients sains : V12M, Q141K, I206L, F431L, S441N, F489L, N590Y et D620N (Cervenak *et al.*, 2006). On trouve également 2 délétions dues à un mauvais épissage : A315 et T316 (Imai *et al.*, 2002a).

La fréquence de ces mutations varie selon la race des patients étudiés. Par exemple, la mutation de l'acide nucléique 421C en A (421C>A), conduisant à la mutation de l'acide aminé V12M, est retrouvée chez 35% des chinois tandis qu'elle n'est présente que chez 1% des Afro-américains (de Jong *et al.*, 2004).

Les conséquences des SNPs sont difficiles à établir mais leurs études cliniques commencent à porter des fruits. Ainsi, nous savons maintenant que la mutation 421C>A modifie le taux plasmatique de plusieurs médicaments. Elle augmente par exemple la biodisponibilité du topotécan (Saito *et al.*, 2001) et l'exposition à la rosuvastatine est plus que doublée (Keskitalo *et al.*, 2009). Comme on peut donc le voir, la caractérisation de ces polymorphismes est importante puisqu'ils peuvent modifier la réponse du patient au traitement. De la même façon que décrit précédemment pour ABCB1, une mutation de la séquence d'ABCG2 peut entraîner soit une modification de l'expression de la protéine, soit une modification de son activité de transport. Dans les 2 cas, la biodisponibilité des médicaments administrés sera modifiée.

7.5. La mutation R482T/G

Une mutation particulière a été observée en position 482 où l'arginine est mutée en thréonine ou glycine. Cette mutation est acquise par forte pression de sélection exercée *in vitro* (Honjo *et al.*, 2001) et n'a, à ce jour, jamais été retrouvée chez l'homme (Cervenak *et al.*, 2006). La mutation de R482 augmente la capacité d'efflux d'ABCG2. En effet, à la différence de la protéine naturelle, les mutants R482T et R482G transportent les anthracyclines et la rhodamine 123 (Allen *et al.*, 2002a ; Honjo *et al.*, 2001 ; Ozvegy *et al.*, 2002 ; Robey *et al.*, 2003) ; ils transportent également plus efficacement la mitoxantrone (Ozvegy *et al.*, 2002 ; Robey *et al.*, 2003). Cependant, contrairement à la protéine sauvage, ces mutants ne transportent pas le méthotrexate (Chen *et al.*, 2003b ; Volk *et al.*, 2002). Enfin, l'activité ATPasique mesurée sur des membranes de cellules d'insectes est plus élevée en cas de mutation en position 482 (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005 ; Ozvegy *et al.*, 2001 ; Ozvegy *et al.*, 2002).

L'arginine 482 peut être impliquée dans la fixation et la reconnaissance des substrats ou dans le site de transport des substrats. En 2006, Pozza et collaborateurs, au laboratoire, démontrent que la fixation des anthracyclines et de la rhodamine 123 n'est pas altérée chez les mutants de cette arginine (Pozza *et al.*, 2006). Ces résultats excluent donc l'implication de l'arginine 482 dans la reconnaissance et la fixation des substrats d'ABCG2. Ainsi, la position R482 serait impliquée directement dans le transport des substrats.

7.6. Mécanisme- topologie

7.6.1. Topologie

ABCG2 est une glycoprotéine de 655 acides aminés conférant une masse molaire de 72 kDa. C'est un demi-transporteur dont la topologie est inversée par rapport à celle d'ABCB1 : le domaine nucléotidique est situé du côté N-terminal tandis que le domaine transmembranaire est du côté C-terminal.

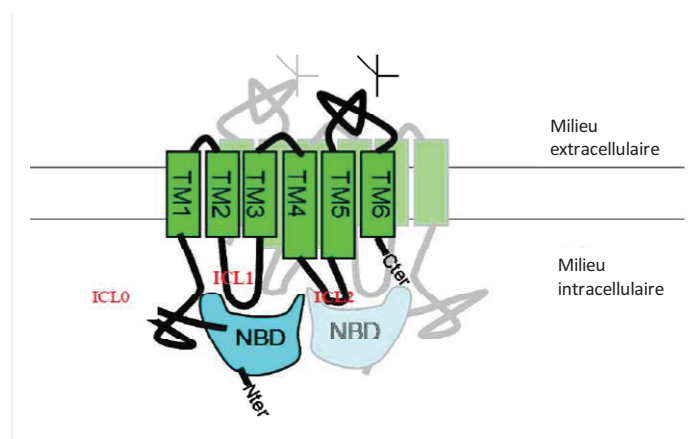


Figure 26 : Topologie d'ABCG2.

ABCG2 est un homodimère dont chaque monomère est formé d'un domaine de liaison nucléotidique (NBD), d'un domaine transmembranaire comprenant 6 hélices transmembranaires (TM1 à 6), et d'un site extracellulaire de glycosylation.
(P. Falson, non publié).

La structuration et la fonction des boucles d'ABCG2 sont largement méconnues. Le modèle topologique de la Figure 26 propose qu'ICL0 relie le NBD au domaine transmembranaire. Du fait de sa taille (une centaine de résidus) il est vraisemblable que cette boucle intègre au moins un domaine, bien que cela reste hypothétique.

Les boucles ICL1 et ICL2, qui connectent les respectivement TM2-3 et TM4-5, sont de tailles réduites et semblent intervenir dans la jonction des TM avec les NBD.

Au niveau extracellulaire, ABCG2 possède également 3 boucles. Les 2 premières, ECL1 et ECL2, de tailles réduites, relient respectivement TM1-2 et TM3-4. La boucle ECL3 est, quant à elle, suffisamment grande pour constituer un domaine à part entière.

Enfin, ABCG2 possède 1 site de N glycosylation au niveau de l'asparagine 596. De la même façon que pour ABCB1, cette glycosylation n'est nécessaire ni au repliement de la protéine, ni à sa fonction de transport (Diop and Hrycyna, 2005).

7.6.2. Dimérisation

La présence de 2 NDB étant indispensable à l'hydrolyse de l'ATP (Smith *et al.*, 2002), nous pouvons supposer que la forme minimale fonctionnelle d'ABCG2 est un dimère, ce qui a effectivement été montré en 2001 en cellules d'insectes *Sf9* (Ozvegy *et al.*, 2001). La dimérisation d'ABCG2 s'effectue au cours d'une étape précoce de la biosynthèse dans le réticulum endoplasmique (Polgar *et al.*, 2010).

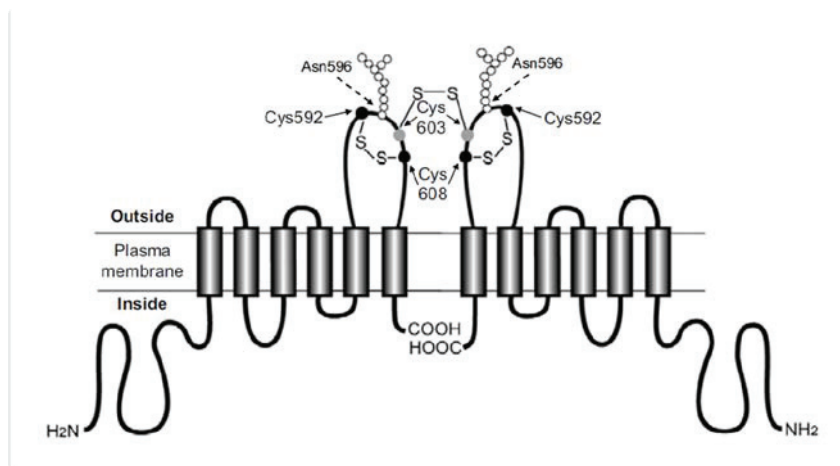


Figure 27 : Résidus de cystéines impliqués dans la dimérisation d'ABCG2.

Les cystéines 603 de chaque monomère interviennent dans la dimérisation du transporteur en formant un pont disulfure intermolécule. Les cystéines 592 et 608 forment quant à elles, un pont disulfure intramolécule nécessaire à la stabilisation de la protéine.

(Wakabayashi *et al.*, 2006).

Trois cystéines localisées au niveau extracellulaire sont impliquées dans la formation de ponts disulfures. Seule la cystéine 603 est impliquée dans la dimérisation par formation d'un pont disulfure intermolécule, les 2 autres formant un pont disulfure intramolécule (Figure 27) (Henriksen *et al.*, 2005). Cependant, ce pont intermolécule n'est indispensable ni à l'expression ni à la fonction de la protéine (Henriksen *et al.*, 2005 ; Mitomo *et al.*, 2003 ; Wakabayashi *et al.*, 2006).

Cette cystéine 603 n'est pas la seule responsable de la dimérisation du transporteur dans des cellules intactes (Ni *et al.*, 2010). ABCG2 contient dans son TM1 un motif de dimérisation GXXXG, connu pour être impliqué dans la dimérisation des protéines membranaires telle que la glycophorine A (Brosig and Langosch, 1998). Des études menées par Polgar et collaborateurs ne permettent pas d'affirmer avec certitude que ce motif soit impliqué dans la dimérisation d'ABCG2 mais leurs résultats le suggèrent fortement (Polgar *et al.*, 2010; Polgar *et al.*, 2004).

Enfin, il a été rapporté que le résidu G553 situé sur le TM5 serait effectivement impliqué dans la dimérisation d'ABCG2 (Polgar *et al.*, 2006).

7.6.3. Données structurales

Contrairement à ABCB1, la structure 3D d'ABCG2 n'a pas encore été résolue. Une structure par microscopie électronique a été résolue à une résolution de 18 Å rapportant qu'ABCG2 adopte une conformation octamérique (4 homodimères d'ABCG2) dans les cellules d'insectes high-five (avec la fos-choline 16 comme détergent) (McDevitt *et al.*, 2006). Des études menées sur cellules humaines et sans purification en détergent avaient, quant à elles, rapporté qu'ABCG2 est exprimée sous forme de tétramère et/ou de dodécamère (Xu *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2007).

Une étude récente menée parallèlement sur cellules d'insecte *Sf9* et sur cellules humaines Flp-InTM-293 a montré qu'ABCG2 était exprimé sous forme de tétramère dans ces 2 systèmes (Dezi *et al.*, 2010). La structure obtenue par microscopie électronique est présentée en Figure 28.

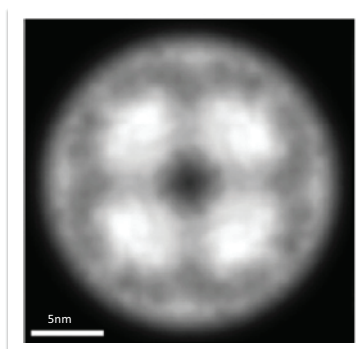


Figure 28 : Image de microscopie électronique de la face intracellulaire de His₆-ABCG2.

His₆-ABCG2 a ici été purifié à partir de membrane de cellules humaines Flp-InTM-293 après passage sur une couche de lipides fonctionnels. Cette image permet de visualiser 4 NBD et donc l'organisation tétramérique d'ABCG2. (Dezi *et al.*, 2010).

Enfin, plusieurs modèles d'ABCG2, qui ne seront pas détaillés ici, ont été établis par homologie de séquence avec d'autres transporteurs ABC.

7.7. Substrats transportés

7.7.1. Le spectre des substrats

Les 3 transporteurs ABC impliqués dans le phénotype MDR (ABCB1, ABCC1 et ABCG2) interagissent avec des centaines de substrats. Ces substrats peuvent être soit spécifiques d'un transporteur soit communs à 2 ou 3 (Figure 29) (Litman *et al.*, 2000).

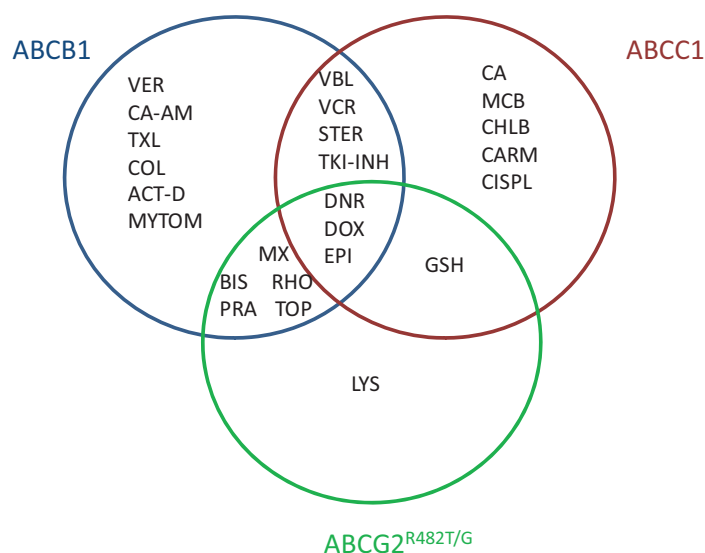


Figure 29 : Spectre des substrats des 3 transporteurs ABC principalement impliqués dans le phénotype MDR.

Avec : ACT-D : actinomycine D; BIS, bisantrene; CA, calcein; CA-AM, calcein-AM ester; CHLB : chlorambucol ; CISPL : cisplatine ; COL, colchicine; DNR, Daunorubicin; DOX, doxorubicin; EPI, epirubicin; GSH : glutathion ; LYS, LysoTracker; MCB, monochlorobinamine; MX, mitoxantrone; MYTOM : mytomycine ; PRA, prazosine; RHO, rhodamine 123; STER : stéroïdes ; TKI-INH : inhibiteurs des tyrosine kinases ; TXL, paclitaxel; TOP, topotécan; VBL, vinblastine; VCR : vincristine ; VER, verapamil.

Il faut noter qu'ABCG2 naturelle, à la différence du mutant R482T/G, transporte également le méthotrexate.

Adapté de (Litman *et al.*, 2000).

ABCG2 transporte des composés qui peuvent être neutre ou chargés négativement incluant des conjugués sulfates (Imai *et al.*, 2003 ; Suzuki *et al.*, 2003) et glucuronides (Chen *et al.*, 2003b). Comme nous l'avons vu précédemment, selon l'acide aminé présent en position 482, le spectre des substrats change.

ABCG2 transporte donc une grande quantité de substrats variant tant par leur origine, que par leur fonction ou leur structure.

7.7.1.1. Les dérivés porphyriques

L'accumulation d'hème (Figure 30) entraîne une l'accumulation de fer et donc des dommages à l'ADN par les espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Blokhina *et al.*, 2003 ;

Bohm *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 1997). De plus, l'accumulation d'hème ou de porphyrines conduit à un arrêt des fonctions mitochondriales (Antolin *et al.*, 1994 ; Sandberg and Romslo, 1980). L'homéostasie des porphyrines est donc essentielle à la survie des cellules et doit être finement régulée.

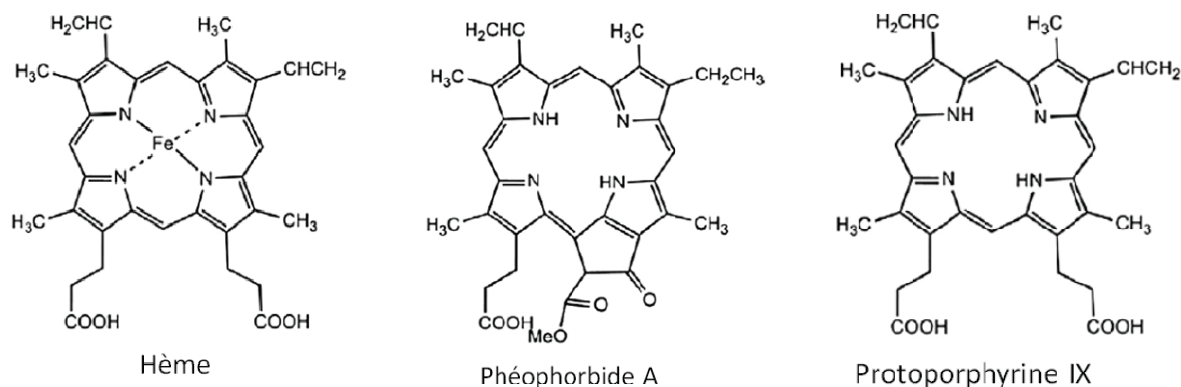


Figure 30 : Structure de 3 dérivés porphyriques transportés par ABCG2, l'hème, le phéophorbide a et la protoporphyrine IX.

La 1^{ère} démonstration de la capacité d'ABCG2 à transporter les porphyrines a été réalisée par Jonker et collaborateurs en 2001. Les souris KO *abcg2*^{-/-} recevant une nourriture riche en alfalfa (*Medicago sativa*) développent une nécrose au niveau des oreilles lorsque les animaux sont exposés à la lumière (Figure 31). Le métabolisme de l'alfalfa génère en effet un produit de dégradation phototoxique, le phéophorbide a (Figure 30), produit qui résulte également de la chlorophylle a. Le phéophorbide a s'accumule dans les souris invalidées pour le gène *abcg2*, ce qui provoque une nécrose des zones les plus exposées à la lumière (Jonker *et al.*, 2002). Ce rôle d'ABCG2 dans le transport du phéophorbide a a par la suite été confirmé *in vitro* sur des cellules humaines (Robey *et al.*, 2004).

Les souris *abcg2*^{-/-} ont un taux dans les érythrocytes de protoporphyrine IX (PPIX), le précurseur direct de l'hème (Figure 30), 10 fois supérieur aux souris sauvages et ceci sans relation avec leur régime alimentaire (Jonker *et al.*, 2002), suggérant qu'ABCG2 serait impliqué dans le transport de PPIX afin de protéger ces cellules contre une accumulation excessives de PPIX.

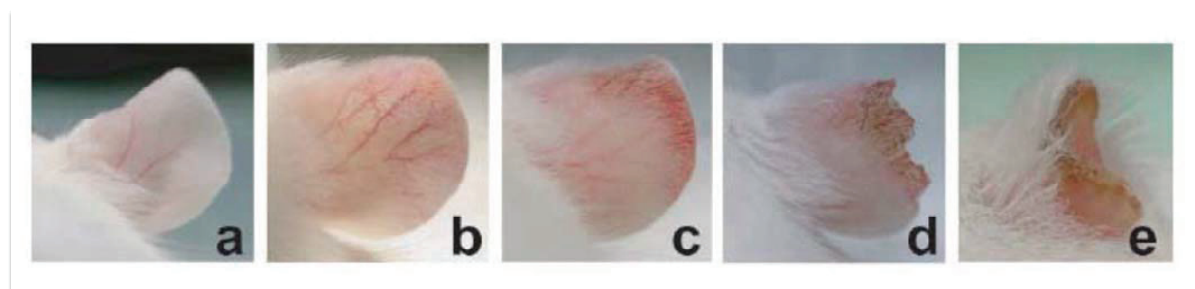


Figure 31 : Phototoxicité induite par l'accumulation de phéophorbide a chez les souris *abcg2* $-/-$.
a : oreille saine ; de b à e : progression de la nécrose sur une période de 3 à 5 jours chez les souris *abcg2* $-/-$.
(Jonker *et al.*, 2002).

De fait, plusieurs études montrent le rôle d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines. Ainsi, en 2005, une diminution significative du PPIX dans les cellules surexprimant ABCG2 a été observée (Zhou *et al.*, 2005).

En 2007, Jonker et son équipe montrent l'importance du transporteur ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines grâce à leur étude menée sur la glande de Harder. Cette glande exocrine dont la fonction est mal cernée est située à l'arrière de l'œil et contient une grande quantité de porphyrines. Cette glande exprimant ABCG2 constitue un bon modèle pour l'étude du transport des porphyrines. Ils ont ainsi mis en évidence d'une part le transport des dérivés de PPIX par ABCG2 et d'autre part la capacité du transporteur à les éliminer par voie hépatique (Jonker *et al.*, 2007).

Récemment, une étude sur les cellules souches ES a confirmé la capacité d'ABCG2 à transporter le PPIX dans ces cellules (Susanto *et al.*, 2008).

ABCG2 participe également à la protection des cellules neuronales contre le stress oxydatif en régulant le taux d'hème et en inhibant la réponse inflammatoire, *via* la voie du NF κ -B. Ceci pourrait avoir un rôle dans la maladie d'Alzheimer (Shen *et al.*, 2010).

La concentration d'hème étant augmentée dans des conditions d'hypoxie, la régulation des porphyrines est encore plus critique. Ainsi, en 2004, Krishnamurthy et collaborateurs ont caractérisé le rôle d'ABCG2 dans le maintien de cette homéostasie sous conditions hypoxiques dans des cellules souches. Ainsi, les cellules *abcg2* $-/-$ sont plus sensibles à l'hypoxie que les cellules normales et cette sensibilité est réversée par inhibition de la synthèse d'hème. Le rôle d'ABCG2 dans le maintien de cette homéostasie a alors été suggéré (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Cependant, il faut noter que ces auteurs n'ont pas directement montré le transport d'hème par ABCG2 mais son interaction avec la protéine.

En 2009, Solazzo et collaborateurs ont rapporté qu'ABCG2 est aussi exprimée dans la membrane interne de la mitochondrie. Ils émettent l'hypothèse que le transporteur permettrait la protection de l'ADN mitochondrial lors d'un traitement chimiothérapeutique (Solazzo *et al.*, 2009). Cependant, sachant que la mitochondrie est le siège de la synthèse de l'hème, ces résultats posent la question d'un rôle éventuel d'ABCG2 dans l'efflux d'hème néosynthétisé.

Enfin, il ne faut pas oublier que, même si le rôle d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines est important, les souris *abcg2* ^{-/-} sont parfaitement viables. Ceci indique que d'autres systèmes sont impliqués dans le maintien de cette homéostasie.

7.7.1.2. Les molécules thérapeutiques

Etant impliqué dans un phénotype de multirésistance, ABCG2 transporte un grand nombre de molécules actives. Une liste, non exhaustive, est présentée en Tableau 6.

Antibiotiques	Drogues anticancéreuses	Antifongiques	Divers
Ciprofloxacine	9-aminocamptothécine	Itraconazole	Glyburide
Erythromycine	Bisantrene	Ketoconazole	Protoporphyrine
Nitrofurantoïne	Cladribine	Antihistaminiques	Immunosuppresseur
Norfloxacine	Daunorubicine	Certizidine	Cyclosporine A
Ofloxacine	Diflomotecan	Fexofenadine	Lefunomide
Inhibiteurs des protéases du VIH	Doxorubicine	Loratadine	Sirolimus
Abacavir	Epirubicine	Terfenadine	Sulfasalazine
Lamivudine	Erlotinib	Antihypertenseurs	Tacrolimus
Nelfinavir	Etoposide	Olmesartan	Bloqueurs des canaux Ca ²⁺
Zidovudine	Flavopiridol	Anticoagulants	Azidopine
Statines	Gefitinib	Dipyridamole	Dypiridamole
Seravastatine	Gimatecan		Nitrendipine
Pitavastatine	Homocamptothécine		
Posuvastatine	Imatinib		
	Methotrexate		
	Mitoxantrone		
	SN-38		
	Teniposide		
	Topotecan		

Tableau 6: Principaux substrats médicamenteux d'ABCG2.

Liste non exhaustive adapté de (Sissung *et al.*, 2010).

Outre les substrats cités précédemment, ABCG2 transporte beaucoup d'autres molécules. Ces dernières peuvent également être des inhibiteurs qui agissent de manière compétitive avec

certaines autres substrats, empêchant ainsi leur efflux. C'est par exemple le cas des flavonoïdes et notamment du flavopiridol (Robey *et al.*, 2001). Ce dérivé des flavones est également un anticancéreux puisqu'il induit un arrêt du cycle cellulaire.

7.7.2. Les différents sites de fixations

En 2006, Clark et collaborateurs ont montrés qu'ABCG2, comme ABCB1 (Shapiro and Ling, 1997), possède plusieurs sites de fixation des drogues (Clark *et al.*, 2006). Ils ont utilisé la forme R482G du transporteur afin d'élargir le spectre des substrats transportés. Leur étude a permis d'établir l'existence de 3 sites distincts sur chaque monomère d'ABCG2^{R482G}. Deux de ces sites sont allostériquement liés tandis que le 3^{ème} ne semble pas interagir avec les 2 autres (Clark *et al.*, 2006). Nous trouvons en effet, une coopérativité négative (la fixation d'un substrat dans son site diminue l'affinité d'un autre substrat pour son site) ou positive (la fixation d'un substrat sur son site augmente l'affinité du 2^{ème} substrat) entre les différents sites, schématisés sur la Figure 32.

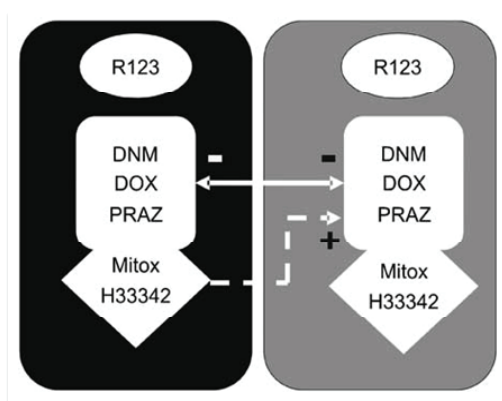


Figure 32 : ABCG2^{R482G} posséderait 3 sites de fixation des drogues distincts.

Sur ce schéma est représenté un dimère d'ABCG2 (le 1^{er} en fond noir, le 2^{ème} en fond gris). Il y a donc 2×3 sites de représentés ici. R123 : rhodamine 123 ; DNM : daunomycine ; DOX : doxorubicine ; PRAZ : prazosine ; Mitox : mitoxantrone ; H33342 : bisbenzidine Hoechst 33343 ; - : coopérativité négative ; + : coopérativité positive.

(Clark *et al.*, 2006).

Dans cette étude, les auteurs n'ont pas pu identifier le site de fixation du méthotrexate. Ce composé n'étant pas transporté par le mutant R482G, ils ont proposé que cette arginine interviendrait dans l'interaction des ligands avec le transporteur (Clark *et al.*, 2006). Cependant cette hypothèse est en désaccord avec les résultats publiés par Pozza et collaborateurs qui ont montré que malgré le fait qu'ils ne soient pas transportés, les anthracyclines et la rhodamine 123 se fixent avec la même affinité sur ABCG2 naturelle et que le méthotrexate se fixe de la même façon sur la protéine mutée (Pozza *et al.*, 2006).

III. Les inhibiteurs des transporteurs ABC

Nous avons vu que dans certains cas, la chimiothérapie échoue du fait de la résistance développée par les cellules cancéreuses. Cette résistance est fréquemment associée au phénotype de multirésistance aux drogues induit par la surexpression des transporteurs ABC dans ces cellules. Il est donc indispensable de développer une stratégie bloquant ces transporteurs ou de trouver de nouvelle voie de thérapie n'impliquant pas les transporteurs ABC. Différentes approches, présentées en Figure 33 et ci-dessous, ont été développées pour contrer ce phénotype et ainsi restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques.

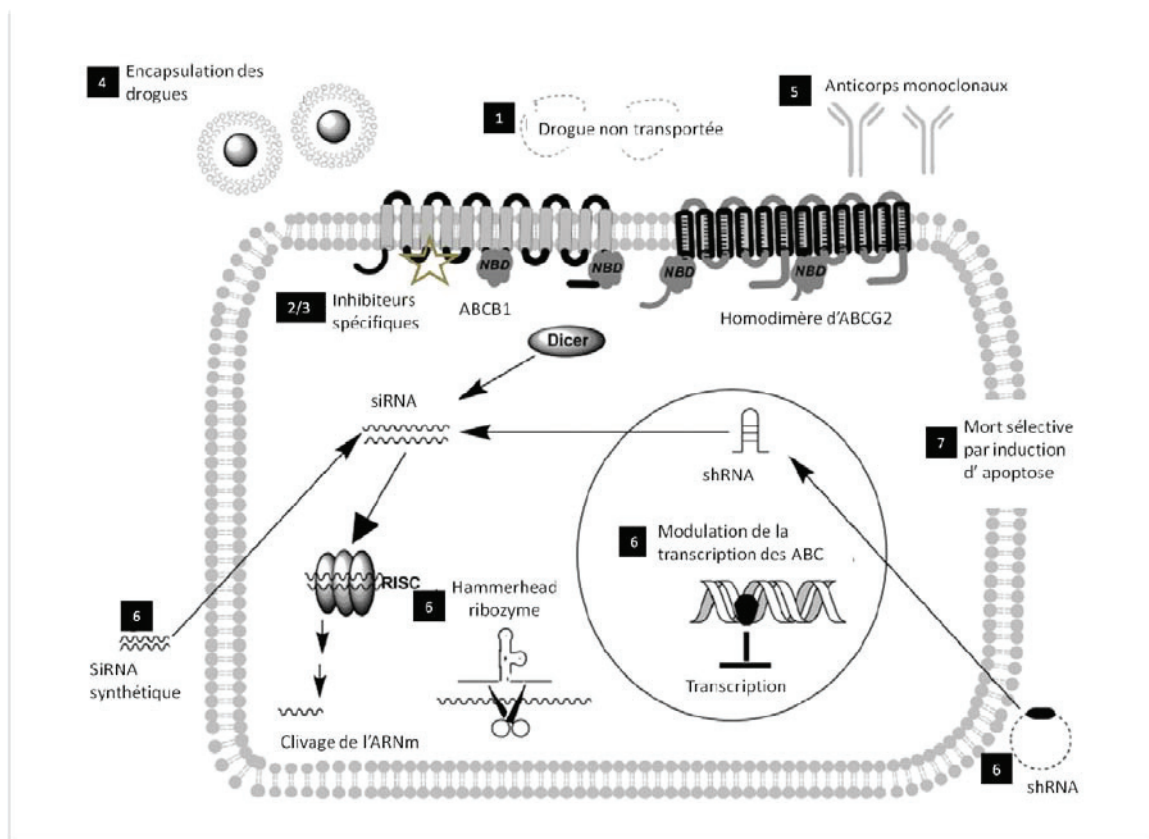


Figure 33 : Stratégies envisagées pour contrer le phénotype MDR.

1 : drogues non transportées ; 2 : développement d'inhibiteurs spécifiques ; 3 : combinaisons d'inhibiteurs ; 4 : encapsulation des drogues ; 5 : développement d'anticorps monoclonaux ; 6 : modulation de la transcription ou de la traduction ; 7 : induction d'apoptose.

Adapté de (Wu *et al.*, 2008).

1. Anticancéreux non transportés

La 1^{ère} stratégie pour lutter contre le phénotype MDR est de développer de nouveaux anticancéreux qui ne soient pas expulsés par un transporteur ABC. La capacité d'efflux par ABCB1 d'un candidat médicament est maintenant fréquemment testée avant son développement et en fait un avantage considérable pour son développement futur.

Ainsi, les épothilones sont de nouveaux agents ciblant les microtubules, avec un mécanisme d'action identique au paclitaxel mais qui ne sont pas reconnus par ABCB1. Ceci apporte bien la preuve que le développement de nouveaux anticancéreux non transportés est possible (Szakacs *et al.*, 2006). Cependant certaines drogues ne peuvent pas être remplacées dans un traitement. Ainsi, certaines équipes synthétisent des analogues d'anticancéreux dans le but qu'ils ne soient pas transportés par les transporteurs ABC. Il est apparu que les drogues ayant une faible polarité sont rarement des substrats des transporteurs ABC (Wu *et al.*, 2008). En 2001, Perego et collaborateurs ont synthétisé un analogue de la camptothécine, le ST481, et l'ont testé sur une lignée cellulaire de carcinome du colon, HT29. Ces cellules, résistantes au topotécan et au SN-38 du fait de l'expression d'ABCG2, sont sensibles au ST481, suggérant que ce composé n'est pas un substrat d'ABCG2. L'activité antitumorale du ST481 sur les cellules cancéreuses surexprimant ABCG2 fait donc de ce composé un bon candidat pour les essais cliniques (Perego *et al.*, 2001).

Actuellement, différentes industries pharmaceutiques testent la capacité d'efflux par ABCB1 de leur candidat médicament avant son développement. Cependant, ceci ne garantit pas que la drogue ne soit pas transportée. Ce test ne se fait que sur ABCB1 alors que plusieurs transporteurs ABC sont impliqués dans cette résistance et que tous n'ont pas le même spectre de substrats. De plus, il est maintenant connu que les transporteurs ABC sont capables de s'adapter à une drogue. Il y a donc une probabilité que même si le candidat médicament n'est pas exporté lors de ce test, il le soit en clinique grâce à une adaptation de ces pompes (Szakacs *et al.*, 2008).

2. Inhibiteurs

Idéalement, la voie la plus simple et la plus directe pour contrer le phénotype MDR est de bloquer les transporteurs ABC par des inhibiteurs, aussi appelés modulateurs ou chimiosensibilisants. Depuis 1980, de nombreuses équipes ont donc travaillé dans cette optique. Un inhibiteur idéal serait un inhibiteur possédant les caractéristiques suivantes :

- Efficace à faible concentration
- Spécifique du transporteur surexprimé
- Pas d'interaction pharmacocinétique avec l'agent anticancéreux
- Haute affinité pour le transporteur ABC
- Non toxique

Plusieurs points importants ressortent de cette liste. Il apparaît tout d'abord que les traitements doivent être adaptés à chaque patient afin d'administrer un inhibiteur spécifique du transporteur exprimé dans le cancer traité, et qui, de plus, ne modifie pas la pharmacocinétique de l'agent anticancéreux. Ensuite, un inhibiteur est potentiellement toxique. En effet, comme décrit précédemment, les transporteurs ABC ont des rôles physiologiques essentiels, et leur inhibition dans les tissus sains peut avoir des conséquences néfastes. Il faut donc prendre en compte la balance bénéfice/risque lorsqu'on développe un inhibiteur de la même façon que lors du développement de tout médicament (Robert and Jarry, 2003). Il faut cependant noter que les rôles physiologiques des transporteurs ABC sont fréquemment redondants d'un transporteur à un autre. Ainsi, en développant des inhibiteurs spécifiques pour un seul transporteur, on peut espérer maintenir ces rôles physiologiques par le biais d'autres transporteurs ABC.

Les inhibiteurs développés depuis 1980 peuvent être classés en 3 groupes de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations. Seuls les inhibiteurs d'ABCB1 et ABCG2 sont détaillés par la suite.

2.1. Les inhibiteurs d'ABCB1

2.1.1. Première génération d'inhibiteurs

Elle correspond essentiellement à des agents pharmacologiques utilisés dans d'autres pathologies et donc déjà disponibles sur le marché. Le 1^{er} inhibiteur découvert fut le vérapamil (Tsuruo *et al.*, 1981) pour sa capacité à contrer la résistance à la vincristine et à la vinblastine induite par ABCB1. C'est un médicament connu comme inhibiteur des canaux calciques, principalement utilisé comme vasodilatateur coronarien. La cyclosporine A (Figure 34), un immunosuppresseur, inhibe également l'efflux de la vincristine et de la daunorubicine par ABCB1 dans la leucémie lymphoïde aigue (Slater *et al.*, 1995) et l'efflux de la doxorubicine dans les tumeurs solides (Twentyman and Bleehen, 1991).

Le principal obstacle au développement clinique de ces inhibiteurs est leur toxicité. Par exemple, le vérapamil est cardiotoxique à dose thérapeutique. Une étude clinique menée en 1985 a ainsi été stoppée en phase I car la concentration inhibant ABCB1 s'est révélée supérieure à la dose maximale tolérée. Il n'a donc pas été possible de l'utiliser en adjuvant à une chimiothérapie (Benson *et al.*, 1985).

Certains composés tels que la cyclosporine ont été testés en clinique. La phase III a permis d'établir un effet bénéfique pour les patients traités avec la cytarabine et la daunorubicine (List *et al.*, 1993). Une autre étude clinique a été menée avec la quinine pour traiter le syndrome myélodysplasique (Wattel *et al.*, 1999). Ces exemples positifs témoignent de l'efficacité de cette stratégie, qui a conduit les équipes de recherche à développer une 2^{ème} génération d'inhibiteurs, moins toxiques.

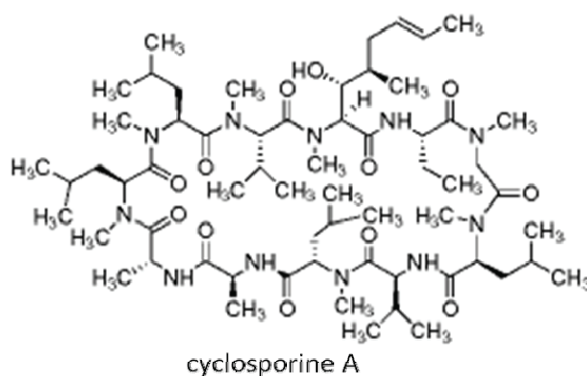


Figure 34 : Structure de la cyclosporine A, inhibiteur de 1^{ère} génération d'ABCB1.

2.1.2. Seconde génération d'inhibiteurs

La synthèse de composés de 2^{ème} génération a utilisé une approche de bio-informatique : le 3D-QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) permettant de définir les groupements essentiels à l'activité de l'inhibiteur, afin de synthétiser des composés par modification structurale de la 1^{ère} génération. L'objectif est d'obtenir des inhibiteurs plus efficaces et moins toxiques. Ainsi ont été obtenus le R-vérapamil qui n'a plus l'effet cardiotoxique du vérapamil racémique ou encore le PSC-833 (Valspodar), analogue de la cyclosporine D, qui n'est pas immunosuppresseur. En plus de la diminution des effets toxiques, ces composés sont plus efficaces que leurs prédécesseurs : ainsi le PSC-833 est par exemple 10 à 20 fois plus efficace que la cyclosporine A (te Boekhorst *et al.*, 1992; Twentyman and Bleehen, 1991).

L'utilisation de cette 2nde génération en clinique est restée limitée du fait de l'interaction des inhibiteurs avec les agents anticancéreux, modifiant leur pharmacocinétique. Ces inhibiteurs modifient la clairance ou la métabolisation des anticancéreux, augmentant leur concentration plasmatique et donc leur toxicité. Une solution a consisté à modifier la dose d'anticancéreux. Cependant certains patients n'ont alors plus été sensibles aux drogues ou aux inhibiteurs tandis que d'autres se sont retrouvés sur-dosés. Ainsi, des essais cliniques du PSC-833 dans la leucémie myéloïde aigüe ont été arrêtés du fait d'un taux de mortalité trop élevé (Baer *et al.*, 2002). Une autre étude avait pourtant montré l'avantage de ce composé dans le traitement de la leucémie myéloïde aigüe pour des patients de moins de 45 ans mais cet effet n'a pas été reproduit et les essais ont également été arrêtés (Kolitz *et al.*, 2004). Plusieurs autres composés de 2nde génération ont été testés en clinique mais aucun n'a été retenu comme inhibiteur à la fois efficace et sans danger.

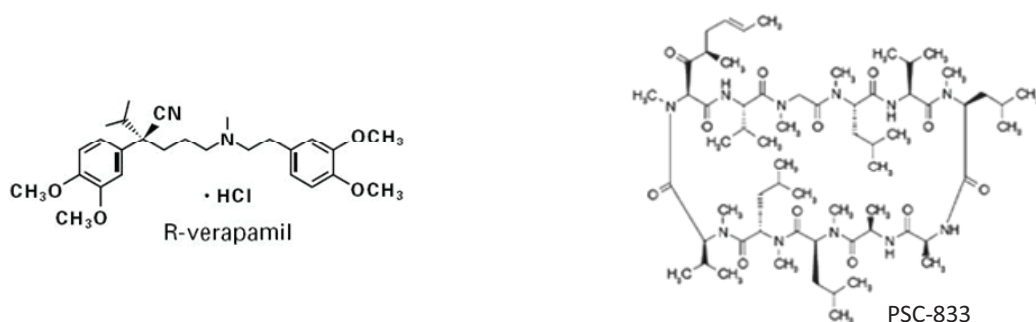


Figure 35 : Structure de 2 inhibiteurs d'ABCB1 de 2^{ème} génération, le R-vérapamil et le PSC-833.
Le PSC-833 est aussi connu sous le nom de Valspodar.

2.1.3. Troisième génération d'inhibiteurs

La plupart des inhibiteurs de 3^{ème} génération ont 3 caractéristiques majeures :

- Ils sont efficaces à faible concentration grâce à une forte affinité pour le transporteur visé.
- Ils n'inhibent pas le cytochrome P450 3A, ce qui conduit à une faible interaction pharmacocinétique avec l'agent anticancéreux. Ceci s'avère important puisque ces enzymes métabolisent une grande variété de xénobiotiques et notamment des drogues. Le cytochrome P450 3A est localisé dans le foie et les intestins ce qui explique son rôle majeur dans la métabolisation et l'élimination des xénobiotiques. Les inhibiteurs de 1^{ère} ou 2^{ème} génération, tels que la cyclosporine A ou le PSC-833, sont des substrats du cytochrome P450 3A de même que de nombreux agents anticancéreux. De ce fait, lors d'une co-administration, il y a compétition et le résultat est imprévisible. Cela peut conduire à une augmentation de la

concentration plasmatique d'agents anticancéreux, provoquant de dangereux surdosages (Relling, 1996).

- Ils sont *a priori* spécifiques du transporteur ciblé, ce qui présente 2 avantages. Premièrement, il y a moins de risque de bloquer des transporteurs impliqués dans l'élimination de la drogue anticancéreuse et donc de moduler la pharmacocinétique de cette drogue. Deuxièmement, comme nous l'avons vu précédemment, en n'inhibant qu'un seul transporteur ABC, on peut espérer que les fonctions physiologiques du transporteur inhibé soient assurées par d'autres transporteurs ABC.

La plupart des inhibiteurs de 3^{ème} génération sont dérivés du pharmacophore établi avec les composés de 2^{nde} génération. Plusieurs composés ont été testés *in vivo* ou sont en cours d'essais cliniques. Le Tableau 7 résume les différents essais cliniques effectués avec les composés de 3^{ème} génération.

Inhibiteur testé	Transporteurs ABC	Phase de l'EC	Référence
CBT-1	ABCB1	III	(Oldham, 2007)
Tesmilifène	ABCB1	III	(Reyno <i>et al.</i> , 2004)
Dofequidar (MS209)	ABCB1, ABCC1	III	(Saeki <i>et al.</i> , 2007)
Valspodar (PSC-833)	ABCB1	III	(Friedenberg <i>et al.</i> , 2006)
ONT-093	ABCB1	II	(Mistry and Folkes, 2002)
Mitotane	ABCB1	II	(Berruti <i>et al.</i> , 2005)
Laniquidar (R101933)	ABCB1	II	(van Zuylen <i>et al.</i> , 2000)
Biricodar	ABCB1, ABCC1	II	(Fox and Bates, 2007) ; (Rowinsky <i>et al.</i> , 1998)
Zosuquidar (LY335979)	ABCB1	I, II	(Morschhauser <i>et al.</i> , 2007)
Tariquidar (XR9576)	ABCB1, ABCC1	I, II	(Fox and Bates, 2007); (Agrawal <i>et al.</i> , 2003)
Elacridar (GF120918)	ABCB1, ABCC1	I	(Kuppens <i>et al.</i> , 2007)
Sulindac	ABCC1	I	(O'Connor <i>et al.</i> , 2007)
S9788	ABCB1	I	(Tranchand <i>et al.</i> , 1998)

Tableau 7 : Essai clinique des inhibiteurs de 2^{ème} et 3^{ème} génération.
Adapté de (Lee, 2004).

Les études menées sur 4 composés sont développées ci-dessous.

Le Zosuquidar (Figure 36) est un inhibiteur spécifique d'ABCB1 (Lee *et al.*, 2004), parmi les plus efficaces avec un IC₅₀ de 59 nM et n'interagissant pas avec le cytochrome P450 3A (Dantzig *et al.*, 2001). Ce composé réduit la taille d'une tumeur chez des souris et augmentent leur taux de survie. Il a donc été testé en clinique, chez des patients atteints de

leucémie myéloïde aigüe, en combinaison avec de la daunorubicine et de la cytarabine. Cette étude est très prometteuse puisque 75% des patients ont réagi favorablement au traitement (Gerrard *et al.*, 2004). Il a également été démontré que ce composé ne modifie pas la pharmacocinétique de l'anticancéreux utilisé dans le traitement des lymphomes non-Hodgkinien (Morschhauser *et al.*, 2007). La phase III de cet essai clinique se poursuit actuellement.

Le CBT-1, un dérivé quinoléine de plante, n'a pas montré d'interaction pharmacocinétique avec la doxorubicine ou le paclitaxel lors de la phase I d'un essai clinique (Oldham *et al.*, 2000; Oldham *et al.*, 1998). Les essais cliniques se poursuivent donc en phase II.

Le tariquidar (Figure 37) est un dérivé anthranilamide dont les 1^{ères} études effectuées *in vivo* étaient très encourageantes. Il restaure la sensibilité aux agents anticancéreux chez des souris portant des xénogreffes de cellules humaines MDR résistantes (Mistry *et al.*, 2001). La phase I de l'essai clinique a été tout aussi prometteuse puisqu'elle a montré que le tariquidar ne modifie pas la pharmacocinétique du paclitaxel, de la doxorubicine ou de la vinorelbine quand ils sont administrés à des patients ayant une tumeur solide (Abraham J, 2001); (Ferry D, 2001). La phase I a également montré que ce composé ne présente pas d'effet indésirable aux doses utilisées (Stewart *et al.*, 2000). Malheureusement, les phases II et III ont montré la toxicité de l'anticancéreux chez un patient atteint du cancer du poumon « non à petites cellules » dans le groupe traité avec le tariquidar (Nobili *et al.*, 2006).

Contrairement à beaucoup d'inhibiteurs de 3^{ème} génération, le GF120918 (Figure 36) n'est pas spécifique à ABCB1 et inhibe aussi ABCG2 (Allen *et al.*, 1999). Il est cependant un élément prometteur de cette génération puisqu'il a été montré en phase I d'essai clinique, qu'il restaure la biodisponibilité orale du topotécan (Kuppens *et al.*, 2007). Il a cependant 2 inconvénients qui l'empêchent d'être utilisé en clinique : sa non-spécificité vis-à-vis d'ABCB1 et les conséquences inconnues de son utilisation *in vivo*.

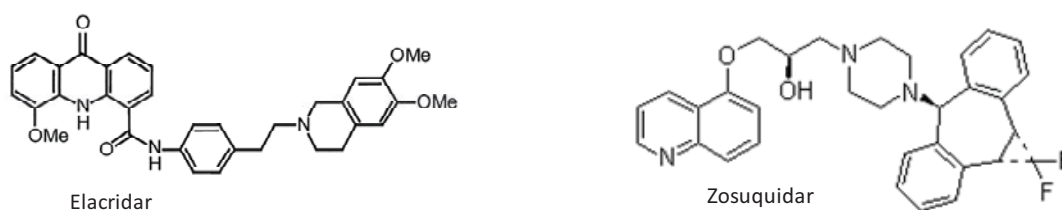
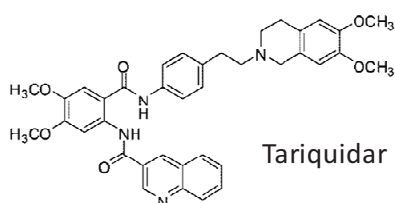


Figure 36 : Structure de 2 inhibiteurs de 3^{ème} génération : l'élacridar et le zosuquidar.
 L'élacridar est aussi connu sous le nom de GF120918 et le zosuquidar sous le nom de LY335979.

2.1.4. Inhibiteurs compétitifs ou non compétitifs

Le type d'inhibition de l'inhibiteur est un paramètre important à prendre en compte. L'inhibiteur peut être non compétitif ou compétitif vis-à-vis des substrats. Lorsqu'il est non compétitif, il se fixe sur un site différent du site de transport. En revanche, s'il est compétitif, il se fixe dans le site de transport de la protéine et, à terme, risque d'être transporté. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les transporteurs ABC sont des protéines polyspécifiques qui s'adaptent à un très grand nombre de molécules. Le risque associé au développement d'un inhibiteur compétitif est donc une perte potentielle d'efficacité de ce dernier à long terme. De plus, comme nous l'avons développé précédemment, un inhibiteur doit être spécifique du transporteur ciblé, dans le but de diminuer les effets indésirables du traitement. Etant donné que les transporteurs ABC ont des spectres de substrats qui se recouvrent partiellement, la probabilité qu'un inhibiteur compétitif pour un transporteur soit un substrat pour un autre est élevée. Ainsi, le développement d'inhibiteur non compétitif est plus approprié pour contrer le phénotype MDR.

L'étude du mécanisme d'inhibition des transporteurs n'est pas aisée et peu de données sont disponibles. La 1^{ère} caractérisation a eu lieu en 2000 par le groupe de Callaghan. Il montra que le tariquidar/XR9576 (Figure 37) se lie au même site de fixation que le Hoechst 33342 (Martin *et al.*, 2000b). Une étude plus poussée a été menée en 2008 par Müller et collaborateurs où ils ont étudié 28 composés dérivant du tariquidar. Tous les composés se révèlent alors non compétitifs avec la calcéine AM et compétitifs avec le Hoechst 33342. Ceci signifie donc que ces composés se fixent sur le site H et non pas sur le site R d'ABCB1 (Muller *et al.*, 2008). Ainsi des études commencent à déterminer le mécanisme d'inhibition et ceci devrait se poursuivre par la suite.



Tariquidar

Figure 37 : Structure du tariquidar (XR9576).

2.2. Les inhibiteurs d'ABCG2

Un certain nombre d'inhibiteurs d'ABCG2, énumérés dans le Tableau 8 ci-après, sont connus mais pour différentes raisons de concentration efficace trop élevée ou d'effets indésirables trop importants, peu sont en cours d'essais cliniques. Selon Ahmed-Belkacem et collaborateurs, au laboratoire, les inhibiteurs d'ABCG2 peuvent être classés en 4 catégories : inhibiteurs spécifiques, modulateurs inhibant également ABCB1 et ABCC1, flavonoïdes et dérivés, et divers autres inhibiteurs (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2006).

Flavonoïdes	Inhibiteurs des tyrosines kinase	Hormones stéroïdes	Inhibiteurs des protéases du VIH	Autres
•Genistein •Naringenin •Apigenin •Biochanine A •Chrysine •Kaempferol •Hesperetin •Silymarin •Quercetin •Daidzein	•CI-1033 •EKI-785 •Gefitinib •Imatinib •Nilotinib •Erlotinib	•Beclomethasone •6-α-methylprednisolone •Dexamethasone •Triamcinolone •17-β-estradiol	•Ritonavir •Saquinavir •Nelfinavir	•Resveratrol •VX-710 (biricodar) •Novobiocine •Tryprostatine A •Fumitrmorgine C •Ko143 •Cyclosporine A •Vanadate •Anticorps anti-BCRP humain

Tableau 8 : Principaux inhibiteurs connus d'ABCG2.
(Adapté de (Abbott, 2006)).

2.2.1. Les inhibiteurs spécifiques

La fumitrimorgine C (FTC) (Figure 38), une mycotoxine isolée du champignon *Aspergillus fumigatus Fresenius*, a tout d'abord été identifiée comme inhibant le transport de la mitoxantrone, la doxorubicine et du topotécan dans les cellules S1-M1-3.2 et MCF7/ABCG2 (Rabindran *et al.*, 1998). Cette équipe a par la suite montré que cet inhibiteur bloque directement ABCG2 (Rabindran *et al.*, 2000). Cependant, la FTC est neurotoxique provoquant des tremblements et des convulsions chez la souris ; elle n'a donc pas été testée en clinique.

Partant de ce constat, Allen et collaborateurs ont développé des analogues tétracycliques de la FTC, dont le Ko143 (Figure 38), non toxique. Cette molécule inhibe non seulement le transport des substrats mais également l'activité ATPasique de la protéine (Allen *et al.*, 2002b) et s'avère au moins aussi puissante que le GF120918. Les premiers tests *in vivo* sont prometteurs puisque ce composé n'est pas toxique aux doses inhibant ABCG2 soit 10-

50 mg/kg. De plus, le Ko143 a la capacité d'inhiber ABCG2 au niveau du tractus gastro-intestinal, ce qui contribue à augmenter la biodisponibilité du topotécan administré par voie orale. Ce composé devrait être prochainement soumis à des essais cliniques.

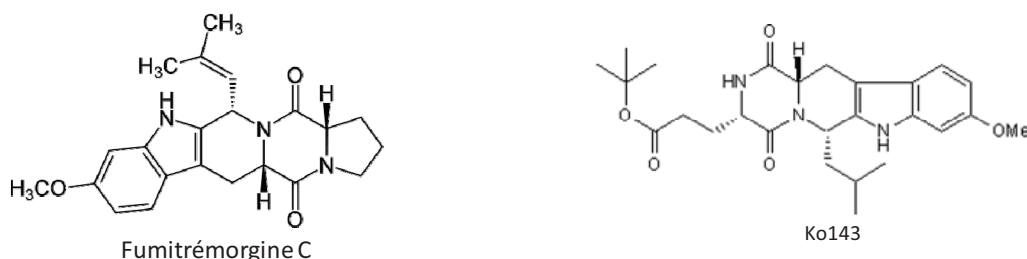


Figure 38 : Structure de 2 inhibiteurs spécifique d'ABCG2 : la fumitrémorgine C et le Ko143.

2.2.2. Les inhibiteurs non spécifiques

On retrouve dans cette catégorie des inhibiteurs initialement développés pour ABCB1, ou éventuellement ABCC1, qui montrent également une capacité à inhiber ABCG2. C'est par exemple le cas du GF120918 (de Bruin *et al.*, 1999) ou de la cyclosporine A (Qadir *et al.*, 2005).

Les agonistes ou antagonistes des œstrogènes sont également des inhibiteurs non spécifiques des transporteurs ABC. Dans cette classe de molécules, l'œstrone et le 17-β-œstradiol ont été les premiers à démontrer un effet chimiosensibilisant des cellules K562/BCRP au SN-38 et au topotécan (Imai *et al.*, 2002b). Certains sont actifs à faible concentration (comme les dérivés chimiques du tamoxifène), alors que d'autres ne sont actifs qu'à haute concentration (comme l'œstrone ou le 17-β-œstradiol). Par ailleurs, le diéthylstilbestrol se révèle être un inhibiteur plus efficace pour bloquer l'efflux de topotécan que le tamoxifène ou le toféranil. Cependant, en 2003, Sugimoto et collaborateurs ont synthétisé du TAG-139, un dérivé du tamoxifène qui s'est révélé être 5 fois plus efficace que l'œstrone avec une IC₅₀ de 2 μM (Sugimoto *et al.*, 2003).

Enfin, il est intéressant de noter que certains inhibiteurs, tels que les dérivés du taxane, ne sont actifs que sur la forme naturelle d'ABCG2^{R482} tandis que d'autres comme la cyclosporine A ne le sont que sur le mutant R482T (Ozvegy *et al.*, 2001).

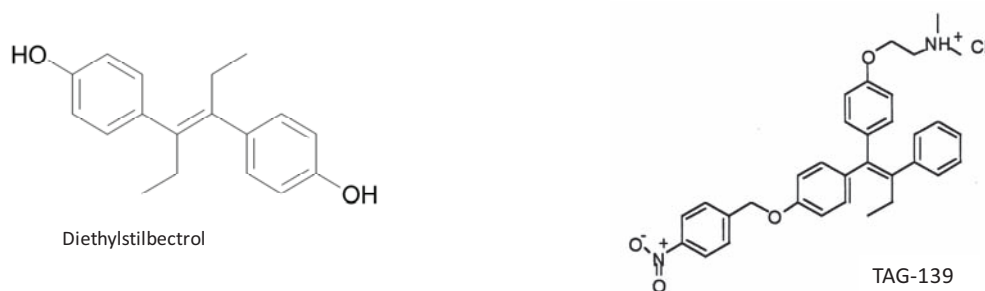


Figure 39 : Structure de 2 inhibiteurs non spécifiques d'ABCG2 : le diéthylstilbestrol et le TAG-139.

2.2.3. Les flavonoïdes et leurs dérivés

Ces composés sont aussi connus pour inhiber ABCB1 et ABCC1, avec cependant des relations structure-activité distinctes en fonction des transporteurs. La première interaction d'ABCG2 avec des classes variées de polyphénols de plantes a été rapportée en 2004, à des concentrations très élevées, de l'ordre de 30 μ M (Cooray *et al.*, 2004). Par la suite, Zhang et collaborateurs ont découvert la chrysine et la biochanine A, inhibiteurs efficaces d'ABCG2 qui réversent la résistance à la mitoxantrone des cellules MCF7/MX100 humaines (Zhang *et al.*, 2004).

Les flavones sont connues depuis 2004 pour leur capacité à inhiber l'efflux de mitoxantrone dans les cellules surexprimant ABCG2. En 2005, Ahmed-Belkacem et collaborateurs ont classé ces flavones et leurs dérivés par rapport à leur efficacité comme suit : flavones (apigénine) > flavonols (galangine) > isoflavones (génistéine) > flavonones (naringénine) (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005). Ils ont également identifié 2 dérivés de flavones, la 6-prénylchrysine et la tectochrysine (Figure 40), comme inhibiteurs spécifiques d'ABCG2 (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005). La 6-prénylchrysine a une efficacité comparable au GF120918, inhibiteur de référence (0,3 μ M). Contrairement à d'autres inhibiteurs, ces 2 composés inhibent ABCG2 ainsi que son mutant R482T. Enfin, ces molécules sont relativement peu cytotoxiques et sont donc des candidats potentiels pour des essais *in vivo*.



Figure 40 : Structure de 2 flavonoïdes inhibiteurs d'ABCG2, la 6 prénylchrysine et la tectochrysine.

2.2.4. Autres types d'inhibiteurs

On trouve ici des inhibiteurs des tyrosines kinases ou des protéases du VIH (Ozvegy *et al.*, 2002).

Les inhibiteurs de tyrosine kinase ont été décrits comme interagissant avec ABCB1, ABCC1 et ABCG2 (Hegedus *et al.*, 2002 ; Shukla *et al.*, 2008). Plusieurs de ces inhibiteurs sont en fait des substrats d'ABCG2 et bloquent le transport d'autres drogues par compétition avec elles. Concernant certains inhibiteurs des tyrosines kinases, il existe de nombreuses controverses sur leur fonctionnement : l'imatinib (Figure 41) est, par exemple, considéré par certains comme un substrat d'ABCG2 (Brendel *et al.*, 2007; Burger *et al.*, 2004 ; Nakanishi *et al.*, 2006) alors que d'autres le considèrent comme un inhibiteur à part entière (Houghton *et al.*, 2004 ; Jordanides *et al.*, 2006). En 2004, Houghton et collaborateurs ont montré que cette molécule reverse la résistance aux camptothécines avec un IC_{50} de 0,17 μ M (Houghton *et al.*, 2004). Il semble maintenant que cet effet soit dépendant des concentrations d'imatinib utilisées : ainsi il n'est transporté efficacement qu'à faible concentration ($< 1 \mu$ M) du fait de sa très bonne affinité pour le transporteur qui devient alors saturé pour de plus fortes concentrations (Shukla *et al.*, 2008) confirmant ainsi son rôle d'inhibiteur comme compétiteur des substrats.

La même controverse concerne le géfitinib (Figure 41), un inhibiteur du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR). Certains le considèrent comme substrat (Elkind *et al.*, 2005) et d'autres comme inhibiteur d'ABCG2 (Nakamura *et al.*, 2005). Il a une IC_{50} submicromolaire et accroît la survie des souris greffées avec des cellules humaines immortalisées (xénogreffes) (Yanase *et al.*, 2004). Il augmente également chez les souris la biodisponibilité de l'irinotécan et de son métabolite actif, le SN-38 (Stewart *et al.*, 2004).

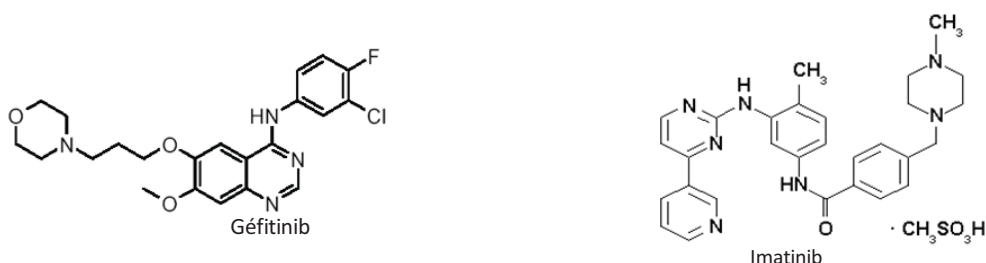


Figure 41 : Structure de 2 inhibiteurs des tyrosine kinases également inhibiteurs d'ABCG2, le géfitinib et l'imatinib.

Les inhibiteurs des protéases du VIH peuvent être des substrats d'ABCB1 et ABCC1 mais pas d'ABCG2. Au contraire, 3 d'entre eux, le ritonavir, le saquinavir (Figure 42) et le nelfinavir, inhibent le transport de la mitoxantrone par ABCG2 avec des IC_{50} de 12 à 20 μM (Gupta *et al.*, 2004). L'étude de ces composés sur l'inhibition d'ABCG2 doit se poursuivre *in vivo*.

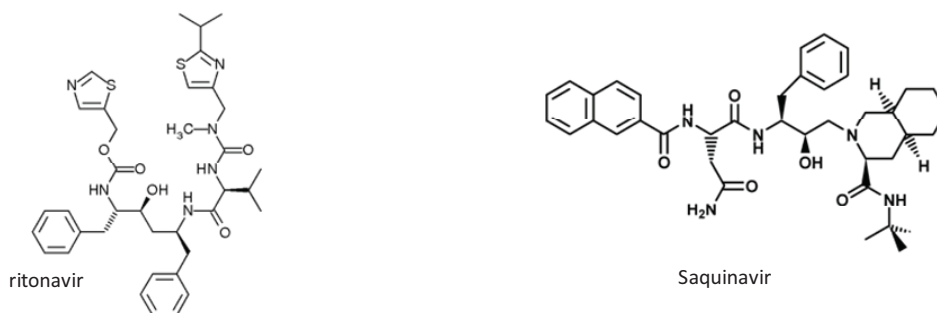
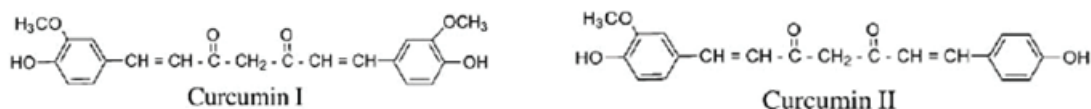


Figure 42 : Structure de 2 inhibiteurs des protéases du VIH également inhibiteurs d'ABCG2 : le ritonavir et le saquinavir.

2.3. Le cas particulier du curcumin

Actuellement, plusieurs équipes travaillent au développement d'inhibiteurs d'origine naturelle extraits de plantes ou de champignons, avec pour objectif d'obtenir des composés moins toxiques que les dérivés synthétiques. Le 2^{ème} avantage des composés naturels est leur relative abondance et leur facilité d'obtention. Cela dépend toutefois de la disponibilité du composé extrait et de son origine (plantes ou champignons abondants ou rares).

Le curcumin est un très bon exemple de cette nouvelle stratégie. Il a été identifié en 2006 comme un puissant inhibiteur d'ABCB1 (Chearwae *et al.*, 2004), ABCG2 et ABCC1 (Chearwae *et al.*, 2006). Le curcumin est un mélange de curcuminoïdes extrait sous forme de poudre, à partir de *Curcuma longa*, plante herbacée rhizomateuse originaire du sud-est de l'Asie. Le curcumin contient 3 curcuminoïdes majeurs : le curcumin (curcumin I), le déméthoxycurcumin (curcumin II) et le bisdéméthoxycurcumin (curcumin III) (Chearwae *et al.*, 2006) (Figure 43).



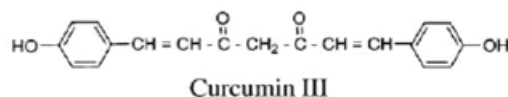


Figure 43 : Structure des curcuminoïdes.

Le curcumin I est le plus puissant des curcuminoïdes pour inhiber les transporteurs ABC.
(Chearwae *et al.*, 2004).

La forme la plus efficace pour inhiber les transporteurs ABC est le curcumin I. Cependant, cette forme a une faible biodisponibilité et est très rapidement métabolisée en dihydrocurcumin et tétrahydrocurcumin par une endogène réductase. Récemment, Li et collaborateurs ont montré l'avantage de l'encapsulation liposomale du curcumin (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005). Cette stratégie est détaillée dans le paragraphe 4 (*Formulation des anticancéreux ou des inhibiteurs*).

Il est important de noter que ces composés ont une très faible toxicité, comparable aux inhibiteurs de 3^{ème} génération. De plus, le curcumin est connu de longue date comme étant un agent anticancéreux prévenant l'initiation et la progression du cancer.

Le curcumin est donc prometteur pour être utilisé en clinique dans le traitement du cancer en tant qu'inhibiteur des transporteurs ABC, bien qu'il soit fortement métabolisé.

2.4. Les échecs des essais cliniques

Beaucoup d'efforts ont été déployés pour développer ces inhibiteurs et malgré cela, peu ont passé la phase d'essai clinique.

Diverses causes relatives à l'inhibiteur peuvent conduire à ces échecs (Szakacs *et al.*, 2006) :

- Les propriétés pharmacologiques de l'inhibiteur :
 - faible affinité pour le transporteur et donc inhibition peu efficace,
 - faible spécificité pour un transporteur,
 - faible biodisponibilité dans la tumeur.
- La toxicité de l'inhibiteur :
 - toxicité due à l'inhibiteur lui-même,
 - toxicité secondaire entraînée par l'inhibition de la fonction physiologique du transporteur ABC.
- Interaction pharmacocinétique avec les anticancéreux :

- modification de la clairance de l'anticancéreux augmentant sa concentration plasmatique jusqu'à dépasser la dose non toxique pour les cellules saines (Relling, 1996),
- modification de la métabolisation de la drogue cytotoxique (Benet *et al.*, 2004),
- interaction de l'inhibiteur avec des transporteurs ABC modifiant l'élimination de l'agent anticancéreux (tel que ABCB4 ou ABCB11) (Bohme *et al.*, 1993).

L'échec des essais cliniques peut également être imputé au transporteur ABC lui-même. Il a été démontré que la présence de « single-nucleotide polymorphism (SNP) » synonyme ou non synonyme, affectait la fixation du substrat ou de l'inhibiteur sur le transporteur (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). Ceci entraîne donc des modifications de la réponse aux drogues telles que les inhibiteurs. Il faudrait donc envisager de prendre en compte ces SNPs dans les essais cliniques.

Ensuite, les essais cliniques mis en place ne sont pas toujours optimisés. Les patients inclus dans un essai clinique sont le plus fréquemment des patients en rechute. La cause de la rechute n'est pas connue et l'expression d'un transporteur ABC dans la tumeur n'est pas vérifiée. Il est évident que les cellules cancéreuses résistantes se sont adaptées au traitement, et ont développé différents mécanismes de résistance, pouvant être différents de la surexpression des transporteurs ABC MDR. De ce fait, certains essais cliniques sont biaisés (Robert and Jarry, 2003). L'idéal serait de réaliser ces essais cliniques sur des patients pour lesquels la cause de la résistance est identifiée et dont on connaît le ou les transporteur(s) ABC impliqué(s).

Enfin, le phénomène de multirésistance aux drogues est plus complexe que les modèles *in vitro* et *in vivo* de souris xénogreffées qui sont développés. Le taux d'expression des transporteurs ABC varie d'un patient à un autre. Il faudrait donc adapter les doses d'inhibiteurs pour éviter les effets indésirables tout en restant efficace. De plus, les patients peuvent co-exprimer plusieurs transporteurs ABC ; donc l'inhibition d'un seul transporteur n'empêchera pas complètement la résistance aux agents anticancéreux administrés.

En résumé, pour pouvoir contrer ce phénotype MDR, il faut connaître le cancer que l'on veut traiter, et les mécanismes de résistance mis en place par les cellules cancéreuses. L'expression d'un transporteur ABC dans une tumeur doit être vérifiée précocement afin

d'administrer une bi-thérapie agents anticancéreux / inhibiteurs dès le début du traitement. Ceci éviterait la sélection des cellules résistantes, difficiles à éradiquer par la suite.

Bien que les essais cliniques aient jusqu'à présent conduit à des échecs, les inhibiteurs développés aujourd'hui sont plus prometteurs que les précédents. Ils sont efficaces à faibles doses, spécifiques, moins toxiques et ne modifient pas la pharmacocinétique de l'agent anticancéreux co-administré. Les résultats des essais cliniques en cours seront déterminants pour le développement de ces inhibiteurs. En effet, il semble qu'à l'heure actuelle ces échecs répétés aient conduit diverses équipes à remettre en cause cette stratégie, et chercher à développer de nouvelles approches thérapeutiques.

3. Combinaison d'inhibiteurs

L'utilisation d'inhibiteurs est la méthode la plus directe pour contrer le phénotype MDR. Cependant, leur utilisation en clinique est fréquemment compromise à cause de leur toxicité. Il a été proposé de combiner plusieurs modulateurs afin de bloquer ces transporteurs ABC tout en diminuant les doses d'inhibiteurs et donc en diminuant leur toxicité (Robert, 1994). Cette stratégie a été utilisée avec succès pour l'inhibition de la réplication du VIH. Afin d'optimiser la combinaison d'inhibiteurs, l'effet des modulateurs doit être synergique plutôt qu'additif. Pour cela, les inhibiteurs doivent agir de manière complémentaire et/ou se fixer sur des sites différents du transporteur. En 1997, DiDiodato et Sharom ont étudié l'effet de plusieurs combinaisons d'inhibiteurs sur l'accumulation de colchicine dans des cellules CH^RC5 résistantes, en identifiant une combinaison particulièrement intéressante mixant la cyclosporine A et le vérapamil. L'effet observé est synergique et les doses nécessaires trop faibles pour entraîner une toxicité (DiDiodato and Sharom, 1997).

Un autre exemple de combinaison de modulateurs a été présenté par Watanabé et collaborateurs en 1997, qui ont combiné un modulateur, le PSC-833 avec un anticorps spécifique d'ABCB1 bloquant son activité, le MRK-16. Le mélange ternaire entre MRK-16, PSC-833 et l'anticancéreux adriamycine a prouvé son efficacité non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo* où il a entraîné une régression tumorale complète chez des souris athymiques xénogreffées avec des cellules HCT-15/ADM2-2 (Watanabe *et al.*, 1997).

4. Formulation des anticancéreux ou des inhibiteurs

Depuis le début des années 1990, une approche thérapeutique visant à augmenter l'influx des drogues dans les cellules cancéreuses a été évaluée. L'hypothèse de départ est que cette augmentation permet de maintenir une concentration intracellulaire efficace malgré l'efflux par les transporteurs ABC.

Pour cela, la 1^{ère} stratégie a été de modifier directement la drogue pour la rendre plus lipophile et donc augmenter sa pénétration intracellulaire. Des analogues d'anthracyclines hautement lipophiles, tels que l'annamycine ou l'idarubicine, ont été testés dans le cas de leucémie myéloïde aigüe. Il a alors été montré des taux de rémission élevés, même chez les patients surexprimant ABCB1 (Byrne *et al.*, 1999; Lampidis *et al.*, 1997).

La 2^{ème} stratégie a été de formuler les drogues anticancéreuses de manière à augmenter leur pénétration intracellulaire. Il a été montré, en 1992 par Lee et collaborateurs que certaines cellules cancéreuses internalisaient les liposomes anioniques. Les drogues cytotoxiques ont alors été délivrées directement dans les compartiments intracellulaires augmentant ainsi leur influx (Lee *et al.*, 1992). Une autre étude, en 1997, a montré l'intérêt de l'utilisation de liposomes de doxorubicine dans le traitement de tumeurs solides (Krishna and Mayer, 1997). Les drogues cytotoxiques peuvent également être encapsulées dans des liposomes de nanoparticules, dont l'efficacité a été montrée en 2007 avec l'utilisation de la bithérapie paclitaxel-céramide (van Vlerken *et al.*, 2007). Enfin, une étude menée en 2004 apporte beaucoup d'espoir : la stratégie de Gao et collaborateurs a été d'utiliser des drogues encapsulées dans des micelles de polymères qui ne seront délivrées qu'après traitement aux ultrasons. En n'irradiant que la tumeur et donc en ne délivrant la drogue que dans ce tissu, la concentration d'anticancéreux administrée peut être augmentée sans avoir d'effets indésirables trop importants (Gao *et al.*, 2004).

De la même façon, on peut imaginer formuler les inhibiteurs efficaces, non toxiques mais faiblement distribués au niveau du site tumoral. Ceci permettrait d'améliorer leur biodisponibilité et donc leur effet thérapeutique. Dans cette optique, 2 études ont montré en 2005 et 2007 que l'encapsulation lyposomale du curcumin augmente la biodisponibilité du composé (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005) en diminuant sa métabolisation. On pourrait donc envisager de pouvoir utiliser cette stratégie pour augmenter l'efficacité de certains inhibiteurs.

5. Les peptides spécifiques et les anticorps

Afin d'inhiber les transporteurs ABC, l'utilisation de peptides ou d'anticorps a été envisagée pour bloquer les changements de conformation de la protéine nécessaires à l'export des drogues.

Une étude menée par Sharom et collaborateurs en 1999 a prouvé l'efficacité de différents peptides formés de 2 acides aminés : l'aspartate et la lysine (Sharom *et al.*, 1999). La même année, Tarasova et son équipe montrent que des peptides analogues des TMD d'ABCB1 sont des inhibiteurs spécifiques et efficaces pour bloquer ce transporteur (Tarasova *et al.*, 2005). En partant de ces résultats, nous pourrions donc envisager l'utilisation de peptides analogues d'une partie du transporteur afin de le bloquer spécifiquement.

L'approche utilisant un anticorps bloquant ABCB1 a été rapportée pour la 1^{ère} fois par Meyer et collaborateurs en 1989. Ils ont observés que les anticorps HYB-612 et HYB-214 augmentent *in vitro* la concentration intracellulaire de vincristine et d'actinomycine D dans des cellules de neuroépithéliome humain (Meyers *et al.*, 1989). La 1^{ère} étude *in vivo* a été menée par Tsuruo et collaborateurs en 1989. Dans ce cas, c'est un anticorps monoclonal spécifique, MRK16, qui est dirigé contre un épitope externe d'ABCB1 humain et qui bloque l'efflux de drogues cytotoxiques *in vitro* et *in vivo* (Iwahashi *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1991 ; Tsuruo *et al.*, 1989).

Cette stratégie prometteuse pose cependant des questions encore non résolues : quelle est l'immunogénicité de ces molécules ? Compte tenu du rôle physiologique important d'ABCB1, quels sont les effets indésirables de tels anticorps ou peptides ?

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'essais réalisés avec des anticorps ciblant ABCC1 ou ABCG2.

6. Inhibition de l'expression des transporteurs ABC

Au début des années 1990, une nouvelle stratégie a été proposée pour contrer le phénotype MDR : inhiber l'expression des transporteurs ABC en inhibant la transcription de l'ADN ou la traduction de l'ARNm. Cependant, contrairement à l'inhibition des transporteurs ABC par des modulateurs, peu d'études concernant la régulation de l'expression de ces transporteurs ont été réalisées.

6.1. Inhibition de la transcription des transporteurs ABC

Comme nous l'avons vu précédemment, les transporteurs ABC possèdent une séquence MED-1 dans leur promoteur. Différentes études montrent que l'on peut réguler l'expression des transporteurs ABC par plusieurs approches, en utilisant :

- des oligonucléotides antisens de phosphorotioate ciblant la séquence de MED-1 (Marthinet *et al.*, 2000),
- le gène LANCL2 supprimant l'activité du promoteur d'ABCB1 (Park and James, 2003),
- K2-5F : une construction contenant des domaines de fixation à l'ADN reconnaissant le promoteur d'ABCB1 (Xu *et al.*, 2002),
- des antagonistes des récepteurs nucléaires aux stéroïdes ou aux xénobiotiques (Synold *et al.*, 2001),
- des inhibiteurs de protéines kinase A (Scala *et al.*, 1995),
- des inhibiteurs de protéine kinase C (Chaudhary and Roninson, 1992),
- des inhibiteurs directs du promoteur d'ABCB1 tel que Et743 (Jin *et al.*, 2000).

Ces différentes voies d'inhibition des transporteurs ABC pourraient être une stratégie possible pour contrer le phénotype MDR. Elle n'a cependant pas encore été testée *in vivo* (Lee), et beaucoup de questions restent à résoudre et notamment celle de la spécificité d'inhibition du gène ciblé.

6.2. Inhibition de la traduction des transporteurs ABC

6.2.1. Oligonucléotides antisens ciblant l'ARNm

Les oligonucléotides antisens (AON) sont la 1^{ère} stratégie développée pour induire la dégradation de l'ARNm des transporteurs ABC (Lee, 2004). Ils se fixent sur l'ARNm dont la séquence est complémentaire, forment un duplex avec l'ARNm et empêchent ainsi sa traduction. Leur activité passe par la RNase-H qui dégrade leur ARNm complémentaire.

Cette approche a ainsi permis d'inhiber non seulement la résistance due à ABCB1 dans les cellules leucémiques (Nadali *et al.*, 2007), mais également la résistance due à ABCC1 et ABCG2 (Kawabata *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 1996). De nombreuses modifications ont été faites pour améliorer ces AON qui, depuis, fonctionnent indépendamment des RNases-H. Une

étude récente menée à la fois *in vitro* et *in vivo* a montré qu'ils augmentaient la concentration intracellulaire de doxorubicine dans des cellules de carcinomes humains (Ren *et al.*, 2008) démontrant ainsi la possibilité de leur utilisation en clinique.

Aucune étude clinique n'est pour l'instant prévue à cause de leur spécificité qui doit être excellente mais également à cause de leur faible biodisponibilité pour les cellules. Ceci pourrait être amélioré par l'utilisation de vecteurs (Shukla *et al.*, 2008). Il faut cependant noter que l'efficacité de ces AON a été démontrée lors d'essais cliniques menés pour inhiber l'expression de Bcl-2 (Tafech *et al.*, 2006).

6.2.2. « Hammerhead ribozymes »

Les ribozymes sont de petites molécules d'ARN qui s'hybrident à une séquence particulière et possèdent la capacité de catalyser une réaction chimique à cette position. Il existe des ribozymes qui ciblent spécifiquement ABCB1 (Kobayashi *et al.*, 1994), ABCC2 (Materna *et al.*, 2005) et ABCG2 (Kowalski *et al.*, 2002). De plus, un multiribozyme multicibles combinant les ribozymes dirigés contre les 3 transporteurs est capable de diminuer leur expression et de reverser le phénotype MDR induit par leur expression (Kowalski *et al.*, 2005).

Il n'existe actuellement aucune étude clinique pour valider cette stratégie. Cependant, son efficacité a été montrée dans l'inhibition de l'expression de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) (Tafech *et al.*, 2006).

6.2.3. Les siRNA

Les siRNA sont de petits ARN, complémentaires de leur ARNm cibles. Ils possèdent une structure en double brin et entraînent la dégradation de leur ARNm cible par le biais des protéines RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Ces protéines se fixent sur le brin complémentaire du siRNA, le brin sens est abandonné, le complexe RISC-siRNA reconnaît l'ARNm correspondant et le dégrade.

L'expression des transporteurs ABC pourrait donc être inhibée par cette méthode. Il existe des siRNA ciblant ABCB1 (Duan *et al.*, 2004 ; Stierle *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008), ABCC2 (Tian *et al.*, 2004) et ABCG2 (Ee *et al.*, 2004) et la réversion du phénotype MDR par cette technique a été démontrée *in vivo* (Pichler *et al.*, 2005).

Comparés aux AON, ils peuvent être administrés à faible concentration, ce qui leur confère un avantage important. Cependant, leur demi-vie est de 4 heures, ce qui est relativement faible par rapport à la demi-vie des protéines (16 heures). La transcription peut alors être augmentée et les protéines retrouvent leur taux d'origine 7 jours après l'administration du siRNA (Wu *et al.*, 2008). Le 2^{ème} inconvénient de cette stratégie est la difficulté de délivrer ces siRNA aux cellules cancéreuses sans pour autant inhiber les transporteurs ABC présent naturellement dans les autres cellules de l'organisme.

6.2.4. Les "short hairpin RNA" (shRNA)

Les « short hairpin RNA » permettent d'améliorer ces siRNA. Ils ont le même mécanisme d'action que les siRNA, par recrutement du complexe RISC. Ils sont cependant introduits dans la cellule par un vecteur, qui peut être d'origine virale tel que les adénovirus (Kaszubiak *et al.*, 2007), bactérienne tel que *Salmonella typhimurium* (Jiang *et al.*, 2007) ou d'origine synthétique tel que les « transposon-based vector » (Rumpold *et al.*, 2005).

Il existe des shRNA ciblant ABCB1 (Steger *et al.*, 2004), ABCC2 (Materna *et al.*, 2006) et ABCG2 (Pribsch *et al.*, 2006). Les « transposon-based vector » ont prouvé leur efficacité à inhiber ABCB1 dans des cellules de leucémies myéloïdes chroniques augmentant ainsi la concentration intracellulaire d'imatinib (Widmer *et al.*, 2007). De même une étude récente menée par Stein et collaborateurs s'est avérée très encourageante. Ils ont complètement réversé le phénotype MDR chez des souris xénogreffées avec des cellules cancéreuses humaines surexprimant ABCB1. Deux jours après l'injection de shRNA, le taux d'ARNm d'ABCB1 avait diminué de 90% et la protéine n'était plus détectée dans les tumeurs. Deux injections de shRNA combinées à 2 injections de doxorubicine était suffisantes pour resensibiliser les cellules à la doxorubicine.

Il apparait donc possible de réverser cette multirésistance par le biais des shRNA.

7. Mort sélective des cellules multirésistantes

Plusieurs études ont montré qu'une stratégie pourrait être de cibler les cellules multirésistantes et d'induire leur apoptose. Cette stratégie a été particulièrement étudiée pour sur les cellules surexprimant ABCB1 et ABCC1. Le vérapamil est le 1^{er} composé à avoir montré une toxicité collatérale sur les cellules CHO de hamster surexprimant ABCB1 (Cano-Gauci and Riordan, 1987). Depuis, certaines équipes de recherche ont travaillé sur cette

stratégie et de nombreux composés ont montré une hypertoxicité vis-à-vis des cellules surexprimant un transporteur ABC (Tableau 9).

Composé	Classe du composé	Lignées cellulaires	Transporteur surexprimé	référence
Vérapamil / Nifédipine / Calmoduline / Trifluoperazine	Bloqueur des canaux calciques	CHO MDR	ABCB1	(Cano-Gauci and Riordan, 1987); (Warr <i>et al.</i> , 1988); (Karwatsky <i>et al.</i> , 2003)
Vérapamil (S)	Bloqueur des canaux calciques	BHK-21	ABCC1	(Perrotton <i>et al.</i> , 2007) ; (Trompier <i>et al.</i> , 2004)
Bisdioxopiperazine dextrazoxane / ICRF-187	Inhibiteurs de la topoisomérase II	K/VP5	ABCB1	(Fattman <i>et al.</i> , 1996)
Tunicamycine	Inhibiteur de la N-glycosylation	KB-C-1	ABCB1	(Bentley <i>et al.</i> , 1997)
Gemcitabine	Analogue de la deoxycytidine	H69/DAU ; NYH/VM	ABCB1	(Bergman <i>et al.</i> , 2001)
Gemcitabine	Analogue de la deoxycytidine	2R120 ; 2R160 ; SW1573/S1 ; GLC4/ADR ; 2780AD ; KB-8-5 ; BROmdr	ABCB1 ; ABCC1	(Bergman <i>et al.</i> , 2003)
Cytosine arabinosine	Analogue de la deoxycytidine	H69/DAU ; NYH/VM	ABCB1	(Bergman <i>et al.</i> , 2001)
5-fluorouracile	Inhibiteur de la thymidilate synthétase	KB-C-1 ; KB-V-1 ; KB-A-1	ABCB1	(Warr <i>et al.</i> , 2002)
LY294002	Inhibiteur de la PI3 kinase	KB-V-1	ABCB1	(Nicholson <i>et al.</i> , 2003)
NSC73306	Thiosemicarbazone	KB-V-1 ; KB-8-5 ; KB-8-5-11 ; NCI/ADR-RES	ABCB1	(Ludwig <i>et al.</i> , 2006)
KP772/FFC24	Composé lanthanum	GLC4/ADR ; HCL/ADR ; KB-C-1 ; MCF7-BCRP	ABCB1 ; ABCC1 ; ABCG2	(Heffeter <i>et al.</i> , 2007)
Celecoxib	Inhibiteur de la cox-2	HT-29-dx ; PNIA-NIH3T3	ABCB1	(Fantappie <i>et al.</i> , 2007)
NBDHEX	Inhibiteur de la S-glutathion transférase			(Turella <i>et al.</i> , 2006)

Tableau 9 : Exemples de composés induisant l'apoptose chez les cellules exprimant un transporteur ABC.

Ce tableau présente les composés découverts comme ciblant spécifiquement les cellules surexprimant un transporteur ABC. On trouve le nom du composé, sa classe, la lignée cellulaire testée et le transporteur surexprimé par ces lignées.

L'hypersensibilité de certains composés a été caractérisée. On sait que le vérapamil induit un efflux de GSH par MRP1 augmentant ainsi la production d'espèces réactives à l'oxygène conduisant à la mort cellulaire. Un autre exemple est celui du LY294002 qui inhibe la PI3-

kinase et modifie les cascades de réactions intracellulaires induisant ainsi l'apoptose. Mais beaucoup de mécanismes restent inconnus. Il est très probable que cette apoptose induite passe par plusieurs voies qui diffèrent d'un composé à un autre.

Cette stratégie est très intéressante. On peut en effet imaginer qu'en combinant un de ces composés avec une chimiothérapie classique, on puisse traiter des cancers qui à l'heure actuelle sont incurables.

MATERIELS ET METHODES

I. Etablissement d'une nouvelle lignée cellulaire, Flp-InTM-293 ABCG2 et étude fonctionnelle d'ABCG2

Le système Flp-InTM-293 est un modèle d'étude *in vitro* qui présente plusieurs avantages. Premièrement, ce sont des cellules humaines embryonnaires de rein HEK-293 (Human embryonic Kidney 293). Elles permettent donc l'étude d'ABCG2, protéine humaine dans des cellules d'origine humaine.

Deuxièmement, ce système permet un gain de temps considérable : les clones cellulaires étant tous identiques, une sélection monoclonale n'est pas nécessaire.

Enfin, leur principal avantage, comparé aux cellules HEK-293 est qu'elles possèdent un site d'intégration unique dans leur génome, le site FRT (Flp Recombination Target). Ce système permet l'intégration du gène d'intérêt dans des cellules de mammifères à une localisation précise et unique de leur génome. Ainsi, les cellules transfectées avec le même plasmide seront identiques. Elles produiront un seul type d'ARNm d'ABCG2 qui ne sera pas soumis à des variations selon le lieu d'insertion dans le génome. L'étude de la protéine sera plus précise : les différences observées entre la protéine sauvage et les mutants seront dues exclusivement à la mutation.

Les cellules Flp-InTM-293 proviennent d'Invitrogen. Elles sont présentées en Figure 44 et sont sélectionnées par 100 µg/ml de Zéocine (Invitrogen).

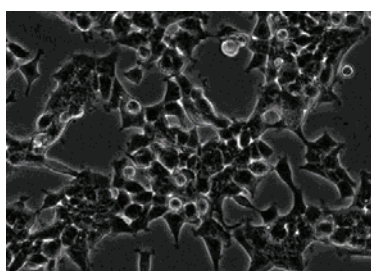


Figure 44 : photo de la lignée cellulaire Flp-InTM-293.

La photo a été prise au microscope optique au contraste de phase, grossissement $\times 20$.

1. Clonage d'ABCG2 dans le vecteur pcDNA5/FRT

Le gène d'ABCG2 possédant une étiquette 6 histidines du côté N-terminal est sous-cloné du plasmide pFastBacDual-H6-ABCG2-NinaA (Trometer and Falson) au plasmide pcDNA5/FRT. Pour cela, une 1^{ère} étape de PCR est réalisée afin d'ajouter un site de clivage par *Bam*HI en amont du gène de H6-ABCG2. La séquence amplifiée et le plasmide pcDNA5/FRT sont alors digérés par *Bam*HI et *Xho*I et une ligature permettra ensuite de générer le plasmide pcDNA5/FRT-H6-ABCG2.

1.1. Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés pour le sous-clonage sont :

- pFastBacDual-H6-ABCG2-NinaA établi au laboratoire (Trometer and Falson) (Figure 45A),
- pcDNA5/FRT (Invitrogen) : vecteur possédant le site d'insertion FRT (Figure 45B).

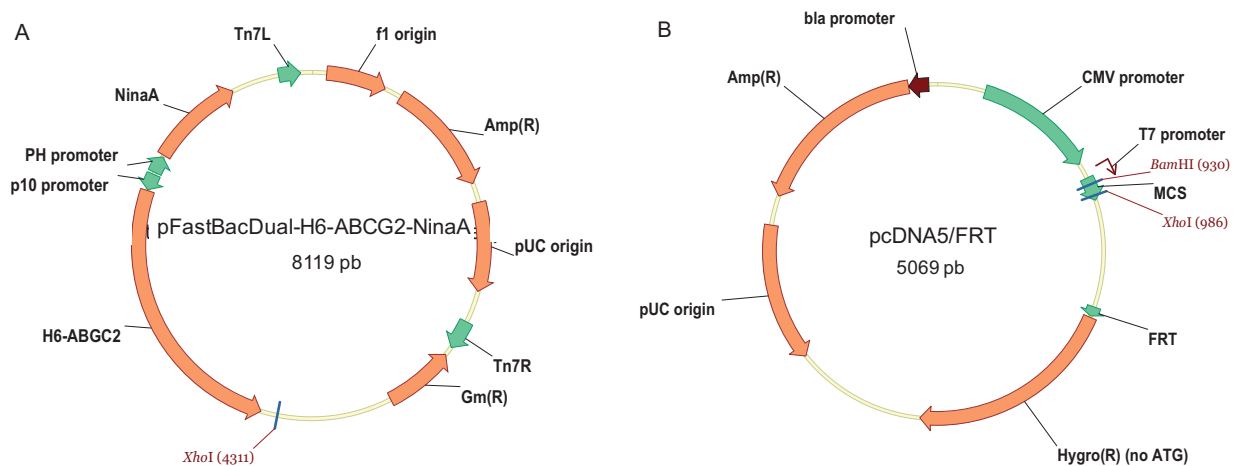


Figure 45 : Plasmides utilisés pour le clonage et l'expression d'ABCG2 dans le système Flp-In™-293.

A : pFastBacDual-H6-ABCG2-NinaA. Il contient (i) le gène d'*abcg2* possédant une étiquette 6 histidines du côté N-terminal, (ii) le gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des bactéries transformées avec le plasmide, (iii) 1 site de restriction par *XhoI* en aval d'*abcg2*.

B : pcDNA5/FRT permettant l'expression d'ABCG2 en cellules Flp-In™-293. Il contient (i) un site de clonage T7 contenant les 2 sites de restrictions *BamHI* et *XhoI*, (ii) un site FRT permettant l'intégration du plasmide dans le génome des cellules Flp-In™-293 au site FRT, (iii) un gène de résistance à l'hygromycine B sélectionnant ainsi les cellules ayant intégré le plasmide, (iv) un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des bactéries transformées par le plasmide, (v) le promoteur du cytomégalovirus (pCMV) qui permet la surexpression de la protéine d'intérêt.

1.2. Préparation du plasmide pcDNA5/FRT-H6-ABCG2

1.2.1. Polymerase Chain Reaction

Principe : la « Polymerase Chain Reaction » ou PCR permet d'amplifier un ADN spécifique à partir d'un échantillon peu abondant. Pour cela, 3 phases sont réalisées successivement et répétées plusieurs fois : une phase de désappariement des 2 brins d'ADN, une phase d'appariement des brins monocaténaire avec des amorces et une phase de synthèse des nouveaux brins d'ADN. La réaction nécessite donc 2 amorces oligonucléotidiques qui s'apparient spécifiquement à la séquence à amplifier et qui la définissent en la bornant en 5' et 3'. Le fait d'utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices des cycles suivants permet à l'amplification d'être géométrique.

Protocole : dans le milieu réactionnel de la PCR se trouvent :

- 5 µl de tampon 10× de la polymérase utilisée (Invitrogen)
- 1 ng de matrice
- 1 µM d'oligonucléotide 5' (Sigma-Aldrich)
- 1 µM d'oligonucléotide 3' (Sigma-Aldrich)
- 0,2 µM d'ATP, TTP, GTP et CTP (Promega)
- 1 U de Taq DNA polymerase High Fidelity Accuprime™ d'Invitrogen
- H₂O qsp 50 µl

Après homogénéisation, la réaction de PCR se fait de manière automatique dans un appareil à PCR « DNA thermal cycle » (MWG-BIOTECH). Les cycles de PCR suivent le schéma suivant :

1^{er} cycle : - dénaturation des brins d'ADN : 94°C, 2 min
- hybridation des amorces : 50°C, 30 s
- amplification : 68°C, 3 min

25 cycles : - dénaturation des brins d'ADN : 94°C, 30 s
- hybridation des amorces : 50°C, 30 s
- amplification : 68°C, 4 min

Dernier cycle : - dénaturation des brins d'ADN : 94°C, 30 s
- hybridation des amorces : 50°C, 30 s
- amplification : 68°C, 15 min

Les produits de PCR peuvent être gardés à 4°C.

Les amorces utilisées sont :

- oligonucléotide 5' : 5' **CGGTGCTGGAGGATCCGAATTATTATCAAATCATTTGTATA** 3'

Avec **GGATCC** : site de clivage de *Bam*HI

CGGTGCTGGA : 10 bases en amont du site de clivage facilitant l'action de l'enzyme de restriction

GAATTATTATCAAATCATTTGTATA : séquence complémentaire s'hybridant avec l'ADN

- oligonucléotide 3' : 3' **GGCTAACTGAAACACGGAAG** 5'

correspondant à la séquence complémentaire s'hybridant avec l'ADN en amont du site de clivage par *Xho*I.

1.2.2. Purification des produits de PCR ou des produits de digestion

L'ADN amplifié est séparé, à l'aide de silice, des amorces et des réactifs avec le kit Nucleospin Extract de Macherey-Nagel.

1.2.3. Restriction des ADN

Chacune des enzymes de restriction utilisée (Promega) est commercialisée avec un tampon qui lui confère une activité optimale. Les tampons des activités des 2 enzymes *Bam*H1 et *Xho*I n'étant pas compatible, la digestion de l'ADN est réalisée en 3 étapes :

1^{ère} étape : digestion des produits de PCR purifiés et du plasmide pcDNA5/FRT par *Bam*H1. Le milieu réactionnel est :

- 30 µl d'ADN amplifié, purifié (environ 1 µg) ou 2 µg de plasmide
- 5 µl de tampon E 10×
- 10 U de *Bam*H1
- H₂O, qsp 50 µl

La réaction est réalisée 2 h à 37°C sous agitation lente.

2^{ème} étape : purification des produits de digestion par le kit Nucleospin Extract de Macherey-Nagel.

3^{ème} étape : digestion des produits de purification par *Xho*I. Le milieu réactionnel est :

- totalité (30 µl) de produits purifiés (ADN amplifié ou plasmide digérés)
- 5 µl de tampon D 10×
- 10 U de *Xho*I
- H₂O, qsp 50 µl

La réaction est réalisée 2 h à 37°C sous agitation lente.

1.2.4. Ligature

Le plasmide ouvert et les produits de PCR purifiés et digérés sont soumis à l'action de la T4 DNA ligase (Promega). Le rapport molaire produit de PCR / plasmide ouvert doit être de 1/5. L'action de la T4 DNA ligase s'effectue pendant 1 h à température ambiante.

1.3. Amplification du plasmide pcDNA5/FRT-H6-ABCG2

1.3.1. Souche bactérienne

Les bactéries TOP10 de *E. coli* sont utilisées pour les étapes de clonage. Leur génotype est *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ-* (Invitrogen).

1.3.2. Préparation des bactéries compétentes

Principe : On utilise la technique décrite par Cohen et collaborateurs en 1972 (Cohen *et al.*, 1972) selon laquelle la membrane des bactéries est perméabilisée par action de chlorure de calcium.

Mode opératoire : Une colonie de bactéries est cultivée une nuit dans 3 ml de LB à 37°C sous agitation. Le lendemain, 1 ml de cette culture est inoculé dans 100 ml de LB toujours à 37°C et sous agitation. Lorsque l'absorbance à 600 nm est comprise entre 0,3 et 0,4, la culture est placée dans la glace pendant 10 min. Les cellules sont centrifugées 7 min à 1600×g à 4°C. Les culots sont alors remis en suspension dans 10 ml de solution A (60 mM CaCl₂ (Euromedex), 15% glycérol (Roth), 10 mM de 1,4-pipérazinedianesulfonate (PIPES) (Sigma-Aldrich), pH 7,0) préalablement autoclavée et froide. Le culot, obtenu par centrifugation à 1600×g pendant 5 min est à nouveau remis en suspension et les bactéries sont incubées 30 min dans la glace, puis culotées comme précédemment. Enfin, le culot est repris dans 2 ml de la solution A et aliquoté puis congelé à -80°C.

1.3.3. Transformation des bactéries compétentes

L'ADN à incorporer, environ 50 ng/2 µl, est ajouté à 50 µl de bactéries compétentes. Après 20 min dans la glace, un choc thermique est réalisé pendant 2 min à 42°C. Ensuite 250 µl de milieu de culture S.O.C (Invitrogen) sont ajoutés et l'ensemble est incubé pendant 1 h à 37°C sous agitation constante. Les bactéries sont alors étalées sur du milieu LB + agar (15 g/l) et 100 µg/ml d'ampicilline et sont placées à l'étuve à 37°C pendant 14 à 16 h. Les bactéries ayant incorporé le plasmide se développeront sur milieu sélectif.

1.3.4. Préparation analytique d'ADN

Principe : Après lyse des bactéries par traitement au SDS et au lysozyme, l'ADN chromosomique est précipité par addition de sels de potassium. Le précipité de SDS-protéines-ADN chromosomique est éliminé par centrifugation. Le surnageant contient l'ADN plasmidique et l'ARN (Ish-Horowicz and Burke, 1981).

Protocole : L'ADN a été préparé par l'utilisation du kit Nucleospin Plasmid de Macherey-Nagel. Une colonie de bactéries est mise en culture une nuit à 37°C sous agitation dans 3 ml de milieu LB (25 g/l) contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les bactéries sont culotées et lysées. L'ADN chromosomique est précipité et éliminé par centrifugation tandis que l'ADN plasmidique est retenu sur une colonne de silice avant d'être élué. L'ajout d'isopropanol permet la précipitation de l'ADN plasmidique qui est alors récupéré par une centrifugation à 15000×g pendant 30 min. L'ADN est lavé par de l'éthanol 70% v/v, séché et repris dans du tampon approprié.

1.3.5. Préparation quantitative d'ADN

Le principe est le même que précédemment. Toutes les solutions nécessaires à l'extraction sont fournies par le kit Nucleospin Xtra maxi de Macherey-nagel. Le volume de culture est de 200 ml.

1.4. Analyse du plasmide obtenu

1.4.1. Par gel d'électrophorèse

Les plasmides à analyser sont tout d'abord linéarisés avant d'être déposés. Ici, nous utilisons l'enzyme *SpeI* (Promega), optimale dans le tampon B. Elle digère pcDNA5/FRT-H6-ABCG2 en 3 fragments et pcDNA5/FRT en 2 fragments. Ceci permet de visualiser facilement l'intégration du gène dans le vecteur.

Les gels d'agarose sont utilisés à une concentration de 0,8% (*m/v*), soit 0,48 g d'agarose (Sigma-Aldrich) mélangés à 60 ml de tampon TBE 0,5× (Euromedex) (50 mM Tris-borate, pH 8,0, 1 mM EDTA) puis chauffés à 100°C pour dissoudre l'agarose. La solution est refroidie à 50°C environ avant l'ajout de 1 µg/ml de GelRed (Interchim), utilisé pour détecter l'ADN sous lumière ultraviolette (UV_{254 nm}). Le gel est ensuite coulé sur un support horizontal. Les échantillons sont additionnés d'une solution de dépôt 6× (Promega) (0,1% bleu de bromophénol, 10% glycérol, eau milliQ). Un marqueur d'ADN (Promega) est également déposé sur le gel, servant de repère de masses moléculaires, la taille des bandes allant de 80 à 10000 paires de bases. La migration s'effectue sous une tension de 120 à 140 V à température ambiante. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés et le gel est photographié sous lumière UV_{254 nm}.

1.4.2. Par séquençage

Le séquençage des plasmides est réalisé par la société GATC à partir de 30 ng/30 µl de plasmide. Les amorces utilisées pour le séquençage sont conçues pour une séquence de 600 à 700 paires de bases, les faisant débiter 50 bases en amont de la partie à séquencer. Le contrôle de la séquence se fait alors par un alignement de séquence avec celle que l'on doit obtenir. Les séquences modèles sont données par le logiciel vecteur NTI. L'alignement de séquence est réalisé par le logiciel ClustalW.

2. Réalisation de mutants de pcDNA5/FRT-H6-ABCG2 par mutagenèse dirigée

Différents mutants ont été établis dans les boucles intracellulaires d'ABCG2 afin d'étudier leur rôle dans l'efflux de substrats. Ces mutants ont été réalisés dans le système Flp-In™-293 et donc dans le plasmide pcDNA5 FRT-H6-ABCG2. Ils ont été produits par mutagenèse dirigée.

Principe : Une mutation est introduite dans le gène désiré par PCR grâce à 2 amorces utilisées qui portent la même mutation. Le schéma en Figure 46 présente ces différentes étapes.

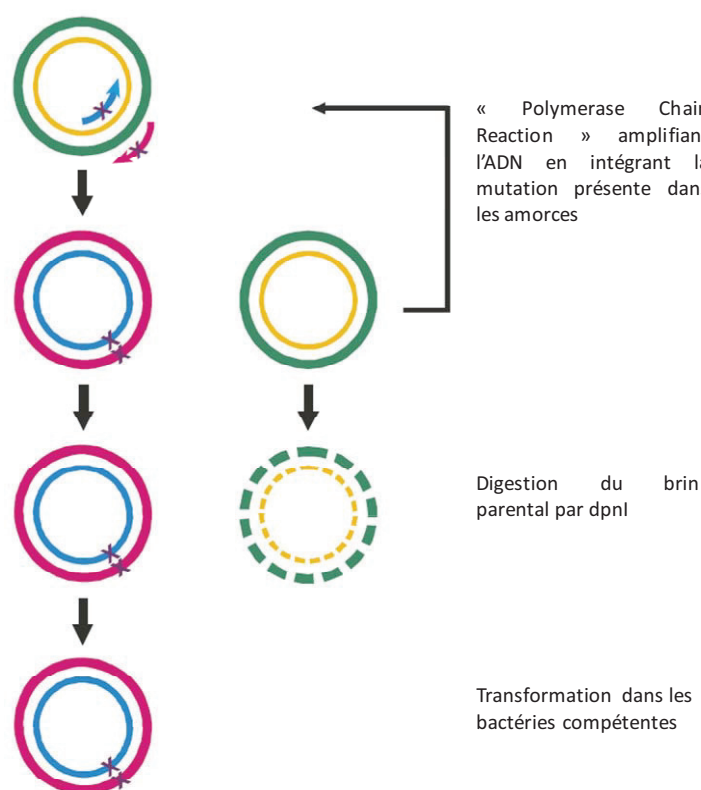


Figure 46 : Schémat de la mutagenèse dirigée par PCR.

Dans un 1^{er} temps, l'ADN parental (brins jaunes et verts en trait plein) est amplifié par PCR avec des amorces oligonucléotidiques (flèches bleue et rose) contenant la mutation voulue (représentée par une croix violette). L'ADN parental est ensuite digéré par *DpnI* (brin verts et jaunes en pointillé) et les plasmides mutés (brins roses et bleus) sont transformés dans des bactéries compétentes pour être amplifiés (Invitrogen).

Afin de réaliser les mutants, nous avons, ici, utilisé le kit QuikChange II XL « Site-Directed Mutagenesis » de Stratagene.

2.1. Amorces utilisées

La construction des amorces est une étape importante de la mutagenèse dirigée dont dépend la réussite de la mutagenèse. Leur construction a été réalisée avec le logiciel Vecteur NTI de Invitrogen et a suivi plusieurs règles :

- les 2 amorces contiennent la mutation et sont complémentaires de la même séquence d'ADN des brins parentaux.

- les amorces doivent être formées de 25 à 45 bases et leur température de fusion doit être supérieure ou égale à 78°C. Cette température est calculée par la formule suivante :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - (675/N) \% \text{ mismatch}$$

où

- N est le nombre de bases de l'amorce
- % GC est le pourcentage de bases G et C dans l'amorce
- % mismatch est le pourcentage de bases modifiées

- la mutation est située au centre de l'amorce, encadrée par au moins 10 à 15 bases.
- pour être optimum, les amorces devraient avoir au moins 40% de bases G ou C et se terminer par une ou plus de ces 2 bases.

Quatre mutants d'ABCG2 sont créés par les amorces du Tableau 10.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
H350A	5' - GAGACAAAAGCTGAATTAGCACTTCCGGGGGTGAG
H375A	5' - TACACCACCTCCTTCTGTGCTCAACTCAGATGGGTTTCC
W379A	5' - TTCTGTCATCAACTCAGAGCGGTTCCAAGCGTTCATTC
H457A	5' - GAGAAGAAGCTCTTCATAGCAGAATACATCAGCGGATACTAC

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée d'ABCG2.

En rouge sont représentées les bases modifiées conduisant à la mutation d'un acide aminé. Le nom des amorces permet de connaître la mutation introduite. Ainsi, H350A signifie que l'histidine en position 350 a été remplacée par une alanine.

2.2. Introduction de la mutation par PCR

Les mutations ont été introduites par PCR. Le milieu réactionnel est le suivant :

- 5 µl de tampon de la pfu HF DNA polymerase 10×
- 10 ng de matrice pcDNA5/FRT-H6-ABCG2
- 125 ng de l'amorce 1
- 125 ng de l'amorce 2
- 1 µl de dNTP
- 3 µl de QuickSolution
- H₂O qsp 50µl
- 2,5 U de pfu HF DNA polymerase

Après homogénéisation, la réaction de PCR se fait de manière automatique dans un appareil à PCR « DNA thermal cycle » (MWG-BIOTECH). Le cycle de PCR suit le schéma suivant :

1^{er} cycle : - dénaturation des brins d'ADN : 95°C, 1 min

18 cycles : - dénaturation des brins d'ADN : 95°C, 50 s
- hybridation des amorces : 60°C, 50 s
- amplification : 68°C, 7 min

Dernier cycle : - amplification : 68°C, 7 min

Les produits de PCR sont alors placés 2 min dans la glace pour stopper la réaction.

2.3. Digestion du brin parental

Afin de ne transformer les bactéries compétentes qu'avec les plasmides contenant la mutation, l'ADN parental est digéré par l'enzyme *DpnI* qui digère spécifiquement un ADN méthylé et donc produit *in vivo*.

Une unité de *DpnI* est ajoutée au milieu réactionnel de la PCR et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 2 h.

Les plasmides sont ensuite transformés dans les bactéries compétentes. L'ADN est extrait et analysé comme précédemment.

3. Transfection cellulaire

3.1. Principe

Une transfection cellulaire correspond à l'introduction d'ADN dans une cellule de mammifères. Ici, les transfections réalisées sont stables, l'ADN plasmidique est donc intégré au génome des cellules hôtes. La transfection a été réalisée par la lipofectamine 2000

(Invitrogen). C'est une formulation de lipides aux propriétés cationiques. Ils se complexent avec l'ADN plasmidique et favorisent ainsi son entrée dans les cellules de mammifères.

Les cellules transfectées ici sont les Flp-InTM-293. Afin d'intégrer le plasmide au site FRT, elles nécessitent une co-transfection avec le plasmide pOG44 (Figure 47) (contenant un gène codant pour une recombinase) et le plasmide contenant le gène d'intérêt, ici pcDNA5/FRT-H6-ABCG2.

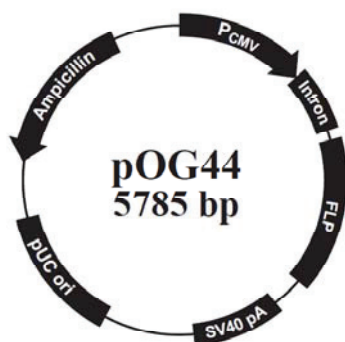


Figure 47 : Plasmide pOG44.

Il contient (i) le promoteur du cytomegalovirus (pCMV), (ii) un gène codant pour une FLP recombinase (FLP) permettant l'intégration du plasmide pcDNA5/FRT au niveau du site FRT du génome des cellules, (iii) un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des bactéries transformées avec ce plasmide (Invitrogen).

3.2. Protocole

La veille de la transfection, les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits à 5.10^5 cellules / puits sans agents de sélection.

A J0, les plasmides à transfecter sont préparés avec un ratio 9:1 pOG44 : pcDNA5/FRT dans 250 μ l de Opti-MEM[®] sans sérum (Invitrogen) et sont homogénéisés par agitation lente au vortex. Dix microlitres de lipofectamine 2000 sont mélangés à 240 μ l d'Opti-MEM[®]. Après une incubation de 5 min à température ambiante, l'ADN est mélangé à la lipofectamine et est incubé 20 min à température ambiante. Les 500 μ l de mélange sont alors ajoutés, goutte à goutte, dans les puits contenant les cellules dans leur milieu de culture. Ce milieu de culture est changé 4 à 6 h après la transfection et les cellules sont cultivées dans des conditions normales de culture.

A J1, l'agent de sélection, l'hygromycine B, est ajouté à la concentration de 10 μ g/ml.

Durant les semaines suivantes, le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

II. Biologie cellulaire

1. Les lignées cellulaires

1.1. NIH3T3 et NIH3T3-MDR G185

Les cellules NIH3T3 (Figure 48A) proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC). Elles ont été mises à disposition par le Dr Carol O. Cardarelli (Bethesda, USA) (Cardarelli *et al.*, 1995). C'est une lignée immortalisée de cellules embryonnaires de souris Swiss Nude adhérentes. Les cellules NIH3T3-MDR G185 (Figure 48B) ont été transfectées par co-précipitation au phosphate de calcium avec le gène *mdr1*, possédant une glycine en position 185, contenue dans le vecteur pHaMDR1/A, puis sélectionnées par 60 ng/ml de colchicine (Sigma-Aldrich®).

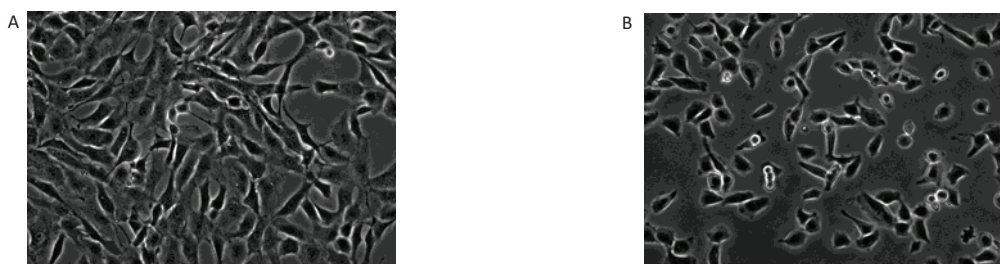


Figure 48 : Photos des lignées cellulaires NIH3T3 (A) et NIH3T3-MDR G185 (B).
Les photos ont été prises au microscope optique au contraste de phase, grossissement 20×.

1.2. HEK-293 pcDNA3.1 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482

Les cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) sont des cellules immortalisées embryonnaires de rein humain adhérentes provenant de l'ATCC. Elles ont été transfectées par Sira Macalou alors en thèse au laboratoire, par la méthode de nucléofection, et sélectionnées par 0,75 mg/ml de généticine (G418) (PAA). Les cellules ont été transfectées avec pcDNA3.1 vide (Invitrogen) et avec le même vecteur pcDNA3.1 contenant le gène codant pour la souche sauvage d'ABCG2 (arginine en position 482).

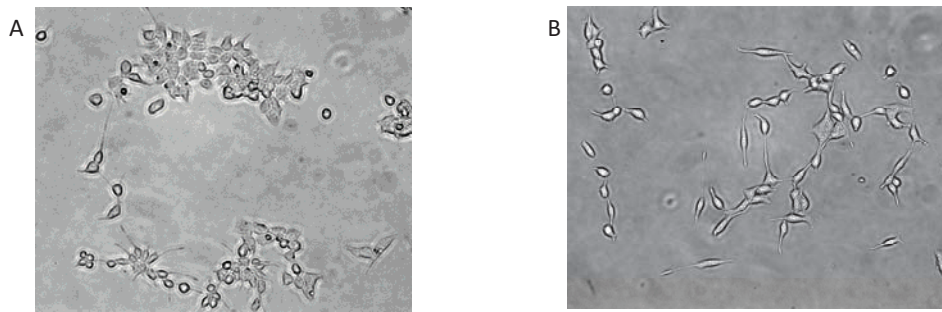


Figure 49 : Photos des lignées cellulaires HEK-293 pcDNA3.1 (A) et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482 (B).

Les photos ont été prises au microscope optique au contraste de phase, grossissement 20 ×.

1.3. Les Flp-InTM-293

La lignée Flp-InTM-293 a été présentée précédemment dans la partie *Matériels et méthodes I. Etablissement d'une nouvelle lignée cellulaire*

2. Culture cellulaire

Les 5 lignées cellulaires présentées ci-dessus sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, PAA), complémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (AbCys) et 1% de pénicilline-streptomycine (PAA) (inhibiteur de la synthèse des parois membranaires bactériennes et de la synthèse des protéines procaryotes).

3. Stockage des cellules

3.1. Décongélation

Afin d'avoir des résultats avec peu de variations, de nouvelles cellules sont régulièrement décongelées. Après une incubation rapide à 37°C, les cellules sont reprises dans du DMEM et centrifugées à 200×g pendant 5 min afin d'éliminer le milieu de congélation. Les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture et incubées à 37°C sous 5% de CO₂ sous atmosphère humide.

3.2. Congélation

Les différents types cellulaires sont conservés à long terme (plusieurs années) dans l'azote liquide, dans un milieu de congélation variant selon les types cellulaires. Pour les cellules utilisées ici, le milieu de congélation se compose de 40% DMEM + 50% SVF + 10% DMSO

(diméthyle sulfoxyde) (Euromedex). Après décollement et lavage, les cellules sont reprises dans du milieu de congélation. Cette suspension est refroidie progressivement de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dans une boîte de congélation (Nalgène) jusqu'à -80°C pendant 24 h avant d'être conservée dans l'azote liquide.

4. Numération cellulaire

Afin de réaliser certains tests (tests de cytotoxicité, tests de cytométrie en flux, ...), les cellules doivent être quantifiées. Après remise en suspension, les cellules mortes sont marquées au bleu de trypan, les cellules viables sont alors dénombrées au microscope optique grâce à une cellule de Mallassez. Cette cellule est quadrillée de manière à ce que chaque carreau équivaille à $0,1\text{ }\mu\text{l}$. Le nombre de cellules comptées dans 10 carreaux est multiplié par 10000 permettant alors de connaître le nombre de cellules dans 1 ml de solution.

5. Cytométrie en flux

5.1. Principe

La cytométrie en flux permet l'analyse de cellules entraînées dans un flux liquide en utilisant leurs propriétés optiques. Les cellules, alignées les unes derrière les autres et séparées d'au moins 1 mm, défilent individuellement à grande vitesse (environ 10 m/s) devant un laser. Les cellules sont triées selon 3 paramètres (Figure 50) :

- la taille (paramètre FSC) : la diffraction de la lumière mesurée dans l'axe du laser,
- la granulosité (paramètre SSC) : la diffraction de la lumière mesurée avec un angle de 90° par rapport à l'axe du laser,
- l'intensité de fluorescence émise (paramètre FL).

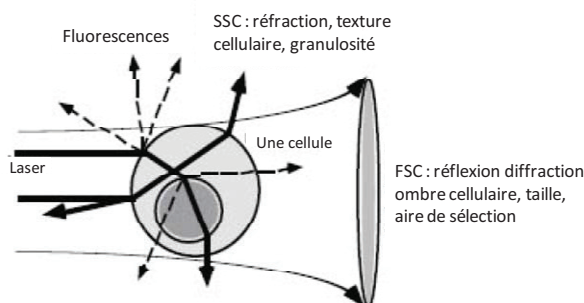


Figure 50 : Paramètres mesurés par le cytomètre en flux.

On trouve ainsi la taille des cellules (FSC), leur granulosité (SSC) et leur fluorescence.

5.2. Appareillage

Un cytomètre en flux est composé de plusieurs parties (Figure 51) :

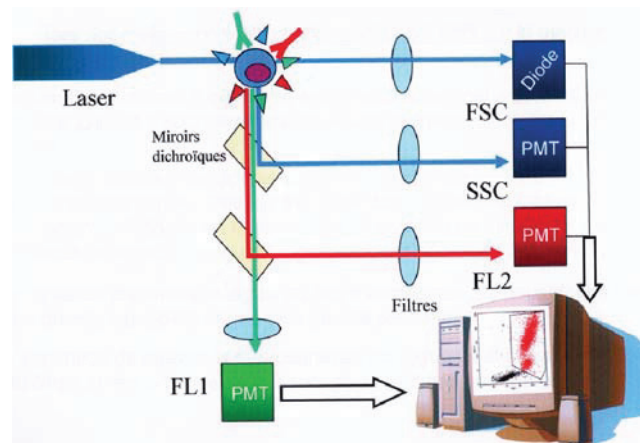


Figure 51 : cytomètre en flux.

- **un système fluide** : flux laminaire qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser.
- **un système optique** : composé du rayon laser et des filtres permettant de sélectionner les longueurs d'ondes appropriées. Les cytomètres peuvent être équipés d'un ou de plusieurs lasers. Nous trouvons très fréquemment des lasers argon excitant les cellules à 488 nm ; d'autres, tels que le LSR II 4 lasers contiennent des lasers excitant à 488 nm, 633 nm, 355 nm et 561 nm.
- **un système électronique** : il est composé de photomultiplicateurs (PMT) qui captent la lumière émise, d'un digitaliseur qui la transforme en signal électrique puis en signal numérique et enfin d'un ordinateur qui permet de traiter et stocker les données.

Pour nos analyses, 2 cytomètres seront utilisés : le Facscan et le LSR II 4 lasers.

5.3. Les paramètres étudiés

Les paramètres mesurés sont donc transformés en signal électrique et présentés sous forme de cytogramme. Cela permet de sélectionner les populations à étudier, notées en rose dans l'exemple ci-dessous. Chaque population est la population fille de la précédente.

Les 2 premiers paramètres étudiés sont la taille des cellules (FSC) et leur granulosité (SSC). Ils permettent de sélectionner une population viable (Figure 52).

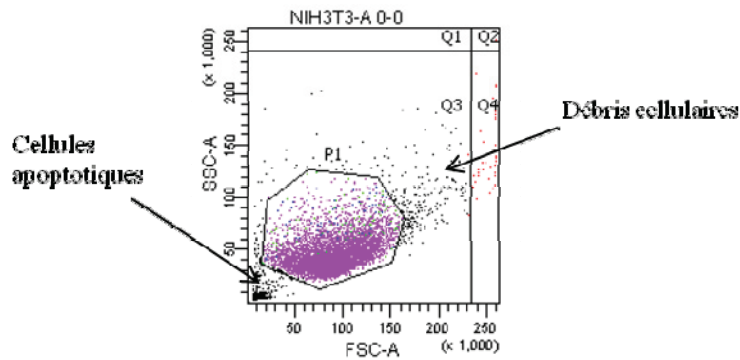


Figure 52 : cytogramme représentant la granulosité des cellules en fonction de leur taille.

L'étape suivante consiste à éliminer les doublets. En effet, lorsque 2 cellules passent en même temps devant le laser, la hauteur de l'impulsion électrique de leur taille (FSC-H) ou de leur granulosité (SSC-H) sera la même mais la largeur de cette impulsion (FSC-W ou SSC-W) sera doublée. Nous éliminons environ 90% des doublets par le 1^{er} cytogramme (Figure 53A) et le 2^{ème} nous permet d'éliminer environ 5% de doublets restants (Figure 53B).

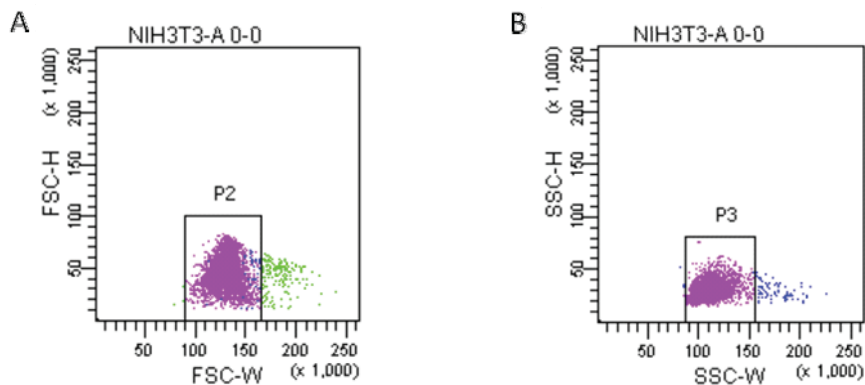


Figure 53 : Elimination des doublets.

Une fois ces doublets éliminés, la fluorescence intracellulaire n'est mesurée que sur cette dernière population sélectionnée, P3. La fluorescence est présentée par la Figure 54.

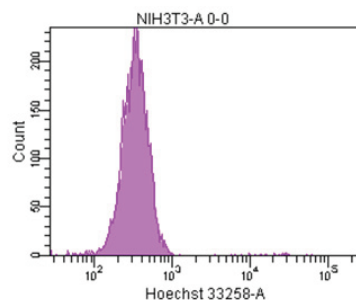


Figure 54 : Mesure de la fluorescence intracellulaire dans le canal le plus approprié.

La cytométrie en flux est utilisée pour 3 types d'expérimentations détaillées ci-dessous.

5.4. Etude de l'adressage des protéines

L'utilisation d'un anticorps spécifique d'ABCG2 couplé à un fluorochrome permet de visualiser et de quantifier l'adressage de la protéine à la membrane plasmique. L'anticorps utilisé ici est le 5D3 (e-bioscience), anticorps de souris reconnaissant spécifiquement la 3^{ème} boucle extracellulaire d'ABCG2, ECL3, couplé à phycoérythrine (PE). Une excitation de cet anticorps couplé à 488 nm permet de mesurer une émission à 520 nm. Les cellules n'étant pas perméabilisées, la fluorescence observée correspond à l'anticorps fixé sur la membrane plasmique donc à l'adressage d'ABCG2 à cette membrane.

Les cellules sontensemencées à 10^5 cellules dans une plaque 96 puits et centrifugées à $350\times g$ pendant 5 min. Après lavage au PBS, l'anticorps préparé au $1/10^{ème}$ dans de la « Bovine Serum Albumine » (BSA) 2% est ajouté au culot de cellules. Elles sont incubées 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Une centrifugation à $350\times g$ permet de retirer l'anticorps et de laver les cellules au PBS. Les cellules sont par la suite récupérées dans du PBS et conservées dans de la glace, à 4°C, dans l'obscurité jusqu'à analyse au cytomètre.

Un contrôle négatif, fourni avec l'anticorps 5D3 permet d'éliminer le bruit de fond lors de l'analyse. Des cellules n'exprimant pas ABCG2 sont analysées de la même façon afin de s'affranchir de la fixation non spécifique de l'anticorps lors de l'analyse.

5.5. Mesure de l'activité de transport des mutants

La cytométrie en flux peut être utilisée pour mesurer une activité de transport. Pour cela, le substrat doit être fluorescent après excitation. Le cytomètre mesure la fluorescence intracellulaire, ainsi, si le substrat est expulsé, la fluorescence intracellulaire sera faible, à la différence du cas où le substrat est peu ou pas expulsé.

Le protocole suivi est résumé sur la Figure 55.

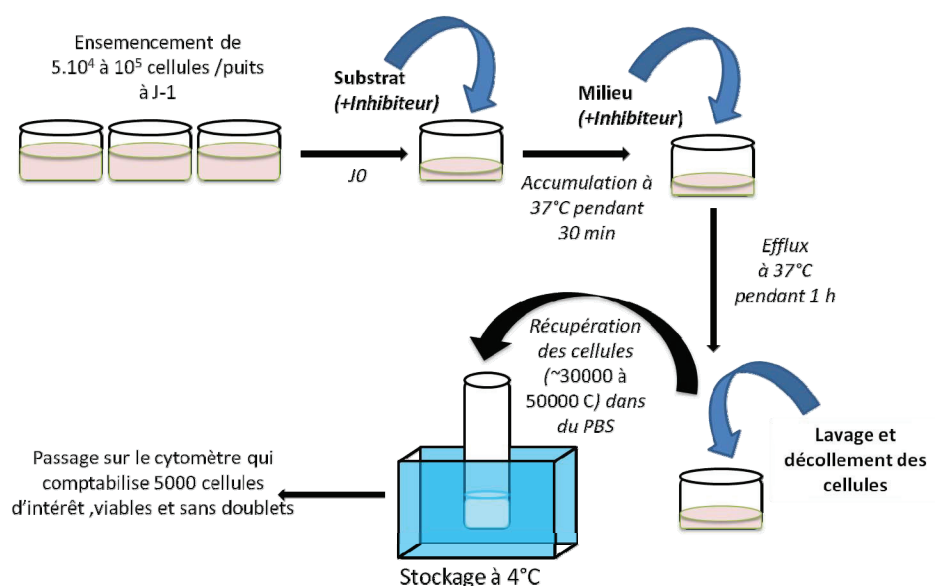


Figure 55 : Protocole de cytométrie en flux pour la mesure de transport de substrats ou pour la mesure de l'activité inhibitrice d'un composé.

J-1 : les cellules sont ensemencées dans une plaque 24 puits à 10^5 cellules par puits (pour les cellules HEK-293 pcDNA3.1 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482) ou à 5×10^4 cellules par puits (pour les cellules NIH3T3 et NIH3T3-MDR G185) et incubées 24 h sous atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO_2 .

J0, h0 : Après avoir lavé les cellules, 100 μl de substrat à la concentration souhaitée leur sont ajoutés avec 100 μl de DMEM. Les cellules sont alors incubées 30 min à 37°C , c'est la phase d'accumulation.

J0, h+30 min : le milieu + substrat est retiré et du DMEM seul est ajouté aux cellules. Elles sont incubées 1 h à 37°C , permettant à la protéine étudiée d'expulser le substrat.

J0, h+90 min : les cellules sont lavées, décollées et conservées dans du PBS, à 4°C dans de la glace jusqu'à analyse au cytomètre.

En pratique, chaque série d'essais contient (i) un témoin d'accumulation maximum correspondant à des cellules n'exprimant pas le transporteur et accumulant donc un maximum de substrat (100% du test), (ii) un bruit de fond correspondant à des cellules exprimant le transporteur ou non, sans substrat, (iii), l'essai proprement dit où les cellules exprimant le transporteurs sont incubées avec le substrat.

La fluorescence mesurée dans les cellules correspond aux substrats non transportés. Ainsi, le pourcentage d'accumulation est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ accumulation} = \frac{\text{FLA} - \text{FLB}}{\text{FLC} - \text{FLB}} \times 100$$

Où FLA est la fluorescence mesurée dans les cellules exprimant la protéine et incubées avec le substrat ;

FLB est l'autofluorescence des cellules; elle est mesurée dans les cellules sans substrat ;

FLC est la fluorescence maximum dans les cellules ; elle est mesurée dans les cellules n'exprimant pas la protéine et incubées avec le substrat ;

.

5.6. Mesure de l'activité inhibitrice des composés testés

Ce test est quasiment identique à la mesure de l'activité d'efflux. Nous mesurerons l'activité d'efflux de la protéine testée en présence de substrat mais également de composé potentiellement inhibiteur.

Le protocole est présenté en Figure 55. La différence est l'ajout, en plus du substrat, du composé à tester dans les 2 phases d'accumulation et d'efflux.

Les contrôles sont effectués comme précédemment à la différence que l'autofluorescence des cellules est mesurée en présence de l'inhibiteur, ceci dans le but de s'affranchir de la fluorescence potentielle du composé testé.

Afin de calculer l'efficacité du composé, nous mesurons la concentration intracellulaire du substrat. Lorsque l'on ajoute des concentrations croissantes d'un inhibiteur, la fluorescence intracellulaire augmentera avec ces concentrations comme on peut l'observer sur la Figure 56.

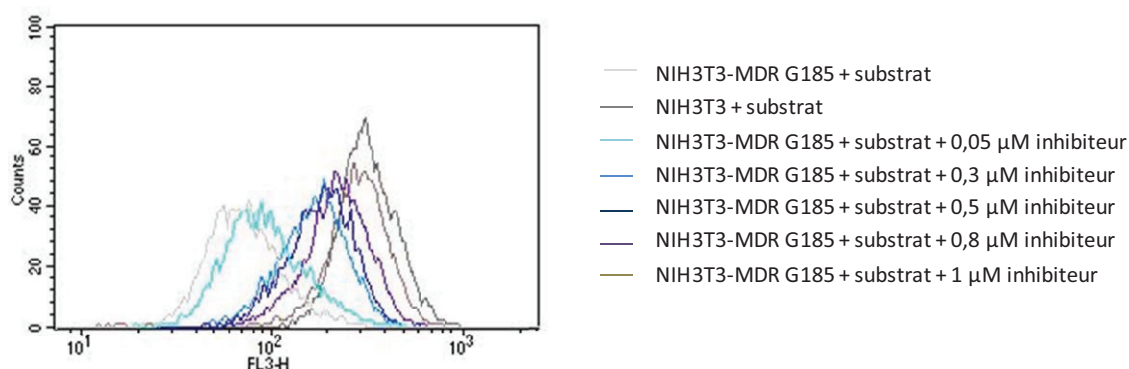
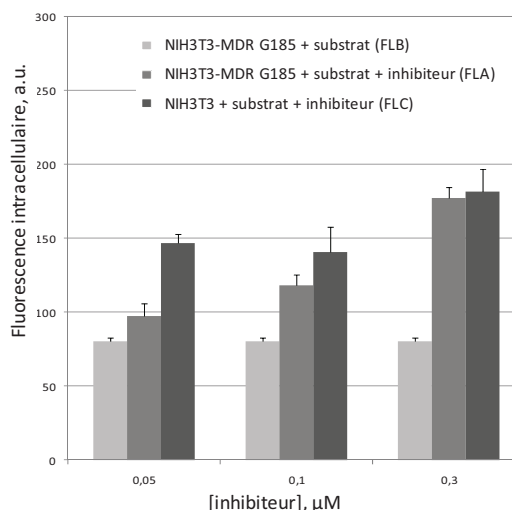


Figure 56 : Exemple de l'augmentation de la fluorescence intracellulaire lorsque l'on ajoute des concentrations croissantes d'un inhibiteur.

L'efficacité du composé testé est alors calculée comme suit :



Avec

$$E(\%) = \frac{FLA - FLB}{FLC - FLB} \times 100$$

Figure 57 : Mesures effectuées pour déterminer l'efficacité d'inhibition d'un composé testé et calcul de son efficacité.

Exemple d'un inhibiteur.

6. Test de croissance cellulaire par le test au MTT

6.1. Principe

Le test de croissance cellulaire permet de quantifier les cellules viables par l'utilisation du bromure de 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich). Ce sel de tétrazolium est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase des mitochondries des cellules viables, formant ainsi un précipité violet. Une lecture de l'absorbance permet de déterminer le pourcentage de cellules viables.

6.2. Protocole

La veille du test, à J-1, les cellules sontensemencées, dans une plaque 96 puits, de $2,5 \cdot 10^3$ à 10^4 cellules par puits selon le type cellulaire et sont incubées 24 h sous atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO₂.

A J0, le milieu de culture est retiré et 100 μl de DMEM seul + 100 μl de concentrations croissantes de chaque composé à tester (1% DMSO final) sont ajoutés dans les puits. Les cellules sont alors incubées dans les conditions normales de culture. Un contrôle sans composé est effectué afin d'obtenir le 100% de croissance cellulaire ; chaque concentration de composé est réalisée en triple.

A J3, le milieu est retiré et 100 μ l de DMEM contenant 5 mg/ml de MTT est ajouté à chaque puits. Après 4 h d'incubation à 37°C, le milieu est retiré et les cristaux de formazan sont dissous dans un mélange éthanol : DMSO (50:50, v/v). L'absorbance des puits est lue au spectrophotomètre à 550 nm.

7. Tests de chimiosensibilisation

Les tests de chimiosensibilisation sont menés de la même manière que les tests de cytotoxicité. Les cellules exprimant ou non le transporteur ABC sont ensemencées dans les plaques 96 puits à J0. A J1, des concentrations croissantes de substrat sont ajoutés en présence ou non d'inhibiteur à une concentration égale à 5 fois son IC₅₀. Après 72 h d'incubation, la survie cellulaire est mesurée par le biais du test MTT.

8. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique de marquage permettant la détection des protéines dans une cellule grâce à un fluorochrome associé à un anticorps dirigé contre la protéine cible.

Quarante-huit heures avant leur marquage, 10⁵ cellules sont ensemencées sur des lames de microscopie avec chambres d'incubation (BD Falcon) et sont incubées sous atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO₂.

Le marquage des cellules est réalisé à température ambiante. Après un lavage rapide au PBS, les cellules sont fixées 15 min par du paraformaldéhyde (PAF) à 4% (Sigma-aldrich). Trois lavages rapides permettent d'enlever l'excédent et les cellules sont alors perméabilisées 5 min par du méthanol froid (Carlo Erba). Après avoir ôté l'excédent de méthanol, les cellules sont saturées par un mélange BSA (2 mg/ml) (Euromedex), Triton $\times$ 100 (0.1%) (Sigma-Aldrich) et sérum de chèvre (5%) (Sigma-aldrich). Après 2 h d'incubation, le mélange de saturation est retiré et l'anticorps primaire est ajouté aux cellules pendant 1 h. L'anticorps utilisé ici est BXP21 (Santa-cruz). C'est un anticorps de souris, dirigé contre les acides aminés 271 à 396 d'ABCG2 et utilisé au 1/100^{ème}. Trois lavages de 10 min au PBS sont nécessaires pour enlever l'anticorps non fixé à ABCG2. L'anticorps secondaire est alors ajouté aux cellules à la dilution de 1/250^{ème} pendant 1 h. Cet anticorps est un anti-souris couplé au fluorochrome Alexa 488 (Santa-cruz). L'anticorps secondaire non fixé est retiré par 3 lavages de 10 min au PBS. Le noyau des cellules est marqué par du Hoechst 33358 (2,5 μ M

pendant 5 min) suivi par 3 lavages de 10 min au PBS. Afin d'observer les cellules au microscope, une lamelle est superposée aux cellules dans du milieu de montage (glycérol : PBS 50:50 v/v). Les cellules marquées sont conservées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à analyse au microscope confocal spectral SP5.

III. Biochimie

1. Extraction des protéines

1.1. Extraction des protéines totales de cellules de mammifères

L'extraction des protéines est réalisée par un tampon de lyse hypotonique (5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH8,0, 10 mM KCl, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-aldrich)). Le culot de cellules (5.10^6) est lavé puis incubé 30 min dans la glace dans le tampon de lyse hypotonique. Une centrifugation de 10 min à 4°C à $1000\times g$ permet de séparer les cellules non lysées (culot) des protéines (surnageant). Les protéines sont conservées à -20°C jusqu'à analyse.

1.2. Extraction des protéines membranaires

Les cellules sont cultivées en hyperflask[®] (Corning) et sont récupérées dans 200 ml de PBS. Après centrifugation à $200\times g$ pendant 5 min, le culot de cellules est repris dans 10 ml de tampon de lyse hypotonique (5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH7,4, 10 mM KCl, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-aldrich)) et incubé 30 min à 4°C. Les cellules sont alors cassées par traitement mécanique au Dounce sur glace puis centrifugées 10 min à $500\times g$ afin d'éliminer les cellules non lysées. Les membranes totales sont alors culotées par ultracentrifugation à $100000\times g$ pendant 1 h puis reprises dans du tampon de stockage (10 mM Tris-HCl pH7,4, 250 mM sucrose, 50 mM NaCl, glycérol 10%, inhibiteurs des protéases) et stockées dans l'azote liquide.

1.3. Extraction des protéines de tumeurs

Environ 150 mg de chaque tumeur sont prélevés et incubés 1 h à 4°C dans un tampon hypotonique (5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH7,4, 10 mM KCl, cocktail d'inhibiteurs de protéases). Les tumeurs sont cassées par traitement mécanique par 30 passages au Dounce, sur glace. Une centrifugation de 15 min à $1000\times g$ permet de récupérer les protéines totales dans le surnageant.

2. Dosage des protéines

2.1. Dosage par Bradford (Bradford, 1976)

La fixation du bleu de Coomassie R 250 sur les protéines déplace le maximum d'absorption du colorant de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu). La gamme de sensibilité de cette méthode permet de détecter de 1 à 15 µg de protéine par essai.

Ainsi, à une solution protéique contenant de 1 à 15 µg de protéines dans 500 µl d'eau milliQ, 500 µl de la solution de colorant de Coomassie Plus (Pierce) sont ajoutés. Après homogénéisation, la densité optique est lue à 595 nm. Une gamme étalon de BSA est réalisée dans les mêmes conditions.

2.2. Dosage par BCA (Smith *et al.*, 1985)

Cette méthode est également un dosage colorimétrique. L'acide bicinchoninique (BCA) utilise la réactivité du cuivre (Cu^{2+}) avec les protéines : elles réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin qui forme alors un complexe pourpre avec l'acide bicinchoninique. L'absorbance lue à 562 nm est proportionnelle à la concentration de protéines. Cette méthode permet de détecter de 1 à 100 µg de protéines.

A 5 µl de protéines, sont additionnés 1 µl de SDS et de l'eau qsp 20 µl. Après l'homogénéisation, un mélange réactif de Cuivre (II) et d'acide bicinchoninique (1:500, v/v) est ajouté aux protéines et incubé 40 min à 37°C sous agitation. L'absorbance est ensuite lue à 562 nm. Une gamme étalon établie avec de la BSA permet de relier l'absorbance lue à la quantité de protéine.

3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

3.1. Séparation des protéines

Préparation des échantillons : Dix µg de protéines totales sont préparés en mélange 1:1 (v/v) avec du tampon de dépôt 2× (100 mM Tris-HCl pH8,0, 4% SDS, 20% glycérol, 1,44 M β-mercaptoéthanol, 5 mM EDTA, 4 M urée et 0,002% bleu de bromophénol). Après 10 min d'incubation à température ambiante, 20 µl d'échantillons sont déposés sur gel d'acrylamide.

Préparation des gels de migrations : Les protéines migrent sur un gel d'acrylamide à 10%. Le gel de concentration est composé d'acrylamide 5% (37,5% d'acrylamide pour 1% de bisacrylamide), Tris-HCl pH6,8 à 0,375 M, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1%, *N,N,N',N'*-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED) 0,01%. Le gel de séparation est composé

d'acrylamide 10%, (en proportion 37,5 pour 1 acrylamide/bisacrylamide), Tris-HCl pH 8,8 à 0,375 M, SDS 0,1%, persulfate ammonium 0,1% et TEMED 0,01%.

Migration : La migration des protéines s'effectue à 120 V et 25 mA par gel de migration dans un tampon Tris-HCl 0,25 M, glycine 1,92 M, SDS 0,1%, pH8,5.

3.2. Coloration au bleu de coomassie

Le gel est trempé pendant 1 h dans une solution de bleu de coomassie (0,4% de bleu de Coomassie, 40% éthanol, 49,6% eau, 10% acide acétique) puis est décoloré par une solution composée de 10% d'acide acétique, 10% d'éthanol et 1% de glycérol une nuit à température ambiante.

3.3. Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est une méthode de détection plus sensible que la coloration au bleu de coomassie mais la détection dépend de la composition en acides aminés des protéines et n'est donc pas linéaire.

Les protéines sont fixées sur gel par une incubation de 1 h avec une solution de méthanol 50%, acide acétique 12% et 0,02% de formaldéhyde. Après 3 lavages de 20 min dans de l'éthanol 50 % (v/v), le gel est incubé 15 min dans une solution de thiosulfate de sodium à 200 mg/l. Deux rinçages rapides à l'eau sont effectués avant le marquage du gel par une incubation de 20 min dans une solution de nitrate d'argent à 2 g/l contenant 0,03% de formaldéhyde. Deux rinçages rapides à l'eau éliminent l'excès de nitrate d'argent et les protéines sont révélées par une solution contenant 0,057 M de carbonate de sodium et 0,8 mg/ml de sulfate de sodium. La réaction est arrêtée par un mélange contenant du méthanol 50% et de l'acide acétique 12%.

4. Analyse par immunodétection : le western-blot

Après migration sur gel de polyacrylamide 10%, les protéines sont électrotransférées sur une membrane de PVDF 0,22 µm (préalablement mouillée avec du méthanol) pendant 1 h à 4°C et à 200 mA constant, dans le tampon de transfert (méthanol 10%, 0,4 g/l de NaOH, 2,21 g/l de CAPS, pH11) selon la méthode liquide. La membrane de PVDF est alors saturée par 30 min d'incubation dans une solution de lait écrémé 5% (Régilait) dans du tampon TBS-tween 20. La réaction avec l'anticorps primaire se fait par incubation d'une nuit à 4°C en présence d'anticorps monoclonal de souris, BXP21 pour ABCG2 dilué au 250^{ème} et

d'anticorps mdrl reconnaissant les acides aminés 1040 à 1280 pour ABCB1, dilué au 500^{ème}. Trois lavages successifs de 15 min par du TBS-tween 20 sont effectués. La membrane de nitrocellulose est alors incubée pendant 1 h en présence de l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à la peroxydase (DakoCytomation) dilué au 3000^{ème}, puis lavée 3 fois avec du TBS-tween 20 pendant 15 min. La révélation se fait par le kit ECL (Roche Applied science) grâce à un ChemiDoc Universal Hood III (BioRad).

5. Activité ATPasique

Les transporteurs ABC transportent les substrats en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. Nous pouvons donc étudier l'activité d'un transporteur ABC en mesurant le phosphate (Pi) libéré par cette hydrolyse. Les mesures sont effectuées sur des membranes de cellules de mammifères HEK-293 pcDNA3.1 R482 ou Flp-InTM-293 ABCG2.

5.1. Activité ATPasique basale

La mesure est effectuée en plaque 96 puits sur 50 µg de protéines totales. Le volume total du milieu réactionnel est de 60 µl. Il est composé d'inhibiteurs des ATPases autres que les transporteurs ABC (ouabaine 2 mM, azoture de sodium 5 mM, EGTA 0,1 mM), de chlorure de magnésium (7 mM), d'ATP (5,5 mM), d'orthovanadate ou non (0,5 mM) (inhibiteurs des transporteurs ABC permettant de mesurer une activité spécifique des ABC) et de tampon qsp 60 µl (50 mM Tris-HCl pH7,5, 50 mM NaCl).

La réaction est démarrée par l'ajout des membranes dans les puits. Elle est réalisée sous agitation à 37°C pendant 30 min et est stoppée par ajout de 30 µl de SDS dans chacun des puits suivie d'une incubation de 10 min à 4°C. Le Pi libéré est quantifié par dosage colorimétrique avec un mélange d'acide ascorbique dans une solution de molybdate d'ammonium et d'acétate de zinc. Une gamme étalon de Pi établie dans les mêmes conditions permet de relier la lecture de l'absorbance à 620 nm à la quantité de Pi et donc à l'activité de la protéine (Chifflet *et al.*, 1988).

5.2. Activité ATPasique stimulée positivement ou négativement

L'activité ATPasique stimulée est mesurée selon le même protocole que précédemment. Le milieu réactionnel contient cependant un substrat ou un inhibiteur à la concentration souhaitée en plus des autres réactifs.

6. Mesure de l'hème par HPLC

L'hème n'étant pas fluorescent, son efflux par ABCG2 ne peut pas être mesuré par cytométrie en flux. Nous décidons donc de mesurer la quantité intracellulaire d'hème restante après une phase d'efflux par une « High-performance liquid chromatography » (HPLC). La méthode est décrite par Zhou et collaborateurs (Zhou *et al.*, 2005).

6.1. Préparation des cellules

Cinq millions de cellules sontensemencées dans des flasques de 75 cm² et sont incubées 24 h dans des conditions normales de culture. La synthèse d'hème est alors stimulée par ajout de son précurseur, l'acide δ -aminolévulinique à la concentration de 1 mM. Cette stimulation se fait en présence ou non d'inhibiteur d'ABCG2, le GF120918 à 5 μ M ou le Ko143 à 1 μ M. La stimulation s'effectue pendant 21 h dans les conditions normales de culture. Afin de mesurer la concentration intracellulaire d'hème produit, les cellules sont lavées puis mises en suspension dans 50 μ l de DMEM. Vingt microlitres de DMSO sont ajoutés et les cellules sont vortexées vigoureusement pendant 5 min. Un mélange méthanol : KH₂PO₄ (60:40 ; v/v) est ajouté aux cellules qui sont ensuite vortexées vigoureusement pendant 5 min. Une centrifugation à 1400×g pendant 15 min permet de récupérer le surnageant prêt à être injecté sur colonne d'HPLC.

6.2. Mesure par HPLC

Les expérimentations ont été menées par Damien Ficheux (ingénieur IBCP). La colonne utilisée est une C18 5 μ m, 300 Å, 4,6×250 mm, équilibrée dans un mélange 80% de tampon A (H₂O, 0,1% d'acide trifluoroacétique) et 20% de tampon B (95% acétonitrile, 5% H₂O, 0,08% TFA). L'injection de 50 μ l d'échantillon déclenche le gradient isocratique de tampon B 20-100%, sur 10 min, puis 100% pendant 6 min. Le détecteur est calibré pour la lecture de l'absorbance à 400 nm au cours du temps. Les temps de rétention et l'amplitude des pics des composés renseignent sur leur identité et leur concentration. L'injection de référence permet de déterminer les temps de rétention de l'hémine et de la PPIX, respectivement observés à 13 et 16 min.

7. Purification

Des essais de purification d'ABCG2 sont réalisés sur membranes de cellules de mammifères Flp-InTM-293 ABCG2.

Plusieurs modifications ont été apportées au cours des tests sur la base du protocole présenté ci-dessous. ABCG2 possède une étiquette 6 histidines du coté N-terminal, la purification est réalisée en batch sur résine de Nickel-agarose (Qiagen).

Les membranes sont solubilisées dans 1 ml final de tampon de solubilisation (Hepes/KOH 150 mM pH8,0 (Euromedex), NaCl 300 mM (Euromedex), octyl glucose 0,5% (Sigma-aldrich), glycérol 10% (Roth), PMSF 1× (Sigma-aldrich), cocktail d'inhibiteurs de protéase 1× (Sigma-aldrich)) 1 h à 4°C sous agitation. Une centrifugation à 100000×g pendant 15 min permet d'enrichir ABCG2 dans le culot et d'éliminer les protéines solubles et solubilisées dans ces conditions. Une 2nde solubilisation est réalisée sur le 1^{er} culot afin d'extraire ABCG2 des membranes. La solubilisation est réalisée dans 1 ml de tampon de solubilisation 2 (Hepes/KOH 150 mM pH 8,0 (Euromedex), NaCl 300 mM (Euromedex), Dodécylmaltoside 4% (Roth), glycérol 10% (Roth), PMSF 1× (Sigma-aldrich), cocktail d'inhibiteurs de protéase 1× (Sigma-aldrich)) 1 h à 4°C sous agitation. Les protéines non solubilisées sont éliminées par une centrifugation de 30 min à 100000×g. Le surnageant est alors appliqué pendant 1 h à 4°C sur 2×400 µl de résine de Nickel-agarose préalablement équilibrée par le tampon de solubilisation 2. La fraction non retenue est éliminée par centrifugation à 8000×g pendant 5 min. Deux lavages (lavage 1 : Hepes/KOH 150 mM pH8,0, NaCl 300 mM, glycérol 10%, imidazole 25 mM, DDM 0,5%; lavage 2 : HEPES/KOH 150 mM pH8,0, NaCl 300 mM, glycérol 10%, imidazole 40 mM, DDM 0,5%) de 4 ml sont effectués et l'élution est réalisée avec 500 µl de tampon d'élution (HEPES 150 mM pH8,0, NaCl 300 mM, glycérol 10%, imidazole 100 mM, DDM 0,5%). Une centrifugation à 8000×g de 2 min permet d'obtenir l'éluat. Cette élution est répétée 3 fois.

Un dosage est effectué par la méthode au BCA et l'imidazole est éliminé par une dialyse d'une nuit à 4°C dans 2 bains successifs.

IV. Test in vivo

Ces tests ont été effectués en collaboration avec le Dr Léa Payen de la Faculté de Pharmacie de Grange-Blanche (UCBL) de l'équipe du Pr. Charles Dumontet.

1. Les souris

Les tests sont réalisés sur des souris SCID femelles de 8 semaines (Charles River Laboratories). Ce sont des souris immunodéficientes dont la mutation SCID bloque la différenciation lymphoïde, entraînant un déficit profond en lymphocytes B et T mais conserve intactes les cellules de la lignée myéloïde.

Les souris sont acclimatées à l'animalerie 8 jours avant les tests *in vivo*.

Tous les tests ont été effectués selon « the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » et ont respecté le protocole approuvé par le conseil d'éthique des expérimentations animales.

2. Les molécules testées

Deux inhibiteurs d'ABCG2, efficaces *in vitro*, sont testés pour leur capacité à abolir le phénotype MDR *in vivo*. Ce sont le MBLI-87, un dérivé acridone (Boumendjel *et al.*, 2007) et le CT1364, un peptidomimétique.

Le MBLI-87 n'est pas soluble dans l'eau ou en solution saline. Il a été formulé par le Dr A. Gèze de la Faculté de Pharmacie de Grenoble. Il est administré aux souris sous forme d'une suspension colloïdale de cyclodextrine modifiées enzymatiquement. La taille des nanoparticules de la solution filtrée (0,45 µm) est comprise entre 185 et 195 nm et le MBLI-87 se trouve à une concentration de 0,16 mg/ml (déterminée par mesure spectrométrique à 393 nm). Des essais de stabilité ont été réalisés. Ils n'ont pas montré de variation dans la taille des nanoparticules ni dans la concentration du principe actif durant 3 mois. L'impact de la lumière sur la formulation n'ayant pas été étudiée les solutions sont conservées à l'obscurité. La durée d'un test étant inférieure à 3 mois, la même solution sera donc utilisée. Une solution témoin de nanoparticules seules (NANO) est préparée de la même façon. Le MBLI-87 est injecté en voie intra-péritonéale (IP) 5 fois par semaine. Les nanoparticules seules sont injectées de la même façon (300 µl/souris en IP).

Le 2nd inhibiteur testé n'est pas non plus soluble en solution aqueuse ou saline. Le CT1364 est préparé dans une solution à 6% d'éthanol à une concentration finale de 30 mM. La solubilité n'est pas totale et un précipité se forme rapidement après préparation de la solution. La suspension est injectée en IP 5 fois par semaine à la dose de 100 mg/Kg.

Nous utiliserons également un inhibiteur de référence, le géfitinib (AstraZeneca). Une solution aqueuse de concentration 15 mg/ml est administrée aux souris par gavage 3 fois par semaine.

L'agent anticancéreux utilisé est l'irinotécan (fourni par le Dr. Hamedi-Sangsari, MAP-France company) en solution aqueuse (6 mg/ml). Il est injecté aux souris en IP 3 fois par semaine.

3. Tests de toxicité aigüe

Le premier test est la validation de l'innocuité des solutés à tester, à la dose souhaitée *in vivo*. Huit groupes de 3 souris saines sont créés (Tableau 11).

Groupes	composés
Groupe 1	Irinotécan seul
Groupe 2	Irinotécan + géfitinib
Groupe 3	Irinotécan + MBLI-87 dose A
Groupe 4	Irinotécan + MBLI-87 dose B
Groupe 5	Irinotécan + NANO
Groupe 6	Irinotécan + CT1364 dose A
Groupe 7	Irinotécan + CT1364 dose B
Groupe 8	Irinotécan + éthanol 6%

Tableau 11 : Groupes de 3 souris pour le test de toxicité des composés.

Les composés sont injectés comme décrit précédemment.

4. Tests de chimioréversion

4.1. Les souris

Chaque groupe est composé de 6 souris, doublement xénogreffées en sous-cutanée dont 3 avec des cellules HEK-293 pcDNA3.1 (contrôle) et 3 avec des cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482 (essai). Le Tableau 12 présente les 12 groupes de souris ainsi que leurs traitements.

Souris	Composés administrés	Voie d'administration	Doses / fréquence
Groupe 1	Eau	IP	100 µl/ 3 fois/semaine
Groupe 2	Irinotecan	IP	30 mg/Kg (100 µl) 3fois/semaine
Groupe 3	Géfitinib	Gavage	75 mg/Kg (100 µl) 3fois/semaine
Groupe 4	Irinotecan + géfitinib	IP + gavage	30 mg/Kg + 75 mg/Kg 3fois/semaine
Groupe 5	CT1364	IP	100 mg/Kg (100 µl) 5 fois/semaine
Groupe 6	Ethanol 6% (V/V)	IP	100 µl 5 fois/semaine
Groupe 7	Irinotécan + CT1364	IP + IP	30 mg/Kg 3 fois/semaine + 100 mg/Kg 5 fois/semaine
Groupe 8	Irinotécan + éthanol	IP + IP	30 mg/Kg 3 fois/semaine + 100 µl 5 fois/semaine
Groupe 9	MBLI-87	IP	42,4mg/Kg (300µl) 5 fois/semaine
Groupe 10	NANO	IP	300 µl 5 fois/semaine
Groupe 11	Irinotécan + MBLI-87	IP + IP	30 mg/Kg 3 fois/semaine + 2,4 mg/Kg 5 fois/semaine
Groupe 12	Irinotécan + NANO	IP + IP	30 mg/Kg 3 fois/semaine + 300 µl 5 fois/semaine

Tableau 12 : Groupes de souris établis pour le test *in vivo* de réversion du phénotype MDR.

Chaque souris est identifiée individuellement par un code couleur (rose, bleu ou jaune) et les souris xénogreffées avec des cellules exprimant ABCG2 ont été entaillées à une oreille. Chaque souris est suivie afin de contrôler une éventuelle toxicité, au niveau de son poids, son comportement et l'état de son pelage.

4.2. Protocole

Le protocole a précédemment été établi par le Dr. Léa Payen. L'expérimentation a été réalisée avec 4 groupes de 3 souris auxquelles on injecte au niveau du péritoine des cellules HEK-293 pcDNA3.1 (2 groupes) ou HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482 (2 groupes). Trois souris de ces 2 groupes ont été traitées avec de l'irinotécan et 2 groupes traités avec de l'eau.

Le protocole contient 2 phases dont une de 15 jours de traitements suivit d'une pause initialement de 7 jours augmentée ensuite à 15 jours du fait de la toxicité des produits. L'expérimentation est stoppée par le sacrifice des souris ou après avoir répété le protocole 2 fois.

Le jour 0 correspond au jour d'inoculation des tumeurs. Le traitement est commencé le jour 1.

4.3. Implantation des tumeurs

Les cellules humaines greffées aux souris sont les mêmes que celles utilisées *in vitro*. Ce sont des HEK-293 pcDNA3.1 et des HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482, cultivées selon les conditions classiques (partie *Matériels et méthodes II.2. Culture cellulaire*). Le jour de l'inoculation, $8,2 \times 10^6$ cellules sont suspendues dans 100 μ l de DMEM auquel est ajoutée une solution de Matrigel (50:50, v/v). Les cellules sont inoculées aux souris en sous-cutané. Deux tumeurs identiques sont implantées sur les flancs droit et gauche de chaque souris. Bien que cela introduise un biais dans l'expérimentation, il n'est pas préférable de greffer une tumeur exprimant ABCG2 et une autre ne l'exprimant pas à la même souris car la croissance des tumeurs sera différente selon le traitement. En effet, les tumeurs HEK-293 pcDNA3.1 traitées avec l'irinotécan ne se développent pas alors que les tumeurs exprimant ABCG2 ont une croissance plus rapide obligeant à sacrifier prématurément les souris.

4.4. Déroulement du test

L'expérimentation s'effectue sur les groupes de souris décrit précédemment et selon le protocole établi. Certaines souris ayant un poids plus faible au début du test, les volumes de solutions administrées sont ajustés afin d'administrer la même dose pondérale aux souris.

Les souris sont pesées 3 fois par semaine pour détecter une éventuelle perte de poids synonyme de toxicité. Le comportement et l'état du pelage sont observés 5 fois par semaine lors des traitements.

4.5. Sacrifice des souris

Les souris ont été sacrifiées par anesthésie kétamine/valium (8/2), du fait du volume de la tumeur. Conformément à la réglementation, elles sont sacrifiées si on observe soit une nécrose de la tumeur, une perte de poids supérieur à 20%, une gêne dans le déplacement de la souris du fait de la localisation de la tumeur. Dans tous les cas, les souris sont sacrifiées dès que la taille de la tumeur atteint 1800 mm³, calculé par la formule suivante $\text{volume} = (4 \times 3,14 (l + w)/2)^3/3$ où l est la longueur et w , la largeur de la tumeur. Les tumeurs sont prélevées et conservées à -80°C. L'expression d'ABCG2 dans celles-ci est contrôlée par western-blot comme décrit précédemment (partie *Matériels et méthodes II.5 Analyse par immunodetection : le western-blot*). Environ 1 ml de sang est collecté en intracardiaque dans des seringues héparinées et le plasma est collecté par centrifugation (5000×g, 5 min). Il est conservé à -80°C jusqu'à analyse des métabolites par HPLC.

5. Tests de pharmacocinétique

Ce test est effectué sur des souris SCID saines séparées en 10 groupes. Cinq groupes sont traités avec l'irinotécan uniquement (IP, 30 mg/Kg) (groupes 1 à 5), et 5 autres groupes sont traités par une double injection irinotécan (IP, 30 mg/Kg) + MBLI-87 (IP, 0,45 mg/Kg) (groupe 6 à 10). Chaque groupe est composé de 5 souris identifiées individuellement. Les souris sont sacrifiées à des temps différents : groupes 1 et 6 sacrifiés 30 min après injection, groupes 2 et 7 1 h après injection, groupes 3 et 8, 3 h après injection, groupes 4 et 9 6 h après injection et les groupes 5 et 10 sont sacrifiés 24 h après injection.

Le plasma est récupéré et conservé comme décrit précédemment. L'irinotécan et le SN-38 sont dosés comme décrit ci-après.

6. Dosage de l'irinotécan et du SN-38

6.1. Extraction *in vitro*

$7,5.10^5$ de cellules HEK-293 pcDNA3.1 ou HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482 sont ensemencées dans une plaque 6 puits et cultivées 24 h selon les conditions habituelles de culture. L'irinotécan est ajouté à une concentration de 2 μ M pendant 60 min à 37°C, en présence ou en absence de 5 μ M de GF120418, 5 μ M de MBLI-87 ou 10 μ M de fumitrimorgine C. Durant cette phase, l'irinotécan peut être métabolisé en SN-38. Après 2 lavages au PBS froid, les cellules sont collectées dans 1 ml de PBS froid, centrifugées (5 min, 1500×g) et lysées par 500 μ l de méthanol pur. Vingt microlitres de camptothécine à 1 μ g/ μ l (standard interne) sont ajoutés et les échantillons sont centrifugés 5 min à 12000×g à 10°C. Le surnageant est évaporé sous azote et les résidus sont suspendus dans 300 μ l de phase mobile.

6.2. Extraction *in vivo*

Cinquante microlitres de plasma, 20 μ l de standard interne (camptothécine à 1 μ g/ μ l) et 300 μ l d'acide formique (2%, v/v) sont mélangés vigoureusement pendant 10 s. Le mélange est appliqué sur colonne d'extraction SPE (Oasis® HLB 30 mg – Waters, Milford, USA). La colonne est lavée par 1 ml d'acide formique 2% : méthanol (80:20, v/v) et l'élution est réalisée par 1 ml de méthanol. L'éluat est évaporé sous azote et les résidus suspendus dans 300 μ l de phase mobile.

6.3. Dosage par HPLC

Le dosage a été réalisé par le Pr Jérôme Guitton.

Dix microlitres des solutions obtenus *in vitro* ou *in vivo* sont injectés. L'irinotécan et le SN-38 sont séparés sur une colonne Hypersil Gold 100 mm x 2.1 mm (ThermoFisher, San Jose, USA) par un gradient de phase mobile eau/acétonitrile (0,1% d'acide acétique). Le débit de cette phase mobile est de 200 µl/min. La détection est réalisée avec un spectromètre de masse triple quadripôle Quantum-Ultra (ThermoFisher). La quantification est réalisée en utilisant les transitions m/z 587→124 (irinotécan), 393→349 (SN-38) et 349→305 (camptothécine). Une courbe de calibration permet de relier l'aire du pic à la quantité de produit.

V. Bio-informatique

Les expériences de bio-informatique ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Raphaël Terreux (IBCP-UCBL).

1. 3D-QSAR

Les molécules sont représentées avec le logiciel « Sybyl molecular-modeling » (SYBYL 6.9. Tripos Inc) en utilisant les champs de forces et de charges partielles de MMFF94 (Chang *et al.*, 1997 ; Halgren, 1996; Robey *et al.*, 2004). La constante diélectrique est fixée à 80 pour simuler un environnement aqueux : les limites électrostatiques sont de 16 Å. Dans CoMSIA, l'encombrement stérique et électrostatique, l'hydrophobicité, les donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène sont calculés avec un facteur d'atténuation de 0,3 dans une grille de dimension de 6 Å dans toutes les directions de l'espace correspondant à la plus grande molécule dans sa conformation la plus étendue. Un atome-sonde commun à toutes les molécules est utilisé avec un rayon de 1 Å et des propriétés de charges, d'hydrophobicité et de liaison hydrogène de +1. Les indices sont évalués par le protocole CoMSIA classique possédant une valeur filtrante de 2,0 Kcal.mol⁻¹. La capacité prédictive du modèle est évaluée par une validation LOO (« leave one outside »), basée sur le coefficient de contre-validation (q^2) pouvant avoir une valeur maximale de 10. La marge d'erreur au cours de la prédiction de la valeur d'inhibition est au maximum de 22% avec un écart-type de 5,2% ± 6,1.

2. Docking

Les protéines ABCB1 murine et humaine partageant 85% d'identité, le modèle 3-D de ABCB1 humaine a été réalisé avec le logiciel Spdbviewer 4.0 (Expasy) en superposant la séquence d'ABCB1 humaine P08183 (base de donnée de Uniprot) avec la structure 3D d'ABCB1 murine 3G60 (base de donnée de PDB) (Aller *et al.*, 2009). La structure 3D d'ABCB1 humaine est alors minimisée par le logiciel « Sybyl molecular modeling » en utilisant le champ de force Tripos et l'algorithme de Gasteiger Marseli. Du fait de la taille de la cavité (6000 Å³) formée par les domaines membranaires d'ABCB1 murine résolue dans cette conformation, les simulations de docking sur la structure 3D d'ABCB1 humaine résultante a été réalisée sur 4 zones (B1-B4) de la cavité (Figure 93). Chaque zone ainsi définie se superposent avec la précédente afin d'éviter les problèmes de limites. La réversine CT1347, le Hoechst 33342 et la rhodamine 123 sont dockés indépendamment en utilisant le module SurFlex Dock du logiciel Sybyl fonctionnant sous forme de Cscore. L'algorithme protomol a été utilisé pour générer une sonde définissant chaque zone, en réglant les paramètres d'atténuation à 0,5 et d'extension à 10 Å.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude d'ABCG2 par mutagenèse dirigée

L'implication d'ABCG2 étant très importante dans la résistance à de multiples drogues, il est essentiel de mieux connaître les domaines et le fonctionnement de cette protéine, en vue de contrer ce phénotype. De nouvelles connaissances acquises dans le mécanisme de transport ou encore dans les zones impliquées dans la reconnaissance des substrats, permettraient de développer des inhibiteurs ciblés, et donc spécifiques, de ce transporteur. Plusieurs motifs de cette protéine, ou des transporteurs ABC en général, ont été identifiés et leur rôle principal est connu (Tableau 2). Cependant, le rôle de plusieurs motifs ou domaines est encore inconnu. Un des axes majeurs de recherche de notre laboratoire est l'étude de ces domaines.

Dans ce contexte, je me suis focalisée sur l'étude des boucles intracellulaires d'ABCG2. Une implication dans la liaison aux NBDs est suggérée mais peu de données sont actuellement disponibles sur les 2 premières boucles. Nous supposons que ces régions seraient également impliquées dans la reconnaissance des substrats d'ABCG2, avant que ces derniers n'atteignent leur site de transport. En effet, certains substrats non transportés par la forme naturelle d'ABCG2 tels que les anthracyclines ou la rhodamine 123, se fixent avec la même affinité sur la forme naturelle et sur la forme mutée ABCG2^{R482T/G} (Pozza *et al.*, 2006). Ceci signifie donc que le site de transport et le site de reconnaissance (ou de sélection) des drogues sont distincts. Nous supposons également que le lieu de reconnaissance des substrats serait situé en amont de cette mutation. Le résidu arginine 482 est positionné dans la 3^{ème} hélice transmembranaire, du côté du feuillet interne de la membrane plasmique. Il est donc envisageable que le site de reconnaissance soit situé sur les boucles intracellulaires.

Nous avons donc souhaité étudier le rôle de ces boucles dans la reconnaissance des substrats d'ABCG2. Pour cela, j'ai tout d'abord établi un nouveau système d'expression d'ABCG2 en cellules de mammifères, permettant l'étude de la protéine dans des conditions optimales. Puis, différents acides aminés des boucles intracellulaires ICL0 et ICL1 ont été mutés en alanine afin d'étudier leur rôle fonctionnel dans ABCG2.

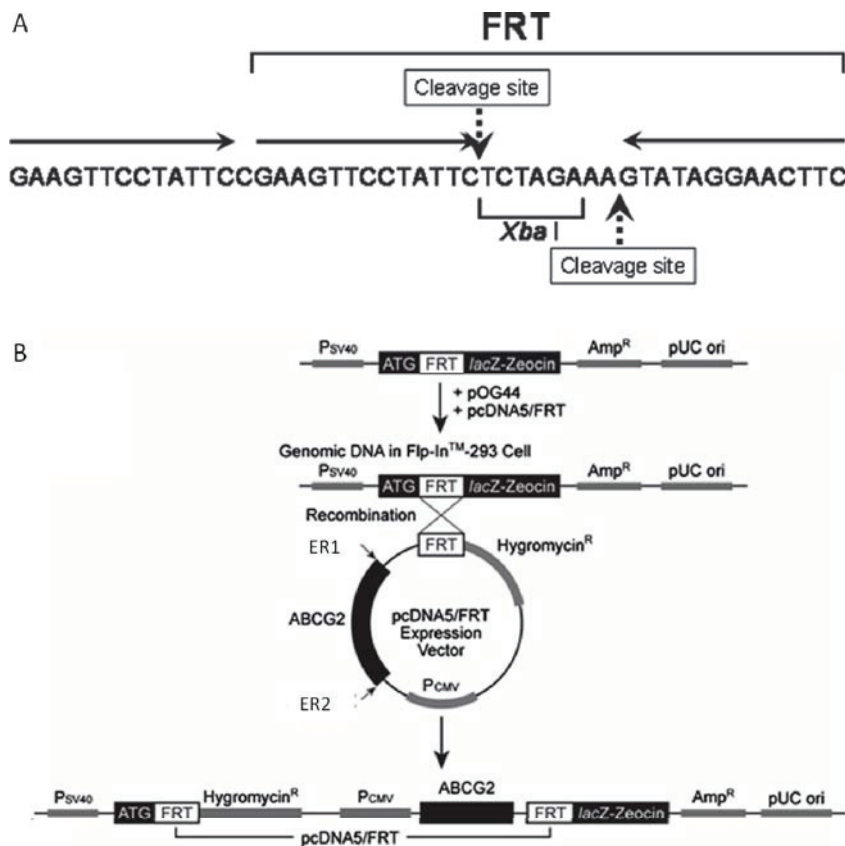


Figure 58 : Principe du système Flp-In™.

A : Le site FRT Flp Recombination Target.

B : La séquence d'ABCG2 est clonée dans le vecteur pcDNA5/FRT par 2 enzymes de restrictions ER1 et ER2, le gène est alors sous le contrôle d'un promoteur de CMV. L'insertion du vecteur codant pour ABCG2 dans le génome des cellules Flp-In™ est effectuée par la recombinase du plasmide POG44.

1. La lignée Flp-InTM-293

La première étape de cette étude a été de développer une nouvelle lignée cellulaire exprimant ABCG2. Nous avons choisi pour cela le système Flp-InTM décrit pour la 1^{ère} fois en 1991 (O'Gorman *et al.*, 1991) et dont le principe est illustré sur la Figure 58. Afin d'insérer le gène d'ABCG2 dans le génome des cellules hôtes, ce système requiert 3 éléments essentiels :

- le site d'insertion FRT unique : ce site FRT (Flp Recombination Target) a été isolé de *S. cerevisiae* (Gronostajski and Sadowski, 1985 ; Jayaram, 1985 ; Senecoff *et al.*, 1985). Il est formé d'une séquence de 34 paires de bases contenant 13 paires de bases répétées de façon imparfaite et séparées par 8 paires de bases, incluant un site de clivage par *Xba*I (Figure 58A).

- le vecteur d'expression pcDNA5/FRT : vecteur dans lequel est cloné le gène d'intérêt. Il contient le même site FRT que les cellules hôtes Flp-InTM permettant son insertion dans le génome des cellules.

- le vecteur POG44 : vecteur exprimant de manière constitutive la Flp recombinase qui, grâce à une co-transfection avec le vecteur pcDNA5/FRT, permet la recombinaison de ce dernier dans le génome des cellules hôtes (Figure 58B).

Les étapes de clonage et de transfection sont détaillées dans la partie *Matériels et méthodes*.

Les cellules utilisées Flp-InTM-293 sont des cellules dérivées des HEK-293. Le site unique FRT présent dans le génome de ces cellules leur permet d'intégrer le plasmide en un site unique du génome. Ainsi, le gène de la protéine d'intérêt ne s'intégrera qu'une seule fois dans le génome et dans une zone connue et identique pour chaque cellule. Ceci présente plusieurs avantages non négligeables : tout d'abord, une sélection monoclonale n'est pas nécessaire, ce qui est un gain de temps considérable, ensuite, le nombre de copie d'ADN recombinant inséré est fixe. Ce point est indispensable à la comparaison quantitative des mutants entre eux, et avec la protéine naturelle. Les différences observées seront alors directement imputables à la mutation. Enfin, ce système permet l'étude d'ABCG2, protéine humaine, dans des cellules humaines.

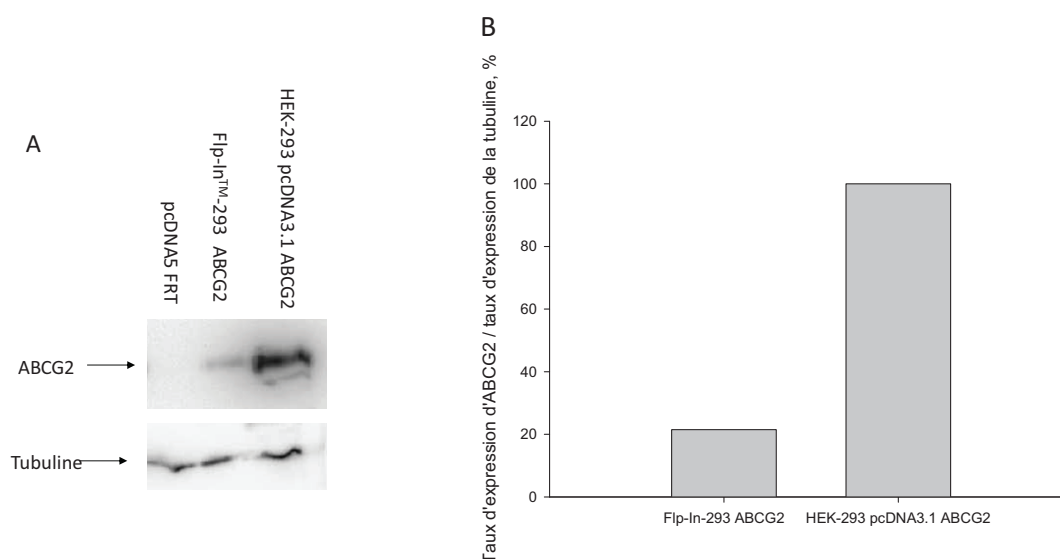
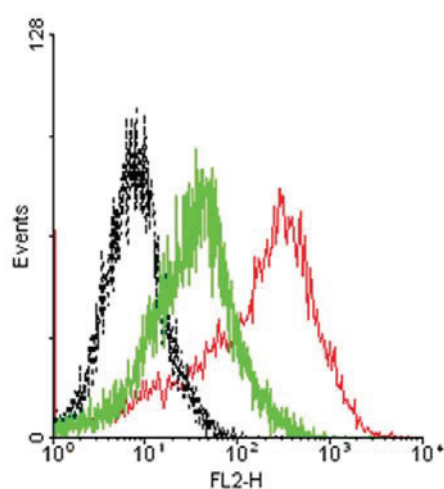


Figure 59 : Taux d'expression d'ABCG2 dans le système Flp-InTM-293 comparé aux cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2.

A : Le western blot est réalisé selon le protocole décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Les anticorps dirigés contre ABCG2 et contre la tubuline sont respectivement BXP21 et l'anti-tubuline α .

B : Quantification, réalisée par le logiciel Quantity One, du taux d'expression d'ABCG2 rapporté au taux d'expression de la tubuline dans les cellules. Le maximum d'expression (100%) est l'expression d'ABCG2 dans les cellules HEK-293 transfectées.



HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 (valeur : 280)

Flp-InTM-293 ABCG2 (valeur : 35)

Flp-InTM-293 pcDNA5 FRT (valeur : 7)

Figure 60 : Quantification de l'adressage d'ABCG2 à la membrane plasmique dans les 2 systèmes cellulaires étudiés.

2. Comparaison de 2 lignés cellulaires

L'utilisation de ce système pour l'expression d'ABCG2 et l'étude des mutants a été validée par Tamura et collaborateurs en 2006 (Tamura *et al.*, 2006). Cependant, nous avons souhaité comparer l'expression et l'activité d'ABCG2 dans ce système avec le modèle d'expression utilisé habituellement dans notre laboratoire : les cellules HEK-293 transfectées avec le plasmide pcDNA3.1 ABCG2.

2.1. Expression d'ABCG2

2.1.1. Taux d'expression d'ABCG2

Le premier contrôle effectué a été la quantification et la comparaison de l'expression d'ABCG2 dans les 2 systèmes. Pour cela, un western blot est réalisé sur un extrait cellulaire de protéines et les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 59.

Ainsi, les cellules Flp-InTM-293 ABCG2 expriment environ 5 fois moins la protéine que les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 (22% *versus* 100%). La diminution d'expression était attendue puisqu'une copie seulement du gène d'ABCG2 est insérée dans le génome des cellules Flp-InTM-293 contre un nombre variable de copies dans celui des cellules HEK-293.

2.1.2. Adressage d'ABCG2 à la membrane plasmique

L'expression d'ABCG2 à la membrane plasmique a été quantifiée par l'utilisation de l'anticorps 5D3, couplé à la phycoérythrine et dirigé spécifiquement contre la 3^{ème} boucle extracellulaire d'ABCG2. La quantification de la fluorescence, proportionnelle au taux de protéines ABCG2 exprimées à la membrane plasmique, a été réalisée par cytométrie en flux comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Les mesures effectuées sont présentées dans l'histogramme de la Figure 60.

De la même façon que pour le taux d'expression d'ABCG2, l'adressage à la membrane plasmique de la protéine est plus faible dans les cellules Flp-InTM-293 : ABCG2 est environ 8 fois moins abondant à la membrane de ces cellules comparé aux cellules HEK-293. Cependant, on observe une différence qualitative notable dans l'adressage d'ABCG2 dans ces 2 systèmes : les cellules Flp-InTM-293 ABCG2 ont un adressage plus homogène que les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2. En effet, le pic de fluorescence de ces dernières

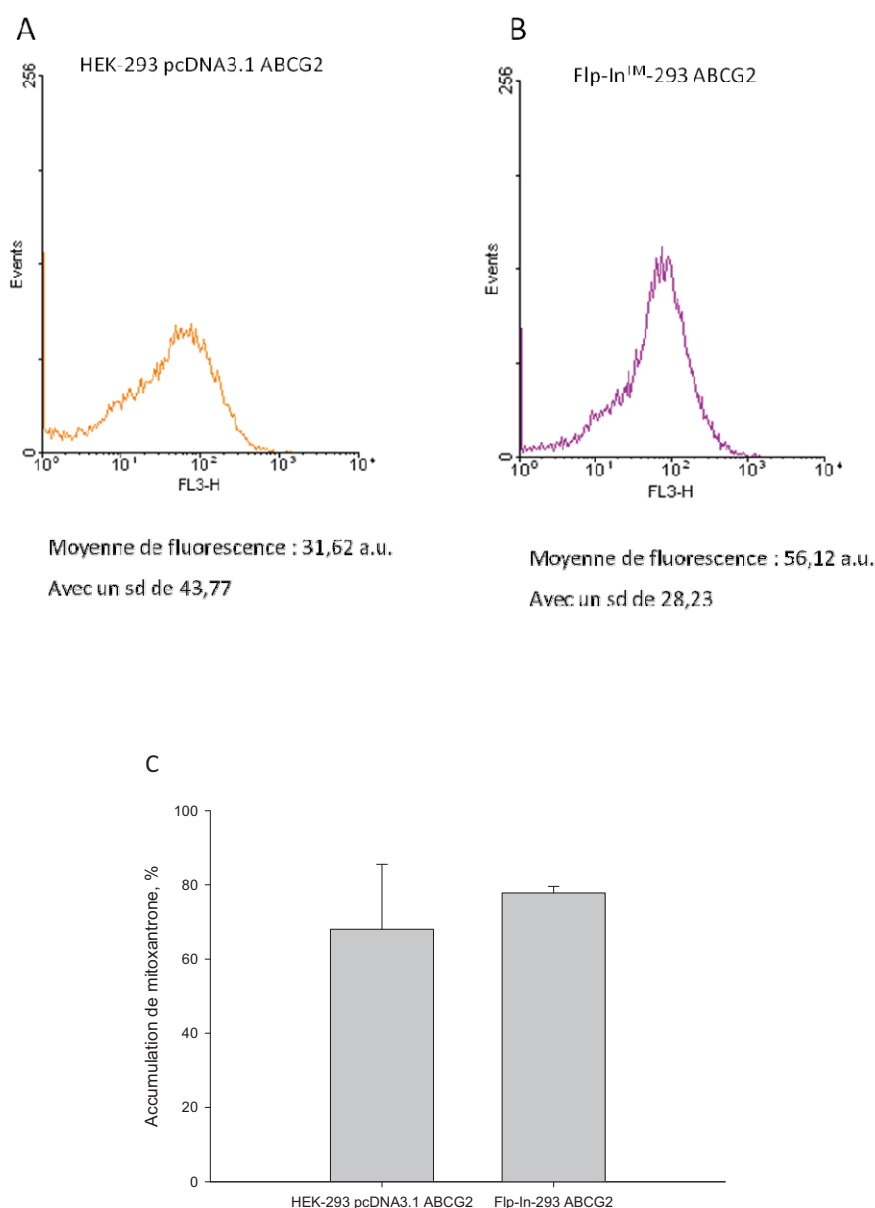


Figure 61 : Quantification de l'efflux de mitoxantrone par ABCG2 dans 2 systèmes d'expression.

Histogramme représentant la fluorescence résiduelle de mitoxantrone dans les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 (A) et Flp-InTM-293 ABCG2 (B). La mesure du transport par ABCG2 est réalisée comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. La mitoxantrone est excitée à 488 nm par le laser argon du cytomètre et son émission est mesurée à 650 nm. Les valeurs sont en unité arbitraire (a.u.).

C : La quantification est réalisée en prenant comme 100% d'accumulation les cellules n'exprimant pas ABCG2. Les valeurs correspondent à des duplicats indépendants.

est étalé, trainant particulièrement dans les valeurs basses. Ceci reflète l'hétérogénéité des cellules : certaines expriment plus de protéine ABCG2 à la membrane plasmique que d'autres. En ce qui concerne les cellules Flp-InTM-293 ABCG2, le pic de fluorescence est symétrique, les cellules apparaissent donc relativement homogènes.

En conclusion, même si les cellules Flp-InTM-293 ABCG2 expriment moins de protéine, l'expression semble plus homogène que pour les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2.

2.2. Transport de substrats

L'étape suivante a été de contrôler la capacité de transport d'ABCG2 dans les cellules Flp-InTM-293. Nous avons souhaité connaître l'impact de la diminution d'expression et d'adressage d'ABCG2 sur cette activité de transport. Nous avons pour cela quantifié par cytométrie en flux l'efflux de mitoxantrone, substrat fluorescent d'ABCG2, dans les 2 systèmes d'expression. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 61.

L'accumulation de mitoxantrone dans les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 est plus faible que dans les cellules Flp-InTM-293 ABCG2, ce qui traduit un efflux moins important de ce substrat dans ces dernières. Cependant, malgré le taux d'expression à la membrane plasmique 8 fois plus faible, l'efflux de mitoxantrone n'est que légèrement diminué : 32% de transport pour HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 contre 22% de transport dans les cellules Flp-InTM-293 ABCG2. Les protéines adressées à la membrane plasmique, dans le 1^{er} système, ne sont donc, très certainement, pas toutes fonctionnelles.

Le 2^{ème} point à noter est que les cellules Flp-InTM-293 ABCG2 semblent effectivement plus homogènes que les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2. En effet, sur la Figure 61 le pic de fluorescence est plus fin pour la Figure 61B (56 ± 28 a.u) que pour la Figure 61A (33 ± 44 a.u.). Enfin, la quantification de l'efflux de mitoxantrone étant plus reproductible dans les cellules Flp-InTM-293 ABCG2 que dans les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2, on peut supposer que le système Flp-InTM-293 est moins variable dans le temps (Figure 61C).

En conclusion, même si les cellules Flp-InTM-293 expriment 8 fois moins ABCG2 à la membrane plasmique, le transport de substrats est quasiment équivalent dans les 2 systèmes. De plus, ce système présente l'avantage d'être plus homogène et plus reproductible.

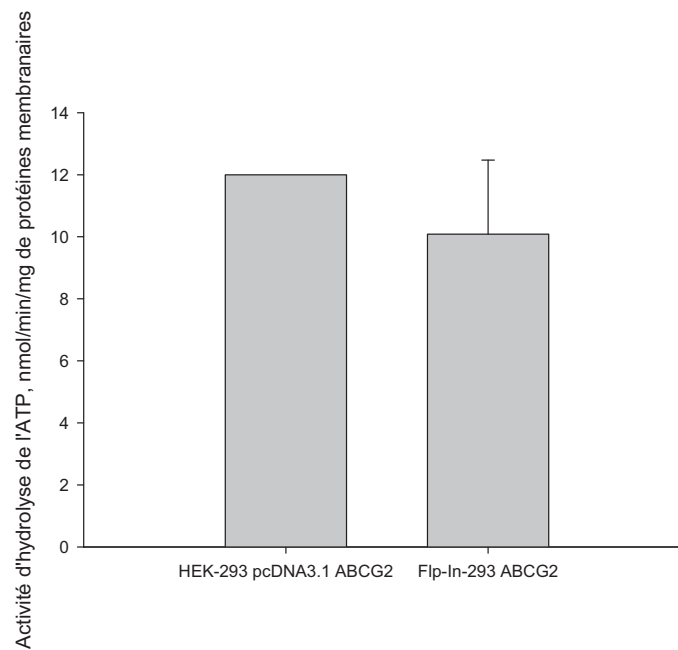


Figure 62 : Comparaison de l'activité d'hydrolyse d'ATP vanadate-sensible sur un extrait total de protéines membranaires des 2 systèmes étudiés.

L'activité d'hydrolyse de l'ATP est mesurée sur des membranes de cellules préparées comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. L'activité mesurée est vanadate sensible.

2.3. Activité d'hydrolyse d'ATP

Afin de comparer l'efficacité d'ABCG2 exprimée dans le système Flp-InTM-293 et dans les cellules HEK-293, nous mesurons l'activité d'hydrolyse d'ATP d'un extrait de protéines membranaires. La mesure est réalisée en présence de vanadate, un inhibiteur spécifique de l'activité d'hydrolyse d'ATP des transporteurs ABC, permettant de quantifier l'activité spécifique du transporteur. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure ci-contre.

Ainsi, de la même façon que pour le transport de substrat, malgré le taux plus faible de protéines exprimées, l'activité d'hydrolyse d'ATP est quasiment équivalente dans les 2 types cellulaires. On peut donc supposer que les protéines exprimées dans les cellules Flp-InTM-293 soient plus actives ou bien que les protéines exprimées par les cellules HEK-293 ne soient pas toutes fonctionnelles. Cette 2^{ème} hypothèse semble plus plausible ; si le taux de production des protéines est trop important, il est possible que certaines ne soient pas repliées correctement et ne soient donc pas fonctionnelles.

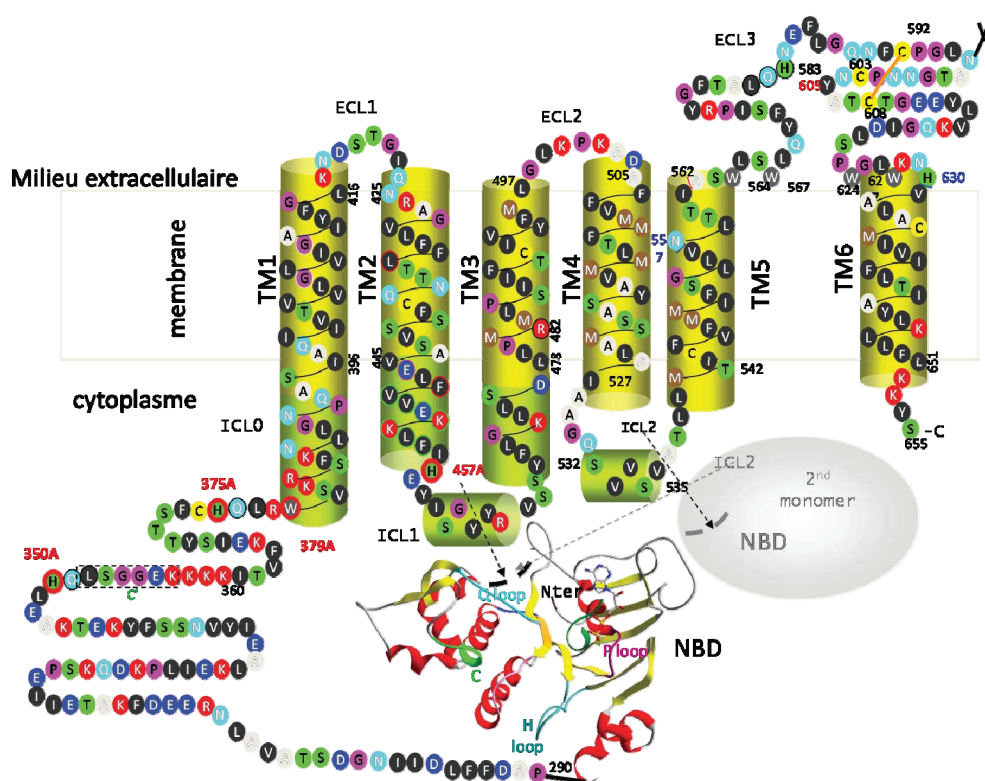


Figure 63 : Modèle topologique en 2D d'ABCG2. Les résidus mutés sont encadrés en rouge.
Ce modèle a été établi par alignement de séquence avec 3 transporteurs ABC bactériens, BmrA, Sav1866 et MsbA (P.Falson, non publié).
Les résidus sélectionnés, dans ICL0 (H350, H375 et W379) et dans ICL1 (H457), sont mutés en alanine.

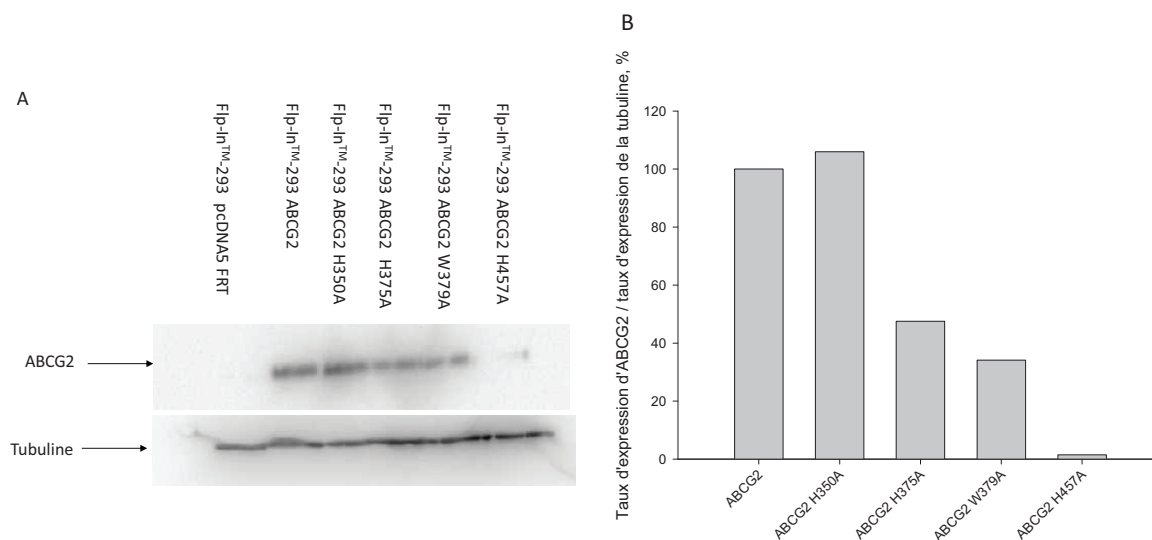


Figure 64 : Quantification du taux d'expression d'ABCG2 muté.
A : Western-blot réalisé sur un extrait de protéines totales. Les anticorps dirigés respectivement contre ABCG2 et la tubuline sont BXP21 et l'anti tubuline α .
B : Quantification, par le logiciel Quantity One, du taux d'expression d'ABCG2 rapporté à l'expression de la tubuline. Le 100% d'expression correspond au taux d'expression de la protéine naturelle ABCG2.

3. Les mutants

3.1. Le choix des mutants

Afin d'étudier le rôle des boucles intracellulaires d'ABCG2, 4 mutants ont été créés dans les 2 premières boucles intracellulaires (Figure 63). Les résidus sélectionnés, H350, H375, W379 et H457, sont des résidus proches des hélices transmembranaires ou de la signature C2. Les résidus H375, W379 et H457 sont conservés chez les orthologues d'ABCG2 de l'homme, de la souris, du rat, du singe et des bovins, tandis que le résidu H350 est conservé chez l'homme et le singe et correspond à un résidu aspartate chez la souris et le rat. Ces résidus étant fortement conservés ou partageant de fortes similarités dans leur polarité, on peut supposer qu'ils jouent un rôle important dans la fonctionnalité d'ABCG2. Nous avons choisis de muter ces 4 résidus en alanine, acide aminé hydrophobe et de petite taille. L'étude de ces mutations permet une première évaluation de l'importance de ces boucles dans la reconnaissance des substrats. D'autres mutations seront par la suite envisagées en fonction des résultats obtenus.

Les mutants sont réalisés dans le vecteur pcDNA5/FRT ABCG2 comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Ils ont ensuite été transfectés de manière stable dans les cellules Flp-InTM-293.

3.2. Taux d'expression d'ABCG2 muté dans les cellules Flp-InTM-293

3.2.1. Taux d'expression total

Afin de déterminer l'impact des mutations sur l'expression de la protéine, la quantité d'ABCG2 a été estimée par western-blot selon le protocole décrit dans la partie *Matériels et méthodes*.

Ainsi, comme observé sur la Figure 64, le mutant H350A est autant exprimé que la protéine naturelle. Les 2 mutants H375A et W379A ont un taux d'expression de 50% et 33% par rapport à l'expression de la protéine naturelle tandis que le mutant H457A est très faiblement exprimé (taux d'expression diminué de plus de 10 fois). Ce faible taux d'expression de H457A est retrouvé dans une étude récente de Mao et collaborateurs (Cai *et al.*, 2010).

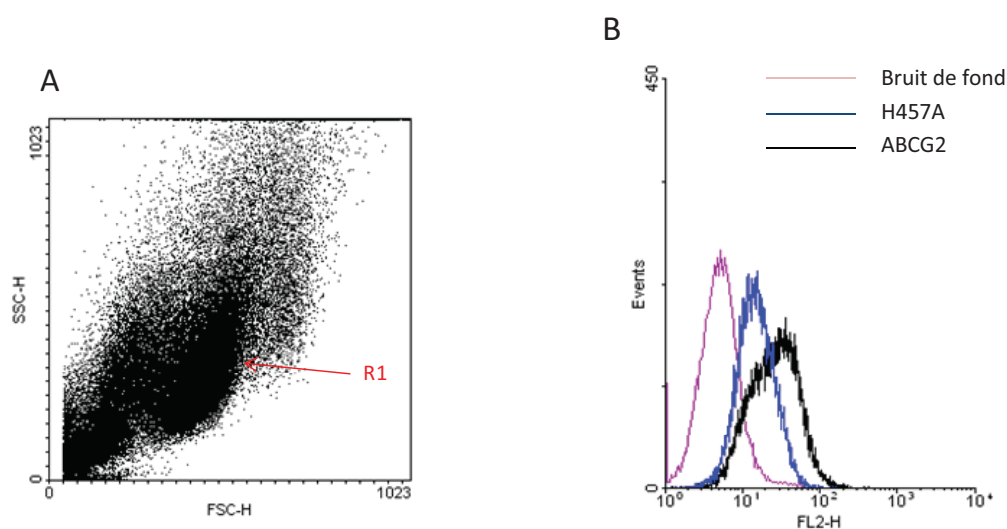


Figure 65 : Taux d'expression membranaire d'ABCG2 naturelle et H457A.

A : Dot Plot permettant la sélection de la population d'intérêt, R1.

B : Histogramme représentant les taux d'expression membranaire d'ABCG2 naturelle (en noire) et H457A (en bleue) ; en rose est représenté le bruit de fond.

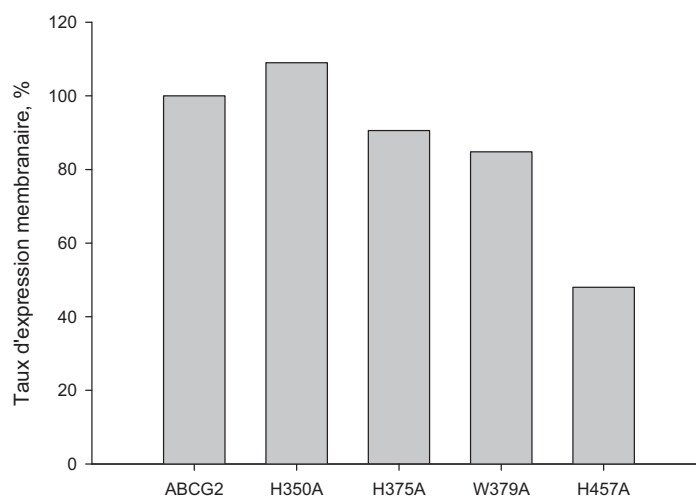


Figure 66 : Comparaison de l'expression membranaire d'ABCG2 naturelle ou mutée.

Les valeurs d'expression membranaire sont calculées après avoir soustrait le bruit de fond de chaque mutant à la valeur de fluorescence mesurée. Le taux d'expression est alors rapporté à celui la protéine naturelle et est exprimé en pourcentage.

3.2.2. Taux d'expression à la membrane plasmique

Le taux d'adressage des formes naturelle et mutées d'ABCG2 à la membrane plasmique est quantifié par cytométrie en flux, par l'utilisation de l'anticorps 5D3, spécifique d'ABCG2, selon le protocole décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. La figure ci-contre illustre l'expression membranaire des formes naturelle et H457A d'ABCG2.

Les mêmes histogrammes sont obtenus pour les 4 mutants et les valeurs moyennes de fluorescence mesurées étant proportionnelles au taux d'expression membranaire d'ABCG2, le taux d'expression membranaire des protéines a été quantifié. Après avoir enlevé le bruit de fond de chaque essai, les pourcentages d'expression membranaires d'ABCG2 ont été calculés et les résultats sont présentés ci-contre.

En comparaison avec la protéine naturelle, le taux d'expression des protéines mutées à la membrane plasmique diffère de celui mesuré en expression totale. En effet, l'expression totale des mutants H375A, W379A et H457A étaient, respectivement de 50%, 33% et de moins de 10% tandis que l'expression membranaire est de 90%, 85% et 50% par rapport à ABCG2.

Il est possible que le western-blot effectué avec l'anticorps BXP21 ne reflète pas l'expression totale réelle des mutants H350A, H375A et W379A. En effet, ces 3 mutations sont situées dans l'épitope reconnu par BXP21 (acides aminés 271-396 d'ABCG2) ce qui peut gêner la reconnaissance d'ABCG2 par l'anticorps. Cependant, nous notons que la mutation H350A n'affecte pas cette reconnaissance puisque le taux d'expression total et membranaire est similaire. Enfin, le mutant H457A n'est pas concerné par ce problème puisque la mutation se situe assez loin de l'épitope reconnu par BXP21. Il est donc possible qu'une partie des protéines d'ABCG2 naturelle produites ne soit pas adressée à la membrane plasmique mais reste dans les organites internes.

Les substrats étant transportés par les protéines exprimées à la membrane plasmique, nous utiliserons ce taux d'expression afin de comparer les efficacités réelles de transport ou d'activité d'hydrolyse de l'ATP.

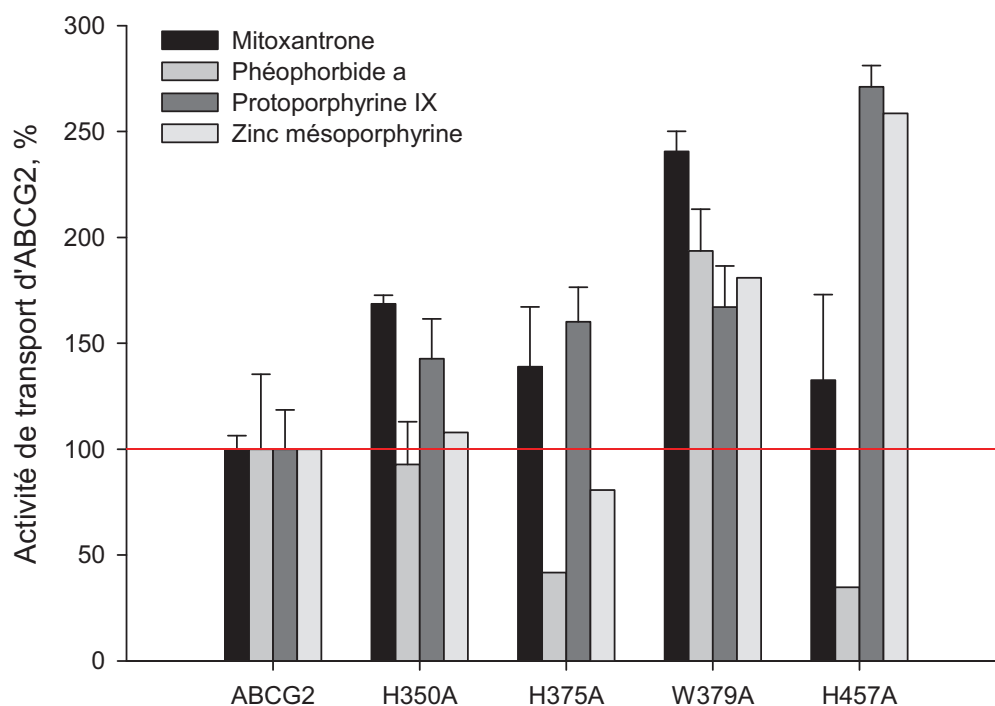


Figure 67 : Activité de transport d'ABCG2 naturelle ou mutée.

La capacité d'efflux des substrats est quantifiée par cytométrie en flux. Le maximum d'efflux correspond à l'activité de la protéine naturelle. Quatre substrats sont testés : la mitoxantrone, le phéophorbide a, la protoporphyrine IX et la zinc mésoporphyrine. L'activité de transport est rapportée à la quantité de protéines membranaires exprimées.

3.3. Caractérisations des mutants

3.3.1. Transport de substrats

Afin de déterminer l'impact des mutations sur la reconnaissance des substrats par ABCG2, nous mesurons non seulement la capacité de transport de plusieurs substrats, mais également la sensibilité des cellules exprimant ces mutants à certains agents cytotoxiques.

3.3.1.1. Cytométrie en flux

La capacité de transport d'ABCG2 et de ses mutants a été quantifiée par cytométrie en flux, comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Nous avons pour cela quantifié le transport de 6 substrats : la mitoxantrone, le phéophorbide a, la protoporphyrine IX, la zinc mésoporphyrine, la daunorubicine et la doxorubicine, ces 2 derniers n'étant pas transportés par ABCG2 naturelle mais par les mutants ABCG2^{R482T/G}. Le transport mesuré est exprimé en pourcentage, en fixant comme 100% l'activité d'ABCG2 naturelle. Le taux de transport mesuré est rapporté au taux d'expression membranaire des mutants, afin d'étudier l'impact réel de la mutation sur l'activité de transport. Les résultats sont présentés sur la Figure 67.

Ainsi, nous observons des différences significatives dans l'activité de transport des mutants par rapport à la protéine naturelle mais également entre eux ; certains mutants sont jusqu'à 2,7 fois plus efficace que la protéine naturelle.

Le mutant H350A transporte la mitoxantrone et la protoporphyrine IX avec une efficacité augmentée de 60% par rapport au sauvage tandis que sa capacité à expulser le phéophorbide a et la zinc mésoporphyrine est équivalente au sauvage. Le mutant H375A transporte plus efficacement 2 substrats : la mitoxantrone et la protoporphyrine IX (transport augmenté respectivement de 50% et 60%). Le phéophorbide a ainsi que la zinc mésoporphyrine semblent moins transportés par ce mutant (efflux diminué respectivement de 60% et de 20%). Le mutant le plus intéressant semble être W379A. Son activité d'efflux est augmentée pour les 4 substrats testés ici et cela de manière importante : le transport de mitoxantrone est augmenté de 150%, le phéophorbide a de 90%, la protoporphyrine IX de 70% et la zinc mésoporphyrine 80%. Enfin, comme il a récemment été rapporté, le mutant H457A, malgré son faible taux d'expression, transporte plus efficacement la mitoxantrone (transport

augmenté de 30%) (Cai *et al.*, 2010), ainsi que la protoporphyrine IX (70%) et la zinc mésoporphyrine (60%). Le phéophorbide a, quant à lui, est expulsé moins efficacement par ce mutant (efflux diminué de 66%).

Ainsi, les boucles intracellulaires semblent être une région importante pour l'activité d'efflux des substrats par ABCG2. La mutation W379A est particulièrement intéressante, puisqu'elle provoque un gain de fonction pour le transport des substrats d'ABCG2.

L'augmentation de l'efflux de tous les substrats par la mutation W379A semble indiquer que ce résidu influence la capacité de transport d'ABCG2, plus que sa spécificité. Au contraire, les effets différents observés selon les substrats avec les mutations H350A, H375A et H457A semblent indiquer que ces résidus pourraient être impliqués dans la spécificité des substrats d'ABCG2.

Nous avons par la suite testé si ces mutations modifiaient le spectre des substrats d'ABCG2, de la même façon que la mutation R482T permet l'efflux de daunorubicine et de doxorubicine (Honjo *et al.*, 2001). Nous avons donc testé la capacité d'efflux de ces substrats par ABCG2 naturelle ou mutée. Aucun des 4 mutants ne semble transporter ces 2 substrats.

3.3.1.2. Dosage de l'efflux d'hémine par chromatographie liquide haute performance

L'étude de transport a été complétée par la quantification de l'efflux d'hémine par ABCG2 naturelle ou mutée. L'objectif ici était double : dans un premier temps, ceci nous permet d'étudier l'efflux d'un substrat supplémentaire par ABCG2 naturelle ou mutée. De plus, les substrats étudiés précédemment étant principalement des porphyrines (phéophorbide a, protoporphyrine IX et zinc mésoporphyrine), il nous semblait intéressant de déterminer si la variation d'efflux était spécifique à toutes les porphyrines ou commune à tous les substrats d'ABCG2. Dans un 2^{ème} temps, nous voulions démontrer l'efflux direct d'hémine par ABCG2. Il est maintenant connu qu'ABCG2 transporte diverses porphyrines (Jonker *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2005) et qu'il existe une interaction directe entre l'hémine et ABCG2 (Krishnamurthy *et al.*, 2004), mais son efflux direct n'a jamais été démontré.

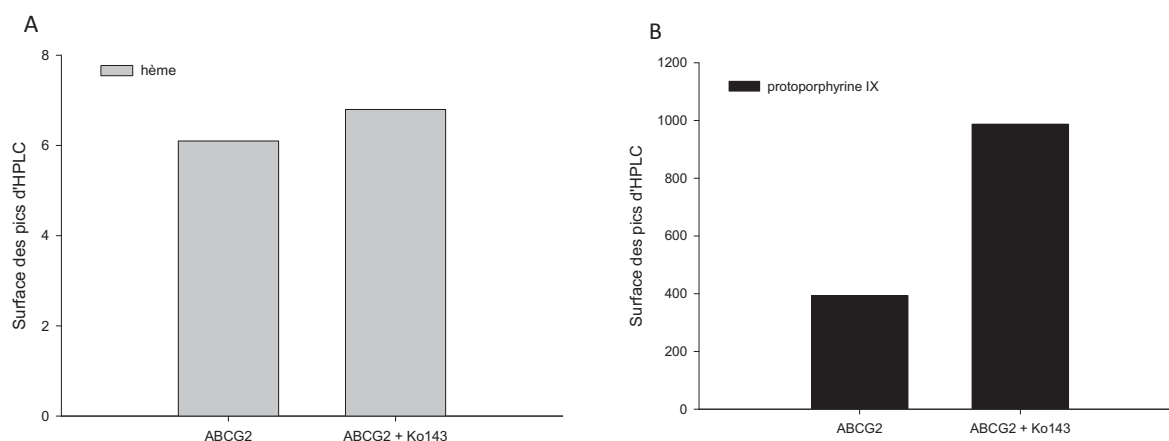


Figure 68 : Quantification du taux résiduel d'hème et de protoporphyrine IX dans les cellules exprimant ABCG2.

La mesure est effectuée en présence ou non d'inhibiteur spécifique d'ABCG2, le Ko143. Nous représentons ici la surface des pics d'HPLC qui est proportionnelle à la quantité du produit détecté.

A : Surfaces des pics mesurées à 13 min de rétention correspondant à l'hème.

B : Surfaces des pics mesurés à 16 min de rétention, correspondant à la protoporphyrine IX.

Comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*, les cellules ont été soumises pendant 21 h à 1 mM d'acide δ -aminolévulinique, en présence ou non d'inhibiteur d'ABCG2, afin de stimuler la synthèse d'hème. Les cellules sont ensuite lysées et la concentration résiduelle d'hémine est dosée par HPLC. Les chromatogrammes obtenus possèdent 2 pics à différents temps de rétention : le 1^{er} à 13 min correspondant à l'hémine et le 2^{ème} à 16 min qui correspond à la protoporphyrine IX, précurseur de l'hème. La quantité intracellulaire des 2 composés est présentée sur la Figure 68.

Comme on peut le voir sur la figure ci-contre, la protoporphyrine IX est présente en quantité beaucoup plus importante dans les cellules que l'hémine (surface du pic de protoporphyrine IX des cellules ABCG2 + Ko143 de 1000 contre 6,8 pour l'hémine). La protoporphyrine IX étant le précurseur direct de l'hémine, il est fort probable que la ferrochelatase soit saturée et ne puisse pas ajouter un atome de fer à toutes les molécules de protoporphyrine IX produites. Les quantités d'hémine mesurées étant faibles, il est difficile de déterminer si l'écart observé entre le taux résiduel d'hémine dans les cellules exprimant ABCG2 en présence de Ko143 (surface du pic de 6,8) ou en son absence (surface du pic de 6,2) est significatif.

Le transport de protoporphyrine IX par ABCG2 est, quant à lui, facilement visualisable sur la Figure 68B. L'ajout de Ko143 augmente la quantité résiduelle de cette molécule d'un facteur 3, confirmant le transport déjà observé en cytométrie en flux.

Il n'est donc pas possible de mettre en évidence l'efflux d'hémine par ABCG2 par cette méthode. L'efflux de protoporphyrine IX ayant déjà été quantifié par cytométrie en flux, l'étude des mutants n'a pas été réalisée ici.

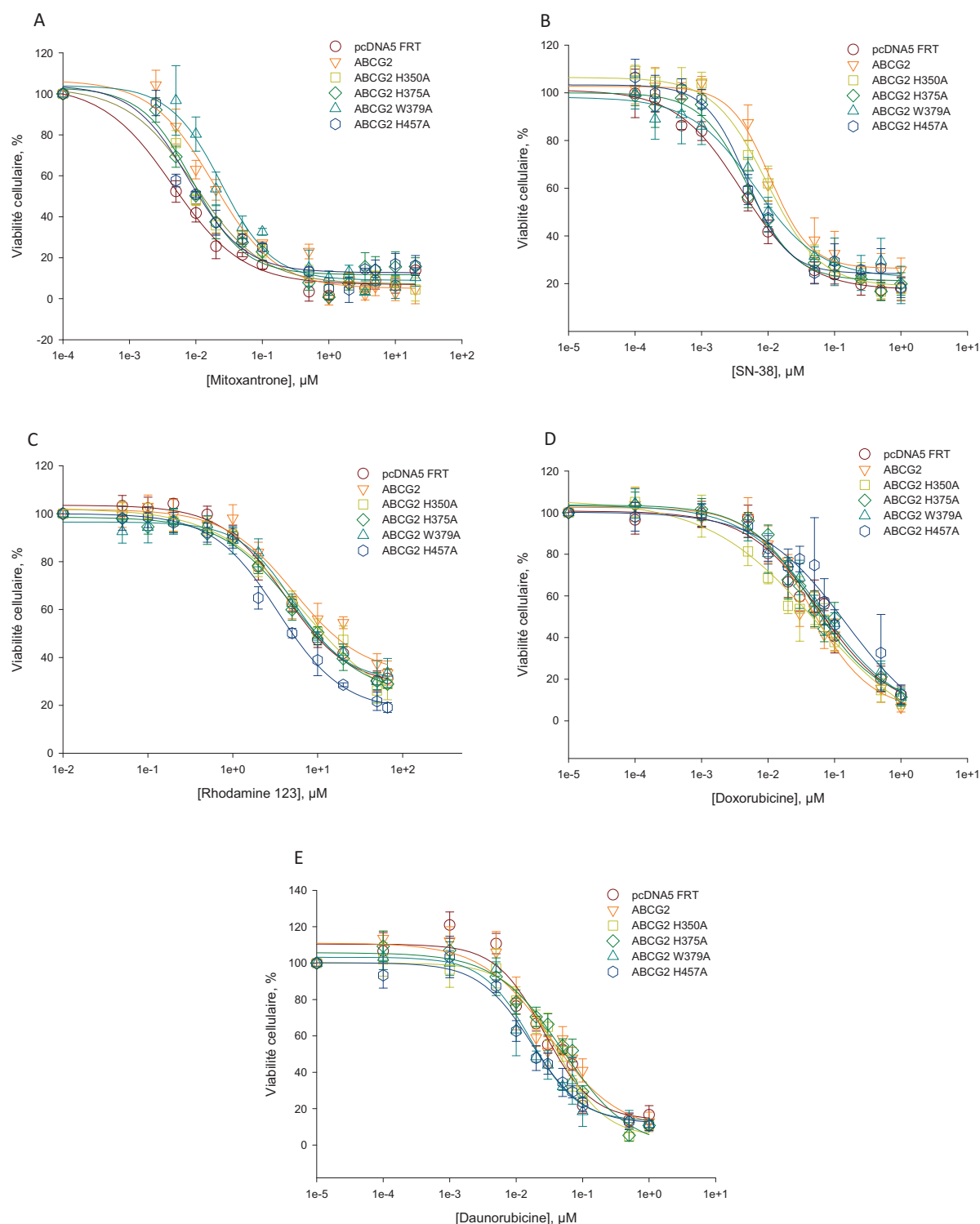


Figure 69 : Cytotoxicité induite par différents substrats d'ABCG2 sur des cellules exprimant la protéine naturelle ou mutée.

La cytotoxicité de 5 substrats a été testée, la mitoxantrone (A), le SN-38, métabolite actif de l'irinotécan (B), la rhodamine 123 (C), la doxorubicine (D) et la daunorubicine (E) sur les cellules exprimant (triangles oranges) ou non (cercles bordeaux) la protéine naturelle ou les mutants H350A (carrés verts clairs), H375A (losanges verts), W379A (triangles bleus clairs) ou H457A (hexaèdres bleus).

Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expérimentations indépendantes en triplicate.

3.3.1.3. Chimiosensibilisation

Afin d'explorer plus en détail l'impact des mutations d'ABCG2 sur le transport de substrat, nous réalisons des tests de cytotoxicité sur des cellules exprimant la protéine ABCG2 naturelle ou mutée avec différents substrats (mitoxantrone, SN-38, rhodamine 123, daunorubicine et doxorubicine). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 69 et les valeurs d'IC₅₀, correspondant à la concentration en drogue induisant 50% de mortalité cellulaire, sont présentées dans le Tableau 13. Les valeurs d'IC₅₀ présentées dans ce tableau ne sont pas rapportées aux taux d'expression des protéines afin d'étudier la résistance réelle des cellules par contre celles présentées dans le Tableau 14 le sont.

Comparé à la résistance des cellules transfectées avec le vecteur vide, nous notons que la protéine ABCG2 confère une résistance aux cellules vis-à-vis de la mitoxantrone et du SN-38. La doxorubicine, la daunorubicine et la rhodamine 123 n'étant, quant à elles, pas transportées par cette protéine, la sensibilité des cellules est identique pour les 2 types cellulaires.

Du fait de l'expression plus faible des protéines mutées, la résistance des cellules est bien souvent inférieure à celle des cellules exprimant la protéine naturelle (Tableau 13), la résistance a donc été rapportée au taux d'expression membranaire, pour les substrats transportés (le Tableau 14) afin de comparer ces résultats avec ceux du transport.

Contrairement à ce que nous attendions, nous ne retrouvons pas ici un transport de mitoxantrone plus efficace par les 4 mutants. En effet, les cellules exprimant ABCG2 mutée ne résistent pas à des concentrations plus élevées de mitoxantrone que les cellules exprimant la protéine sauvage (Tableau 14). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'activité de transport est mesuré après une incubation d'une heure seulement ; alors que la chimiorésistance est mesurée après 72 h d'incubation. Des mécanismes autres peuvent alors se mettre en place. Nous notons cependant que les cellules exprimant ABCG2 W379A résistent à des concentrations plus fortes de mitoxantrone, confirmant sa plus grande capacité à expulser la mitoxantrone.

	Mitoxantrone		SN-38		Rhodamine 123		Doxorubicine		Daunorubicine	
	IC ₅₀ , µM	Ratio	IC ₅₀ , µM	Ratio	IC ₅₀ , µM	Ratio	IC ₅₀ , µM	Ratio	IC ₅₀ , µM	Ratio
pcDNA5 FRT	0,005		0,007		9		0,057		0,04	
ABCG2	0,02	4 (1)	0,02	2,8 (1)	16	1,8 (1)	0,06	1 (1)	0,05	1,25 (1)
H350A	0,013	2,6 (0,65)	0,01	1,4 (0,5)	11,9	1,3 (0,7)	0,057	1 (1)	0,044	1,1 (0,88)
H375A	0,011	2,2 (0,55)	0,008	1,1 (0,4)	9	1 (0,6)	0,07	1,2 (1,2)	0,055	1,4 (1,1)
W379A	0,029	5,8 (1,45)	0,01	1,4 (0,5)	9,6	1,1 (0,6)	0,07	1,2 (1,2)	0,022	0,55 (0,44)
H457A	0,01	2 (0,5)	0,007	1 (0,3)	5	0,55 (0,3)	0,11	1,9 (1,8)	0,02	0,55 (0,44)

Tableau 13 : Résistance des cellules exprimant ou non ABCG2 naturelle ou mutée.

Les IC₅₀ des substrats sont calculées à l'aide de la Figure 69. Le ratio correspond à la résistance des cellules exprimant ABCG2 naturelle ou mutée par rapport aux cellules n'exprimant pas la protéine ; la valeur du ratio entre parenthèses correspond à l'altération par mutation de la résistance cellulaire, c'est-à-dire à la comparaison de la résistance induite par ABCG2 mutée par rapport à la protéine naturelle.

	Mitoxantrone	SN-38
	Ratio	Ratio
pcDNA5 FRT		
ABCG2	4 (1)	2,8 (1)
H350A	2,6 (0,65)	1,4 (0,5)
H375A	2,4 (0,6)	1,1 (0,4)
W379A	6,4 (1,61)	1,5 (0,53)
H457A	4 (1)	1 (0,3)

Tableau 14 : Résistance des cellules exprimant ou non ABCG2 naturelle ou mutée rapportée au taux d'expression membranaire

Les ratios sont rapportés au taux d'expression membranaire. Lorsque la protéine mutée ne transporte pas le substrat (IC₅₀ identique au vecteur vide), le ratio n'est pas modifié par rapport au taux d'expression.

Il est intéressant de noter que 2 mutants, H375A et H457A semblent ne pas transporter le SN-38 ou alors très faiblement. En effet, leur résistance est équivalente à celle des cellules n'exprimant pas ABCG2 (Tableau 13). Les 2 mutants H350A et W379A ont une efficacité de transport diminué d'environ 50% pour ce substrat comparé à la protéine sauvage (IC_{50} de 0,01 μ M contre 0,02 μ M). Malgré le taux d'expression plus faible de W379A, la résistance des cellules exprimant cette protéine mutée est quand même inférieure à celles exprimant ABCG2 sauvage (Tableau 14).

La résistance à la rhodamine 123 et à la daunorubicine des cellules exprimant les mutants est plus faible que pour la protéine sauvage. Cependant, nous savons que la protéine naturelle ABCG2 ne transporte pas ces 2 substrats. De ce fait, il n'est pas envisageable que les mutants les transportent moins. De plus, comme on peut l'observer sur les graphiques, en tenant comptes des erreurs expérimentales, les courbes de chimiosensibilisation se superposent (Figure 69).

Concernant la doxorubicine, les mutants H350A, H375A et W379A ne transportent pas ce composé. Cependant, le mutant H457A semble induire une résistance à ce composé : l' IC_{50} des cellules exprimant ce mutant est de 0,11 μ M contre 0,06 μ M pour les cellules exprimant ABCG2 naturelle, ce qui correspond à un ratio de 1,8. Les cellules n'exprimant que 50% du mutant H457 par rapport à la protéine sauvage, on peut penser que cette différence est significative. Dans ce cas, cela signifierait que le mutant H457A produit un gain de fonction en permettant le transport de rhodamine 123. Ceci est cependant en contradiction avec l'activité de transport que nous avons mesurée précédemment et d'après le graphique, l'erreur expérimentale pourrait expliquer cette différence. Ceci doit cependant être confirmé par de nouveaux tests.

Malgré la différence entre la mesure du transport direct et la résistance des cellules exprimant ces mutants, nous notons un impact des mutations sur le transport des substrats. Le cas des mutants H375A et H457A qui ne transportent pas ou très peu le SN-38 est particulièrement intéressant ainsi que le H457A qui pourrait induire l'efflux de doxorubicine. Les boucles intracellulaires semblent donc jouer un rôle important dans le transport des substrats.

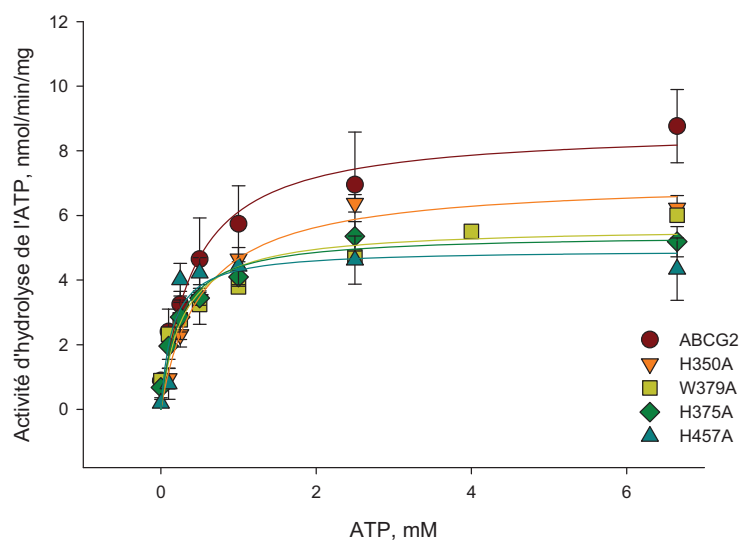


Figure 70 : Activité d'hydrolyse de l'ATP dans des préparations de membranes de cellules exprimant ABCG2 naturelle ou mutée.

L'activité d'hydrolyse de l'ATP des mutants est mesurée avec différentes concentrations d'ATP (de 0 à 6,5 mM). ABCG2 est représenté par des cercles bordeaux, H350A par des triangles oranges, W379A par des carrés verts clairs, H375A par des losanges verts et H457A par des triangles bleus.

Les valeurs correspondent à la moyenne de triplicat indépendants.

3.3.2. Activité d'hydrolyse d'ATP

Nous examinons ensuite si la modification de l'activité de transport peut être une conséquence de changement dans l'activité d'hydrolyse de l'ATP des mutants. Pour cela, nous quantifions l'activité d'hydrolyse de l'ATP sensible au vanadate de membranes de cellules de mammifère Flp-InTM-293 exprimant ABCG2 sous sa forme naturelle ou mutée, comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Le vanadate étant un inhibiteur spécifique de l'activité d'hydrolyse des transporteurs ABC et les membranes utilisées n'exprimant qu'ABCG2, comme transporteur ABC, l'activité sensible au vanadate est donc spécifique de ce transporteur. L'activité de ces transporteurs est tout d'abord quantifiée sans stimulation (basale), puis après stimulation par différents substrats.

3.3.2.1. Activité d'hydrolyse d'ATP basale

Tout d'abord, nous notons que la valeur de l'activité maximale d'hydrolyse est plus faible que celle retrouvée dans la littérature. En effet, en 2010, Mao et collaborateurs ont mesurés une activité maximale de 18,4 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine (Cai *et al.*, 2010). Cette différence peut cependant s'expliquer par le fait que les 2 études ne sont pas réalisées dans le même type de membrane. Nous étudions ici ABCG2 dans les cellules Flp-InTM-293 tandis que Mao et son équipe l'étudient dans les cellules HEK-293. De plus, les expériences ne sont pas réalisées dans les mêmes conditions ; il n'est donc pas possible de comparer les activités d'hydrolyse maximale de l'ATP. Par contre, nous notons que la valeur du K_M d'ABCG2 naturelle est comparable à celle rapportée précédemment, de l'ordre de 0,4 mM (Cai *et al.*, 2010). Ceci est très important car quel que soit le niveau d'expression d'ABCG2, l'ATP aura toujours la même affinité.

L'étude effectuée ici révèle que la valeur du K_M du mutant H350A est comparable à celui de la protéine naturelle, tandis que celles des mutants H375A et W379A sont diminuées d'environ 50% et jusqu'à 70% pour H457A.

	V_{max} nmol Pi/min/mg prot	V_{max}' nmol Pi/min/mg prot	K_M , mM	V_{max}'/K_M nmol/min/mg/mM)
ABCG2	8,69 ± 0,63	8,69 ± 0,63	0,42 ± 0,11	20,58
H350A	7,10 ± 0,46	7,10 ± 0,46	0,52 ± 0,11	13,63
H375A	5,41 ± 0,34	7,3 ± 0,3	0,23 ± 0,06	31,74
W379A	5,64 ± 0,47	6,8 ± 0,57	0,28 ± 0,10	24,29
H457A	4,94 ± 0,54	13,18 ± 2,51	0,15 ± 0,07	87,87

Tableau 15 : Paramètres cinétiques de l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'ABCG2 naturelle ou mutée.

Les paramètres cinétiques sont calculés en traitant les courbes de la Figure 70 par l'équation de Michaelis et Menten : $V = V_{max}[ATP]/([ATP]+K_M)$ où V est la vitesse d'hydrolyse de l'ATP, V_{max} est la vitesse maximale de cette activité, [ATP] est la concentration en ATP et K_M est la constante de Michaelis, reflétant l'affinité de l'ATP pour sa cible. Le V_{max}' correspond à l'hydrolyse maximale rapportée au taux d'expression d'ABCG2 (Figure 64).

Ceci suggère que ces 3 mutations, particulièrement en position 457, améliorent l'affinité de l'ATP pour ABCG2. Après normalisation par rapport au taux d'ABCG2 dans les membranes, nous notons que la valeur du V_{max}' des mutants H350A, H375A et W379A est diminuée respectivement de 18%, 16% et 22%, tandis qu'elle est augmentée de 51% pour le mutant H457A.

Les valeurs de K_M et de V_{max}' nous permettent d'évaluer l'activité d'hydrolyse de l'ATP de chaque mutant (rapport V_{max}'/K_M). Ainsi, ce rapport est diminué de moitié pour le mutant H350A reflétant une activité d'hydrolyse de l'ATP moins efficace que la protéine naturelle. Les mutants H375A et H457A ont une activité d'hydrolyse de l'ATP plus efficace que la protéine naturelle : le rapport V_{max}'/K_M est augmenté, respectivement de 54% et de 327%. Les résultats obtenus avec le mutant H457A sont comparables à ceux publiés récemment (Cai *et al.*, 2010). Le cas peut être le plus intéressant est celui du mutant W379A : le mutant est plus affin pour l'ATP que la protéine naturelle (K_M nettement diminuée) mais sa vitesse maximale étant plus faible, le rapport V_{max}'/K_M n'en est que faiblement modifié : il n'augmente que de 18% ; ainsi malgré une meilleure affinité pour l'ATP, ce mutant n'entraîne pas d'augmentation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP.

Les activités d'hydrolyse de l'ATP et de transport des substrats sont étroitement liées. Ainsi, un transport plus actif de substrat (dû par exemple à une meilleure reconnaissance) peut entraîner une augmentation de l'hydrolyse de l'ATP. A l'inverse, on peut également noter qu'une augmentation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP entraîne un efflux plus actif de substrat. Il n'est pas évident de discriminer qui est responsable et qui est la conséquence de l'autre.

Les mutants H375A et H457A entraîne une augmentation de l'affinité de l'ATP pour les NBD ainsi qu'une augmentation de l'efficacité d'hydrolyse de l'ATP. Cet effet est retrouvé pour les mutants N629A (Ni *et al.*, 2010) et R482T (Pozza *et al.*, 2006) qui montraient une diminution du K_M et une augmentation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Cependant, il n'est pas possible de déterminer, si l'augmentation du transport des substrats est une cause ou une conséquence du changement dans l'activité d'hydrolyse de l'ATP de ces mutants.

L'augmentation de l'activité de transport observée pour les mutants H350A et W379A (respectivement avec les substrats mitoxantrone et zinc mésoporphyrine ; mitoxantrone, phéophorbide a, protoporphyrine IX et zinc mésoporphyrine) est difficilement fiable à la

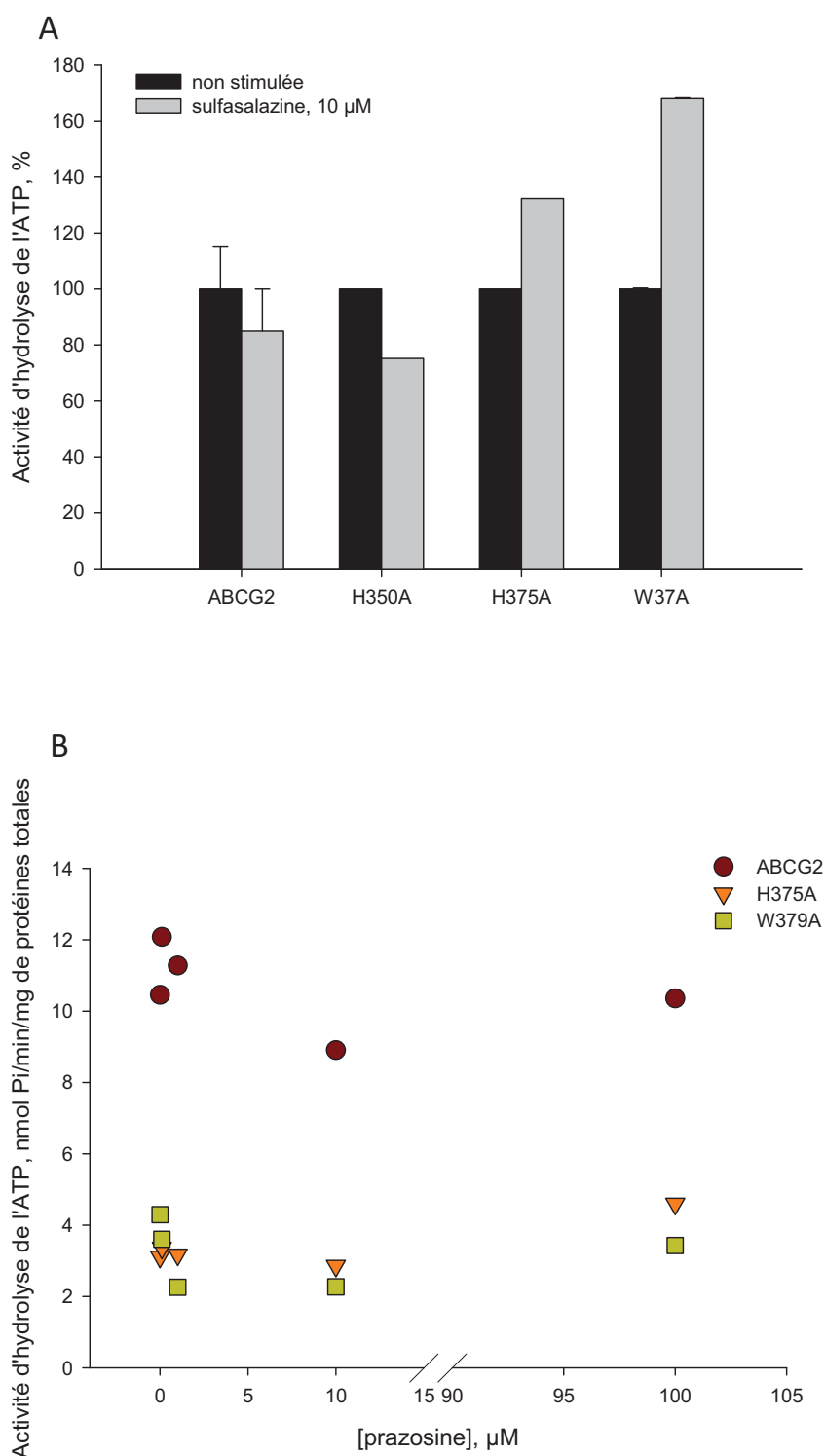


Figure 71 : Activité d'hydrolyse de l'ATP, sur des préparations de membranes exprimant ABCG2 naturelle ou mutée, après stimulation.

A : L'activité d'hydrolyse de l'ATP est mesurée après stimulation (barres grises) ou non (barres noires) par 10 μ M de sulfasalazine. L'activité à 100% est l'activité d'hydrolyse de l'ATP non stimulée pour chaque protéine.

B : L'activité d'hydrolyse de l'ATP est mesurée sur la protéine naturelle et sur 2 mutants après stimulation par des concentrations croissantes de prazosine.

modification de l'activité d'hydrolyse de l'ATP. En effet, on observe pour les mutants H350A et W379A une affinité pour l'ATP qui est équivalente ou augmentée, alors que l'hydrolyse de l'ATP est diminuée ou faiblement augmentée. Ainsi, il est possible que cette activation du transport des substrats soit directement reliée aux mutations introduites dans les boucles intracellulaires.

3.3.2.2. *Activité ATPase stimulée*

Nous avons ensuite mesuré l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la protéine naturelle ou mutée après stimulation par un substrat. Dans un 1^{er} temps, le test a été réalisé sur tous les mutants avec 10 μ M de sulfasalazine (Figure 71A), substrat d'ABCG2. Ce composé est utilisé pour stimuler l'activité d'hydrolyse de l'ATP par ABCG2, de 2 à 4 fois d'après Solvobiotech. Dans un 2^{ème} temps, nous avons mesuré cette activité sur 2 mutants particulièrement intéressants, H375A et W379A, avec des concentrations croissantes de prazosine (Figure 71B), substrat d'ABCG2 qui stimule l'activité d'hydrolyse de l'ATP du mutant R482G d'ABCG2, à une concentration supérieure à 10 μ M (McDevitt *et al.*, 2008).

Dans nos conditions, l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la protéine naturelle n'est pas stimulée par 10 μ M de sulfasalazine (Figure 71A), qui au contraire stimule l'activité d'hydrolyse de l'ATP de 2 mutants, H375A et W379A, respectivement de 30% et 60%. Afin de déterminer si cette stimulation est provoquée par tous les substrats, nous en testons un 2^{ème}, la prazosine, avec une gamme de concentrations allant de 0 à 100 μ M. Nous notons ici, que contrairement à ce qui était observé précédemment, l'activité d'hydrolyse de l'ATP des mutants n'est pas stimulée et cela même à des concentrations élevées (jusqu'à 100 μ M de prazosine). Ainsi, la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP est substrat-dépendant ce qui n'est pas tellement étonnant puisque nous avons déjà noté des effets différents des mutants sur leur transport en fonction des substrats testés

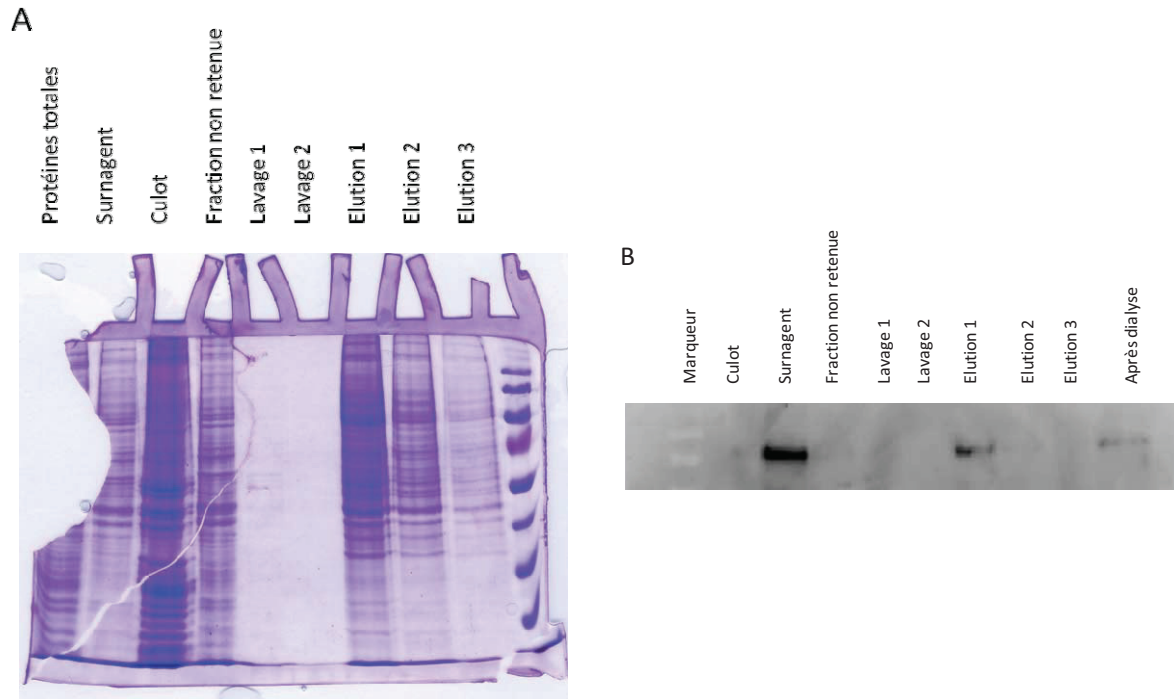


Figure 72 : Purification d'ABCG2 à partir de membranes de cellules de mammifère.

A : Gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie permettant la visualisation de toutes les protéines. ABCG2 est présente en quantité trop faible pour être visualisée ici.

B : Western-blot permettant la visualisation d'ABCG2 au cours de la purification grâce à l'anticorps BXP21 dirigé spécifiquement contre ABCG2. On la retrouve dans la 1^{ère} élution.

3.3.3. Essais de purification

Afin de déterminer l'impact des mutations sur la fixation des substrats sur ABCG2, nous avons souhaité purifier la protéine et tester la fixation des substrats par variations de fluorescence. Pour ne pas changer de système d'expression, nous purifions ABCG2 à partir de membranes de cellules de mammifère produites dans des hyperflasks[®], comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. En effet, ABCG2 correspondant à environ 0,1% des protéines membranaires, une grande quantité de protéines membranaires totales est nécessaire pour obtenir suffisamment d'ABCG2 pour son analyse.

Plusieurs essais ont été réalisés à partir des membranes exprimant la protéine naturelle. Les premières purifications étaient effectuées après une solubilisation dans 4% de DDM pendant 1 h à 4°C avec une concentration en protéines de 8 mg.ml⁻¹. La purification était réalisée en batch, sur résine de Nikel-Agarose (Qiagen). ABCG2 était retenue sur cette colonne, puis éluée par de l'imidazole (100 mM). Malheureusement, nous retrouvons une grande quantité de contaminants dans l'élution puisque, contrairement à ABCG2, ils se visualisent sur gel coloré au bleu de Coomassie (Figure 72A).

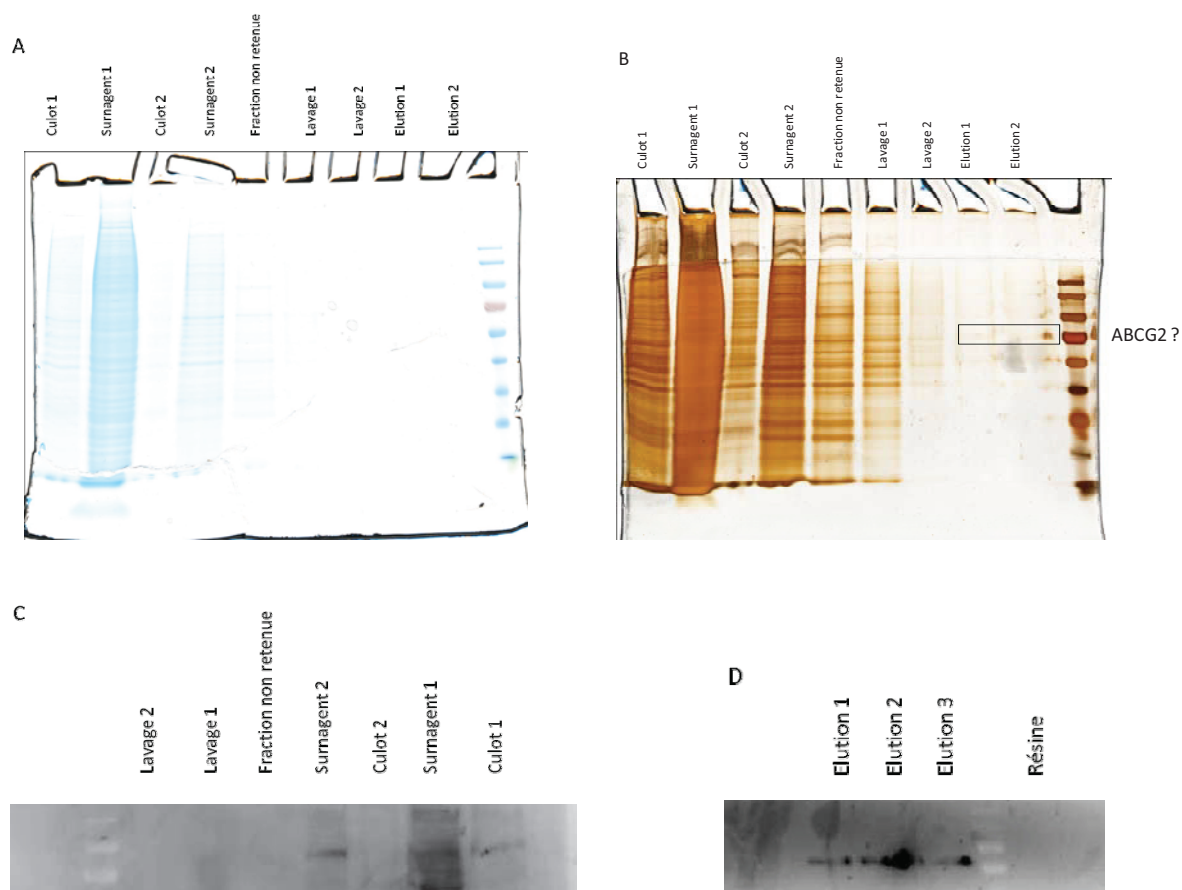


Figure 73 : Purification d'ABCG2 avec une double solubilisation OG 0,5% puis DDM 4%.

A et B: Gels d'acrylamide colorés respectivement au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent.
C et D : Western-blot permettant la visualisation d'ABCG2 (anticorps BXP21) dans le 2^{ème} surnagent et les élutions 1, 2 et 3.

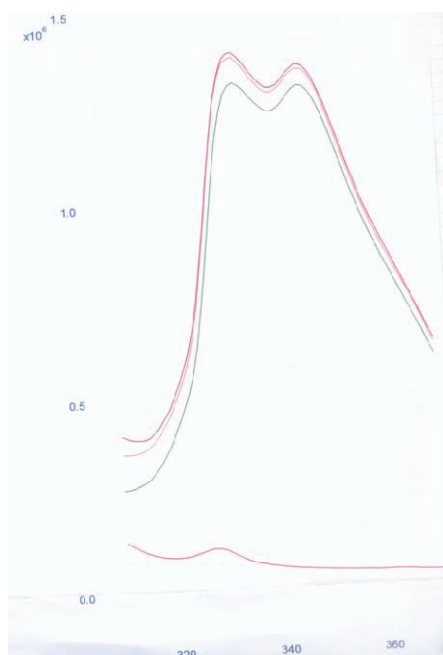


Figure 74 : Spectre d'émission de fluorescence intrinsèque de la protéine purifiée, après excitation à 295 nm.

Les courbes rose et orange correspondent à la solution de protéines étudiées, la courbe rouge représente le tampon, soit le bruit de fond, et la courbe verte correspond à la protéine après soustraction du tampon.

Afin d'améliorer la purification, nous décidons de procéder à une première étape de solubilisation avec 0,5% d'octyl-glucoside (OG). ABCG2 n'étant pas solubilisée dans ces conditions, une centrifugation à $100000 \times g$ permet d'éliminer les contaminants solubles. Cette concentration en détergent est inférieure à la CMC (concentration micellaire critique), ainsi, nous solubilisons peu de protéines mais cette étape permet l'élimination des protéines faiblement ancrées dans les membranes. Comme on peut le visualiser sur la Figure 73A et B, cette étape permet l'élimination d'une grande quantité de contaminants. Une solubilisation dans 4% DDM 1 h à 4°C du culot de l'étape précédente permet de solubiliser ABCG2. La purification suit alors le protocole décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Afin de visualiser ABCG2, un western-blot, un gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent sont réalisés (Figure 73).

Ainsi, cette méthode semble être assez sélective pour obtenir ABCG2 relativement bien purifiée. Peu de contaminants sont visualisables sur un gel coloré au bleu de Coomassie ou par le nitrate d'argent. Nous observons une protéine possédant une taille de 72 kDa sur ce dernier gel qui pourrait donc correspondre à ABCG2. Une analyse en spectrométrie de masse devrait répondre à cette question.

Cependant, nous restons confrontés à 2 problèmes. Le premier est la faible quantité d'ABCG2 purifié qui est due d'une part, à la dialyse réalisée après la purification où la moitié des protéines sont dégradées et, d'autre part, au faible taux d'expression d'ABCG2 dans ce système d'expression. Ainsi, la quantité obtenue est trop faible pour permettre d'effectuer des essais de fluorimétrie. Il faudrait débiter la purification avec des quantités plus importantes de protéine, ce qui n'est pas réalisable ici. Le deuxième problème rencontré est la qualité de la protéine. En fluorimétrie, elle présente 2 pics, ce qui démontre 2 formes de la protéine (Figure 74) ; ceci peut également être dû à un problème dans la dialyse.

La purification d'ABCG2 en cellules de mammifère est assez complexe. Les quantités obtenues sont faibles, malgré la quantité importante de protéines membranaires utilisées en début de purification. Afin de pallier ce problème, nous envisageons de changer de système d'expression et de produire les mutants en cellules d'insectes *Sf9*, dont la purification a été mise au point au laboratoire (Pozza *et al.*, 2006). La qualité de la protéine peut être améliorée en modifiant les conditions de dialyse. Cette étape est indispensable afin d'éliminer l'imidazole et pouvoir analyser la protéine en fluorimétrie. Nous envisageons d'augmenter la quantité de détergent au cours de la dialyse, qui ici, n'était présent qu'à 0,1% et pourrait donc expliquer la dégradation de la protéine.

	Taux d'expression	Transport de substrat, efflux modifié	Chimiosensibilisation index de résistance modifié	Hydrolyse de l'ATP basale	Hydrolyse de l'ATP stimulée (10 µM sulfa)
H350A	=	Mtx ↗ 60% Phe a = PPIX ↗ 60% Zn mesoP = Doxo = Dauno =	Mtx ↘ 35% SN-38 ↘ 50% Dauno = Doxo = Rho =	$K_M =$ $V_{max}' \searrow 18\%$ $K_M/V_{max}' \searrow 50\%$ Activité d'hydrolyse de l'ATP diminuée	=
H375A	↘ 10%	Mtx ↗ 40% Phe ↘ 50% PPIX ↗ 60% Zn mesoP ↘ 40% Doxo = Dauno =	Mtx ↘ 40% SN-38 ① Dauno = Doxo = Rho =	$K_M \searrow 50\%$ $V_{max}' \searrow 16\%$ $K_M/V_{max}' \nearrow 54\%$ Activité d'hydrolyse de l'ATP augmentée	↗ 30%
W379A	↘ 15%	Mtx ↗ 140% Phe ↗ 90% PPIX ↗ 70% Zn mesoP ↗ 80% Doxo = Dauno =	Mtx ↗ 60% SN-38 ↘ 50% Dauno = Doxo = Rho =	$K_M \searrow 50\%$ $V_{max}' \searrow 12\%$ $K_M/V_{max}' \nearrow 18\%$ Activité d'hydrolyse de l'ATP faiblement augmentée	↗ 60%
H457A	↘ 50%	Mtx ↗ 30% Phe ↘ 66% PPIX ↗ 170% Zn mesoP ↗ 160% Doxo = Dauno =	Mtx = SN-38 ① Dauno = Doxo = Rho ↗ ?	$K_M \searrow 70\%$ $V_{max}' \nearrow 51\%$ $K_M/V_{max}' \nearrow 327\%$ Activité d'hydrolyse de l'ATP augmentée	?

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des modifications induites par mutation sur l'expression, le transport de substrats, la sensibilisation des cellules aux agents anticancéreux et l'activité d'hydrolyse de l'ATP basale et stimulée.

Les résultats présentés sont une comparaison avec les caractéristiques de la protéine naturelle. « ↗ 60% » signifie augmenté de 60% par rapport à ABCG2 naturelle ; « ↘ » diminué de ; « = » identique ; « ① » sensibilité identique aux cellules n'exprimant pas ABCG2 ; Mtx : mitoxantrone ; Phe : phéophorbide a ; PPIX : protoporphyrine IX ; Zn mesoP : Zinc mésoporphyrine ; doxo : doxorubicine ; rho : rhodamine 123 ; K_M : constante de Michaelis, affinité d'ABCG2 pour l'ATP ; V_{max}' : vitesse maximale d'hydrolyse de l'ATP.

Résultats et discussion

Afin d'étudier le rôle des boucles intracellulaires d'ABCG2, 4 mutants ont été produits et plusieurs caractéristiques ont été étudiées : le taux d'expression des protéines, le transport de substrats, la résistance des cellules exprimant les protéines aux agents anticancéreux et les paramètres cinétiques de l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Le tableau précédent résume les différences observées entre les mutants et ABCG2 naturelle.

Tous les mutants sont exprimés sous une forme mature, ils sont correctement adressés à la membrane plasmique et ils transportent activement les substrats. Ceci suggère donc que ces mutations n'entraînent pas d'altérations majeures dans la structure d'ABCG2 qui modifieraient son repliement, son adressage ou sa biosynthèse. Cependant, ces mutations entraînent des changements importants dans la fonctionnalité du transporteur. Ainsi, les 4 mutations introduites entraînent une augmentation de l'efflux de mitoxantrone et de protoporphyrine IX. Un tel gain de fonction est observé notamment avec 2 autres résidus des domaines transmembranaires, les mutations R482G ou R482T (Miwa *et al.*, 2003 ; Robey *et al.*, 2003) et K462A (Cai *et al.*, 2010) qui augmentent considérablement la résistance à la mitoxantrone. Il est important de noter que, contrairement aux mutations R482G/T, les mutants générés dans cette étude ne sont pas obtenus par pression de sélection. De plus, aucun polymorphisme n'a été répertorié pour ces résidus.

Mutation H350A.

Le mutant H350A diminue de manière sélective l'activité de transport d'ABCG2. Ainsi le transport de phéophorbide a et de zinc mésoporphyrine n'est pas modifié, celui de mitoxantrone et de protoporphyrine IX est augmenté, tandis que la protéine mutée transporte moins efficacement le SN-38. Nous notons également que l'affinité de l'ATP pour les NBD est identique à celle de la protéine naturelle mais que la vitesse maximale d'hydrolyse est diminuée, conduisant alors à une diminution de l'activité globale d'hydrolyse de l'ATP.

Ce résidu H350 est situé dans ICL0 et précède de 3 résidus la signature C'. D'après les travaux récents du laboratoire, il semblerait que cette signature soit impliquée dans la transduction du signal entre les NBD et les TMD (thèse de S. Macalou, non publié). Il est donc raisonnable de penser qu'un résidu si proche de cette signature puisse également interférer dans l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Cependant, dans cette hypothèse pourquoi n'observons-nous pas le même effet avec tous les substrats ? Une explication pourrait être que certains substrats stimulent cette activité, conduisant alors à une efficacité de transport plus

Résultats et discussion

élevée, tandis que d'autres ne la stimulent pas. Il sera donc intéressant de mesurer l'activité d'hydrolyse de l'ATP en présence de substrats dont on a observé une augmentation dans le transport (tel que la mitoxantrone).

Mutation H457A.

Le mutant H457A entraîne une augmentation du transport de mitoxantrone, de protoporphyrine IX et de zinc mésoporphyrine, tandis que l'efflux de phéophorbide a est diminué. Ce mutant n'est par ailleurs plus capable d'expulser le SN-38. Cette mutation a également un effet très marqué sur l'activité d'hydrolyse de l'ATP : l'affinité des NBD pour l'ATP est très augmentée, de même que la vitesse maximale d'hydrolyse. Ceci entraîne une activité d'hydrolyse de l'ATP 4 fois plus importante que celle de la protéine naturelle.

La localisation de H457 est controversée. En effet, comme d'autres équipes (e.g. Hazai and Bikadi, 2008), nous positionnons ce résidu dans la 2^{ème} boucle intracellulaire ICL1 juste après TM2 (Figure 63). La probabilité de ce positionnement est renforcée par la proximité de la séquence SGYYR que nous supposons être la région charnière au contact du NBD du même monomère. De leur côté, Wang et ses collaborateurs proposent que ce résidu soit au contraire localisé dans TM2, côté feuillet externe de la membrane (Figure 75, Wang *et al.*, 2008), localisation basée sur l'insertion d'épitope hémagglutinine à divers endroits de la séquence.

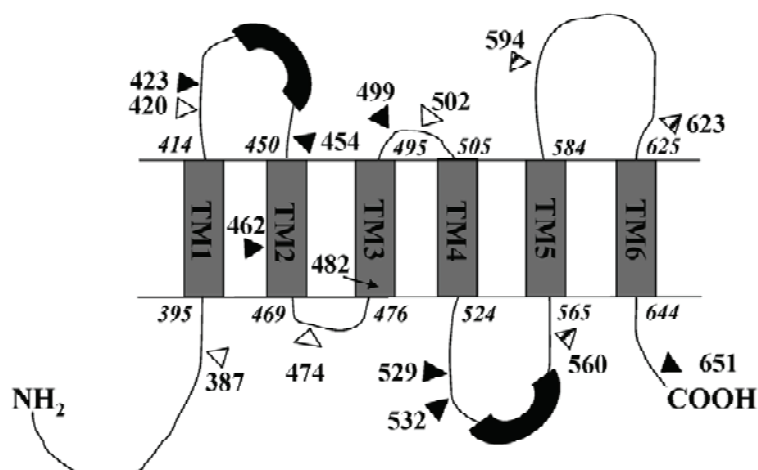


Figure 75 : Modèle topologique d'ABCG2 prédit par Wang et collaborateurs.
(Wang *et al.*, 2008)

Résultats et discussion

Cette même équipe suggère que ce résidu H457 participerait à la formation du site de fixation du Hoechst 33342 sur ABCG2. En effet, sur la base de la structure tridimensionnelle d'ABCB1 murin (Aller *et al.*, 2009), cette même équipe a récemment établi un modèle 3D d'ABCG2 par homologie de séquence, incluant les données du 1^{er} modèle (Cai *et al.*, 2010). Une étude de docking a par la suite suggérée l'implication de ce résidu dans la fixation du Hoechst 33342.

Il est maintenant important pour nous de déterminer la position exacte de ce résidu : transmembranaire ou intracellulaire ? En effet, les 2 hypothèses concorderaient avec nos résultats.

- l'augmentation de l'efflux de certains substrats comme la mitoxantrone, protoporphyrine IX et zinc mésoporphyrine que l'on observe avec ce mutant peut s'expliquer par une diminution d'affinité au site de transport de ces substrats, ce qui en première approximation est en accord avec une localisation membranaire de cette histidine. Nous supposons dans ce cas que le phéophorbide a pourrait se fixer dans une zone distincte des autres substrats et voir son transport également affecté, avec des conséquences différentes, par cette mutation.

- Dans l'hypothèse où ce résidu est intracellulaire, il pourrait avoir les mêmes conséquences qu'exposé ci-dessus mais en constituant un 1^{er} site de fixation intracellulaire comme nous le supposions au début de cette étude avec également des affinités différentes selon la structure des substrats.

Quant au SN-38, que le résidu H457 soit situé du côté intracellulaire ou transmembranaire, nous pouvons supposer qu'il est indispensable à la fixation de ce substrat sur ABCG2.

La mutation du résidu H457 affecte également l'activité globale de l'hydrolyse d'ATP. Une modification de l'affinité de l'ATP et une augmentation de l'activité d'hydrolyse d'ATP sont retrouvées pour les mutants R482T/G, modifiés sur un résidu situé dans la partie transmembranaire ; la raison pour laquelle elles entraînent ces changements est inconnue (Pozza *et al.*, 2006). Mao et collaborateurs ont formulé l'hypothèse que les mutations, notamment celle du résidu H457, peuvent modifier l'interaction d'ABCG2 avec les substrats et perturber les changements conformationnels induits par leur fixation sur la protéine, conduisant alors à une altération du transport et/ou de l'activité d'hydrolyse de l'ATP (Cai *et al.*, 2010). De plus, il a été montré sur ABCB1 une communication directe entre les sites de

Résultats et discussion

fixation des substrats et le site de fixation de l'ATP (Liu and Sharom, 1996). Etant donné la similarité de fonctionnement entre ABCB1 et ABCG2, on peut penser qu'il existe aussi une communication directe entre la fixation des substrats sur ABCG2 et l'affinité des NBD pour l'ATP. Il serait alors intéressant de mesurer si l'activité d'hydrolyse de l'ATP est stimulée par différents substrats.

Concernant l'activité basale qui est elle-même augmentée, il est difficile de l'expliquer de cette manière. Une hypothèse, qui doit bien évidemment être confirmée, pourrait être que cette mutation entraîne un changement conformationnel de la protéine qui rapproche les 2 NBD, de la même façon que lors de la fixation d'un substrat sur son site. Ainsi, la protéine serait maintenue plus longtemps dans une « forme fermée », augmentant ainsi l'affinité de l'ATP pour les NBD et l'hydrolyse de l'ATP.

Mutation H375A.

La mutation en position H375 provoque quasiment les mêmes effets que celle du résidu H457 : l'efflux de mitoxantrone et de protoporphyrine IX est augmenté tandis que celui de la zinc mésoporphyrine et du phéophorbide a est diminué par rapport à la protéine naturelle. Cependant, l'activité d'hydrolyse d'ATP n'est pas modifiée de la même manière : nous observons bien une augmentation de l'affinité de l'ATP pour les NBD (diminution du K_M) mais la vitesse maximale d'hydrolyse est diminuée. Nous notons également que l'activité d'hydrolyse d'ATP semble stimulée par la sulfasalazine mais pas par la prazosine.

Ce résidu est situé seulement 15 résidus en aval de la signature C'. Ainsi, de la même façon que la signature C', ce résidu pourrait jouer un rôle direct dans la liaison de l'ATP sur les NBD et plus généralement dans son hydrolyse : en augmentant l'affinité de l'ATP sur les NBD, ceci pourrait figer la conformation et ainsi altérer l'hydrolyse de l'ATP en ADP ce qui se traduirait alors par une baisse du V_{max} . Ainsi, certains substrats, qui ne stimulent pas cette activité auraient une efficacité de transport réduite ; les substrats stimulant cette activité auraient au contraire une efficacité de transport augmentée. Ainsi, de part sa localisation, H375 pourrait jouer un rôle au niveau de l'activité d'hydrolyse d'ATP, et non pas au niveau du transport des substrats comme H457.

Il est aussi possible que ce résidu soit impliqué dans la reconnaissance et la fixation des substrats au niveau intracellulaire. Un substrat reconnu plus efficacement atteindrait plus rapidement son site de transport entraînant alors une augmentation de son transport. La stimulation de l'activité d'hydrolyse d'ATP observée par certains substrats (tel que la

Résultats et discussion

sulfasalazine) serait alors un effet indirect dû au couplage entre site de transport et activité d'hydrolyse d'ATP.

Mutation W379A.

La mutation W379A augmente le transport de tous les substrats testés et ne change pas la sélectivité des sites (anthracyclines non transportées). De plus nous observons que l'affinité pour l'ATP est 2 fois meilleure mais que sa vitesse d'hydrolyse n'est augmentée que d'un facteur 1,2, et est stimuable par la sulfasalazine. Ces effets font penser à un couplage entre transport et hydrolyse d'ATP, et à une localisation possible du résidu dans le site de reconnaissance des substrats. L'encombrement stérique du tryptophane pourrait réguler le passage des substrats ; en remplaçant le tryptophane par un résidu plus petit, comme une alanine, le passage des composés est facilité, entraînant un efflux plus actif.

Cette étude a ainsi permis de démontrer l'importance de certains résidus dans la fixation des substrats sur ABCG2. Elle permet également d'illustrer la coopération entre les boucles intracellulaires, les NBD et les TMD.

Le premier point que nous souhaitons éclaircir est la position du résidu H457 dans ABCG2. Nous envisageons pour cela de pratiquer une protéolyse sur un extrait de membranes et d'étudier par spectrométrie de masse si le peptide contenant le résidu H457 est du côté intracellulaire, transmembranaire ou extracellulaire.

Le 2^{ème} point à éclaircir est le rôle du résidu H375 dans la fixation des substrats ou la fixation de l'ATP. Nous envisageons pour cela de purifier ce mutant en cellules d'insectes *Sf9* et de mesurer les affinités des substrats et de l'ATP sur la protéine purifiée par fluorimétrie, ce qui devrait nous permettre de mettre en évidence des affinités de fixation modifiées.

Ensuite, nous souhaitons, de la même façon, mettre en évidence des affinités de fixation des substrats modifiées sur la protéine H457 purifiée.

Afin de caractériser les sites de transport des substrats d'ABCG2, nous avons débuté une étude utilisant les QZ59, inhibiteurs d'ABCB1, co-cristallisée avec la protéine et dont les sites de fixation sur ABCB1 sont donc connus. Ces 2 inhibiteurs inhibant également ABCG2, nous souhaitons transposer les sites d'ABCB1 à ABCG2. Il serait intéressant d'étudier également leur efficacité à inhiber l'efflux de substrats catalysé par les mutants.

Enfin, les résultats obtenus avec le mutant W379A sont particulièrement intéressants. Nous souhaitons exprimer ce mutant en cellules d'insectes *Sf9* et le purifier afin de contrôler

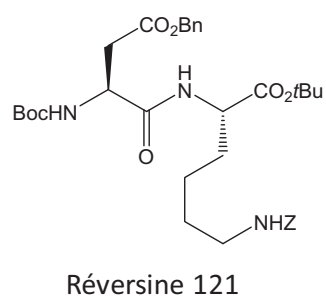
Résultats et discussion

les affinités de fixation des substrats. Si comme nous le pensons, il n'est pas impliqué dans la reconnaissance des molécules, mais est situé sur le passage des substrats, nous ne devrions pas mesurer des affinités de fixation différentes. L'étude de l'activité de transport et la résistance des cellules exprimant ce mutant se poursuivent également avec de nouveaux substrats afin de caractériser plus en détail cette augmentation du transport. Nous envisageons également de produire le double mutant W379A R482T/G, où la capacité de transport devrait être augmentée de manière significative. En tenant compte de notre hypothèse sur W379A, on peut imaginer que ces 2 résidus soient des filtres internes permettant de réguler l'activité de la protéine. En modifiant ces 2 résidus, il est possible que l'activité de la protéine soit ainsi très augmentée. Nous pensons également muter ce résidu par d'autres acides aminés encombrant afin de déterminer si cette caractéristique du W379 est bien fondamentale. Si nous démontrons l'implication de ce résidu dans la voie d'accès aux substrats, nous pouvons alors imaginer pouvoir développer des inhibiteurs bloquant ce passage, restaurant ainsi la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques.

II. Développement d'inhibiteurs d'ABCG2 et ABCB1

Comme exposé précédemment, les transporteurs ABC constituent une famille de protéines importantes de par leurs rôles dans de nombreuses pathologies. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur leur implication dans la résistance aux agents anticancéreux. Beaucoup d'inhibiteurs de ces transporteurs ont déjà été mis en évidence mais peu ont été testés en essais clinique et aucun n'a réussi à démontrer une efficacité sans effets indésirables majeurs en essais cliniques. La recherche et le développement de nouveaux inhibiteurs de ces transporteurs ABC sont donc primordiaux dans la lutte contre le cancer. Comme nous l'avons vu, 3 transporteurs sont plus particulièrement impliqués dans le phénotype MDR : ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1) et ABCG2 (BCRP). Cette étude s'est portée sur 2 de ces transporteurs, ABCB1 et ABCG2.

Le but de cette étude a été de développer des inhibiteurs, à la fois efficaces à faible concentration, sélectifs d'un transporteur, non toxiques et non compétitifs des substrats. Ayant testé un grand nombre de molécules, nous avons, par la suite, analysé les relations structure-activité de ces composés. L'approche bio-informatique permet de repérer les groupements les plus favorables de ces inhibiteurs permettant ainsi de concevoir une 2^{ème} génération de composés plus efficaces. Enfin, la compréhension du mécanisme d'action de ces inhibiteurs sur les transporteurs ABC nous aidera à mieux connaître les sites de fixation de ces transporteurs et d'une manière générale à mieux appréhender leur fonctionnement.



Avec les groupements protecteurs d'amines secondaires :

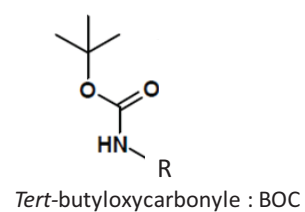
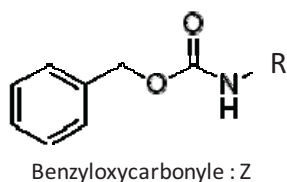


Figure 76 : Structure de la réversine 121, inhibiteur d'ABCB1.

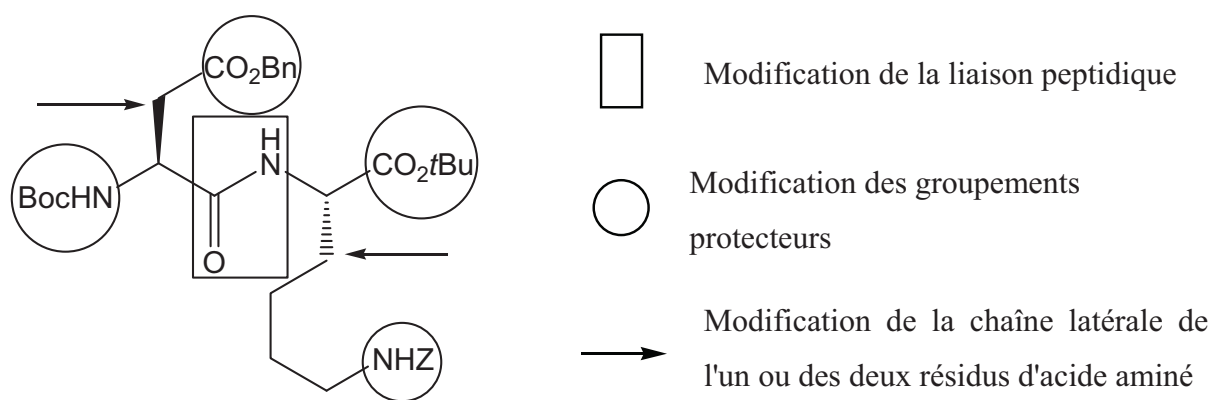


Figure 77 : Modifications structurales de la réversine 121.

1. Les inhibiteurs testés et leurs effets

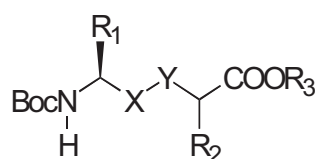
1.1. Les classes d'inhibiteurs

Les composés testés ici sont des dérivés de dipeptides analogues, basés sur la réversine 121 (Sharom *et al.*, 1999). Ces peptides présentent l'avantage d'être relativement simples à synthétiser, accessibles à des modifications structurales susceptibles de favoriser la sélectivité, et peu toxiques. La réversine 121 a été sélectionnée parmi une famille de composés analogues initialement décrits en 1998 (Sarkadi, 1998). Ce sont des di/tri-peptides possédant des caractéristiques physicochimiques ou des substituants communs tels que des cycles aromatiques ou des groupes alkyles (Sepodi, 1998).

Dans cette série, la réversine 121 (Figure 76) présente une bonne affinité et une spécificité pour ABCB1 (Sharom *et al.*, 1999). C'est un di-peptide aspartate-lysine ayant un IC_{50} de l'ordre de 1 μ M pour inhiber ABCB1.

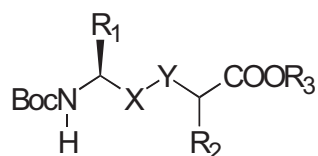
Les inhibiteurs testés ici sont des dérivées de la réversine 121. Ils ont été synthétisés par l'équipe du Pr J. Paris (Laurent Ettouati, Marie-Emmanuelle Million) de la Faculté de Pharmacie de Lyon 1 (UCB-Lyon1). Plusieurs modifications structurales ont été réalisées dans le double objectif d'améliorer la capacité d'inhibition d'ABCB1 et de sélectionner des dérivés actifs sur ABCG2 ou sur les 2 transporteurs. En effet, tenant compte du fait qu'ABCB1 et ABCG2 ont en commun plusieurs substrats et inhibiteurs (Figure 85), nous avons fait l'hypothèse que la modification de ces réversines pourrait modifier leur spectre d'action.

Malgré les études menées en 1998 et 1999, peu de données de relations structure-activité sont disponibles pour ces réversines. Nous avons donc opté pour 3 types de changements afin de générer une nouvelle série de composés : la modification des groupements protecteurs, la modification de la liaison peptidique ou la modification de la chaîne latérale de l'un ou des deux résidus d'acide aminé (Figure 77).



composé	R ₁	X	Y	R ₂	R ₃
CT1300	-CH ₂ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1301	-CH ₂ COOBn	CH ₂	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1360	-CH ₂ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NH ₂	Bu'
CT1369	-CH ₂ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NH ₂	Bn
CT1368	-CH ₂ COOBn	C=O	NH	(R)-(CH ₂) ₄ -NH ₂	Bn
CT1361	-CH ₂ COOBn	C=O	CH ₂	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bn
CT1316	-CH ₂ COOBn	Ψ(CO-CH ₂)-Gly		(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1329	-(CH ₂) ₂ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1302	-(CH ₂) ₂ COOBn	CH ₂	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1343	-(CH ₂) ₂ COOBu'	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1348	-(CH ₂) ₃ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1337	-(CH ₂) ₂ OCOBN	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1339	-(CH ₂) ₂ OCOCHex	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1345	-(CH ₂) ₃ OCOCHex	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1340	-(CH ₂) ₂ OBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1317	-(CH ₂) ₂ COOCHex	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'

Tableau 17 : Premier groupe de composés permettant d'évaluer l'importance de la liaison peptidique, des chaînes latérales et de leurs substituants.



composé	R ₁	X	Y	R ₂	R ₃
CT1341	-CH ₂ <i>p</i> -PhOBu'	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1346	-CH ₂ <i>p</i> -PhOBu'	CH ₂	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bu'
CT1333	-CH ₂ <i>p</i> -PhOBu'	C=O	NH	H	Bu'
CT1354	-CH ₂ <i>p</i> -PhOBu'	C=O	(RS)CHSO ₂ Ph	H	Bu'
CT1357	-CH ₂ <i>p</i> -PhOBu'	(RS)CHOH	(RS)CHSO ₂ Ph	H	Bu'
CT1355	-CH ₂ <i>p</i> -PhOBu'	Ψ (E,CH=CH)	H	Bu'	
T1353	-CH ₂ <i>p</i> -PhOBu'	CH ₂	CH ₂	H	Bu'

Tableau 18 : Composés de type tyr-gly.

1.1.1. Les peptidomimétiques

1.1.1.1. *Modification des chaînes latérales, de leurs substituants et de la liaison peptidique*

Dans cette série de composés, nous avons étudié les aspects suivants :

- impact de la liaison peptidique en supprimant le groupement carbonyle en X, ou l'amine en Y,
- importance des groupements protecteurs en R₁, R₂ et R₃. La déprotection de l'amine de la chaîne latérale diminue l'hydrophobicité de la molécule résultante, nous permettant d'évaluer l'importance du caractère hydrophobe des inhibiteurs,
- importance de l'aspartate ou de la lysine en R₁ et R₂. Les chaînes latérales ont été soit entièrement modifiées, soit rallongées, ou raccourcies.

Les molécules obtenues sont présentées dans le Tableau 17.

1.1.1.2. *Les composés de type tyr-gly*

Ces dérivés ont été préparés antérieurement au laboratoire de Chimie Thérapeutique (Charrier, 1999). Ils faisaient partie d'une chimiothèque disponible et possèdent des éléments structuraux communs avec les réversines ; ils ont donc été inclus dans cette étude. Ces composés possèdent une tyrosine en position R₁, tandis qu'à la position R₂ est greffée soit une glycine, une lysine ou un groupement *tert*-butyl (Tableau 18).

1.1.1.3. Ajout d'une glycine dans la chaîne principale

Notre étude inclut aussi 2 composés présentés dans le Tableau 19 qui possèdent une glycine entre l'acide aspartique et la lysine. Ceci permet d'évaluer l'intérêt d'un groupement espaceur dans l'efficacité de ces molécules.

1.1.1.4. Les composés contraints

Cinq composés (Tableau 20) présentent une contrainte structurale au niveau de l'acide aspartique, dont la cyclisation de la chaîne latérale le transforme en dérivé de la proline. Ceci entraîne un changement dans la topologie des chaînes latérales permettant d'explorer de nouveaux sites de liaisons. De plus, la contrainte réduit la flexibilité des chaînes latérales, permettant leur étude dans une position fixe.

1.1.1.5. Ajout d'un groupement sulfone

Quatre composés ont été synthétisés avec un groupement sulfone au niveau de la chaîne principale (Tableau 21). Cela augmente l'hydrophylie des molécules, de même que le nombre d'électrons disponibles pour former des liaisons hydrogène.

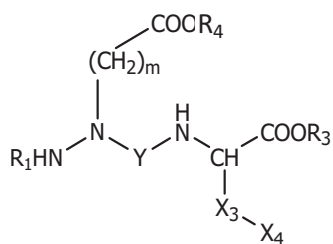
1.1.1.6. Autres composés

Les 2 composés présentés dans le Tableau 22 ont une structure différente du fait de l'ajout d'un carbonyle en position R₃. Ils faisaient partie d'une librairie disponible au laboratoire de chimie thérapeutique et ont donc été inclus dans cette étude.

1.1.2. Les azapeptides

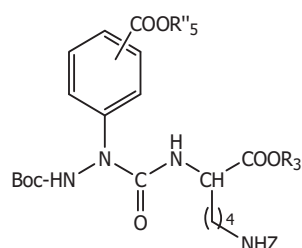
Ce sont des composés dans lesquels un ou plusieurs atomes de carbone du squelette peptidique sont remplacés par un azote, soit au niveau de l'acide aminé N-terminal (N-aza), soit dans l'acide aminé C-terminal (C-aza). Cela permet, d'une part, d'augmenter leur stabilité et leur biodisponibilité et, d'autre part, de favoriser ou stabiliser la conformation active de la molécule la plus efficace.

Trente composés ont ainsi été synthétisés. Ils sont présentés dans les tableaux suivants.



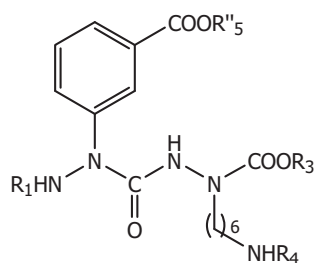
composé	Y	R ₁	m	R ₃	-X ₃ -X ₄	R ₄	Stéréochimie
CT1311	CO	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bn	L
CT1310	CO	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₄ -NHZ	Et	L

Tableau 23 : 1^{ère} série de composés aza-peptidomimétiques.



composé	COOR'' ₅	R ₃
CT1328	o-COOBn	tBu
CT1364	m-COOBn	tBu
CT1321	p-COOBn	tBu
CT1370	m-COOBn	Bn D
CT1371	m-COOCH(Ncyclohexyl) ₂	Bn L
CT1375	m-COOBn	Bn L
CT1381	m-COOC ₆ H ₅	tBu
CT1374	m-COOCH (Ncyclohexyl) ₂	Bn D
CT1386	m- O-CH ₂ -C ₆ H ₅	Bn

Tableau 24 : 2^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.



composé	R ₁	COOR'' ₅	R ₃	R ₄
CT1383	Boc	m-COOBn	Bn	Z
CT1385	Boc	m-COOBn	Bn	Boc

Tableau 25 : 3^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.

1.1.2.1. 1^{ère} série

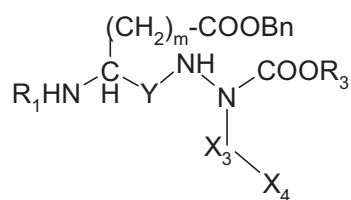
La 1^{ère} série de composé est constituée de dérivés C-aza (Tableau 23). Les substituants R₁, R₃ et R₄ sont des groupements protecteurs des fonctions amines ou carboxyles. Nous étudions ici l'impact du groupement protecteur R₃.

1.1.2.2. 2^{ème} série

Dans cette série (Tableau 24), le CH α remplacé est celui du côté C-terminal. De plus, l'acide aspartique est remplacé par un cycle aromatique avec un substituant en position ortho-, méta- ou para-. Les groupements Z et R''₅ sont des groupements protecteurs de l'amine et de l'acide carboxylique.

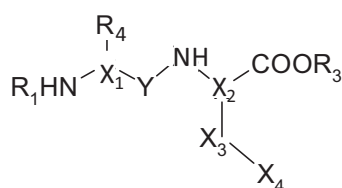
1.1.2.3. 3^{ème} série

Les composés de cette 3^{ème} série (Tableau 25) sont également des dérivés C-aza qui se distinguent des précédents par leur groupements protecteurs R₃ et R₄.



composé	Y	R ₁	m	R ₃	-X ₃ -X ₄
CT1366	CH ₂	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₆ -NHZ
CT1313	CO	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₃ -NHZ
CT1314	CO	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₄ -NHZ
CT1315	H	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₄ -NHZ
CT1324	CO	Boc	1	tBu	-Bn-NHZ
CT1325	CO	Boc	2	tBu	-Bn-NHZ
CT1349	CO	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₅ -NHZ
CT1362	CH ₂	Boc	1	tBu	-CH ₂ -C ₅ H ₉ NZ
CT1363	CO	Boc	1	tBu	-CH ₂ -C ₅ H ₉ NZ
CT1365	CH ₂	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₅ -NHZ
CT1367	CO	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₆ -NHZ
CT1377	CH ₂	Boc	1	tBu	-(CH ₂) ₆ -NHBoc
CT1378	CH ₂	Boc	1	Bn	-(CH ₂) ₆ -NHZ
CT1379	CH ₂	Boc	1	Bn	-(CH ₂) ₆ -NHBoc
CT1380	CH ₂	Z	1	Bn	-(CH ₂) ₆ -NHZ

Tableau 26 : 4^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.



composé	Y	X ₁	X ₂	R ₁	R ₃	R ₄	-X ₃ -X ₄
CT 1334	CO	CH	NH	Boc	tBu	-CH ₂ PhOtBu	H
CT1335	CO	NH ₂	CH	Boc	tBu	-CH ₂ PhOtBu	H

Tableau 27 : 5^{ème} série de composés aza-peptidomimétiques.

1.1.2.4. 4^{ème} série

La 4^{ème} série (Tableau 26) correspond à des dérivés N-aza : le CH α de la lysine est remplacé par un azote. Ces composés permettent l'étude de la lysine mais montrent également l'importance du carbonyle de la liaison peptidique.

1.1.2.5. 5^{ème} série

La 5^{ème} série est composée de dérivés N-aza (Tableau 27) et sont les dérivés –aza des composés de la librairie tyr-gly.

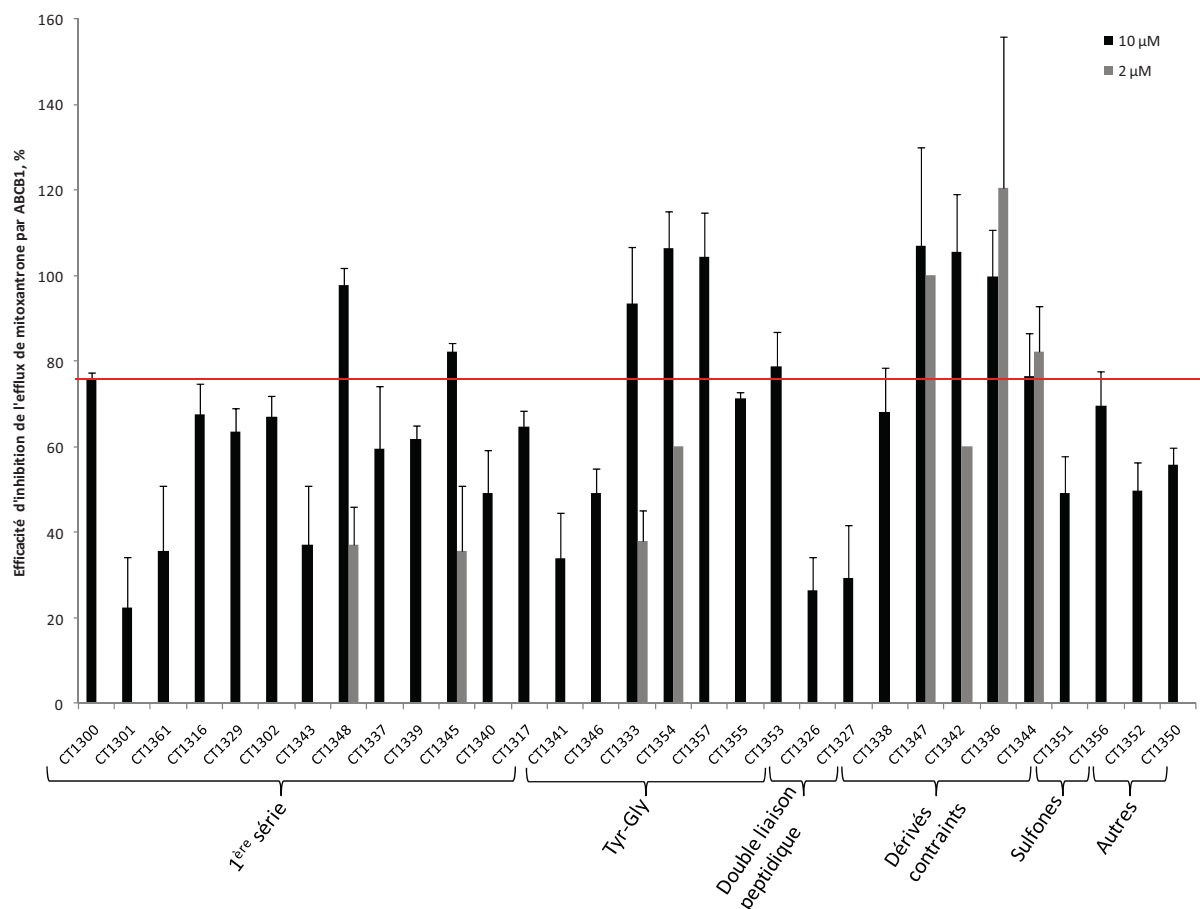


Figure 78 : Efficacité d'inhibition par les peptidomimétiques de l'efflux de mitoxantrone par ABCB1.
L'efficacité d'inhibition a été mesurée comme présentée dans la partie *Matériels et méthodes*. Elle a été mesurée dans un premier temps à 10 µM, puis à 2 µM pour les composés sélectionnés. Toutes les données correspondent à des triplicates indépendants.

La structure des composés est présentée dans les Tableau 17 à Tableau 22.

Composés	IC ₅₀ ± sd, µM
CT1300	1,41 ± 0,34
CT1342	1,68 ± 0,28
CT1336	0,73 ± 0,2
CT1344	1,13 ± 0,34
CT1354	1,55 ± 0,86
CT1347	0,22 ± 0,03

Tableau 28 : IC₅₀ des peptidomimétiques les plus efficaces pour inhiber ABCB1.

1.2. Efficacité d'inhibition sur ABCB1

Les tests d'efficacité ont été réalisés par cytométrie en flux comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. J'ai, tout d'abord, mesuré la capacité des composés à inhiber l'efflux de substrat, ici la mitoxantrone, par ABCB1 en quantifiant la quantité résiduelle de ce substrat fluorescent dans les cellules incubées ou non avec les molécules testées. Les premiers tests ont été réalisés à une concentration en composé de 10 μM afin de sélectionner le groupe de molécules ayant une efficacité supérieure ou égale à 80% d'inhibition. Un 2^{ème} test effectué à 2 μM a ensuite été réalisé sur ce premier groupe afin d'en sélectionner les meilleurs.

Comme on peut le voir sur la figure ci-contre, les efficacités peuvent parfois être supérieures à 100%. Ceci s'explique par la capacité des cellules exprimant ABCB1 à accumuler plus de substrat que les cellules contrôles.

1.2.1. Les peptidomimétiques

1.2.1.1. Efficacité d'inhibition

Dans notre système de cellules transfectées la réversine 121 (CT1300), qui est le composé témoin, a une efficacité à 10 μM de 75% ce qui correspond à un IC_{50} de 1,4 μM .

Nous pouvons séparer ces composés en 3 classes : ceux ayant une efficacité limitée, inférieure à 40%, ceux avec une efficacité comprise entre 40% et 75% du même ordre que la réversine 121, et ceux ayant une efficacité d'inhibition supérieure à 75% (Figure 78).

Seulement 6 composés se retrouvent dans la 1^{ère} classe : CT1301, CT1361, CT1343, CT1341, CT1326, et CT1327.

La plupart des composés ont une efficacité du même ordre que celle de la réversine 121. C'est le cas des 14 composés : CT1316, CT1329, CT1302, CT1337, CT1339, CT1340, CT1317, CT1346, CT1355, CT1338, CT1351, CT1356, CT1352 et CT1350.

Enfin, 10 composés, essentiellement des dérivés contraints, s'avèrent plus efficaces que la réversine 121. On trouve ainsi CT1348, CT1345, CT1333, CT1354, CT1357, CT1353, CT1347, CT1342, CT1336 et CT1344. Pour ces derniers, une estimation de leur IC_{50} a été réalisée : elle est présentée dans le Tableau 28.

1.2.1.2. Les relations structure-activité

Les tests d'efficacité ont été réalisés sur 31 composés peptidomimétiques dont l'efficacité est très variable (de 22% à 100% d'inhibition). Ceci nous permet de mener une étude des relations structure-activité sur cette classe de composés.

Plusieurs modifications n'ont pas d'effets particuliers sur l'efficacité des composés. On peut ainsi citer le remplacement de la liaison amine par un isostère kétométhylène du composé CT1361, ou encore l'allongement de la chaîne de l'acide aspartique des composés CT1329 et CT1348. L'augmentation de la chaîne de l'acide aspartique augmente modestement l'efficacité du composé CT1348, étant faiblement actif à 2 μM , à hauteur de 37%.

De la même façon, les dérivés du composé CT1329, dans lesquels les groupements protecteurs de l'acide carboxylique de l'aspartate ont été remplacés par un *tert*-butyl (CT1343) ou ceux dont l'ester a été remplacé par un ester inversé (CT1337, CT1339 et CT1345), ou encore par un éther benzylique (CT1340), ne gagnent pas en efficacité.

Dans une autre série de modifications, l'aspartate a été remplacé par une tyrosine. Ce simple remplacement réduit l'efficacité des composés résultants (CT1341 a 30% d'efficacité alors que CT1346 a 50% d'efficacité) tandis qu'une surprenante augmentation de l'efficacité est obtenue par le simple remplacement de la lysine par un groupement (RS)-CHSO₂PhCH₂ (de 33% d'efficacité pour CT1333 à 60% pour CT1354). Dans cette série, le dérivé le plus efficace, CT1354 a une efficacité équivalente à celle de la réversine 121, avec une IC₅₀ de 1,55 μM . Nous remarquons également qu'une diminution de l'efficacité est observée pour les dérivés de plus grande taille (CT1326 et CT1327).

Inversement, des effets remarquables sont obtenus par l'introduction d'une contrainte dans les composés. Ainsi, hormis CT1338, les dérivés contraints ont tous une efficacité d'inhibition supérieure au témoin, avec des IC₅₀ de 1,68 μM , 1,13 μM , 0,73 μM et 0,22 μM respectivement pour CT1342, CT1344, CT1336 et CT1347. Comme présenté dans le Tableau 20, certaines de ces améliorations sont dues au remplacement de la fonction ester N-terminale soit par une fonction éther benzylique (CT1336 et CT1347), soit par un éther cyclohexylmethylene (CT1344). Une augmentation importante de l'efficacité est également obtenue par la réduction du carbonyle de la liaison peptidique (CT1347 par comparaison à CT1336), permettant d'atteindre un IC₅₀ de 0,22 μM , qui est 7 fois plus faible que celui de la réversine 121.

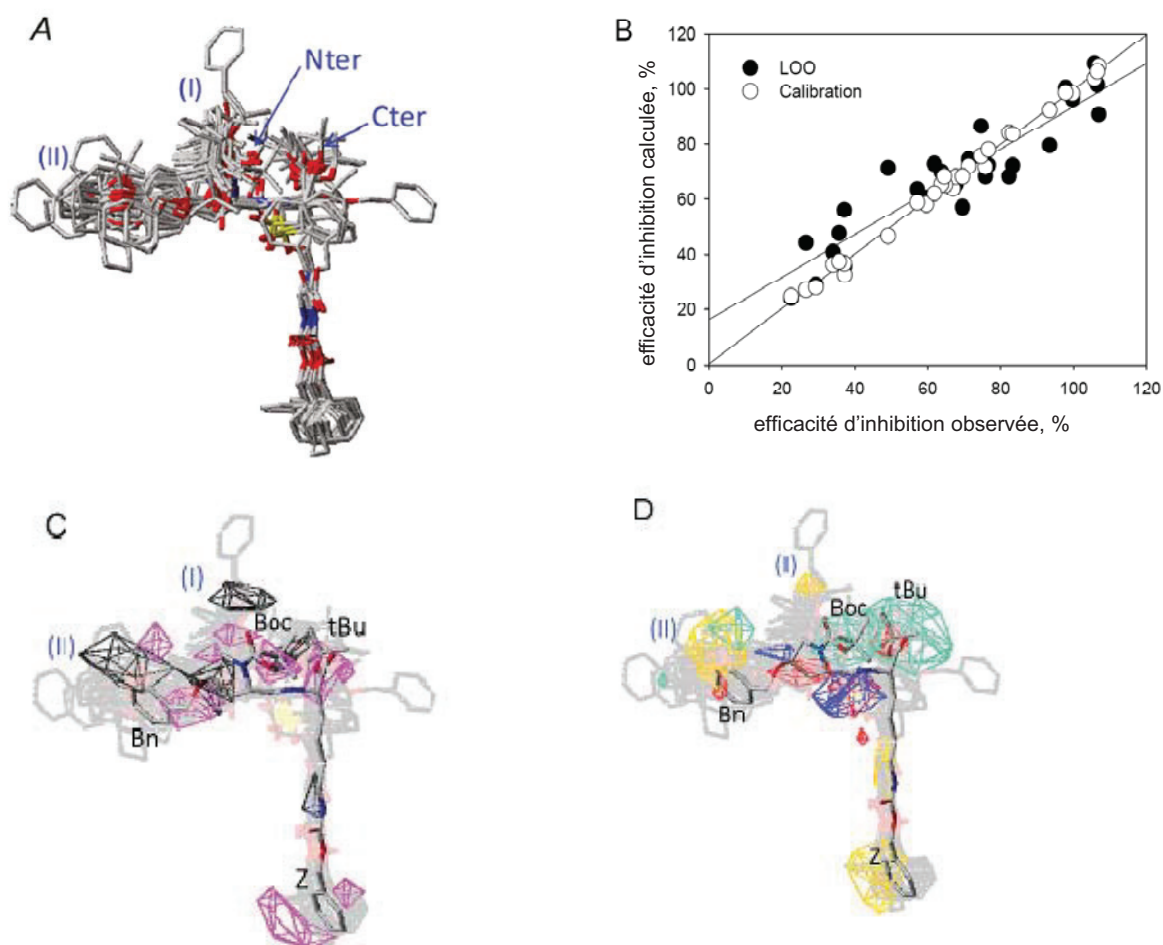


Figure 79 : 3D-QSAR des dérivés de la réversine.

A : Superposition des molécules de la série comme détaillé dans le texte.

B : Valeurs d'efficacité d'inhibition prédictives en fonction des valeurs expérimentales. Les valeurs calculées sont obtenues avec un modèle CoSMIA par la méthode LOO. Le coefficient de corrélation est de 0,85, l'interception des lignes est de 16,29 et la pente de 0,77. Les valeurs calculées sont obtenues avec le modèle CoSMIA sans méthode de validation avec un coefficient de corrélation linéaire de 0,99, une interception des lignes à 0,40 et une pente de 0,99.

C et D : Analyse des groupements hydrophobes (C) et électrostatiques et stériques (D). Le composé présenté en trait plein est le plus efficace, CT1347, les autres étant représentés en grisé. Les caractères favorables et défavorables sont respectivement représentés en rose et noir pour les caractères hydrophobes ; en rouge et bleu pour les zones électrostatiques ; en jaune et vert pour les zones stériques.

Résultats et discussion

Enfin, l'ajout d'un groupement sulfone ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'efficacité d'inhibition des composés. En effet, les composés CT1351 et CT1356 ont une efficacité équivalente à la réversine 121.

1.2.1.3. Relation quantitative structure-activité

Cette étude a permis de réaliser un 3D-QSAR sur les peptidomimétiques présentés dans les Tableau 17 à Tableau 22.

Comme détaillé dans la partie *Matériels et méthodes*, l'énergie des molécules a tout d'abord été minimisée et les chaînes latérales ont été alignées. Les molécules ont un grand degré de liberté, nous avons donc choisi de figer leur conformation, commune pour toutes. Elles ont été alignées au niveau de leur liaison peptidique de façon automatique tandis que les chaînes latérales ont été alignées manuellement. Chaque molécule a ensuite été minimisée jusqu'à atteindre une énergie de 20 Kcal.mol⁻¹. Cet alignement est présenté en Figure 79A. Une base de données a ensuite été générée avec les molécules en introduisant leur efficacité à 10 µM, et traitée par la méthode CoSMIA. Les mêmes valeurs d'efficacité d'inhibition ont été utilisées pour valider le modèle par la méthode LOO. Un coefficient de corrélation linéaire de 0,85 a ainsi été obtenu indiquant que le 3D-QSAR est assez robuste pour être utilisé avec notre série de composés (Figure 79B).

Les Figure 79C et D présentent les zones hydrophobes, électrostatiques ou d'encombrement stérique qui ont un impact positif ou négatif sur l'efficacité des composés. L'analyse des régions hydrophobes (Figure 79C) révèle que ce caractère est particulièrement important au niveau du phényle du groupe -Z (protecteur de l'amine) et qu'il est associé à un caractère stérique favorable (Figure 79D, grille jaune). Ceci illustre l'importance d'un groupement protecteur non polaire encombrant dans cette zone. Le carbamate du groupement protecteur -Z correspond à une région hydrophobe défavorable (Figure 79C, grille grise) couplée à une région stérique favorable. Ceci peut être attribué à des groupements donneurs d'électrons interagissant avec des résidus polaires d'ABCB1.

L'inverse est observé au niveau du groupement carbamate N-terminal du groupement Boc protecteur. En effet, cet environnement hydrophobe apparaît favorable à l'activité des composés, tandis que l'encombrement stérique est défavorable (grilles rose et verte respectivement). La même tendance est observée avec la région du *tert*-butyl en C-terminal

Résultats et discussion

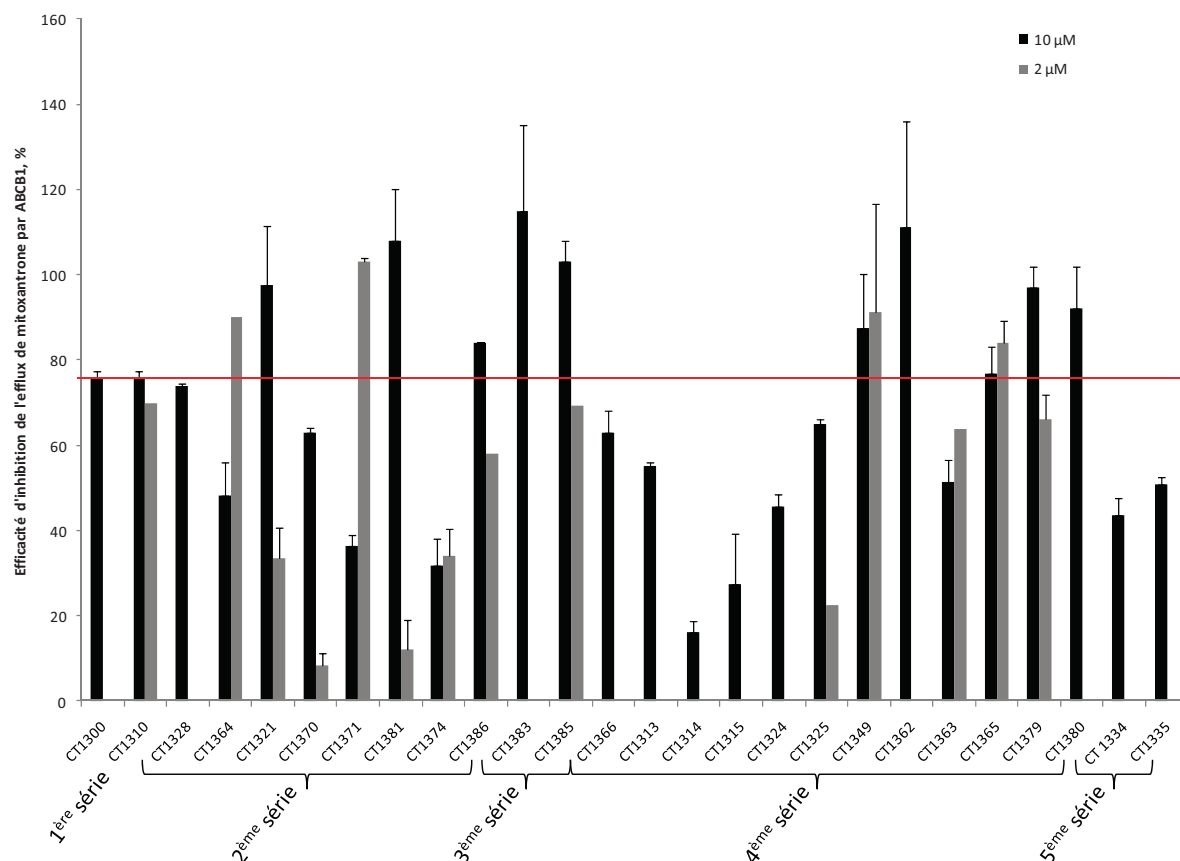


Figure 80 : Efficacité d'inhibition par les azapeptides de l'efflux de mitoxantrone par ABCB1.

L'efficacité d'inhibition a été mesurée comme cela est présenté dans la partie *Matériels et méthodes*. Elle a été mesurée, dans un 1^{er} temps, à 10 µM pour tous les composés puis à 2 µM pour ceux présentant plus de 80% d'efficacité à 10 µM. Toutes les données correspondent à une moyenne de triplicates indépendants.

Les structures des composés sont présentées dans les Tableau 23 à Tableau 27.

Composés	IC ₅₀ ± sd, µM
CT1321	0,29 ± 0,04
CT1365	1,06 ± 0,95
CT1366	1
CT1378	0,66 ± 0,23
CT1380	1,9 ± 1
CT1381	1,53 ± 0,27
CT1383	1,45 ± 0,64
CT1385	1,84 ± 1,02

Tableau 29 : IC₅₀ des azapeptides les plus actifs pour inhiber ABCB1.

Résultats et discussion

suggérant que, dans les 2 cas, les poches de fixation de ces groupes doivent être hydrophobes et de petite taille. La région notée (I), est hydrophobiquement défavorable mais stériquement favorable (grilles noire et jaune respectivement) suggérant que dans cette région il est préférable d'éviter les groupes ayant un caractère hydrophobe marqué, comme c'est le cas des composés CT1326 et CT1327.

Comme on peut l'observer sur la Figure 79D, un groupement électrostatique est défavorable (grille bleue) à proximité du -NH de la liaison peptidique mais favorable (grille rouge) en retrait de cette liaison. Ceci pourrait expliquer l'effet positif observé avec les composés contenant des sulfones comme CT1351. L'importance des groupements électrostatique limités par la liaison peptidique associée au caractère hydrophobe général des composés suggère que le volume hydrophile correspondant pourrait s'encastrent dans un environnement hydrophobe, et donc que les inhibiteurs pourraient se fixer dans une poche hydrophobe. Le caractère hydrophobe de la région notée II est défavorable à l'activité tandis que l'encombrement stérique est favorable, ce qui pourrait illustrer l'effet positif du changement du pont de l'ester sur l'activité inhibitrice des composés.

1.2.2. Les azapeptides

1.2.2.1. Efficacité d'inhibition

La 2^{ème} série de composés testés pour leur capacité à inhiber ABCB1 concerne les azapeptides. Leurs structures sont présentées dans les Tableau 23 à Tableau 27. Le témoin est la réversine 121 qui a une efficacité de 75% à 10 μ M. Les efficacités des différents azapeptides sont présentés sur la Figure 80. Les IC₅₀ des composés les plus actifs ont été mesurées et sont présentées dans le Tableau 29.

De la même façon que précédemment, nous pouvons séparer ces composés en 3 groupes : ceux avec une efficacité faible (inférieure à 40%), ceux avec une efficacité du même ordre que la réversine 121 (de 40% à 75%) et ceux ayant une efficacité supérieure.

Globalement, l'introduction d'un atome d'azote dans la structure a un impact positif sur l'efficacité. Nous ne trouvons ici que 3 molécules avec une faible efficacité : CT1374, CT1314 et CT1315.

Douze composés ont une efficacité équivalente à la réversine 121 : CT1310, CT1328, CT1364, CT1370, CT1371, CT1366, CT1313, CT1324, CT1325, CT1363, CT1334, CT1335.

Enfin, 10 composés se révèlent plus efficaces que la réversine 121 à 10 μ M.

Résultats et discussion

L'IC₅₀ de ces composés révèle que ce groupe compte 6 composés avec une IC₅₀ inférieure à celle de la molécule témoin, dont le composé CT1321 qui est 4 fois plus efficace que la réversine 121.

1.2.2.2. Relations structure-activité

L'étude de relations structure-activité menée sur ces composés a montré que plusieurs modifications n'améliorent pas l'efficacité. Ainsi, l'ajout d'un atome d'azote du côté de l'acide aspartique est sans effet sur l'activité d'inhibition du composé CT1310 par comparaison à la réversine 121.

Cependant, lorsque cet ajout est associé à une contrainte de la chaîne par le remplacement de l'aspartate par un cycle aromatique, on observe alors une augmentation d'activité pour les composés CT1321, CT1381, CT1386, CT1383 et CT1385. De manière très intéressante, l'étude révèle l'importance de la position du substituant sur le cycle aromatique. Ainsi, le composé CT1321 qui porte l'ester benzylique en position meta-, possède une IC₅₀ de 0,33 μ M, tandis que l'activité des composés CT1328 et CT1364 dont l'ester benzylique est en position ortho- ou para-, reste égale à la réversine. Ceci montre que le groupement -otbu doit être impliqué dans une liaison avec la protéine.

Du côté N-terminal, 2 groupements semblent importants à l'activité. Premièrement, la position du benzène, groupement protecteur de l'acide carboxylique en N-terminal, lorsque le composé est lévogyre, l'efficacité chute à moins de 40 % pour le composé correspondant CT1374, alors que le dextrogyre (CT1371) l'efficacité est équivalente à celle du CT1300. Deuxièmement, l'augmentation de la chaîne latérale de la lysine entraîne une augmentation de l'efficacité d'inhibition du composé correspondant : CT1383 $-(\text{CH}_2)_6\text{-NHZ}$ comparé à CT1370 $-(\text{CH}_2)_4\text{-NHZ}$. On note le même effet pour les composés N-aza. En effet, le composé CT1349 $-(\text{CH}_2)_5\text{-NHZ}$ a une efficacité nettement supérieure au composé CT1315 $-(\text{CH}_2)_4\text{-NHZ}$; de même les composés CT1323, CT1365, CT1379 et CT1380 qui possèdent une chaîne latérale de la lysine longue, sont très efficaces pour inhiber ABCB1. Cependant, on remarque que le composé CT1313, qui possède une chaîne $-(\text{CH}_2)_3\text{-NHZ}$, a une efficacité proche de la réversine, ce qui n'est pas le cas du composé CT1315 dont la chaîne est $-(\text{CH}_2)_4\text{-NHZ}$. Ceci laisse supposer que la chaîne latérale de la lysine est de préférence petite ou grande, mais pas de taille intermédiaire (≤ 3 ou ≥ 5).

D'une manière générale, l'ajout d'un azote côté N-terminal n'a des effets notables que s'il est couplé à l'augmentation de la chaîne latérale de la lysine.

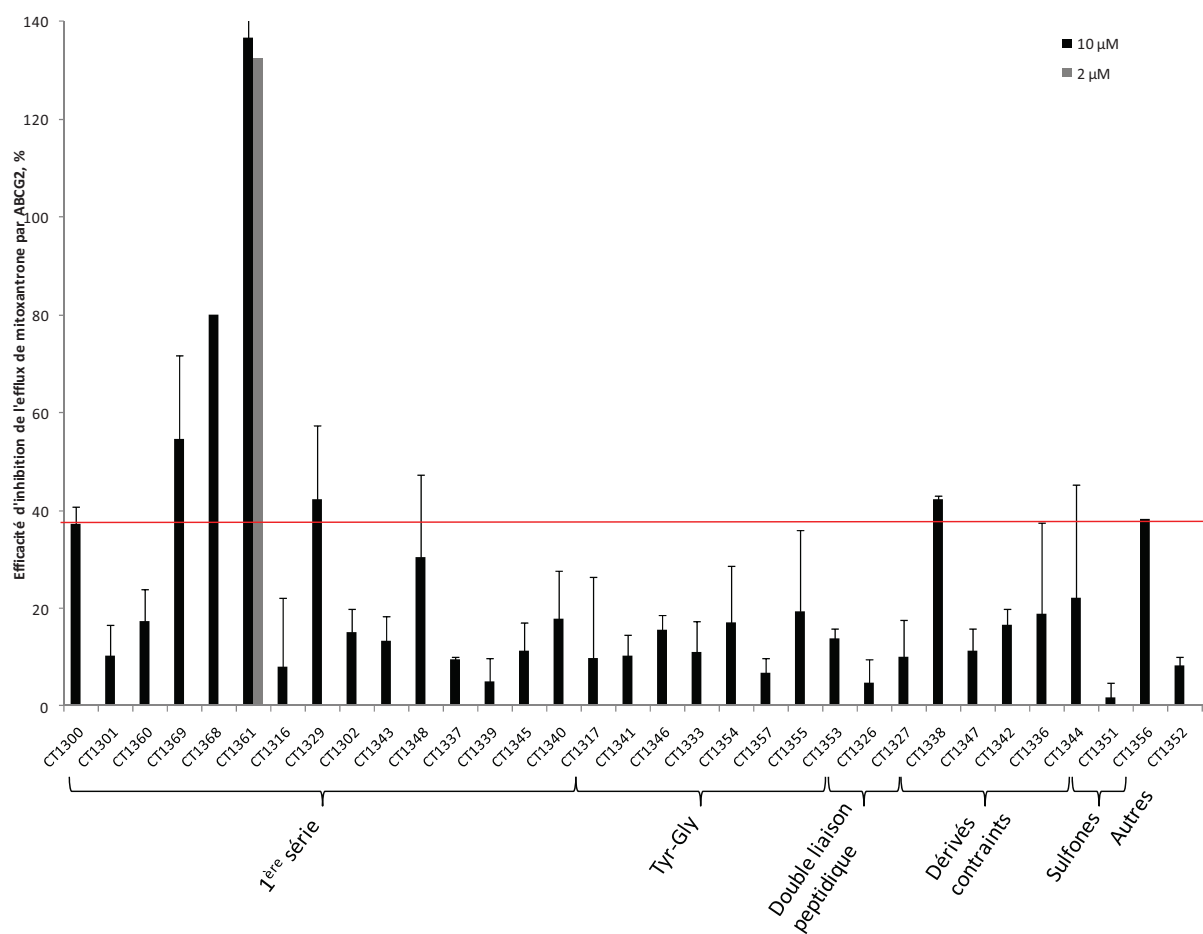


Figure 81 : Efficacité d'inhibition par les peptidomimétiques de l'efflux de mitoxantrone par ABCG2.
 L'efficacité d'inhibition a été mesurée selon le même protocole que pour ABCB1 (Figure 78).
 Les structures des composés sont présentées dans les Tableau 17 à Tableau 22.

Résultats et discussion

Enfin, le dernier point à noter est que la liaison peptidique ne semble pas indispensable à l'activité d'inhibition des composés. En effet, les composés CT1334 et CT1335 ont la même efficacité que les composés CT1314 et CT1315.

1.3. Efficacité d'inhibition d'ABCG2

Les tests d'efficacité ont été réalisés de la même façon que pour ABCB1 et sont décrits dans la partie *Matériels et méthodes*.

1.3.1. Les peptidomimétiques

1.3.1.1. Efficacité d'inhibition

L'efficacité d'inhibition d'ABCG2 par les peptidomimétiques est présentée sur la Figure 81. La structure des composés est retrouvée dans les Tableau 17 à Tableau 22.

Contrairement à ABCB1, la réversine 121 ou CT1300 a une efficacité relativement faible, environ 40%. Les composés sont alors classés en 2 groupes d'efficacité égale ou supérieure à la réversine 121.

Globalement, les peptidomimétiques sont très peu efficaces sur ABCG2. Seuls 3 composés, CT1369, CT1368 et CT1361 sont plus actifs que le témoin, et seul le composé CT1361 atteint plus de 80% d'efficacité à 10 μ M. Son efficacité à 2 μ M est aussi bonne et son IC_{50} est de 2 μ M.

Il n'a pas été possible d'établir une relation structure-activité pour cette série du fait de la faible variation d'efficacité des composés.

Résultats et discussion

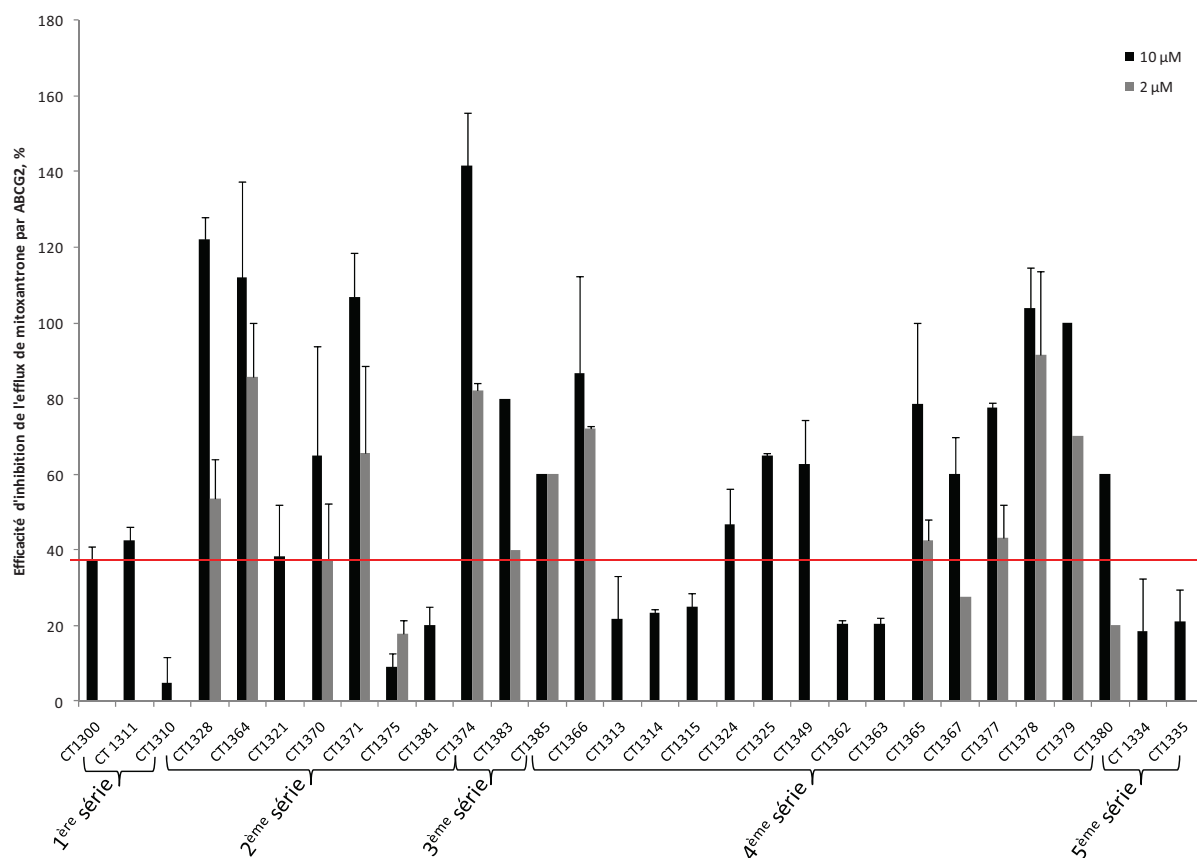


Figure 82 : Efficacité d'inhibition par les azapeptides de l'efflux de mitoxantrone par ABCG2.

L'efficacité d'inhibition a été mesurée comme décrit dans la Figure 78.

Les structures des composés sont présentées dans les Tableau 23 à Tableau 27.

Les IC₅₀ des composés les plus actifs ont été réalisées et sont présentées dans le Tableau 30.

Composés	IC ₅₀ ± sd, µM
CT1328	2,08 ± 0,1
CT1364	1,06 ± 0,3
CT1366	0,93
CT1378	0,68 ± 0,27
CT1379	2

Tableau 30 : IC₅₀ des azapeptides les plus actifs pour inhiber ABCG2.

Résultats et discussion

1.3.2. Les azapeptides

1.3.2.1. Efficacité d'inhibition

L'efficacité d'inhibition d'ABCG2 par les azapeptides est présentée sur la Figure 82. La structure des composés est présentée dans les Tableau 23 à Tableau 27.

Les azapeptides testés sur ABCG2 peuvent être regroupés en 3 classes : composés peu ou pas actifs (efficacité dans la tranche 10-40%), modérément actifs (40-80%) et les composés actifs (efficacité d'inhibition supérieure à 80% à 10 μ M).

La 1^{ère} classe contient 10 composés (CT1311, CT1310, CT1321, CT1375, CT1381, CT1313, CT1314, CT1315, CT1324, CT1362, CT1363, CT1334, CT1335), la 2^{ème} classe 7 composés (CT1370, CT1385, CT1325, CT1349, CT1365, CT1367, CT1377, CT1380) et la dernière classe 8 molécules particulièrement intéressantes (CT1328, CT1364, CT1371, CT1374, CT1383, CT1366, CT1378 et CT1379). Certains des composés de ce dernier groupe ont des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire voir inférieurs (Tableau 30).

1.3.2.2. Les relations structure-activité

Les résultats obtenus avec les azapeptides recouvrent un spectre d'efficacité suffisant pour nous permettre de mener une étude des relations structure-activité.

Les résultats montrent que comme pour ABCB1, l'ajout d'un atome d'azote du côté C-terminal ne permet pas à lui seul d'augmenter l'efficacité des composés résultants, CT1311 et CT1310. Par contre, le remplacement de l'aspartate par un cycle aromatique conduit souvent à une augmentation de l'efficacité d'inhibition. De plus, la position du substituant sur le cycle est importante. Contrairement à ABCB1 où le substituant doit être en position para- pour produire le maximum d'efficacité, dans le cas d'ABCG2, une substitution en meta- donne de meilleurs résultats, e.g. CT1364 comparé à CT1328 ou CT1321.

Il semble que la taille du substituant du cycle aromatique soit importante. En effet, les composés CT1371 et CT1374 qui ont un groupement encombrant sur le cycle aromatique ont une efficacité supérieure aux composés CT1370 et CT1375.

Par ailleurs, la stéréochimie (composé D ou L) du benzène en position R₃ n'affecte pas l'activité des composés : CT1370 comparé à CT1374.

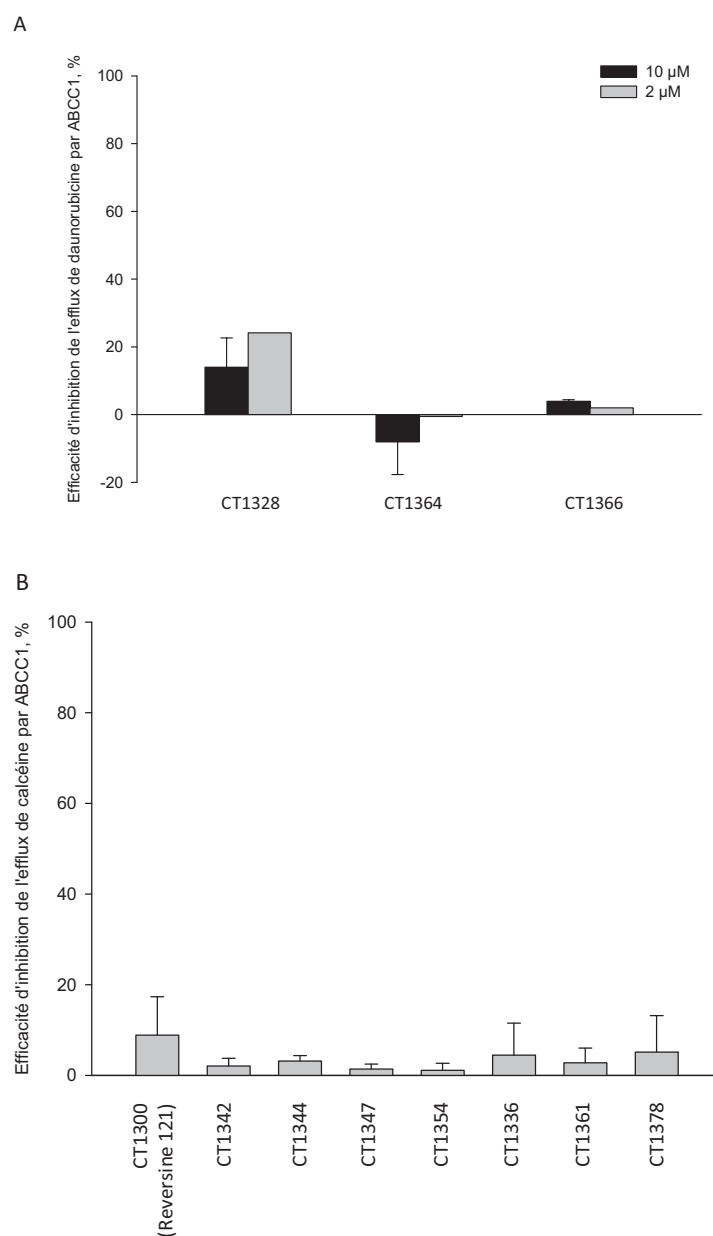


Figure 83 : Efficacité d'inhibition par les peptidomimétiques sur l'efflux de substrats par ABCC1.

A : Efficacité d'inhibition de l'efflux de daunorubicine par 3 composés sélectionnés.

B : Efficacité d'inhibition de l'efflux de calceïne AM par 8 composés sélectionnées.

Résultats et discussion

Un point commun avec ABCB1, concerne la longueur de la chaîne latérale de la lysine de ces composés. Plus elle est longue, plus l'activité est élevée : CT1313 < CT1314 < CT1315 < CT1349 < CT1366. Nous ne retrouvons cependant pas une taille minimum nécessaire comme pour ABCB1.

La liaison peptidique, quant à elle, n'est pas nécessaire à l'activité inhibitrice des composés. En effet, nous n'observons pas de différence entre les composés CT1314 et CT1315. De plus, CT1378, qui est l'un des composés les plus efficaces présente une liaison peptidique avec un carbonyle réduit en méthylène.

1.4. Tests d'efficacité d'inhibition d'ABCC1

Ces tests ont été effectués afin de contrôler la spécificité des composés les plus actifs sur ABCB1 et/ou ABCG2. Ainsi, seuls les composés sélectionnés précédemment ont été testés.

L'efficacité d'inhibition d'ABCC1 par ces composés a été mesurée en testant leur capacité à inhiber l'efflux de daunorubicine (10 μ M) ou de calcéine AM (0,02 μ M).

Comme on peut le voir sur les Figure 83A et B, aucun des composés testés n'inhibe l'efflux de substrats par ABCC1. Les composés testés ici étant les plus efficaces sur ABCB1 ou ABCG2., on a une spécificité vis-à-vis de l'un ou l'autre de ces transporteurs.

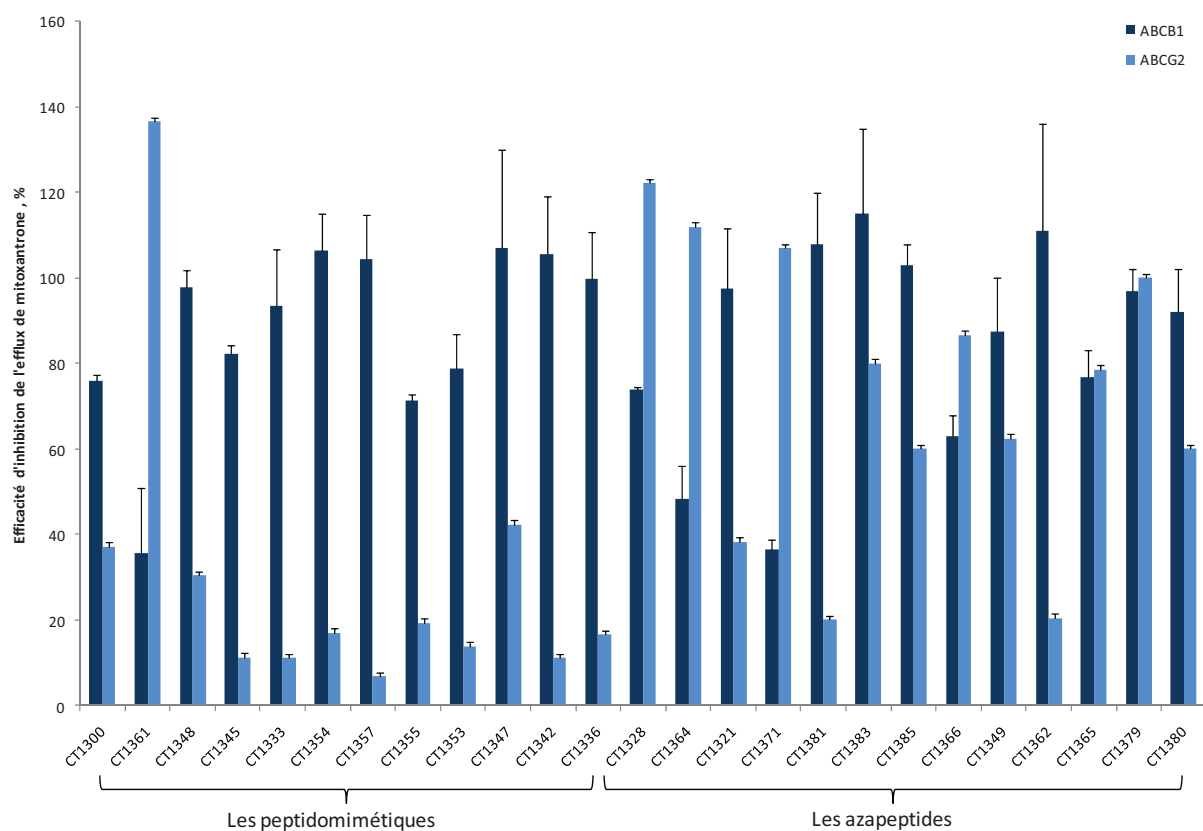


Figure 84 : Comparaison des efficacités d'inhibition de l'efflux de mitoxantrone par les meilleurs composés inhibiteurs d'ABCB1 ou ABCG2.

1.5. Comparaison des efficacités d'inhibition sur 3 transporteurs ABC

Comme on peut le voir sur la Figure 84, peu d'inhibiteurs sont actifs sur les 2 transporteurs. Seuls 6 composés inhibent à la fois ABCB1 et ABCG2 : CT1328, CT1383, CT1366, CT1365, CT1378 et CT1379 ; les autres inhibiteurs sont spécifiques de l'un ou l'autre transporteur. Ainsi, 18 composés se révèlent spécifiques d'ABCB1 : CT1300, CT1348, CT1345, CT1333, CT1354, CT1357, CT1355, CT1353, CT1347, CT1342, CT1336, CT1321, CT1366, CT1381, CT1385, CT1349, CT1362 et CT1380. Trois seulement sont spécifiques d'ABCG2 : CT1361, CT1364 et CT1371.

Comme déjà remarqué précédemment, l'ajout d'un atome d'azote en position C- (C-aza) ou N-terminal (N-aza) est essentiel à l'activité d'inhibition d'ABCG2. Cette caractéristique a déjà été observée par une étude menée sur 123 composés non reliés structurellement (Matsson *et al.*, 2007). Cette analyse a montré l'importance des atomes d'azote, ainsi que des substituants ayant des électrons π , dans l'efficacité des inhibiteurs d'ABCG2. Ils suggèrent que des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions des substituants possédant des électrons π tels que des interactions π - π ou π -cations, seraient impliquées dans l'interaction de l'inhibiteur avec ABCG2 (Matson *et al.*, 2007). Ainsi, les cycles aromatiques présents dans toutes nos molécules pourraient également constituer un élément essentiel de l'activité des composés, en formant des interactions π - π avec les acides aminés aromatiques d'ABCG2. Il est intéressant de noter que les boucles intracellulaires et les domaines transmembranaires d'ABCG2 sont constituées d'un grand nombre d'acides aminés aromatiques ou possédant des chaînes latérales donneuses de liaisons hydrogènes (Doyle *et al.*, 1998). De la même façon, les zones supposées de fixation des substrats d'ABCB1 possèdent des acides aminés aromatiques en grande quantité (Aller *et al.*, 2009) ; (Pajeva *et al.*, 2009), ce qui pourrait expliquer le recouvrement des spectres de substrats et d'inhibiteurs de ces 2 transporteurs.

Un point intéressant à noter est la discrimination assez fine qu'est capable d'avoir un transporteur ABC par rapport à un autre. Les composés CT1321, CT1328 et CT1364 constituent un très bon exemple de cette remarquable capacité de discrimination (Tableau 23). La seule différence dans leur structure est la position ortho-, méta- ou para- du substituant du cycle aromatique en position C-terminale. Lorsque le substituant est en position ortho-

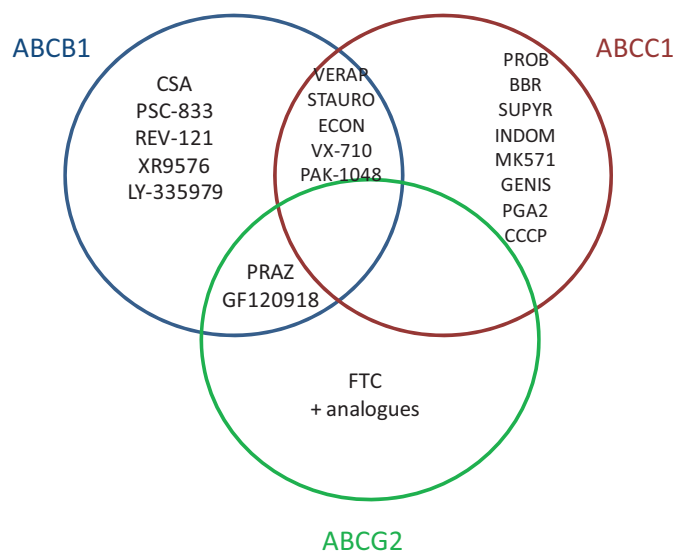


Figure 85 : Diagramme de Venn représentant le spectre des inhibiteurs de 3 transporteurs ABC.
 CSA : cyclosporine A ; VERAP : vérapamil ; STAURO : staurosporine ; ECON : econazole ; PRAZ : prazosine ;
 FTC : fumitrémorgine C ; PROB : probénécide ; BBR : benzbromarone ; SUPYR : sulfinpyrazone ; INDOM :
 indométhacine ; GENIS : génistéine ; PGA2 : prostaglandine A2 ; CCCP : chlorocarbonyl cyanide
 phénylhydrazone (Litman *et al.*, 2000).

Résultats et discussion

(CT1328) l'inhibiteur est aussi efficace sur ABCB1 que sur ABCG2 ; lorsque ce même substituant est en position méta- (CT1364), l'inhibiteur est spécifique d'ABCG2 ; enfin, lorsque le substituant est en position para- (CT1321), le composé inhibe spécifiquement ABCB1. Ce point illustre parfaitement le fait que les poches d'ABCB1 et ABCG2 sont différentes mais restent tout de même relativement proches.

Enfin, aucun des inhibiteurs testés ne s'est révélé efficace sur ABCC1, alors que le spectre des inhibiteurs des transporteurs ABC se recouvre partiellement (Figure 85). Il n'est pas étonnant que les inhibiteurs d'ABCG2 développés ici soient inefficaces sur ABCC1 puisqu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'inhibiteur commun à ces 2 transporteurs. Cependant, il existe un spectre de recouvrement des inhibiteurs d'ABCB1 et ABCC1. On aurait donc pu penser que ce soit le cas ici aussi. Ceci suggère que les poches de fixation des inhibiteurs d'ABCB1 et ABCC1 divergent beaucoup plus que celle d'ABCB1 et ABCG2.

Le but de cette étude était d'une part de développer des inhibiteurs spécifiques d'un transporteur ABC et d'autre part, d'établir, si possible, des relations structure-activité des séries synthétisées. Le composé de référence était la réversine 121, dipeptides connus pour inhiber spécifiquement ABCB1 (Sharom *et al.*, 1999), sur lequel des modifications structurales ont été réalisées. Nous avons ainsi sélectionné des composés inhibant ABCB1 avec une efficacité d'inhibition supérieure à la molécule témoin. De plus, les modifications structurales ont permis d'obtenir des composés inhibant spécifiquement ABCG2. Les études de relations structures-activités ont mis en avant certaines caractéristiques importantes des inhibiteurs d'ABCB1 ou ABCG2. Concernant ABCB1, les 2 points qui semblent les plus importants pour l'activité d'inhibition des composés est d'une part le fait de contraindre les molécules et d'autre part, l'ajout d'un cycle aromatique combiné à un atome d'azote en position C-terminal. Cette dernière caractéristique est également vraie pour ABCG2 où la présence d'un atome d'azote semble indispensable à l'activité inhibitrice de ces composés.

Enfin, les données recueillies par l'étude de relations structure-activité devraient nous permettre de synthétiser des composés de 2^{ème} génération plus actifs et plus spécifiques du transporteur ciblé.

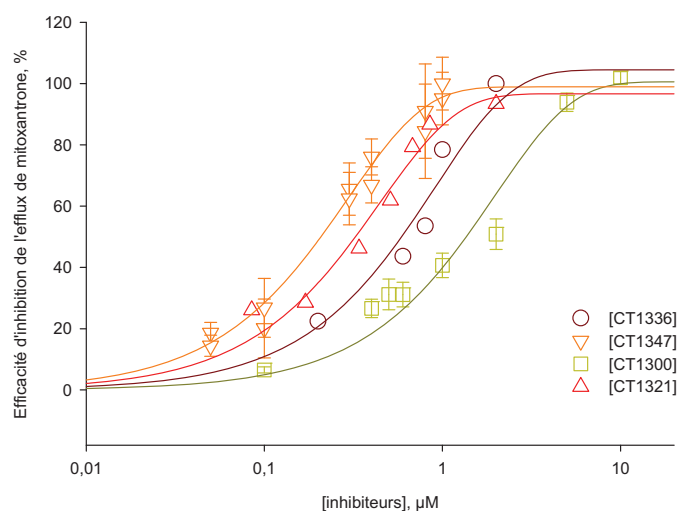


Figure 86 : Efficacité de réversion de l'efflux de mitoxantrone par la réversine 121, CT1300, et par les composés CT1347, CT1336 et CT1321.

Les courbes d'efficacité d'inhibition du CT1347 (triangles oranges), du CT1321 (triangles rouges), du CT1336 (cercles bordeaux) et du CT1300 (carrés verts) sont traitées par le logiciel SigmaPlot en utilisant l'équation :

$$\% \text{ efficacité} = a \times (1 - \exp^{-b[\text{inhibiteur}, \mu\text{M}]})$$
 où a et b sont des paramètres permettant d'ajuster la courbe.

2. Caractérisation des inhibiteurs d'ABCB1

Les composés les plus efficaces et spécifiques d'ABCB1 ont été caractérisés plus en détail afin de déterminer s'ils sont de bons candidats aux tests *in vivo*. En effet, plusieurs caractéristiques sont requises pour le développement d'un inhibiteur potentiellement utilisable en tant que médicament. Ils ne doivent pas être cytotoxiques aux doses efficaces, ils doivent être capables d'abolir le phénotype MDR *in vitro* et enfin un mécanisme d'inhibition de type non compétitif avec les substrats est préférable à une compétition.

2.1. Demi-concentration inhibitrice des réversines

L'IC₅₀ des composés les plus efficaces d'ABCB1 est détaillée dans les Tableau 28 et Tableau 29. Les composés les plus efficaces sont le CT1347 avec un IC₅₀ de 0,22 µM, le CT1321 avec un IC₅₀ de 0,33 µM, et le CT1336 avec un IC₅₀ de 0,73 µM.

La Figure 86 montre clairement le décalage d'efficacité des composés CT1347, CT1321 et CT1336 avec la réversine 121. L'efficacité de CT1347 est près de 10 fois supérieure, celle du CT1321 plus de 5 fois supérieure et l'efficacité du CT1336 est 2 fois meilleure à celle du composé d'origine, la réversine 121.

Résultats et discussion

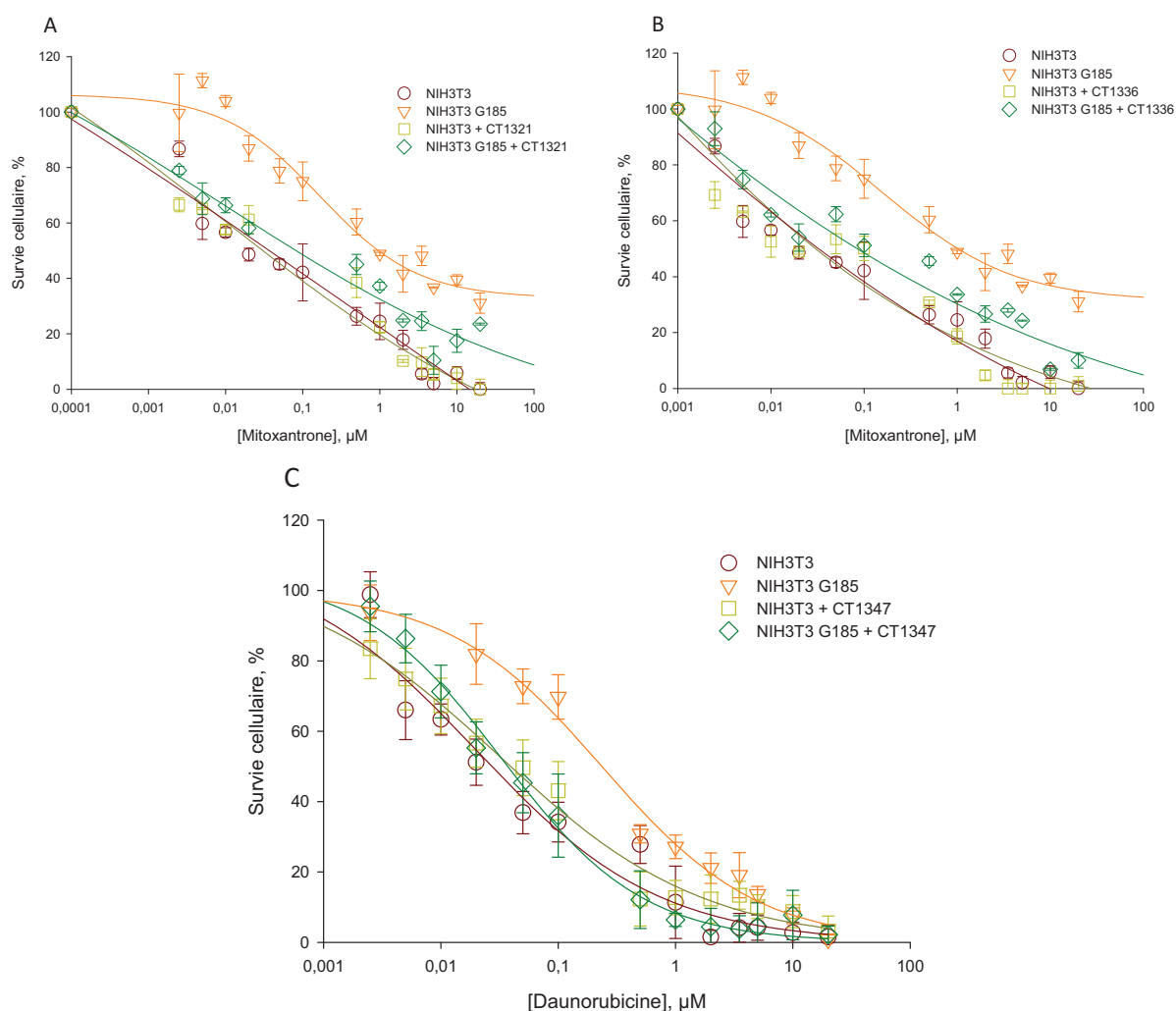


Figure 87 : Les 3 réversines CT1321, CT1336 et CT1347 chimiosensibilisent les cellules NIH3T3-MDR-G185 exprimant ABCB1.

Les cellules exprimant (triangles oranges) ou non (cercles bordeaux) ABCB1 sont incubées avec des concentrations croissantes de substrat (mitoxantrone ou daunorubicine). Les mêmes essais sont réalisés en présence d'inhibiteurs (carrés verts clairs pour les cellules contrôles ; losanges verts pour celles exprimant ABCB1).

Les composés testés sont CT1321 à une concentration de 1 μM (A), CT1336 à 4 μM (B) et CT1347 à 1 μM (C).

Les courbes ont été réalisées par le logiciel SigmaPlot. La viabilité cellulaire a été estimée en prenant comme 100% les cellules incubées avec du milieu seul.

Sur les 3 graphiques, nous notons une réversion de la résistance à la mitoxantrone ou à la daunorubicine pour les cellules exprimant ABCB1 après ajout de l'inhibiteur.

2.2. Chimiosensibilisation

Nous avons démontré que les réversines CT1321, CT1336 et CT1347 sont capables d'inhiber l'efflux de mitoxantrone par ABCB1. Nous souhaitons maintenant caractériser leur capacité à abolir le phénotype MDR provoqué par ABCB1. Pour cela, nous avons mesuré la viabilité des cellules exprimant ou non ABCB1 après 72 h d'incubation avec un agent cytotoxique, la mitoxantrone ou la daunorubicine, en présence ou non d'inhibiteur. Les résultats sont présentés sur la Figure 87.

La Figure 87A présente les résultats obtenus avec le composé CT1321. Comme on peut le voir, les cellules exprimant ABCB1 (notées NIH3T3 G185 sur le graphique, triangles oranges) ont une viabilité cellulaire de 50% à 1 μ M de mitoxantrone tandis que les cellules n'exprimant pas ABCB1 (cercles bordeaux) ont une viabilité cellulaire de 50% à 0,02 μ M de mitoxantrone. L'index de résistance à la mitoxantrone est 50 fois plus élevé pour les cellules exprimant ABCB1. Lorsque l'inhibiteur est ajouté, ici CT1321, à 5 fois son IC_{50} , soit 1 μ M, la sensibilité des cellules exprimant ABCB1 (losanges verts) est quasiment la même que celle des cellules n'exprimant pas le transporteur. Ceci signifie que l'inhibiteur utilisé est capable de restaurer la sensibilité des cellules exprimant ABCB1 à la mitoxantrone. Le même phénomène est observé avec le composé CT1336 (Figure 87B).

La Figure 87C permet d'observer la sensibilité des cellules à la daunorubicine. Ainsi, les cellules NIH3T3-MDR-G185 ont un index de résistance à la daunorubicine 8,5 fois plus élevé que les cellules NIH3T3 (triangles oranges contre cercles bordeaux). Même si l'index de résistance à la daunorubicine est plus faible que celui à la mitoxantrone, il est suffisant pour observer un effet de l'inhibiteur et il nous permet d'étudier un 2^{ème} substrat du transporteur. Ainsi, après addition du CT1347 à la concentration de 1 μ M (5 fois son IC_{50}), la sensibilité des cellules NIH3T3-MDR-G185 à la daunorubicine (losanges verts) a été restaurée, montrant ainsi la capacité de l'inhibiteur à abolir le phénotype MDR.

Résultats et discussion

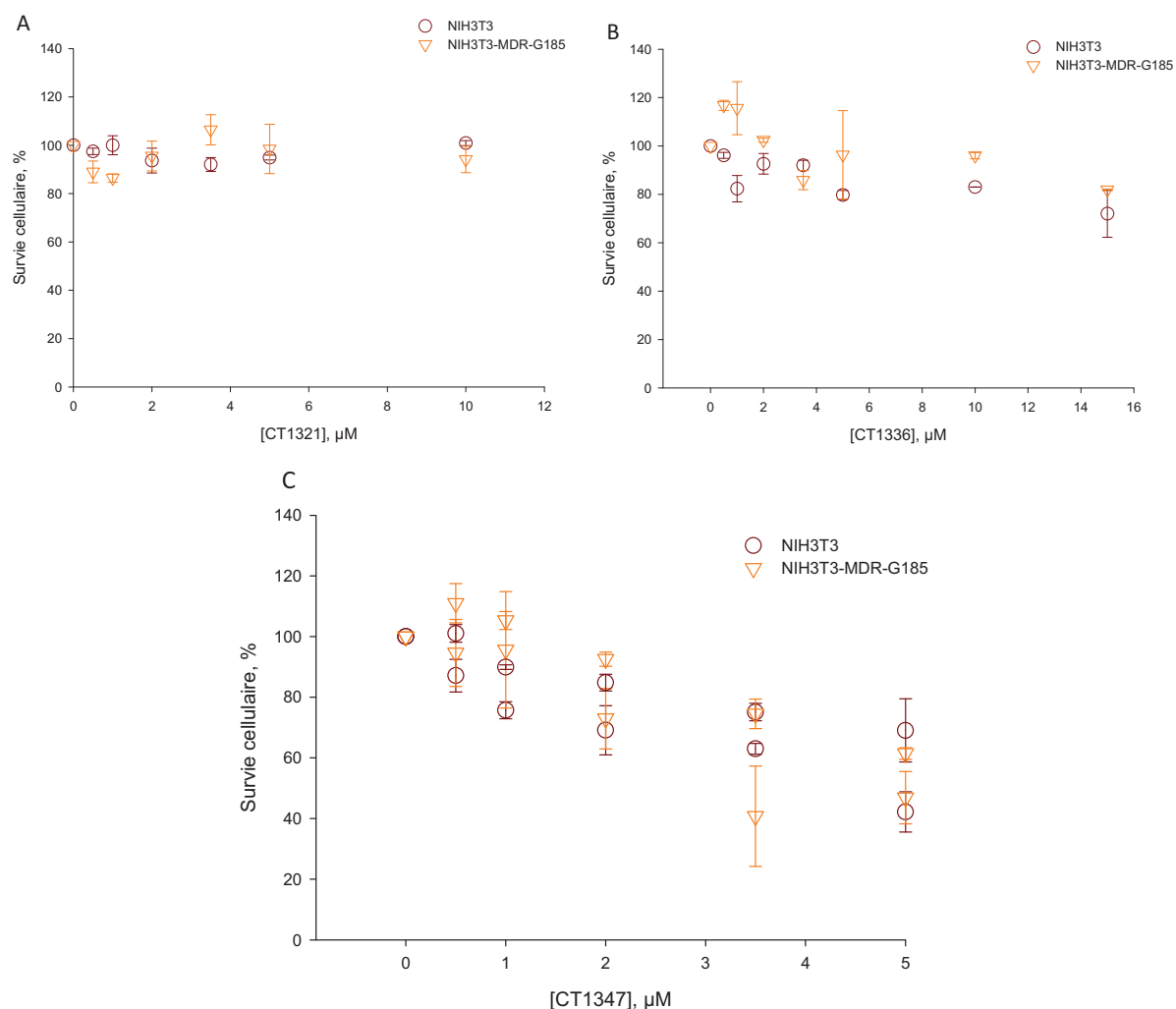


Figure 88 : Les 3 réversines, CT1321, CT1336 et CT1347 sont peu, ou pas, cytotoxiques.

Ces différents graphiques présentent la viabilité cellulaire en fonction des concentrations croissantes de réversines (CT1321 en A ; CT1336 en B ; CT1347 en C). Ils ont été réalisés par le logiciel SigmaPlot. Les cellules contrôles NIH3T3 sont représentées par des cercles rouges et les cellules exprimant ABCB1 par des triangles oranges. La viabilité cellulaire a été estimée en prenant comme 100% les cellules incubées avec du milieu seul.

2.3. Cytotoxicité

Afin de mieux caractériser ces réversines et avant d'envisager des tests *in vivo*, il est indispensable de contrôler leur innocuité *in vitro*. Pour cela, nous utilisons le test de viabilité au MTT décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. La viabilité cellulaire (en pourcentage) est représentée en fonction de la concentration croissante de réversine. Les résultats sont présentés dans la Figure 88.

Malgré leur structure proche, les 3 réversines testées présentent des cytotoxicités différentes sur les mêmes cellules. Ainsi, le CT1321 n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules exprimant ABCB1 (triangles oranges) ou sur les cellules contrôles (cercles bordeaux). Même à 10 μM , soit 30 fois son IC_{50} , il n'est pas cytotoxique (Figure 88A). Le composé CT1336 a une structure un peu différente du CT1321 puisque ce dernier est un C-aza alors que le CT1336 est un peptidomimétique. Comme on peut le noter sur la Figure 88B, la réversine CT1336 présente une légère cytotoxicité : à 5 μM , soit 6,5 fois son IC_{50} , la viabilité cellulaire est de 80%. On remarque également que la viabilité des cellules NIH3T3-MDR-G185 est équivalente à celle des cellules contrôles. Ceci suggère que la réversine CT1336 n'est pas transportée par ABCB1. En effet, dans le cas contraire, les cellules exprimant ABCB1 auraient expulsé le composé, résistant ainsi à des concentrations plus élevées de CT1336.

Le composé CT1347 est plus cytotoxique que les 2 autres réversines (Figure 88C). En effet, à 5 μM la viabilité des 2 types de cellules n'est plus que de 40%. Cependant, à 2 μM , soit 10 fois son IC_{50} , le CT1347 n'est quasiment pas cytotoxique, la viabilité cellulaire étant de 80%. De la même façon que le CT1336, la réversine CT1347 ne semble pas transportée (même profil pour les cellules exprimant ABCB1 (triangles oranges) et les cellules contrôles (cercles bordeaux)).

Il est intéressant de noter la différence de toxicité des réversines CT1336 et CT1347, le composé CT1347 étant réduit au niveau de la liaison peptidique par rapport au CT1336. Ainsi, malgré leur faible différence de structure, les 2 composés ont des profils de toxicité distincts.

2.4. Mécanisme d'inhibition

Il est essentiel de connaître le mécanisme d'action des inhibiteurs, notamment afin de déterminer s'ils agissent de manière compétitive ou non compétitive avec les substrats. Dans le cas où un inhibiteur est compétitif, cela signifie que le complexe enzyme-substrat-inhibiteur n'existe pas et que donc l'inhibiteur pourrait se fixer dans le même site que le substrat. Or, les transporteurs ABC sont des protéines polyspécifiques capables d'adapter leur site de transport à un grand nombre de molécules. Ainsi, si un inhibiteur se fixe au site de transport, il y a un risque qu'il soit expulsé par ce transporteur ou par un autre transporteur. C'est par exemple le cas de l'Imatinib, inhibiteur d'ABCG2 qui agit de manière compétitive, notamment avec la mitoxantrone, et où des résistances sont alors observées (Burger *et al.*, 2004).

Comme expliqué dans la partie *Rappels bibliographiques*, il est maintenant admis qu'ABCB1 possède au moins 3 sites de fixation de substrats différents (Figure 24) : le site R fixant préférentiellement la rhodamine 123 et les anthracyclines tels que la doxorubicine et la daunorubicine ; le site H fixant préférentiellement le Hoechst 33342 ; et le site P reconnaissant la prazosine et la progestérone. Ce dernier site est considéré comme un site de fixation des modulateurs puisque la prazosine est peu transportée par ABCB1 tandis que la progestérone n'est pas transportée (Shapiro et Ling, 1997 ; Shapiro *et al.*, 1999).

Le mécanisme d'inhibition des réversines CT1321, CT1336 et CT1347 a été étudié sur les 2 sites de fixation des substrats R et H.

Le protocole est quasiment identique à celui utilisé pour mesurer l'efficacité d'inhibition d'un composé. Les paramètres cinétiques sont déterminés en incubant 10^5 cellules NIH3T3 ou NIH3T3-MDR-G185 avec des concentrations variées en substrat (daunorubicine ou Hoechst 33342), en présence de 4 à 5 concentrations d'inhibiteur à tester. Le taux intracellulaire résiduel de substrat, après 1 h d'incubation, est alors quantifié par cytométrie en flux. Deux types de représentations sont utilisés et les constantes cinétiques sont calculées :

- la représentation directe (panel A et C des figures) : le taux résiduel de fluorescence intracellulaire est représenté en fonction de la concentration en substrat et la courbe est tracée par le logiciel SigmaPlot selon l'équation de Michaelis et Menten ($R = R_{max}[I]/([I]+K_M)$) où R est le taux résiduel de substrat, R_{max} est le taux résiduel maximum de substrat, $[I]$ est la concentration en inhibiteur et K_M est la constante de Michaelis ;

Résultats et discussion

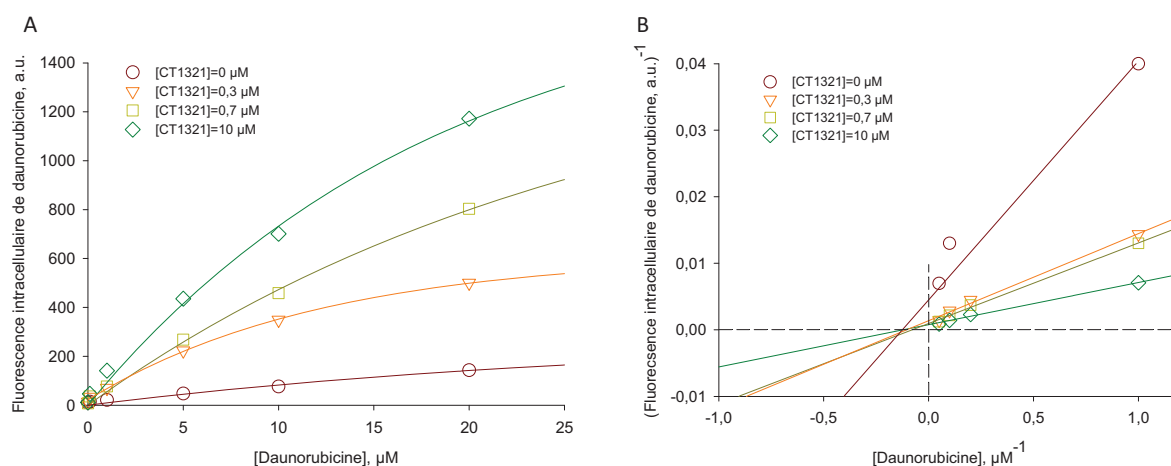


Figure 89 : CT1321 inhibe l'efflux de daunorubicine avec un mécanisme non compétitif.

CT1321 est soit omis (0 μM , cercles Bordeaux), soit ajouté à 0,3 μM (triangles oranges), 0,7 μM (carrés verts clairs) ou à 10 μM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel SigmaPlot avec la représentation de Michaelis et Menten (A) ou de Lineweaver-Burk (doubles inverses) (B). Les expériences ont été réalisées en duplicate dans 2 séries indépendantes.

[CT1321], μM	R_{max} , a.u.	K_M , μM	K_I , μM
Daunorubicine			
0	$116,5 \pm 54,2$	$5,8 \pm 5,9$	
0,3	$692,1 \pm 195$	$10,0 \pm 5$	$0,35 \pm 0,02$
0,7	$709 \pm 181,5$	$8,2 \pm 3,3$	$0,83 \pm 0,05$
10	$1495,2 \pm 235,2$	$11,5 \pm 3,0$	$10,8 \pm 0,4$

Tableau 31 : Constantes cinétiques de l'inhibition du transport de daunorubicine par CT1321.

Le R_{max} correspond au taux de rétention maximal dans les cellules représentant ainsi la vitesse maximale du transport ; le K_M correspond à la constante de Michaelis ; et le K_I à la constante d'inhibition.

Résultats et discussion

- la représentation en double inverse ou représentation de Lineweaver-Burk (panel B et D des figures).

La constante d'inhibition, K_I , présenté dans les tableaux est calculée avec l'équation $R_{max}' = R_{max}/(1+[I]/K_I)$ avec R_{max}' correspondant au maximum de rétention intracellulaire pour chaque concentration en inhibiteur $[I]$.

2.4.1. La réversine CT1321

Commençons par la réversine CT1321 (Figure 89) dont le type d'inhibition n'a été étudié qu'avec la daunorubicine.

Les courbes de la Figure 89A, tracées avec l'équation de Michaelis et Menten, atteignent des plateaux différents, ce qui signifie que le taux de rétention de daunorubicine (R_{max}) diffère avec la concentration d'inhibiteur. La représentation en doubles inverses (Figure 89B) montre que les droites obtenues se croisent au niveau de l'axe des abscisses et donc que le K_M est constant quelle que soit la concentration en inhibiteur tandis que le R_{max} varie avec la concentration en inhibiteur ajoutée, paramètres caractéristiques d'une inhibition non compétitive.

Les constantes cinétiques sont calculées à partir de la Figure 89A et sont présentées dans le Tableau 31.

Le Tableau 31 confirme que, selon la concentration en inhibiteur, le R_{max} varie tandis que le K_M , aux erreurs expérimentales près, semble plus constant, en accord avec ce qui était observé sur la Figure 89B. Enfin, la constante d'inhibition calculée est différente pour chaque concentration en inhibiteur ce qui signifierait que CT1321 possède au moins 2 sites de fixation sur ABCB1 avec des affinités différentes.

Nous sommes donc ici en présence d'une inhibition de type non compétitive vis-à-vis de la daunorubicine ce qui suggère que le composé CT1321 ne se fixe pas dans le site R d'ABCB1.

Résultats et discussion

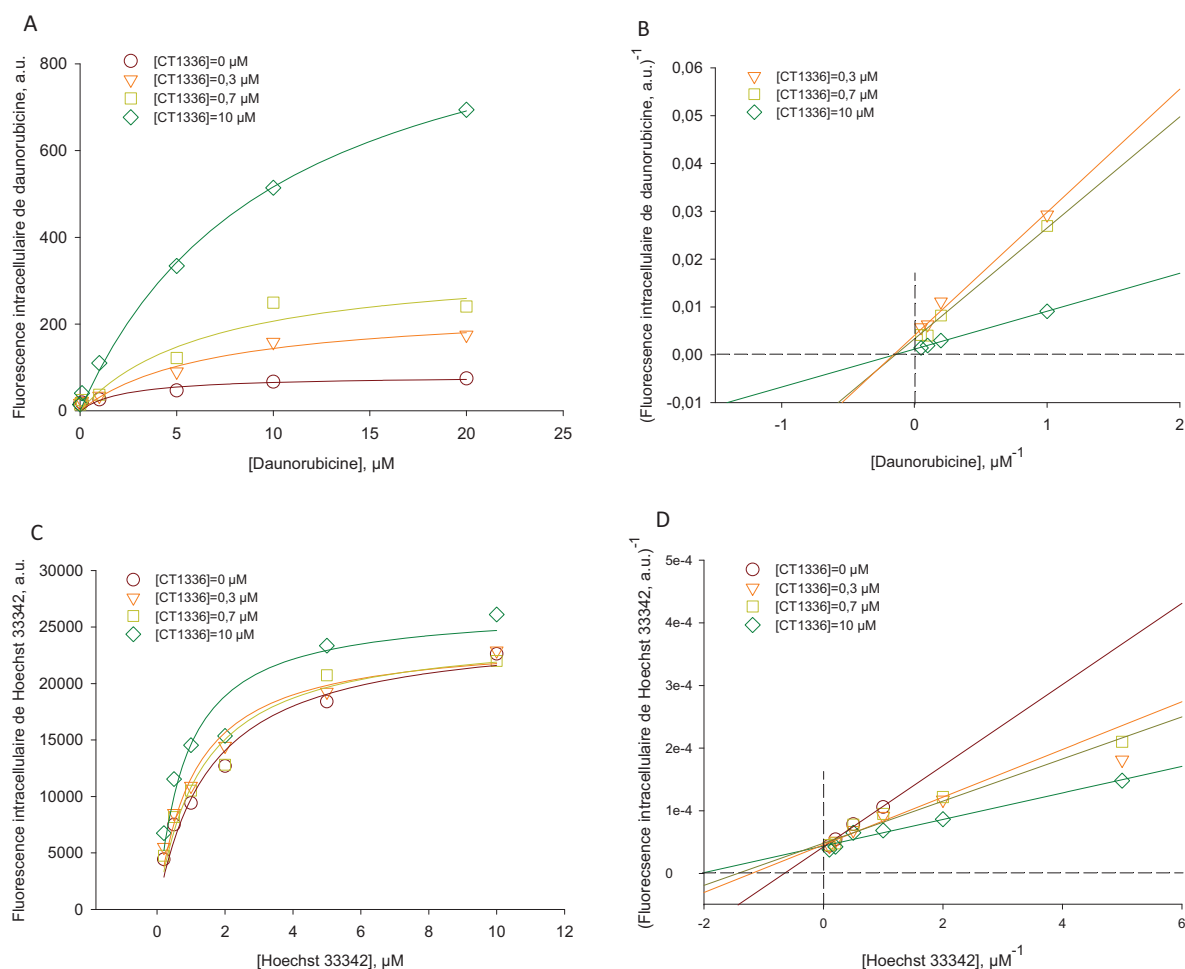


Figure 90 : CT1336 inhibe l'efflux de daunorubicine de façon non compétitive mais inhibe l'efflux de Hoechst 33342 de façon compétitive.

CT1336 est soit omis (0 μM , cercles Bordeaux), soit ajouté à 0,3 μM (triangles oranges), 0,7 μM (carrés verts clairs) ou à 10 μM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel SigmaPlot avec la représentation directe de Michaelis et Menten (A et C) ou de Lineweaver-Burk en doubles inverses (B et D). Les expériences ont été réalisées en duplicates dans 2 séries indépendantes.

[CT1336], μM	R_{max} , a.u.	K_M , μM	K_i , μM
Daunorubicine			
0	$94 \pm 8,4$	$4,6 \pm 1,3$	
0,3	$217,3 \pm 32,0$	$4,3 \pm 2,3$	$0,53 \pm 0,03$
0,7	$315,1 \pm 57,4$	$4,2 \pm 2,8$	$2,3 \pm 0,26$
10	$1047 \pm 81,8$	$10,3 \pm 1,7$	$14,3 \pm 0,9$
Hoechst 33342			
0	$24960,2 \pm 1618,7$	$1,55 \pm 0,3$	
0,3	$24169,6 \pm 1312,1$	$1,0 \pm 0,2$	$0,54 \pm 0,01$
0,7	$24222,5 \pm 1286,4$	$0,9 \pm 0,2$	$0,95 \pm 0,09$
10	$27319,4 \pm 1175,7$	$0,7 \pm 0,1$	$9,42 \pm 1,13$

Tableau 32 : Constantes cinétiques de l'inhibition par le CT1336 de l'efflux de 2 substrats.

2.4.2. La réversine CT1336

Le mécanisme d'inhibition de la réversine CT1336 est présenté sur les Figure 90A à D avec 2 substrats différents : la daunorubicine et le Hoechst 33342.

Concernant la daunorubicine, le mécanisme d'inhibition de CT1336 est le même que celui du CT1321, à savoir une inhibition de type non compétitive. En effet, comme on peut l'observer sur le panel A, les courbes atteignent des plateaux différents pour les concentrations en inhibiteurs testés. De plus, les droites tracées en doubles inverses (Figure 90B) se croisent sur l'axe des abscisses. Ces 2 points signifient que le R_{max} varie avec la concentration en inhibiteur et que le K_M est constant.

Le mécanisme d'inhibition de l'efflux de la daunorubicine par CT1336 est donc non compétitif : le R_{max} varie (Figure 90A et Tableau 32) alors que le K_M est identique pour chaque concentration d'inhibiteur (Tableau 32 et Figure 90). A 10 μ M, nous notons une augmentation du K_M de la daunorubicine pour ABCB1. Cependant, nous nous sommes placés à une très forte concentration et dans ce cas, nous pensons que le composé hydrophobe se fixe sur des zones non spécifiques d'ABCB1 qui peuvent alors recouvrir le site R.

L'inverse est observé avec le Hoechst 33342. Les courbes de la représentation directe (Figure 90C) semblent tendre vers un seul point et les droites obtenus par la représentation de Lineweaver-Burke (Figure 90D) se croisent sur l'axe des ordonnées. Ces 2 points signifient que le R_{max} est constant quelle que soit la concentration en inhibiteur ajouté. Les constantes cinétiques calculées grâce à la représentation directe (Tableau 32) confirment ces résultats.

Le profil d'inhibition de l'efflux du Hoechst 33342 est donc complètement différent : il semble être compétitif.

De la même façon que pour le CT1321, la constante d'inhibition (K_I) varie avec la concentration d'inhibiteur. Ceci pourrait également s'expliquer par différents sites de fixation de CT1336 sur ABCB1 avec des affinités différentes.

En résumé, le composé CT1336 est en compétition avec le Hoechst 33342 mais pas avec la daunorubicine, ce qui suggère que ce composé se fixe dans le site H d'ABCB1.

Résultats et discussion

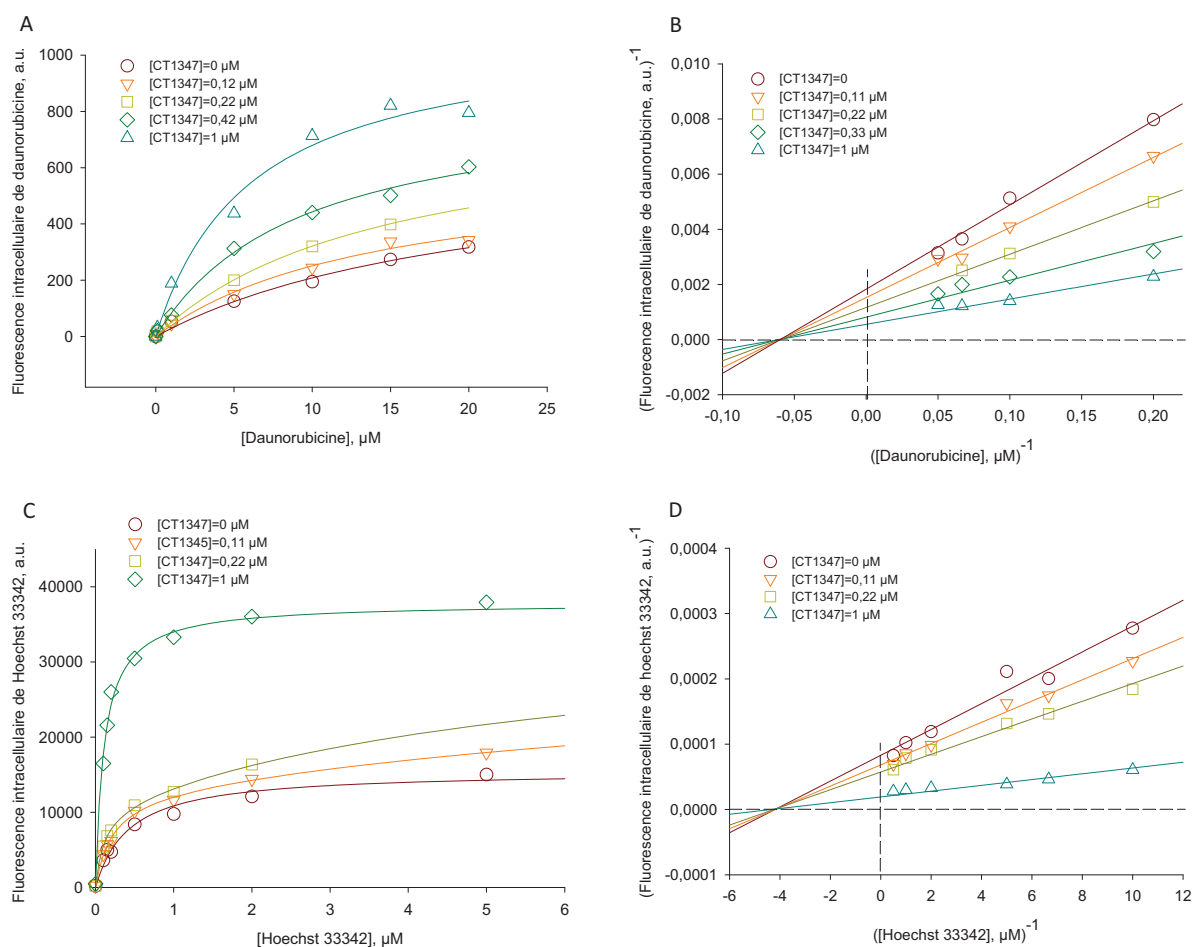


Figure 91 : CT1347 inhibe l'efflux de daunorubicine et de Hoechst 33342 de manière non compétitive. CT1347 est soit omis (0 μM , cercles Bordeaux), soit ajouté à 0,11 μM (triangles oranges), 0,22 μM (carrés verts clairs) ou à 1 μM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel SigmaPlot avec la représentation directe de Michaelis et Menten (A) ou en doubles inverses de Lineweaver-Burk (B). Les expériences ont été réalisées en duplicates dans 2 séries indépendantes.

[CT1347], μM	R_{max} , a.u.	K_M , μM	K_p , μM
Daunorubicine			
0	547 $\pm$ 42	16,7 $\pm$ 1,1	
0,11	656 $\pm$ 46	16,7 $\pm$ 1,2	0,66 $\pm$ 0,01
0,22	860 $\pm$ 65	16,4 $\pm$ 1,4	0,6 $\pm$ 0,01
0,33	1230 $\pm$ 58	15,9 $\pm$ 1,7	0,59 $\pm$ 0,04
1	1808 $\pm$ 77	16,3 $\pm$ 1,2	1,43 $\pm$ 0,08
Hoechst 33342			
0	1591 $\pm$ 562	0,23 $\pm$ 0,06	
0,11	20485 $\pm$ 1199	0,24 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,04
0,22	26098 $\pm$ 1278	0,27 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,06
1	38349 $\pm$ 987	0,25 $\pm$ 0,07	1,68 $\pm$ 0,08

Tableau 33 : Valeurs des R_{max} et K_M du CT1347 avec la daunorubicine et le Hoechst 33342.

Le R_{max} correspond au taux de rétention maximal dans les cellules permettant ainsi d'évaluer la vitesse maximale du transport. Le K_M correspond à la constante de Michaelis.

2.4.3. La réversine CT1347

Le mécanisme d'inhibition de la réversine CT1347 est présenté sur les Figure 91A à D.

Le composé CT1347 a également été étudié vis-à-vis des 2 sites de fixation de substrats d'ABCB1, le site R avec la daunorubicine et le site H avec le Hoechst 33342.

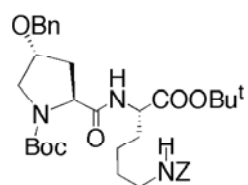
Le profil de cinétique du CT1347 avec les 2 substrats semble être le même : les courbes obtenues avec les représentations directes semblent atteindre des plateaux différents selon la concentration en inhibiteur (Figure 91A et C), signifiant que le taux intracellulaire résiduel de daunorubicine et de Hoechst 33342 est différent pour chaque concentration d'inhibiteur. Les représentations de Lineweaver-Burk (Figure 91B et D) montrent que les droites se croisent au niveau de l'axe des abscisses signifiant que le K_M n'est pas modifié avec la concentration en inhibiteur.

Les constantes cinétiques des activités d'inhibition sont présentées dans le Tableau 33. Ces constantes confirment que la réversine CT1347 inhibe l'efflux des 2 substrats testés de manière non compétitive : le R_{max} augmente avec la concentration en inhibiteur tandis que le K_M est constant.

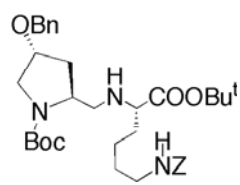
Le K_I est constant pour les 2 premières concentrations testées mais augmente par la suite. Ceci suggère la présence d'un site de fixation spécifique à l'inhibiteur dans ABCB1. Ce 2^{ème} site est toujours non compétitif des 2 substrats et n'est accessible qu'à forte concentration de composé.

Ainsi, l'inhibiteur CT1347 est non compétitif vis-à-vis de la daunorubicine mais également du Hoechst 33342. Ceci signifie qu'il se fixe sur ABCB1 à un site différent des sites de fixation des substrats.

Ainsi, les 3 réversines les plus efficaces pour inhiber ABCB1 ont des comportements cinétiques différents vis-à-vis des substrats. Le cas le plus intéressant est celui du CT1336 comparé au CT1347, le 1^{er} se fixe dans le site H tandis que le 2^{ème} ne se fixe ni dans le site R ni dans le site H d'ABCB1. Or, la seule différence de structure de ces 2 composés est la réduction de la liaison peptidique pour le CT1347 (Figure 92). Ce substituant semble donc très important puisque la caractéristique cinétique de non compétitivité avec les substrats est



CT1336 IC₅₀ = 0,65 μM



CT1347 IC₅₀ = 0,22 μM

Figure 92 : Structures des réversines CT1336 et CT1347.

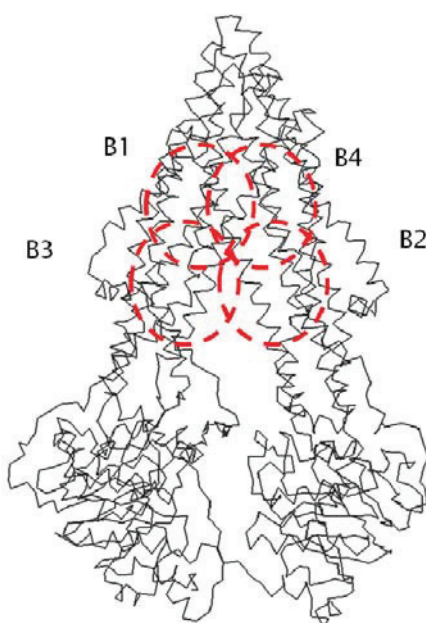


Figure 93 : Modèle d'ABCB1 humaine et représentation des 4 zones utilisées pour les études de docking.

Les zones sont représentées par des cercles rouges et numérotées de B1 à B4.

Résultats et discussion

primordiale pour un inhibiteur. Les liaisons hydrogène sont supposées être favorisées par la réduction du carbonyle de la liaison peptidique afin de conférer un caractère basique à l'azote de la liaison hydrogène ainsi qu'une grande flexibilité dans la liaison peptidique (Geyer, 1994). Ainsi, la fixation du composé CT1347 serait favorisée par des liaisons hydrogènes, qui ne peuvent s'établir pour le composé CT1336.

Le 2^{ème} point important à noter est que pour la 1^{ère} fois nous avons développé et caractérisé des inhibiteurs non compétitifs pour les 2 sites de fixation des substrats d'ABCB1. Jusqu'à présent, les seules études de cinétique des inhibiteurs correspondaient à l'inhibition de l'activité d'hydrolyse d'ATP. La zone de fixation des substrats, site R ou site H, a été étudiée pour la 1^{ère} fois en 2000 puis en 2008 (Martin *et al.*, 2000a ; Muller *et al.*, 2008). Dans les 2 études, les inhibiteurs testés se fixaient dans le site H (compétitifs du Hoechst 33342). Le composé CT1347 se fixe, dans un site distinct d'ABCB1, une étude de docking nous a permis de mieux caractériser ce nouveau site.

2.5. Simulation de docking

Cette partie a été réalisée en collaboration avec le Dr. Raphaël Terreux de l'IBCP.

Grâce à la résolution récente de la structure 3D d'ABCB1 murine (Aller *et al.*, 2009), nous avons réalisé des simulations de docking afin de visualiser les zones d'interaction de CT1347 avec ABCB1 humaine. ABCB1 murine et ABCB1 humaine possédant 85% d'identité, nous avons généré un modèle de la forme humaine par alignement de sa structure primaire avec la structure 3D de la forme murine analogue (voir la partie *Matériels et méthodes*). La principale zone pouvant être impliquée dans la fixation des substrats correspond au creux formé par les hélices transmembranaires. Cette zone est large et a donc été divisée en 4 poches qui se superposent partiellement (de B1 à B4) (Figure 93).

Les études de docking ont été réalisées indépendamment, pour le Hoechst 33342, la rhodamine 123 et la réversine CT1347. Les résultats sont présentés dans la Figure 94.

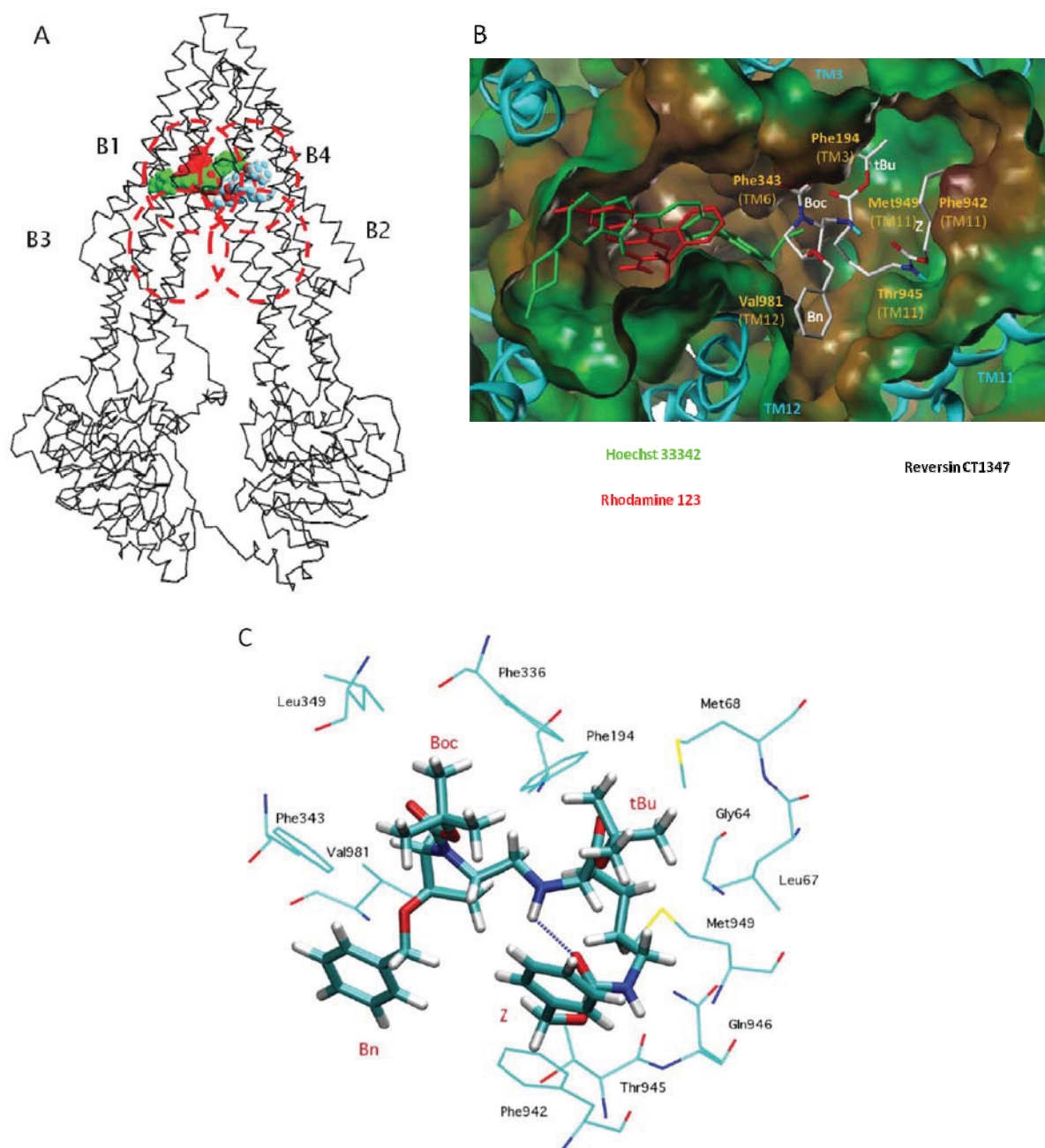


Figure 94 : Docking de la réversine CT1347, du Hoechst 33342 et de la rhodamine 123 sur ABCB1 humaine.

Le modèle d'ABCB1 humaine a été généré par alignement de sa structure primaire sur ABCB1 murine (Aller *et al.*, 2009) et le modèle a été dessiné par le logiciel Swiss PDB viewer (Guex et Peitsch, 1997).

A : Fixation des composés sur le modèle d'ABCB1 humaine. Le Hoechst 33342 et la rhodamine 123 se fixent préférentiellement dans la zone B1 tandis que le CT1347 se fixe préférentiellement dans la zone B4.

B : Représentation de la vue en 3 dimensions des sites de fixation de la rhodamine 123 (en rouge), du Hoechst 33342 (en vert) et de la réversine CT1347 (en blanc). La surface d'ABCB1 est colorée selon un dégradé de vert et marron correspondant aux caractères hydrophobes et hydrophiles. Les résidus identifiables et les hélices transmembranaires sont indiqués sur la figure.

C : Vue détaillée de la réversine CT1347 après docking sur ABCB1 réalisée avec le logiciel VMD. Les principaux groupes protecteurs de CT1347, benzène, Boc, *tert*-butyl et Z sont indiqués en rouges.

Résultats et discussion

Ces résultats de docking montrent que le Hoechst 33342 et la rhodamine 123 se fixent au niveau de la zone B1 tandis que le CT1347 se fixe dans la poche B4. Aucun des composés testés ne se fixe dans les sites B2 et B3 suggérant que les sites de fixation seraient préférentiellement dans la partie haute d'ABCB1 (interne à la membrane). Ces composés se fixent dans des zones relativement proches des régions où sont fixés les QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS) co-cristallisés avec ABCB1 murine (Aller *et al.*, 2009). Parmi les 5 résidus d'ABCB1 humain précédemment identifiés comme étant impliqués dans la fixation de la rhodamine 123 (Loo and Clarke, 2002), 4 sont proches du site de fixation de la rhodamine 123 identifié dans cette étude : $_{TM9}$ Ala841, $_{TM12}$ L975, $_{TM12}$ Val981 et $_{TM12}$ Val982 (Figure 94A). Ceci suggère donc que la poche identifiée ici serait la région préférentielle de fixation de la rhodamine 123.

Ces simulations suggèrent également l'existence d'une large poche de fixation ce qui corrobore les études d'Orlowski et Garrigos (Garrigues *et al.*, 2002). Le site H et le site R, définis comme reconnaissant préférentiellement le Hoechst 33342 et la rhodamine 123 respectivement, ne peuvent être distingués l'un de l'autre dans cette étude. Ceci pourrait suggérer que ces sites se recouvrent partiellement. Si cela peut être surprenant, ces résultats sont en fait en accord avec l'observation qu'à plus de 2 μ M la rhodamine 123 diminue la fixation du Hoechst 33342 sur son site (Shapiro *et al.*, 1999).

Enfin, bien que les régions B1 et B4 se superposent, la réversine CT1347 se fixe sur B4 sans superposition avec B1 (Figure 94A).

Les résidus interagissant avec la réversine CT1347 sont présentés en Figure 94C. Ainsi, le site de l'inhibiteur est formé par les TM1, 2, 6, 11 et 12. La poche de fixation est principalement constituée de résidus hydrophobes. Elle contient seulement 2 résidus hydrophiles, $_{TM11}$ Thr945 et $_{TM11}$ Gln946 qui interagissent avec la fonction carbamate du groupement protecteur Z de la lysine. Ces 2 résidus sont potentiellement impliqués dans des liaisons hydrogènes. Le groupement protecteur Z de la lysine est principalement stabilisé par une interaction de type π avec la $_{TM11}$ Phe942. Les méthylènes en position δ et γ de la chaîne latérale de la lysine génèrent des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales de la $_{TM1}$ Leu67 et $_{TM11}$ Met949. Le groupement protecteur *tert*-butyl en position C-terminale occupe une poche formée par les chaînes latérales des résidus $_{TM1}$ Gly64, $_{TM1}$ Leu67, $_{TM1}$ Met68, $_{TM3}$ Phe194 et $_{TM6}$ Phe336. Le groupement protecteur Boc occupe, quant à lui, une poche formée par les chaînes latérales des résidus $_{TM6}$ Phe336, $_{TM6}$ Phe343 et $_{TM3}$ Phe194.

Résultats et discussion

Toutes ces interactions sont en accord avec les résultats du 3D-QSAR décrit précédemment, notamment pour les caractères hydrophobes et stériques. Nous notons que la réversine CT1347 adopte une position spatiale arrondie. Ceci est dû, d'une part, à la formation d'une liaison hydrogène (2,17 Å) entre le -NH de la liaison peptidique et le groupement carbonyle du carbamate du groupement protecteur Z et d'autre part, à une liaison hydrophobe (2,48 Å) impliquant les 2 groupements protecteurs *tert*-butyl. Ces liaisons hydrogènes sont supposées être favorisées par la réduction du carbonyle de la liaison peptidique afin de conférer un caractère basique à l'azote de la liaison hydrogène ainsi qu'une grande flexibilité dans la liaison peptidique (Geyer, 1994). Ceci est en parfait accord avec le fait que le composé CT1336 ne se fixe pas dans ce site. En effet, la seule différence de structure de CT1336 et CT1347 est la réduction du carbonyle de la liaison peptidique pour ce dernier. Ainsi, le composé CT1347 peut se fixer sur ce site grâce à ces liaisons hydrogènes.

Un site de fixation des inhibiteurs dérivés des quinazolinones a été précédemment décrit comme impliquant les résidus Tyr117, Tyr953, Phe957, Phe336 et Tyr307. Ce site est profondément enfoui dans les domaines transmembranaires, proche de la partie extracellulaire d'ABCB1. Il est à noter que ce site est à proximité de celui du CT1347 décrit ici.

En conclusion, ces études préliminaires de docking concordent et complètent les études expérimentales du mécanisme d'inhibition de la réversine CT1347. Cette réversine a bien un comportement non compétitif avec les 2 substrats et se fixe effectivement dans un site distinct des sites R et H connus d'ABCB1. Il se pose maintenant la question de savoir quel est le rôle de ce site ? Est-ce un nouveau site régulateur ? Est-il commun avec le site P de la prazosine et de la progestérone d'ABCB1 ?

En conclusion générale de cette étude menée sur ABCB1, nous avons développé des inhibiteurs spécifiques et efficaces sur ce transporteur. Certains, tel que la réversine CT1347 agissent de manière non compétitive avec les 2 sites de fixation des substrats d'ABCB1. Cette caractéristique est un avantage considérable pour son développement. Des tests *in vivo* sont maintenant prévus afin de démontrer la capacité de ce composé à réverser le phénotype *in vivo*. Le modèle utilisé pour ces tests sera le même que celui mis en place pour les tests sur ABCG2 (voir III.4.6 tests *in vivo*), des souris xénogreffées avec des cellules exprimant ou non ABCB1. Enfin, comme il sera développé plus loin, ces composés sont également utilisés dans une nouvelle étude visant à déterminer la position des sites de fixation des substrats d'ABCB1.

Résultats et discussion

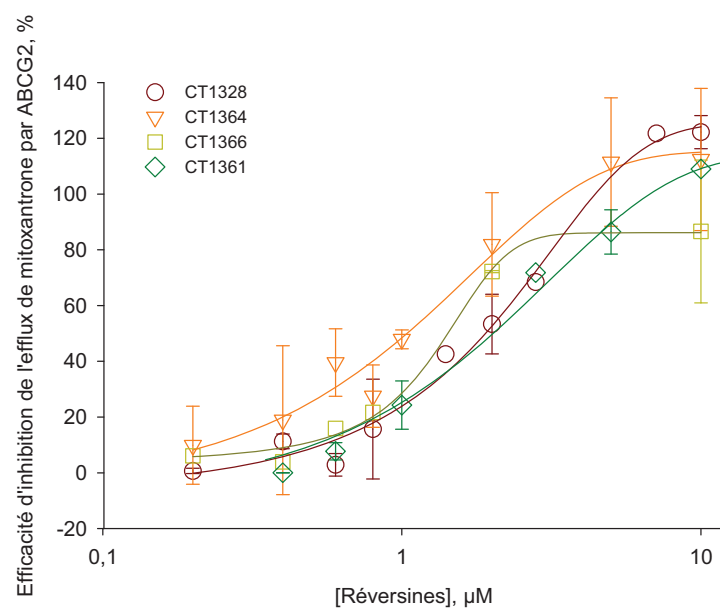


Figure 95 : IC_{50} de 4 réversines inhibitrices d'ABCG2.

Les réversines CT1364 (triangles oranges) et CT1361 (losanges verts) sont spécifiques d'ABCG2 tandis que les 2 dernières (CT1328, cercles bordeaux et CT1366, carrés verts clairs) inhibent également ABCB1.

3. Caractérisations des inhibiteurs d'ABCG2

Les composés les plus efficaces et spécifiques d'ABCG2 ont été caractérisés plus en détail. Le but ici est de déterminer s'ils sont de bons candidats aux tests *in vivo*, de la même façon que pour les tests menés avec ABCB1. De plus, un composé, le CT1364 étant très prometteur, sa capacité de réversion du phénotype MDR a été testée *in vivo* sur des souris SCID xénogreffées avec les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ou les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2.

3.1. Concentrations de demi-inhibition des meilleures réversines pour ABCG2

Les valeurs d'IC₅₀ des meilleurs composés inhibiteurs d'ABCG2 sont présentées dans le Tableau 30. Ce sont principalement des dérivés azapeptidiques puisque, comme nous l'avons vu précédemment, les peptidomimétiques ne sont pas ou peu efficaces pour inhiber ABCG2. Parmi ces composés, 2 sont spécifiques d'ABCG2 (CT1361 et CT1364) et 2 inhibent également ABCB1 (CT1328 et CT1366). La Figure 95 permet de visualiser les décalages dans les courbes d'IC₅₀ des 4 réversines sélectionnées.

Puisque la réversine 121, ou CT1300, n'inhibe ABCG2 qu'à 40% à 10 µM, son IC₅₀ n'a pas été établie. On voit sur cette figure qu'un composé se détache des autres, il s'agit du composé CT1364. Son IC₅₀, de l'ordre de 1 µM, est nettement inférieur à celui des autres composés.

Résultats et discussion

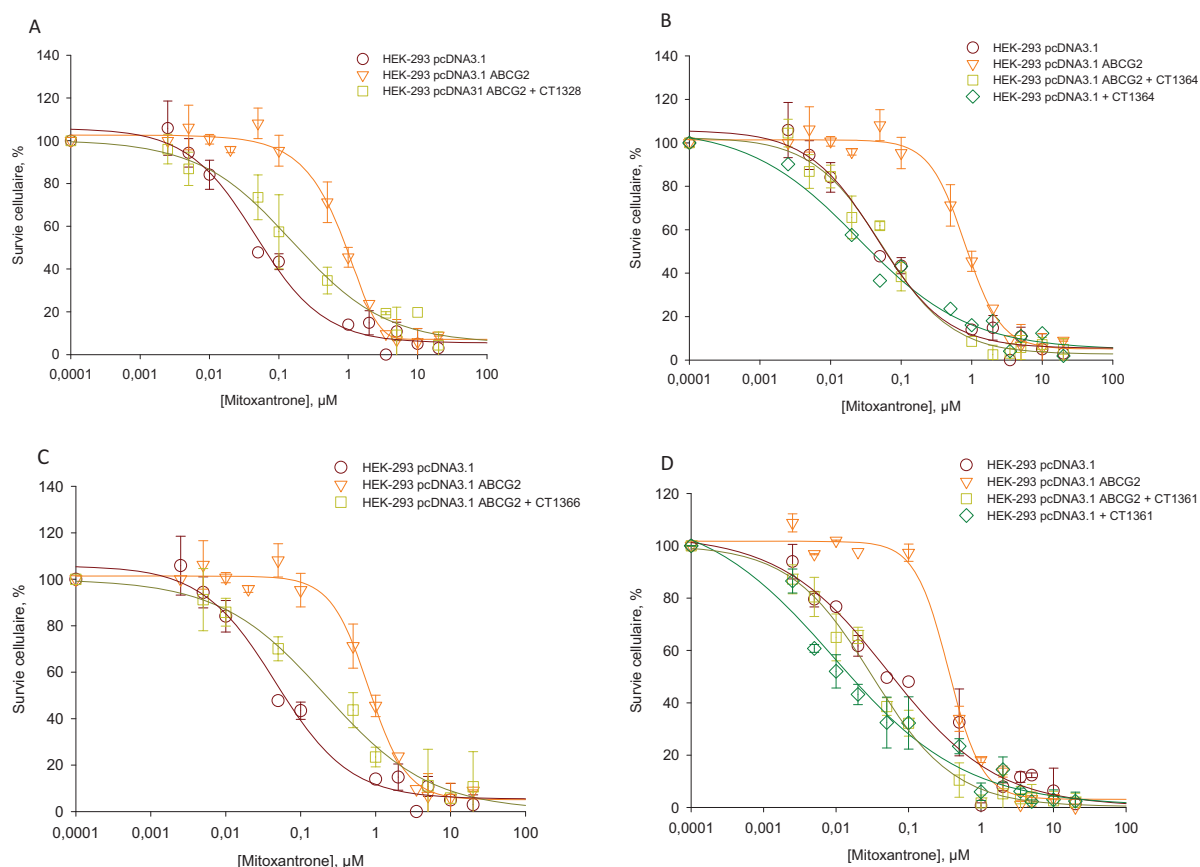


Figure 96 : Les 4 réversines CT1328, CT1364, CT1366 et CT1361 chimiosensibilisent les cellules exprimant ABCG2.

Les cellules exprimant (triangles oranges) ou non (cercles bordeaux) ABCG2 sont incubées en présence de concentrations croissantes de mitoxantrone. Les mêmes essais sont effectués en présence d'inhibiteur (losanges verts pour les cellules contrôles ; carrés verts clairs pour les cellules exprimant ABCG2).

Les courbes ont été réalisées par le logiciel SigmaPlot. La viabilité cellulaire a été estimée en prenant comme viabilité maximale les cellules incubées avec le milieu seul.

Les composés testés sont le CT1328 à 10 μM (A), le CT1364 à 5 μM (B), le CT1366 à 5 μM (C) et le CT1361 à 10 μM (D). Les 4 graphiques montrent une réversion de la résistance à la mitoxantrone induite par ABCG2 grâce aux composés.

3.2. Chimiosensibilisation

La capacité des réversines à inhiber l'efflux de substrats a été démontrée, et est illustrée sur la Figure 95. Il est maintenant intéressant d'étudier leur capacité à abolir le phénotype MDR induit par ABCG2. Pour cela, de la même façon que pour ABCB1, nous étudions la viabilité des cellules exprimant ou non ABCG2 en présence de mitoxantrone, après addition ou non de réversine. La concentration en réversine ajoutée correspond à 5 fois son IC_{50} , de manière à totalement inhiber ABCG2. Les résultats sont présentés sur les figures ci-contre.

Ainsi, les cellules exprimant le transporteur (triangles oranges) ont un index de résistance à la mitoxantrone 15 fois plus élevé que les cellules ne l'exprimant pas (cercles bordeaux) (50% de viabilité cellulaire à 0,9 μ M de mitoxantrone contre 0,06 μ M de mitoxantrone pour les cellules contrôles). Lorsqu'une réversine est ajoutée, on voit très clairement que la sensibilité des cellules HEK293 pcDNA3.1 ABCG2 à la mitoxantrone (carrés verts clairs) augmente.

Ainsi, sur les Figure 96B et D, les réversines CT1364 et CT1361 abolissent totalement ce phénotype. La sensibilité à la mitoxantrone des cellules exprimant ABCG2 devient la même que la sensibilité des cellules contrôles (50% de viabilité cellulaire à 0,06 μ M de mitoxantrone). La réversion observée avec les réversine CT1328 et CT1366 n'est que partielle (Figure 96A et C respectivement). La réversine CT1328 permet de réduire l'index de résistance à la mitoxantrone : il est seulement 3 fois plus élevé après ajout du CT1328 (contre 15 fois sans inhibiteur). Les mêmes résultats sont obtenus avec la réversine CT1366 (50% de viabilité cellulaire à 0,2 μ M de mitoxantrone pour les cellules exprimant ABCG2 et additionnées de CT1366).

En conclusion, les réversines CT1364 et CT1361 semblent plus intéressantes que les réversines CT1328 et CT1366 qui n'abolissent que partiellement le phénotype MDR à une concentration 5 fois supérieure à leur IC_{50} .

Résultats et discussion

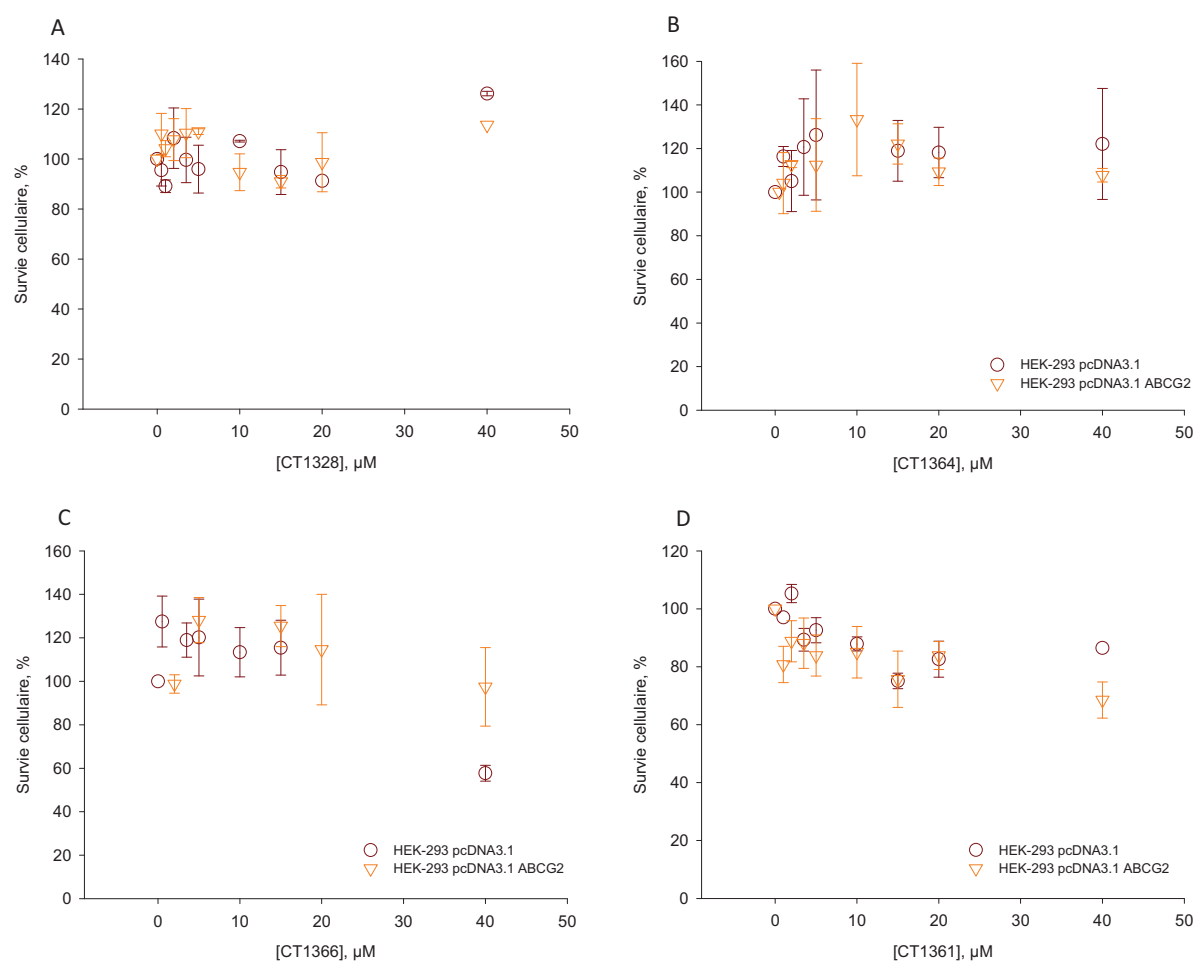


Figure 97 : Les réversines CT1328, CT1364, CT1366 et CT1361 ne sont pas ou peu cytotoxiques.
Les figures A à D présentent l'effet des réversines, à concentration croissante, sur la survie cellulaire des HEK-293 contrôles ou exprimant ABCG2.

3.3. Cytotoxicité des réversines

La cytotoxicité des réversines a été étudiée sur les cellules HEK-293 contrôles et les cellules exprimant ABCG2. Pour cela, comme expliqué dans la partie *Matériels et méthodes*, les cellules sont incubées pendant 72 h avec des concentrations croissantes de composé, et la viabilité cellulaire est mesurée par un test MTT. Les résultats pour les 4 réversines sélectionnées sont présentés sur les Figure 97.

Comme on peut le constater sur les Figure 97A à D, la viabilité cellulaire est parfois supérieure à 100%. Le maximum de viabilité est calculé avec les cellules ne recevant pas de composés ainsi, un ensemencement légèrement plus faible de cellules dans ce puits entraîne une viabilité supérieure à 100%. Ce qu'il est important de noter ici est la tendance générale des courbes. Ainsi, les composés CT1328 et CT1364 (Figure 97A et B) ne sont pas cytotoxiques pour les 2 types cellulaires.

Au contraire, le composé CT1366 (Figure 97C) entraîne une diminution de la viabilité cellulaire pour des concentrations supérieures à 20 μM , correspondant à 22 fois son IC_{50} (0,9 μM). Cette toxicité est donc négligeable. Le point intéressant à noter est que la toxicité à 40 μM sur les cellules HEK-293 pcDNA3.1 est nettement supérieure à celle observée sur les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 (60% de viabilité cellulaire contre 80%). Ceci pourrait s'expliquer par un transport de ce composé par ABCG2, permettant ainsi aux cellules de résister aux concentrations toxiques de ce composé.

La réversine CT1361 est quant à elle légèrement cytotoxique (Figure 97D), même pour des concentrations relativement faibles, de l'ordre de 5 μM . Cependant, la viabilité cellulaire reste élevée, à 80%, ce qui démontre que la cytotoxicité de ce composé est faible. La viabilité des cellules n'exprimant pas ABCG2 étant la même que celle des cellules l'exprimant, on peut penser que la réversine CT1361 n'est pas transportée.

Des 4 composés testés, seul la réversine CT1366 est cytotoxique. Il est intéressant de noter que c'est également le seul composé possédant ici un azote du côté N-terminal. Nous ne pouvons certes pas conclure à une relation entre ces 2 caractéristiques, mais l'étude de la cytotoxicité d'autres composés de type N-aza pourrait apporter des réponses intéressantes. Nous envisageons d'améliorer ces composés par la synthèse d'une autre génération de dérivés grâce aux résultats des relations structure-activité. Il est dans ce cas primordial de déterminer si cet azote en position N-terminal est effectivement délétère pour les cellules.

Résultats et discussion

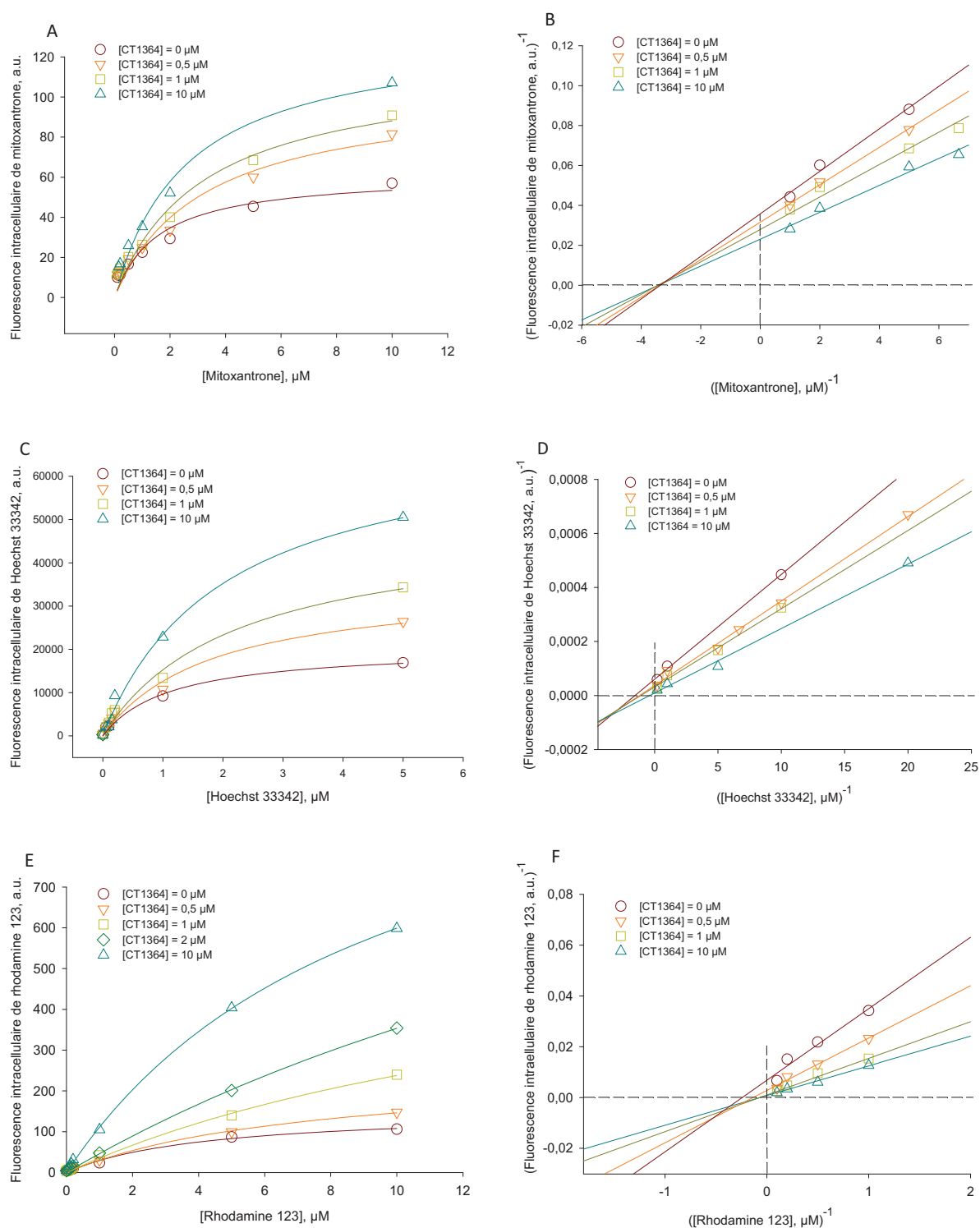


Figure 98 : CT1364 inhibe l'efflux des 3 substrats testés (mitoxantrone, Hoechst 33342 et rhodamine 123) de façon non compétitive.

Le mécanisme d'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone (A et B), du Hoechst 33342 (C et D) et de la rhodamine 123 (E et F) a été étudié. Les graphiques sont traités par le logiciel SigmaPlot avec la représentation de Michaelis et Menten (A, C et E) ou de Lineweaver-Burk (B, D et F). Les expériences ont été réalisées en duplicats dans 2 séries indépendantes.

Pour chaque essai, le CT1364 est soit omis (cercles bordeaux), soit ajouté à 0,5 μM (triangles oranges), à 1 μM (carrés verts clairs), à 2 μM (losanges verts) ou à 10 μM (triangles bleus).

Résultats et discussion

En conclusion, le composé CT1364 semble le plus intéressant puisqu'il est spécifique d'ABCG2, possède un IC_{50} de 1 μM , reverse totalement le phénotype MDR et est non cytotoxique même à une concentration 40 fois supérieure à son IC_{50} .

Les tests sont donc poursuivis avec ce seul inhibiteur.

3.4. Caractérisation de la réversine CT1364

3.4.1. Mécanisme d'inhibition

La détermination du mécanisme d'inhibition de ce composé nous permettra d'étudier son site de fixation sur ABCG2. Contrairement à ABCB1, le nombre de sites de fixation des substrats sur ABCG2 est moins clair. En 2006, Clark et collaborateurs supposent qu'ABCG2 muté (ABCG2^{R482G}) posséderait plusieurs sites de fixation, reconnaissant préférentiellement un ou plusieurs substrats (Figure 32) (Clark *et al.*, 2006). Nous décidons donc de tester le mécanisme d'inhibition de CT1364 avec 3 substrats : la mitoxantrone, le Hoechst 33342 et la rhodamine 123. Les 2 premiers sont testés avec les cellules contrôles HEK-293 pcDNA3.1 et les cellules exprimant ABCG2 sauvage (ABCG2^{R482}). La rhodamine, quant à elle, n'étant transportée que par la forme mutée d'ABCG2^{R482T} ou ABCG2^{R482G}, nous utiliserons les cellules HEK-293 transfectées par le plasmide contenant le gène de la forme mutée d'ABCG2^{R482T}. Les représentations directes dites de Michaelis et Menten (panel A, C et E) et en doubles inverses de Lineweaver-Burk, (panel B, D et F) sont utilisées afin de déterminer le mécanisme d'inhibition. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

Pour chaque essai, le taux de rétention maximal, R_{max} est calculé, ainsi que la constante de Michaelis, K_M et la constante d'inhibition K_I . Les valeurs sont présentées dans le Tableau 34.

Le CT1364 semble avoir le même comportement cinétique pour les 3 substrats testés : il agit de manière non compétitive. En effet, les représentations directes (Figure 98A, C et E) semblent indiquer que les courbes atteignent des plateaux différents selon la concentration en inhibiteur, signifiant que le taux de rétention résiduel de substrat dans les cellules augmente avec la concentration d'inhibiteur testé. Ceci est retrouvé dans le Tableau 34 où les valeurs de R_{max} augmentent avec la concentration d'inhibiteur. Les représentations en doubles inverses (Figure 98B, D et F) semblent également tendre vers un comportement non compétitif de

Résultats et discussion

[CT1364], μM	R_{max} , a.u.	K_M , μM	K_I , μM
Mitoxantrone			
0	$61,8 \pm 6,5$	$1,6 \pm 0,5$	
0,5	$103,2 \pm 14,8$	$3,2 \pm 1,1$	$0,2 \pm 0,01$
1	$115,9 \pm 13,9$	$3,2 \pm 0,9$	$0,11 \pm 0,03$
10	$132,6 \pm 13,1$	$2,6 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,3$
Hoechst 33342			
0	$20542,1 \pm 1659,5$	$1,1 \pm 0,3$	
0,5	$35410,3 \pm 4175,1$	$1,8 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,01$
1	$48998,8 \pm 5453,5$	$2,2 \pm 0,6$	$0,28 \pm 0,007$
10	$70754,9 \pm 4412,7$	$2 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,5$
Rhodamine 123			
0	$153,8 \pm 16,8$	$4,2 \pm 1,2$	
0,5	$255,6 \pm 32,7$	$7,5 \pm 1,8$	$0,2 \pm 0,008$
1	$658,8 \pm 108,4$	$17,7 \pm 4,2$	$0,6 \pm 0,02$
10	$1354,8 \pm 231,1$	$28,3 \pm 6,2$	$5,1 \pm 0,04$

Tableau 34 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de substrats par CT1364.

R_{max} correspond au taux intracellulaire de rétention résiduel maximale, K_M à la constante de Michaelis et K_I la constante d'inhibition.

Résultats et discussion

l'inhibiteur. En effet, les droites semblent se croiser au niveau de l'axe des abscisses ce qui est caractéristique d'une inhibition non compétitive.

Les constantes cinétiques calculées avec les représentations directes (Tableau 34), nous indiquent que l'inhibition de l'efflux de mitoxantrone et de Hoechst 33342 semble effectivement être non compétitive : le R_{max} varie avec la concentration en inhibiteur tandis que, aux erreurs expérimentales près, le K_M semble constant.

En revanche, l'inhibition de l'efflux de rhodamine semble moins claire. Nous notons une augmentation du R_{max} mais également du K_M avec la concentration en inhibiteur, signifiant que la fixation du CT1364 sur son site diminue l'affinité de la rhodamine 123 pour son site de fixation. Nous sommes donc en présence d'une coopérativité négative. Une coopérativité du même type était également observée entre les 2 sites fixant la daunorubicine (ou doxorubicine ou prazosine) mais rien n'était observé entre un site et celui de la rhodamine 123 (Figure 32) (Clark *et al.*, 2006). Il faut cependant noter que le composé CT1364, à la concentration de 10 μM , n'inhibe pas complètement l'efflux de rhodamine 123 (Figure 103). En effet, ici, la fluorescence intracellulaire maximale de rhodamine 123 mesuré dans les cellules contrôles HEK-293 pcDNA3.1 est de 2900 a.u. pour une concentration en rhodamine 123 de 10 μM , alors qu'elle est de 600 a.u. dans les cellules exprimant ABCG2. Le fait que le composé CT1364 ne bloque pas efficacement l'efflux de rhodamine 123 pourrait biaiser l'étude du mécanisme d'inhibition.

Les constantes cinétiques nous ont également permis de calculer les valeurs des constantes d'inhibition (K_I) de la réversine CT1364. Ainsi, comme présenté dans le Tableau 34, pour de faibles concentrations en inhibiteur, les K_I sont constants. Par contre, lorsque la concentration en inhibiteur est élevée (10 μM), la valeur du K_I est modifiée. Ceci signifie que le CT1364 se fixe alors au niveau d'un 2^{ème} site sur ABCG2. Nous pouvons donc émettre 2 hypothèses :

- le transporteur possède 2 sites de fixation pour cet inhibiteur : l'un à forte affinité et l'autre à faible affinité où l'inhibiteur se fixe à forte concentration,

- la concentration de 10 μM étant très élevée, l'inhibiteur hydrophobe se fixe de manière non spécifique dans de nombreux sites de la protéine. Il faut cependant noter que quel que soit l'endroit où il se fixe, ce n'est pas dans le site du Hoechst 33342 ou de la mitoxantrone (K_M identique aux valeurs précédentes et R_{max} différents).

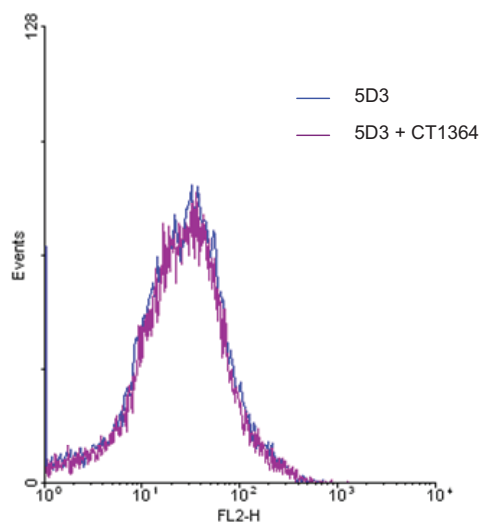


Figure 99 : CT1364 n'empêche pas la fixation de l'anticorps 5D3 sur la 3^{ème} boucle extracellulaire d'ABCG2.

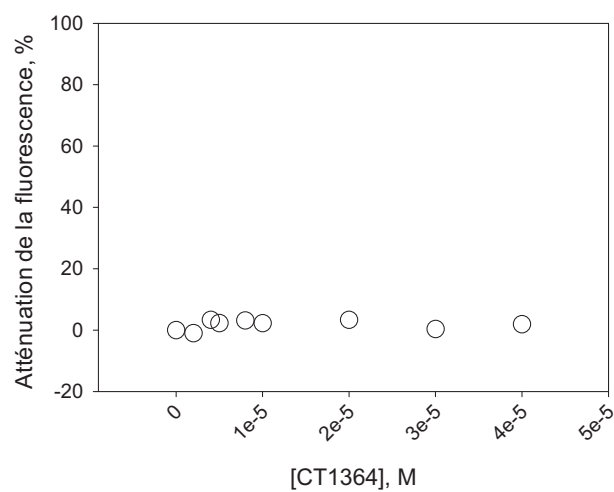


Figure 100 : Courbe de saturation de l'interaction d'inhibiteurs d'ABCG2 avec ECL3.

Résultats et discussion

Ainsi, ces résultats semblent indiquer que, quel que soit le substrat testé et quelle que soit sa concentration, la réversine CT1364 inhibe ABCG2 avec un mécanisme non compétitif, avec une coopérativité négative vis-à-vis de la rhodamine 123. Cela signifie donc que ce composé ne se fixe pas dans un site de fixation des substrats. De la même façon que pour ABCB1, cette caractéristique est essentielle au développement d'un inhibiteur d'ABCG2 en tant que médicament sensibilisant à la chimiothérapie.

Les comportements cinétiques des inhibiteurs d'ABCG2 par rapport aux substrats sont très peu étudiés. Cette étude rapporte donc pour la 1^{ère} fois le développement d'un inhibiteur non compétitif pour 3 substrats d'ABCG2.

3.4.2. La réversine CT1364 ne se fixe pas sur ECL3

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la réversine CT1364, nous décidons d'explorer la zone de fixation de ce composé. Nous testons ainsi la capacité de CT1364 à se fixer sur la 3^{ème} boucle extracellulaire d'ABCG2. Cette boucle est assez large et pourrait constituer un domaine à part entière, mais son rôle physiologique n'est pas connu.

Pour cela, nous utilisons l'anticorps 5D3 qui est spécifique de cette 3^{ème} boucle extracellulaire (ECL3) d'ABCG2 et qui est couplé à la phycoérythrine. Les cellules sont incubées en présence de l'anticorps seul ou avec l'anticorps additionné de 5 μ M de CT1364. La fluorescence membranaire due au 5D3 est ensuite quantifiée par cytométrie en flux et présentée sur la Figure 99A.

La fluorescence cellulaire mesurée est identique avec ou sans CT1364. Ceci signifie que la fixation de l'anticorps 5D3 sur ABCG2 n'est pas gênée par la réversine CT1364. Deux hypothèses peuvent être émises : soit le composé CT1364 ne se fixe pas sur cette boucle et le 5D3 est alors libre de s'y fixer, soit l'affinité de l'anticorps pour la boucle est (beaucoup) plus forte que celle du CT1364 empêchant ainsi ce dernier de se fixer sur ABCG2.

Afin de répondre à cette question, une étude de fluorimétrie a été réalisée en collaboration avec Elodie Desuzinges-Mandon, alors doctorante au laboratoire. La fixation du CT1364 sur 3 μ M d'ECL3 purifié est présentée sur la Figure 100.

Aucune variation de la fluorescence d'ECL3 n'est observée avec l'addition de CT1364, même à très forte concentration (jusqu'à 40 μ M). Ceci signifie que la réversine CT1364

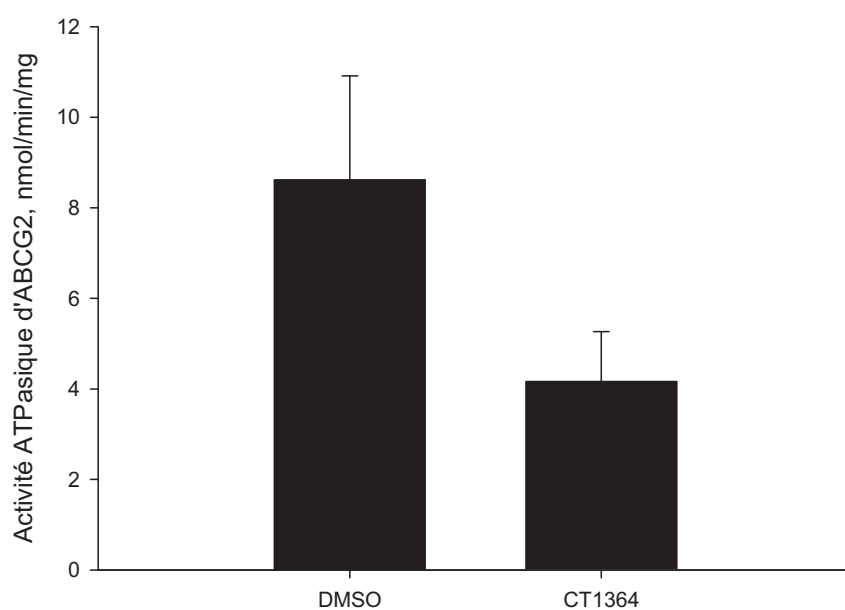


Figure 101 : Diminution de l'activité d'hydrolyse de l'ATP de 50% avec 5 μ M de CT1364.

L'activité d'hydrolyse de l'ATP mesurée est vanadate sensible.

Les essais ont été réalisés en triplicats indépendants.

Résultats et discussion

n'interagit pas avec ECL3. Cette 3^{ème} boucle extracellulaire d'ABCG2 n'est donc pas le lieu de fixation de CT1364 sur ABCG2.

3.4.3. Diminution de l'activité d'hydrolyse de l'ATP

L'étude de l'impact de l'inhibiteur sur l'activité d'hydrolyse d'ATP d'un transporteur ABC permet de démontrer l'interaction directe de l'inhibiteur avec le transporteur. De plus, certains inhibiteurs des transporteurs ABC, tels que le GF120918 (Ozvegy *et al.*, 2001 ; Robey *et al.*, 2001), la fumitremorgine C ou encore le Ko143 (Ozvegy-Laczka *et al.*, 2005), inhibent l'activité d'hydrolyse d'ATP du transporteur. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'impact de la réversine CT1364 sur l'activité d'hydrolyse d'ATP d'ABCG2.

Les essais ont été réalisés sur des membranes de cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2. L'activité mesurée est sensible au vanadate et est donc spécifique du transporteur ABC. Le composé CT1364 est préparé dans une solution contenant 0,5% de DMSO : le témoin, noté ici DMSO, contient donc la même quantité de DMSO.

Ainsi, comme on peut l'observer sur la Figure 101, la réversine CT1364 diminue de 50% l'activité d'hydrolyse d'ATP lorsqu'elle est ajoutée à des membranes de cellules de mammifère exprimant ABCG2, à une concentration de 5 μ M, soit 5 fois son IC₅₀. Afin de déterminer si le CT1364 diminue l'affinité de l'ATP pour son site (K_M) ou la vitesse d'hydrolyse d'ATP (V_{max}), des études sont en cours en mesurant l'activité d'hydrolyse d'ATP avec une gamme de concentrations croissantes d'ATP. En effet, 3 possibilités sont envisageables :

- la réversine CT1364 se fixe au niveau du site de l'ATP, diminuant ainsi sa fixation et par là même diminuant l'activité de transport d'ABCG2. Dans ce cas, nous mesurerons un K_M diminué. Ceci semble peu probable puisque, compte tenu de l'hydrophobicité du composé, nous supposons qu'il se fixe dans un environnement hydrophobe, au niveau des domaines transmembranaires d'ABCG2. On peut cependant imaginer que l'interaction du CT1364 avec son site de fixation entraîne des modifications structurales modifiant l'affinité de l'ATP pour son site.

- La réversine CT1364 se fixe dans les domaines transmembranaires ce qui entraîne un changement de conformation de la protéine et donc une modification de l'affinité du substrat sur son site. Dans ce cas, si l'affinité du substrat pour son site est plus grande, il sera relargué moins rapidement entraînant une diminution de la vitesse d'hydrolyse d'ATP, V_{max} .

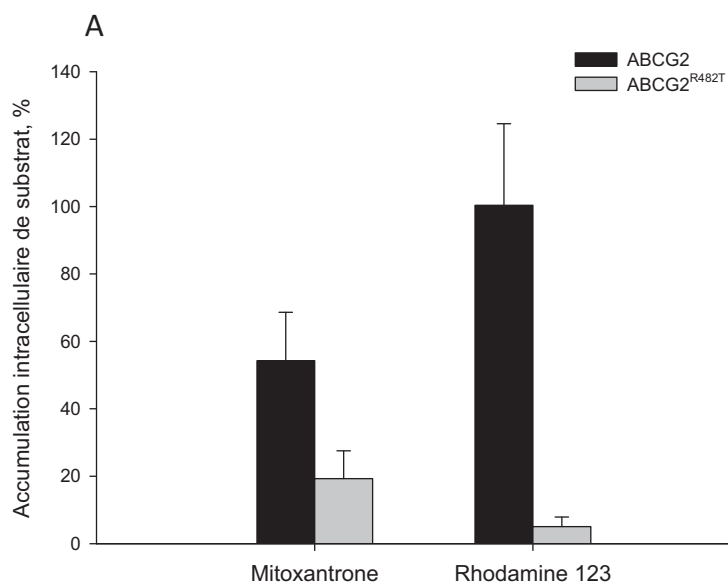


Figure 102 : Mesure de l'accumulation de substrat dans les cellules exprimant la forme sauvage ou mutée d'ABCG2.

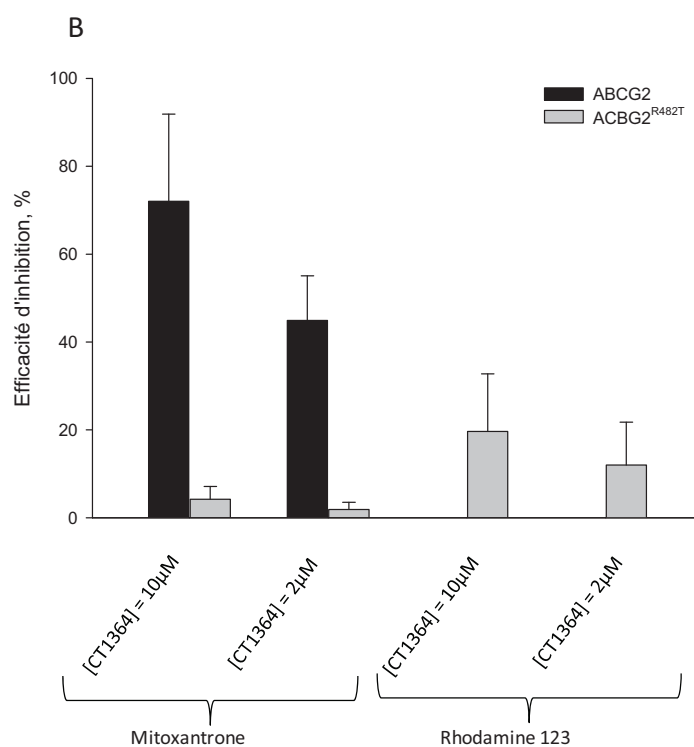


Figure 103 : La réversine CT1364 n'inhibe pas ou peu la forme mutée ABCG2^{R482T}.
A 10 μM et à 2 μM le composé CT1364 n'inhibe pas l'efflux de mitoxantrone par ABCG2^{R482T} et inhibe très peu l'efflux de rhodamine 123.

Résultats et discussion

- La fixation du CT1364 au niveau des domaines transmembranaires pourrait bloquer les changements de conformation de la protéine, empêchant alors le relargage du substrat. Dans ce cas, nous devrions également mesurer une diminution du V_{max} .

Des tests d'activité d'hydrolyse d'ATP avec une gamme de concentrations en ATP devrait permettre de déterminer les paramètres cinétiques de cette activité, et par là-même de comprendre un peu mieux le mécanisme d'action du CT1364.

3.4.4. Efficacité d'inhibition de l'efflux de substrats par le mutant ABCG2^{R482T}

Afin d'étudier plus en détail le site de fixation de la réversine CT1364, nous avons mesuré son efficacité d'inhibition de l'efflux de 2 substrats, la mitoxantrone et la rhodamine 123 par ABCG2^{R482T}. Les cellules utilisées sont les cellules HEK-293 pcDNA3.1 comme cellules contrôle, les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2^{R482T}. L'efficacité d'inhibition du composé a été mesurée par cytométrie en flux comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*.

Les résultats présentés sur la Figure 102 sont en accords avec la littérature (Honjo *et al.*, 2001 ; Allen *et al.*, 2002a ; Robey *et al.*, 2003 ; Ozvegy *et al.*, 2002). En effet, la forme sauvage d'ABCG2 transporte la mitoxantrone mais pas la rhodamine 123. Quant à la forme mutée d'ABCG2, elle transporte la rhodamine 123, ainsi que la mitoxantrone avec une efficacité supérieure à la forme sauvage.

Comme on peut l'observer sur la Figure 103, la réversine CT1364 inhibe l'efflux de mitoxantrone par la forme sauvage d'ABCG2. L'inhibition est quasiment totale à 10 μ M et est d'environ 60% à 2 μ M. De façon surprenante, cette même réversine n'inhibe pas l'efflux de mitoxantrone par la forme mutée d'ABCG2. L'inhibition de l'efflux de rhodamine 123 est, quant à elle très faible (20% à 10 μ M).

La mutation R482T est située dans la 3^{ème} hélice transmembranaire d'ABCG2, près du feuillet interne de la membrane plasmique. Le fait que l'efficacité d'inhibition par cette réversine diminue sur la forme mutée d'ABCG2, et cela pour les 2 substrats, démontre l'importance de ce résidu arginine 482 pour l'activité de la réversine CT1364. Ces résultats incitent à penser que le composé se fixerait dans cette région. Ceci serait alors en accord avec notre 1^{ère} hypothèse qui est que ces réversines se fixent dans les domaines transmembranaires, du fait de leur hydrophobicité. De plus, nous savons que la mutation en position 482 modifie l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la protéine (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005 ;

Résultats et discussion

Ozvegy *et al.*, 2001 ; Ozvegy *et al.*, 2002). Cette région est donc importante pour cette activité. L'hypothèse de fixation de la réversine CT1364 dans cette région serait donc également en accord avec la modification de l'activité d'hydrolyse de l'ATP observée dans la Figure 101.

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de purifier ABCG2 sauvage et mutée puis de mesurer la fixation de la réversine CT1364, par fluorimétrie, sur ces 2 protéines purifiées.

3.4.5. Diminution de l'expression d'ABCG2

Plusieurs études, menées principalement sur ABCB1, montrent que certains inhibiteurs du transport induisent également une diminution de l'expression du transporteur. C'est notamment le cas pour de nombreux composés naturels : le millepertuis, (Durr *et al.*, 2000) , la capsaïcine (Han *et al.*, 2006), le curcumin et ses dérivées curcuminoïdes (Hou *et al.*, 2008) ; (Limtrakul *et al.*, 2004), le kaempferol et la quercétine (Limtrakul *et al.*, 2005), la pipérine (Han *et al.*, 2008) ainsi que d'autres composés développés dans la revue de Zhang et collaborateurs (Zhang *et al.*, 2009).

3.4.5.1. Diminution de l'expression totale d'ABCG2

Afin de déterminer l'impact de la réversine CT1364 sur l'expression totale d'ABCG2, nous avons soumis les cellules HEK-293 pcDNA3.1 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 à 5 μ M de CT1364 durant un temps variable allant de 3 h à 72 h. Il a été précédemment démontré qu'à cette concentration, le composé CT1364 n'est pas toxique pour les cellules (Figure 97). CT1364 étant ajouté aux cellules avec 0,5% de DMSO final, des contrôles sont effectués dans les mêmes conditions. Les cellules sont cultivées selon les conditions normales de culture. Après 3 heures, 24 heures, 48 heures ou 72 heures d'incubation, les cellules sont récoltées et sont lysées afin d'en extraire les protéines totales. Un western-blot, présenté sur la Figure 104 est ensuite réalisé sur ces échantillons.

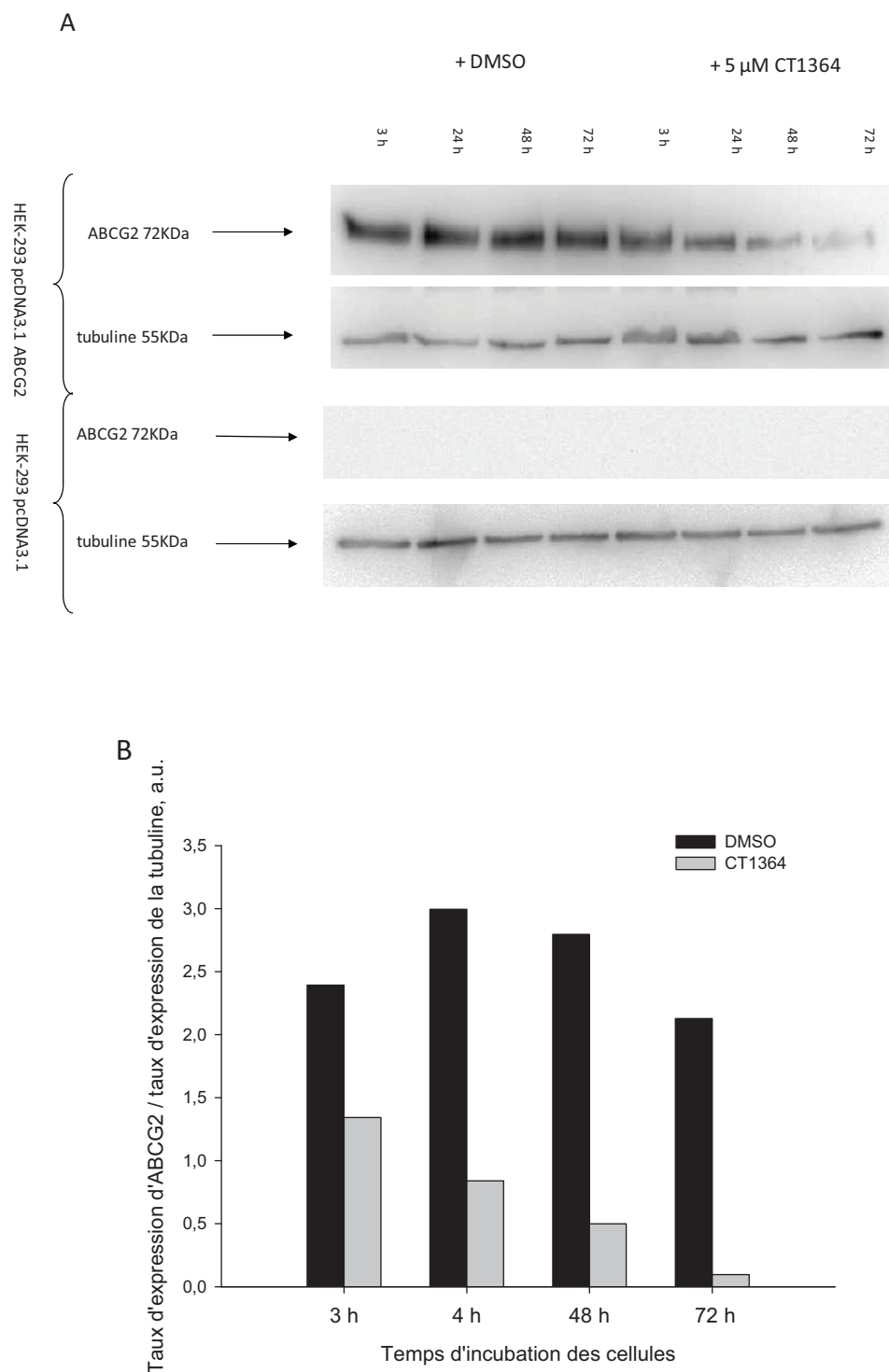


Figure 104 : CT1364 induit une diminution de l'expression d'ABCG2.

A : Western-blot permettant de visualiser la diminution de l'expression d'ABCG2 induit par CT1364. Le composé CT1364 est ajouté aux cellules à la concentration non cytotoxique de 5 μ M. Les anticorps utilisés sont BXP21, spécifique d'ABCG2 et l'anti-tubuline α , spécifique de la tubuline.

B : Quantification réalisée par le logiciel Quantity One, du taux d'expression d'ABCG2 rapporté au taux d'expression de la tubuline.

Résultats et discussion

Le western-blot réalisé à partir d'extrait de protéines totales des cellules exprimant ABCG2 montre que dès 3 heures d'incubation avec 5 μ M de réversine CT1364, la quantité totale d'ABCG2 cellulaire diminue (Figure 104A et B). Cette caractéristique est un avantage majeur pour un inhibiteur : en plus d'inhiber l'activité de transport des agents anticancéreux, il diminuerait également l'expression de ce facteur de résistance dans les cellules. Cette caractéristique doit cependant être confirmée *in vivo*. Nous travaillons, en effet ici, sur des cellules transfectées et donc différentes des cellules tumorales qui ont subi des modifications majeures par rapport à une cellule saine.

Une étude de 2006 menée par Nakanishi et collaborateurs a rapporté une inhibition d'expression d'ABCG2 par l'imatinib. Elle a montré que cette inhibition de l'expression était post-transcriptionnelle et due à l'inhibition de la voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase/AKT. L'imatinib inhibe BCR-ABL qui a pour effet de diminuer la phosphorylation d'Akt (Ser473). Il a été rapporté que la voie de signalisation de PI3K-Akt est impliquée dans des modifications post-transcriptionnelle et post-traductionnelle d'ABCG2 (Mogi *et al.*, 2003 ; Takada *et al.*, 2005). Ainsi, l'inhibition de BCR-ABL par l'imatinib inhibe la PI3K-Akt entraînant alors une diminution de l'expression d'ABCG2 (Nakanishi *et al.*, 2006). De la même façon que pour la réversine CT1364, la diminution du taux d'expression d'ABCG2 est observée très tôt : après 4h d'incubation, la diminution est visible, et après 8 h, le taux d'ABCG2 est diminué de moitié.

La diminution d'expression de transporteur ABC a également été observée avec d'autres inhibiteurs (Zhang *et al.*, 2009). Il est maintenant intéressant de savoir qu'elle est la cause de cette diminution d'expression : une dégradation plus rapide des protéines, une diminution de la transcription ou de la traduction, une inhibition d'une voie de signalisation, ... ?

3.4.5.2. Expression membranaire d'ABCG2 constante

Afin de compléter l'étude de la diminution d'expression d'ABCG2 après stimulation par 5 μ M de CT1364, nous avons mesuré le taux d'adressage des protéines à la membrane plasmique. En effet, si les protéines sont mal repliées, l'adressage à la membrane sera plus faible. Nous souhaitons donc vérifier cette hypothèse. Pour cela, nous avons quantifié la fluorescence membranaire, par cytométrie en flux, après marquage des cellules avec l'anticorps 5D3, spécifique de la 3^{ème} boucle extracellulaire (ECL3) d'ABCG2 et couplé à la phycoérythrine. Nous avons précédemment démontré que la réversine CT1364 ne se fixait pas sur ECL3 et ne modifiait donc pas dans la fixation de l'anticorps sur la boucle.

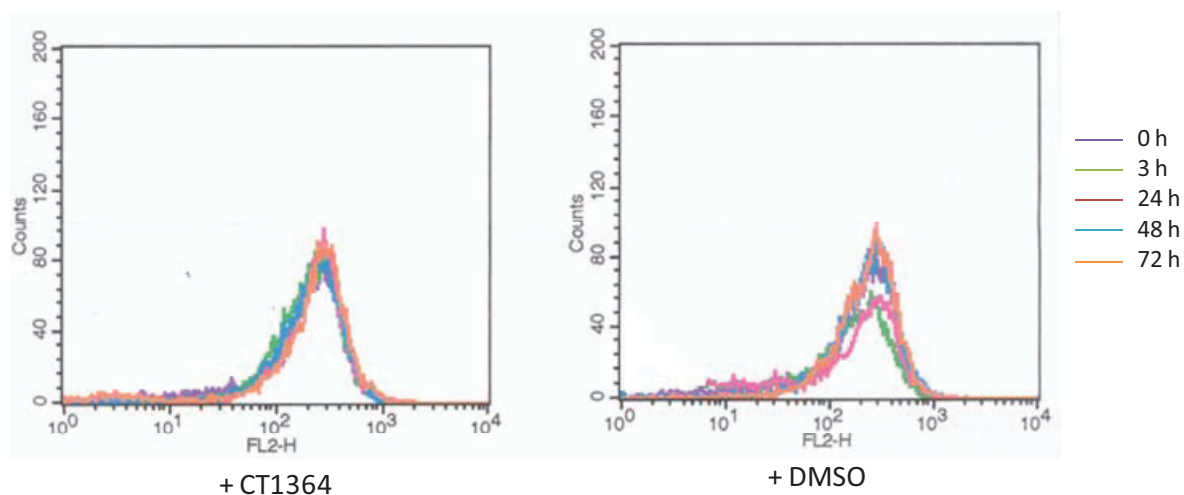


Figure 105 : CT1364 n’affecte pas l’adressage d’ABCG2 à la membrane plasmique.

Les codes couleurs correspondant aux temps d’incubation sont indiqués sur la figure.

Le CT1364 à 5 μ M a été ajouté aux cellules à différents temps. Le DMSO a été ajouté dans les mêmes proportions que pour le CT1364.

L’adressage d’ABCG2 est quantifié par cytométrie en flux, en mesurant la fluorescence émise par l’anticorps 5D3 mesurée à 565 nm, en FL-2 après excitation à 488 nm par un laser argon.

Résultats et discussion

Ainsi, comme on peut le noter sur la Figure 105, l'ajout de la réversine CT1364 n'affecte pas l'adressage d'ABCG2 à la membrane plasmique. En effet, quel que soit le temps d'incubation (de 3 h à 72 h), la fluorescence mesurée ne varie pas, indiquant que la même quantité d'anticorps a été fixée sur les cellules, et donc que la même quantité d'ABCG2 est présente à la membrane plasmique.

La diminution d'ABCG2 induite par la réversine CT1364 n'est donc pas due à un mauvais adressage de la protéine.

La diminution du taux d'expression total d'ABCG2 mais pas membranaire pourrait s'expliquer par la forte quantité de protéine surproduite dans ce système d'expression. Dans les conditions normales, les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 produisent une grande quantité d'ABCG2 et seule une faible proportion est adressée à la membrane plasmique. Ce phénomène se visualise en immunofluorescence où nous retrouvons la protéine ABCG2 dans les organites intracellulaires mais aussi dans le cytosol. De ce fait, malgré la diminution d'expression d'ABCG2 il est possible que suffisamment de protéines soient produites pour avoir la même quantité adressée à la membrane plasmique. Nous envisageons d'étudier ce phénomène par le biais des cellules Flp-InTM-293 ABCG2 qui n'ont qu'une seule copie du gène inséré dans leur génome et de ce fait ne surexpriment pas la protéine.

Afin de poursuivre ces investigations, des essais d'immunofluorescence sont en cours. Ils nous permettront notamment de localiser la diminution d'expression d'ABCG2. Nous envisageons également de quantifier le taux d'ARNm dans les cellules après différents temps d'incubation. Enfin, s'il s'avère que la diminution d'expression est due à une dégradation plus rapide, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques devrait nous permettre de déterminer si cette dégradation se fait par le biais des lysosomes ou du protéasome après ubiquitinylation. Nous savons, en effet, que la dégradation d'ABCG2 peut se faire par ces 2 voies, selon que la protéine dégradée est mature, mal repliée ou mutée (Wakabayashi *et al.*, 2007) ; (Wakabayashi-Nakao *et al.*, 2009) ; (Nakagawa *et al.*, 2008). Ceci nous permettrait alors de déterminer si la réversine CT1364 a un impact sur la maturation des protéines.

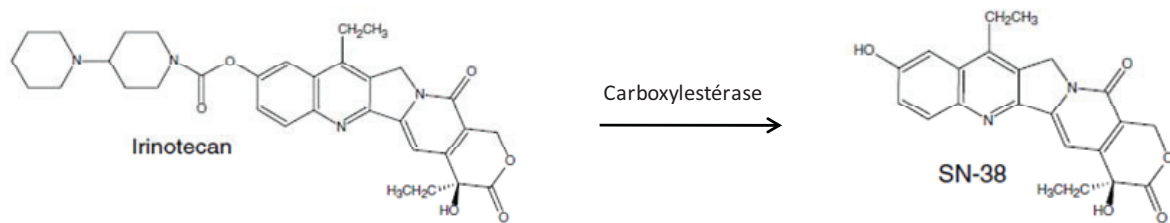


Figure 106 : Métabolisation de l'irinotécan en SN-38, son métabolite actif.

3.4.6. Tests in vivo

3.4.6.1. Mise en place du test

3.4.6.1.1. Le choix des cellules

Le choix des cellules xéno greffées est une étape importante dans les tests *in vivo*. Nous décidons d'utiliser les cellules HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482 comme modèle d'étude *in vivo* et ceci pour plusieurs raisons. Premièrement, il a déjà été montré que ces cellules sont capables de croître sous forme de xéno greffe chez les souris (Zhang *et al.*, 2007). Deuxièmement, ceci nous permet d'étudier les modulateurs dans le même système que celui utilisé pour les tests *in vitro*. Troisièmement, le fait d'utiliser un modèle cellulaire transfecté nous permet de disposer de cellules contrôles n'exprimant pas ABCG2, à savoir les cellules transfectées par le vecteur seul. Enfin, les cellules transfectées, à la différence des cellules dites sélectionnées (cellules surexprimant ABCG2 après sélection par un agent cytotoxique), ne surexpriment qu'un seul transporteur ABC, celui transfecté. Ces 2 derniers points sont essentiels puisqu'ils nous permettent de relier directement les effets observés à l'inhibition d'ABCG2.

3.4.6.1.2. Le choix de l'agent anticancéreux et de l'inhibiteur témoin

3.4.6.1.2.1. L'irinotécan

L'irinotécan ((7-éthyl-10-[4-(1-pipéridino)-1-pipéridino] carbonyloxy)camptothécine, aussi appelé CPT-11) est une analogue des camptothécines, dérivé alcaloïde naturel d'un arbre chinois, le *Camptotheca acuminata*. C'est un agent anticancéreux, inhibiteur de la topoisomérase I (Hsiang *et al.*, 1985 ; Hsiang and Liu, 1988). Afin d'être actif, l'irinotécan est métabolisé par une carboxylestérase en SN-38 (Kawato *et al.*, 1991) (Figure 106).

L'irinotécan est un agent anticancéreux reconnu. Il est utilisé, en 1^{ère} ligne, dans le traitement des cancers colorectaux en combinaison avec le 5-FU et, en seconde ligne, pour les patients traités par le 5-FU en rechute ou en progression. De plus, l'irinotécan est étudié dans le traitement de plusieurs autres tumeurs solides (Smith *et al.*, 2006).

Cet agent anticancéreux et son métabolite actif étant des substrats de plusieurs transporteurs ABC (ABCG2, ABCB1 et ABCC1) (Chu *et al.*, 1999 ; Smith *et al.*, 2006), nous avons décidé de réaliser les tests *in vivo* avec l'irinotécan.

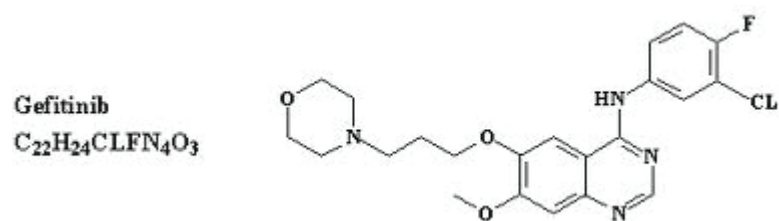


Figure 107 : Structure du géfitinib

3.4.6.1.2.2. Le géfitinib

Le géfitinib (Figure 107) est un inhibiteur des tyrosines kinases ciblant le récepteur du facteur de croissance cellulaires (EGFR). Il est utilisé en essais cliniques dans le traitement des cancers du poumon (Hida *et al.*, 2009 ; Lemos *et al.*, 2008). Des données controversées ont été rapportées concernant son transport par ABCG2 (Lemos *et al.*, 2008 ; Stewart *et al.*, 2004). Il apparait maintenant que le géfitinib est effectivement un substrat d'ABCG2 à faible dose, mais un inhibiteur de ce même transporteur à forte concentration *in vivo* (Elkind *et al.*, 2005 ; Leggas *et al.*, 2006). Ainsi, le géfitinib a été rapporté pour abolir le phénotype de résistance au SN-38 MDR à la dose maximale tolérée (75 mg/Kg) (Stewart *et al.*, 2004 ; Leggas *et al.*, 2006 ; Yanase *et al.*, 2004). Il présente cependant 2 inconvénients majeurs, empêchant son utilisation en clinique comme inhibiteur d'ABCG2 : il n'est pas spécifique d'ABCG2, et est toxique à la dose inhibant ABCG2.

En ce qui concerne notre étude, compte tenu de sa capacité à limiter l'efflux de SN-38 par ABCG2, nous décidons de l'utiliser comme inhibiteur de référence.

3.4.6.1.3. Le protocole utilisé

Le protocole a été mis au point par le Dr Léa Payen (Université Lyon 1). La tumorigénicité des cellules HEK-293 a tout d'abord été vérifiée. Des cellules HEK-293 pcDNA3.1 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482 ont été implantées chez des souris SCID en sous cutanée au jour 1 et le traitement a débuté au jour 2.

Les traitements chimiothérapeutiques intègrent fréquemment une pause entre 2 périodes d'administrations d'agents anticancéreux afin de diminuer les effets indésirables ; les cellules tumorales "récupèrent" moins vite que les tissus sains après une cure, qui se retrouvent alors "réparés" au départ de la cure suivante alors que la tumeur est toujours plus ou moins sensible. Nous décidons de nous rapprocher de ce protocole en découpant les tests en 2 phases : une 1^{ère} phase de traitement de 15 jours suivie d'une 2^{ème} phase de pause de 7 jours. Le 2^{ème} avantage d'un tel protocole est que l'on peut voir l'effet du traitement sur des tumeurs de petites tailles et des tumeurs bien établies dans les tissus puisque le traitement est débuté le jour suivant l'implantation des cellules. Lors des 15 premiers jours, les tumeurs étant de petite taille, il n'y aura pas de variation de diffusion de l'irinotécan dans les tumeurs. Le second cycle de thérapie (entre les jours 30 à 45) étudie l'effet des composés sur des tumeurs établies dans les tissus. Le volume de la tumeur atteint une taille de 100 mm³, concordante avec les données cliniques habituelles.

Résultats et discussion

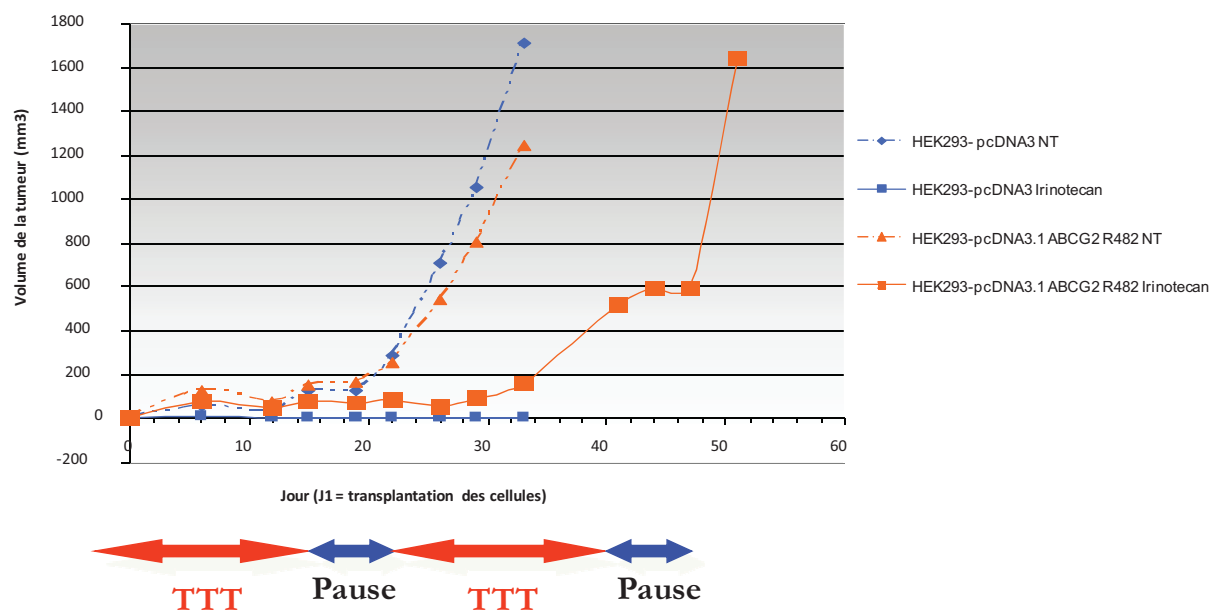


Figure 108 : Protocole utilisé pour les tests de réversion *in vivo*.

Il se compose de 2 phases : une phase de traitement de 15 jours et une pause dans le traitement de 7 jours.
NT, souris non traitées ; irinotécan, souris traitées par 30 mg/Kg d'irinotécan.

Résultats et discussion

Les résultats sont présentés en Figure 108, le volume tumoral mesuré est représenté en fonction du temps de traitement. Ainsi, les tumeurs non traitées, exprimant ou non ABCG2 (représentées par les courbes en pointillées avec des triangles oranges ou des losanges bleus respectivement) ont une croissance très rapide. Les souris sont sacrifiées au bout de 30 jours. Les souris xénogreffées avec les cellules n'exprimant pas ABCG2 et traitées par l'irinotécan (courbe pleine avec des carrés bleus) n'ont pas de croissance tumorale, les cellules étant toutes tuées par l'irinotécan. A la différence, les souris xénogreffées avec les cellules exprimant ABCG2 et traitées par l'irinotécan (courbe orange pleine reliant les carrés oranges) ont une croissance tumorale qui survient après la pause de 7 jours. Ceci correspond à un échappement tumoral au traitement du fait de l'expression d'ABCG2. Les souris sont sacrifiées au bout de 50 jours.

Ce test nous permet d'une part de valider la tumorigénicité des cellules HEK-293 chez les souris SCID. D'autre part, le protocole utilisé (15 jours de traitement puis 7 jours de pause) permet d'observer un échappement tumoral relié à ABCG2, le protocole est donc adapté à nos tests. Nous avons également dosé l'irinotécan et le SN-38 dans les xénogreffes 24 h après l'injection par HPLC-MS/MS. Bien que certaines variations de concentration soient observées, ces 2 composés sont détectés dans les xénogreffes. Enfin, la dose de 30 mg/Kg d'irinotécan est validée puisqu'elle inhibe bien la croissance des cellules n'exprimant pas ABCG2.

3.4.6.2. Toxicité

Avant de commencer les tests de chimiosensibilisation, nous devons contrôler l'innocuité des doses administrées. Nous testerons toutes les molécules administrés (irinotécan, géfitinib, éthanol et CT1364). Ce test s'est déroulé sur des souris SCID saines, à raison de 3 souris par groupe, auxquelles étaient injectés les composés par voie intrapéritonéale (éthanol, CT1364 ou irinotécan) ou par gavage (géfitinib). La toxicité a été évaluée comme préconisé par le comité d'éthique c'est-à-dire en observant toute modification comportementale des souris, une variation de l'état de leur pelage ou encore une diminution de plus de 20% de leur poids. Les souris sont donc observées après chaque injection et sont pesées 3 fois par semaine.

L'irinotécan (30 mg/Kg) est utilisé aux doses préconisées par les conseils d'éthiques. Des doses plus élevées entraînent des pertes de poids et une modification du comportement des souris. Cet agent anticancéreux ainsi que le CT1364 (100 mg/Kg) et l'éthanol (6% solution aqueuse) ne s'avèrent pas toxiques après 2 cycles du protocole.

Le géfitinib, quant à lui, entraîne certains signes de toxicité. Le 1^{er} essai effectué en IP à 100 mg/Kg révélait une toxicité du composé. La dose a donc été diminuée à 75 mg/Kg et il a été administré par gavage. Après 15 jours de traitement, les souris ont une tendance à rester prostrées dans leur cage et elles ont un pelage légèrement abimé reflétant une diminution de la fréquence de leur lavage et donc un mal être. La période de pause est alors augmentée à 15 jours. Le 2^{ème} cycle produit les mêmes conséquences sur les souris traitées au géfitinib. Cependant, nous ne pouvons pas diminuer la dose qui est celle nécessaire à l'inhibition d'ABCG2.

Suite à ce test, les doses de tous les produits administrés sont maintenues mais la pause est augmentée à 15 jours. Le protocole est donc constitué de 15 jours de traitement suivi de 15 jours de pause.

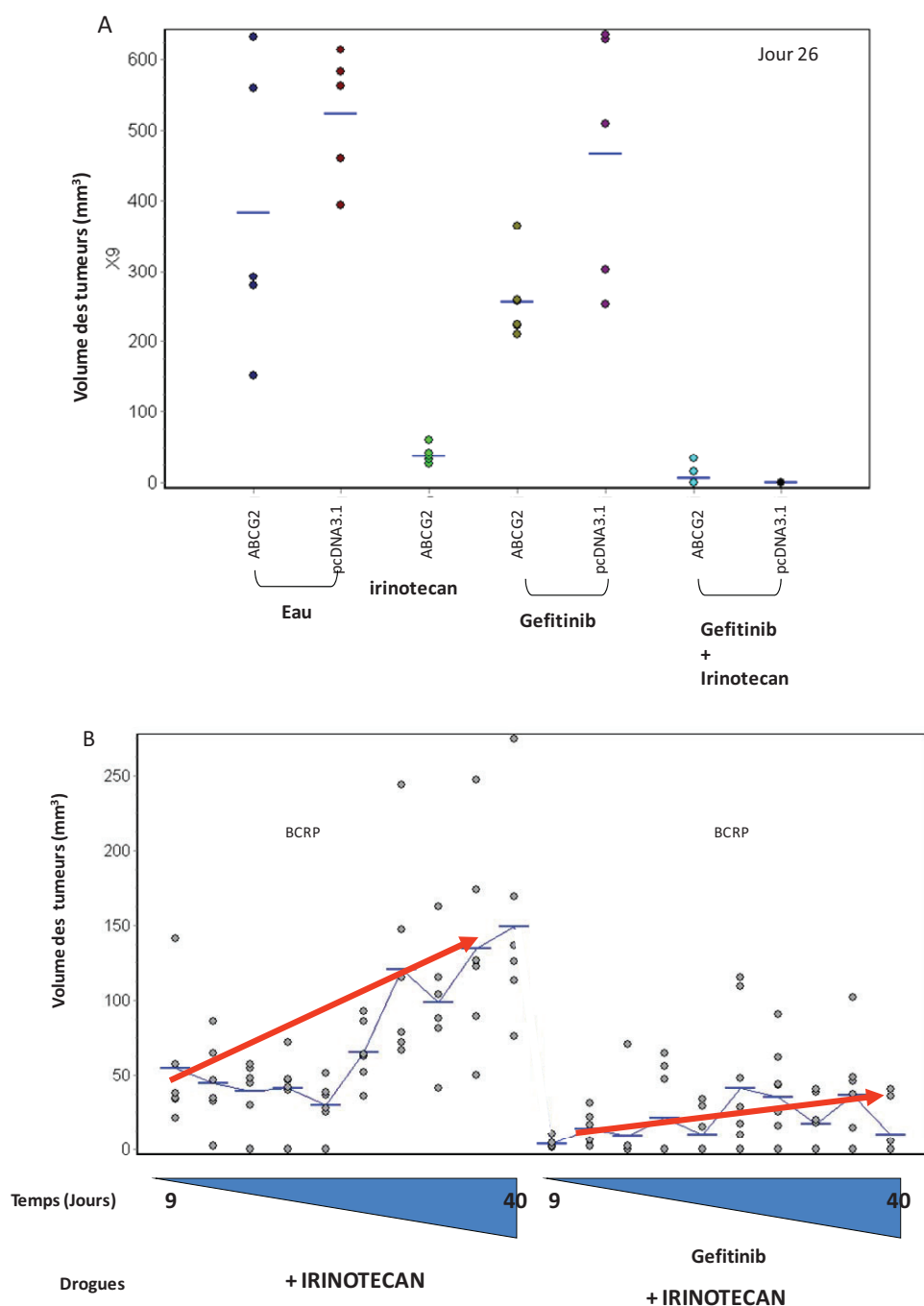


Figure 109 : Validation des contrôles lors du test de chimioréversion *in vivo*.

Chaque point représente une tumeur, les traits représentent les moyennes des volumes tumoraux. ABCG2 est l'abréviation des tumeurs exprimant ABCG2 et pcDNA3.1 correspond aux cellules contrôles HEK-293 pcDNA3.1 xénogreffées. Le traitement est débuté le jour suivant l'implantation des cellules.

A : Le graphique présente le volume tumoral mesuré au jour 26 selon les différents traitements administrés aux souris.

B : Le graphique présente l'évolution du volume tumoral des cellules exprimant ABCG2 entre les jours 9 et 40 traitées par de l'irinotecan seul ou additionné de géfitinib.

3.4.6.3. Efficacité

3.4.6.3.1. Validation des contrôles

Nous déterminons si la résistance des xénogreffes exprimant ABCG2 est réversée par l'addition de géfitinib. Les souris sont donc traitées par de l'eau, par de l'irinotécan additionné ou non de géfitinib. Les résultats sont présentés sur la Figure 109.

Sur la Figure 109A nous observons que les xénogreffes pcDNA3.1 contrôles et ABCG2 traitées avec de l'eau ont une croissance rapide et atteignent un volume maximal au bout de 26 jours, conduisant au sacrifice des souris. Comme observé précédemment, les tumeurs n'exprimant pas ABCG2 n'ont pas de croissance lorsqu'elles sont traitées avec l'irinotécan seul (Figure 109A). Les souris ont été suivies pendant 8 semaines après l'arrêt du traitement par irinotécan et aucune croissance tumorale n'a été observée. Au contraire, l'irinotécan retarde seulement, d'environ 10 jours, la croissance des xénogreffes exprimant ABCG2. Ce délai est augmenté lorsque le géfitinib est ajouté à l'irinotécan. La Figure 109B montre l'évolution du volume tumoral entre les jours 9 et 40 pour les xénogreffes exprimant ABCG2 et traitées par le cocktail irinotécan + géfitinib. On voit très clairement que la croissance des tumeurs est ralentie. La tumeur atteint un volume de 150 mm³ en traitement seul alors que le volume stagne à 40 mm³ en co-administration. Malgré sa légère toxicité, notre contrôle positif est donc correct.

Nous notons ici que les tumeurs exprimant ABCG2 ont une croissance plus lente sous traitement au géfitinib seul. Ceci peut être dû à l'effet anticancéreux du géfitinib (Hida *et al.*, 2009 ; Lemos *et al.*, 2008).

Après avoir validé les contrôles, nous pouvons étudier l'effet de la réversine CT1364 sur la croissance tumorale.

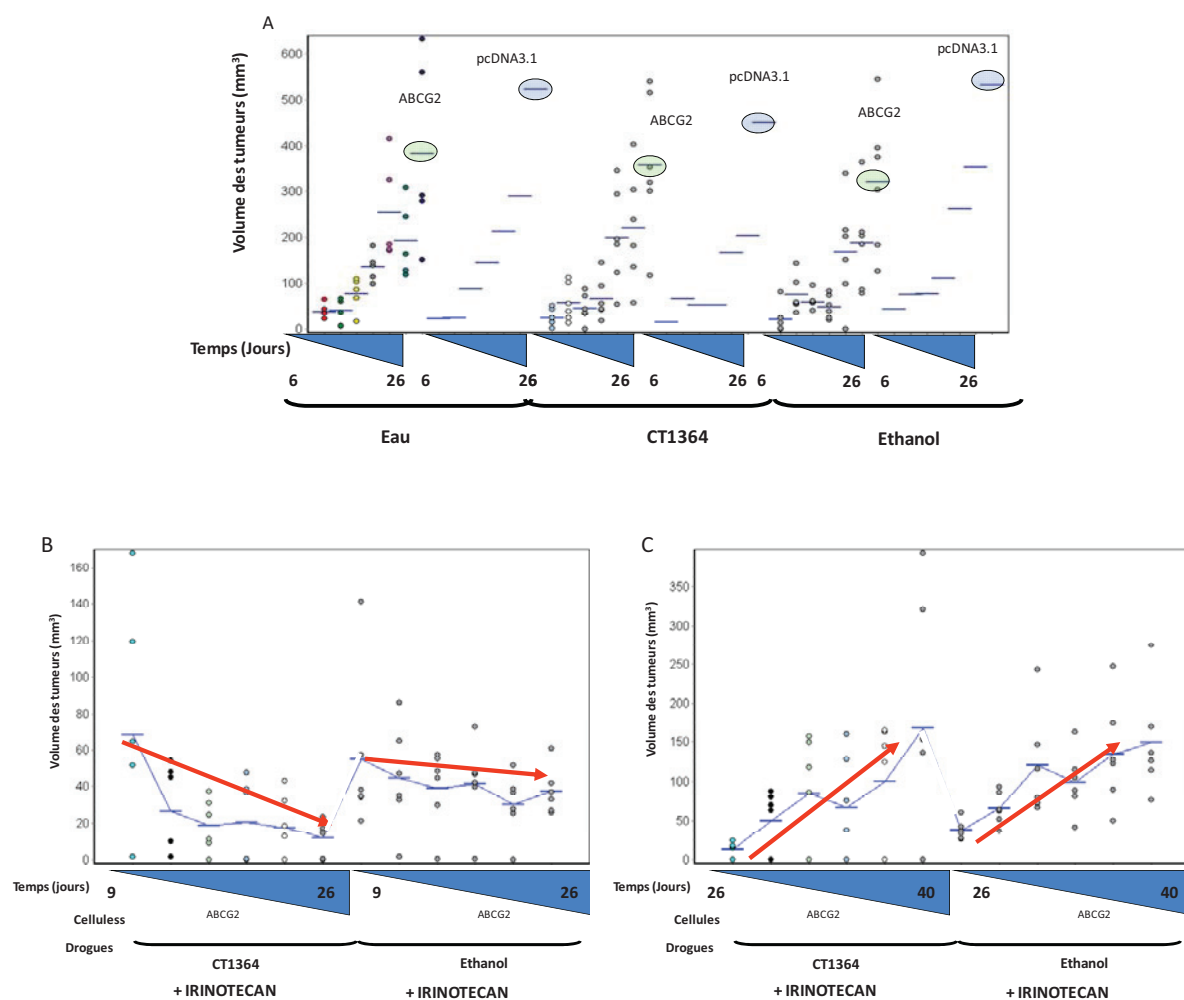


Figure 110 : Effets chimiosensibilisants du CT1364 ou de l'éthanol 6% combiné ou non avec l'irinotécan.
 ABCG2 est l'abréviation des tumeurs exprimant ABCG2 et pcDNA3.1 correspond aux cellules HEK-293-pcDNA3.1 xénotreffées.

A : Effets du CT1364 et de l'éthanol seul, comparé à l'eau, sur les tumeurs exprimant ou non ABCG2 entre les jours 6 et 26.

B et C : Effets du CT1364 et de l'éthanol co-administré avec l'irinotécan sur les tumeurs exprimant ABCG2 entre les jours 6 et 26 (B) et entre les jours 26 à 40 (C).

Résultats et discussion

3.4.6.3.2. Effets du CT1364 dans une solution aqueuse d'éthanol 6%

Le composé CT1364 ainsi que la solution d'éthanol à 6% n'a pas d'effet sur la croissance des tumeurs comme le montre la Figure 110A. Le volume tumoral, au jour 26, est le même pour les tumeurs traitées avec de l'eau, du CT1364 ou de l'éthanol 6% aussi bien pour les tumeurs exprimant ou n'exprimant pas ABCG2.

Lorsque les souris sont xénogreffées avec les tumeurs exprimant ABCG2, nous observons une différence de croissance entre les jours 6 et 26 selon le traitement (Figure 110B) : le traitement irinotécan + CT1364 conduit à une régression. Cette régression s'explique par le fait que l'injection en sous-cutané des cellules a produit une grosseur, due à une réaction locale qui est indépendante d'une tumeur et qui diminue de taille avec le temps. La taille de cette grosseur diminue rapidement avec l'injection irinotécan + CT1364, ce qui indique que les cellules injectées ne se développent quasiment pas. Au contraire, la taille de la grosseur stagne pour les souris traitées par irinotécan + éthanol. Ceci s'explique par la diminution de la grosseur tandis qu'on a une multiplication des cellules.

Le traitement irinotécan + CT1364 ralentit donc la croissance des tumeurs exprimant ABCG2 par comparaison au traitement irinotécan + éthanol. Ceci témoignerait donc bien d'un effet chimiosensibilisant du CT1364.

Cet effet chimiorévertant n'est pas retrouvé pour la période suivant la pause, entre les jours 26 et 40, à savoir sur des tumeurs bien établies dans les tissus (Figure 110C). La grosseur due à l'injection étant totalement résorbée, nous observons directement la croissance tumorale par la mesure de son volume. L'allure des courbes de cette croissance est la même avec les traitements irinotécan + CT1364 et irinotécan + éthanol. Le composé n'a donc plus ici d'effet chimiorévertant. Ceci peut s'expliquer par la taille de la tumeur (elle a beaucoup progressée durant la phase de pause avec une augmentation d'environ 40 mm³ à 150 mm³), et par leur faible vascularisation. Le composé CT1364 administré dans une solution d'éthanol 6% ne pénètre au cœur de la tumeur. Son effet est donc assez rapidement limité.

Malgré les résultats mitigés obtenus, ces tests *in vivo* sont très encourageants. Nous avons démontré l'effet réversant, *in vivo*, du CT1364 sur des tumeurs de faible taille. En améliorant la forme d'administration, nous espérons pouvoir démontrer son effet sur des tumeurs de toutes tailles.

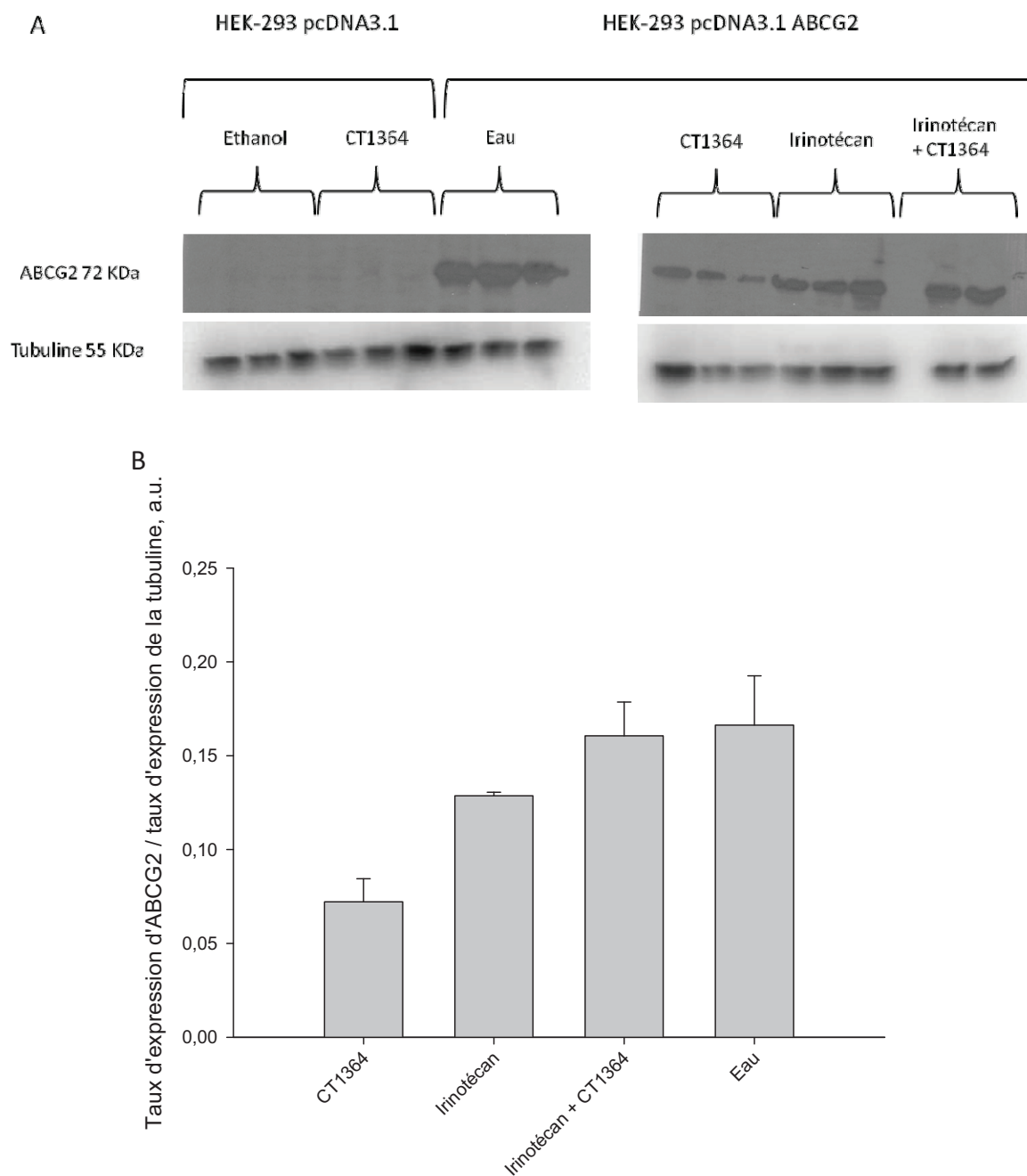


Figure 111 : Expression d'ABCG2 dans les tumeurs extraites des souris.

A : Western-Blot réalisé avec un anticorps primaire BXP21, spécifique d'ABCG2 ou un anticorps primaire anti-tubuline α . L'anticorps secondaire, de souris, est couplé à la peroxydase. Deux contrôles négatifs sont effectués avec les tumeurs n'exprimant pas ABCG2 et 4 essais en triplicats sont quantifiés.

B : Quantification, réalisée par le logiciel Quantity One, de l'expression d'ABCG2 rapportée à l'expression de la tubuline dans chaque tumeur.

3.4.6.4. Expression d'ABCG2 dans les tumeurs

Les tumeurs des souris ont été prélevées après sacrifice, et une analyse de l'expression d'ABCG2 est réalisée par western-blot. L'analyse est effectuée sur 3 tumeurs ayant subi le même traitement : eau, CT1364, irinotécan, ou CT1364 + irinotécan. Enfin, un contrôle est effectué sur les tumeurs n'exprimant pas ABCG2.

Le taux d'ABCG2 dans les tumeurs traitées par l'éthanol est identique à celui des tumeurs traitées par l'eau, le western-blot n'a donc pas été reproduit ici. Le point intéressant est qu'on retrouve *in vivo* la propriété du composé CT1364 à diminuer le taux d'expression d'ABCG2 (Figure 111) comme observé précédemment *in vitro* (Figure 104). En effet, comparé aux tumeurs traitées par l'eau, le rapport d'expression ABCG2/tubuline est plus faible dans les tumeurs traitées par de la réversine CT1364 seule (Figure 111B). Lorsque l'irinotécan est ajouté aux tumeurs traitées par CT1364, le taux d'expression d'ABCG2 est identique à celui des tumeurs traitées par l'eau. Enfin, la quantité d'ABCG2 dans les tumeurs traitées à l'irinotécan seul semble plus faible que les tumeurs traitées par de l'eau. Mais la différence n'est pas significative. Le taux d'expression d'ABCG2 ne semble en réalité pas modifiée par l'irinotécan (Figure 133B). Ainsi, la propriété de l'inhibiteur CT1364 à diminuer l'expression d'ABCG2 est retrouvée *in vivo*.

Résultats et discussion

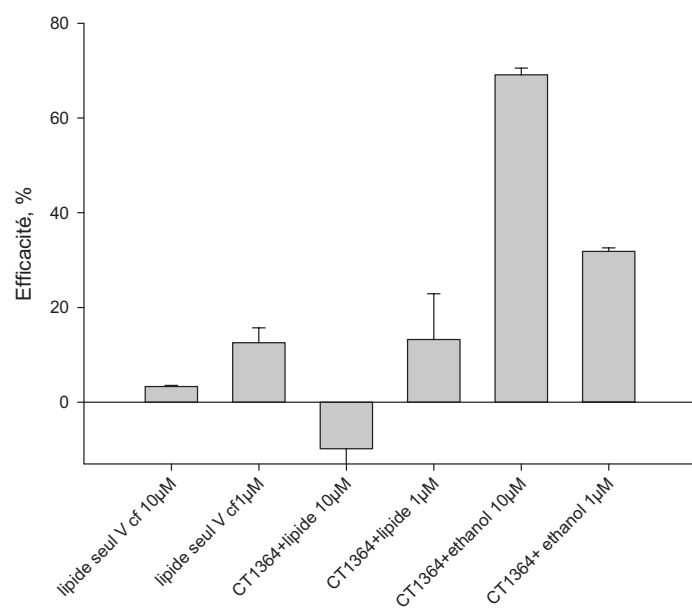


Figure 112 : Efficacité d'inhibition d'ABCG2 par le composé CT1364 en intralipide.

Le composé CT1364 est testé à 2 concentrations, 1 μ M et 10 μ M soit dans des intralipides soit dans de l'éthanol. La solution d'intralipides seule est également testée au même volume qu'en association avec le CT1364.

« V cf » : volume correspondant

3.4.6.5. Essais de formulation *in vitro*

3.4.6.5.1. En lipides

Le 1^{er} test de formulation réalisé a été d'inclure le CT1364 dans des lipides. Nous avons pour cela collaboré avec le Pr. Jérôme Guitton à l'hôpital Lyon sud. Cette forme galénique est utilisée pour l'injection de médicaments notamment, des anesthésiques locaux. Cette forme est donc connue, sa toxicité est maîtrisée et il existe des médicaments possédant une autorisation de mise sur le marché (AMM) qui sont ainsi formulés (Intralipide®). Le choix de cette forme est donc justifié. Elle correspond à une émulsion lipidique de triglycérides à chaînes longues provenant de l'huile de soja.

L'efficacité d'inhibition du composé CT1364 a été déterminée, *in vitro*, par cytométrie en flux sur les cellules HEK-293 pcDNA3.1 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2, en déterminant leur capacité d'inhibition de l'efflux de mitoxantrone. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 112, le composé n'est pas actif ainsi formulé. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'après intégration des lipides dans les compartiments intracellulaires, le CT1364 peut rester piégé dans un organe intracellulaire. Il n'est alors pas accessible pour ABCG2 membranaire.

3.4.6.5.2. En nanoparticules

Les tests *in vivo* effectués avec le MBLI-87 formulé dans les nanoparticules se sont révélés très prometteurs (voir la partie suivante *Résultats et discussion D-I Tests In vivo*). Le CT1364 a donc été inclus dans une même solution de nanoparticules par le Dr Annabelle Gèze et son équipe (Faculté de Pharmacie de Grenoble, UJF). Cette formulation nous permettrait d'utiliser les contrôles déjà effectués *in vitro* et *in vivo* avec les nanoparticules seules, évitant des tests de toxicité inutiles sur les souris. Ce choix serait donc très avantageux.

Malheureusement, la solution nanoparticules - CT1364 est très peu stable. Il se forme des précipités après 10 jours de conservation à 4°C ainsi qu'à température ambiante. La fabrication hebdomadaire de la solution étant trop contraignante, nous ne pouvons pas utiliser cette formulation.

Cependant, cette formulation dans des nanoparticules nous semblent particulièrement intéressante puisque son efficacité a été démontrée avec le MBLI-87, composé testé au laboratoire. Nous envisageons alors de tester une nouvelle formulation dans des nanoparticules, avec une composition différentes en solvant ou en lipides.

Résultats et discussion

3.4.6.5.3. Avec l'alcool benzylique

L'alcool benzylique est un excipient utilisé pour la formulation de médicaments injectable en voie intraveineuse (Equanyl[®]) ou encore intramusculaire (Clamoxyl[®]). Nous décidons de tester notre composé CT1364 sous cette forme. Une solution mère de CT1364 est préparée dans 100% d'alcool benzylique à 500 mM. Afin de dissoudre entièrement le composé, la solution est soumise aux ultrasons pendant 5 min. Cette formulation est ensuite préparée à 6% dans du milieu de culture, le DMEM pour être testée *in vitro*. Cependant, cette étape conduit à la formation d'un précipité laiteux dû à la dilution de l'alcool benzylique dans le DMEM.

Les tests de cette préparation en cytométrie en flux ne sont pas concluants. Le précipité formé interfère dans la mesure de l'efflux de mitoxantrone. Il nous est impossible de tester l'efficacité de cette formulation *in vitro*.

3.4.6.5.4. Avec du DMSO

Une dernière voie est envisagée : la formulation du composé CT1364 dans du DMSO. En effet, des études utilisant du DMSO en solution injectable en IP ont été réalisées sur des souris. Ainsi, en 2010 Roller et collaborateurs ont injecté du DMSO à la dose de 2 ml/Kg à des souris SCID (Roller, 2010). Le CT1364 se dissout parfaitement dans du DMSO et il n'y a pas de formation de précipité lorsqu'il est dilué dans du DMEM ou dans de l'eau. Tous les tests *in vitro* ont été réalisés avec une solution à 1% de DMSO final. Il faudrait cependant contrôler que cette forme est capable de pénétrer à l'intérieur de la tumeur.

En conclusion de cette étude, un composé, le CT1364, sélectionné pour inhiber spécifiquement ABCG2 à faible concentration (1 μ M) possède les caractéristiques essentielles au développement d'un inhibiteur de ce transporteur. Il n'est pas cytotoxique et les premiers tests *in vivo* non pas révélé de toxicité. De plus, il agit sur ABCG2 avec 3 mécanismes : diminution de son activité de transport de façon non compétitive, diminution de l'activité d'hydrolyse d'ATP et diminution de l'expression du transporteur. Il reverse le phénotype MDR *in vitro* et les premier tests *in vivo* sont très encourageants. Même si l'efficacité reste modérée, du fait de sa formulation qui n'est pas optimale, le composé agit également sur la réversion du phénotype de résistance *in vivo*. De plus, contrairement au géfitinib, ce composé n'a pas été testé à sa dose maximale mais à sa solubilité maximale en éthanol 6%. Ainsi, on peut imaginer qu'une optimisation de sa formulation associée à une dose plus élevée pourrait améliorer ces résultats.

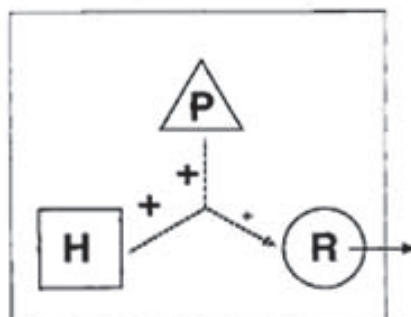


Figure 113 : Coopérativité positive entre les sites de fixation de substrats d'ABCB1.

Le site H reconnaît préférentiellement le Hoechst 33342, le site R fixant préférentiellement la rhodamine 123 ou les anthracyclines et le site P reconnaissant préférentiellement la prazosine ou la progestérone. Il existe une coopérativité positive, plus ou moins importante entre les sites (+, +).
(Shapiro *et al.*, 1999)

III. Caractérisation des sites R, H et P d'ABCB1

Il est maintenant admis qu'ABCB1 possède plusieurs sites distincts de fixation des substrats, ce qui est, en partie, responsable de sa capacité à transporter des substrats structurellement très différents. Selon Shapiro et collaborateurs, ABCB1 possède au moins 3 sites de fixation distincts : les sites R, H et P (Figure 24). Les substrats se fixent préférentiellement sur un site mais à forte concentration, (généralement à partir de 2 μ M), ils peuvent se fixer sur un 2^{ème} site. Il faut également noter qu'il existe une coopérativité positive entre les 3 sites, c'est-à-dire que la fixation d'un substrat sur son site entraîne une augmentation de l'affinité plus ou moins forte d'un autre substrat pour son site (Figure 113) (Shapiro et Ling, 1997 ; Shapiro *et al.*, 1999).

La localisation exacte des sites dans la structure d'ABCB1 est inconnue. Récemment, la résolution de la structure 3D d'ABCB1 murin a permis de déterminer 3 sites de fixation des inhibiteurs : 2 sites fixant l'inhibiteur QZ59-(SSS) et un site fixant son énantiomère, l'inhibiteur QZ59-(RRR) (Figure 17) (code PDB 3G61 et 3G60 respectivement) (Aller *et al.*, 2009). Dans cette étude, nous avons souhaité déterminer si les sites de fixation des inhibiteurs QZ59 sont communs aux sites de fixation des substrats d'ABCB1 ; dans ce cas, il serait alors possible de positionner avec précision les sites de fixation des substrats.

Dans un premier temps, une étude préliminaire de docking est menée sur la structure 3D d'ABCB1. Puis, dans un deuxième temps, le mécanisme d'inhibition des inhibiteurs QZ59 est déterminé vis-à-vis de plusieurs substrats. Cette étude ayant été initiée récemment, les résultats présentés ci-dessous sont préliminaires.

1. Etude de docking préliminaire

Une première étude de docking avait été réalisée sur le modèle d'ABCB1 humain établi à partir de la structure 3D d'ABCB1 murine (Aller *et al.*, 2009) (décrit dans la partie *Résultats et discussion II.5.*), il n'avait alors pas été possible de différencier les sites R et H sur ABCB1. Nous en avons déduit que ces 2 sites devaient être relativement proches, et que notre étude n'était pas assez précise pour les séparer. Cependant, le but de cette 1^{ère} étude étant de localiser la zone de fixation de l'inhibiteur CT1347 par rapport aux 2 sites R et H dans ABCB1, nous n'avons pas appondis ce docking.

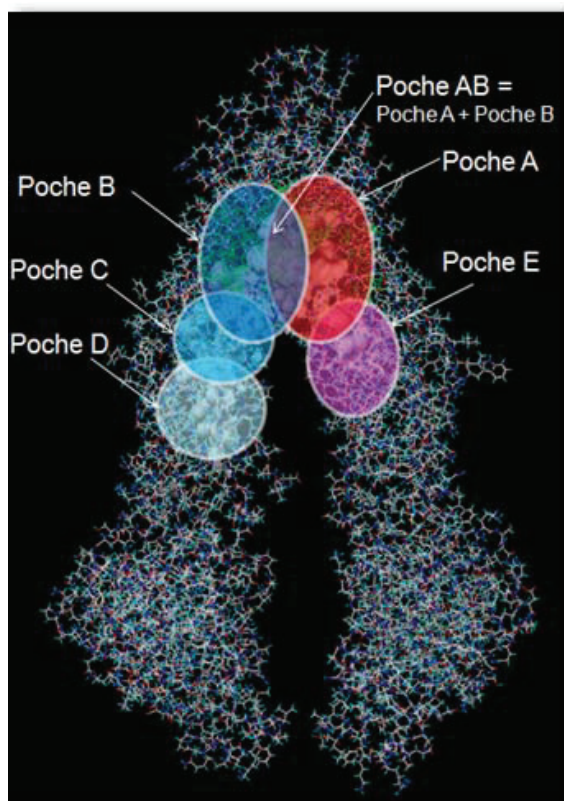


Figure 114 : Poches A à E dans lesquelles ont été effectuées les simulations de docking.
Ces poches ont été choisies en tenant compte des zones d'accessibilité au solvant dans la structure d'ABCB1 murine. Les poches se superposent 2 à 2 afin d'éviter les zones non accessibles aux substrats. La poche AB correspond à l'ensemble des 2 poches A et B.

Résultats et discussion

Cette 2^{ème} étude de docking est réalisée sur ABCB1 murine cristallisé sans inhibiteur (code PDB 3G5U) (Aller *et al.*, 2009). Après avoir ajouté les hydrogènes à la structure, elle a été minimisée avec une constante diélectrique correspondant à un milieu aqueux (80) et avec des charges de Gasteiger-Marseli. L'étape suivante a été de choisir et de créer les poches où les simulations de docking seront effectuées. Nous avons pour cela, grâce au logiciel « Sybyl molecular-modeling », déterminé les zones d'accessibilité au solvant de la protéine, zones supposées également accessibles aux substrats, présents en solution dans le milieu intracellulaire ; les 5 poches (de A à E) englobent cette zone d'accessibilité au solvant. Les poches sont distinctes, mais malgré tout assez proches, de celles choisies précédemment et élargissent la zone du docking (Figure 114). De la même façon que lors du 1^{er} docking, les poches se chevauchent afin d'éviter les zones non accessibles aux composés.

Afin de tenter de localiser les sites R, H et P dans ABCB1, nous avons choisi de docker :

- 3 substrats connus pour se fixer préférentiellement au site R : la rhodamine 123, la daunorubicine et la doxorubicine (Shapiro *et al.*, 1999),
- 4 substrats connus pour se fixer préférentiellement sur le site H : le Hoechst 33342, la quercétine, la colchicine (Shapiro *et al.*, 1999), et les énantiomères du vérapamil R et S (Shapiro and Ling, 1997; Spoelstra *et al.*, 1994) connus comme étant des modulateurs d'ABCB1 transportés,
- 2 substrats se fixant au site P : la prazosine (et la bodipy-prazosine, analogue de la prazosine, utilisé dans la partie expérimentale) et la progestérone (Shapiro and Ling, 1997),
- 1 substrat dont le site de fixation est inconnu : la mitoxantrone,
- les inhibiteurs QZ59-(SSS) et QZ59-(RRR) dont les sites de fixation sur ABCB1 sont connus (Aller *et al.*, 2009),
- l'inhibiteur CT1347 dont le site de fixation sur ABCB1 été modélisé précédemment (Figure 94) (Arnaud *et al.*, 2010).

Résultats et discussion

Drogue	CScore Poche A	CScore Poche B	CScore Poche AB	CScore Poche C	CScore Poche D	CScore Poche E
Bodipy-Prazosine	5,88	9,23	4,5	7,59	5,42	5,32
Prazosine	4	4,87	4,68	4,18	4,63	2,39
Progesterone	3,04	4,01	2,78	2,09	3,31	3,69
CT1347	7,03	9,1	6,54	8,77	7,29	6,64
Daunorubicine	5,98	5,53	5,29	2,51	3,64	4,18
Doxorubicine	5,13	4,78	6,32	4,63	4,13	3,45
Rhodamine 123	3,18	3,52	3,32	4,42	4,17	3,44
Hoechst 33342	4,01	7,49	4,84	6,16	7,06	3,78
Quercetine	3,76	3,71	3,46	3,46	5,46	2,46
Colchicine	4,22	4,79	5,32	4,98	4,69	4
Verapamil R	6,6	8,15	7,46	9,18	6,11	5,46
Verapamil S	7,05	7,27	7,18	8,19	5,64	6,41
Mitoxantrone	6,95	6,49	7,99	6,54	5,81	7,51
QZ59-(RRR)	4,34	4,52	4,51	3,38	4,24	3,24
QZ59-(SSS)	3,75	3,39	3,89	5,46	3,04	4,48

Tableau 35 : CScores de chaque molécule positionnée par docking sur les 6 poches choisies.

La case surlignée en rose correspond à la zone préférentielle de fixation de la molécule.

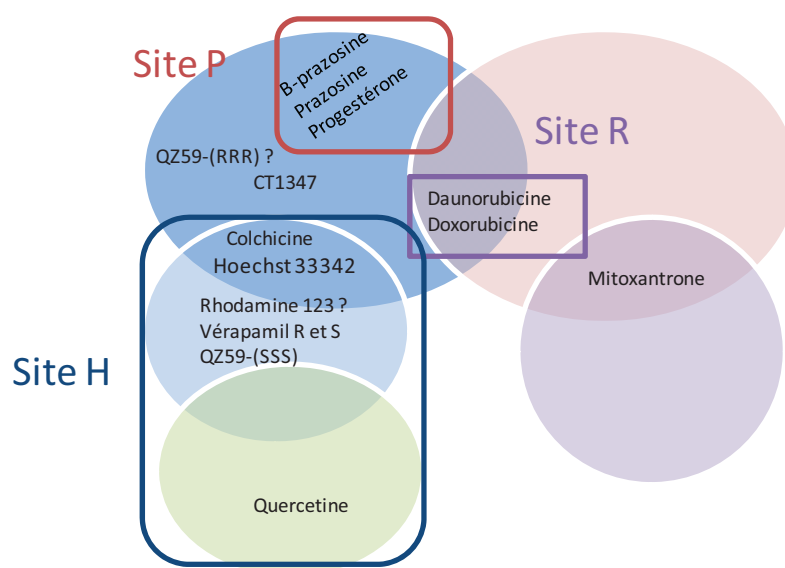


Figure 115 : Schéma permettant une visualisation des zones préférentielles pour le docking des substrats et des inhibiteurs étudiés.

Chaque couleur représente une poche : rose : poche A ; bleu foncé : poche B, bleu clair : poche C, vert : poche D, violet : poche E.

Résultats et discussion

Chaque substrat ou modulateur a été positionné par docking de façon indépendante dans chacune des poches sélectionnées. Les CScores, caractéristiques de l'affinité d'une molécule pour le site de fixation sont indiqués dans le Tableau.

Comme on peut l'observer dans ce tableau, il est difficile de déterminer avec précision une seule zone de fixation pour certains composés, tels que la daunorubicine, la doxorubicine, la rhodamine 123 ou encore le Hoechst 33342. Nous supposons dans ce cas que la fixation se fait au niveau du chevauchement des zones sélectionnées. Ces CScores nous permettent de réaliser le schéma ci-contre, indiquant, dans notre modèle de docking, la position préférentielle des molécules dans ABCB1 (Figure 115).

Ainsi, même si le docking réalisé ici n'est qu'une première approche, et que ces résultats doivent être confirmés par la partie expérimentale, il permet d'avoir un 1^{er} aperçu de la position des différentes poches. La première observation est que la plupart des substrats semblent se fixer sur la même moitié de la protéine. Seul le site de la mitoxantrone est localisé sur une partie plus éloignée et indépendante des autres substrats. La deuxième observation est que les substrats peuvent être séparés en 3 groupes, correspondant quasiment aux sites R, H et P d'ABCB1. Le site P serait localisé dans la poche B ; le site H serait assez étendu entre la partie basse de la poche B et les poches C et D ; enfin le site R serait localisé au niveau du chevauchement des poches A et B. Seule la rhodamine 123 n'est pas positionnée dans le site R mais dans le site H. Si l'on s'intéresse plus en détail aux résidus situés à moins de 7 Å du Hoechst 33342 et de la rhodamine 123, on trouve que la majorité des résidus sont communs aux 2 substrats. Ainsi, de la même façon que lors du précédent docking (Figure 94), il est très difficile de localiser ces substrats dans des zones différentes. Enfin, les passages transmembranaires formant ces sites de fixation sont en accord avec ceux décrits par Gutmann et collaborateurs (Gutmann *et al.*, 2009) ; nous retrouvons les TM4, 5, 6, 7, 8, 10 et 12 pour le site de fixation du Hoechst 33342 et les TM6 et 2 pour le site de fixation de la rhodamine 123.

Enfin, un point très intéressant à noter est qu'il semblerait, selon cette étude *in silico*, que le site H soit commun au site du QZ59-(SSS) identifié par cristallographie. Si ce résultat se confirme expérimentalement, il nous permettrait de positionner le site H dans la structure d'ABCB1.

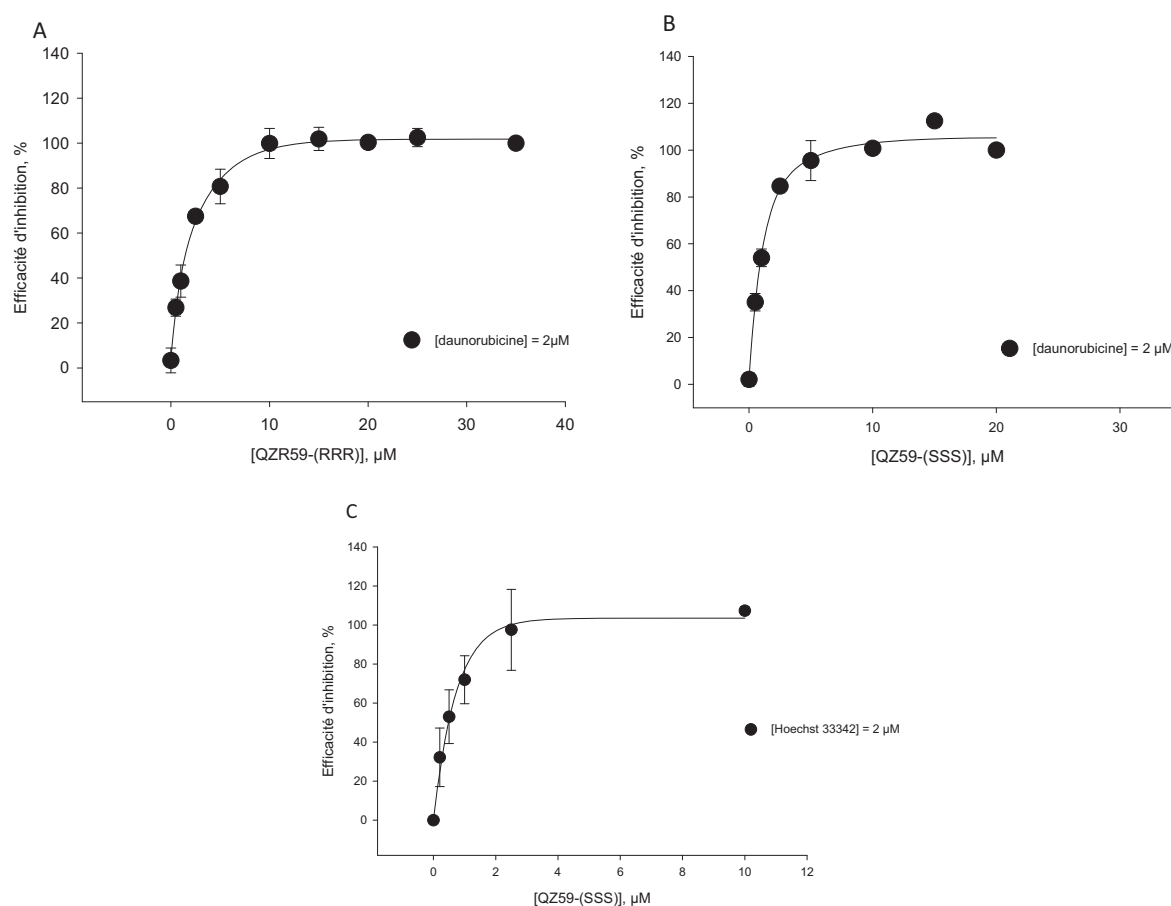


Figure 116 : Concentration de demi-inhibition maximale des QZ59 avec $2\mu\text{M}$ de daunorubicine ou $2\mu\text{M}$ de Hoechst 33342.

L'inhibiteur QZ59-(RRR) possède un IC_{50} de $1,7 \pm 0,3\mu\text{M}$ tandis que l'inhibiteur QZ59-(SSS) est plus efficace avec un IC_{50} de $1,02 \pm 0,06\mu\text{M}$ pour inhiber le transport de daunorubicine. Ce dernier inhibe le transport de Hoechst 33342 avec une meilleure efficacité (IC_{50} de $0,5 \pm 0,04\mu\text{M}$).

Résultats et discussion

Une étude de docking plus poussée sera réalisée à la suite de la partie expérimentale lorsqu'on aura d'avantage d'informations sur le type d'inhibition, compétitif ou non compétitif, des QZ59 avec les différents substrats. Nous pourrions alors affiner la position des substrats et déterminer les résidus interagissant avec chacune des molécules. Cela nous permettra de valider nos résultats par les données de la littérature.

2. Concentration de demi-efficacité d'inhibition

Les inhibiteurs QZ59 inhibent le transport de calcéine AM avec une efficacité de $2,7 \pm 0,25 \mu\text{M}$ et $8,5 \pm 0,47 \mu\text{M}$ respectivement (Aller *et al.*, 2009). Nous avons souhaité déterminer les concentrations de demi-efficacité d'inhibition dans notre système, les cellules NIH3T3 contrôles et NIH3T3-MDR-G185 transfectées avec le gène d'ABCB1. Nous avons procédé comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*, et les résultats sont présentés dans la Figure 116.

La concentration de demi-inhibition maximale (IC_{50}) a été déterminée pour les 2 inhibiteurs avec $2 \mu\text{M}$ de daunorubicine et pour le QZ59-(SSS) avec également $2 \mu\text{M}$ de Hoechst 33342. Nous avons trouvé par l'étude *in silico* que ce composé pouvait se fixer dans le site H d'ABCB1, nous avons donc souhaité établir son IC_{50} avec les 2 substrats.

Les valeurs d'efficacité trouvées ici sont différentes de celles données par Chang et collaborateurs (Aller *et al.*, 2009). Ceci peut aisément s'expliquer par le fait que les systèmes cellulaires sont différents : nous travaillons ici avec des cellules transfectées tandis que Chang et collaborateurs travaillent avec des cellules sélectionnées. De plus, nous ne mesurons pas la concentration de demi-inhibition d'export du même substrat. Ainsi dans le cas où les inhibiteurs sont compétitifs avec l'un des 2 substrats, ou que leur fixation entraîne une coopérativité positive ou négative pour la fixation du substrat, la valeur de l' IC_{50} sera modifiée.

De même que Chang et collaborateurs, nous notons une meilleure efficacité pour QZ59-(SSS) pour inhiber le transport d'un même substrat que son énantiomère R : IC_{50} respectivement de $1,02 \pm 0,06 \mu\text{M}$ et $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ vis-à-vis de la daunorubicine. Cependant, l'énantiomère S n'est que 1,6 fois plus efficace que l'énantiomère R pour inhiber le transport de daunorubicine, alors qu'il est 3,2 fois plus efficace pour inhiber l'export de calcéine AM dans le système de cellules sélectionnées (Aller *et al.*, 2009).

Dans notre système cellulaire, l'inhibiteur QZ59-(SSS) inhibe plus efficacement le transport de Hoechst 33342 que le transport de la daunorubicine : $0,5 \pm 0,04 \mu\text{M}$ contre $1,02 \pm$

Résultats et discussion

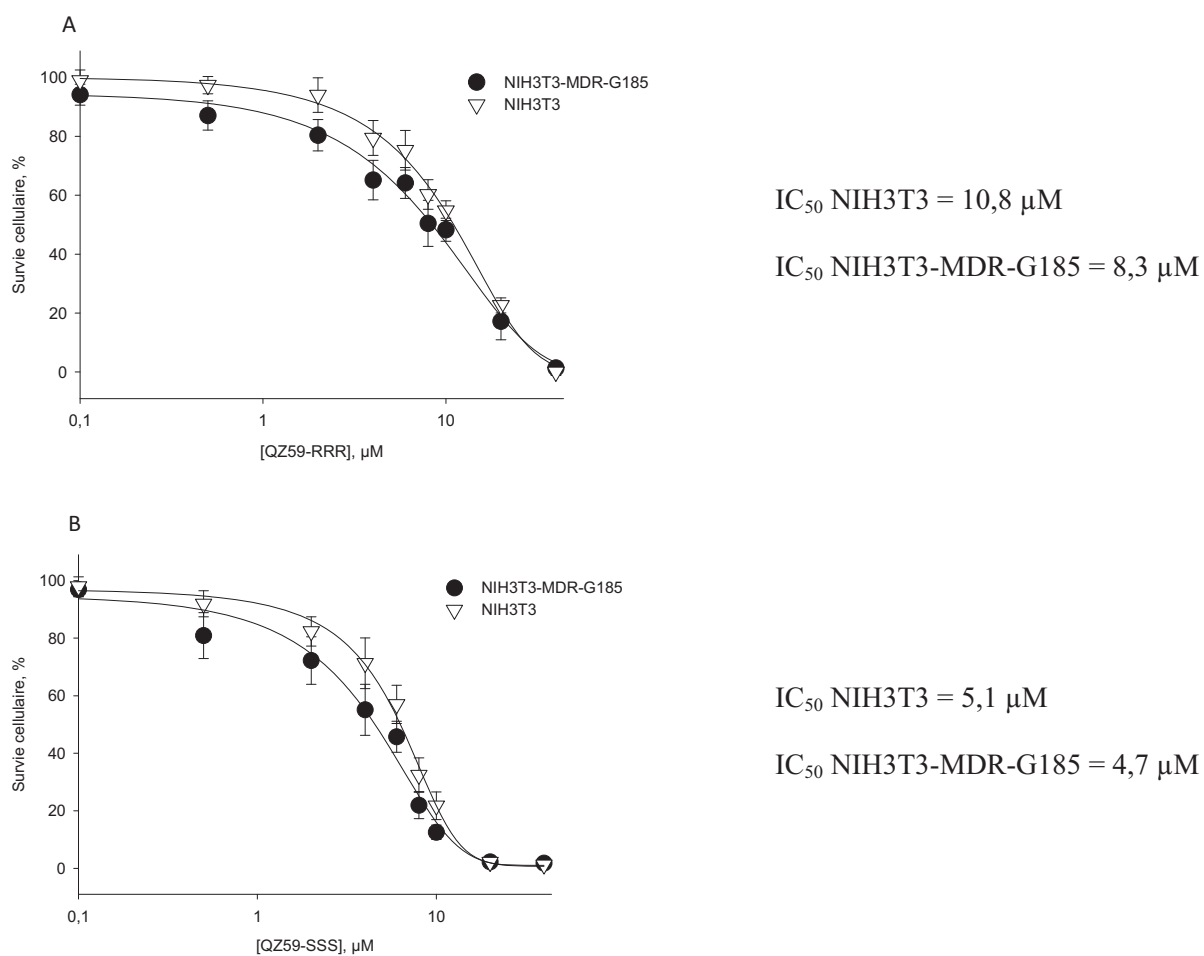


Figure 117 : Cytotoxicité des 2 inhibiteurs QZ59 sur les cellules NIH3T3 et NIH3T3-MDR-G185.
Les tests de cytotoxicité ont été réalisés avec le QZ59-(RRR) (A) et le QZ59-(SSS) (B) selon la méthode du test au MTT décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. Le QZ59-(SSS) est plus toxique que son énantiomère et aucun des 2 inhibiteurs n'est transporté.

Résultats et discussion

0,06 μM . Etant donné que l'étude *in silico* semble indiquer que le site de fixation de cet inhibiteur et le site H soient recouvrant, nous nous serions attendus à obtenir une IC_{50} plus élevée avec ce substrat qu'avec la daunorubicine. Cependant, ce résultat pourrait s'expliquer par une affinité meilleure du QZ59-(SSS) pour le site H que le Hoechst 33342 lui-même. Dans ce cas, contrairement à la daunorubicine, en plus d'inhiber le transport, l'inhibiteur inhiberait la fixation du substrat sur son site ce qui augmenterait sa capacité d'inhibition et donc son IC_{50} .

En conclusion, dans le système de cellules transfectées utilisées ici, les inhibiteurs QZ59-(RRR) inhibent le transport de daunorubicine avec une IC_{50} de $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$, QZ59-(SSS) $1,02 \pm 0,06 \mu\text{M}$ et ce dernier inhibe l'export de Hoechst 33342 avec une IC_{50} de $0,5 \pm 0,04 \mu\text{M}$.

3. Cytotoxicité des inhibiteurs QZ59

Nous avons souhaité, avant de débiter les études du mécanisme d'inhibition, déterminer la cytotoxicité de ces composés, d'une part afin de connaître les gammes de concentrations qu'il était possible d'utiliser dans nos tests, et d'autre part afin de déterminer si ces composés étaient transportés par ABCB1. Nous avons donc effectué des tests de cytotoxicité (décrit dans la partie *Matériels et méthodes*) sur les 2 types cellulaires exprimant (NIH3T3-MDR-G185) ou non (NIH3T3) ABCB1. Les résultats sont présentés ci-contre.

Ainsi, le composé QZ59-(SSS) est plus cytotoxique que son énantiomère R. A la concentration de 5,1 μM , la survie cellulaire n'est plus que de 50% avec le composé QZ59-(SSS) alors qu'il faut ajouter 10,8 μM de QZ59-(RRR) pour atteindre la même mortalité cellulaire. Le même effet est retrouvé pour les cellules exprimant ABCB1 : le QZ59-(RRR) est 2 fois moins cytotoxique que son énantiomère S.

Le 2^{ème} point important à noter est le fait que ces 2 composés ne semblent pas transportés par ABCB1. En effet, la toxicité est la même sur les cellules exprimant ou non le transporteur. Si le composé était transporté, sa concentration intracellulaire aurait été diminuée par ce transporteur et donc sa cytotoxicité aurait été plus faible dans les cellules exprimant la protéine.

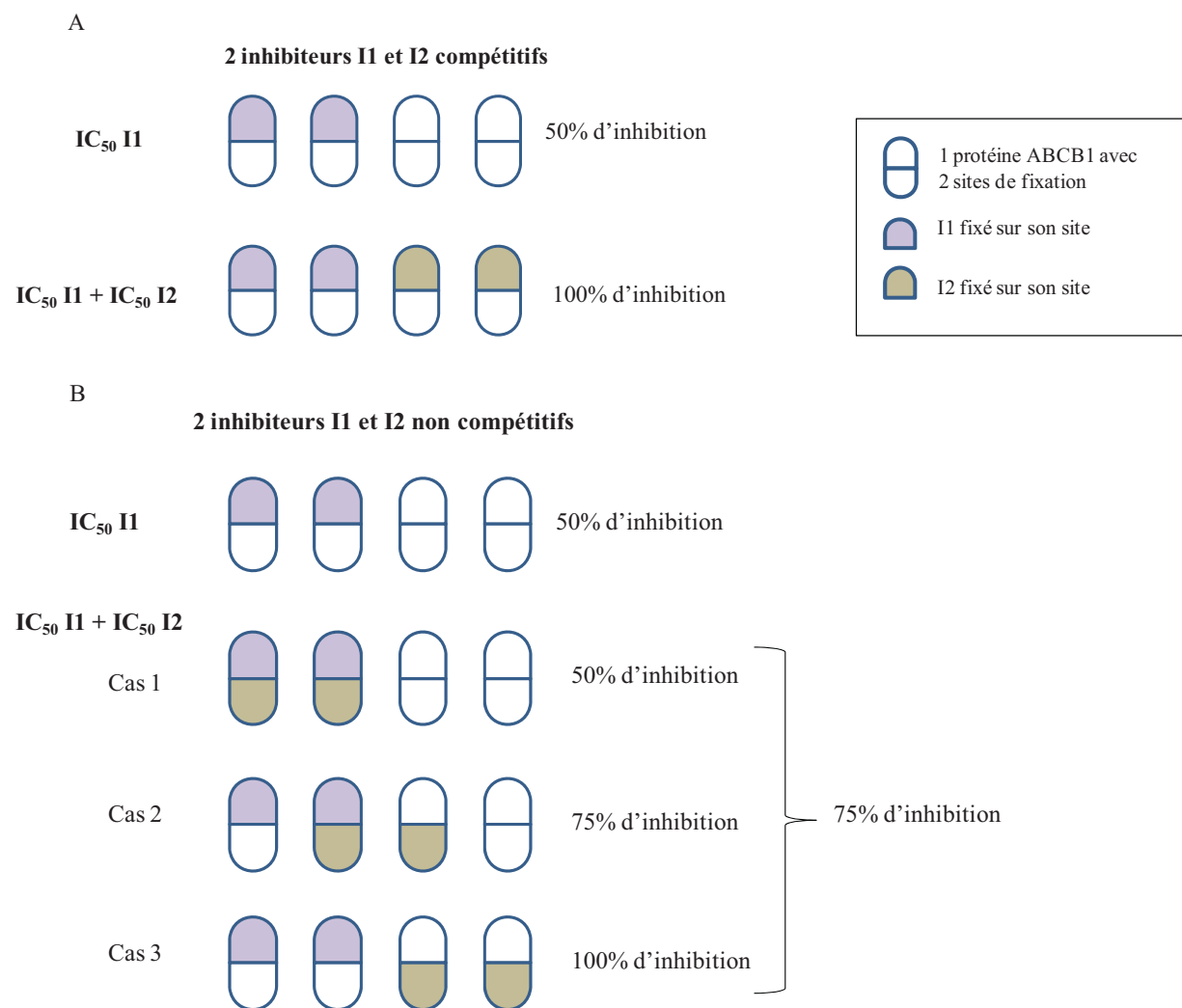


Figure 118 : Schématisation des effets additifs dans le cas de 2 inhibiteurs qui se fixent au même site d'une protéine (A) ou à des sites différents (B).

A : Les 2 inhibiteurs se fixant au même site, l'efficacité d'inhibition en présence des 2 inhibiteurs sera proche de l'efficacité induite par 2 fois leur IC₅₀.

B : Les 2 inhibiteurs se fixent sur des sites distincts, 3 cas sont alors possibles entraînant une efficacité d'inhibition inférieure à celle produite par 2 fois l'IC₅₀ de l'un.

4. Additivité des efficacités d'inhibition

Nous avons démontré précédemment, de manière expérimentale et *in silico* que le composé CT1347 ne se fixait ni dans le site R, ni dans le site H. Nous savons également, par la structure d'ABCB1 co-cristallisée avec les 2 inhibiteurs QZ59 (Aller *et al.*, 2009), que les QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS) se fixent sur des sites distincts d'ABCB1. Nous décidons alors d'étudier l'additivité d'efficacité d'inhibition de ces 3 inhibiteurs sur la protéine ABCB1. Ceci nous permettra d'effectuer une étude préliminaire à celle déterminant le mécanisme d'inhibition de l'efflux de substrat par ABCB1 des inhibiteurs QZ59-(SSS) et QZ59-(RRR).

Dans le cas où les inhibiteurs se fixent au même site, les efficacités d'inhibition seront additives, l'ajout d'une concentration égale à l'IC₅₀ de l'inhibiteur I2 à l'IC₅₀ de l'inhibiteur I1 devrait conduire à une efficacité égale à 2 fois l'IC₅₀ de l'inhibiteur I1 (Figure 118A). Dans le cas où les inhibiteurs ne se fixent pas au même site, la résultante de l'ajout de l'inhibiteur I2 à l'inhibiteur I1 sera une efficacité moindre que celle de $2 \times IC_{50}$. En effet, certaines protéines seront inhibées par les 2 inhibiteurs à hauteur de 50% tandis que d'autres seront totalement exemptes d'inhibiteurs (Figure 118B).

Les tests sont effectués indépendamment avec 2 substrats, le Hoechst 33342 et la daunorubicine. Si un inhibiteur s'avère compétitif d'un substrat, ce dernier pourrait empêcher la fixation de l'inhibiteur sur son site préférentiel, biaisant ainsi les résultats. Il est donc nécessaire de contrôler les effets additifs avec 2 substrats se fixant préférentiellement sur des sites distincts.

Résultats et discussion

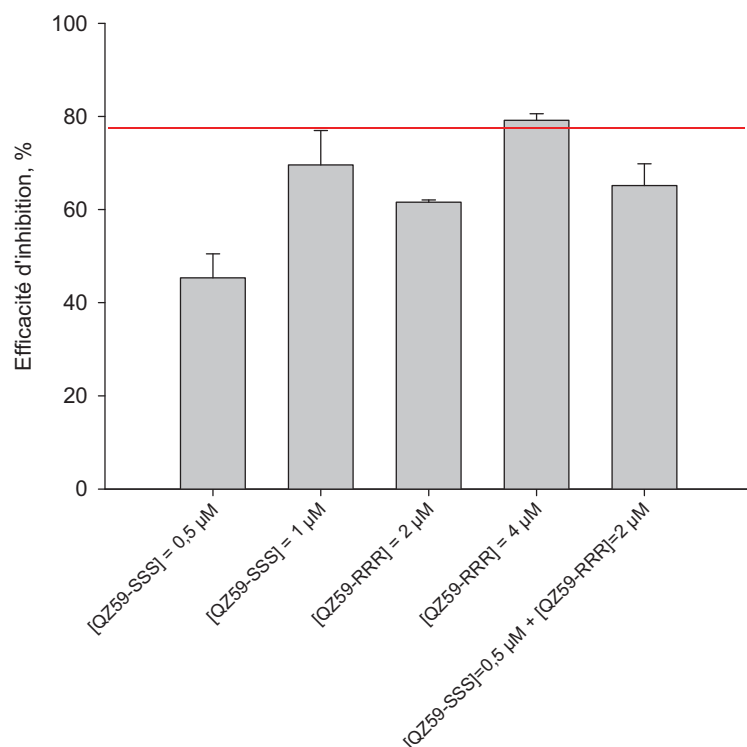


Figure 119 : Additivité des efficacités d'inhibition des 2 inhibiteurs QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS).

Les tests ont été réalisés avec 2 µM de Hoechst 33342.

L'efficacité d'inhibition des 2 inhibiteurs est inférieure à celle de 2 fois l'IC₅₀ des 2 inhibiteurs suggérant que ces 2 inhibiteurs ne se fixent pas sur le même site d'ABCB1.

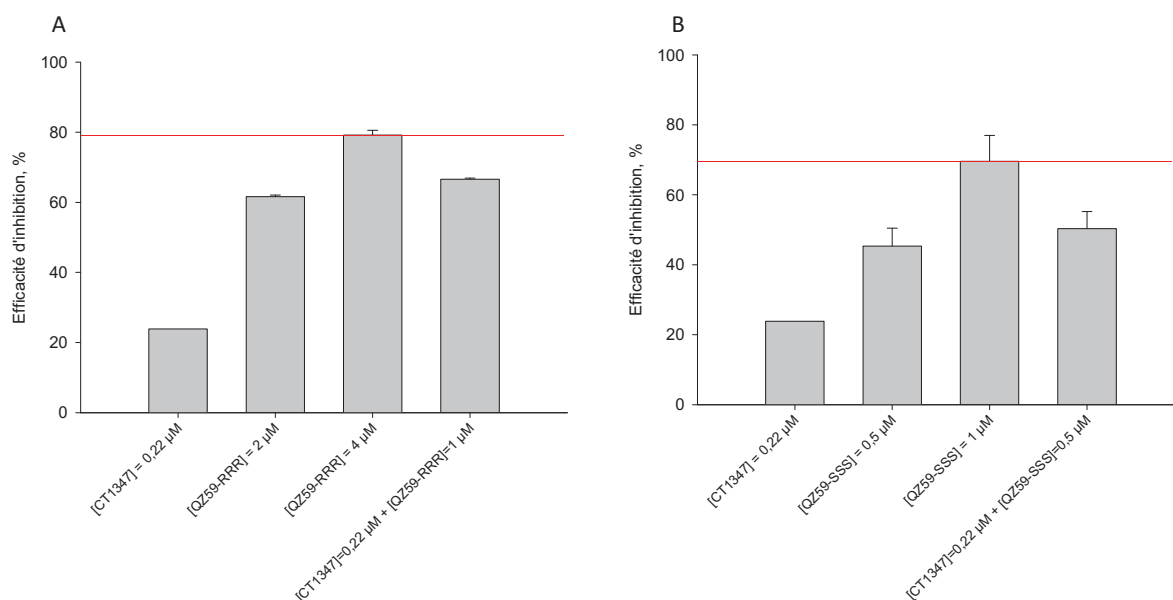


Figure 120 : Additivité des efficacités d'inhibition des 2 inhibiteurs QZ59-(RRR) (A) et QZ59-(SSS) (B) avec l'inhibiteur CT1347.

Les tests ont été réalisés à 2 µM de Hoechst 33342. L'ajout des 2 inhibiteurs inhibe le transport de Hoechst 33342 avec une efficacité inférieure à celle d'un inhibiteur seul à une concentration égale à 2 fois l'IC₅₀.

4.1. Hoechst 33342

La mesure d'efficacité d'inhibition a été réalisée par cytométrie en flux comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*. La concentration en Hoechst 33342 est de 2 μM , assurant ainsi la fixation de ce substrat dans le site H d'ABCB1. Les inhibiteurs sont ajoutés à 2 concentrations : leur IC_{50} et 2 fois leur IC_{50} .

Le premier test a été réalisé en combinant les inhibiteurs QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS). Ils ont été ajoutés à 2 concentrations : 0,5 μM et 1 μM pour le QZ59-(SSS), et 2 μM et 4 μM pour le QZ59-(RRR).

Comme on peut l'observer sur la Figure 119, lorsque les 2 inhibiteurs sont ajoutés ensemble à 0,5 μM et 2 μM , l'efficacité d'inhibition d'ABCB1 semble être inférieure (70%) à celle obtenue par 2 fois l' IC_{50} des inhibiteurs (80%). Nous supposons que les 2 inhibiteurs agissent alors de manière non compétitive (Figure 118B). Cependant, la faible marge d'erreur nous empêche de conclure avec certitude sur la non compétitivité des 2 inhibiteurs.

Les mêmes tests ont été effectués avec l'inhibiteur CT1347 et les 2 énantiomères du QZ59. Les résultats sont présentés sur la Figure 120. Ainsi comme on peut le voir, l'efficacité d'inhibition des 2 inhibiteurs associés conduit à une efficacité d'inhibition inférieure à celle d'un inhibiteur seul ajouté à une concentration égale à 2 fois l' IC_{50} . Nous supposons donc que les 2 inhibiteurs QZ59-(RRR) et QZ59-(SSS) agissent de manière non compétitive avec le CT1347 et se fixent sur des sites distincts d'ABCB1.

En conclusion, il semble donc que les 3 inhibiteurs QZ59-(RRR), QZ59-(SSS) et CT1347 se fixent sur des sites distincts d'ABCB1.

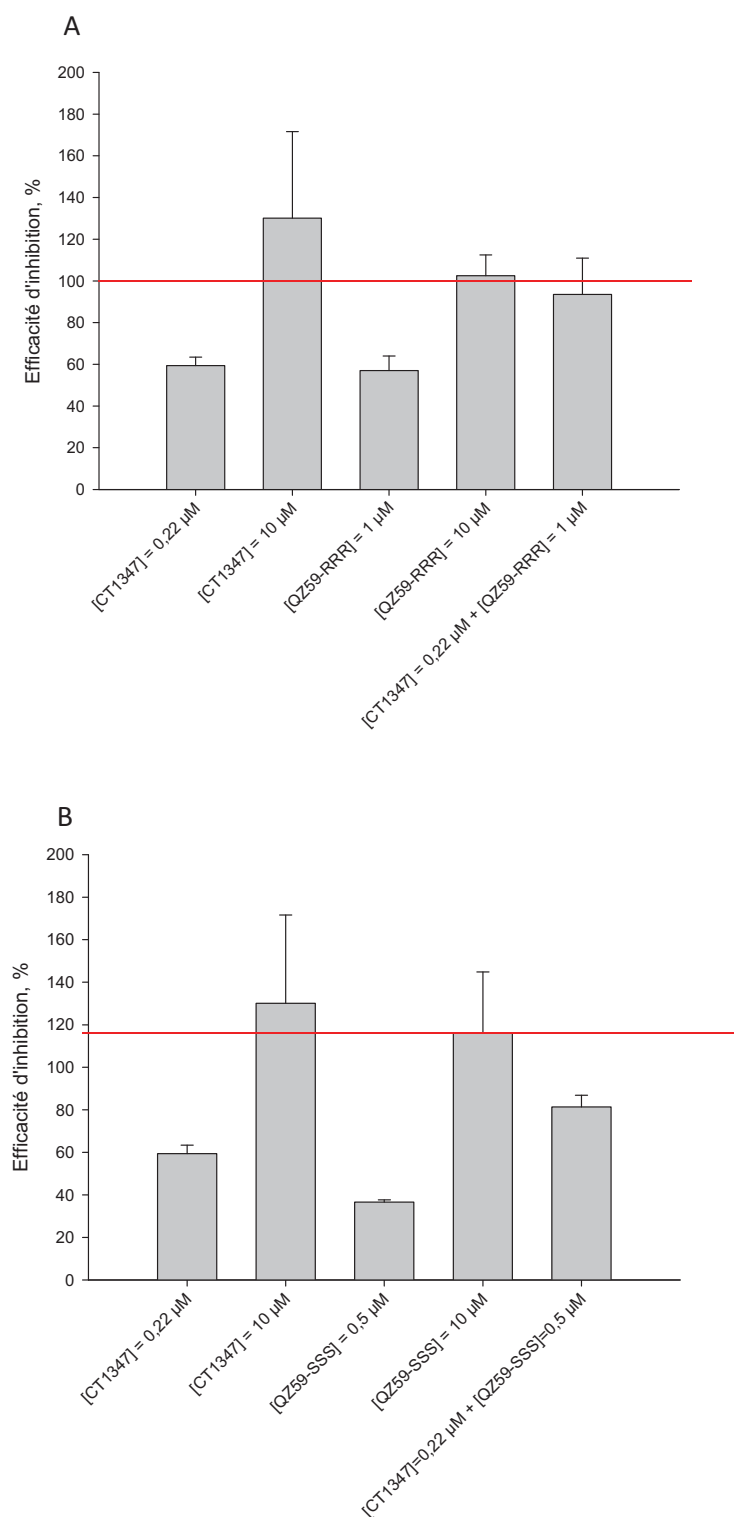


Figure 121 : Additivité des efficacités d'inhibition des 2 énantiomères du QZ59 avec le CT1347.
 Les tests ont été réalisés à 2 μ M de daunorubicine. Les 2 inhibiteurs ajoutés aux cellules à une concentration égale à leur IC_{50} , inhibent ABCB1 avec une efficacité proche de 100%.

4.2. La daunorubicine

Les mêmes tests ont été réalisés avec 2 μM de daunorubicine, substrat d'ABCB1 se fixant préférentiellement au site R. Nous savons que les 2 inhibiteurs QZ59 ne se fixent pas sur le même site (Aller *et al.*, 2009) les tests d'additivité ne sont donc pas réalisés une 2^{ème} fois.

L'association du QZ59-(RRR) avec le CT1347 ne permet pas de conclure à l'existence d'un site de fixation commun ou distinct. En effet, la valeur d'efficacité d'inhibition à $2 \times \text{IC}_{50}$ n'a pas été mesurée et les composés CT1347 ou QZ59-(RRR), à respectivement 0,22 μM et 1 μM , inhibent ABCB1 avec une efficacité de 60%. Ainsi, dans le cas d'une compétition entre les inhibiteurs, nous devrions avoir une efficacité d'inhibition proche de 120%, ce qui ne peut pas être mesurée, l'efficacité d'inhibition ne dépassant pas 100%, et dans le cas d'une non compétition, nous devrions être inférieures à 120%. Ainsi, le fait que l'efficacité d'inhibition de QZ59-(RRR) + CT1347 s'approche de 100% peut être dû, ou non, à une compétition. Il ne nous est donc pas possible de conclure et de nouveaux tests doivent être réalisés.

Concernant QZ59-(SSS), il n'est pas, non plus, évident de conclure puisque l'efficacité d'inhibition à 2 fois l' IC_{50} de chaque inhibiteur n'a pas été réalisée. Cependant, on note que l'ajout des 2 inhibiteurs semble conduire, ici, à une efficacité d'inhibition proche de 80%. Cette donnée laisse penser que nous sommes en présence d'une inhibition de type non compétitive. Ce résultat est cependant à confirmer par les essais d'inhibition à une concentration de 2 fois l' IC_{50} .

En conclusion, il semblerait que les 3 inhibiteurs, QZ59-(RRR), QZ59-(SSS) et CT1347 se fixent sur des sites distincts les uns des autres. Nous savons que l'inhibiteur CT1347 se fixe ni dans le site R ni dans le site H. Deux hypothèses sont alors possibles : soit il existe 2 autres sites spécifiques des QZ59 sur ABCB1, soit ces inhibiteurs sont compétitifs des substrats. Pour répondre à cette question, nous débutons des études du mécanisme d'inhibition des composés avec différents substrats.

5. Type d'inhibition

Afin de déterminer l'emplacement des sites R et H dans ABCB1, nous souhaitons déterminer le mécanisme d'inhibition de ces inhibiteurs vis-à-vis de 2 substrats : le Hoechst 33342 et la daunorubicine. S'il s'avère qu'un inhibiteur est compétitif d'un substrat testé, cela signifie que les 2 composés se fixent dans le même site, nous permettant alors de déterminer l'emplacement des sites R et H grâce à la structure 3D d'ABCB1 co-cristallisé avec ces 2 inhibiteurs (Aller *et al.*, 2009).

Le protocole utilisé est le même que celui décrit précédemment pour les inhibiteurs peptidomimétiques (partie *Résultats et discussion B.III.4*) L'activité d'efflux d'ABCB1 est mesurée en incubant 10^5 cellules NIH3T3 ou NIH3T3-MDR-G185 avec des concentrations variées en substrat (daunorubicine ou Hoechst 33342) en présence de 4 à 5 concentrations de l'inhibiteur testé. La mesure du taux intracellulaire résiduel de substrat, par cytométrie en flux, dans les cellules exprimant ou non ABCB1 permet de calculer l'activité du transporteur, en soustrayant le taux résiduel de substrat des cellules exprimant ABCB1 du taux total de substrat des cellules n'exprimant pas le transporteur. Ceci correspond à la capacité d'efflux du transporteur et donc à son activité de transport.

Trois types de représentations, tracée par le logiciel SigmaPlot, sont alors utilisés pour déterminer le type d'inhibition et calculer les constantes cinétiques :

- la représentation directe : l'activité de transport de la protéine en fonction de la concentration en substrat. La courbe est tracée selon l'équation de Michaelis et Menten ($V = V_{max}[I]/([I] + K_M)$) où V est l'activité d'efflux de la protéine ; V_{max} l'activité maximale d'efflux d'ABCB1 ; $[I]$ la concentration en inhibiteur ; et K_M la constante de Michaelis ;

- la représentation en double inverse ou représentation de Lineweaver-Burk, qui correspond à l'inverse de l'activité de la protéine en fonction de l'inverse de la concentration en substrat ;

- la représentation de Hanes-Woolf, correspondant au rapport de la concentration en substrat sur l'activité de la protéine en fonction de la concentration en substrat. Cette dernière représentation permet de trancher dans certains cas indécis de compétitivité ou non. Dans ce cas, l'intersection des droites avec l'axe des abscisses correspond au K_M , l'intersection avec les ordonnées correspond à K_M/V_{max} et la pente de la droite représente $1/V_{max}$. Ainsi, dans le cas d'une inhibition de type non compétitive, les droites se croisent sur l'axe des abscisses alors qu'elles sont parallèles dans le cas d'une inhibition compétitive.

Résultats et discussion

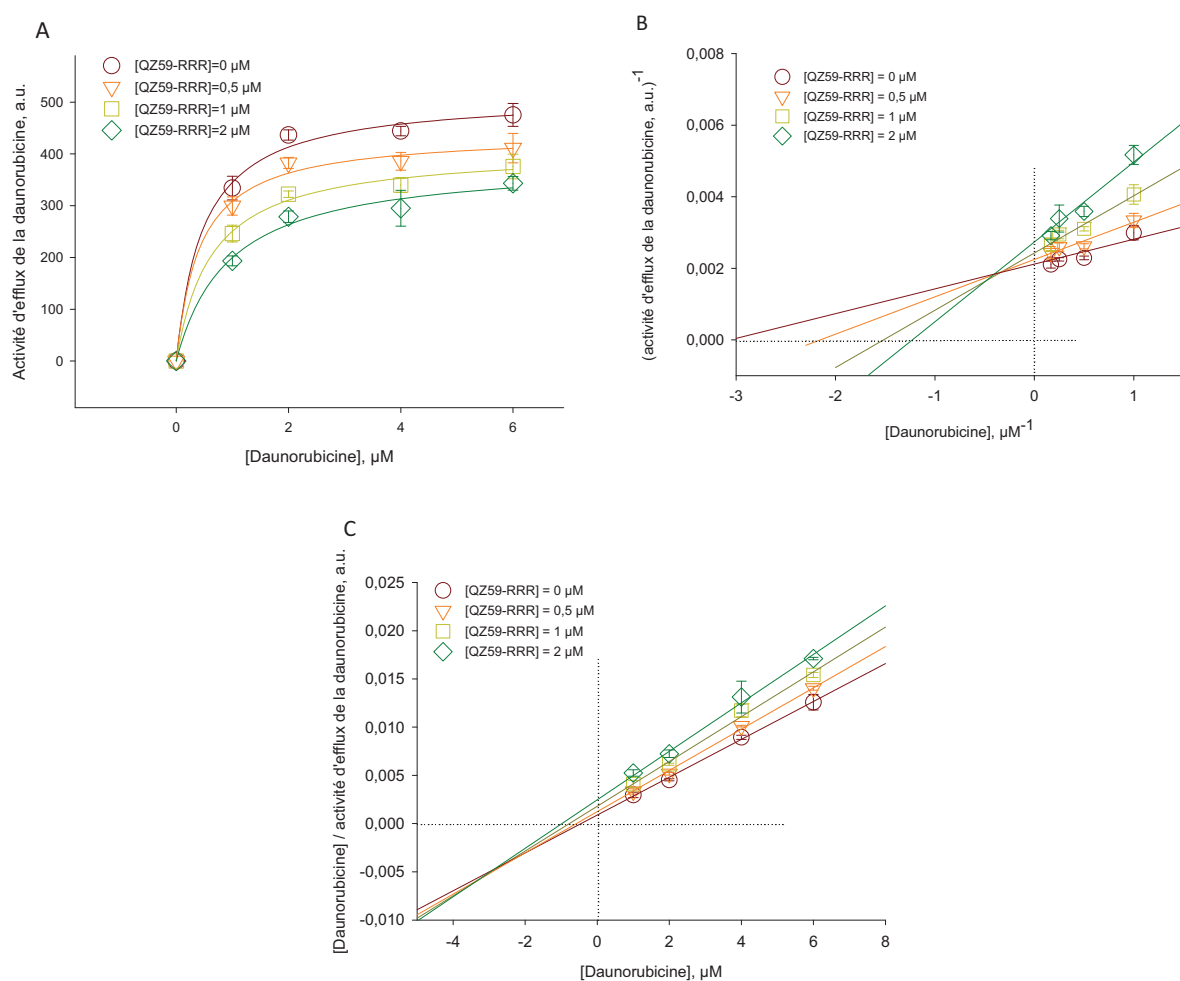


Figure 122 : Mécanisme d'inhibition par le QZ59-(RRR) de l'activité d'efflux de daunorubicine par ABCB1.

QZ59-(RRR) est soit omis (0 μM , cercles Bordeaux), soit ajouté à 0,5 μM (triangles oranges), 1 μM (carrés verts clairs) ou 2 μM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel SigmaPlot avec la représentation de Michaelis et Menten (A), Lineweaver-Burk (B) ou Hanes-Woolf (C). Les expériences ont été réalisées en triplicates.

[QZ59-(RRR)], μM	V_{max}	K_M , μM	K_I , μM
Daunorubicine			
0	513 ± 18	$0,5 \pm 0,1$	
0,5	440 ± 17	$0,4 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$
1	409 ± 19	$0,6 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,3$
2	387 ± 23	$0,9 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,9$

Tableau 36 : Constantes cinétiques du mécanisme d'inhibition du QZ59-(RRR) avec la daunorubicine.

V_{max} correspond à l'activité maximale d'efflux de la daunorubicine par ABCB1 ; K_M est la constante de Michaelis, caractéristique de l'affinité du substrat, K_I est la constante d'inhibition.

5.1. L'inhibiteur QZ59-(RRR)

5.1.1. Mécanisme d'inhibition de l'efflux de daunorubicine

Le premier substrat étudié est la daunorubicine avec une gamme de concentrations allant de 0 à 6 μM . L'inhibiteur QZ59-(RRR) est, quant à lui, testé à 4 concentrations de 0 à 2 μM . Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

La première représentation (Figure 122A) semble indiquer un comportement non compétitif, puisque les courbes semblent atteindre des plateaux différents. Cependant, la représentation de Lineweaver-Burk n'est pas aussi affirmative : les droites ne se coupent pas sur l'axe des abscisses, signe caractéristique d'une inhibition non compétitive, mais entre les axes des abscisses et des ordonnées, signifiant que le K_M et le V_{max} seraient modifiés. Les droites obtenues par la représentation de Hanes-Woolf (Figure 122C) ne sont pas parallèles et se croisent sur l'axe des abscisses aux erreurs expérimentales près, semblant confirmer le mécanisme d'inhibition non compétitif. On remarque cependant que la droite correspondant au QZ59-(RRR) à 2 μM croise l'axe des abscisses en un point différent des autres droites, signifiant que le K_M est ici différent.

Les courbes de la représentation directe sont traitées selon l'équation de Michaelis et Menten, ce qui nous permet d'obtenir les constantes cinétiques, présentées dans le Tableau 36.

Les constantes cinétiques mesurées ici semblent confirmer le mécanisme d'inhibition non compétitif du QZ59-(RRR) avec la daunorubicine. En effet, la vitesse maximale de l'activité d'efflux de daunorubicine diminue avec l'augmentation de la concentration en inhibiteur, tandis que l'affinité du substrat pour la protéine est constante (K_M non modifié avec des concentrations croissantes d'inhibiteur). Cependant, à une concentration plus élevée en inhibiteur (2 μM), le K_M est augmenté, confirmant l'observation faite avec la représentation de Hanes-Woolf. Nous notons également qu'à cette concentration, l'inhibiteur QZ59-(RRR) semble posséder 2 sites de fixation sur ABCB1 (augmentation du K_I). L'inhibiteur n'a pas la même affinité pour les 2 sites de fixation : le 1^{er} site semble être à forte affinité tandis que le 2^{ème} est à plus faible affinité. Il est alors possible que la fixation du QZ59-(RRR) sur son 2^{ème} site diminue l'affinité de la daunorubicine pour son site. Ces 2 sites ne sont pas recouvrant

Résultats et discussion

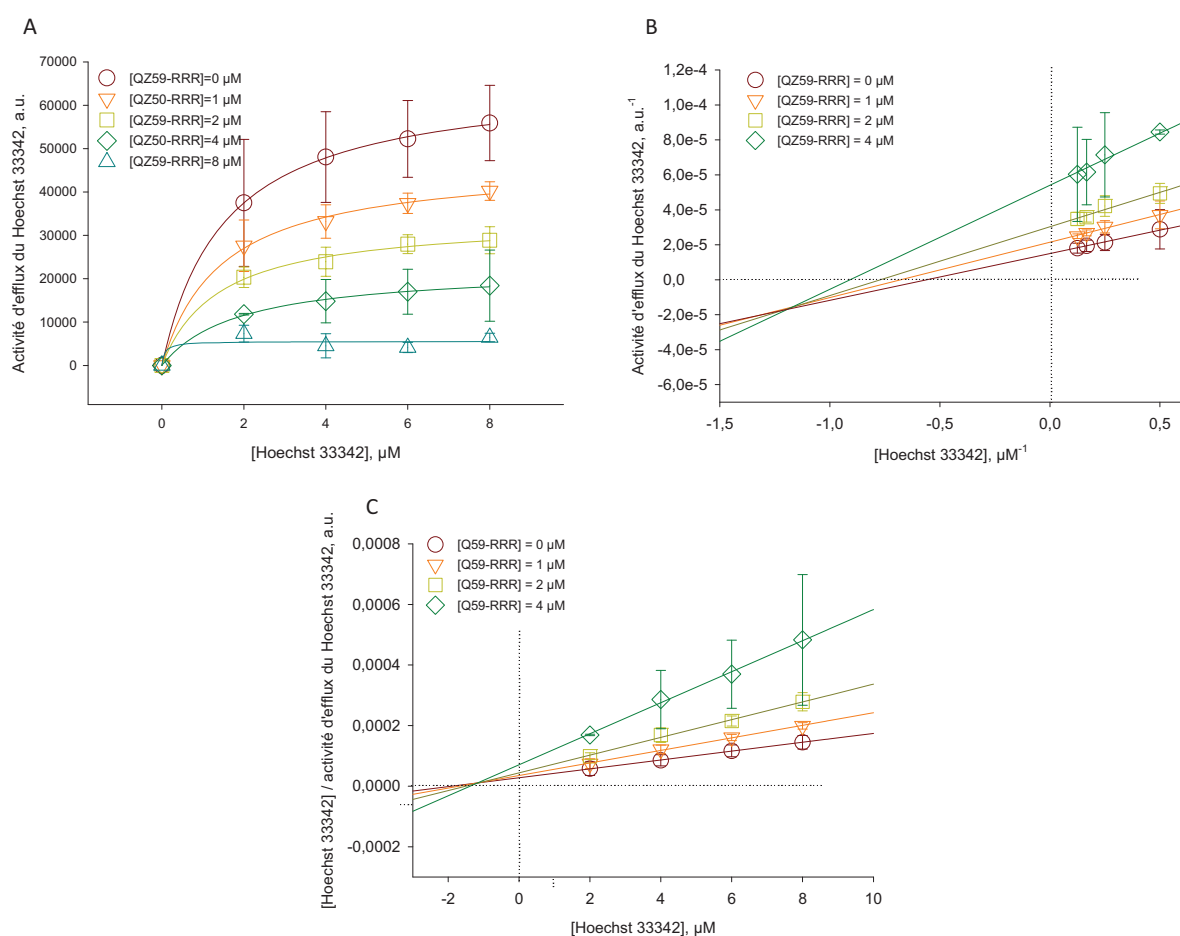


Figure 123 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(RRR) vis-à-vis du Hoechst 33342. QZ59-(RRR) est soit omis (0 μM , cercles Bordeaux), soit ajouté à 1 μM (triangles oranges), 2 μM (carrés verts clairs) ou 4 μM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel SigmaPlot avec la représentation de Michaelis et Menten (A), Lineweaver-Burk (B) ou Hanes–Woolf (C). Les expériences ont été réalisées en triplicats.

[QZ59-(RRR)], μM	$V_{\max}$	$K_M, \mu\text{M}$	$K_I, \mu\text{M}$
Hoechst 33342			
0	$6,6 \text{ e}4 \pm 0,1 \text{ e}4$	$1,5 \pm 0,2$	
1	$4,68 \text{ e}4 \pm 0,2 \text{ e}4$	$1,5 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,3$
2	$3,38 \text{ e}4 \pm 0,2 \text{ e}4$	$1,4 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$
4	$2,2 \text{ e}4 \pm 0,2 \text{ e}4$	$1,9 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,3$

Tableau 37 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342 par le QZ59-(RRR).

Résultats et discussion

puisque le V_{max} varie ; il pourrait alors s'agir d'une inhibition incompétitive avec une coopérativité négative.

Ainsi, cette 1^{ère} étude semble indiquer que le site R et celui du QZ59-(RRR) sont distincts l'un de l'autre dans ABCB1. Il faut cependant noter que l'inhibiteur semble posséder un 2^{ème} site de fixation moins affin que le 1^{er} et qui pourrait être incompétitif avec le site R.

5.1.2. Mécanisme d'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342

Nous avons ensuite étudié l'impact du QZ59-(RRR) sur l'efflux de Hoechst 33342. Les tests ont été réalisés avec une gamme de substrat de 0 à 8 μM et une concentration en inhibiteur comprise entre 0 et 4 μM . Les résultats préliminaires sont présentés sur la Figure 123.

Le mécanisme d'inhibition du QZ59-(RRR) de l'efflux de Hoechst 33342 semble être le même que celui observé avec la daunorubicine : non compétitif. En effet, les courbes tracées selon l'équation de Michaelis et Menten semblent atteindre des plateaux différents selon la concentration en inhibiteur (Figure 123A). Ceci signifie donc que l'activité d'efflux maximale de la protéine varie avec la concentration en inhibiteur, ce qui est caractéristique d'une inhibition non compétitive. Cette variation du V_{max} est retrouvée sur la Figure 123B où les droites semblent se rejoindre au niveau de l'axe des abscisses (aux erreurs expérimentales près), en tout cas, elles ne se croisent certainement pas sur l'axe des ordonnées signifiant donc que le V_{max} est différent. La 3^{ème} représentation (Figure 123C) semble confirmer ces observations : les droites se coupent sur l'axe des abscisses signifiant que le K_M est constant quelle que soit la concentration en inhibiteur, tandis que le V_{max} varie. Les constantes cinétiques sont calculées à partir de la Figure 123A (Tableau 37).

Il apparaît donc que l'activité maximale d'efflux du Hoechst 33342 varie avec la concentration en inhibiteur (V_{max} différent) tandis que l'affinité de la protéine pour le substrat est constante (K_M). Cependant, de la même façon qu'avec la daunorubicine, nous notons une augmentation de l'affinité du Hoechst 33342 pour ABCB1 lorsque 4 μM de QZ59-(RRR) est ajouté (K_M modifié). En tenant compte de l'erreur, le K_I semble relativement constant, ce qui est étonnant puisque les études menées avec la daunorubicine indiquaient que cet inhibiteur possédait au moins 2 sites de fixation sur ABCB1.

Résultats et discussion

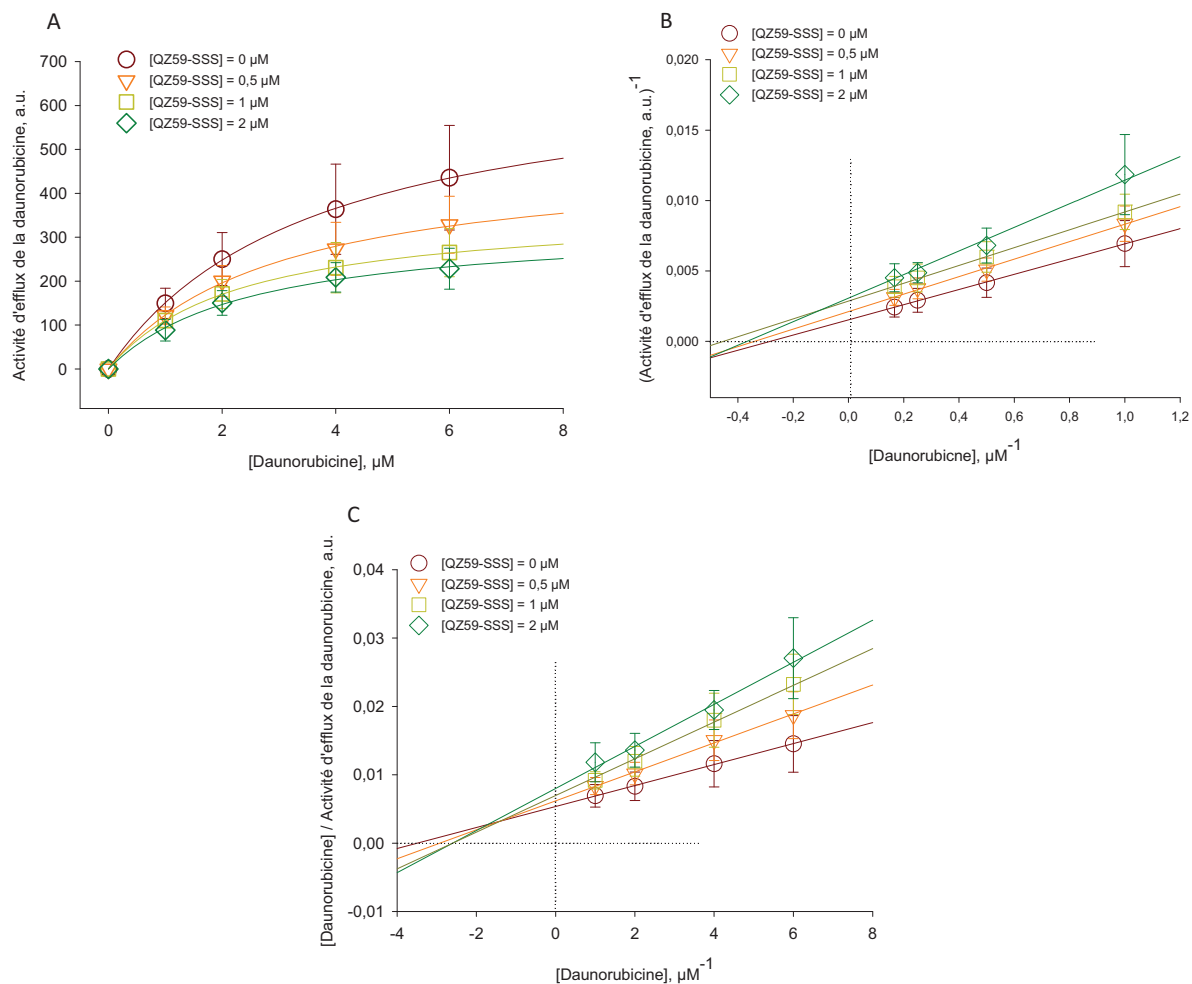


Figure 124 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis de la daunorubicine. QZ59-(SSS) est soit omis (0 μM , cercles Bordeaux), soit ajouté à 0,5 μM (triangles oranges), 1 μM (carrés verts clairs) ou 2 μM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel SigmaPlot avec la représentation de Michaelis et Menten (A), Lineweaver-Burk (B) ou Hanes-Woolf (C). Les expériences ont été réalisées en triplicats.

Résultats et discussion

Les études préliminaires menées avec le QZ59-(RRR) semblent donc indiquer que cet inhibiteur ne se fixe ni dans le site H, ni dans le site R d'ABCB1. Cependant, une question reste en suspend : le QZ59-(RRR) possède-t-il un ou plusieurs sites de fixation sur ABCB1 ? S'il en possède 2, est-il possible que le 2^{ème} soit incompétitif avec le site R ?

Des études supplémentaires devraient, nous l'espérons, nous permettre de répondre à ces questions.

5.2. L'inhibiteur QZ59-(SSS)

La même étude a été initiée avec le QZ59-(SSS) et les différents substrats d'ABCB1, la daunorubicine et le Hoechst 33342. Nous avons également débuté l'étude du mécanisme d'inhibition de l'efflux de bodipy-prazosine par ABCB1. L'étude de ce composé est plus délicate que pour QZ59-(RRR) puisque nous savons qu'il possède 2 sites de fixation sur ABCB1, dont les affinités ne sont pas connues, ce qui complique nos études. En effet, dans le cas où le substrat ne se fixe dans aucun site de fixation du QZ59-(SSS), l'inhibition sera clairement non compétitive mais dans le cas où le substrat se fixe dans un seul des sites de l'inhibiteur, l'inhibition ne sera pas clairement compétitive puisque le 2^{ème} site du QZ59-(SSS) ne sera pas en compétition avec le substrat.

5.2.1. Mécanisme d'inhibition de l'efflux de daunorubicine

De la même façon que pour le QZ59-(RRR), l'activité d'efflux d'ABCB1 a été quantifiée avec différentes concentrations en daunorubicine (de 0 à 6 μ M) et différentes concentrations en inhibiteur (de 0 à 2 μ M). Les 1^{ers} résultats obtenus sont présentés sur les figures ci-contre.

La première représentation (Figure 124A) semble indiquer que les courbes de Michaelis et Menten atteignent des plateaux différents avec des concentrations croissantes en inhibiteur signifiant que le V_{max} varie avec la concentration en inhibiteur. La Figure 124B, nous montre que les droites de la représentation de Lineawer-Burk ne se croisent ni sur l'axe des abscisses, ni sur celui des ordonnées signifiant que le V_{max} et le K_M seraient modifiés. De la même façon, nous notons sur le panel C des figures que ni le K_M ni le V_{max} ne semblent constants puisque les droites ne se croisent pas sur l'axe des abscisses mais ne sont pas pour autant parallèles. Ainsi, l'inhibition n'apparaît ni compétitive, ni non compétitive. Les constantes cinétiques sont présentées dans le tableau suivant.

[QZ59-(SSS)], μM	V_{max}	$K_{\text{M}}, \mu\text{M}$	$K_{\text{i}}, \mu\text{M}$
Daunorubicine			
0	697 ± 17	$3,6 \pm 0,2$	
0,5	486 ± 14	$3,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,01$
1	366 ± 11	$2,3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,01$
2	330 ± 12	$2,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,04$

Tableau 38 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de daunorubicine par le QZ59-(SSS).

Résultats et discussion

Comme nous l'avons observé sur la Figure 124, les K_M et les V_{max} diffèrent selon la concentration en inhibiteur. L'activité maximale d'efflux (V_{max}) diminue lorsque la concentration en inhibiteur augmente, alors qu'au contraire, nous notons une augmentation de l'affinité de la daunorubicine pour ABCB1 avec l'augmentation de la concentration en QZ59-(SSS) jusqu'à 1 μM , (diminution du K_M) puis l'affinité semble stagner à 2 μM . Nous serions alors en présence d'un inhibiteur incompétitif avec une coopérativité positive : la fixation du QZ59-(SSS) sur son site augmente l'affinité du substrat pour son site, distinct de l'inhibiteur. Ce phénomène est le même que celui observé sur la Figure 113 : la fixation d'un substrat sur son site favorise la fixation d'un autre substrat sur un site distinct d'ABCB1. On peut ainsi émettre l'hypothèse qu'il existe également une coopérativité positive entre le site du QZ59-(SSS) et de la daunorubicine.

Ces résultats semblent donc indiquer que l'inhibiteur QZ59-(SSS) ne se fixe pas dans le site de la daunorubicine mais on peut supposer qu'il se fixe soit dans le site H soit dans le site P d'ABCB1, sites entraînant une coopérativité positive avec le site R.

5.2.2. Mécanisme d'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342

Afin de déterminer si le QZ59-(SSS) se fixe dans le site H ou P d'ABCB1, nous commençons une étude du mécanisme d'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342 avec cet inhibiteur.

Résultats et discussion

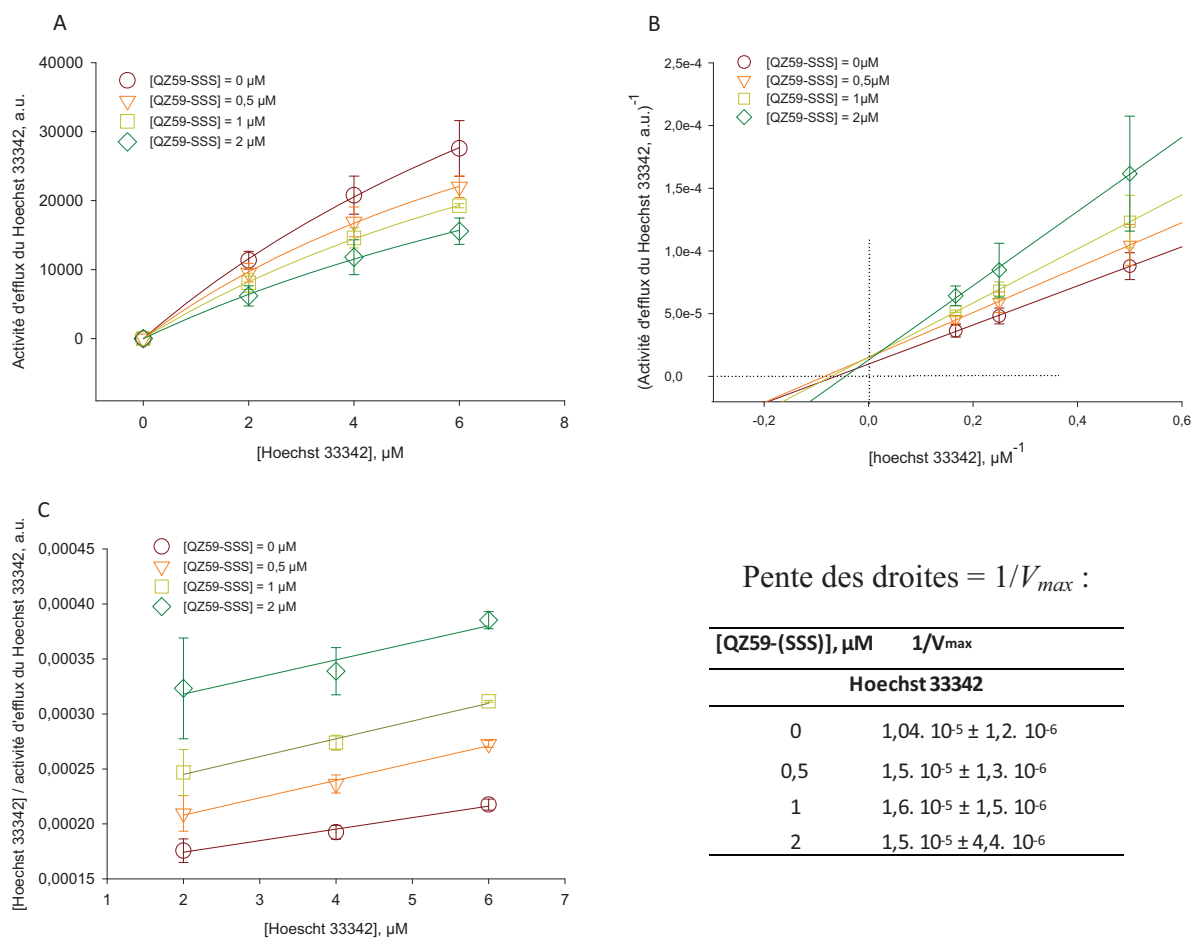


Figure 125 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis du Hoechst 33342 à forte concentration. Le QZ59-(SSS) est ajouté aux mêmes concentrations que sur la Figure 124. Les graphiques sont traités par le logiciel Sigma Plot avec la représentation de Michaelis et Menten (A), Lineweaver-Burk (B) ou Hanes-Woolf (C). Les expériences ont été réalisées en triplicats.

[QZ59-(SSS)], μM	$V_{\max}$	K_M , μM
Hoechst 33342		
0	90769 ± 6823	$13,7 \pm 1,4$
0,5	61419 ± 4656	$10,7 \pm 1,2$
1	59495 ± 5899	$12,5 \pm 1,7$
2	56618 ± 8477	$15,6 \pm 3$

Tableau 39 : Constantes cinétiques de l'inhibition par de fortes concentrations de QZ59-(SSS) de l'efflux du Hoechst 33342.

5.2.2.1. A forte concentration en Hoechst 33342

Nous nous plaçons dans un 1^{er} temps dans la même gamme de concentration que précédemment : le Hoechst 33342 entre 0 et 6 μM et le QZ59-(SSS) entre 0 et 2 μM . Les résultats sont représentés sur la Figure 125.

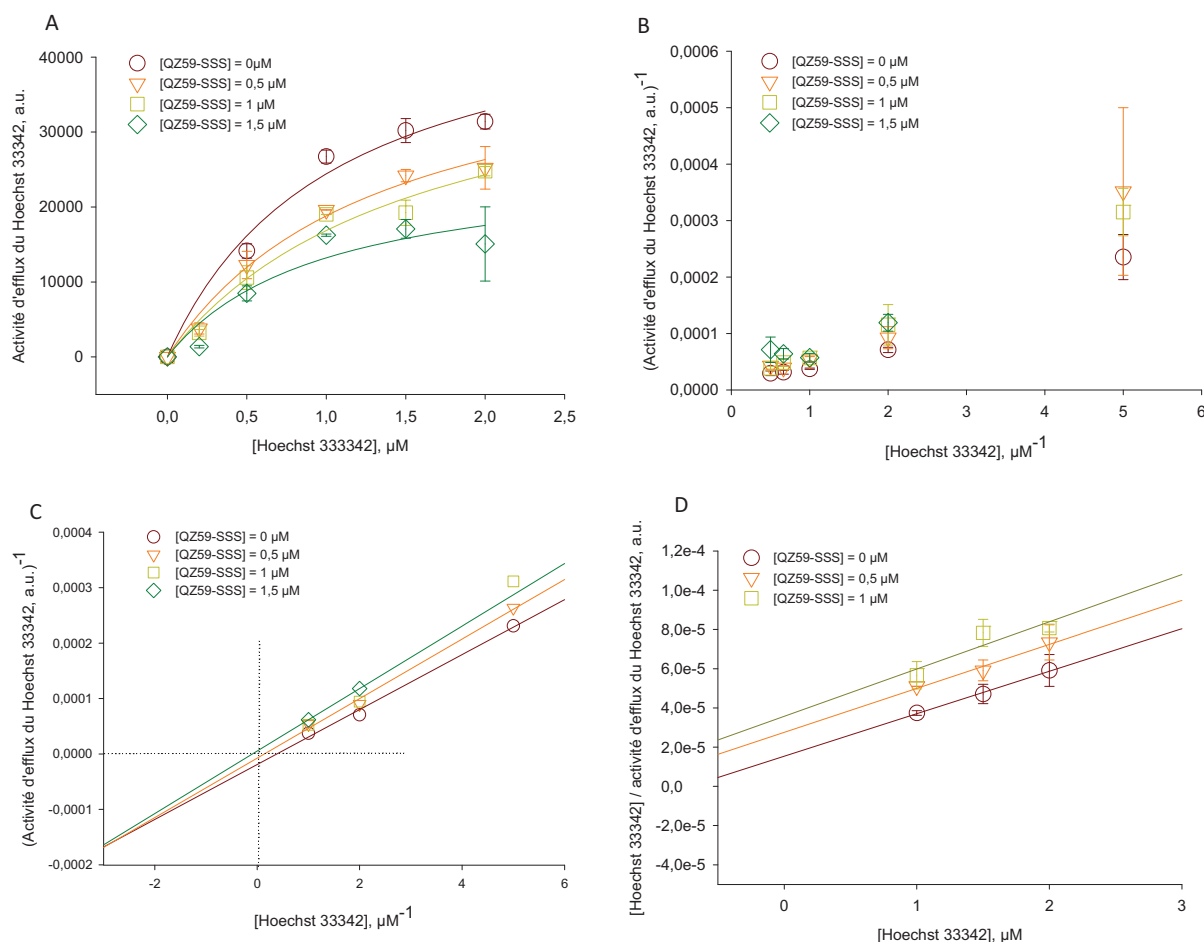
Les 3 types de représentations semblent tous tendre vers une compétitivité entre le Hoechst 33342 et le QZ59-(SSS). En effet, sur le panel A, les courbes n'atteignent pas un plateau mais semblent converger vers un même point ce qui pourrait signifier que le V_{max} ne varie pas avec la concentration en inhibiteur. Ceci est confirmé par le panel B où l'on observe que les droites tracées en doubles inverses se croisent au niveau de l'axe des ordonnées, indiquant que le V_{max} est inchangé quelle que soit la concentration en inhibiteur, alors que le K_M est modifié. Enfin, en calculant les pentes des droites du panel C, correspondant à $1/V_{max}$, hormis pour la droite sans inhibiteur, nous ne notons qu'une faible différence, les V_{max} semblent relativement identiques, à l'erreur expérimentale près. Les constantes cinétiques (Tableau 39) de l'inhibition de l'efflux du Hoechst 33342, semblent confirmer cette hypothèse (hormis pour le cas sans inhibiteur) : le V_{max} reste inchangé et le K_M varie, l'inhibition serait donc de type compétitive.

Ainsi il semblerait, qu'à forte concentration en Hoechst 33342, le QZ59-(SSS) soit compétitif de ce substrat. Ceci sous-entendrait que le Hoechst 33342 se fixe dans le même site que le QZ59-(SSS) sur ABCB1.

5.2.2.2. A faible concentration en Hoechst 33342

Nous savons qu'à forte concentration le Hoechst 33342, comme tous les autres substrats d'ABCB1, peut se fixer sur différents sites. Afin de contrôler que le site en compétition avec le QZ59-(SSS) est bien le site préférentiel du Hoechst, nous réalisons les mêmes tests à faible concentration en substrat. La gamme de concentrations est alors de 0 à 2 μM et la Figure 126 présente les résultats obtenus.

Résultats et discussion



pentés des courbes du panel D :

[QZ59-(SSS)], μM	$1/V_{\text{max}}$
Hoechst 33342	
0	$2,17 \cdot 10^{-5} \pm 1,36 \cdot 10^{-6}$
0,5	$2,24 \cdot 10^{-5} \pm 3,62 \cdot 10^{-6}$
1	$2,41 \cdot 10^{-5} \pm 1,11 \cdot 10^{-6}$

Figure 126 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis du Hoechst 33342 à faible concentration. Le QZ59-(SSS) est soit omis (0 μM , cercles Bordeaux), soit ajouté à 0,5 μM (triangles oranges), 1 μM (carrés verts clairs) ou 1,5 μM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel Sigma Plot avec la représentation de Michaelis et Menten (A), Lineweaver-Burk (B et C) ou Hanes–Woolf (D). Les expériences ont été réalisées en triplicates.

[QZ59-(SSS)], μM	V_{max}	$K_M, \mu\text{M}$
Hoechst 33342		
0	49904 ± 8067	$1,04 \pm 0,38$
0,5	43840 ± 9229	$1,33 \pm 0,56$
1	43432 ± 11498	$1,58 \pm 0,78$
1,5	26056 ± 6563	$0,97 \pm 0,55$

Tableau 40 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de Hoechst 33342 par de faibles concentrations de QZ59-(SSS).

Les résultats obtenus avec ces figures ne sont pas aussi concluants que précédemment. La représentation directe, sur le panel A, semble indiquer que la compétition a lieu pour des faibles concentrations en inhibiteur (jusqu'à 1 μM). En effet, les courbes de Michaelis et Menten obtenues pour des concentrations en inhibiteur de 0, 0,5 et 1 μM semblent converger vers un même point, signifiant que le V_{max} ne serait pas modifié par l'ajout d'inhibiteur, alors que la courbe obtenue avec 1,5 μM d'inhibiteur atteint un plateau différent.

Les données traitées en doubles inverses ne correspondent pas à des droites, comme on peut le voir sur la Figure 126B. Il semble y avoir 2 effets : un effet observé entre 0 et 1 μM de Hoechst 33342, et un effet pour des concentrations supérieures à 1 μM . Si l'on ne s'intéresse qu'aux valeurs entre 1 et 2 μM , on remarque que les droites obtenues ne se croisent ni sur l'axe des abscisses ni sur celui des ordonnées (panel C). Ainsi, le V_{max} et le K_M seraient modifiés. Par contre, avec la représentation de Hanes–Woolf, on remarque que les droites sont parallèles (panel D), la pente des courbes ne varie pas ce qui signifie que le V_{max} ne serait pas modifié en fonction de la concentration en inhibiteur.

Les valeurs cinétiques de cette inhibition (Tableau 40) montrent 2 effets du QZ59-(SSS) sur l'inhibition de l'efflux du Hoechst 33342. Le premier, pour des concentrations en inhibiteur inférieures à 1 μM , semble indiquer une inhibition compétitive : à l'erreur expérimentale près, le V_{max} est identique tandis que l'affinité du substrat pour la protéine augmente (K_M). Le deuxième effet, observé à plus de 1 μM , montre une variation du V_{max} et du K_M , et semble donc indiquer que nous sommes en présence d'un inhibiteur incompétitif avec une coopérativité positive. L'hypothèse que nous formulons est que le 1^{er} site de fixation du QZ59-(SSS) est plus affin pour l'inhibiteur et est compétitif du Hoechst 33342. Lorsqu'on augmente la concentration en inhibiteur (à plus de 1 μM), il se fixerait sur son 2^{ème} site qui, lui, n'est pas compétitif du Hoechst 33342. Le QZ59-(SSS) étant à cette concentration capable de se fixer sur ses 2 sites, il libère le site H, provoquant une augmentation de l'affinité du Hoechst 33342 pour son site, alors libre (diminution du K_M).

Cependant, les résultats ne sont pas nets et sont donc sujets à discussions. De nouveaux tests doivent être réalisés afin de conclure définitivement sur ces types d'inhibition.

Ainsi, nous n'avons pas clairement mis en évidence l'inhibition compétitive du Hoechst 33342 avec le QZ59-(SSS). Il semblerait que l'inhibition soit effectivement compétitive à

Résultats et discussion

forte concentration en Hoechst 33342. Cependant, à faible concentration, il est difficile de conclure sur les résultats. L'inhibition tend à être compétitive mais rien n'est très concluant.

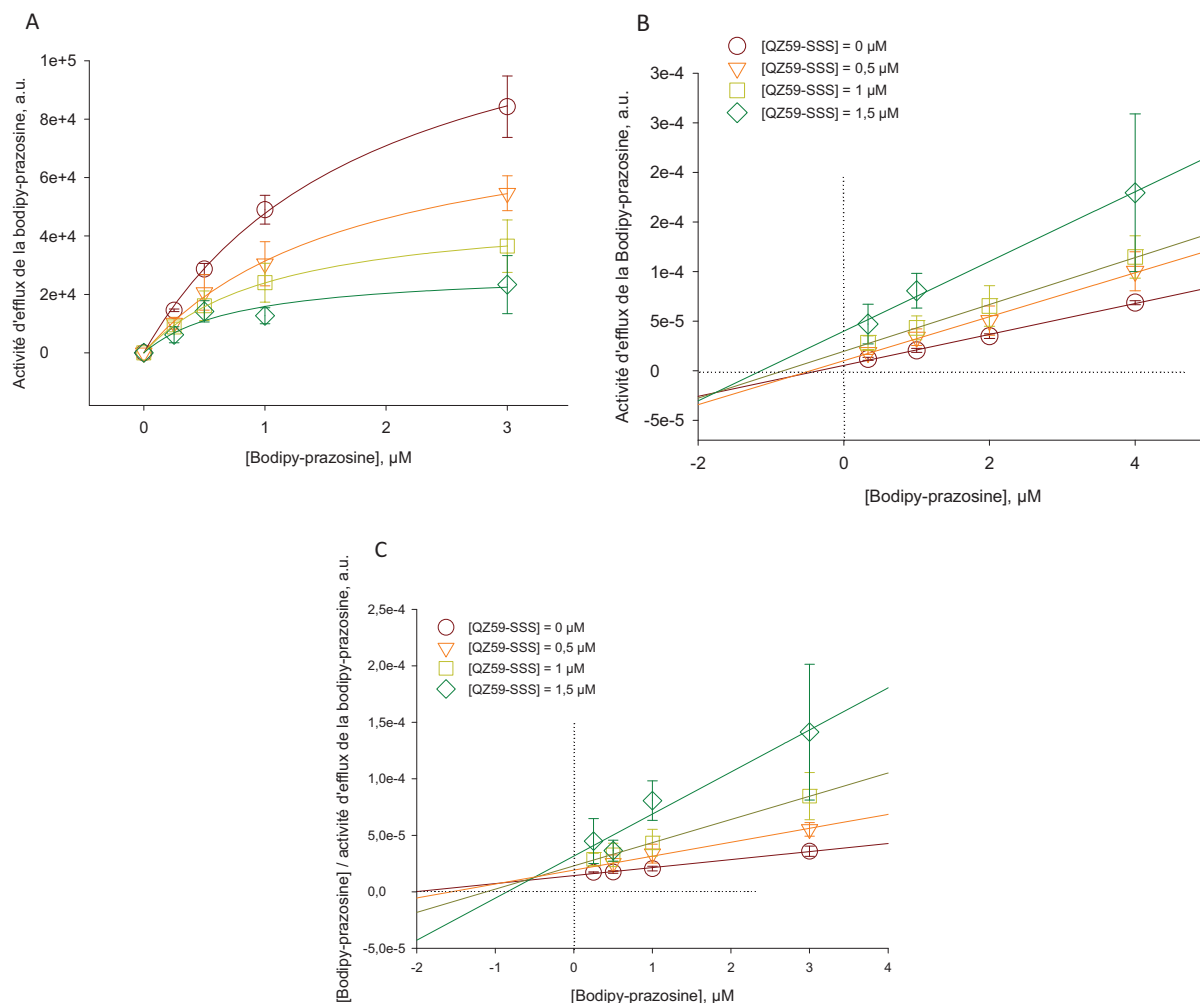


Figure 127 : Mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) vis-à-vis de la bodipy-prazosine.
Le QZ59-(SSS) est soit omis (0 µM, cercles Bordeaux), soit ajouté à 0,5 µM (triangles oranges), 1 µM (carrés verts clairs) ou 1,5 µM (losanges verts). Les graphiques sont traités par le logiciel Sigma Plot avec la représentation de Michaelis et Menten (A), Lineweaver-Burk (B) ou Hanes-Woolf (C). Les expériences ont été réalisées en triplicats.

[QZ59-(SSS)], µM	V_{max}	K_M , µM
Bodipy-prazosine		
0	136052 ± 8664	$2,3 \pm 0,3$
0,5	109094 ± 16580	$3,7 \pm 0,9$
1	46595 ± 6841	$1,9 \pm 0,5$
1,5	20281 ± 4460	$1,2 \pm 0,5$

Tableau 41 : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'efflux de bodipy-prazosine par le QZ59-(SSS).

5.2.3. Mécanisme d'inhibition de l'efflux de prazosine

Nous avons ensuite étudié l'impact du QZ59-(SSS) sur l'efflux de bodipy-prazosine, substrat d'ABCB1 analogue de la prazosine et se fixant donc dans le site P de la protéine. Les tests ont été effectués avec une gamme de substrat allant de 0 à 3 μM et une concentration en inhibiteur comprise entre 0 et 2 μM . Les résultats préliminaires sont présentés sur la Figure 127.

Les courbes de la Figure 127A tendent vers des plateaux différents ce qui signifie que le V_{max} varie. Le même effet est observé sur les Figure 127B et C : les droites du 1^{er} panel ne se croisent pas au niveau de l'axe des ordonnées et, concernant le dernier panel, les droites possèdent des pentes différentes. Les 3 observations indiquent que l'activité maximale d'efflux du substrat est modifiée selon la concentration en QZ59-(SSS), et donc que l'inhibition n'est certainement pas compétitive. Cependant, elle n'est pas non plus non compétitive puisque le K_M varie également en fonction de la concentration en inhibiteur : les droites des Figure 127B et C ne se croisent pas sur l'axe des abscisses. Les variations du V_{max} et du K_M sont retrouvées dans le Tableau 41, où les constantes cinétiques de l'inhibition sont présentées (calculées à l'aide de la représentation directe). Ainsi, de la même façon que pour la daunorubicine, le mécanisme d'inhibition par le QZ59-(SSS) de l'efflux de bodipy-prazosine semble non compétitif mais avec une coopérativité positive. En effet, plus l'inhibiteur est présent à forte concentration, plus l'affinité du substrat pour sa cible augmente (diminution du K_M) favorisant ainsi sa fixation.

Ainsi cette étude préliminaire semblerait indiquer que le QZ59-(SSS) se fixe dans le site du Hoechst 33342. Nous avons en effet trouvé une inhibition compétitive entre ces 2 molécules. De plus, les coopérativités positives observées avec la daunorubicine et la bodipy-prazosine renforce cette hypothèse. Cette coopérativité est en effet retrouvée entre le Hoechst 33342 et ces 2 substrats, on peut donc imaginer qu'un composé se fixant dans le site H aura le même effet sur les 2 autres sites de fixation. Une simulation de docking devrait nous permettre de positionner le site H dans la structure 3D d'ABCB1.

Cette étude, qui, nous l'espérons, permettra à terme de positionner les sites R et H dans ABCB1 grâce aux 2 énantiomères QZ59 a été débutée il y a peu. Les résultats présentés ici ne

Résultats et discussion

sont donc que préliminaires et doivent bien évidemment être confirmés. Les études d'additivités d'efficacité d'inhibition de l'efflux de daunorubicine doivent, notamment, être améliorées par une mesure de l'efficacité d'inhibition à 2 fois l'IC₅₀ de chaque inhibiteur. Ceci nous permettra peut être de conclure plus précisément. Nous devons également approfondir le mécanisme d'inhibition du QZ59-(SSS) avec de faibles concentrations en Hoechst 33342. Les résultats suggèrent une compétition mais ne sont pas assez précis pour conclure de manière définitive. De plus, nous avons débuté de nouveaux tests d'additivité avec des inhibiteurs dont la fixation est connue sur ABCB1 : le vérapamil qui se fixe préférentiellement au site H (Shapiro et Ling., 1997) et le XR9576 (ou Tariquidar) qui se fixe également dans le site H d'ABCB1 (Martin *et al.*, 2000).

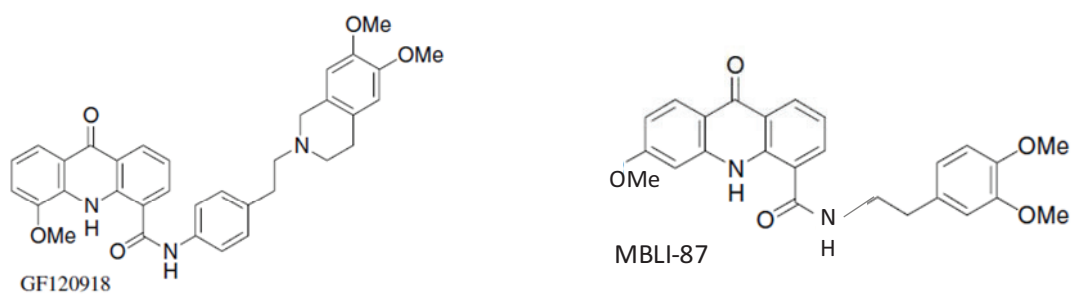


Figure 128 : Structures du GF120918 et du MBLI-87, son analogue structural.

IV. Autres tests

1. Tests *in vivo* de l'inhibiteur MBLI-87

1.1. Rappels (publiés dans Boumendjel et al., 2007)

Le composé testé est le MBLI-87, (Figure 128). C'est un analogue du GF120918 (Figure 128) qui est un inhibiteur puissant d'ABCG2 (IC_{50} de 0,41 μ M) mais également d'ABCB1 (IC_{50} de 40 nM). Les acridones sont des alcaloïdes naturels considérés comme des aza-analogues des xanthones (Michael, 2005).

Le MBLI-87 a été testé *in vitro* en 2007 au laboratoire (Boumendjel *et al.*, 2007). Il est synthétisé par le Dr Boumendjel et son équipe à la Faculté de Pharmacie de l'Université Joseph Fourier de Grenoble.

Le MBLI-87 est un peu moins efficace que l'inhibiteur de référence, ici le GF120918. Il inhibe l'efflux de mitoxantrone par ABCG2 avec une IC_{50} , soit une concentration de demi-inhibition, de l'ordre de 1,38 μ M. Ce composé, contrairement au GF120918, est inefficace sur ABCB1 et ABCC1 et est donc spécifique d'ABCG2. Enfin, il a été montré que le MBLI-87 et d'autres dérivés des acridones avaient un mécanisme d'inhibition différent de celui du GF120918. En effet, ce dernier entraîne une nette diminution de l'activité d'hydrolyse d'ATP, déjà observable à faible concentration. Le MBLI-87 et ses dérivés, au contraire, ne modifient pas cette activité d'hydrolyse d'ATP, même à 10 μ M. Ces tests ont été effectués par Sira Macalou, dans le cadre de son doctorat au laboratoire.

1.2. Tests *in vitro* supplémentaires

1.2.1. Modulation de l'efflux de l'irinotécan par ABCG2

L'efficacité du MBLI-87 a été démontrée en mesurant sa capacité à inhiber l'efflux de mitoxantrone *in vitro*. Les tests *in vivo* sont réalisés, en même temps que les tests de réversion par le composé CT1364. Nous utilisons donc l'irinotécan comme agent anticancéreux et substrat d'ABCG2, et le géfitinib comme inhibiteur témoin positif. Il est donc nécessaire de démontrer que le MBLI-87 est aussi efficace à inhiber l'efflux d'irinotécan *in vitro*. Ces tests ont donc été réalisés sur les cellules HEK-293 pcDNA3.1 et HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 R482, qui seront par la suite xénotreffées aux souris. Nous avons utilisé le GF120918

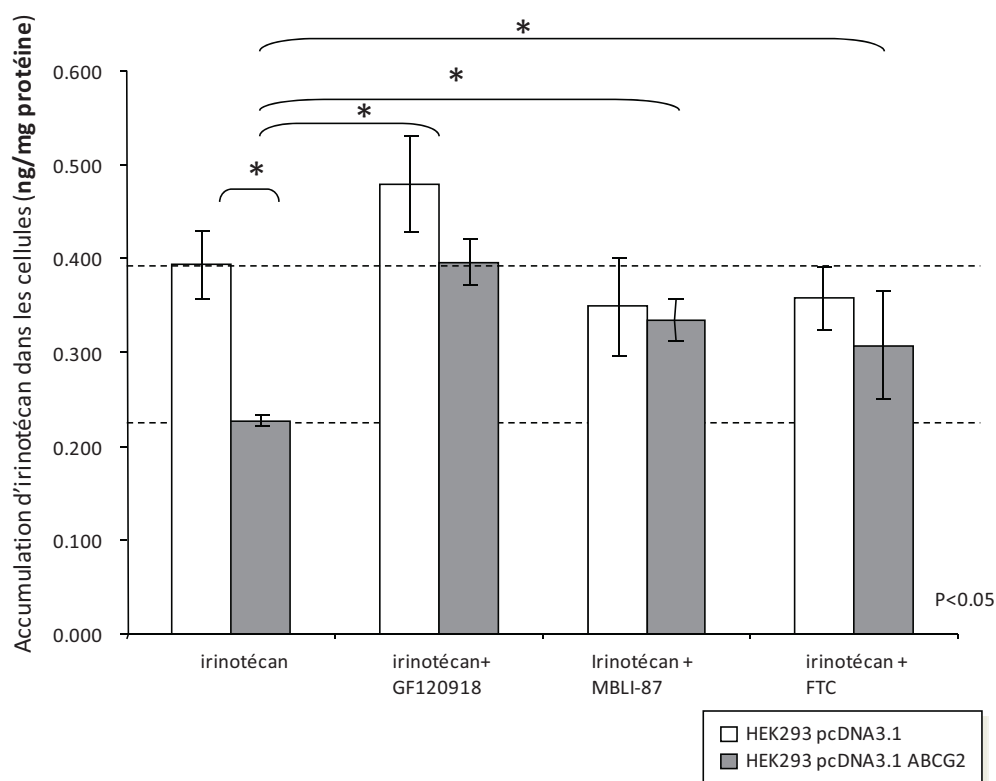


Figure 129 : Mesure de l'accumulation d'irinotécan dans les cellules exprimant ou non ABCG2 en présence ou en absence de 5 μ M de MBLI-87, 5 μ M de GF120918 ou 10 μ M de fumitrémorgine C.

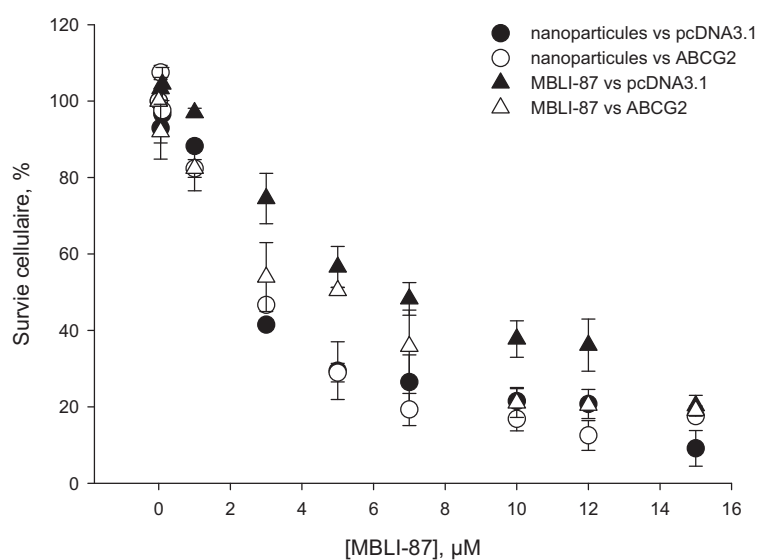


Figure 130 : Cytotoxicité des nanoparticules seules et du MBLI-87 formulé dans les nanoparticules. Les cercles représentent la cytotoxicité des nanoparticules et les triangles la cytotoxicité du MBLI-87 dans les nanoparticules. En noir, nous trouvons les effets sur les cellules contrôles HEK-293-pcDNA3.1 et en blanc les effets sur les cellules exprimant ABCG2

Résultats et discussion

et la fumitrimorgine C, aux concentrations respectives de 5 μM et 10 μM , comme témoins lors de ce test *in vitro*. La quantité d'irinotécan présente dans les cellules a été mesurée par HPLC MS/MS et rapportée à la quantité de protéines de chaque essai.

Comme présenté en Figure 129, l'irinotécan est environ 1,7 fois moins présent dans les cellules exprimant ABCG2 que dans les cellules témoins. Dans les cellules surexprimant ABCG2, l'accumulation de l'irinotécan est augmentée lorsqu'on ajoute des modulateurs d'ABCG2 (5 μM de GF120918, 10 μM de FTC ou 5 μM de MBLI-87) tandis que ces modulateurs non pas d'effets sur les cellules contrôles. Ceci démontre bien que le MBLI-87 est un puissant inhibiteur d'ABCG2, capable d'augmenter l'accumulation d'irinotécan dans les cellules surexprimant cette protéine.

1.2.2. Cytotoxicité de la formulation

Jusqu'à présent, le MBLI-87 est préparé sous forme de poudre sèche, dissoute dans du DMSO. Cette forme n'est pas administrable aux souris. Il a donc été nécessaire de formuler ce produit sous une forme administrable, ce qui a été réalisé par le Dr. A. Gèze de la Faculté de Pharmacie de l'Université Joseph Fourier de Grenoble. Comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*, le MBLI-87 est administré par voie intrapéritonéale sous forme d'une suspension colloïdale de nanoparticules. La concentration de MBLI-87 est de 0,16 mg/ml et est il administré aux souris à la dose de 2,4 mg/Kg. La cytotoxicité de cette formulation a été testée *in vitro*, sur le même modèle cellulaire.

Les acridones sont des composés relativement peu toxiques. Ici la cytotoxicité observée est due à la formulation dans les nanoparticules. En effet, la cytotoxicité du MBLI-87 dans les nanoparticules est proche de celle des nanoparticules seules. L' IC_{50} de cette formulation est d'environ 4 μM de MBLI-87. Le 2^{ème} point intéressant est que les nanoparticules ou le MBLI-87 ne sont pas transportés par ABCG2. Dans le cas contraire, leur cytotoxicité aurait été moins élevée pour les cellules exprimant ABCG2. Ceci est un point essentiel pour le développement d'un inhibiteur des transporteurs ABC puisque les tumeurs exprimant ABCG2 ne développeront pas de résistance à cet inhibiteur en le transportant.

1.3. Tests in vivo

Les tests in vivo ont été réalisés en même temps que ceux du CT1364. Le protocole, les produits et les contrôles sont donc les mêmes que ceux détaillés précédemment.

1.3.1. Toxicité

La 1^{ère} étape des tests *in vivo* a été de tester la toxicité de ces molécules afin de déterminer la concentration à laquelle elles pourraient être administrées. Les tests sont effectués comme décrit dans le paragraphe II.4.5.2 de la partie *Résultats et discussion*. L'irinotécan est injecté en IP à la dose de 30 mg/Kg, 3 fois par semaine. Le Géfitinib est, quant à lui toxique, et est administré par gavage aux souris, 3 fois par semaine à la dose de 75 mg/Kg, dose peu toxique et efficace.

Le MBLI-87 est préparé à sa concentration maximale de solubilité dans les nanoparticules (0,16 mg/ml). Les recommandations du conseil d'éthique fixent le volume maximal d'injection en IP à 300 µl. Deux doses sont testées en co-injection avec l'irinotécan. A ces doses, nous n'observons pas de toxicité chez les souris. Elles présentent une excitation plus importante après 10 jours d'injection mais cet effet est aboli par l'arrêt des injections. L'excitation étant observée chez les souris traitées par MBLI-87 ou NANO seul, elle est donc attribuée à la formulation et non pas au principe actif.

La dose d'injection retenue est donc de 2,4 mg/Kg soit 300 µl en IP, 5 fois par semaine.

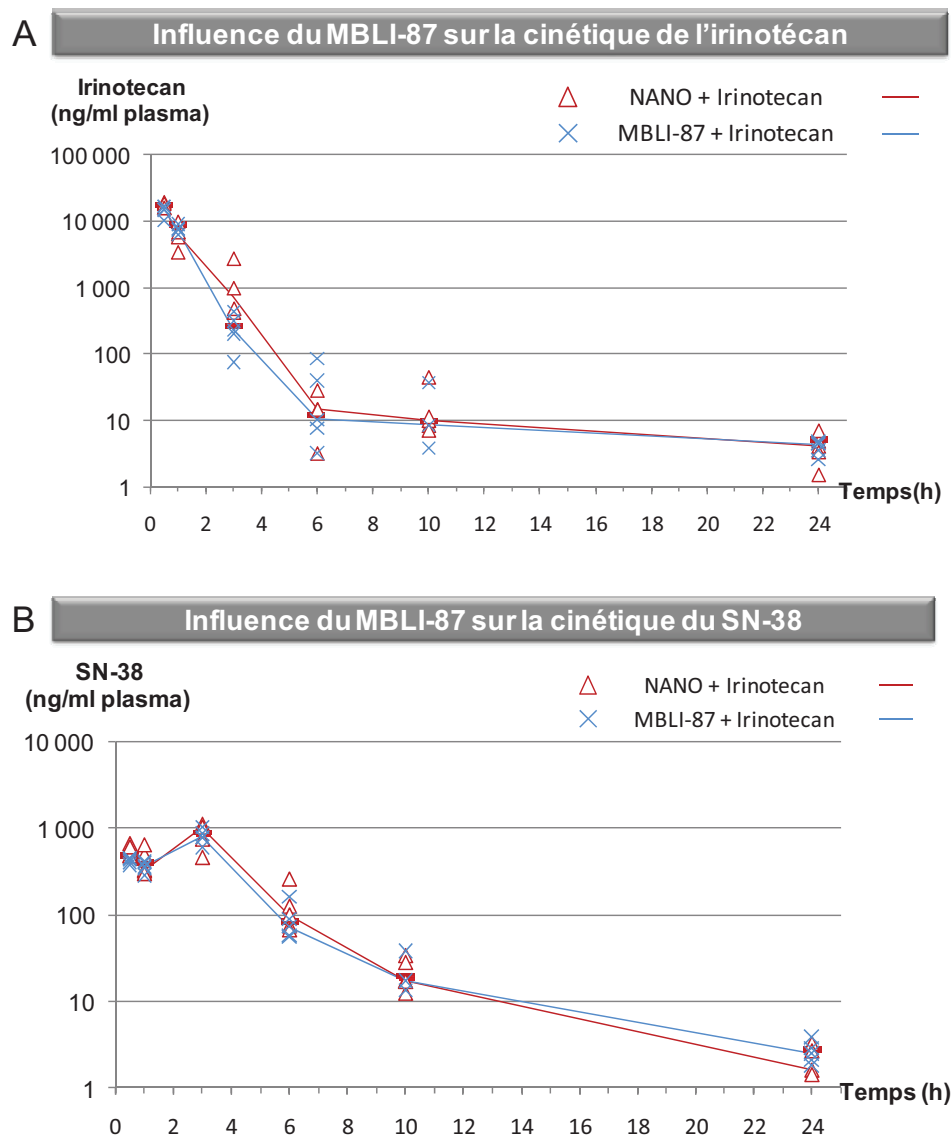


Figure 131 : Représentation de la concentration plasmatique d'irinotécan et de SN-38 en fonction du temps.

La quantification des 2 composés a été faite par HPLC-MS/MS. La concentration d'irinotécan (A) ou de SN-38 (B) de chaque souris (5 souris par condition) est montrée en présence (croix bleue) ou en absence (triangle rouge) de MBLI-87 en fonction du temps. Les valeurs moyennes sont représentées par une ligne rouge (sans MBLI-87) ou bleue (MBLI-87).

1.3.2. Pharmacocinétique

Un des problèmes fréquemment rencontrés avec les inhibiteurs des transporteurs ABC est la modulation des paramètres pharmacocinétiques des agents anticancéreux. Les inhibiteurs peuvent agir avec le cytochrome P450, directement avec l'agent anticancéreux ou par le biais d'autres mécanismes (Relling *et al.*, 1996). De plus, ABCG2 étant exprimé physiologiquement dans de nombreux tissus, sa modulation peut modifier la distribution de l'irinotécan dans l'organisme. Il est donc indispensable de contrôler si notre inhibiteur, le MBLI-87, modifie la pharmacocinétique de l'agent anticancéreux, ici l'irinotécan.

Pour cela, nous avons quantifié la concentration plasmatique d'irinotécan et de son métabolite, le SN-38 chez des souris, après une co-injection en IP d'irinotécan (20 mg/Kg) avec le MBLI-87 (3,45 mg/Kg) ou les nanoparticules seules.

Dans ces conditions, la concentration d'irinotécan diminue en 2 temps (Figure 131A). Elles sont très élevées à 30 min, diminuent rapidement après 3 h d'exposition mais restent détectables 24 h après l'injection. Le SN-38, métabolite actif de l'irinotécan, a un pic de concentration 3 h après l'injection d'irinotécan. Ceci correspond au délai nécessaire à sa métabolisation. Elle diminue ensuite rapidement mais reste détectable après 24 h d'injection d'irinotécan (Figure 131B). Le point intéressant est que la cinétique de ces 2 composés n'est pas modifiée par le MBLI-87. On peut donc conclure que notre inhibiteur n'a pas d'effets ni sur la cinétique de l'irinotécan, ni sur celle du SN-38, et on peut donc supposer qu'il n'interférera pas dans leur toxicité. De telles caractéristiques sont très importantes et ceci nous encourage à poursuivre les tests avec ce composé.

1.3.3. Réversion du phénotype MDR

Afin d'évaluer la capacité du MBLI-87 à abolir la chimiorésistance, les souris sont soumises à 2 cycles de thérapie : elles sont traitées avec l'irinotécan (30 mg/Kg, 3 fois/semaine en IP) en combinaison avec le MBLI-87 (2,4 mg/Kg, 5 fois/semaine en IP) ou avec le véhicule de ce composé, les nanoparticules (300 µl, 5 fois/semaine en IP). Le traitement débute le jour suivant l'implantation des cellules. Comme expliqué précédemment, le premier cycle de thérapie (jours 1 à 15) évite les variations de diffusion de l'irinotécan dans les tumeurs (tumeurs de petites tailles et pas entièrement établies dans les tissus) tandis que le 2^{ème} cycle (jours 30 à 44) permet de voir l'effet de l'inhibiteur sur les tumeurs bien définies.

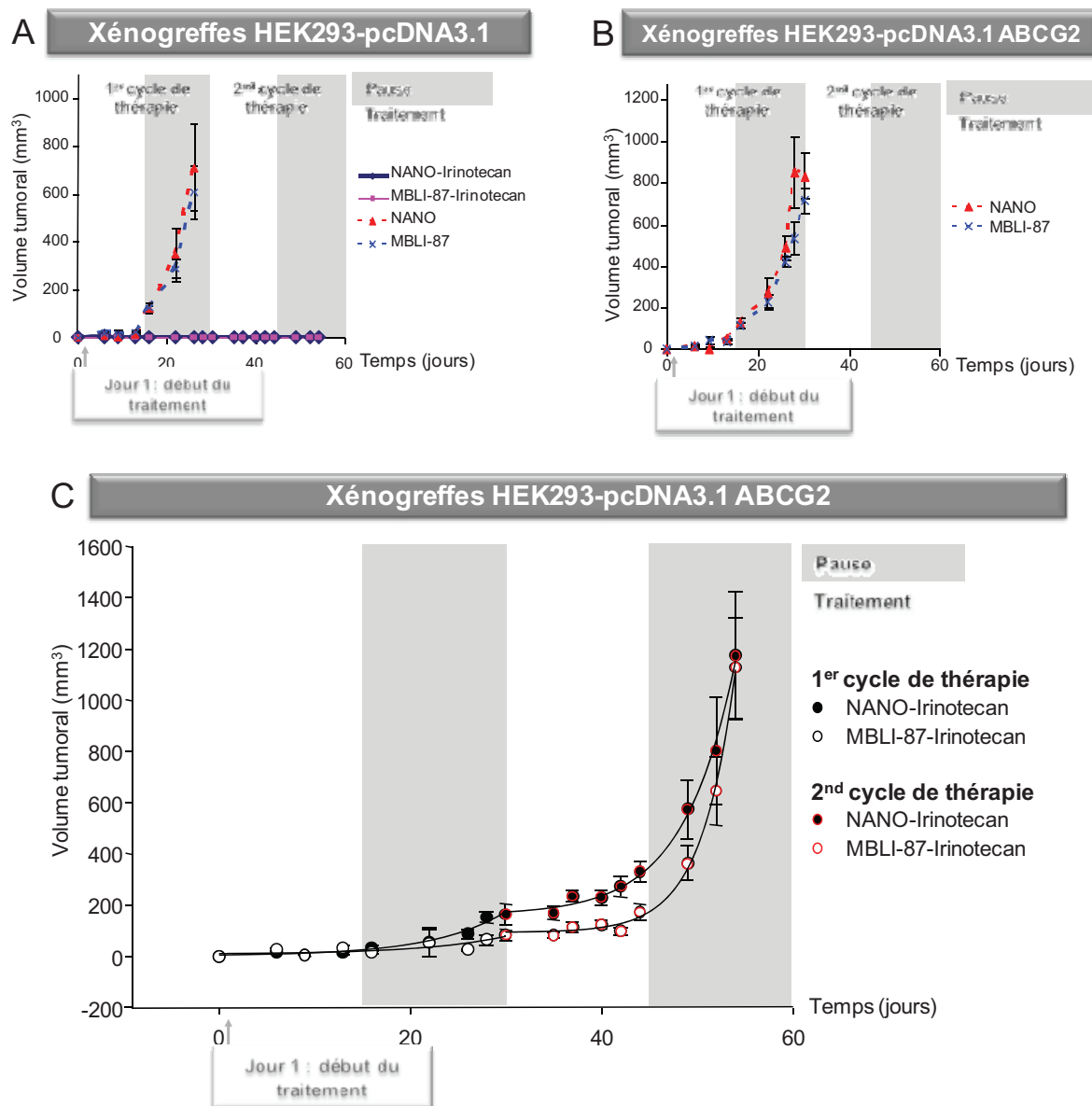


Figure 132 : Activité du MBLI-87, des nanoparticules et de l'irinotécan, seuls ou en combinaison, sur les xénogreffes exprimant ou non ABCG2.

A et B : Les données de chaque période sont moyennées. Les différences avec un $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives entre 2 groupes de tumeurs (1 groupe (N) contient 6 tumeurs).

C : Les souris sont traitées avec des nanoparticules ou du MBLI-87, en combinaison avec l'irinotécan. Les données de chaque période sont moyennées (N=6 pour les nanoparticules et N=5 pour le MBLI-87) et les erreurs standards sont représentées.

Résultats et discussion

Les xénogreffes contrôles, HEK-293 pcDNA3.1 traitées avec les nanoparticules ont une croissance rapide et atteignent leur volume maximal en 28 jours, nous obligeant à sacrifier les souris. Au contraire, ces mêmes tumeurs traitées en combinaison avec l'irinotécan ne se développent pas, même 8 semaines après la fin du traitement (Figure 132A). Le MBLI-87 n'affecte pas la croissance des tumeurs exprimant (Figure 132B) ou non ABCG2 (Figure 132A) par comparaison aux tumeurs contrôles traitées par les nanoparticules. Comparé à son effet sur les xénogreffes HEK-293 pcDNA3.1, le traitement avec l'irinotécan retarde la croissance des xénogreffes exprimant ABCG2 d'environ 10 jours (Figure 132C versus Figure 132B).

Nous observons une inhibition par le MBLI-87 de la résistance à l'irinotécan pour les xénogreffes exprimant ABCG2 au cours du 2nd cycle de thérapie, entre les jours 30 et 54 (Figure 132C). La croissance des tumeurs exprimant ABCG2 est retardée lors de la co-administration irinotécan-MBLI-87, par comparaison avec celles traitées par le cocktail irinotécan-nanoparticules. Ceci est observable dès la 1^{ère} période de pause, et pendant le 2nd cycle de traitement. Les données globales de la série du MBLI-87 sont significativement plus faibles que celles de la série des nanoparticules ($p < 0,001$).

Une analyse cinétique permet de mieux observer cette différence. Les points de la Figure 132C sont reliés par une courbe en 2 parties, correspondant aux 2 cycles de thérapie, avec une courbe d'équation $y = y_0 + a \times \exp(b \times t)$ où y_0+1 est la taille calculée à $t=0$, a est 1,71828 fois l'augmentation de la taille au même temps que $1/b$ et b est la croissance des tumeurs. Nous n'observons pas de différences dans les courbes entre les jours 1 à 30 ($p=0,115$) mais une différence significative apparaît au cours de la pause (jour 16 à 30) ($p=0,039$). Le taux de croissance des xénogreffes durant le second cycle de thérapie (jours 30 à 44) est significativement plus lent pour celles traitées avec la combinaison irinotécan-MBLI-87, par comparaison avec celle traitées par irinotécan-nanoparticules. Cependant, la croissance des tumeurs s'accélère à l'arrêt du 2nd traitement et cette accélération est plus importante pour les tumeurs traitées avec le cocktail irinotécan-MBLI-87 (leur volume tumoral est identique à celui des xénogreffes irinotécan-nanoparticules). Leur taux de croissance (b) dans le groupe irinotécan-MBLI-87 est 50% plus élevé que dans le groupe irinotécan-nanoparticules. Une explication possible est que cette accélération est entraînée par la discontinuité du traitement. Un phénomène similaire est observé dans la croissance des tumeurs traitées, chez l'homme, avec du bevacizumab (Avastin) (Stein *et al.*, 2008).

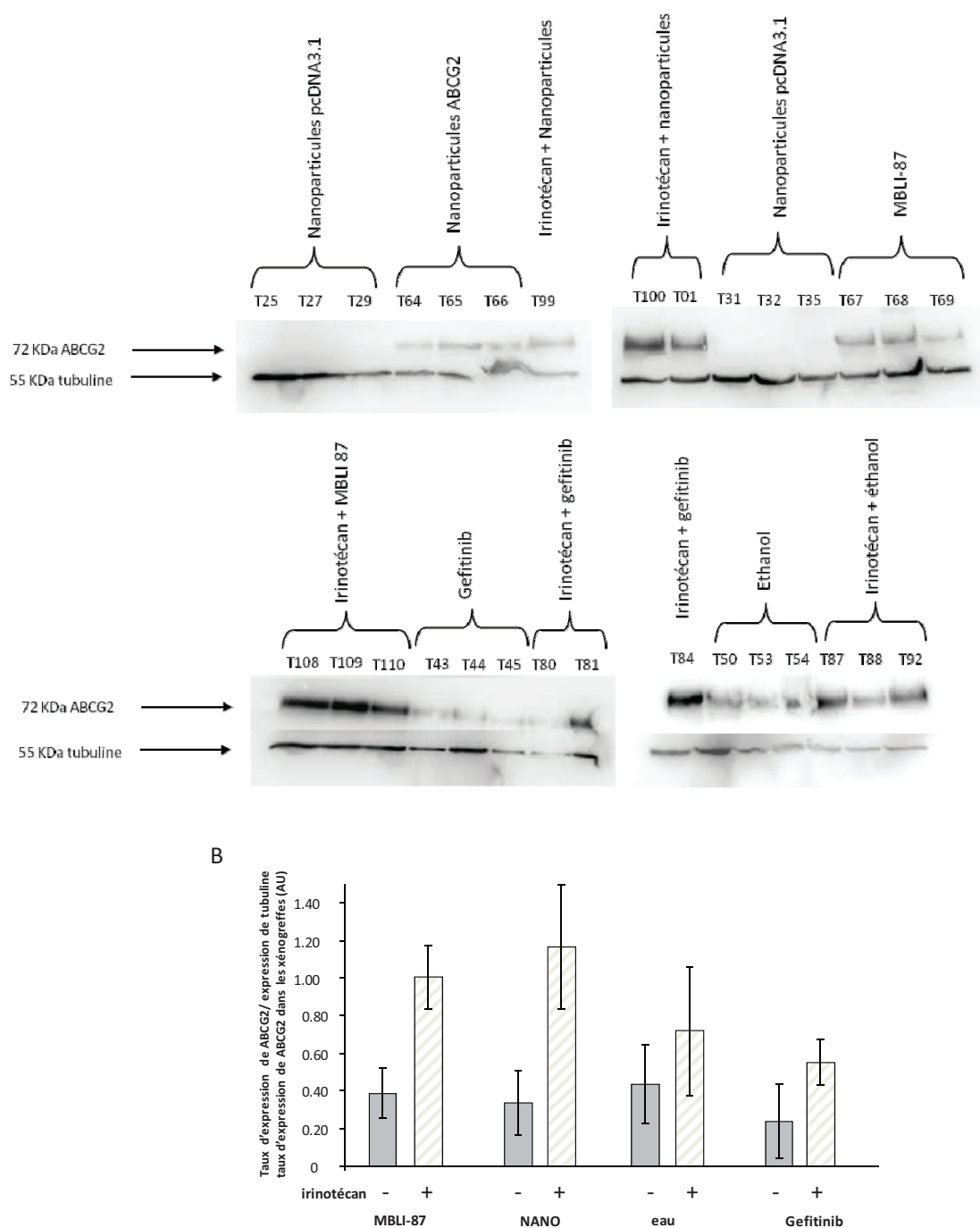


Figure 133 : Taux d'expression d'ABCG2 dans les xénogreffes des souris après traitements.

A : Expression d'ABCG2 dans les xénogreffes. Les fractions protéiques des tumeurs sont préparées comme précédemment décrit. L'expression d'ABCG2 est quantifiée par l'anticorps BXP21.

B : Effets des différents traitements sur le taux d'expression d'ABCG2. L'expression est quantifiée avec le western blot présenté en A à l'aide du logiciel Quantity One. Les taux d'ABCG2 sont rapportés au taux d'expression de la tubuline dans chaque tumeur et sont représentés par des unités arbitraires (A.U.).

Résultats et discussion

1.3.4. Taux d'expression d'ABCG2 dans les xénogreffes

Lorsque la tumeur des souris atteint le volume de 1800 mm³, les souris sont sacrifiées et nous extrayons les tumeurs. Ceci nous permet de contrôler l'expression d'ABCG2 dans ces tissus. L'expression de la protéine est quantifiée par western-blot et, comme attendu, ABCG2 n'est retrouvée que dans les tumeurs HEK-293 pcDNA3.1 ABCG2 (Figure 133A). Les tumeurs n'exprimant pas ABCG2 traitées par l'irinotécan n'ont pas poussé, même 8 semaines après l'arrêt du traitement, il a donc été impossible pour nous de vérifier l'effet de l'irinotécan sur ces tumeurs. Ces quantifications nous permettent cependant de montrer que ni le MBLI-87, ni les nanoparticules, ni le géfitinib n'ont d'effet sur l'expression d'ABCG2 dans les xénogreffes (Figure 133B). Par contre, dès que les souris sont traitées par l'irinotécan, le taux d'expression d'ABCG2 est augmenté dans les xénogreffes (Figure 133B). Ceci suggère très fortement que l'agent anticancéreux sélectionne les cellules exprimant ABCG2 ayant le plus fort efflux d'irinotécan, ceci dans le but de limiter l'effet de l'agent cytotoxique sur ces cellules.

Résultats et discussion

En conclusion, les résultats présentés lors de ces tests *in vivo* sont particulièrement intéressants. Nous avons montré une sensibilisation des tumeurs exprimant ABCG2 à l'irinotécan lorsqu'elles sont traitées conjointement avec le MBLI-87, même si ces résultats sont nuancés du fait de l'augmentation du taux de croissance à la fin du 2nd cycle de thérapie.

Etant donné que le MBLI-87 et le géfitinib ne sont pas administrés avec le même véhicule ou par la même voie (gavage pour le géfitinib, IP pour le MBLI-87), il n'est pas possible de comparer directement les résultats obtenus. Il est cependant intéressant de noter que le MBLI-87 est utilisé ici à une dose 20 fois plus faible que celle utilisée pour le géfitinib. De plus, il n'a pas été testé à sa dose maximale mais à son maximum de solubilité dans cette formulation. N'étant pas toxique pour les souris, nous pouvons envisager d'augmenter ces doses afin d'augmenter son effet, ce qui n'est pas possible pour le géfitinib, beaucoup plus toxique pour les souris. Ainsi, en vue d'un futur développement clinique, le MBLI-87 est un bien meilleur candidat que le géfitinib bien que sa formulation nécessite d'être optimisée.

Enfin, un autre point important à noter est que ce composé ne modifie pas la pharmacocinétique de l'irinotécan ou de son métabolite actif, le SN-38. Comme expliqué précédemment, cette caractéristique est essentielle au développement d'un inhibiteur. C'est la cause de l'échec et de l'arrêt de nombreux essais cliniques où la toxicité des agents anticancéreux était accrue par l'administration conjointe d'un inhibiteur des transporteurs ABC.

Ces résultats sont une preuve que le concept d'inhibition des transporteurs ABC dans l'abolition du phénotype MDR est possible. Elle doit être approfondie mais est très encourageante. Si nous obtenons la confirmation que le MBLI-87 est un inhibiteur non toxique des transporteurs ABC et ceci dans plusieurs modèles d'études et avec d'autres drogues anticancéreuses il pourrait constituer un bon candidat médicament pour améliorer la biodisponibilité de certaines drogues, augmenter leur pénétration dans le système nerveux central ou bien évidemment abolir le phénotype MDR dans certains cancers.

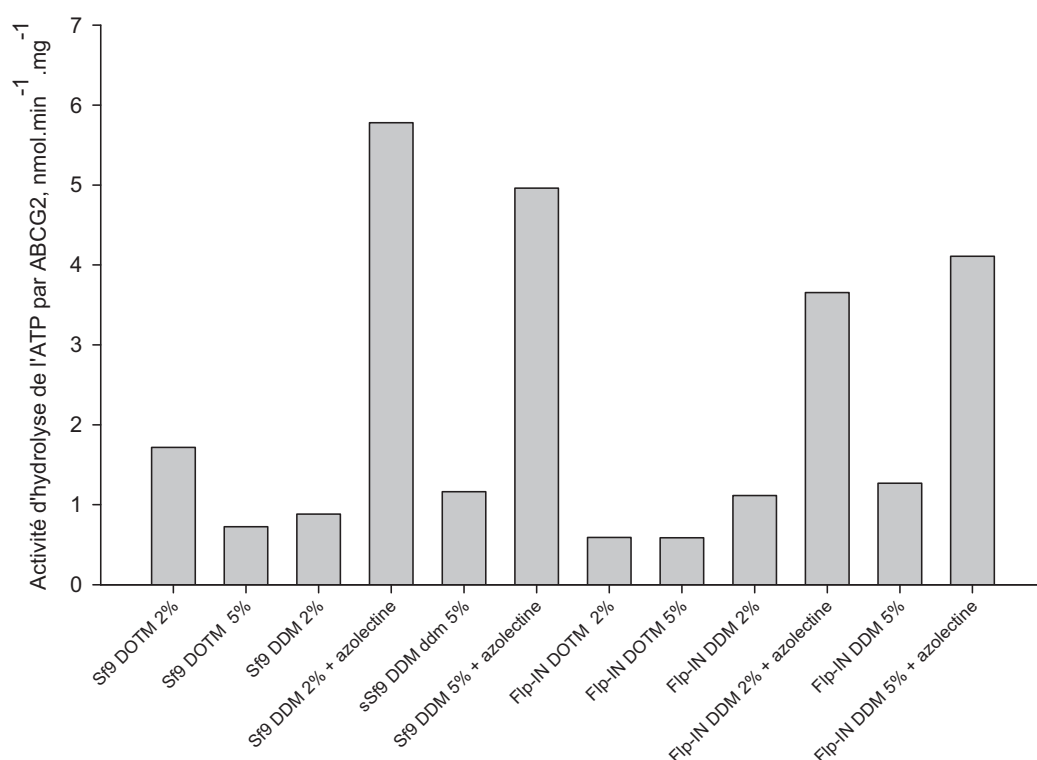


Figure 134 : Activité d'hydrolyse de l'ATP d'ABCG2 solubilisé dans 2 détergents, le DDM ou le DOTM. Les membranes de cellules d'insectes (*Sf9*) ou de mammifères (Flp-InTM-293) ont été solubilisées dans du DDM ou du DOTM à 2 ou 5% (w/w) et de l'azolectine a été ajoutée ou non. L'activité d'hydrolyse de l'ATP mesurée est sensible au vanadate et donc spécifique du transporteur.

La concentration de détergent n'a pas d'effets sur l'activité d'hydrolyse de l'ATP tandis que la présence d'azolectine est indispensable à cette activité.

2. Activité d'ABCG2 purifiée

Une étude menée en collaboration avec l'équipe du Dr. D. Lévy à l'Institut de Curie, à Paris, visait à produire, purifier et analyser par microscopie électronique ABCG2 provenant de 2 systèmes d'expression, les cellules d'insectes *Sf9* et les cellules de mammifères Flp-InTM-293. Plusieurs formes oligomériques d'ABCG2 ont été publiées mais les systèmes d'expression ou les détergents utilisés étaient différents, empêchant toute véritable comparaison. Mon rôle dans cette étude a été de produire des membranes de cellules de mammifères et de démontrer que les protéines solubilisées dans les 2 systèmes étaient actives.

Les membranes ont ainsi été préparées comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes*.

Les mesures d'activité d'hydrolyse d'ATP ont été réalisées sur un extrait de protéines solubilisées dans 2 détergents, le dodécylmaltoside (DDM) et le dodécylthiomaltoside (DOTM) à 2 concentrations (2 ou 5%), en présence ou non de lipides. Des membranes à 10 mg/ml ont été solubilisées avec du DOTM ou du DDM avec un ratio détergent/protéine de 5 (w/w). Après une centrifugation à 100000×g, le surnagent est additionné ou non d'azolectine solubilisée dans du DOTM ou du DDM à une concentration finale en lipides de 5 mg/ml. L'activité d'hydrolyse d'ATP d'une fraction aliquote de 20 µl est alors testée comme décrit dans la partie *Matériels et méthodes* en présence ou non d'orthovanadate. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 134.

Ainsi, comme on le remarque sur cette figure, la proportion de détergent n'a pas d'effet sur l'activité d'hydrolyse d'ATP. Les cellules d'insectes ont une activité de l'ordre de 6 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ tandis que les cellules de mammifères ont une activité plus faible, de l'ordre de 4 nmol.min⁻¹.mg⁻¹. Cette activité des protéines solubilisées est plus faible que celle mesurée avec des protéines non extraites des membranes mais elle est suffisamment élevée pour conclure à l'activité effective de la protéine après solubilisation. On note que, comme attendu, la présence d'azolectine est indispensable à cette activité d'hydrolyse d'ATP.

Ainsi, les protéines solubilisées nécessitent la présence de lipides pour être actives. La purification de ces protéines est réalisée sur une couche de Ni²⁺-NTA avec lipides (Ni²⁺-NTA DOGS lipides), la protéine étudiée devrait donc être active.

CONCLUSION

Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires impliquées dans le phénotype de multirésistance aux agents chimiothérapeutiques. Le développement d'inhibiteurs de ces transporteurs est l'une des stratégies envisagées pour améliorer les traitements chimiothérapeutiques. En effet, en associant un agent chimiothérapeutique avec un inhibiteur, on espère ainsi pouvoir restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements.

Afin de développer des inhibiteurs ciblés et spécifiques d'un transporteur, il est essentiel de mieux comprendre leur mécanisme de fonctionnement. Ainsi, nous nous sommes tout d'abord intéressés au fonctionnement d'ABCG2 et plus particulièrement au rôle des boucles intracellulaires de cette protéine. Nous avons ainsi mis en évidence l'importance de certains résidus (H350, H375, W379 et H457) des boucles intracellulaires ou des domaines transmembranaires dans la spécificité ou dans l'activité de la protéine. Deux résidus semblent particulièrement intéressants ; H457 qui participerait à la reconnaissance ou à la fixation des substrats ; et le résidu W379 qui semble être située sur la trajectoire de passage des substrats et pourrait agir comme un filtre interne. Cette étude ouvre de nombreuses perspectives. En effet, il serait maintenant intéressant de démontrer si 3 de ces résidus, H350, H375 et H457, sont directement impliqués dans la reconnaissance des substrats ou dans leur fixation sur ABCG2. En ce qui concerne le résidu W379, il serait intéressant d'étudier s'il est impliqué dans la régulation de l'efflux des substrats. Cette hypothèse, si elle est démontrée serait particulièrement intéressante et permettrait de mieux connaître le chemin emprunté par un substrat avant son efflux. Ce résidu tryptophane pourrait alors être ciblé par des inhibiteurs bloquant le transport de substrat, et restaurant ainsi la sensibilité des cellules cancéreuses.

La 2^{ème} partie de cette étude a concerné le développement et la caractérisation d'inhibiteurs d'ABCB1 et/ou ABCG2. Des études de relations structure-activité (3D-QSAR) ont été réalisées avec ces inhibiteurs permettant de déterminer des substituants essentiels à leur activité et leur spécificité pour l'un ou l'autre des transporteurs. Nous envisageons ainsi de synthétiser une nouvelle génération de composés, qui devrait améliorer leur efficacité.

Parmi les composés testés, nous avons sélectionné des inhibiteurs spécifiques et efficaces pour inhiber le transport des substrats par ABCB1. Ils sont non cytotoxiques et chimiosensibilisants. Nous avons également montré que le meilleur inhibiteur d'ABCB1, CT1347, inhibe le transport avec un mécanisme non compétitif vis-à-vis des substrats se fixant dans les 2 sites de fixation connus des substrats d'ABCB1, le site R et le site H. Cette caractéristique assure que cet inhibiteur ne se fixe pas dans un site de transport et diminue

donc sa probabilité d'être à son tour expulsé par ABCB1. C'est un avantage considérable pour son développement clinique potentiel. Cette étude sera poursuivie par des tests *in vivo* de chimioréversion sur des souris xénogreffées avec des cellules exprimant ABCB1.

Une classe particulière de ces peptidomimétiques, les azapeptides, s'est révélée plus efficace pour inhiber le transport induit par ABCG2. De la même façon que précédemment, certains de ces inhibiteurs, et notamment le CT1364, se révèlent spécifiques d'ABCG2, et sont efficaces à faible concentration, non cytotoxiques et chimiosensibilisants. Le CT1364 est également non compétitif et inhibe l'activité d'ABCG2 par 3 mécanismes : inhibition du transport, diminution de l'expression du transporteur et inhibition de l'activité d'hydrolyse d'ATP. Enfin, un test de réversion *in vivo* a permis de démontrer la capacité de cet inhibiteur à abolir la résistance des cellules cancéreuses. Son efficacité est cependant limitée du fait de sa formulation non optimale. Nous travaillons actuellement sur l'amélioration de cette formulation afin que le composé soit distribué plus efficacement aux cellules cancéreuses.

Au cours de l'étude *in vivo* du CT1364, un inhibiteur acridone développé au laboratoire a également été testé pour sa capacité à abolir le phénotype de chimiorésistance induit par ABCG2. Il est formulé dans des nanoparticules et s'est révélé efficace. Cet inhibiteur acridone, le MBLI-87 est très prometteur. En plus de son efficacité *in vivo* à une dose non toxique, ce composé ne modifie pas la pharmacocinétique de l'irinotécan, agent anticancéreux utilisé dans nos tests. Cette caractéristique est essentielle à son développement clinique, afin d'éviter des modifications dans l'efficacité ou dans les effets indésirables de l'agent chimiothérapeutique. L'étude de ce composé se poursuit actuellement afin d'étudier sa distribution et sa métabolisation dans l'organisme mais également afin de contrôler plus en détail sa faible toxicité.

Enfin, nous avons récemment débuté une étude destinée à localiser les sites de fixation des substrats sur ABCB1. Les résultats bien que préliminaires sont encourageants. Ils semblent suggérer que le site du Hoechst 33342 et le site de fixation du QZ59-(SSS), inhibiteur récemment co-cristallisé avec ABCB1, soient recouvrant, permettant ainsi de localiser le site H dans ABCB1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, B.L. (2006). ABCG2 (BCRP): a cytoprotectant in normal and malignant stem cells. *Clin Adv Hematol Oncol* 4, 63-72.
- Abolhoda, A., Wilson, A.E., Ross, H., Danenberg, P.V., Burt, M., and Scotto, K.W. (1999). Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res* 5, 3352-3356.
- Abraham J, E.M., Wilson R, Chen C, Rutt A, Bakke S, Robey R, Dwyer A, Goldspiel B, Balis F, Van Tellingen O, Bates SE, Fojo T. (2001). A phase I study of the P-glycoprotein antagonist tariquidar in combination with vinorelbine. *Clin Cancer Res* 15, 3574-3582.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., and Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621-628.
- Agrawal, M., Abraham, J., Balis, F.M., Edgerly, M., Stein, W.D., Bates, S., Fojo, T., and Chen, C.C. (2003). Increased 99mTc-sestamibi accumulation in normal liver and drug-resistant tumors after the administration of the glycoprotein inhibitor, XR9576. *Clin Cancer Res* 9, 650-656.
- Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Macalou, S., Perez-Victoria, J.M., Boumendjel, A., and Di Pietro, A. (2006). Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anticancer Drugs* 17, 239-243.
- Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Munoz-Martinez, F., Bates, S.E., Castanys, S., Gamarro, F., Di Pietro, A., and Perez-Victoria, J.M. (2005). Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res* 65, 4852-4860.
- Al-Ali, H.K., Heinrich, M.C., Lange, T., Krah, R., Mueller, M., Muller, C., Niederwieser, D., Druker, B.J., and Deininger, M.W. (2004). High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol J* 5, 55-60.
- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., and Schinkel, A.H. (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.
- Allen, J.D., Jackson, S.C., and Schinkel, A.H. (2002a). A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance. *Cancer Res* 62, 2294-2299.
- Allen, J.D., van Loevezijn, A., Lakhai, J.M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J.H., Koomen, G.J., and Schinkel, A.H. (2002b). Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 1, 417-425.
- Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., and Chang, G. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323, 1718-1722.
- Allikmets, R., Schriml, L.M., 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.
- Allouche, M., Bettaieb, A., Vindis, C., Rousse, A., Grignon, C., and Laurent, G. (1997). Influence of Bcl-2 overexpression on the ceramide pathway in daunorubicin-induced apoptosis of leukemic cells. *Oncogene* 14, 1837-1845.

- Ames, G.F., Nikaido, K., Groarke, J., and Petithory, J. (1989). Reconstitution of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles. Energization by ATP. *J Biol Chem* 264, 3998-4002.
- Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253, 202-205.
- Antolin, I., Uria, H., Tolivia, D., Rodriguez-Colunga, M.J., Rodriguez, C., Kotler, M.L., and Menendez-Pelaez, A. (1994). Porphyrin accumulation in the harderian glands of female Syrian hamster results in mitochondrial damage and cell death. *Anat Rec* 239, 349-359.
- Arnaud, O., Koubeissi, A., Ettouati, L., Terreux, R., Alame, G., Grenot, C., Dumontet, C., Di Pietro, A., Paris, J., and Falson, P. (2010). Potent and fully noncompetitive peptidomimetic inhibitor of multidrug resistance P-glycoprotein. *J Med Chem* 53, 6720-6729.
- Azzaria, M., Schurr, E., and Gros, P. (1989). Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol* 9, 5289-5297.
- Baer, M.R., George, S.L., Dodge, R.K., O'Loughlin, K.L., Minderman, H., Caligiuri, M.A., Anastasi, J., Powell, B.L., Koltz, J.E., Schiffer, C.A., Bloomfield, C. D. and Larson, R. A. (2002). Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 100, 1224-1232.
- Bahr, O., Wick, W., and Weller, M. (2001). Modulation of MDR/MRP by wild-type and mutant p53. *J Clin Invest* 107, 643-646.
- Bakos, E., Evers, R., Calenda, G., Tusnady, G.E., Szakacs, G., Varadi, A., and Sarkadi, B. (2000). Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* 113 Pt 24, 4451-4461.
- Bayani, J., Selvarajah, S., Maire, G., Vukovic, B., Al-Romaih, K., Zielenska, M., and Squire, J.A. (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* 17, 5-18.
- Bedford, J.S., and Mitchell, J.B. (1974). The effect of hypoxia on the growth and radiation response of mammalian cells in culture. *Br J Radiol* 47, 687-696.
- Belfield, G.P., Ross-Smith, N.J., and Tuite, M.F. (1995). Translation elongation factor-3 (EF-3): an evolving eukaryotic ribosomal protein? *J Mol Evol* 41, 376-387.
- Benderra, Z., Faussat, A.M., Sayada, L., Perrot, J.Y., Chaoui, D., Marie, J.P., and Legrand, O. (2004). Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 10, 7896-7902.
- Benet, L.Z., Cummins, C.L., and Wu, C.Y. (2004). Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int J Pharm* 277, 3-9.
- Benson, A.B., 3rd, Trump, D.L., Koeller, J.M., Egorin, M.I., Olman, E.A., Witte, R.S., Davis, T.E., and Tormey, D.C. (1985). Phase I study of vinblastine and verapamil given by concurrent iv infusion. *Cancer Treat Rep* 69, 795-799.
- Bentley, J., Quinn, D.M., Pitman, R.S., Warr, J.R., and Kellett, G.L. (1997). The human KB multidrug-resistant cell line KB-C1 is hypersensitive to inhibitors of glycosylation. *Cancer Lett* 115, 221-227.

- Bergman, A.M., Munch-Petersen, B., Jensen, P.B., Sehested, M., Veerman, G., Voorn, D.A., Smid, K., Pinedo, H.M., and Peters, G.J. (2001). Collateral sensitivity to gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) and cytosine arabinoside of daunorubicin- and VM-26-resistant variants of human small cell lung cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 61, 1401-1408.
- Bergman, A.M., Pinedo, H.M., Talianidis, I., Veerman, G., Loves, W.J., van der Wilt, C.L., and Peters, G.J. (2003). Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer* 88, 1963-1970.
- Berruti, A., Terzolo, M., Sperone, P., Pia, A., Casa, S.D., Gross, D.J., Carnaghi, C., Casali, P., Porpiglia, F., Mantero, F., Reimondo, G. Angeli, A. and Dogliotti, L., (2005). Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer* 12, 657-666.
- Bieche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P., and de Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics* 17, 731-742.
- Biedler, J.L., and Riehm, H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 30, 1174-1184.
- Bielas, J.H., Loeb, K.R., Rubin, B.P., True, L.D., and Loeb, L.A. (2006). Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18238-18242.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M.K., and Poolman, B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* 580, 1023-1035.
- Bishop, L., Agbayani, R., Jr., Ambudkar, S.V., Maloney, P.C., and Ames, G.F. (1989). Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6953-6957.
- Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91 *Spec No*, 179-194.
- Bohm, F., Edge, R., Foley, S., Lange, L., and Truscott, T.G. (2001). Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity. *J Photochem Photobiol B* 65, 177-183.
- Bohme, M., Buchler, M., Muller, M., and Keppler, D. (1993). Differential inhibition by cyclosporins of primary-active ATP-dependent transporters in the hepatocyte canalicular membrane. *FEBS Lett* 333, 193-196.
- Boumendjel, A., Macalou, S., Ahmed-Belkacem, A., Blanc, M., and Di Pietro, A. (2007). Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg Med Chem* 15, 2892-2897.
- Bradford, M.M. (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.
- Brendel, C., Scharenberg, C., Dohse, M., Robey, R.W., Bates, S.E., Shukla, S., Ambudkar, S.V., Wang, Y., Wennemuth, G., Burchert, A., Boudriot, U. and Neubauer, A., (2007). Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia* 21, 1267-1275.

- Brosig, B., and Langosch, D. (1998). The dimerization motif of the glycophorin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci* 7, 1052-1056.
- Brown, J.M., and Giaccia, A.J. (1998). The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58, 1408-1416.
- Burger, H., van Tol, H., Boersma, A.W., Brok, M., Wiemer, E.A., Stoter, G., and Nooter, K. (2004). Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 104, 2940-2942.
- Byeon, L., Shi, Z., and Tsai, M.D. (1995). Mechanism of adenylate kinase. The "essential lysine" helps to orient the phosphates and the active site residues to proper conformations. *Biochemistry* 34, 3172-3182.
- Byrne, J.L., Dasgupta, E., Pallis, M., Turzanski, J., Forman, K., Mitchell, D., Haynes, A.P., and Russell, N.H. (1999). Early allogeneic transplantation for refractory or relapsed acute leukaemia following remission induction with FLAG. *Leukemia* 13, 786-791.
- Cai, X., Bikadi, Z., Ni, Z., Lee, E.W., Wang, H., Rosenberg, M.F., and Mao, Q. (2010). Role of basic residues within or near the predicted transmembrane helix 2 of the human breast cancer resistance protein in drug transport. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 670-681.
- Cano-Gauci, D.F., and Riordan, J.R. (1987). Action of calcium antagonists on multidrug resistant cells. Specific cytotoxicity independent of increased cancer drug accumulation. *Biochem Pharmacol* 36, 2115-2123.
- Cardarelli, C.O., Aksentijevich, I., Pastan, I., and Gottesman, M.M. (1995). Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters. *Cancer Res* 55, 1086-1091.
- Cervenak, J., Andrikovics, H., Ozvegy-Laczka, C., Tordai, A., Nemet, K., Varadi, A., and Sarkadi, B. (2006). The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. *Cancer Lett* 234, 62-72.
- Chaney, S.G., and Sancar, A. (1996). DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* 88, 1346-1360.
- Chang, X.B., Hou, Y.X., and Riordan, J.R. (1997). ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 272, 30962-30968.
- Charrier, C., Ettouati, L., Paris, J., (1999). *J Tetrahedron lett* 40, 5705-5707.
- Chaudhary, P.M., and Roninson, I.B. (1992). Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists. *Oncol Res* 4, 281-290.
- Chearwae, W., Anuchapreeda, S., Nandigama, K., Ambudkar, S.V., and Limtrakul, P. (2004). Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II, and III purified from Turmeric powder. *Biochem Pharmacol* 68, 2043-2052.
- Chearwae, W., Wu, C.P., Chu, H.Y., Lee, T.R., Ambudkar, S.V., 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, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L., and Quijcho, F.A. (2003a). A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* 12, 651-661.
- Chen, Z.S., Robey, R.W., Belinsky, M.G., Shchaveleva, I., Ren, X.Q., Sugimoto, Y., Ross, D.D., Bates, S.E., and Kruh, G.D. (2003b). Transport of methotrexate, methotrexate

- polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res* 63, 4048-4054.
- Cheng, X., Maher, J., Dieter, M.Z., and Klaassen, C.D. (2005). Regulation of mouse organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in liver by prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription factor pathways. *Drug Metab Dispos* 33, 1276-1282.
- 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.
- Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M.M. (1992). Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255, 459-462.
- Chu, X.Y., Suzuki, H., Ueda, K., Kato, Y., Akiyama, S., and Sugiyama, Y. (1999). Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 735-741.
- Cianchetta, G., Singleton, R.W., Zhang, M., Wildgoose, M., Giesing, D., Fravolini, A., Cruciani, G., and Vaz, R.J. (2005). A pharmacophore hypothesis for P-glycoprotein substrate recognition using GRIND-based 3D-QSAR. *J Med Chem* 48, 2927-2935.
- Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., and Scherrmann, J.M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* 64, 3296-3301.
- Clark, R., Kerr, I.D., and Callaghan, R. (2006). Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. *Br J Pharmacol* 149, 506-515.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., and Deeley, R.G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654.
- Cooray, H.C., Janvilisri, T., van Veen, H.W., Hladky, S.B., and Barrand, M.A. (2004). Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 269-275.
- Cygalova, L., Ceckova, M., Pavek, P., and Staud, F. (2008). Role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in fetal protection during gestation in rat. *Toxicol Lett* 178, 176-180.
- Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J.J., and Reed, E. (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 94, 703-708.
- Dantzig, A.H., Law, K.L., Cao, J., and Starling, J.J. (2001). Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem* 8, 39-50.
- Daschner, P.J., Ciolino, H.P., Plouzek, C.A., and Yeh, G.C. (1999). Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 53, 229-240.
- Dassa, E., and Bouige, P. (2001). The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* 152, 211-229.

- Davidson, A.L. (2002). Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol* 184, 1225-1233.
- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* 73, 241-268.
- Davidson, A.L., and Nikaido, H. (1991). Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266, 8946-8951.
- Davidson, A.L., Shuman, H.A., and Nikaido, H. (1992). Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2360-2364.
- Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180-185.
- de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R., and Bates, S.E. (1999). Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett* 146, 117-126.
- de Jong, F.A., Marsh, S., Mathijssen, R.H., King, C., Verweij, J., Sparreboom, A., and McLeod, H.L. (2004). ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition. *Clin Cancer Res* 10, 5889-5894.
- de la Salle, H., Hanau, D., Fricker, D., Urlacher, A., Kelly, A., Salamero, J., Powis, S.H., Donato, L., Bausinger, H., Laforet, M., Jeras M., Spehner D., Bieber T., Falkenrodt A., Cazenave JP., Trowsdale J., and Tongio M.M. (1994). Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 265, 237-241.
- de la Salle, H., Zimmer, J., Fricker, D., Angenieux, C., Cazenave, J.P., Okubo, M., Maeda, H., Plebani, A., Tongio, M.M., Dormoy, A., and Hanau D. (1999). HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1. *J Clin Invest* 103, R9-R13.
- de Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturm, E., Cresteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., and Hadchouel, M. (1998). Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 282-287.
- Dean, D.A., Davidson, A.L., and Nikaido, H. (1989). Maltose transport in membrane vesicles of *Escherichia coli* is linked to ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9134-9138.
- Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001a). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42, 1007-1017.
- Dean, M., Rzhetsky, A., and Allikmets, R. (2001b). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11, 1156-1166.
- Delepelaire, P. (1994). PrtD, the integral membrane ATP-binding cassette component of the *Erwinia chrysanthemi* metalloprotease secretion system, exhibits a secretion signal-regulated ATPase activity. *J Biol Chem* 269, 27952-27957.
- Dewhirst, M.W., Tso, C.Y., Oliver, R., Gustafson, C.S., Secomb, T.W., and Gross, J.F. (1989). Morphologic and hemodynamic comparison of tumor and healing normal tissue microvasculature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17, 91-99.
- Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., and Ambudkar, S.V. (1997). Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10594-10599.

Références bibliographiques

- Dezi, M., Fribourg, P.F., Di Cicco, A., Arnaud, O., Marco, S., Falson, P., Di Pietro, A., and Levy, D. (2010). The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes. *Biochim Biophys Acta* 1798, 2094-2101.
- DiDiodato, G., and Sharom, F.J. (1997). Interaction of combinations of drugs, chemosensitizers, and peptides with the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochem Pharmacol* 53, 1789-1797.
- 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.
- Diop, N.K., and Hrycyna, C.A. (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, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15665-15670.
- Drummond, J.T., Anthoney, A., Brown, R., and Modrich, P. (1996). Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J Biol Chem* 271, 19645-19648.
- Duan, Z., Brakora, K.A., and Seiden, M.V. (2004). Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3, 833-838.
- Durand, R.E. (1994). The influence of microenvironmental factors during cancer therapy. *In Vivo* 8, 691-702.
- Durr, D., Stieger, B., Kullak-Ublick, G.A., Rentsch, K.M., Steinert, H.C., Meier, P.J., and Fattinger, K. (2000). St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 68, 598-604.
- Eckford, P.D., and Sharom, F.J. (2009). ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 109, 2989-3011.
- Ee, P.L., He, X., Ross, D.D., and Beck, W.T. (2004). Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference. *Mol Cancer Ther* 3, 1577-1583.
- Elkind, N.B., Szentpetery, Z., Apati, A., Ozvegy-Laczka, C., Varady, G., Ujhelly, O., Szabo, K., Homolya, L., Varadi, A., Buday, L., Keri, G., Nemet, K., and Sarkadi, B. (2005). Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res* 65, 1770-1777.
- Endrich, B., Reinhold, H.S., Gross, J.F., and Intaglietta, M. (1979). Tissue perfusion inhomogeneity during early tumor growth in rats. *J Natl Cancer Inst* 62, 387-395.
- Enokizono, J., Kusuhashi, H., Ose, A., Schinkel, A.H., and Sugiyama, Y. (2008). Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metab Dispos* 36, 995-1002.
- Enokizono, J., Kusuhashi, H., and Sugiyama, Y. (2007). Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol* 72, 967-975.

- Ewart, G.D., Cannell, D., Cox, G.B., and Howells, A.J. (1994). Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *J Biol Chem* 269, 10370-10377.
- Fantappie, O., Solazzo, M., Lasagna, N., Platini, F., Tessitore, L., and Mazzanti, R. (2007). P-glycoprotein mediates celecoxib-induced apoptosis in multiple drug-resistant cell lines. *Cancer Res* 67, 4915-4923.
- Fattman, C.L., Allan, W.P., Hasinoff, B.B., and Yalowich, J.C. (1996). Collateral sensitivity to the bisdioxopiperazine dextrazoxane (ICRF-187) in etoposide (VP-16)-resistant human leukemia K562 cells. *Biochem Pharmacol* 52, 635-642.
- Fedier, A., Schwarz, V.A., Walt, H., Carpini, R.D., Haller, U., and Fink, D. (2001). Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer* 93, 571-576.
- Ferry D, P.L., Atsmon J (2001). A phase IIa pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the P-glycoprotein inhibitor, XR9576 in patients treated with doxorubicin chemotherapy. *Proc Am Assoc Cancer Res* 42, 950.
- Fojo, T. (2007). Multiple paths to a drug resistance phenotype: mutations, translocations, deletions and amplification of coding genes or promoter regions, epigenetic changes and microRNAs. *Drug Resist Updat* 10, 59-67.
- Fox, E., and Bates, S.E. (2007). Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Rev Anticancer Ther* 7, 447-459.
- Friedenberg, W.R., Rue, M., Blood, E.A., Dalton, W.S., Shustik, C., Larson, R.A., Sonneveld, P., and Greipp, P.R. (2006). Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 106, 830-838.
- Fry, D.C., Kuby, S.A., and Mildvan, A.S. (1986). ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 907-911.
- Fukushima, Y., Oshika, Y., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Tomisawa, M., Kawai, K., Ozeki, Y., Tsuchida, T., Kijima, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Miura, S., and Nakamura, M. (1999). Multidrug resistance-associated protein (MRP) expression is correlated with expression of aberrant p53 protein in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 35, 935-938.
- Gao, Z., Fain, H.D., and Rapoport, N. (2004). Ultrasound-enhanced tumor targeting of polymeric micellar drug carriers. *Mol Pharm* 1, 317-330.
- Garrigues, A., Loiseau, N., Delaforge, M., Ferte, J., Garrigos, M., Andre, F., and Orlowski, S. (2002). Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 62, 1288-1298.
- Gaudet, R., and Wiley, D.C. (2001). Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J* 20, 4964-4972.
- Gerrard, G., Payne, E., Baker, R.J., Jones, D.T., Potter, M., Prentice, H.G., Ethell, M., McCullough, H., Burgess, M., Mehta, A.B., 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.

- Geyer, A.M., G.; Kessler, H. (1994). Conformational Analysis of a Cyclic RGD Peptide Containing a .psi.[CH2-NH] Bond: A Positional Shift in Backbone Structure Caused by a Single Dipeptide Mimetic. *Journal of the American Chemical Society* 116, 7735-7743.
- Globisch, C., Pajeva, I.K., and Wiese, M. (2008). Identification of putative binding sites of P-glycoprotein based on its homology model. *ChemMedChem* 3, 280-295.
- Gollin, S.M. (2004). Chromosomal instability. *Curr Opin Oncol* 16, 25-31.
- Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S., and Scott, O.C. (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26, 638-648.
- Gronostajski, R.M., and Sadowski, P.D. (1985). The FLP recombinase of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 microns plasmid attaches covalently to DNA via a phosphotyrosyl linkage. *Mol Cell Biol* 5, 3274-3279.
- Grunt, T.W., Lametschwandtner, A., and Staindl, O. (1985). The vascular pattern of basal cell tumors: light microscopy and scanning electron microscopic study on vascular corrosion casts. *Microvasc Res* 29, 371-386.
- Garrigos M., Mir L.M. and Orlowski S. (1997). Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase--further experimental evidence for a multisite model. *Eur J Biochem* 244, 664-73.
- Gupta, A., Zhang, Y., Unadkat, J.D., and Mao, Q. (2004). HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J Pharmacol Exp Ther* 310, 334-341.
- Gutmann, D.A., Ward, A., Urbatsch, I.L., Chang, G., and van Veen, H.W. (2009). Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends Biochem Sci* 35, 36-42.
- Halgren (1996). Merck molecular force field.. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem* 17, 490-615.
- Han, Y., Chin Tan, T.M., and Lim, L.Y. (2008). In vitro and in vivo evaluation of the effects of piperine on P-gp function and expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 230, 283-289.
- Han, Y., Tan, T.M., and Lim, L.Y. (2006). Effects of capsaicin on P-gp function and expression in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* 71, 1727-1734.
- Hazai, E., and Bikadi, Z. (2008). Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2). *J Struct Biol* 162, 63-74.
- Heffeter, P., Jakupiec, M.A., Korner, W., Chiba, P., Pirker, C., Dornetshuber, R., Elbling, L., Sutterluty, H., Micksche, M., Keppler, B.K., and Berger, W. (2007). Multidrug-resistant cancer cells are preferential targets of the new antineoplastic lanthanum compound KP772 (FFC24). *Biochem Pharmacol* 73, 1873-1886.
- Hegedus, T., Orfi, L., Seprodi, A., Varadi, A., Sarkadi, B., and Keri, G. (2002). Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1587, 318-325.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Henriksen, U., Fog, J.U., Litman, T., and Gether, U. (2005). Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Biol Chem* 280, 36926-36934.

Références bibliographiques

- Hida, T., Ogawa, S., Park, J.C., Park, J.Y., Shimizu, J., Horio, Y., and Yoshida, K. (2009). Gefitinib for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 17-35.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113.
- Higgins, C.F., and Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 11, 918-926.
- Ho, R.H., and Kim, R.B. (2005). Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 78, 260-277.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H.P., Brockmoller, J., John, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., and Brinkmann, U. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3473-3478.
- Holzer, A.K., Manorek, G.H., and Howell, S.B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 70, 1390-1394.
- Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.W., Medina-Perez, W.Y., Robey, R.W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., and Bates, S.E. (2001). Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* 61, 6635-6639.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., and Tainer, J.A. (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.
- Hou, X.L., Takahashi, K., Tanaka, K., Tougou, K., Qiu, F., Komatsu, K., and Azuma, J. (2008). Curcuma drugs and curcumin regulate the expression and function of P-gp in Caco-2 cells in completely opposite ways. *Int J Pharm* 358, 224-229.
- Houghton, P.J., Germain, G.S., Harwood, F.C., Schuetz, J.D., Stewart, C.F., 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.
- Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260, 14873-14878.
- Hsiang, Y.H., and Liu, L.F. (1988). Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 48, 1722-1726.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., and Kim, S.H. (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396, 703-707.
- Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* 64, 610-618.
- Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Miki, Y., and Sugimoto, Y. (2002a). C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther* 1, 611-616.

Références bibliographiques

- Imai, Y., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. (2002b). Estrone and 17beta-estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Jpn J Cancer Res* 93, 231-235.
- Ish-Horowicz, D., and Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9, 2989-2998.
- Ishikawa, T., and Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 268, 20116-20125.
- Ishikawa, T., Tamura, A., Saito, H., Wakabayashi, K., and Nakagawa, H. (2005). Pharmacogenomics of the human ABC transporter ABCG2: from functional evaluation to drug molecular design. *Naturwissenschaften* 92, 451-463.
- Iwahashi, T., Okochi, E., Ariyoshi, K., Watabe, H., Amann, E., Mori, S., Tsuruo, T., and Ono, K. (1993). Specific targeting and killing activities of anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK16 directed against intrinsically multidrug-resistant human colorectal carcinoma cell lines in the nude mouse model. *Cancer Res* 53, 5475-5482.
- Jayaram, M. (1985). Two-micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5875-5879.
- Jeong, E.J., Liu, X., Jia, X., Chen, J., and Hu, M. (2005). Coupling of conjugating enzymes and efflux transporters: impact on bioavailability and drug interactions. *Curr Drug Metab* 6, 455-468.
- Jiang, Z., Zhao, P., Zhou, Z., Liu, J., Qin, L., and Wang, H. (2007). Using attenuated *Salmonella typhi* as tumor targeting vector for MDR1 siRNA delivery. *Cancer Biol Ther* 6, 555-560.
- Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., and Scotto, K.W. (2000). Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6775-6779.
- Jonker, J.W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R.P., Rosing, H., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (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.
- Jonker, J.W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A.E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T.C., and Schinkel, A.H. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* 11, 127-129.
- Jonker, J.W., Musters, S., Vlaming, M.L., Plosch, T., Gooijert, K.E., Hillebrand, M.J., Rosing, H., Beijnen, J.H., Verkade, H.J., and Schinkel, A.H. (2007). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) is expressed in the harderian gland and mediates transport of conjugated protoporphyrin IX. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C2204-2212.
- Jonker, J.W., Smit, J.W., Brinkhuis, R.F., Maliepaard, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., and Schinkel, A.H. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 92, 1651-1656.

- Jordanides, N.E., Jorgensen, H.G., Holyoake, T.L., and Mountford, J.C. (2006). Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. *Blood* 108, 1370-1373.
- Juliano, R.L., 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, Y.R., Dai, P.L., MacVey, K., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (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.
- Karwatsky, J., Lincoln, M.C., and Georges, E. (2003). A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry* 42, 12163-12173.
- Kaszubiak, A., Holm, P.S., and Lage, H. (2007). Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes. *Int J Oncol* 31, 419-430.
- Kaufman, Y., Ifergan, I., Rothem, L., Jansen, G., and Assaraf, Y.G. (2006). Coexistence of multiple mechanisms of PT523 resistance in human leukemia cells harboring 3 reduced folate carrier alleles: transcriptional silencing, inactivating mutations, and allele loss. *Blood* 107, 3288-3294.
- Kawabata, S., Oka, M., Shiozawa, K., Tsukamoto, K., Nakatomi, K., Soda, H., Fukuda, M., Ikegami, Y., Sugahara, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Doyle, L. A., Ross, D. D., and Kohno, S. et al. (2001). Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1216-1223.
- Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H., and Sato, K. (1991). Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 51, 4187-4191.
- Kelland, L.R. (1993). New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol* 15, 191-219.
- Kerr, I.D. (2002). Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochim Biophys Acta* 1561, 47-64.
- Keskitalo, J.E., Zolk, O., Fromm, M.F., Kurkinen, K.J., Neuvonen, P.J., and Niemi, M. (2009). ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 86, 197-203.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., and Gottesman, M.M. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525-528.
- Knutsen, T., Rao, V.K., Ried, T., Mickley, L., Schneider, E., Miyake, K., Ghadimi, B.M., Padilla-Nash, H., Pack, S., Greenberger, L., Cowan, K., Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2000). Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 110-116.
- Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J.F., and Ohnuma, T. (1994). Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res* 54, 1271-1275.
- Kolitz, J.E., George, S.L., Baer, M.R., Lee, E.J., Bloomfield, C.D., and Larson, R.A. (2004). P-glycoprotein (Pgp) modulation in untreated acute myeloid leukemia (AML): Cancer and Leukemia Group B (CALGB) trials in younger and older adults. *Ann Hematol* 83 Suppl 1, S103-104.

- Koronakis, E., Hughes, C., Milisav, I., and Koronakis, V. (1995). Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol Microbiol* 16, 87-96.
- Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G.L., and Lage, H. (2002). Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther* 9, 579-586.
- Kowalski, P., Surowiak, P., and Lage, H. (2005). Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP. *Mol Ther* 11, 508-522.
- Kreimer, D.I., Chai, K.P., and Ferro-Luzzi Ames, G. (2000). Nonequivalence of the nucleotide-binding subunits of an ABC transporter, the histidine permease, and conformational changes in the membrane complex. *Biochemistry* 39, 14183-14195.
- Krishna, R., and Mayer, L.D. (1997). Liposomal doxorubicin circumvents PSC 833-free drug interactions, resulting in effective therapy of multidrug-resistant solid tumors. *Cancer Res* 57, 5246-5253.
- Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P., and Schuetz, J.D. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279, 24218-24225.
- Kruijtzter, C.M., Beijnen, J.H., Rosing, H., ten Bokkel Huinink, W.W., Schot, M., Jewell, R.C., Paul, E.M., and Schellens, J.H. (2002). Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol* 20, 2943-2950.
- Kuppens, I.E., Witteveen, E.O., Jewell, R.C., Radema, S.A., Paul, E.M., Mangum, S.G., Beijnen, J.H., Voest, E.E., and Schellens, J.H. (2007). A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin Cancer Res* 13, 3276-3285.
- Kurata, Y., Ieiri, I., Kimura, M., Morita, T., Irie, S., Urae, A., Ohdo, S., Ohtani, H., Sawada, Y., Higuchi, S., and Otsubo, K. (2002). Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 72, 209-219.
- Kurz, E.U., Cole, S.P., and Deeley, R.G. (2001). Identification of DNA-protein interactions in the 5' flanking and 5' untranslated regions of the human multidrug resistance protein (MRP1) gene: evaluation of a putative antioxidant response element/AP-1 binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 981-990.
- Lahaye, T., Riehm, B., Berger, U., Paschka, P., Muller, M.C., Kreil, S., Merx, K., Schwindel, U., Schoch, C., Hehlmann, R., and Hochhaus, A. (2005). Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer* 103, 1659-1669.
- Lampidis, T.J., Kolonias, D., Podona, T., Israel, M., Safa, A.R., Lothstein, L., Savaraj, N., Tapiero, H., and Priebe, W. (1997). Circumvention of P-GP MDR as a function of anthracycline lipophilicity and charge. *Biochemistry* 36, 2679-2685.
- Lankas, G.R., Wise, L.D., Cartwright, M.E., Pippert, T., and Umbenhauer, D.R. (1998). Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol* 12, 457-463.

- Larsen, A.K., and Skladanowski, A. (1998). Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta* 1400, 257-274.
- Lee (2004). Reversing agents for ATP-binding cassette (ABC) transporters: application in modulating multidrug resistance (MDR). *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4, 43-52.
- Lee, C.H. (2010). Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters. *Methods Mol Biol* 596, 325-340.
- Lee, D.K., Kim, Y.H., Kim, J.S., and Seol, W. (2004). Induction and characterization of taxol-resistance phenotypes with a transiently expressed artificial transcriptional activator library. *Nucleic Acids Res* 32, e116.
- Lee, K.D., Hong, K., and Papahadjopoulos, D. (1992). Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim Biophys Acta* 1103, 185-197.
- Lee, Y.J., Kusuhara, H., Jonker, J.W., Schinkel, A.H., and Sugiyama, Y. (2005). Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 44-52.
- Leggas, M., Panetta, J.C., Zhuang, Y., Schuetz, J.D., Johnston, B., Bai, F., Sorrentino, B., Zhou, S., Houghton, P.J., and Stewart, C.F. (2006). Gefitinib modulates the function of multiple ATP-binding cassette transporters in vivo. *Cancer Res* 66, 4802-4807.
- Lemos, C., Jansen, G., and Peters, G.J. (2008). Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 98, 857-862.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., and Cole, S.P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 216-237.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Lewis, H.A., Buchanan, S.G., Burley, S.K., Conners, K., Dickey, M., Dorwart, M., Fowler, R., Gao, X., Guggino, W.B., Hendrickson, W.A., Hunt, J. F., Kearins, M. C., Lorimer, D., Maloney, P. C., Post, K. W., Rajashankar, K. R., Rutter, M. E., Sauder, J. M., Shriver, S., Thibodeau, P. H., Thomas, P. J., Zhang, M., Zhao, X., and Emtage, S. (2004). Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* 23, 282-293.
- Li, L., Ahmed, B., Mehta, K., and Kurzrock, R. (2007). Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 6, 1276-1282.
- Li, L., Braith, F.S., and Kurzrock, R. (2005). Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer* 104, 1322-1331.
- Limtrakul, P., Anuchapreeda, S., and Buddhasukh, D. (2004). Modulation of human multidrug-resistance MDR-1 gene by natural curcuminoids. *BMC Cancer* 4, 13.
- Limtrakul, P., Khantamat, O., and Pintha, K. (2005). Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin. *J Chemother* 17, 86-95.
- Lin, J.H., and Yamazaki, M. (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 42, 59-98.

- Lin, K.T., Xue, J.Y., Sun, F.F., and Wong, P.Y. (1997). Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 115-119.
- Liscovitch, M., and Lavie, Y. (2000). Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem Sci* 25, 530-534.
- List, A.F., Spier, C., Greer, J., Wolff, S., Hutter, J., Dorr, R., Salmon, S., Futscher, B., Baier, M., and Dalton, W. (1993). Phase I/II trial of cyclosporine as a chemotherapy-resistance modifier in acute leukemia. *J Clin Oncol* 11, 1652-1660.
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D.D., Miyake, K., Resau, J.H., and Bates, S.E. (2000). The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 2011-2021.
- Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R., and Aubourg, P. (1999). Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* 274, 32738-32743.
- Liu, R., and Sharom, F.J. (1996). Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry* 35, 11865-11873.
- Locher, K.P., Lee, A.T., and Rees, D.C. (2002). The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296, 1091-1098.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C., and Clarke, D.M. (2003). Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* 278, 39706-39710.
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. (1997). Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate. *J Biol Chem* 272, 31945-31948.
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. (2000). Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *J Biol Chem* 275, 39272-39278.
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. (2001). Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem* 276, 14972-14979.
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. (2002). Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* 277, 44332-44338.
- Lord, R.V., Brabender, J., Gandara, D., Alberola, V., Camps, C., Domine, M., Cardenal, F., Sanchez, J.M., Gumerlock, P.H., Taron, M., Sanchez, J. J., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., and Rosell, R. (2002). Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 8, 2286-2291.
- Ludwig, J.A., Szakacs, G., Martin, S.E., Chu, B.F., Cardarelli, C., Sauna, Z.E., Caplen, N.J., Fales, H.M., Ambudkar, S.V., Weinstein, J.N., *et al.* (2006). Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res* 66, 4808-4815.
- Makin, G., and Dive, C. (2001). Modulating sensitivity to drug-induced apoptosis: the future for chemotherapy? *Breast Cancer Res* 3, 150-153.

- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., and Schellens, J.H. (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.B., Buyse, F., Hou, Y.X., Gustot, A., Riordan, J.R., and Ruyschaert, J.M. (2003). Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem* 278, 3347-3356.
- Mannering, D.E., Sharma, S., and Davidson, A.L. (2001). Demonstration of conformational changes associated with activation of the maltose transport complex. *J Biol Chem* 276, 12362-12368.
- Marsh, S., and McLeod, H.L. (2001). Thymidylate synthase pharmacogenetics in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 1, 175-178; discussion 179-181.
- Marthinet, E., Divita, G., Bernaud, J., Rigal, D., and Baggetto, L.G. (2000). Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter. *Gene Ther* 7, 1224-1233.
- Martin, C., Berridge, G., Higgins, C.F., and Callaghan, R. (1997). The multi-drug resistance reversal agent SR33557 and modulation of vinca alkaloid binding to P-glycoprotein by an allosteric interaction. *Br J Pharmacol* 122, 765-771.
- Martin, C., Berridge, G., Higgins, C.F., Mistry, P., Charlton, P., and Callaghan, R. (2000a). Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 58, 624-632.
- Martin, C., Berridge, G., Mistry, P., Higgins, C., Charlton, P., and Callaghan, R. (2000b). Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* 39, 11901-11906.
- Martin, C.M., Ferdous, A., Gallardo, T., Humphries, C., Sadek, H., Caprioli, A., Garcia, J.A., Szweda, L.I., Garry, M.G., and Garry, D.J. (2008). Hypoxia-inducible factor-2alpha transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circ Res* 102, 1075-1081.
- Materna, V., Liedert, B., Thomale, J., and Lage, H. (2005). Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int J Cancer* 115, 393-402.
- Materna, V., Stege, A., Surowiak, P., Pribsch, A., and Lage, H. (2006). RNA interference-triggered reversal of ABCC2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 153-157.
- Matsson, P., Englund, G., Ahlin, G., Bergstrom, C.A., Norinder, U., and Artursson, P. (2007). A global drug inhibition pattern for the human ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (ABCG2). *J Pharmacol Exp Ther* 323, 19-30.
- McDevitt, C.A., Collins, R.F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I.D., Ford, R.C., and Callaghan, R. (2006). Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* 14, 1623-1632.
- McDevitt, C.A., Crowley, E., Hobbs, G., Starr, K.J., Kerr, I.D., and Callaghan, R. (2008). Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2? *FEBS J* 275, 4354-4362.

- Meijer, C., Mulder, N.H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W.J., Meersma, G.J., and de Vries, E.G. (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* 52, 6885-6889.
- Meisser, A. (2002). [Dear colleagues]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 144, 517.
- Metzger, R., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Lenz, H.J., Hayashi, K., Groshen, S., Salonga, D., Cohen, H., Laine, L., Crookes, P., Silberman, H., Baranda, J.
- Konda, B., and Leichman, L.I. (1998). ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 16, 309-316.
- Meyers, M.B., Rittmann-Grauer, L., O'Brien, J.P., and Safa, A.R. (1989). Characterization of monoclonal antibodies recognizing a Mr 180,000 P-glycoprotein: differential expression of the Mr 180,000 and Mr 170,000 P-glycoproteins in multidrug-resistant human tumor cells. *Cancer Res* 49, 3209-3214.
- Michael, J.P. (2005). Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat Prod Rep* 22, 627-646.
- Mistry, P., and Folkes, A. (2002). ONT-093 (Ontogen). *Curr Opin Investig Drugs* 3, 1666-1671.
- Mistry, P., Stewart, A.J., Dangerfield, W., Okiji, S., Liddle, C., Bootle, D., Plumb, J.A., Templeton, D., and Charlton, P. (2001). In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res* 61, 749-758.
- Mitomo, H., Kato, R., Ito, A., Kasamatsu, S., Ikegami, Y., Kii, I., Kudo, A., Kobatake, E., Sumino, Y., and Ishikawa, T. (2003). A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: critical role of arginine-482 in methotrexate transport. *Biochem J* 373, 767-774.
- Miwa, M., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Asada, S., Imai, Y., and Sugimoto, Y. (2003). Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants. *Int J Cancer* 107, 757-763.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. E. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 59, 8-13.
- Miyoshi, Y., Ando, A., Takamura, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2002). Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *Int J Cancer* 97, 129-132.
- Mogi, M., Yang, J., Lambert, J.F., Colvin, G.A., Shiojima, I., Skurk, C., Summer, R., Fine, A., Quesenberry, P.J., and Walsh, K. (2003). Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. *J Biol Chem* 278, 39068-39075.
- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F., and Thomas, P.J. (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.
- Morschhauser, F., Zinzani, P.L., Burgess, M., Sloots, L., Bouafia, F., and Dumontet, C. (2007). Phase I/II trial of a P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride

- (LY335979), given orally in combination with the CHOP regimen in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 48, 708-715.
- Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L., and Aubourg, P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361, 726-730.
- Mourez M, J.M., Hofnung M et Dassa E (2000). Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *médecine/sciences* 16, 386-394.
- Muller, H., Pajeva, I.K., Globisch, C., and Wiese, M. (2008). Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg Med Chem* 16, 2448-2462.
- Munteanu, E., Verdier, M., Grandjean-Forestier, F., Stenger, C., Jayat-Vignoles, C., Huet, S., Robert, J., and Ratinaud, M.H. (2006). Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochem Pharmacol* 71, 1162-1174.
- Nadali, F., Pourfathollah, A.A., Alimoghaddam, K., Nikougoftar, M., Rostami, S., Dizaji, A., Azizi, E., Zomorodipour, A., and Ghavamzadeh, A. (2007). Multidrug resistance inhibition by antisense oligonucleotide against MDR1/mRNA in P-glycoprotein expressing leukemic cells. *Hematology* 12, 393-401.
- Nakagawa, H., Tamura, A., Wakabayashi, K., Hoshijima, K., Komada, M., Yoshida, T., Kometani, S., Matsubara, T., Mikuriya, K., and Ishikawa, T. (2008). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *Biochem J* 411, 623-631.
- 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.
- Nakanishi, T., Shiozawa, K., Hassel, B.A., and Ross, D.D. (2006). Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood* 108, 678-684.
- Neumann, L., Abele, R., and Tampe, R. (2002). Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Mol Biol* 324, 965-973.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Cai, X., Rosenberg, M.F., and Mao, Q. Transmembrane helices 1 and 6 of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): identification of polar residues important for drug transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C1100-1109.
- Ni, Z., Mark, M.E., Cai, X., and Mao, Q. (2010). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis demonstrates dimer/oligomer formation of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in intact cells. *Int J Biochem Mol Biol* 1, 1-11.
- Nicholson, K.M., Quinn, D.M., Kellett, G.L., and Warr, J.R. (2003). LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, causes preferential induction of apoptosis in human multidrug resistant cells. *Cancer Lett* 190, 31-36.
- Nikaido, K., Liu, P.Q., and Ames, G.F. (1997). Purification and characterization of HisP, the ATP-binding subunit of a traffic ATPase (ABC transporter), the histidine permease of *Salmonella typhimurium*. Solubility, dimerization, and ATPase activity. *J Biol Chem* 272, 27745-27752.

- Nobili, S., Landini, I., Giglioni, B., and Mini, E. (2006). Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 7, 861-879.
- O'Connor, R., O'Leary, M., Ballot, J., Collins, C.D., Kinsella, P., Mager, D.E., Arnold, R.D., O'Driscoll, L., Larkin, A., Kennedy, S., Fennelly, D., Clynes, M., and Crown, J. (2007). A phase I clinical and pharmacokinetic study of the multi-drug resistance protein-1 (MRP-1) inhibitor sulindac, in combination with epirubicin in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 59, 79-87.
- O'Gorman, S., Fox, D.T., and Wahl, G.M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251, 1351-1355.
- Okabe, M., Szakacs, G., Reimers, M.A., Suzuki, T., Hall, M.D., Abe, T., Weinstein, J.N., and Gottesman, M.M. (2008). Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol Cancer Ther* 7, 3081-3091.
- Oldham, R. (2007). Safety and efficacy study of CBT-1 and paclitaxel with carboplatin in patients with advanced inoperable non-small cell lung cancer.
- Oldham, R.K., Reid, W.K., and Barnett, D. (2000). Phase I study of CBT-1 and Taxol in patients with Taxol resistant cancers. *Cancer Biother Radiopharm* 15, 153-159.
- Oldham, R.K., Reid, W.K., Preisler, H.D., and Barnett, D. (1998). A phase I and pharmacokinetic study of CBT-1 as a multidrug resistance modulator in the treatment of patients with advanced cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 13, 71-80.
- Orelle, C., Dalmás, O., Gros, P., DiPietro, A. and Jault, J.M. (2003). The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J Biol Chem*, 278, 47002-47008.
- Orlowski S., Mir L.M., Belehradek J. Jr and Garrigos M. (1996). Effects of steroids and verapamil on P-glycoprotein ATPase activity: progesterone, desoxycorticosterone, corticosterone and verapamil are mutually non-exclusive modulators. *Biochem J* 317, 515-22.
- Ozvegy-Laczka, C., Cserepes, J., Elkind, N.B., and Sarkadi, B. (2005). Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist Updat* 8, 15-26.
- 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.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J., and Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341, 209-214.
- Pajeva, I.K., Globisch, C., and Wiese, M. (2009). Comparison of the inward- and outward-open homology models and ligand binding of human P-glycoprotein. *FEBS J* 276, 7016-7026.
- Panagiotidis, C.H., Reyes, M., Sievertsen, A., Boos, W., and Shuman, H.A. (1993). Characterization of the structural requirements for assembly and nucleotide binding of an ATP-binding cassette transporter. The maltose transport system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268, 23685-23696.

- Park, S., and James, C.D. (2003). Lanthionine synthetase components C-like 2 increases cellular sensitivity to adriamycin by decreasing the expression of P-glycoprotein through a transcription-mediated mechanism. *Cancer Res* 63, 723-727.
- Pascaud C, Garrigos M, Orlowski S. (1998). Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *Biochem J* 333, 351-8.
- Paul, C., Liliemark, J., Tidefelt, U., Gahrton, G., and Peterson, C. (1989). Pharmacokinetics of daunorubicin and doxorubicin in plasma and leukemic cells from patients with acute nonlymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit* 11, 140-148.
- Pearson, J.W., Fogler, W.E., Volker, K., Usui, N., Goldenberg, S.K., Gruys, E., Riggs, C.W., Komschlies, K., Wiltrout, R.H., Tsuruo, T., Pastan, I., Gottesman, M.M., and Longo D.L. (1991). Reversal of drug resistance in a human colon cancer xenograft expressing MDR1 complementary DNA by in vivo administration of MRK-16 monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst* 83, 1386-1391.
- Perego, P., De Cesare, M., De Isabella, P., Carenini, N., Beggiolin, G., Pezzoni, G., Palumbo, M., Tartaglia, L., Pratesi, G., Pisano, C., Carminati, P., Scheffer, G. L., and Zunino, F. (2001). A novel 7-modified camptothecin analog overcomes breast cancer resistance protein-associated resistance in a mitoxantrone-selected colon carcinoma cell line. *Cancer Res* 61, 6034-6037.
- Perrotton, T., Trompier, D., Chang, X.B., Di Pietro, A., and Baubichon-Cortay, H. (2007). (R)- and (S)-verapamil differentially modulate the multidrug-resistant protein MRP1. *J Biol Chem* 282, 31542-31548.
- Petronilli, V., and Ames, G.F. (1991). Binding protein-independent histidine permease mutants. Uncoupling of ATP hydrolysis from transmembrane signaling. *J Biol Chem* 266, 16293-16296.
- Pichler, A., Zelcer, N., Prior, J.L., Kuil, A.J., and Piwnica-Worms, D. (2005). In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 11, 4487-4494.
- Polgar, O., Ierano, C., Tamaki, A., Stanley, B., Ward, Y., Xia, D., Tarasova, N., Robey, R.W., and Bates, S.E. (2010). Mutational analysis of threonine 402 adjacent to the GXXXG dimerization motif in transmembrane segment 1 of ABCG2. *Biochemistry* 49, 2235-2245.
- Polgar, O., Ozvegy-Laczka, C., Robey, R.W., Morisaki, K., Okada, M., Tamaki, A., Koblos, G., Elkind, N.B., Ward, Y., Dean, M., Sarkadi, B., and Bates, S. E. (2006). Mutational studies of G553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization. *Biochemistry* 45, 5251-5260.
- Polgar, O., Robey, R.W., Morisaki, K., Dean, M., Michejda, C., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V., Tarasova, N., and Bates, S.E. (2004). Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry* 43, 9448-9456.
- Pozza, A., Perez-Victoria, J.M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A., and Di Pietro, A. (2006). Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cell Mol Life Sci* 63, 1912-1922.
- Pribsch, A., Rompe, F., Tonnies, H., Kowalski, P., Surowiak, P., Stege, A., Materna, V., and Lage, H. (2006). Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. *Oligonucleotides* 16, 263-274.

- Qadir, M., O'Loughlin, K.L., Fricke, S.M., Williamson, N.A., Greco, W.R., Minderman, H., and Baer, M.R. (2005). Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin Cancer Res* 11, 2320-2326.
- Quioco, F.A., and Ledvina, P.S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol* 20, 17-25.
- Rabindran, S.K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K.I., Annable, T., and Greenberger, L.M. (1998). Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res* 58, 5850-5858.
- Rabindran, S.K., Ross, D.D., Doyle, L.A., Yang, W., and Greenberger, L.M. (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 60, 47-50.
- Rajagopal, A., and Simon, S.M. (2003). Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell* 14, 3389-3399.
- Ramaen, O., Leulliot, N., Sizun, C., Ulryck, N., Pamlard, O., Lallemand, J.Y., 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.
- Relling, M.V. (1996). Are the major effects of P-glycoprotein modulators due to altered pharmacokinetics of anticancer drugs? *Ther Drug Monit* 18, 350-356.
- Ren, Y., Wang, Y., Zhang, Y., and Wei, D. (2008). Overcoming multidrug resistance in human carcinoma cells by an antisense oligodeoxynucleotide--doxorubicin conjugate in vitro and in vivo. *Mol Pharm* 5, 579-587.
- Reyno, L., Seymour, L., Tu, D., Dent, S., Gelmon, K., Walley, B., Pluzanska, A., Gorbunova, V., Garin, A., Jassem, J., Pienkowski, T., Dancey, J., Pearce, L., MacNeil, M., Marlin, S., Lebwohl, D., Voi, M., and Pritchard, K. (2004). Phase III study of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl) phenoxy]ethanamine (BMS-217380-01) combined with doxorubicin versus doxorubicin alone in metastatic/recurrent breast cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA.19. *J Clin Oncol* 22, 269-276.
- Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., and Ling, V. (1985). Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316, 817-819.
- Robert, J. (1994). Proposals for concomitant use of several modulators of multidrug resistance in clinics. *Anticancer Res* 14, 2371-2373.
- Robert, J., and Jarry, C. (2003). Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* 46, 4805-4817.
- Robey, R.W., Honjo, Y., Morisaki, K., Nadjem, T.A., Runge, S., Risbood, M., Poruchynsky, M.S., and Bates, S.E. (2003). Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* 89, 1971-1978.
- Robey, R.W., Medina-Perez, W.Y., Nishiyama, K., Lahusen, T., Miyake, K., Litman, T., Senderowicz, A.M., Ross, D.D., and Bates, S.E. (2001). Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 7, 145-152.

- Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., and Bates, S.E. (2004). Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* 64, 1242-1246.
- Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, E.L., Yang, C.H., Litman, T., Bates, S.E., and Schneider, E. (2000). The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 42-46.
- Rochat, B. (2009). Importance of influx and efflux systems and xenobiotic metabolizing enzymes in intratumoral disposition of anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 652-674.
- Rodriguez, R., Ritter, M.A., Fowler, J.F., and Kinsella, T.J. (1994). Kinetics of cell labeling and thymidine replacement after continuous infusion of halogenated pyrimidines in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29, 105-113.
- Roller, J., Laschke, M.W., Scheuer, C., et Menger, M.D. (2010). Heme oxygenase (HO)-1 protects from lipopolysaccharide (LPS)- mediated liver injury by inhibition of hepatic leukocyte accumulation and improvement of microvascular perfusion. *Langenbecks Arch Surg* 395, 387-394.
- Rowinsky, E.K., Smith, L., Wang, Y.M., Chaturvedi, P., Villalona, M., Campbell, E., Aylesworth, C., Eckhardt, S.G., Hammond, L., Kraynak, M., Drengler, R., Stephenson, J., Jr., Harding, M. W., and Von Hoff, D. D. (1998). Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel in combination with biricodar, a novel agent that reverses multidrug resistance conferred by overexpression of both MDR1 and MRP. *J Clin Oncol* 16, 2964-2976.
- Rumpold, H., Wolf, A.M., Gruenewald, K., Gastl, G., Gunsilius, E., and Wolf, D. (2005). RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. *Exp Hematol* 33, 767-775.
- Saeki, T., Nomizu, T., Toi, M., Ito, Y., Noguchi, S., Kobayashi, T., Asaga, T., Minami, H., Yamamoto, N., Aogi, K., Ikeda, T., Ohashi, Y., Sato, W., and Tsuruo, T. (2007). Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Clin Oncol* 25, 411-417.
- Saito, T., Zhang, Z.J., Ohtsubo, T., Noda, I., Shibamori, Y., Yamamoto, T., and Saito, H. (2001). Homozygous disruption of the mdrla P-glycoprotein gene affects blood-nerve barrier function in mice administered with neurotoxic drugs. *Acta Otolaryngol* 121, 735-742.
- Sandberg, S., and Romslo, I. (1980). Porphyrin-sensitized photodynamic damage of isolated rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 593, 187-195.
- Sarkadi, B., Seprodi, J., Csuka, O., Magocsl, M., Teplan, I., Mezo, I., Palyi, I., Vadasz, Z., Vlnce, B. (1998). Compounds for reversing drug resistance. United states patent *patent N° US 6,297,216 B1*.
- Saurin, W., Hofnung, M., and Dassa, E. (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 48, 22-41.
- Scala, S., Budillon, A., Zhan, Z., Cho-Chung, Y.S., Jefferson, J., Tsokos, M., and Bates, S.E. (1995). Downregulation of mdrl-1 expression by 8-Cl-cAMP in multidrug resistant MCF-7 human breast cancer cells. *J Clin Invest* 96, 1026-1034.

- Scheffel, F., Demmer, U., Warkentin, E., Hulsmann, A., Schneider, E., and Ermler, U. (2005). Structure of the ATPase subunit CysA of the putative sulfate ATP-binding cassette (ABC) transporter from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *FEBS Lett* 579, 2953-2958.
- Scheffer, G.L., Maliepaard, M., Pijnenborg, A.C., van Gastelen, M.A., de Jong, M.C., Schroeijers, A.B., van der Kolk, D.M., Allen, J.D., Ross, D.D., van der Valk, P., *et al.* (2000). Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res* 60, 2589-2593.
- Schinkel, A.H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 179-194.
- Schinkel, A.H., and Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 3-29.
- Schinkel, A.H., Kemp, S., Dolle, M., Rudenko, G., and Wagenaar, E. (1993). N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem* 268, 7474-7481.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., Berns A.J.M, and Borst P. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502.
- Schmees, G., Stein, A., Hunke, S., Landmesser, H., and Schneider, E. (1999). Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur J Biochem* 266, 420-430.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., Holland, I.B., and Stubbs, M.T. (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., and Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 22, 1-20.
- Schneider, E., Wilken, S., and Schmid, R. (1994). Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein. *J Biol Chem* 269, 20456-20461.
- Scotto, K.W. (2003). Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22, 7496-7511.
- Seelig, A. (1998). A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 251, 252-261.
- Senecoff, J.F., Bruckner, R.C., and Cox, M.M. (1985). The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7270-7274.
- Senior, A.E., and Bhagat, S. (1998). P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry* 37, 831-836.
- Seprdi J, M.I., Vadasz Z, Sarkadi B and Teplan I, (1998). Peptide derivatives against multidrug resistance. 24th European Peptide Symposium.
- Shah-Yukich, A.A., and Nelson, A.C. (1988). Characterization of solid tumor microvasculature: a three-dimensional analysis using the polymer casting technique. *Lab Invest* 58, 236-244.

- Shah, N.P., and Sawyers, C.L. (2003). Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 22, 7389-7395.
- Shapiro, A.B., Fox, K., Lam, P., and Ling, V. (1999). Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem* 259, 841-850.
- Shapiro, A.B., and Ling, V. (1997). Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* 250, 130-137.
- Sharom, F.J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9, 105-127.
- Sharom, F.J., Yu, X., DiDiodato, G., and Chu, J.W. (1996). Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem J* 320 (Pt 2), 421-428.
- Sharom, F.J., Yu, X., Lu, P., Liu, R., Chu, J.W., Szabo, K., Muller, M., Hose, C.D., Monks, A., Varadi, A., Seprodi, J., and Sarkadi, B. (1999). Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem Pharmacol* 58, 571-586.
- Shen, S., Callaghan, D., Juzwik, C., Xiong, H., Huang, P., and Zhang, W. (2010). ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 114, 1590-1604.
- Shukla, S., Wu, C.P., and Ambudkar, S.V. (2008). Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 205-223.
- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., and Ames, G.F. (1991). Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* 266, 18714-18719.
- Sissung, T.M., Baum, C.E., Kirkland, C.T., Gao, R., Gardner, E.R., and Figg, W.D. (2010). Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. *Mol Biotechnol* 44, 152-167.
- Slater, L., Sweet, P., Wetzel, M., Stupecky, M., and Osann, K. (1995). Comparison of cyclosporin A, verapamil, PSC-833 and cremophor EL as enhancing agents of VP-16 in murine lymphoid leukemias. *Leuk Res* 19, 543-548.
- Smith, N.F., Figg, W.D., and Sparreboom, A. (2006). Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. *Toxicol In Vitro* 20, 163-175.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (2002). ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10, 139-149.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Smriti, Zou, P., and McHaourab, H.S. (2009). Mapping daunorubicin-binding Sites in the ATP-binding cassette transporter MsbA using site-specific quenching by spin labels. *J Biol Chem* 284, 13904-13913.
- Solazzo, M., Fantappie, O., D'Amico, M., Sassoli, C., Tani, A., Cipriani, G., Bogani, C., Formigli, L., and Mazzanti, R. (2009). Mitochondrial expression and functional activity of

breast cancer resistance protein in different multiple drug-resistant cell lines. *Cancer Res* 69, 7235-7242.

Sonveaux, N., Vigano, C., Shapiro, A.B., Ling, V., and Ruyschaert, J.M. (1999). Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem* 274, 17649-17654.

Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Rosti, G., Castagnetti, F., Poerio, A., Iacobucci, I., Amabile, M., Abruzzese, E., Orlandi, E., Radaelli, F., Ciccone, F., Tiribelli, M., di Lorenzo, R., Caracciolo, C., Izzo, B., Pane, F., Saglio, G., Baccarani, M., and Martinelli, G.. (2006). Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 12, 7374-7379.

Sparreboom, A., van Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, A.H., Smit, J.W., Meijer, D.K., Borst, P., Nooijen, W.J., Beijnen, J.H., and van Tellingen, O. (1997). Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2031-2035.

Spoelstra, E.C., Westerhoff, H.V., Pinedo, H.M., Dekker, H., and Lankelma, J. (1994). The multidrug-resistance-reverser verapamil interferes with cellular P-glycoprotein-mediated pumping of daunorubicin as a non-competing substrate. *Eur J Biochem* 221, 363-373.

Stege, A., Pribsch, A., Nieth, C., and Lage, H. (2004). Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther* 11, 699-706.

Stewart, A., Steiner, J., Mellows, G., Laguda, B., Norris, D., and Bevan, P. (2000). Phase I trial of XR9576 in healthy volunteers demonstrates modulation of P-glycoprotein in CD56+ lymphocytes after oral and intravenous administration. *Clin Cancer Res* 6, 4186-4191.

Stewart, A.J., Canitrot, Y., Baracchini, E., Dean, N.M., Deeley, R.G., and Cole, S.P. (1996). Reduction of expression of the multidrug resistance protein (MRP) in human tumor cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Biochem Pharmacol* 51, 461-469.

Stewart, C.F., Leggas, M., Schuetz, J.D., Panetta, J.C., Cheshire, P.J., Peterson, J., Daw, N., Jenkins, J.J., 3rd, Gilbertson, R., Germain, G.S., Harwood, F. C., and Houghton, P. J. (2004). Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Res* 64, 7491-7499.

Stierle, V., Laigle, A., and Jolles, B. (2005). Modulation of MDR1 gene expression in multidrug resistant MCF7 cells by low concentrations of small interfering RNAs. *Biochem Pharmacol* 70, 1424-1430.

Story, R.M., and Steitz, T.A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* 355, 374-376.

Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M. S., Kagalwalla, A. F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N. B., Gardiner, R. M., and Thompson, R. J. (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 20, 233-238.

Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Imai, Y., Ueda, K., and Tsuruo, T. (2003). Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists. *Mol Cancer Ther* 2, 105-112.

- Sullivan, G.F., Yang, J.M., Vassil, A., Yang, J., Bash-Babula, J., and Hait, W.N. (2000). Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells. *J Clin Invest* 105, 1261-1267.
- Sun, J., He, Z.G., Cheng, G., Wang, S.J., Hao, X.H., and Zou, M.J. (2004). Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit* 10, RA5-14.
- Susanto, J., Lin, Y.H., Chen, Y.N., Shen, C.R., Yan, Y.T., Tsai, S.T., Chen, C.H., and Shen, C.N. (2008). Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. *PLoS One* 3, e4023.
- Suzuki, M., Suzuki, H., Sugimoto, Y., and Sugiyama, Y. (2003). ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278, 22644-22649.
- Synold, T.W., Dussault, I., and Forman, B.M. (2001). The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 7, 584-590.
- Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., and Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5, 219-234.
- Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C., and Sarkadi, B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 13, 379-393.
- Tafech, A., Bassett, T., Sparanese, D., and Lee, C.H. (2006). Destroying RNA as a therapeutic approach. *Curr Med Chem* 13, 863-881.
- Taguchi, Y., Morishima, M., Komano, T., and Ueda, K. (1997). Amino acid substitutions in the first transmembrane domain (TM1) of P-glycoprotein that alter substrate specificity. *FEBS Lett* 413, 142-146.
- 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.
- Tamura, A., Wakabayashi, K., Onishi, Y., Nakagawa, H., Tsuji, M., Matsuda, Y., and Ishikawa, T. (2006). Genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2: development of the standard method for functional validation of SNPs by using the FLP recombinase system. *J Exp Ther Oncol* 6, 1-11.
- Tanabe, M., Ieiri, I., Nagata, N., Inoue, K., Ito, S., Kanamori, Y., Takahashi, M., Kurata, Y., Kigawa, J., Higuchi, S., Terakawa, N., and Otsubo, K. (2001). Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 1137-1143.
- Tannock, I.F. (1968). The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 22, 258-273.
- Tarasova, N.I., Seth, R., Tarasov, S.G., Kosakowska-Cholody, T., Hrycyna, C.A., Gottesman, M.M., and Michejda, C.J. (2005). Transmembrane inhibitors of P-glycoprotein, an ABC transporter. *J Med Chem* 48, 3768-3775.
- te Boekhorst, P.A., van Kapel, J., Schoester, M., and Sonneveld, P. (1992). Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 30, 238-242.

- Teicher, B.A., Herman, T.S., Holden, S.A., Wang, Y.Y., Pfeffer, M.R., Crawford, J.W., and Frei, E., 3rd (1990). Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* 247, 1457-1461.
- Thiagalingam, S., and Grossman, L. (1993). The multiple roles for ATP in the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease-catalyzed incision reaction. *J Biol Chem* 268, 18382-18389.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7735-7738.
- Thomas, J., Wang, L., Clark, R.E., and Pirmohamed, M. (2004). Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 104, 3739-3745.
- Thomas, P.M., Cote, G.J., Wohllk, N., Haddad, B., Mathew, P.M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R.F., and Bryan, J. (1995). Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268, 426-429.
- Thomlinson, R.H., and Gray, L.H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9, 539-549.
- Tian, X., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, P., and Brouwer, K.L. (2004). Modulation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and Mrp3 expression and function with small interfering RNA in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 66, 1004-1010.
- Tranchand, B., Catimel, G., Lucas, C., Sarkany, M., Bastian, G., Evène, E., Guastalla, J.P., Negrier, S., Rebattu, P., Dumortier, A., Foy, M., Grossin, F., Mazier, B., Froudarakis, M., Barbet, N., Clavel, M., and Ardiet, C. (1998). Phase I clinical and pharmacokinetic study of S9788, a new multidrug-resistance reversal agent given alone and in combination with doxorubicin to patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 41, 281-291.
- Trock, B.J., Leonessa, F., and Clarke, R. (1997). Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 89, 917-931.
- Trometer, C., and Falson, P. Mammalian membrane protein expression in baculovirus-infected insect cells. *Methods Mol Biol* 601, 105-117.
- Trompier, D., Chang, X.B., 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.
- Tsai, C.J., Sauna, Z.E., Kimchi-Sarfaty, C., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M., and Nussinov, R. (2008). Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *J Mol Biol* 383, 281-291.
- Tsuruo, T., Hamada, H., Sato, S., and Heike, Y. (1989). Inhibition of multidrug-resistant human tumor growth in athymic mice by anti-P-glycoprotein monoclonal antibodies. *Jpn J Cancer Res* 80, 627-631.
- 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.
- Turella, P., Filomeni, G., Dupuis, M.L., Ciriolo, M.R., Molinari, A., De Maria, F., Tombesi, M., Cianfriglia, M., Federici, G., Ricci, G., and Caccuri, A. M. (2006). A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the P-glycoprotein-mediated resistance in tumor cells. 6-(7-

- Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells. *J Biol Chem* 281, 23725-23732.
- Twentyman, P.R., and Bleehen, N.M. (1991). Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin [corrected]. *Eur J Cancer* 27, 1639-1642.
- Tyzack, J.K., Wang, X., Belsham, G.J., and Proud, C.G. (2000). ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* 275, 34131-34139.
- Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T., and Hori, R. (1992). Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 267, 24248-24252.
- Ueda, K., Taguchi, Y., and Morishima, M. (1997). How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol* 8, 151-159.
- van der Heide, T., and Poolman, B. (2002). ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep* 3, 938-943.
- van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., and van Meer, G. (1996). MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87, 507-517.
- van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J.W., Rosing, H., Beijnen, J.H., and Schinkel, A.H. (2007). Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol* 27, 1247-1253.
- van Vlerken, L.E., Duan, Z., Seiden, M.V., and Amiji, M.M. (2007). Modulation of intracellular ceramide using polymeric nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer. *Cancer Res* 67, 4843-4850.
- van Zuylen, L., Sparreboom, A., van der Gaast, A., van der Burg, M.E., van Beurden, V., Bol, C.J., Woestenborghs, R., Palmer, P.A., and Verweij, J. (2000). The orally administered P-glycoprotein inhibitor R101933 does not alter the plasma pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res* 6, 1365-1371.
- Verdon, G., Albers, S.V., Dijkstra, B.W., Driessen, A.J., and Thunnissen, A.M. (2003). Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J Mol Biol* 330, 343-358.
- Vlaming, M.L., Lagas, J.S., and Schinkel, A.H. (2009). Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 14-25.
- Volk, E.L., Farley, K.M., Wu, Y., Li, F., Robey, R.W., and Schneider, E. (2002). Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* 62, 5035-5040.
- Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y., and Kuwano, M. (1998). Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* 7, 203-207.
- Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Furukawa, T., Nakagawa, H., and Ishikawa, T. (2009). Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 66-72.

- Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Adachi, T., Kii, I., Kobatake, E., Kudo, A., and Ishikawa, T. (2006). Identification of cysteine residues critically involved in homodimer formation and protein expression of human ATP-binding cassette transporter ABCG2: a new approach using the flp recombinase system. *J Exp Ther Oncol* 5, 205-222.
- Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Tamura, A., Koshiba, S., Hoshijima, K., Komada, M., and Ishikawa, T. (2007). Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J Biol Chem* 282, 27841-27846.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-951.
- Wang, H., Lee, E.W., Cai, X., Ni, Z., Zhou, L., and Mao, Q. (2008). Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry* 47, 13778-13787.
- Wang, Q., and Beck, W.T. (1998). Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res* 58, 5762-5769.
- Ward, A., Reyes, C.L., Yu, J., Roth, C.B., and Chang, G. (2007). Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19005-19010.
- Warr, J.R., Anderson, M., and Fergusson, J. (1988). Properties of verapamil-hypersensitive multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 48, 4477-4483.
- Warr, J.R., Bamford, A., and Quinn, D.M. (2002). The preferential induction of apoptosis in multidrug-resistant KB cells by 5-fluorouracil. *Cancer Lett* 175, 39-44.
- Watanabe, T., Naito, M., Kokubu, N., and Tsuruo, T. (1997). Regression of established tumors expressing P-glycoprotein by combinations of adriamycin, cyclosporin derivatives, and MRK-16 antibodies. *J Natl Cancer Inst* 89, 512-518.
- Wattel, E., Solary, E., Hecquet, B., Caillot, D., Ifrah, N., Brion, A., Milpied, N., Janvier, M., Guerci, A., Rochant, H., *et al.* (1999). Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study. Groupe Francais des Myelodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS. *Adv Exp Med Biol* 457, 35-46.
- Widmer, N., Rumpold, H., Untergasser, G., Fayet, A., Buclin, T., and Decosterd, L.A. (2007). Resistance reversal by RNAi silencing of MDR1 in CML cells associated with increase in imatinib intracellular levels. *Leukemia* 21, 1561-1562; author reply 1562-1564.
- Wolf, D.C., and Horwitz, S.B. (1992). P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *Int J Cancer* 52, 141-146.
- Wu, C.P., Calcagno, A.M., and Ambudkar, S.V. (2008). Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol* 1, 93-105.
- Xu, D., Ye, D., Fisher, M., and Juliano, R.L. (2002). Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 963-971.
- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., and Zhang, J.T. (2004). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* 279, 19781-19789.

- Xu, J., Peng, H., Chen, Q., Liu, Y., Dong, Z., and Zhang, J.T. (2007). Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity. *Cancer Res* 67, 4373-4381.
- Yamada, T., Takaoka, A.S., Naishiro, Y., Hayashi, R., Maruyama, K., Maesawa, C., Ochiai, A., and Hirohashi, S. (2000). Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 60, 4761-4766.
- Yanase, K., Tsukahara, S., Asada, S., Ishikawa, E., Imai, Y., and Sugimoto, Y. (2004). Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 3, 1119-1125.
- Yang, C.P., DePinho, S.G., Greenberger, L.M., Arceci, R.J., and Horwitz, S.B. (1989). Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* 264, 782-788.
- Yi, S.Y., Hong, K.S., Lim, H.S., Chung, J.Y., Oh, D.S., Kim, J.R., Jung, H.R., Cho, J.Y., Yu, K.S., Jang, I.J., and Shin, S. G. (2004). A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. *Clin Pharmacol Ther* 76, 418-427.
- Yoshida, M., and Amano, T. (1995). A common topology of proteins catalyzing ATP-triggered reactions. *FEBS Lett* 359, 1-5.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Youn, C.K., Kim, M.H., Cho, H.J., Kim, H.B., Chang, I.Y., Chung, M.H., and You, H.J. (2004). Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res* 64, 4849-4857.
- Yu, L.J., Matias, J., Scudiero, D.A., Hite, K.M., Monks, A., Sausville, E.A., and Waxman, D.J. (2001). P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. *Drug Metab Dispos* 29, 304-312.
- Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., Millen, L., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (2001). The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem* 276, 32313-32321.
- Zhang, J.Y., Wang, Y., and Prakash, C. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes in human lung. *Curr Drug Metab* 7, 939-948.
- Zhang, S., Yang, X., and Morris, M.E. (2004). Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol Pharmacol* 65, 1208-1216.
- Zhang, W., Han, Y., Lim, S.L., and Lim, L.Y. (2009). Dietary regulation of P-gp function and expression. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 789-801.
- Zhang, Y., Wang, H., Unadkat, J.D., and Mao, Q. (2007). Breast cancer resistance protein 1 limits fetal distribution of nitrofurantoin in the pregnant mouse. *Drug Metab Dispos* 35, 2154-2158.
- Zhou, S., Morris, J.J., Barnes, Y., Lan, L., Schuetz, J.D., and Sorrentino, B.P. (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, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B. P. (2001). The ABC

Références bibliographiques

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.

Zhou, S., Zong, Y., Ney, P.A., Nair, G., Stewart, C.F., and Sorrentino, B.P. (2005). Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood* 105, 2571-2576.

Zhou, T., Radaev, S., Rosen, B.P., and Gatti, D.L. (2000). Structure of the ArsA ATPase: the catalytic subunit of a heavy metal resistance pump. *EMBO J* 19, 4838-4845.

COMMUNICATIONS

COMMUNICATIONS

1. 2nd Symposium on Enzymes and Biocatalysis-2011

« Set up of non competitive inhibitors for blocking the human P-gp and BCRP mediated drug efflux » ; *Pierre Falson, Ophélie Arnaud, Lorena Martinez, Sarah Fernandez, Laurent Ettouati, Marie Emmanuelle Million, Raphaël Terreux, Léa Payen, Attilio Di Pietro and Joelle Paris.*

2. 14^{ème} édition de la Journée ARC Jeunes Chercheurs (JAJC), Paris, France

« L'ABC du cancer du sein » ; *Ophélie Arnaud, Léa Payen, Emmanuelle Million, Charles Dumontet, Attilio Di Pietro, Joëlle Paris, et Pierre Falson.*

3. 3rd FEBS special meeting on ABC proteins, Innsbruck, Autriche, February 27th-March 5th 2010

« Design of a non-competitive peptidomimetic inhibitor of both H and R drug transport sites of the multidrug resistance P-glycoprotein » ; *Ophélie Arnaud, Ali Koubeissi, Laurent Ettouati, Raphaël Terreux, Attilio Di Pietro, Joëlle Paris and Pierre Falson.*

4. 7^{ème} colloque Franco-Belge des transporteurs ABC, Paris, France, octobre 2009

« Les azapeptides : une nouvelle classe d'inhibiteurs des transporteurs multidrogues P-gp et BCRP » ; *Ophélie Arnaud, Léa Payen, Emmanuelle Million, Charles Dumontet, Attilio Di Pietro, Joëlle Paris, et Pierre Falson.*

5. 36^{ème} forum des jeunes chercheurs et au congrès annuel de la SFBBM, Nancy, France, Août 2009

« Nouveaux peptidomimétiques chimiosensibilisants des transporteurs P-gp et BCRP » ; *Ophélie Arnaud, Léa Payen, Emmanuelle Million, Charles Dumontet, Attilio Di Pietro, Joëlle Paris, et Pierre Falson.*

6. 14^{ème} journée de l'EDISS, Lyon, France, 11 mars 2009

« Nouveaux inhibiteurs des transporteurs ABCB1 et ABCG2 responsable de la résistance à de multiples drogues » ; *Ophélie Arnaud, Léa Payen, Emmanuelle Million, Charles Dumontet, Attilio Di Pietro, Joëlle Paris, et Pierre Falson.*

7. Bio-innovation Day 08- Lyon Edition, 1 décembre 2008, Lyon, France

« News potent chemosensitizers of the Multidrug-resistance ABC transporters P-gp and BCRP » ; *Ophélie Arnaud, Attilio Di Pietro, Pierre Falson and Joëlle Paris.*

8. 15^{ème} congrès du Groupe Français des Peptides et Protéines, Dinard, France, mai 2007 ; « Synthèse d'azadipeptides susceptibles d'inverser la chimiorésistance de type MDR » *Emilie Racine, Nicolas Charrier, Ophélie Arnaud, Marie-Emmanuelle Million, Thierry Lomberget¹, Pierre Falson, Attilio DiPietro et Joëlle Paris.*

PUBLICATIONS

Publications et Brevets internationaux

Brevets

- **Brevet international PCT/FR2010/052095** : « Modulateurs peptidomimétiques non compétitifs de la glycoprotéine P »

Ophélie Arnaud, Ali Koubeissi, Laurent Ettouati, Joëlle Paris, Attilio Di Pietro et Pierre Falson

- **Brevet international N°PCT-FR2010-050107**, 25 janvier 2010

« Nouveaux composés de type azapeptide ou azapeptidomimétique, inhibiteurs de BCRP et/ou P-gp »

Joëlle Paris, Pierre Falson, Attilio Di Pietro, Ophélie Arnaud and Emmanuelle Million ,

Publications

- **Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: *in vitro* optimization and *in vivo* validation**, Ahcène Boumendjel, Sira Macalou, Glaucio Valdameri, Alexandre Pozza, Charlotte Gauthie¹, Ophélie Arnaud, Edwige Nicolle, Sandrine Magnard, Pierre Falson, Raphaël Terreux, Pierre-Alain Carrupt, Léa Payen and Attilio Di Pietro: *revue soumise à Current Medicinal Chemistry*.

- **The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan**, Arnaud O, Boumendjel A, Gèze A, Honorat M, Matera EL, Guitton J, Stein WD, Bates SE, Falson P, Dumontet C, Di Pietro A, Payen L, *Eur J Cancer.*, 2011, **47**, 640-8

- **The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes**, Dezi M, Fribourg PF, Di Cicco A, Arnaud O, Marco S, Falson P, Di Pietro A, Lévy D, *Biochim Biophys Acta.*, 2010, **798**, 2094-101

- **ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop**, Desuzinges-Mandon E, Arnaud O, Martinez L, Huché F, Di Pietro A, Falson P, *J Biol Chem.*, 2010, **285**, 33123-33

- **Potent and fully noncompetitive peptidomimetic inhibitor of multidrug resistance P-glycoprotein**, Arnaud O, Koubeissi A, Ettouati L, Terreux R, Alamé G, Grenot C, Dumontet C, Di Pietro A, Paris J, Falson P, *J Med Chem.*, 2010, **53**, 6720-9



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Accusé de réception

Par la présente, nous accusons réception de votre demande de traitement d'une demande internationale au titre du Traité de coopération en matière de brevets, comme suit:

Numéro de soumission	1000091075	
Numéro de demande PCT	PCT/FR2010/052095	
Date de réception	05 octobre 2010	
Office récepteur	Institut National de la Propriété Industrielle	
Votre référence	BIP133639PC0	
Demandeur	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS -	
Nombre de demandeurs	7	
Pays	FR	
Titre	MODULATEURS PEPTIDIQUES ET PEPTIDOMIMETIQUES NON COMPETITIFS SPECIFIQUES DE LA GLYCOPROTEINE P	
Documents produits	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-vlog.xml eolf-othd-000001.pdf (55 p.) eolf-appb-P000001.pdf (12 p.) pct101u.gml	eolf-requ.xml eolf-fees.xml pct101.GML eolf-abst.txt pct101.1WO referenc.inf
Effectué par	CN=Eric ENDERLIN (Novagraaf IP),O=NOVAGRAAF IP,C=FR	
Méthode de soumission	En ligne	
Date et heure de réception	05 octobre 2010, 12:00:18 (CEST)	
Digest	C0:F8:16:50:94:80:22:7D:94:09:98:C4:9C:1B:5C:D8:58:78:D1:E2	

MODULATEURS PEPTIDIQUES ET PEPTIDOMIMÉTIQUES NON COMPÉTITIFS SPÉCIFIQUES DE LA GLYCOPROTÉINE P

Domaine technique

5 La présente invention se rapporte à un composé de structure (I), se comportant comme un inhibiteur spécifique non compétitif de la glycoprotéine P (P-gp pour « Pleiotropic glycoprotein »), utile comme médicament, notamment pour l'amélioration de l'efficacité de traitements chimiothérapeutiques.

10 La présente invention trouve donc des applications notamment dans le domaine médical, notamment dans le cadre de traitements chimiothérapeutiques de cancers ou d'infections.

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([]) renvoient à la liste des références présentée après les exemples.

15

Etat de la technique

Les traitements chimiothérapeutiques sont actuellement utilisés pour lutter contre les cancers et les infections d'origine virale, bactérienne, fongique, ou parasitaire, en détruisant les cellules cibles du traitement que
20 sont les cellules tumorales ou infectées par l'agent infectieux (virus, bactérie, champignon, parasite, etc.). Leur efficacité est souvent limitée par la résistance que développent les cellules cibles à l'encontre des agents chimiothérapeutiques administrés dans le cadre du traitement. Parmi les phénomènes de résistances acquises, la résistance à de multiples drogues
25 médicamenteuses (« MultiDrug Resistance », également nommée MDR) se traduit par une diminution de la concentration intracellulaire de l'agent chimiothérapeutique. Les cellules cibles deviennent résistantes non seulement aux agents chimiothérapeutiques administrés, mais également à un grand nombre de molécules structuralement non apparentées.

30 Cette diminution de la concentration intracellulaire de l'agent chimiothérapeutique a pour origine l'expression massive de protéines de



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Accusé de réception

Par la présente, nous accusons réception de votre demande de traitement d'une demande internationale au titre du Traité de coopération en matière de brevets, comme suit:

Numéro de soumission	1000070578	
Numéro de demande PCT	PCT/FR2010/050107	
Date de réception	25 janvier 2010	
Office récepteur	Institut National de la Propriété Industrielle	
Votre référence	1H70840WO91L	
Demandeur	UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I	
Nombre de demandeurs	7	
Pays	FR	
Titre	NOUVEAUX COMPOSES DE TYPE AZAPEPTIDE OU AZAPEPTIDOMI-METRIQUE, INHIBITEURS DE BCRP ET/OU P-GP	
Documents produits	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-vlog.xml eolf-appb-P000001.pdf (70 p.) eolf-appb-P000003.pdf (1 p.) eolf-appb-P000004.pdf (8 p.) pct101u.gml	eolf-requ.xml eolf-fees.xml pct101.GML eolf-appb-P000002.pdf (7 p.) eolf-abst.txt pct101.1WO referenc.inf
Effectué par	CN=Laure SARLIN,O=CABINET BEAU DE LOMENIE,C=FR	
Méthode de soumission	En ligne	
Date et heure de réception	25 janvier 2010, 15:58:23 (CET)	
Digest	B0:CF:CD:9F:05:E9:A0:11:49:FC:56:80:12:92:C5:A3:CB:4B:14:8B	

NOUVEAUX COMPOSES DE TYPE AZAPEPTIDE OU AZAPEPTIDOMIMETIQUE, INHIBITEURS DE BCRP ET/OU P-GP

Le domaine de l'invention est de façon générale celui de la chimie thérapeutique, appliquée plus particulièrement à l'amélioration de l'efficacité de traitements chimiothérapeutiques, et notamment de traitements en

5 de traitements chimiothérapeutiques, et notamment de traitements en oncologie. Plus précisément, la présente invention a pour objet des composés de type azapeptide ou azapeptidomimétique se comportant comme des inhibiteurs de certaines protéines d'efflux telles que BCRP (de l'anglais « *breast cancer resistance protein* », également nommée ABCG2),

10 ainsi que P-gp (de l'anglais « *Pleiotropic glycoprotein* », également nommée ABCB1).

Un problème important auquel se heurte le traitement chimiothérapeutique des cancers et des infections d'origine virale, bactérienne, fongique ou parasitaire, est la résistance intrinsèque ou acquise

15 des cellules malignes ou des bactéries, champignons, virus ou parasites. Parmi les phénomènes de résistances acquises la résistance à de multiples drogues médicamenteuses (de l'anglais « *MultiDrug Resistance* ») se traduit par une diminution de la concentration intracellulaire de l'agent chimiothérapeutique du fait de la surexpression de protéines de transport de

20 type ABC (de l'anglais « *ATP-Binding Cassette* ») qui expulsent l'agent chimiothérapeutique hors des cellules cibles, tumorales ou infectées par un agent infectieux (virus, bactérie, champignon, parasite, ...). Ces protéines sont aussi exprimées de manière physiologique, notamment au niveau du tractus gastro-intestinal et de la barrière hémato-encéphalique.

25 La notion de résistance multiple tient au fait que les cellules deviennent résistantes non seulement aux agents chimiothérapeutiques administrés, mais également à un grand nombre de molécules structuralement non apparentées. Cette élimination survient principalement par l'action de pompes d'efflux, dont trois principales sont identifiées chez l'Homme. Ces

30 protéines d'efflux sont ABCB1, ABCC1 et ABCG2, aussi appelées respectivement P-gp, découverte par Juliano et Ling en 1976 (*Biochim Biophys Acta*, **1976**, 455, 152-162), MRP1 (*multidrug resistance protein 1*),

Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: *in vitro* optimization and *in vivo* validation.

Ahcène Boumendjel², Sira Macalou¹, Glaucio Valdameri^{1,3}, Alexandre Pozza¹, Charlotte Gauthier¹, Ophélie Arnaud¹, Edwige Nicolle², Sandrine Magnard¹, Pierre Falson¹, Raphaël Terreux⁴, Pierre-Alain Carrupt⁵, Léa Payen⁶ and Attilio Di Pietro^{1,*}

¹ Equipe Labellisée Ligue 2009 “Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Drogues”, Université Lyon 1, Univ. Lyon, CNRS UMR 5086 Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, IBCP, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France,

² Université Joseph Fourier, Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR-CNRS 5063, ICMG FR-2607, BP 53, 38041, Grenoble Cedex 9, France,

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

⁴ Equipe “Bioinformatique: structures et interactions”, Université Lyon 1, Univ. Lyon, CNRS UMR 5086 Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, IBCP, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France,

⁵ Section des Sciences Pharmaceutiques, Université de Genève, Université de Lausanne, 30 quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4, Switzerland,

⁶ Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Inserm U1052/CNRS UMR 5286 Centre Léon Bérard, Institut des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (ISPB), Université Lyon 1, 69008, Lyon, France.

* Corresponding author:

Dr. Attilio Di Pietro

Equipe Labellisée Ligue 2009, Institut de Biologie et Chimie des Protéines FR 3302, BM2SI UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France
Tel.: (33) 4 72 72 26 29; Fax: (33) 4 72 72 26 04; E-mail: a.dipietro@ibcp.fr

Short running title: ABCG2-specific flavonoid inhibitors

Abstract

This review describes the breast cancer resistance protein ABCG2 through its structure, functional roles and involvement in cell multidrug resistance, especially in cancer cells resistance to chemotherapeutics. The different types of known inhibitors are described, some being non-selective, since they also bind to other targets, and others being quite specific such as flavonoids. The different classes of active flavonoids and other polyphenols are described, some as plant natural compounds, but most of them being prepared and derivatized through medicinal chemistry. Quantitative structure-activity relationships of the ability of flavones, chalcones, xanthones, acridones and various benzopyrane/benzofurane derivatives to inhibit ABCG2-mediated drug efflux have led to pharmacophores and molecular models allowing to optimize the available hit compounds and to design new-generation lead compounds. Interestingly, inhibitory flavonoids are quite specific for ABCG2 *versus* ABCB1 and ABCC1, and appear either non-competitive or partially competitive towards mitoxantrone efflux. Most compounds do not inhibit ATPase activity, and are assumed not to be transported themselves by the transporter. Some acridones, firstly optimized *in vitro* as potent inhibitors, are indeed efficient *in vivo*, against human xenografts in SCID mice, more efficiently than gefinitib taken as a control. Future developments should open the way to more efficient/targeted modulators including (i) the potential interest of bimodulation by combining two different inhibitors, (ii) computer-assisted ligand-based drug design for getting more potent and more specific inhibitors, (iii) structure-based drug design from ABCG2 molecular models allowing *in silico* screening and docking of new inhibitors.

Key words: ABCG2, breast cancer resistance protein, drug design, flavonoids, inhibitors, molecular models, multidrug resistance, Quantitative Structure-Activity Relationships.

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; AML, acute myeloid leukemia; AZT, azidothymidine (zidovudine); BCRP, breast cancer resistance protein (ABCG2); FTC, fumitremorgin C; HBV, hepatitis B virus; HEK293, human embryonic kidney cells; HIV, human immunodeficiency virus; MCF-7, Michigan Cancer Foundation - 7 (breast cancer cell line); MDR, multidrug resistance; MRP1, multidrug resistance protein 1 (ABCC1); MXR, mitoxantrone resistance protein (ABCG2); NBD, nucleotide-binding domain; QSARs, quantitative structure-activity relationships; TKI, tyrosine kinase inhibitor; TMD, transmembrane domain; TPS-A, Tryprostatin A; TPT, topotecan.

Table of contents:

- 1. The ABCG2 transporter: structure, functional roles and involvement in cell multidrug resistance*
- 2. Different types of ABCG2 inhibitors*
 - 2.1. Non-selective inhibitors*
 - 2.2. ABCG2-specific inhibitors*
- 3. Flavonoids and derivatives*
 - 3.1. Different classes of active flavonoids*
 - 3.2. QSAR analysis for ABCG2 inhibitors*
 - 3.3. Specificity and inhibition mechanism*
- 4. In vivo activity of selected inhibitors*
 - 4.1. Impact on absorption, distribution and elimination of drugs*
 - 4.2. Modulation of ABCG2 protein expression levels*
 - 4.3. Reversion of the MDR phenotype in xenograft models*
- 5. Perspectives*
 - 5.1. Potential interest of bimodulation*
 - 5.2. Ligand-based drug design*
 - 5.3. ABCG2 molecular models and structure-based drug design*

Acknowledgments

References

1. The ABCG2 transporter: structure, functional roles and involvement in cell multidrug resistance

The ABCG2 transporter was discovered in three different laboratories where it received the following denominations: ABCP for its abundance in placenta [1], BCRP for its identification from resistant breast cancer cells [2] and MXR for its ability to confer cell-growth resistance to mitoxantrone [3]. As the other ABC (ATP-binding cassette) proteins, ABCG2 contains the typical signatures of proteins binding ATP at the interface of two cytosolic nucleotide-binding domains (NBDs) : the Walker-A and -B motifs, and the Q- and H-loops [4], as well as A-loop [5], belong to the *cis*-NBD, whereas the ABC signature is located on the *trans*-NBD [6]. In addition, the D-loop is involved in protein-protein interactions between the two monomers of the dimer [7]. Each NBD is fused to a transmembrane domain (TMD) containing six alpha-helical transmembrane spans, connected by two intracellular and three extracellular loops, and involved in drug binding and translocation across the membrane. ABCG2 is therefore a half-transporter, by contrast to full transporters, such as ABCB1, where the four constituting domains, two NBDs and two TMDs, are fused together to form a single polypeptide. Similarly to bacterial ABC half-transporters which have been crystallized as homodimers [8, 9], ABCG2 displays dimerization motifs [10] and dimerizes to be functional [11]. Higher levels of oligomerization have also been reported [12-14] as well as for other human transporters, but the physiological significance of such oligomers higher than dimers is still a matter of debate. Inter-domain disulfide bridge formation has been shown to occur, but seems not to be mandatory for functionality [15, 16]. Since a number of cytosolic NBDs have been crystallized [17], as well as a few bacterial half-transporters [8, 9], the structure of ABCG2 may be predicted by homology molecular modeling using either bacterial MsbA [18] or Sav1866 [19] as a template, except for some specific ABCG2-regions.

Such specificities especially concern the sequence connecting the NBD to the first transmembrane span, which is characteristic of the G class of transporters where the NBD is preceding the TMD; it has no equivalence in the B class, to which belong the crystallized bacterial transporters, Sav1866 and MsbA, as well as P-glycoprotein (ABCB1). Interestingly, at least one of the intracellular loops in ABCG2 appears shorter than in the bacterial transporters where a critical role as coupling helices has been structurally demonstrated [20], which might be correlated to mechanistic differences governing transporter specificity. Another main particularity concerns the large third extracellular loop, which connects transmembrane spans 5 and 6 and contains three cysteines reported to be involved in both

intra- and inter-domain disulfide bridge formation [15, 16], and proposed to allow transporter oligomerisation at a higher level [21]. It has been shown to contain the epitope of 5D3 monoclonal antibody displaying a conformation-dependent reactivity [22].

The physiological functions of ABCG2 are diverse. Its expression in normal tissues, as monitored by cDNA probe in Northern blots and BXP-21 and BXP-34 monoclonal antibodies, appeared relatively high in placental syncytiotrophoblast, brain microvessel, endothelium, kidney, small intestine, liver, testis, ovary and colon [23]. The steroid-dependence of its expression regulation, upregulation by progesterone in placenta [24] and down regulation by either 17beta-estradiol [25] or Dexamethasone [26] in breast cancer cells suggests steroid transport, in agreement with the observed efflux of sulfated estrogens [27]. Similarly to ABCB1, ABCG2 is located at the apical membrane of polarized cells, such as blood-brain barrier and intestinal enterocytes, where it plays an important protective role by limiting drug penetration to the central nervous system, and their oral absorption and pharmacokinetics [28]; increased drug availability is indeed produced by using transporter inhibitors [29, 30]. Both transporters also play an active role in the secretion of drugs and xenobiotics, such as from hepatocytes into the bile, and from kidney into urine. ABCG2 is also highly expressed in stem cell membranes [31], characterizing a side-population (SP) able to transport Hoechst 33342 as monitored by flow cytometry. Its role is likely to protect such sensitive cells against xenobiotics or endogenous catabolites, such as heme and porphyrins [32], that may be toxic under unfavourable hypoxic conditions [33]. These intrinsically-resistant stem cells might contribute to tumour resistance to chemotherapy [34].

Studies aimed at correlating the expression of ABCG2 in cancer cells and its effects on clinical outcome are still controversial [35]. Using the BXP-21 monoclonal antibody with paraffin-embedded samples, ABCG2 has been found to be expressed in many types of solid tumors, with particular abundance in tumors from the digestive tract, endometrium and melanoma [36]. The causative role of ABCG2 is much more evident in leukemia, especially in pediatric AML (acute myeloid leukemia), where it is especially abundant [37] similarly as ABCB1 which is clearly involved in adult AML outcome, as concluded from large-scale studies [38, 39].

ABCG2 is able to transport various types of drug substrates [23, 40]. First of all, many anticancer chemotherapeutics are efficiently effluxed, such as mitoxantrone [3], camptothecins including topotecan [41], irinotecan [42] and its SN-38 metabolite [43], antifolates such as methotrexate [44], epipodophyllotoxins such as etoposide and teniposide [45], tyrosine kinase inhibitors such as Imatinib [46], Gefitinib [47] and possibly Nilotinib

[48], other kinase inhibitors such as flavopiridol [49], and indolocarbazoles [50]. Polyphenols, such as resveratrol [51] and flavonols like quercetin and kaempferol [52] have been reported to be effluxed. Various other pharmacological compounds are also transported, such as the HIV/HBV antiviral drugs Zidovudine/AZT [53], Lamivudine [54] and Abacavir [55], the porphyrines pheophorbide A and protoporphyrin IX [56], carcinogens [57], antibiotics [58], conjugated steroids such as 17 β -estradiol sulfate [27], and dipyridamole [59]. Several fluorescent dyes convenient for *in vitro* experiments are also actively transported, such as Hoechst 33342 [31] and BODIPY-prazosin [60]. Interestingly, the R482T/G hot-spot mutation, which is frequently observed in cell cultures selected at high concentration of drugs [61], has been found to be a gain-of-function for drug efflux by extending the transport capacity to anthracyclins and bisantrene [62] as well as to rhodamine 123 [60] while methotrexate, which is no longer transported, constitutes an exception. Direct ligand interactions with purified ABCG2 have shown that the R482T mutation does not modify the binding affinity for a given substrate whether it is transported or not, since methotrexate still binds. This suggests that arginine-482, which is assumed to be located at the inner edge of the third membrane span, is involved in substrate transport, but not in binding [63]. Remarkably, the single-point mutation also produced a gain-of-function of ATPase activity, by increasing both the maximal rate of hydrolysis [64] and the affinity for ATP [63].

The ABCG2 wide spectrum for transported substrates, characterizing its polyspecificity, is strongly overlapping that of ABCB1 [65]. This concerns, for instance, camptothecins, epipodophyllotoxins, mitoxantrone, kinase inhibitors, antibiotics, antiviral drugs and Hoechst 33342, and additionally anthracyclins, bisantrene and rhodamine 123 upon ABCG2 R482 mutation. Interestingly, the spectra for inhibitors appear much more restrictive, with very few inhibitors being efficient on both transporters [65]. It is then quite possible that failures to abolish cancer cell multidrug resistance by specifically inhibiting ABCB1 were, at least partly, attributable to co-expression of ABCG2 in addition to ABCB1. Therefore, ABCG2-specific inhibitors are urgently required in order to fully abolish multidrug resistance. Enormous amounts of efforts have been spent with ABCB1 to identify and optimize 1st- and 2nd-generation inhibitors, through quantitative structure-activity relationship analysis, 3D-molecular models, pharmacophores construction and drug design resulting in 3rd-generation leads, some of which have been submitted to advanced clinical trials. Similar strategies have been recently investigated for ABCG2.

2. Different types of ABCG2 inhibitors

2.1. Non-selective inhibitors

Known ABCG2 inhibitors are structurally-unrelated compounds belonging to different chemical classes. ABCB1 inhibitors were among the first compounds to be examined for their ability to inhibit ABCG2 [66, 67], since the pattern of substrates transported by ABCG2 highly overlaps that of ABCB1. This however is not the case for inhibitors. In addition, the effects of the hotspot mutation R482G/T, which are well known to change the pattern of transported substrates, have not been systematically characterized for the different inhibitors.

One of the first compounds to be studied was GF120918 (elacridar), which was initially developed as an ABCB1 inhibitor [68], and later demonstrated to be an efficient inhibitor of ABCG2. Following these major results, the structure of GF120918 was used as a template to conceive new ABCG2 inhibitors. In this regard, structural acridone analogues of GF120918 have been synthesized by shortening the aryl side-chain, and found to be similarly active as GF120918, as shown on mitoxantrone efflux from human wild-type (R482) transfected cells [69], but specific for ABCG2 (see below). Tariquidar (XR9576), a structural analogue of GF120918, and derivatives have also been shown to inhibit ABCG2-mediated drug efflux [56, 70]. Bates *et al.* [71] have demonstrated that the immunosuppressive drug cyclosporin A was able to inhibit rhodamine transport in MCF-7/AdVp cells, which has been subsequently confirmed by other groups [72, 73].

Another class of drugs extensively studied as reversers of ABCG2-mediated multidrug resistance was constituted by HIV antivirals. The expression of ABCG2 in a CD4⁺ T-cell line was found to confer cellular resistance to reverse transcriptase nucleoside inhibitors, and ABCG2 was then considered as a target for improving HIV treatments [74]. The effect of a panel of anti-HIV drugs on ABCG2 activity was assessed by an increase in pheophorbide A accumulation in MDCKII-ABCG2 cells by comparison to the corresponding parental cell line MDCKII lacking human ABCG2. The two most active drugs were lopinavir and nelfinavir, whereas a weak inhibition was observed with well-known AZT [75].

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have emerged as a new class of ABCG2 inhibitors. Hydrophobic TKIs display a great potential to interact with ATP-dependent active transporters such as ABCG2. Four compounds have been extensively studied. Gleevec (Imatinib mesylate, STI-571) is a well-known tyrosine kinase inhibitor widely used for treatment of various types of cancer, and ABCG2 overexpression has been shown to be involved in resistance to Gleevec. In human osteosarcoma Saos2 ABCG2#4 cells, Gleevec potentially reversed resistance to camptothecins ($IC_{50} = 0.17 \mu M$) and increased topotecan

accumulation [76]. In contrast to the initial conclusion that STI-571 was not transported, resistance was indeed observed to be due to STI-571 transport [77]. ZD1839 (Iressa, Gefitinib) and EKI-785 are two TKIs reported to effect the ABCG2 function [78]. At low concentration (0.1 μ M), they stimulated ATPase activity, whereas they inhibited at higher concentrations, suggesting that both compounds are probably substrates for ABCG2. Finally, the other TKI CI1033 was shown to reverse ABCG2-mediated resistance to both SN-38 and topotecan in transfected cells. However, it also acts as a substrate, as demonstrated by the low accumulation of CI1033 (alone) in ABCG2-expressing cells. Very recently, Hikaru and co-workers have reported interesting QSAR analysis and molecular modeling approaches to analyze interactions of protein kinase inhibitors with ABCG2 [79].

Taxoids have been recently reported as promising ABCG2 inhibitors. Structure-activity relationship studies have shown that the presence of the C-13 side chain appears critical for activity. Recently, a series of non-cytotoxic taxoids where the C-13 side chain is replaced by an acetyloxy group has been reported [80]. Structural diversity was obtained by introducing substituents on the hydroxyl groups at positions 1, 2, 7, 10 and 14 and led to tRA98006 which is active against ABCG2^{R482}, ABCG2^{R482T} and ABCG2^{R482G}. The basic amino group appears essential for the inhibitory activity and strengthens the importance of basic nitrogen atoms among the structure of ABCG2 inhibitors.

Curcumin, a naturally-occurring polyphenol from the rhizomes of *Curcuma longa* (turmeric) has been shown to inhibit all three main multidrug ABC transporters, ABCB1, ABCC1 and ABCG2, *in vitro* [81], with a higher affinity for ABCG2 [82]. It stimulates the ATPase activity of the three ABC transporters and competitively prevents photolabeling of ABCG2 by iodoarylazidoprazosin and sulfasalazine transport, indicating that it binds at the substrate site and is itself transported [83]. In ABCG2-transduced LLC-PK1 cells (epithelial cells of porcine kidney), steroids, isolated from roots of ginseng were reported as non-selective inhibitors of ABCG2 [84]. The investigated compounds are derivatives of protopanaxadiol (PPD), either alone or conjugated with one or two sugar moiety(ies). The most active compound was the unconjugated derivative PPD, which inhibits mitoxantrone efflux and also ABCG2-associated vanadate-sensitive ATPase activity. Cannabinoids, were reported to act as inhibitors of both ABCB1 and ABCG2 [85]. Cannabinol, cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol were identified as the most potent inhibitors on both drug accumulation and cytotoxicity assays. All three compounds were also found to inhibit the ATPase activity of ABCG2.

2.2. ABCG2-specific inhibitors

2.2.1. Fumitremorgin C and synthetic analogues. Fumitremorgin C (FTC) was isolated from the fermentation broth of *Aspergillus fumigatus*, as reported by Rabindran *et al.* [86]. FTC was tested on a colon carcinoma cell line resistant to mitoxantrone, and found to be a specific and rather potent inhibitor of ABCG2; however, it induced serious neurotoxic effects, preventing any clinical use. In order to provide less toxic and more potent ABCG2-inhibitors, FTC analogues became attractive targets. In this regard, a large series of synthetic analogues, namely indolyldiketopiperazines (containing the A/B/C/D-rings of FTC) were screened on cells transfected with ABCG2 and led to the identification of three compounds, namely Ko132, Ko134 and Ko143, as promising candidates [87, 88]. Ko143 significantly increased the oral availability of topotecan in mice. Tryprostatin A (TPS-A), another fungal secondary metabolite, is a natural analogue of FTC. Using an assay based on mitoxantrone uptake and cytotoxicity, Woehlecke *et al.* [89] demonstrated that TPS-A is an inhibitor of wild-type ABCG2. The structural difference between FTC and TPS-A essentially concerns the non-cohering diketopiperazine C ring in TPS-A, allowing an alternative conformation. It could also be hypothesized that rings A, B and D, as well as the C3 side chain, are necessary for ABCG2 inhibition.

2.2.2. Novobiocin. Novobiocin is a natural antibiotic that is produced by *Streptomyces niveus*. This prenylated aminocoumarin is an effective antibacterial agent used in the treatment against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [90], and is also active against *Staphylococcus epidermidis*. Novobiocin enhanced cellular accumulation of topotecan and inhibited its efflux from MCF7/TPT300 cells. In addition, it enhanced topotecan and mitoxantrone toxicity in MCF7/TPT300 cells [91]. Furthermore, novobiocin increased the intracellular topotecan accumulation in PC-6/SN2-5H2 PC-6/SN2-5H2 small cell lung cancer cells and inhibited the topotecan transport into the vesicles of membranes from these cells [92]. Obviously, the inhibition was dependent on the cell line used: in a recent study, Su *et al.* [93] reported that the resistance of CPT-K5 cells (human acute lymphoblastic leukemia cells) to mitoxantrone was not reversed by novobiocin.

2.2.3. Elacridar derivatives. As outlined above, elacridar (GF120918) was largely investigated as a potent ABCB1 inhibitor. Acting as a non-selective inhibitor, it inspired more than a scientist to be used as a scaffold for the design of ABCG2 inhibitors. Recently, we reported a series of elacridar analogs as potent inhibitors of ABCG2. We found that keeping the acridone moiety of elacridar and replacing the side chain [tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-phenethylisoquinoline-1-2-phenylethyl] by a simple 3,4-dimethoxyphenylethyl was a

straightforward strategy. This structure simplification led to potent and ABCG2 selective inhibitors, exhibiting IC_{50} values in the submicromolar range (the IC_{50} of the most active compound was 0.35 μ M) [69].

2.2.4. Tariquidar derivatives. Introducing minimal structural modifications on the ABCB1 inhibitor tariquidar resulted in drastic selectivity for ABCG2 inhibition. The highest potency was achieved by replacing the 3,4-dimethoxy-2-(quinoline-3-carboxylamino)benzoyl moiety in tariquidar by 4-methoxycarbonylbenzoyl having a hetarylcarboxamido group in 3-position and the introduction of an ester group on the central aromatic core. As shown from mitoxantrone efflux assay, the IC_{50} of the most active molecules was in the submicromolar range and a high selectivity for ABCG2 over ABCB1 [70]. More recently, Pick et al. have reported more structural elements with the aim to refine the scaffold. A special focus was made to investigate the linker types, connecting the tetrahydroisoquinoline-ethylphenyl substructure to the hydrophobic part of the inhibitor [94, 95]. However, although selectivity toward ABCG2 was conserved, no inhibitory activity enhancement was achieved.

3. Flavonoids.

3.1. Different classes of active flavonoids. Flavonoids constitute a growing class of ABCG2 inhibitors. Silymarin, hesperetin, quercetin and daidzein were shown to increase the intracellular accumulation of mitoxantrone in ABCG2-expressing cells [96]. Among the naturally-occurring flavonoids, Biochanin A, chrysin and tectochrysin are the most active on MCF7 and NCI-H460 cells which are resistant to mitoxantrone ([Figure 1](#)) [97-99]. A first comparison of different flavonoids subclasses showed the following efficiency order: flavones > flavonols > isoflavones > flavanones [97].

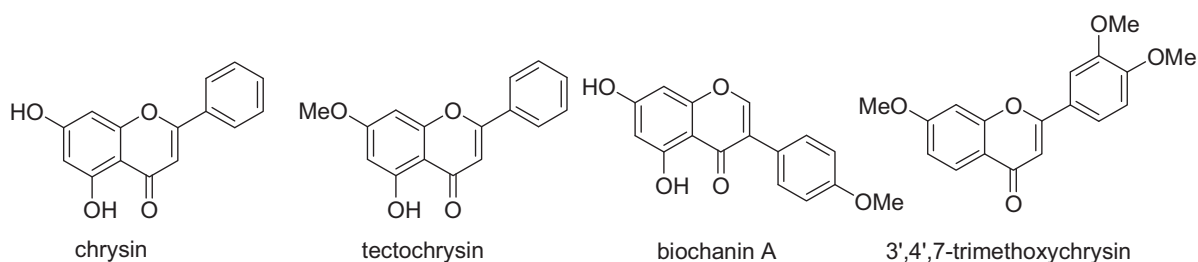
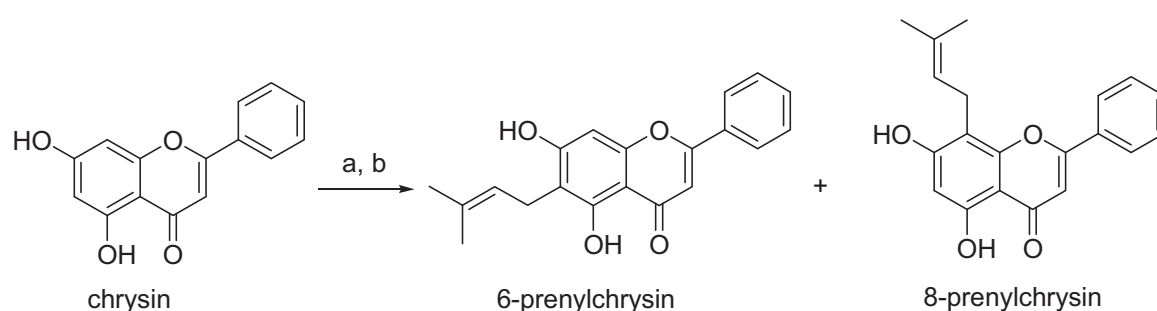


Figure 1. Initial naturally-occurring flavonoids evaluated as ABCG2 inhibitors

Structure-activity studies led to the identification of novel ABCG2 inhibitors such as 6-prenylchrysin ([Scheme 1](#)) [99] exhibiting an IC_{50} of 0.3 μ M, a similar value to that of GF120918. Interestingly, the R482T hotspot mutation altered the positive impact of

prenylation on the inhibitory potency, tectochrysin being then the best compound with an IC_{50} of 1.9 μ M. The 8-prenylchrysin, which is a regioisomer of 6-prenylchrysin was obtained as a side product during the synthesis of 6-prenylchrysin ([Scheme 1](#)) and found to be much less active, indicating the importance of the prenylation position. The relatively low toxicity of tectochrysin and 6-prenylchrysin and efficient sensitization of cell growth to mitoxantrone made these compounds promising for future potential use in clinical trials. In a recent study, the inhibitory effect of naturally-occurring flavonoids on ABCG2 was correlated with their positive effects on the pharmacokinetics of anticancer drugs [100]. A panel of 32 flavonoids was screened by using topotecan accumulation and cytotoxicity assays, and led to the identification 3',4',7-trimethoxyflavone as the most potent inhibitors of ABCG2.



Scheme 1: Synthesis of 6-prenylchrysin and 8-prenylchrysin from chrysin. (a). prenylbromide, K_2CO_3 , DMF; (b). 150 °C.

The investigation of multiple flavonoids effect on the accumulation and cytotoxicity of mitoxantrone in BCRP-overexpressing cells was reported by Morris et al. [101]. It was found that multiple flavonoid combination induce strong ABCG2 inhibition by increasing both accumulation and cytotoxicity of mitoxanthrone in ABCG2-overexpressing breast cancer cells. The best candidates were biochanin A (isoflavone), kaempferide (flavonol), 5,7-dimethoxyflavone and 8-methylflavone (flavones) ([Figure 2](#)).

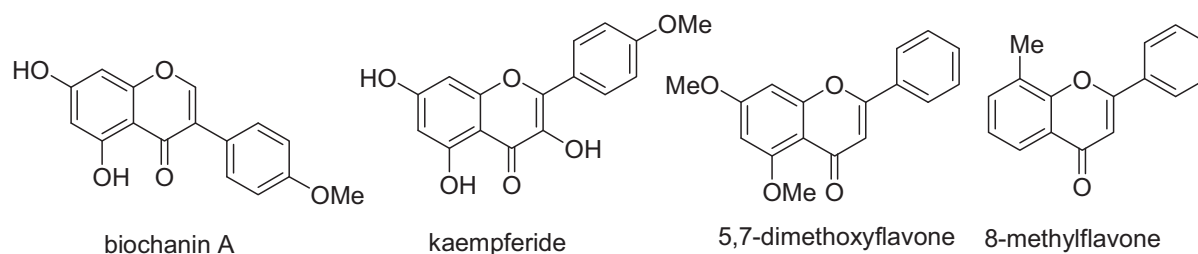


Figure 2. Structures of flavonoids tested in combination for inhibiting ABCG2

Very recently, chalcones were found to inhibit differentially ABCB1 and ABCG2, basic chalcones being more efficient on the first transporter [102] and non-basic chalcones on the second one [103]. Basic chalcones are defined as those comprising a tertiary amine brought by a *N*-methylpiperidinyl moiety. Chalcones exhibiting the highest activity and selectivity toward ABCG2 were found among derivatives which are dimethoxylated or dihydroxylated at the A-ring ([Figure 3](#)) as evidenced by the mitoxantrone accumulation and cytotoxicity assays.

Boeravinones, are rotenoids sharing structural analogy with isoflavones. They differ by the presence of an extra cycle, formed between B and C rings of isoflavones ([Figure 3](#)). These naturally-occurring substances have been isolated from several medicinal plants, and some were investigated as specific inhibitors of ABCG2. Among the eleven boeravinones studied, boeravinone G was found to be the most potent derivative [104]. The concentration dependence study of BCRP-mediated mitoxantrone efflux allowed the determination of an IC_{50} value of 0.7 μ M.

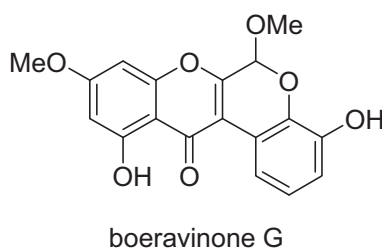
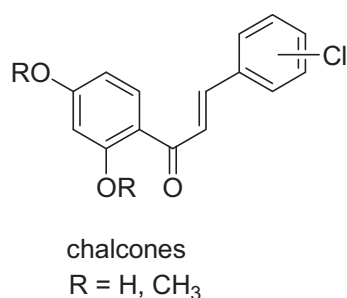
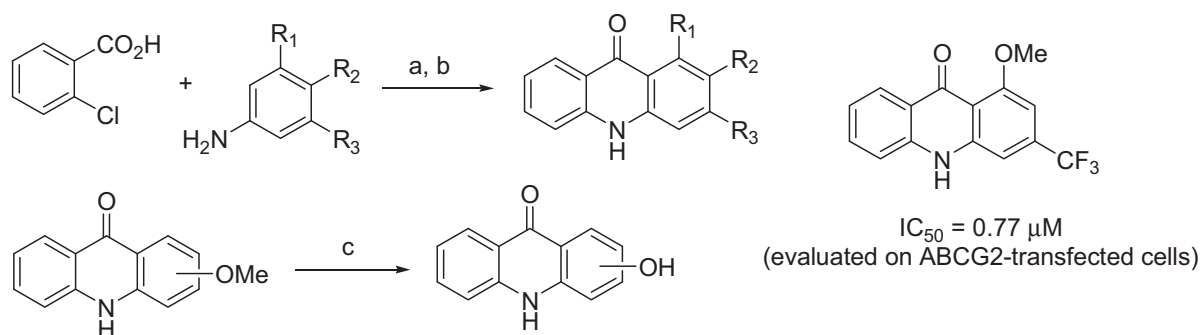


Figure 3. Structures of chalcone and boeravinone analogs reported as selective ABCG2 inhibitors.

Xanthenes are frequently considered as flavonoid derivatives. The initial investigation of this group of compounds as ABCG2 inhibitors revealed no significant effect. However, we then found that replacing the intracyclic oxygen of xanthenes by a NH-group induced a high inhibition potency [69]. The obtained azaxanthenes, namely acridones synthesized according to [Scheme 2](#), appeared selective toward ABCG2 as assessed by mitoxantrone accumulation and cytotoxicity tests with transfected cells.



Scheme 2. Synthesis of acridones (azaxanthones). (a). Cu, K_2CO_3 , (b) H_3PO_4 , (c) AlCl_3 for demethylation of OMe at C-1), BBr_3 (for demethylation of OMe at other positions) [105].

By combination of a part of flavonoid scaffolds and entities found as essential for the activity of GF120918, we designed new inhibitors of ABCG2 [105]. As outlined in [Figure 4](#), the design was based on the linkage of the chromanone (A/C rings) part of flavones to either a substituted piperazine or a methoxylated phenylethyl moiety. For example, 2-[N-(3,4-dimethoxyphenylethylaminocarbonyl)]-5-hydroxychromone ([Figure 4](#)) was revealed to be as active as fumetrimorgin C (FTC).

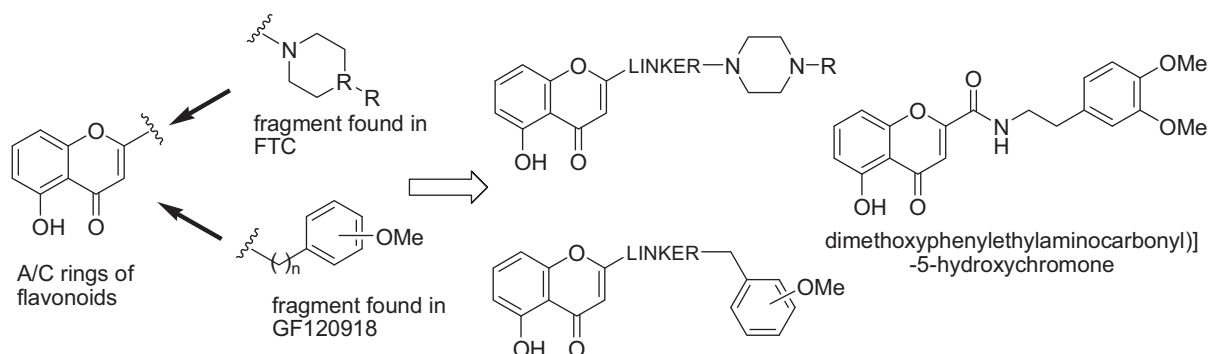


Figure 4. Strategy of design of chromanones and the structure of the most active inhibitor.

3.2. QSAR analysis for ABCG2 inhibitors

As stressed recently [106], structure-based drug design (direct molecular modelling) would constitute a rational and powerful *in silico* approach. In the absence of any high-resolution structure of the human whole transporter, homology molecular modeling associated to molecular dynamics simulation might bring significant information providing accurate templates. However, due to only partial sequence homology of ABCG2 with crystallized mouse *mdr3* P-glycoprotein, only incomplete molecular models can be established for

ABCG2. Thus direct approaches such as molecular docking or virtual screening of chemical libraries can be used at the moment to identify highly-selective and potent inhibitors.

The design of inhibitors can only be assessed by indirect molecular modeling (*i. e.* based on the ligand structure of the targeted transport protein) such as pharmacophore design or Quantitative-Structure Activity Relationships (QSAR) that establish a mathematical relationship between molecular descriptors and pharmacological activities of compounds. These methods allow to predict drug biological properties prior to *in vitro* and *in vivo* studies, even for virtual new chemical entities not yet been synthesized. Besides, QSAR is used to analyze transport or inhibition activities of ABCG2 ligand sets, in order to identify the pharmacophoric moieties involved. SAR and QSAR for ABCG2 were recently reviewed by Gandhi and Morris [107].

Up to now, only two QSAR studies concerning ABCG2 inhibitory activity of flavonoids are available in the literature. One of them was performed by Zhang et al. [108] and the other one was carried out by some of us [109]. QSAR analysis description for flavonoids, and flavonoid analogs, as ABCG2 inhibitors are summarized in [Table I](#). In both studies, the biological activity was performed by assessing mitoxantrone accumulation, using flow cytometry measurements on resistant cells over-expressing ABCG2. The QSAR-model generated by Zhang et al. [108] resulted in a correlation coefficient (r^2) of 0.85 and a q^2 value of 0.78, in the “leave-one-out” (LOO) cross-validation test, attesting the robustness of the performed model. The external test data set of 5 flavonoids displayed a good correlation coefficient ($r^2 = 0.92$) demonstrating the reliability of the model. Note that this model was predominantly generated using 2D topological descriptors and only a limited number of 3D descriptors *i.e.* molecular volumes and surface area. This analysis allows encoding the steric properties of flavonoid derivatives except for the 3D molecular properties since the overall intermolecular interactions are not completely described. Unlike CoMFA methods, genetic algorithm method used to select the independent variables is a process presenting the advantage of avoiding ambiguities in the selection of the most probable molecular conformations and molecular alignments. Interestingly, the QSAR model demonstrated that $\log P$ has a favorable influence on the inhibitory activity of ABCG2 which is consistent with the SAR analysis.

	<i>In vitro</i> biological assay	<i>In silico</i> modeling			
		Modeling method	Descriptors	Performance assessment	
Dataset				Training set	External test set reliability
Flavonoids / n = 25 [108]	Cells : Human breast cancer MCF-7 MX100 ^a Substrate : MTX (3μM) ^b Inhibitor : FTC (10μM)	Genetic algorithm / algorithm MLR ^c	log <i>P</i> SdssC_acnt ^f Dy ^g	n = 19 Accuracy : r2 = 0.85 Reliability : q2 = 0.78 (LOO) ⁱ	r2 = 0.92 (n = 6)
Flavonoids and synthetic analogs / n = 41 [109]	Cells : HEK-293 human cells transfected with either the pcDNA3 vector containing wild-type (R482) ABCG2 cDNA ^c Substrate : MTX (5μM) ^d Inhibitor :: GF120918 (5μM)	3D linear solvation energy (LSE)	3D molecular interaction fields (MIFs) ^h : MLP _{ho} , MHBP _{ac} and MHBP _{do} (in-house SPL procedures) and V, S, R, G, DRY (VolSurf) [110]	n = 34 Accuracy : r2 = 0.77 Reliability : q2 = 0.70 (LOO) ⁱⁱ	r2 = 0.67 (n = 7) Spearman ranking (r2 = 0.80)

Table I : QSAR data for flavonoids and flavonoid analogs as ABCG2 inhibitors.

^a MCF-7 MX100 : resistant cells over-expressing wild type BCRP (ABCG2) with no detectable expression of P-glycoprotein (ABCB1), MRP1 (ABCC1), or MRP2 (ABCC2).

^b MTX accumulation measured by flow cytometry measurements and expressed in EC50 (μM).

^c Method reported by Robey *et al.* [62].

^d MTX accumulation measured by flow cytometry measurements and expressed in IC50 (μM).

^e MLR : Microsoft Logistic Regression.

^f SdssC_acnt : 2D-structural descriptor corresponding to the count of all C-C double bond in the molecule.

^g Dy : 2D-structural descriptor corresponding to the moment of displacement between the centre of mass and the centre of dipole along the inertial Y-axis [108]

^h 3D-MIFs : DRY, MHBP_{ac} and MHBP_{do} for molecular lipophilic potential, polarisability, molecular hydrogen-bonding acceptor capacity, and molecular hydrogen-bonding donor capacity, respectively [110]. V, S, R, G correspond to volume, surface, rugosity and globularity of the analysed molecule, respectively.

ⁱ LOO (leave-one-out) : cross validation method used for internal validation.

In order to explore the interaction forces governing the inhibitory activity of flavonoids toward ABCG2, the QSAR analysis by 3D linear solvation energy (LSE) approach reported by Boccard *et al.* [111] was applied to a dataset of flavonoidic derivatives [109, 111]. This method was applied in the second 3D-QSAR dealing with flavonoidic scaffold inhibitory activity, in which biological activities of flavonoids and analogs (flavones, benzopyranes, benzofuranes, boeravinones and acridones) making the training set, were evaluated in a

whole-cell assay, as previously described [69, 99, 104, 109]. Unlike first data obtained by Zhang *et al.* on Human breast cancer drug-selected MCF-7/MX100 resistant cells, the inhibitory activity on ABCG2 was assessed on HEK-293 human cells transfected with the pcDNA3 vector containing wild-type (R482) ABCG2 cDNA (Table I). For this 3D-LSE analysis, the descriptors used included molecular-interaction fields (MIFs) related to hydrophobic-interaction forces (MLP_{ho}), polarisability (DRY), and hydrogen-bonding acceptor and donor capacity ($MHBP_{ac}$ and $MHBP_{do}$, respectively). Interestingly, the use of 3D-MIFs covers not only the steric effects, but also all molecular spatial properties rendering the analysis more pertinent. The model correctly predicted the different classes of naturally occurring flavonoids or synthetic analogs taken as training set with a satisfactory performance ($r^2 = 0.77$; $q^2 = 0.70$; $n = 34$). Further, the 3D-QSAR analysis allowed the identification of a number of structural elements that seem to govern the inhibitory activity. DRY polarisability, MIF and hydrophobic volumes, as previously defined [110], were the main descriptors accounting for the compounds activity. It should be underlined that the H-bond donor potential appeared to have a negative effect on the inhibitory activity, whereas the H-bond acceptor capacity seemed to have an overall negligible impact. Therefore, for flavonoid scaffolds, high ABCG2 inhibitory activity is mainly governed by large and polarisable hydrophobic volumes, while penalized by H-bonding donor capacity. These results are in accordance with the favorable effect of methoxylation observed in the qualitative SAR studies that could be related rather to its hydrophobic property than to its H-bond acceptor potential. Dealing with the role of H-bond donor capacity, the apparent contradiction between our results and other previous outcomes, is worth discussing. Indeed, on the basis of a CoMSIA method, a 3D-QSAR model was recently proposed pointing out that H-bond donor functionality is favorable to ABCG2 inhibitory activity of non-specific inhibitors deriving from tariquidar [112]. This discrepancy suggests a different binding site for these non-specific inhibitors by comparison to flavonoidic inhibitors that are considered as specific. Besides, it should be underlined that another structural requirement, namely hydrophobicity, highlighted by the 3D-LSE, is in agreement with qualitative SAR outcomes which evidenced hydrophobicity as a major contributive property among flavonoids, acridones and boeravinones [69, 99, 104]. The results suggest that inhibition by the flavonoidic compounds should be related to their global physicochemical properties, which further supports the two step-processes proposed by Matsson *et al.* [113] from QSAR analysis based on ABCG2 inhibition of structurally diverse drugs or drug-like compounds. Taking into account the

cellular permeation component, this two step-model suggests that drug binding to ABCG2 is governed by : i) drug permeation (related mainly to hydrophobicity), followed by lateral diffusion in the membrane, ii) binding to the transporter, influenced by H-bond interaction and polarisability. Hydrophobicity should be a pre-requisite for reaching the binding site. It can be expected for the future, that 3D-QSAR analysis, will assist medicinal chemists in the design of more active and more selective ABCG2 inhibitors, not only to overcome anticancer drug resistance but also to help in a better understanding of the mechanism of action of this multidrug exporter protein.

3.3. Specificity and inhibition mechanism

By difference to GF120918/elacridar and XR9576/tariquidar, most potent flavonoidic inhibitors of ABCG2 appear quite specific with very low, if any, inhibition towards ABCB1 and ABCC1. This was clearly demonstrated for hydrophobic flavones such as 6-prenychrysin and tectochrysin for the efflux of different substrate drugs [99]. This was shown to be also the case for acridone 4a/MBLI-86, acridone 4b/MBLI-87 and acridone 4c/MBLI-97 synthesized with the aim of mimicking GF120918 (Figure 5), and which indeed inhibited ABCG2 with a similar potency [69].

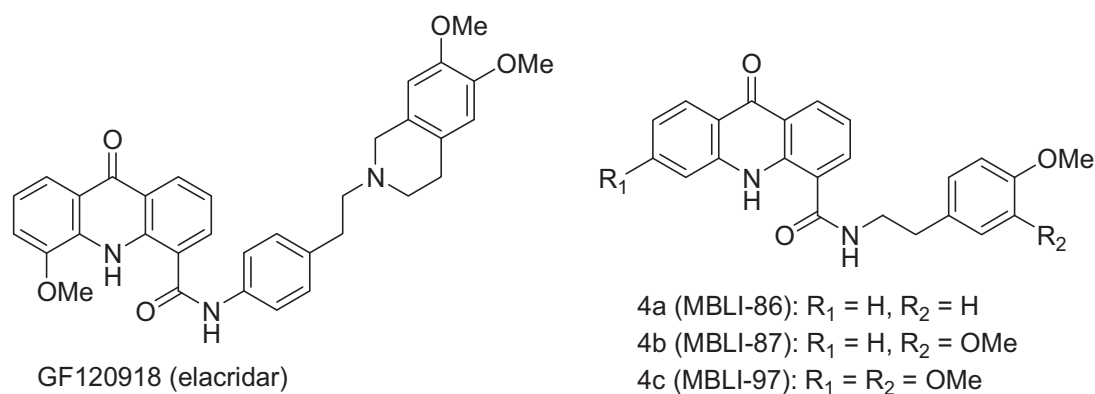


Figure 5. Compared structures of various acridones.

Quite interestingly, despite very limited substituent variations, the three acridones/MBLI compounds were found to be quite specific for ABCG2, since they did not inhibit mitoxantrone efflux by ABCB1, contrarily to the dual inhibitor GF120918 (Figure 6).

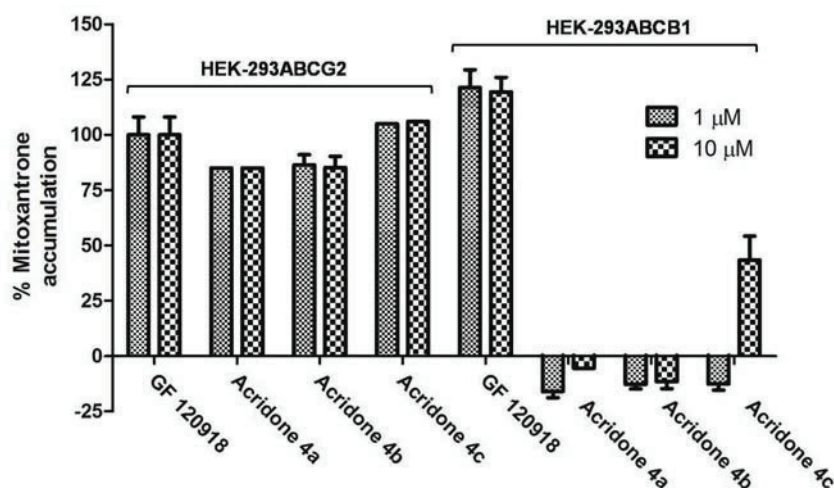


Figure 6: ABCG2-specificity of acridones 4a-c by difference to GF120918. Compared inhibitions at 1 μ M and 10 μ M of mitoxantrone efflux from either ABCG2- or ABCB1- transfected HEK293 cells, leading to accumulation monitored by flow cytometry. For ABCG2, the inhibition was referred to GF120918 taken as 100%. For ABCB1, 100% inhibition was referred to accumulation in control HEK293 cells transfected by the pcDNA3.1 alone.

They also did not inhibit daunomycin efflux by either ABCB1 or ABCC1, whereas they strongly inhibited its efflux by the R482T mutant of ABCG2. In addition, the three acridones did not modify the ATPase activity of High-Five insect cells overexpressing human ABCG2 upon infection with baculovirus, whereas GF120919 was a strong inhibitor at micromolar concentration. The high similarity in structure between GF120918 and acridone 4c/MBLI-97 might explain the competitive antagonism of the former against the binding of the latter to purified ABCG2 (Figure 7).

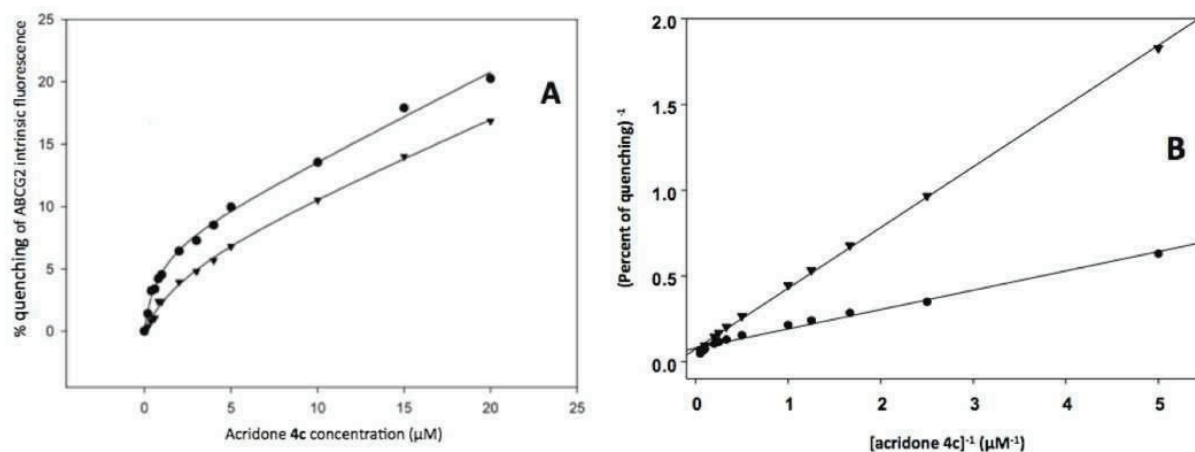


Figure 7: Competitive antagonism by GF120918 (triangles) against acridone 4c/MBLI-97 binding (circles) to purified ABCG2. A, direct binding curves; B, double-reciprocal plots. Human ABCG2 was overexpressed and purified from High-Five insect cell membranes infected by baculovirus. The binding of acridone 4c was monitored by quenching of intrinsic fluorescence [63].

An important overlapping is indeed observed from structure alignment, on the one hand, between GF120918 and the three acridones (*cf.* Figure 5) and, on the other hand, between tariquidar and ABCG2-specific derivatives reported by Kühnle *et al.* [70]; however, the position of substituents allows to define new areas that might be responsible for specificity

towards ABCG2 (left and middle areas) by difference with the duality towards both ABCG2 and ABCB1 of tariquidar and elacridar (right area) ([Figure 8](#)).

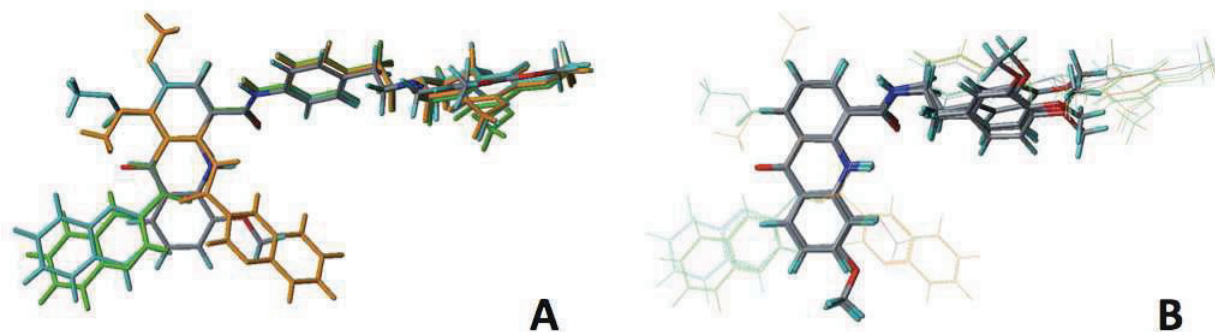


Figure 8: Molecular alignment between tariquidar (orange) and derivatives (green and blue) and elacridar (grey) in A, and acridones 4a-c (grey) in B. A total of 13 Tariquidar analogs were modelled using Sybyl X molecular modelling packages installed on a Linux workstation. All molecules were subjected to minimization with Powell's conjugate gradient method and MMFF94 force field [114]. The minimum energy difference of 0.001 kcal/mol was set as a convergence criterion, and partial atomic charges calculated using the MMFF94 method. The dielectric constant was set to 80, to simulate the water solvent and the electrostatic cut-off to 16 Å. For each structure, the model was examined to check all dihedrals angles, and set to a minimum energy conformation. After validation, all models were added to a model database; they appeared very diverse, without any common moiety allowing an automatic alignment of compounds. They were aligned manually, using phenyl and polycyclic moiety as an anchor. Final conformation of each model was improved by modifying dihedral angle to fit on a common conformation. All molecules were minimized again to verify that the conformational energy does not raise more than 20 kcal/mol, and conformation corresponds to a minimal energy. The final superposition is shown.

Both GF120918 and tariquidar have been shown to prevent photoaffinity labeling of ABCB1 by azidopine [115, 116] which is indeed transported by ABCB1 [117] and ABCG2 [118]. This strongly suggests that their binding site is likely close to (and possibly overlapping) the transport site, and also close to the binding site for ABCG2-specific derivatives. Such proximity for the different drug-binding sites well illustrates the polyspecificity of multidrug ABC transporters, not only for substrates but also for inhibitors. Therefore, further characterization of the molecular mechanism of inhibition by either ABCG2-specific compounds, such as flavonoids, or other non-selective compounds appear quite difficult. It will then require integrating a number of important parameters such as extent of competitiveness, affinity of binding, maximal extent of inhibition, detailed effects on ATPase activity and direct determination of the ability to be transported. It will also depend on the availability of high-resolution crystal structure, or suited molecular model and docking.

4. *In vivo* activity of selected inhibitors

The ABCG2 substrates are generally assumed to be structurally- and functionally-unrelated molecules. In addition, high ABCG2 expression levels are found in barrier tissues such as

placenta, small and large intestine, central nervous system, liver, adrenal glands, prostate, testes, uterus, brain, prostate, stomach, lung and kidney [119, 120]. Since ABCG2 is apically expressed, this leads to limit drug distribution in tissues, and to decrease its substrate bioavailability. Consequently, crucial implications are observed for intestinal absorption, drug distribution (involved in the defense of brain or placenta sensitive organs), drug metabolism, drug excretion, export of nutrients into milk [121], and molecule toxicity (such as heme-induced toxicity). This is globally described by the ADMETox (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, and Toxicity) profile.

These data strongly suggest that modulating the protein expression levels and/or transport activity rates could be clinically favorable. Since the endogenous and pharmacological functions of ABCG2 were largely reported in the recent review of Schinkel's group [121], we decided to only report here the recent and complementary data about the use of *abcg2* (-/-) knockout mice model, and the interest of developing ABCG2-positive xenograft models for studying modulator reversing efficiency.

4.1 Impact on absorption, distribution and elimination of drugs. *Abcg2* (-/-) knockout mice displayed a unique protoporphyria [122]. The applications of these mice are multiple: (1) in drug distribution into brain, this model allows to evaluate the real impact of ABCG2 in the blood-brain barrier function and neurotoxicity of the drugs; drug transport experiments allow to test new approaches for enhancing or limiting their penetration into the brain; (2) more generally in pharmacokinetic experiments, these *abcg2* (-/-) knockout mice allow the determination of ABCG2 contribution to the distribution of drugs in various tissues (lung, heart, liver...); oral availability studies are conducted to study ABCG2 impacts in molecule uptake into the body; (3) in teratology evaluation, these mice allow to determine the ABCG2 role in placental transport and its implication in susceptibility to chemically-induced birth defects; (4) finally, these mice permit to study the contribution of ABCG2 in the undifferentiated phenotype of cells such as stem cells and cancer stem cells.

Modulators are structurally different and often lead to a difference on their selectivity levels: highly specific compounds as MBLI-87, FTC, Ko143 have been described while others, like gefitinib, were not selective. This difference in selectivity has often an impact on the pharmacokinetics parameters of ABCG2 substrates. The fungal fumitremorgin C molecule is too toxic for any human use, whereas the less neurotoxic Ko143 related molecule has not yet reached clinical trials. Non-toxic inhibitors have long been sought to address the clinical problem of chemotherapy failure. The ABCB1 inhibitor elacridar/GF120918 is also inhibiting

ABCG2 at high concentration, limiting its human use although phase I clinical trials of elacridar as an ABCG2 inhibitor have been reported [123].

Recently, imatinib which is an orally-administered tyrosine kinase inhibitor for curing Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia (CML) and gliomas, has been demonstrated to be transported by both ABCB1 [124] and ABCG2 [77], and additionally to display inhibitory effects [76]. Using wild-type mice, *Mdr1a/b* (-/-) knockout mice and *Abcg2*(-/-) knockout mice, imatinib distribution into the brain was directly related to the levels of ABCG2 and ABCB1 expression [124, 125]. Similarly, the brain distribution of dasatinib, an inhibitor of SCR/BCR-ABL kinases, was limited in wild-type mice and strongly increased in the double *Mdr1a/b* (-/-) *abcg2* (-/-) knockout mice. Dasatinib distribution was enhanced by the dual ABCB1 and ABCG2 inhibitor elacridar [126]. Similarly, the brain penetration of gefitinib and erlotinib (Tarceva), epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors, was also increased after administration of these drugs to *abcg2* (-/-) mice, by comparison to *Abcg2* (+/+) mice. Their accumulation into brain was potentiated when co-administrated with elacridar to wild-type mice [127, 128]. Taken together, these interesting findings might be relevant for patients with gliomas, LMC or locally non-small cell lung cancer toward using dual ABCB1 and ABCG2 modulators to improve the anti-cancer response to imatinib, gefitinib, erlotinib and dasatinib.

As present in human food, resveratrol, a polyphenolic stilbenoid and a phytoalexin, is produced by several plants upon contamination by bacteria or fungi. The use of *abcg2* (-/-) models clearly demonstrated that ABCG2, by eliminating resveratrol and its metabolites, strongly protected human from resveratrol high exposure and potential toxicity [129]. In parallel, curcumin has been shown to inhibit the transport activity of ABCG2, ABCB1 and ABCC1 proteins. Sulfasalazine and curcumin interact with ABCG2 [81, 82, 130]. In wild-type and *abcg2* (-/-) mice, orally-administrated curcumin increased the C_{max} and relative bioavailability of sulfasalazine [83].

Using wild-type mice, herbal polyphenol flavonoids, frequently present at high level in our daily diets, were found to inhibit several ABC transporters. Studies were dedicated to find a suitable way to predict harmful drug-flavonoid interactions mediated by ABCG2 [129]. The secretion of nitrofurantoin into milk and into bile was strongly impaired after co-administration of isoflavones [131].

Paracetamol, which is widely used in human, also appeared to interfere with ABCG2 function. An intraperitoneal injection of 700 mg/kg strongly decreased the Time-Concentration Curves (0-12) and C (max) of imatinib (single oral dose of 100 mg/kg) by

56% and 59%, respectively, and increased its half-life in male ICR mice [132]. Additionally, in wild-type mice, reflecting male-predominant ABCG2 expression level, the rate constant of biliary excretion was sex-dependent (higher in males than in females for acetaminophen metabolites) and supported by the lack of difference in *abcg2* (-/-) model [133]. These pharmacokinetic interactions need to be further explored in human use for combination of paracetamol and ABCG2 substrates during cancer cures. Nevertheless, although ABCG2 seemed to modulate acetaminophen elimination, ABCG2 genotype was not shown, recently, to modulate acetaminophen disposition in elderly patients [134].

Another aspect to be studied is the alteration of ABCG2 expression levels at various barriers. For example, at the duodenum segment, the decrease in expression levels of both ABCB1 and ABCG2 is due to combined administrations of imatinib (once a day) and IL2 (twice a day). This drug association increased both C_{max} and half-life of imatinib [135]. Surprisingly, oral administration of imatinib, twice a day, led to the inverse effect on ABCB1 expression levels, likely inducing a decrease of ABCB1 substrate. Although the authors did not report a similar effect for ABCG2, equivalent mechanisms may occur. Then, the expression levels in tissues have to be characterized as a function of the dose, and also likely of the exposure time [135].

New tools have been recently developed to improve a better understanding of ABCG2 functions and clinical potential application. Using the Transposagen's innovative TGEM™ technology, the novel ABCG2 TGEM™ Knockout Rat Model did not express the *abcg2* gene. The *Abcg2* TGEM™ Rats, which are deficient for a regulator of hypoxia, should allow studying the development of *in vivo* stem cell therapy. This new *abcg2* (-/-) mice will permit to study proliferative or anti-proliferative drugs, or to test stem cell therapies.

Since ABC transporters are commonly involved in the MultiDrug Resistance (MDR) phenotype, the inhibition of their function is supposed to restore the efficacy of substrate chemotherapy in drug-resistant cancers. Modulation of ABCG2 or ABCC3, in addition to ABCB1, may be necessary in some patients for improving the outcome. Presently, three generations of ABCB1 inhibitors have been developed to enhance the effects of chemotherapeutic drugs on MDR cancer cells, both *in vitro* and *in vivo*. The third-generation inhibitors of ABCB1, including the anthranilamide derivative tariquidar (XR-9576) and the dibenzosuberane derivative zosuquidar (LY335979), have been especially designed for high-affinity modulation of transport and low pharmacokinetic interactions. Consequently, interesting double *abcg2* (-/-) *mdr1* a/b (-/-) mice had been developed. These mice gave additional and complementary data to single *abcg2* (-/-) mice or *mdr1* a/b (-/-) mice. For

example, although the tyrosine kinase-targeting inhibitor sorafenib is not transported by ABCB1, according to *in vitro* data, Agarwal (2011) showed that brain-to-plasma ratios of sorafenib were strongly dependent on the ABCB1 and ABCG2 transporters present at the blood-brain barrier. An increase of sorafenib penetration was observed in both *abcg2* (-/-) mice, *mdr1 a/b* (-/-) mice and the double *abcg2* (-/-) *mdr1 a/b* (-/-) mice, and these data were supported by the sorafenib modulatory increase in brain after elacridar co-exposure [136]. Therefore, the use of these double knockout mice is highly relevant to study the pharmacokinetic parameters of specific substrates/inhibitors frequently used.

In conclusion, we just highlighted that the administration route has to be taken into account. Since apical ABCG2 is strongly expressed in enterocytes, gefitinib only modified the clearance of orally-administered irinotecan, while no change in clearance of systemic administration was observed [137]. Recently, we also confirmed that the time-concentration curves (AUC) of irinotecan and SN38 were similar in either presence or absence of the MBLI-87 inhibitor in SCID mice after intra-peritoneal administration [138].

4.2 Modulation of ABCG2 protein expression levels. Very recently, it has been shown that ABCG2 substrates are able to increase ABCG2 protein expression levels, which may lead to an increase of its global transport activity and then a decreased accumulation. We demonstrated that irinotecan was able to increase the ABCG2 expression levels ([Figure 9](#), [138]).

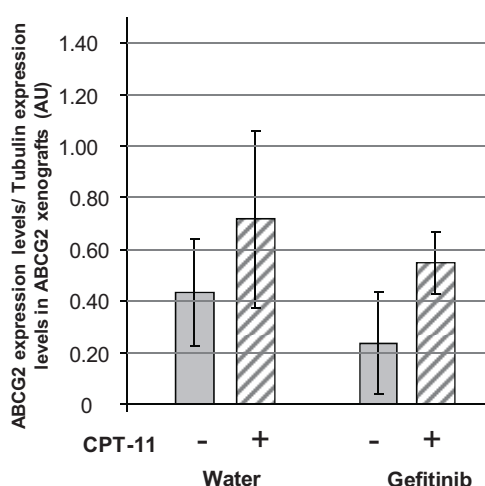


Figure 9. ABCG2 expression in xenografts. When the tumor volume approximately reached 1800 mm³, mice were sacrificed (approximately 26 days after cell implantation for water conditions and 58 days after cell implantation for irinotecan-gefitinib, respectively). Crude membrane fractions were prepared from individual xenografts. ABCG2 expression was quantified with anti-ABCG2 BXP21 antibody. Effects of treatment with irinotecan and/or gefitinib. ABCG2 expression was quantified and normalized to the alpha-tubulin content, with protein levels expressed as arbitrary units (AU). The values are means $\pm$ S.E.

Furthermore, modulators may either have, or not, an impact *in vitro* on ABCG2 expression levels. For example, some inhibitors (NSC-168201, NSC-120668, PZ-8, PZ-34, and PZ-38) decreased ABCG2 expression, while PZ-16 and FTC did not produce any

modification [139, 140]. *In vivo*, we demonstrated that gefitinib alone slightly decreased the ABCG2 protein expression levels in ABCG2 xenografts ([Figure 9](#)), while FTC [141] and MBLI-87/acridone 4b had no effect [138]. In all *in vivo* experiments, a preliminary tolerance protocol had to be done to determine safety dose range. Under our protocol, we characterized the maximal tolerated doses of irinotecan (30 mg/kg for 3 days/week) and of gefitinib (75 mg/kg for 3 days/week). Higher doses were responsible for mice loss of weight and modifications in behaviour. These elements were defined by the Animal Facility veterinarian board to quantify the *in vivo* toxicity of molecules. Additionally, it was interestingly observed that MBLI-87 and gefitinib inhibitors had no effect on the enhanced expression induced by irinotecan treatment ([Figure 9](#)).

4.3 Reversion of the MDR phenotype in xenograft models. In xenograft models, Garimella (2004) implanted in mice the Igrov1/T8 human ovarian cancer cells, overexpressing ABCG2 after topotecan selection. In a first phase, they studied the FTC tolerance and pharmacokinetic parameters in SCID mice. FTC was still detectable after 24 h in plasma and well distributed in tissues. Its concentration range was approximately above 1 μ M, which is compatible with its reversal effect [141].

Recently, by using a dynamic bioluminescent approach, Zhang (2007) clearly demonstrated that FTC was able to increase, by 4-fold, the retention of bioluminescent substrate into ABCG2-positive xenografts, similarly to its retention into the ABCG2-negative xenografts [142].

New molecules, less toxic than FTC, have been tested *in vivo* for their reversion effect on ABCG2 resistance to anti-cancer drugs. In various *in vivo* experimental assays, we and others have shown that the combination of irinotecan and gefitinib strongly decreased the growth rate of ABCG2-positive tumors by comparison to those treated with irinotecan alone or gefitinib alone ([Figure 10A](#); 143). This reversion effect was only observed in ABCG2-positive xenografts. The growth of ABCG2-negative xenografts was completely abolished by the irinotecan treatment ([Figure 10 B](#)).

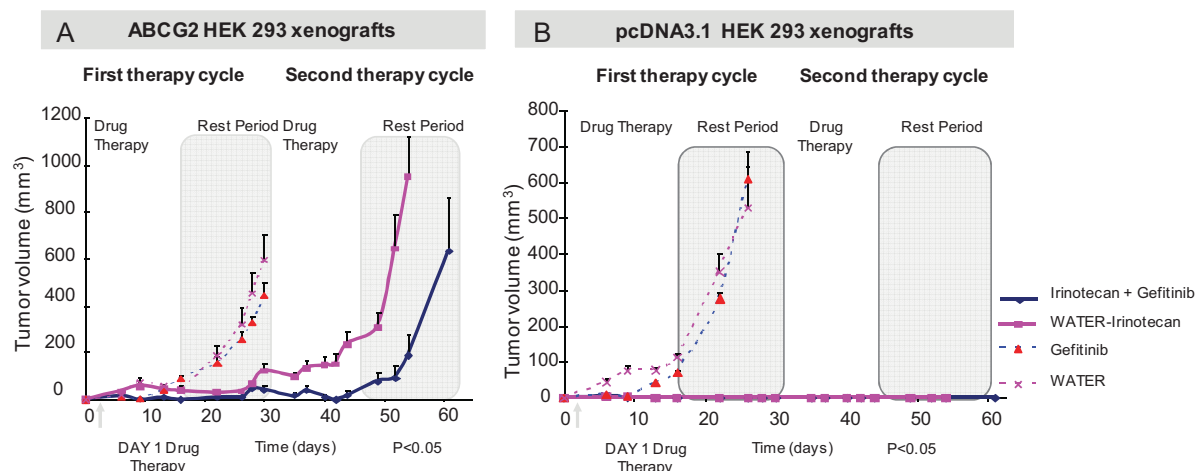


Figure 10. Activity of gefitinib and irinotecan, either alone or in combination, against ABCG2 (A) and pcDNA3.1 (B) xenografts. SCID mice (Charles River Laboratories) were handled in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and all procedures followed protocols approved by the Animal Facility veterinarian board. Eight week-old female mice were subcutaneously inoculated with either pcDNA3.1- or ABCG2-HEK293 cells (8.2×10^6 in 100 μ L PBS/inoculation). Since pcDNA3.1- and ABCG2-xenografts differently responded to irinotecan therapy, each mouse was implanted on the left and right flanks with the same cells. Volume was determined in mm^3 by measuring tumor length (l) and width (w), and using the formula: $\text{volume} = (4 \times 3.14 \times ((l+w)/2)^3)/3$. Time zero was the day of cell inoculation. Irinotecan was administered I.P. at 30 mg/kg (0.1 ml water), 3 days/week on 2 consecutive weeks followed by a 15-day rest period. gefitinib (provided by AstraZeneca, UK) was administered at 15 mg/ml in water by gavage for a total 75-mg/kg dose following the same irinotecan schedule. Each dot represents the size of a single tumor at indicated time. The data at each time period were averaged. A plot was made of tumor volume $\pm$ SE against time. Differences with P -values < 0.05 were considered as statistically significant between two sets of xenograft volume ($N=6$).

Although gefitinib reversed ABCG2-mediated resistance *in vivo*, controversial data were reported about its transport by ABCG2 [137, 144]. This may be linked to the fact that low gefitinib concentrations ($< 1 \mu\text{M}$) significantly activated ABCG2 ATPase activity, whereas higher concentrations ($> 1 \mu\text{M}$) had a markedly lower stimulatory effect [47] and allowed additional inhibitory-interaction with ABCB1 [145]. In humans, with $0.4 \mu\text{M}$ gefitinib steady-state plasma concentration, only 2.8% gefitinib is present as a free drug, which likely stimulates, rather than inhibits, ABCG2 ATPase activity. We and others used high and maximal tolerated doses of gefitinib (75 mg/kg) to demonstrate its ability to reverse the SN-38-dependent resistant phenotype [137, 143, 145]. Since gefitinib was extensively distributed in rat tissues and xenografts [146], we may suggest that such an extensive distribution allows it to inhibit ABCG2 in xenografted model. However, the requirement for such high doses would likely constitute limitations in using gefitinib for ABCG2 modulation in clinical setting. Furthermore, gefitinib is not ABCG2 specific. Recently, it had been demonstrated that co-injection with gefitinib (over 50 mg/kg), of the non-specific ABCB1 modulator cyclosporin A (50 mg/kg), and the dual ABCB1/ABCG2 modulator GF120918 (over 5 mg/kg) induced an increase of gefitinib uptake in mice brain 30 min after injection

[147]. In addition, the high ABCB1 expression levels in brain has major impact on gefitinib accumulation in brain, and ABCB1 might then be responsible for major side effects in clinical assays. Taken together, these data strongly support the interest of characterizing non-toxic and highly specific inhibitors of ABCG2 in order to limit brain toxicity. Consequently, following *in vitro* characterisation [69], MBLI-87/acridone 4b was shown to slow down ABCG2 xenografts [138]. The observed reversion curve was similar to that of gefitinib shown in Figure 9A, despite a low-yield formulation and a significant toxicity (EC_{50} in the range 2-4 μ M). Therefore, finding new-generation compounds with higher potency and solubility and lower intrinsic cytotoxicity could further improve the ability to prevent xenografted tumor growth.

Taken altogether, it appeared that modulating ABCG2 expression and/or activity level could be clinically desirable in human physiology and disease. Supporting these data, polymorphism of proteins (ABCB1, ABCC2, ABCG2, SLCO1B1 and UGT1A1) was investigated on irinotecan and SN-38 time concentration curves, or neutropenia in irinotecan monotherapy and irinotecan-cisplatin combined therapy. ABCG2 polymorphisms (ABCG2 421C>A (Q141K) and IVS12 + 49G>T ((#) IIB)) were identified to be associated to neutropenia (toxicity symptom) in the irinotecan monotherapy [148].

5. Perspectives

5.1. Potential interest of bimodulation. Even when a good inhibitor, both potent and ABCG2-specific, is available, its combination with another inhibitor interacting at a distinct binding site is often highly beneficiary, by producing additive or even synergistic inhibitions. The interest and efficiency of bi- or multi-modulation have been clearly demonstrated in the clinical treatment of many pathologies, such as those related to HIV where up to three/four distinct antivirals (targeting proteases, reverse transcriptase, integrase, membrane fusion, ...) are associated in the Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART) protocol. Also HCV treatments require pegylated-interferon alpha and ribavirin treatment in addition to antiproteases such as boceprevir or telaprevir, in order to prevent or limit mutation-induced virus resistance.

In the case of multidrug ABC transporters, the feasibility of bi- or pluri-modulation has been shown, for example with LtrMDR1, an ABCB1 homologue in *Leishmania tropica* parasite, by using compounds targeting either the NBDs or the TMDs of the transporter [149]. In many preclinical or clinical trials against either ABCB1, ABCC1 or ABCG2 drug-efflux activity, various combinations of transporter inhibitors have been assayed for sensitizing

tumor cells to different chemotherapeutics. In our case with ABCG2-specific inhibitors, combining two types of inhibitors could have several advantages: i) to reach a final 100% inhibition while some inhibitors alone, such as 6-prenylchrysin [99], curcumin [83] and others [70], despite their high affinity, do not fully inhibit, ii) to use rather low concentrations of each inhibitor, limiting the inhibitor intrinsic cytotoxicity and associated secondary side-effects.

5.2. Ligand-based drug design. During the past ten years, the search for ABCG2 inhibitors has provided potent and selective compounds, belonging to different classes of molecules. The gathered structural information required for selective inhibition of ABCG2 may be used to conceive a pharmacophore/molecular model defining the necessary structural characteristics in order to bind to the target. If liable QSAR tools are now available for exploring this global investigation, one major difficulty related to the heterogeneous test is to be considered. Indeed, all reported selective and potent inhibitors are not necessarily evaluated on the same cell line or through the same assay.

Ligand-based drug design was investigated among specific classes of molecules but global investigations dealing with cross-linking of inhibitors originated from different families of molecules is yet to come. As mentioned above (see chromanone-derived inhibitors [69], this approach was actually attempted and found to be efficient. The latter concerned ligands derived from only two inhibitors classes: flavonoids and GF120918. One interesting study would be to combine the three major ABCG2-selective inhibitors: FTC derivatives, flavonoid derivatives, and elacridar/tariquidar analogs and conceive a pharmacophore bearing the major structural elements.

5.3. ABCG2 molecular models and structure-based drug design. Structure-based drug design of ABCG2 modulators represents the next challenge for controlling the pump activity. This approach already opened for human ABCB1, for which high-resolution structural data are now available [150] is presently limited by the lack of structural data at the same resolution for ABCG2. To date, only low-resolution data have been reported, which essentially give information about the quaternary structure of ABCG2 [12-14, 21]. Two 3D-models of ABCG2 have been built in the recent past [18, 19] on the basis of the prokaryotic Sav1866 3D structure [151, however, as underlined by Ker and colleagues [152], these models suffer of the low level of primary sequence similarity between both proteins, and their deep topological differences concerning (i) the reverse TMD-NBD arrangement, (ii) the size difference of the two intracellular loops, which are much shorter in ABCG2 and (iii) the specific presence in ABCG2 of a large intracellular linker

domain between the NBD and TMD together with a large extracellular loop 3 between TMDs 5 and 6. Experimental data giving topological information on the membrane domain such as those obtained by hemagglutinin insertion [153], should help in optimizing an ABCG2 3D-model. In addition, the characterization of ABCG2 domains such as ECL3 [22, 32] should also contribute to build a more precise model. With the recent resolution of the mouse P-gp by the Chang team [150], a complementary approach will be to refine this ABCG2 3D model by mapping the drug-binding region taking into account common and distinct features of the drug-binding sites of both proteins. All these approaches will not replace a true experimental 3D information obtained from a crystal structure.

Acknowledgments

Drs. R.W. Robey and S.E. Bates, NCI-NIH, Bethesda, MD, are acknowledged for providing HEK-293 cells transfected by either ABCB1 (MDR-19) or ABCC1, and GlaxoSmithKline for GF120918. S.M., A.P., O.A. and C.G. were recipient of doctoral fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer, the Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Financial support was provided by the CNRS and Université Lyon 1 (UMR 5086) and Grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue 2009), the Région Rhône-Alpes (CIBLE 2010) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-NKTH 2010). Mobility fellowships were attributed by the Région Rhône-Alpes (Explora'Doc program) to S.M, and by the Brazilian CAPES (Process number 2303/10-8) to G.V.

References

- [1] Allikmets, R.; Schriml, L.M.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V.; Dean, M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.*, **1998**, 58(23), 5337-5339.
- [2] Doyle, L.A.; Yang, W.; Abruzzo, L.V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A.K.; Ross, D.D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1998**, 95(26), 15665-15670.
- [3] Miyake, K.; Mickley, L.; Litman, T.; Zhan, Z.; Robey, R.; Cristensen, B.; Brangi, M.; Greenberger, L.; Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S.E. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.*, **1999**, 59(1), 8-13.
- [4] Hung, L.W.; Wang, I.X.; Nikaido, K.; Liu, P.Q.; Ames, G.F.; Kim, S.H. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **1998**, 396(6712), 703-707.
- [5] Ambudkar, S.V.; Kim, I.W.; Xia, D.; Sauna, Z.E. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett.*, **2006**, 580(4), 7605-7616.
- [6] Smith, P.C.; Karpowich, N.; Millen, L.; Moody, J.E.; Rosen, J.; Thomas, P.J.; Hunt, J.F. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell*, **2002**, 10(1), 139-149.
- [7] Hanekop, N.; Zaitseva, J.; Jenewein, S.; Holland, I.B.; Schmitt, L. Molecular insights into the mechanism of ATP hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Lett.*, **2006**, 580(4), 3432-3443.
- [8] Dawson, R.J.; Locher, K.P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, **2006**, 443(7108), 180-185.
- [9] Ward, A.; Reyes, C.L.; Yu, J.; Roth, C.B.; Chang, G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104(48), 19005-19010.
- [10] Polgar, O.; Robey, R.W.; Morisaki, K.; Dean, M.; Michejda, C.; Sauna, Z.E.; Ambudkar, S.V.; Tarasova, N.; Bates, S.E. Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry*, **2004**, 43(29), 9448-9456.
- [11] Bhatia, A.; Schäfer, H.J.; Hrycyna, C.A. Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry*, **2005**, 44(32), 10893-10904.

- [12] Xu, J.; Liu, Y.; Yang, Y.; Bates, S.E.; Zhang, J.T. Characterization of oligomeric human half-transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(19), 19781-19789.
- [13] McDewitt, C.A.; Collins, R.F.; Conway, M.; Modok, S.; Storm, J.; Kerr, I.D.; Ford, R.C.; Callaghan, R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure*, **2006**, 14(11), 1623-1632.
- [14] Dezi, M.; Fribourg, P.F.; Di Cicco, A.; Arnaud, O.; Marco, S.; Falson, P.; Di Pietro, A.; Levy, D. The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes. *BBA Biomembranes*, **2010**, 1798, 2094-2101.
- [15] Henriksen, U.; Fog, J.U.; Litman, T.; Gether, U. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280(44), 36926-36934.
- [16] Kage, K.; Fujita, T.; Sugimoto, Y. Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2. *Cancer Sci.*, **2005**, 96(12), 866-872.
- [17] Davidson, A.L.; Chen, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, **2004**, 73, 241-268.
- [18] Li, Y.F.; Polgar, O.; Esser, L.; Bates, S.E.; Xia, D. Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: a molecular modeling study. *J. Mol. Graph. Model.*, **2007**, 25(6), 837-851.
- [19] Hazai, E.; Bikadi, Z. Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Struct. Biol.*, **2008**, 162(1), 63-74.
- [20] Dawson, R.J.; Hollenstein, K.; Locher, K.P. Uptake or extrusion: crystal structures of full transporters suggest a common mechanism. *Mol. Microbiol.*, **2007**, 65(2), 250-257.
- [21] Xu, J.; Peng, H.; Chen, Q.; Liu, Y.; Dong, Z.; Zhang, J.T. Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity. *Cancer Res.*, **2007**, 67(9), 4373-4381.
- [22] Ozvegy-Laczka, C.; Laczko, R.; Hegedus, C.; Litman, T.; Varady, G.; Goda, K.; Hegedus, T.; Dokholyan, N.V.; Sorrentino, B.P.; Varadi, A.; Sarkadi, B. Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283(38), 26059-26070.

- [23] Doyle, L.A.; Ross, D.D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, **2003**, *22*(47), 7340-7358.
- [24] Wang, H.; Zhou, L.; Gupta, A.; Vethanayagam, R.R.; Zhang, Y.; Unadkat, J.D.; Mao, Q. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2006**, *290*(5), E798-807.
- [25] Imai, Y.; Ishikawa, E.; Asada, S.; Sugimoto, Y. Estrogen-mediated post-transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Res.*, **2005**, *65*(2), 596-604.
- [26] Honorat, M.; Mesnier, A.; Di Pietro, A.; Lin, V.; Cohen, P.; Dumontet, C.; Payen, L. Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, *375*(3), 308-314.
- [27] Imai, Y.; Asada, S.; Tsukahara, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; Sugimoto, Y. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *64*(3), 610-618.
- [28] Loscher, W.; Potska, H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2005**, *6*, 591-602.
- [29] Breedveld, P.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.M. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharm. Sci.*, **2006**, *27*(1), 17-24.
- [30] Bihorel, S.; Camenish, G.; Lemaire, M.; Scherrmann, J.M. Modulation of the brain distribution of imatinib and its metabolites in mice by valspodar, zosuquidar and elacridar. *Pharm. Res.*, **2007**, *24*(9), 1720-1728.
- [31] Zhou, S.; Schuetz, J.D.; Bunting, K.D.; Colapietro, A.M.; Sampath, J.; Morris, J.J.; Lagutina, I.; Grosveld, G.C.; Osawa, M.; Nakauchi, H.; Sorrentino, B.P. 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.*, **2001**, *7*(9), 1028-1034.
- [32] Desuzinges-Mandon, E.; Arnaud, O.; Martinez, L.; Huché, F.; Di Pietro, A.; Falson, P. ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 33123-33133.
- [33] Krishnamurthy, P.; Ross, D.D.; Nakanishi, T.; Bailey-Dell, K.; Zhou, S.; Mercer, K.E.; Sarkadi, B.; Sorrentino, B.P.; Schuetz, J.D. The stem cell marker Bcrp/ABCG2

- enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(23), 24218-24225.
- [34] Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S.E. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5(4), 275-284.
- [35] Robey, R.W.; Polgar, O.; Deeken, J.; To, K.W.; Bates, S.E. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.*, **2007**, 26(1), 39-57.
- [36] Diestra, J.E.; Scheffer, G.L.; Catala, I.; Maliepaard, M.; Schellens, J.H.; Scheper, R.J.; Germa-Lluch, J.R.; Isquierdo, M.A. 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.*, **2002**, 198(2), 213-219.
- [37] Galimberti, S.; Guerrini, F.; Palumbo, G.A.; Consoli, U.; Fazzi, R.; Morabito, F.; Santini, V.; Petrini, M. Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients. *Leuk. Res.*, **2004**, 28(4), 367-372.
- [38] Benderra, Z.; Faussat, A.M.; Sayada, L.; Perrot, J.Y.; Chaoui, D.; Marie, J.P.; Legrand, O. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute leukemias. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10(23), 7896-7902.
- [39] Steinbach, D.; Legrand, O. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra ? *Leukemia*, **2007**, 21(6), 1172-1176.
- [40] Polgar, O.; Robey, R.W.; Bates, S.E. ABCG2: structure, function and role in drug resistance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2008**, 4(1), 1-15.
- [41] Allen, J.D.; Brinkhuis, R.F.; Wijnholds, J.; Schinkel, A.H. The mouse Bcrp1/Mxr/abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.*, **1999**, 59(17), 4237-4241.
- [42] Schellens, J.H.; Maliepaard, M.; Scheper, R.J.; Scheffer, G.L.; Jonker, J.W.; Smit, J.W.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**, 922, 188-194.
- [43] Kawabata, S.; Oka, M.; Shiozawa, K.; Tsukamoto, K.; Nakatomi, K.; Soda, H.; Fukuda, M.; Ikegami, Y.; Sugahara, K.; Yamada, Y.; Kamihira, S.; Doyle, L.A.; Ross, D.D.; Kohno, S. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 280(5), 1216-1223.

- [44] Volk, E.L.; Farley, K.M.; Wu, Y.; Li, F.; Robey, R.W.; Schneider, E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.*, **2002**, *62*(17), 5035-5040.
- [45] Allen, J.D.; van Dort, S.C.; Buitelaar, M.; van Tellingen, O.; Schinkel, A.H. Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res.*, **2003**, *63*(6), 1339-1344.
- [46] Burger, H.; van Tol, H.; Boersma, A.W.; Brok, M.; Wiemer, E.A.; Stoter, G.; Nooter, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*, **2004**, *104*(9), 2940-2942.
- [47] Elkind, N.B.; Szentpetery, Z.; Apati, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Varady, G.; Ujhelly, O.; Szabo, K.; Homolya, L.; Varadi, A.; Buday, L.; Keri, G.; Nemet, K.; Sarkadi, B. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res.*, **2005**, *65*(5), 1770-1777.
- [48] Brendel, C.; Scharenberg, C.; Dohse, M.; Robey, R.W.; Bates, S.E.; Shukla, S.; Ambudkar, S.V.; Wang, Y.; Wennemuth, G.; Burchert, A.; Boudriot, U.; Neubauer, A. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic cells. *Leukemia*, **2007**, *21*(6), 1267-1275.
- [49] Robey, R.W.; Medina-Perez, W.Y.; Nishiyama, K.; Lahusen, T.; Miyake, K.; Litman, T.; Senderowicz, A.M.; Ross, D.D.; Bates, S.E. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*(1), 145-152.
- [50] Komatani, H.; Kotani, H.; Hara, Y.; Nakagawa, R.; Matsumoto, M.; Arakawa, H.; Nishimura, S. Identification of breast cancer resistant protein/mitoxantrone resistance/placenta-specific, ATP-binding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(7), 2827-2832.
- [51] Breedveld, P.; Pluim, D.; Cipriani, G.; Dalhaus, F.; van Eijndhoven, M.A.J.; de Wolf, C.J.F.; Kuil, A.; Beijnen, J.H.; Scheffer, G.L.; Jansen, G.; Borst, P.; Schellens, J.H.M. The effect of low pH on Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models. *Mol. Pharmacol.*, **2007**, *71*, 240-249.

- [52] An, G.; Gallegos, M.; Morris, M. E. The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux. *Drug Metab. Dispos.*, **2010**, *in press*.
- [53] Wang, X.; Nitanda, T.; Shi, M.; Okamoto, M.; Furukawa, T.; Sugimoto, Y.; Akiyama, S.; Baba, M. Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *68*(7), 1363-1370.
- [54] Wang, X.; Furukawa, T.; Nitanda, T.; Okamoto, M.; Sugimoto, Y.; Akiyama, S.; Baba, M. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol.*, **2003**, *63*(1), 65-72.
- [55] Pan, G.; Giri, N.; Elmquist, W.F. Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metab. Dispos.*, **2007**, *35*(7), 1165-1173.
- [56] Robey, R.W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S.E. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.*, **2004**, *64*(4), 1242-1246.
- [57] van Herwaarden, A.E.; Wagenaar, E.; Karnekamp, B.; Merino, G.; Jonker, J.W.; Schinkel, A.H. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis*, **2006**, *27*(1), 123-130.
- [58] Merino, G.; Alvarez, A.I.; Pulido, M.M.; Molina, A.J.; Schinkel, A.H.; Prieto, J.G. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, *34*(4), 690-695.
- [59] Zhang, Y.; Gupta, A.; Wang, H.; Zhou, L.; Vethanayagam, R.R.; Unadkat, J.D.; Mao, Q. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharm Res.*, **2005**, *22*(12), 2023-2034.
- [60] Litman, T.; Brangi, M.; Hudson, E.; Fetsch, P.; Abati, A.; Ross, D.D.; Miyake, K.; Resau, J.H.; Bates, S.E. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.*, **2000**, *113*(11), 2011-2021.
- [61] Honjo, Y.; Hrycyna, C.A.; Yan, Q.W.; Medina-Perez, W.Y.; Robey, R.W.; van de Laar, A.; Litman, T.; Dean, M.; Bates, S.E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(18), 6635-6639.

- [62] Robey, R.W.; Honjo, Y.; Morisaki, K.; Nadjem, T.A.; Runge, S.; Risbood, M.; Poruchynski, M.S.; Bates, S.E. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br. J. Cancer*, **2003**, *89*(10), 1971-1978.
- [63] Pozza, A.; Perez-Victoria, J.M.; Sardo, A.; Ahmed-Belkacem, A.; Di Pietro, A. Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2006**, *63*(16), 1912-1922.
- [64] Ozvegy, C.; Varadi, A.; Sarkadi, B. 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.*, **2002**, *277*(50), 47980-47990.
- [65] Szakacs, G.; Paterson, J.K.; Ludwig, J.A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, *5* (3), 219-234.
- [66] Florin, A.; Boutonnat, J.; Boumendjel, A. Overcoming BCRP-mediated multidrug resistance. *Drugs of the Future*, **2008**, *33*(6), 533-542.
- [67] Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Macalou, S.; Perez-Victoria, J. M.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A. Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anti-Cancer Drugs*, **2006**, *17*, 239-244.
- [68] de Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.W.; Bates, S.E. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.*, **1999**, *146*, 117-126.
- [69] Boumendjel, A.; Macalou, S.; Ahmed-Belkacem, A.; Blanc, M.; Di Pietro, A. Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 2892-2897.
- [70] Kühnle, M.; Egger, M.; Muller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G.; Fricker, G.; König, B.; Buschauer, A. Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 1190-1197.
- [71] Lee, J.S.; Scala, S.; Matsumoto, Y.; Dickstein, B.; Robey, R.W.; Zhan, Z.; Altenberg, G.; Bates, S.E. Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression. *J. Cell. Biochem.* **1997**, *65*, 513-526.
- [72] Qadir, M.; O'Loughlin, K.L.; Fricke, S.M.; Williamson, N.A.; Greco, W.R.; Minderman, H.; Baer, M.R. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 2320-2326.

- [73] Gupta, A.; Dai, Y.; Vethanayagam, R.R.; Hebert, M.F.; Thummel, K.E.; Unadkat, J.D.; Ross, D.D.; Mao, Q. Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2006**, *58*, 374-383.
- [74] Wang, X.; Baba, M. The role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir. Chem. Chemother.*, **2005**, *16*, 213-216.
- [75] Weiss, J.; Rose, J.; Storch, C.H.; Ketabi-Kiyanvash, N.; Sauer, A.; Haefeli, W.E.; Efferth, T. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2007**, *59*, 238-245.
- [76] Houghton, P.J.; Germain, G.S.; Harwood, F.C.; Schuetz, J.D.; Stewart, C.F.; Buchdunger, E.; Traxler, P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 2333-2337.
- [77] Burger, H.; van Tol, H.; Boersma, A.W.; Brok, M.; Wiemer, E.A.; Stoter, G.; Nooter, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*, **2004**, *104*, 2940-2942.
- [78] Ozvegy-Laczka, C.; Hegedus, T.; Varady, G.; Ujhelly, O.; Schuetz, J.D.; Varadi, A.; Keri, G.; Orfi, L.; Nemet, K.; Sarkadi, B. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol. Pharmacol.*, **2004**, *65*, 1485-1495.
- [79] Hikaru, S.; Ran, A.; Hiroyuki, H.; Toshihisa, I. Emerging new technology: QSAR analysis and MO calculation to characterize interactions of protein kinase inhibitors with the human ABC transporter, ABCG2 (BCRP). *Drug Metab. Pharmacok.*, **2010**, *25*, 72-83.
- [80] Brooks, T.A.; Minderman, H.; O'Loughlin, K.L.; Pera, P.; Ojima, I.; Baer, M.R.; Bernacki, R.J. Taxane-based reversal agents modulate drug resistance mediated by P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, *2*, 1195-1205.
- [81] Limtrakul, P.; Chearwae, W.; Shukla, S.; Phisalpong, C.; Ambudkar, S.V. Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol. Cell. Biochem.*, **2007**, *296*, 85-95.

- [82] Chearwae, W.; Shukla, S.; Limtrakul, P.; Ambudkar, S.V. Modulation of the function of multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, 5, 1995-2006.
- [83] Shukla, S.; Zaher, H.; Hartz, A.; Bauer, B.; Ware, J.A.; Ambudkar, S.V. Curcumin inhibits the activity of ABCG2/BCRP1, a multidrug resistance-linked ABC drug transporter in mice. *Pharm. Res.*, **2009**, 26, 480-487.
- [84] Jin, J.; Shahi, S.; Kang, H.K.; van Veen, H.W.; Fan, T.P. Metabolites of ginsenosides as novel BCRP inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 345, 1308-1314.
- [85] Holland, M.L.; Lau, D. T.; Allen, J.D.; Arnold, J.C. The multidrug transporter ABCG2 (BCRP) is inhibited by plant-derived cannabinoids. *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, 152, 815-824.
- [86] Rabindran, S.K.; He, H.; Singh, M.; Brown, E.; Collins, K.I.; Annable, T.; Greenberger, L.M. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.*, **1998**, 58, 5850-5858.
- [87] van Loevezijn, A.; Allen, J.D.; Schinkel, A.H.; Koomen, G.J. Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 29-32.
- [88] Allen, J.D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J.M.; van der Valk, M.; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J.H.M.; Koomen, G.J.; Schinkel, A.H. Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C. *Mol. Cancer Ther.*, **2002**, 1, 417-425.
- [89] Woehlecke, H.; Osada, H.; Herrmann, A.; Lage, H. Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *Int. J. Cancer*, **2003**, 107, 721-728.
- [90] Walsh, T.J.; Standiford, H.C.; Rebolli, A.C.; John, J.F.; Mulligan, M.E.; Ribner, B.S.; Montgomerie, J.Z.; Goetz, M.B.; Mayhall, C.G.; Rimland, D.; Stevens, D.A.; Hansen, S.L.; Gerard, G.C.; Ragual, R. J. Randomized Double-Blinded Trial of Rifampin with Either Novobiocin or Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization: Prevention of Antimicrobial Resistance and Effect of Host Factors on Outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, 37(6), 1334-1342.
- [91] Yang, C.H.; Chen, Y.C.; Kuo, M.L. Novobiocin sensitizes BCRP/MXR/ABCP overexpressing topotecan-resistant human breast carcinoma cells to topotecan and mitoxantrone. *Anticancer Res.*, **2003**, 23(3B), 2519-2523.
- [92] Shiozawa, K.; Oka, M.; Soda, H.; Yoshikawa, M.; Ikegami, Y.; Tsurutani, J.; Nakatomi,

- K.; Nakamura, Y.; Doi, S.; Kitazaki, T.; Mizuta, Y.; Murase, K.; Yoshida, H.; Ross, D.D.; Kohno, S. Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. *Int. J. Cancer.*, **2004**, *108*(1), 146-151.
- [93] Su, Y.; Sinko, P.J. Inhibition of efflux transporter ABCG2/BCRP does not restore mitoxantrone sensitivity in irinotecan-selected human leukemia CPT-K5 cells: evidence for multifactorial multidrug resistance. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2006**, *29*(2), 102-110.
- [94] Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Novel lead for potent inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 180-183.
- [95] Pick, A.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. Specific inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). *ChemMedChem.*, **2010**, *5*, 1498-1505.
- [96] Cooray, H.C.; Janvilisri, T.; van Veen, H.W.; Hladky, S.B.; Barrand, M.A. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *317*, 269-275.
- [97] Zhang, S.; Yang, X.; Morris, M.E. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol. Pharmacol.*, **2004**, *65*, 1208-1216.
- [98] Zhang, S.; Yang, X.; Morris, M.E. Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharm. Res.*, **2004**, *21*, 1263-1273.
- [99] Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Munoz-Martinez, F.; Bates, S.E.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Di Pietro, A.; Perez-Victoria, J.M. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 4852-4860.
- [100] Katayama, K.; Masuyama, K.; Yoshioka, S.; Hasegawa, H.; Mitsuhashi, J.; Sugimoto, Y. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2007**, *60*, 789-797.
- [101] An, G.; Morris, M. E. Effects of single and multiple flavonoids on BCRP-mediated accumulation, cytotoxicity and transport of mitoxantrone in vitro. *Pharm. Res.*, **2010**, *27*, 1296-1308.
- [102] Liu, X.L.; Tee, H.W.; Go, M.L. Functionalized chalcones as selective inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*(1), 171-180.

- [103] Han, Y.; Riwanto, M.; Go, M.L.; Rachel Ee, P.L. Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) by non-basic chalcone analogues. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2008**, 35(1-2), 30-41.
- [104] Macalou, S.; Ahmed-Belkacem, A.; Borelli, F.; Capasso, R.; Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O.; Di Pietro, A. Non-prenylated rotenoids, a new class of potent breast cancer resistance protein inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 1933-1938.
- [105] Boumendjel, A.; Nicolle, E.; Moraux, T.; Gerby, B.; Blanc, M.; Ronot, X.; Boutonnat, J. Piperazinobenzopyranones and Phenalkylaminobenzopyranones: Potent Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 7275-7281.
- [106] Ecker, G.F.; Stockner, T.; Chiba P. Computational models for prediction of interactions with ABC-transporters. *Drug. Discov. Today*, **2008**, 13(7-8), 311-317.
- [107] Gandhi, Y.A.; Morris, M.E. Structure–Activity Relationships and Quantitative Structure–Activity Relationships for breast cancer resistance protein (ABCG2), *AAPS J.*, **2009**, 11(3), 541-552.
- [108] Zhang, S.; Yang, X.; Coburn, R.A.; Morris, M.E. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein, *Biochem Pharmacol.*, **2005**, 70, 627-639.
- [109] Nicolle, E.; Boccard, J.; Guilet, D.; Dijoux, M.-G.; Zelefac, F.; Macalou, S., Schmidt, J.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A. New inhibitors and QSAR studies by a 3D linear solvation-energy approach, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2009**, 38, 39-46.
- [110] Cruciani, G.; Crivori, P.; Carrupt, P.A.; Testa, B. Molecular fields in quantitative structure permeation relationships: the VolSurf approach. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **2000**, 503, 17–30.
- [111] Boccard, J.; Bajot, F.; Di Pietro, A.; Rudaz, S.; Boumendjel, A.; Nicolle, E., Carrupt, P.-A., Solvatochromic analysis of molecular interaction forces between flavonoid derivatives and P-glycoprotein, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2009**, 36, 254-264.
- [112] Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Structure–activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 8224–8236.
- [113] Matsson, P.; Englund, G.; Ahlin, G.; Bergström, C.A.S.; Norinder, U.; Artursson, P. A global drug inhibition pattern for the human ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (ABCG2), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2007**, 323, 19–30.
- [114] Halgreen, T.A.; Damm, W. Polarizable force fields. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2001**, 11, 236-242.
- [115] Hyafil, F.; Vergely, C.; Du Vignaud, P.; Grand-Perret, T. In vitro and in vivo reversal of

- multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.*, **1993**, 53, 4595-4602.
- [116] Mistry, P.; Stewart, A.J.; Dangerfield, W.; Okiji, S.; Liddle, C.; Bootle, D; Plumb, J.A.; Templeton, D.; Charlton, P. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.*, **2001**, 61(2), 749-758.
- [117] Tamai, I.; Safa, A.R. Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266(25), 16796-16800.
- [118] Shukla, S.; Robey, R.W.; Bates, S.E.; Ambudkar, S.V. The calcium channel blockers, 1,4-dihydropyridines, are substrates of the multidrug resistance-linked ABC drug transporter, ABCG2. *Biochemistry*, **2006**, 45(29), 8940-8951.
- [119] Gutmann, H.; Hruz, P.; Zimmermann, C.; Beglinger, C.; Drewe, J. Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem Pharmacol.*, **2005**, 70(5), 695-699.
- [120] Maliepaard, M.; Scheffer, G.L.; Faneyte, I.F.; van Gastelen, M.A.; Pijnenborg, A.C.; Schinkel, A.H.; van De Vijver, M.J.; Scheper, R.J.; Schellens, J.H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.*, **2001**, 61(8), 3458-3464.
- [121] Vlaming, M.L.; Lagas, J.S.; Schinkel, A.H. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2009**, 61(1), 14-25.
- [122] Jonker, J.W.; Buitelaar, M.; Wagenaar, E.; Van Der Valk, M.A.; Scheffer, G.L.; Scheper, R.J.; Plosch, T.; Kuipers, F.; Elferink, R.P.; Rosing, H.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2002**, 99(24), 15649-15654.
- [123] Kuppens, I.E.; Witteveen, E.O.; Jewell, R.C.; Radema, S.A.; Paul, E.M.; Mangum, S.G.; Beijnen, J.H.; Voest, E.E.; Schellens, J.H. A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin Cancer Res.*, **2007**, 13(11), 3276-3285.
- [124] Dai, H.; Marbach, P.; Lemaire, M.; Hayes, M.; Elmquist, W.F. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, 304(3), 1085-1092.
- [125] Breedveld, P.; Pluim, D.; Cipriani, G.; Wielinga, P.; van Tellingen, O.; Schinkel, A.H.; Schellens, J.H. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain

- penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res.*, **2005**, 65(7), 2577-2582.
- [126] Chen, Y.; Agarwal, S.; Shaik, N.M.; Chen, C.; Yang, Z.; Elmquist, W.F. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein influence brain distribution of dasatinib. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**, 330(3), 956-963.
- [127] Elmeliegy, M.A.; Carcaboso, A.M.; Tagen, M.; Bai, F.; Stewart, C.F. Role of ATP-binding cassette and solute carrier transporters in erlotinib CNS penetration and intracellular accumulation. *Clin. Cancer Res.*, **2011**, 17(1), 89-99.
- [128] Agarwal, S.; Sane, R.; Gallardo, J.L.; Ohlfest, J.R.; Elmquist, W.F. Distribution of gefitinib to the brain is limited by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated active efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2010**, 334(1), 147-155.
- [129] Alvarez, A.I.; Real, R.; Pérez, M.; Mendoza, G.; Prieto, J.G.; Merino, G. Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J. Pharm. Sci.*, **2010**, 99(2), 598-617
- [130] Chearwae, W.; Anuchapreeda, S.; Nandigama, K.; Ambudkar, S.V.; Limtrakul, P. Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II, and III purified from Turmeric powder. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, 68(10), 2043-2052.
- [131] Merino, G.; Perez, M.; Real, R.; Egido, E.; Prieto, J.G.; Alvarez, A.I. In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: a comparative study in Bcrp1 (-/-) mice. *Pharm. Res.*, **2010**, 27(10), 2098-2105.
- [132] Nassar, I.; Pasupati, T.; Judson, J.P.; Segarra, I. Reduced exposure of imatinib after coadministration with acetaminophen in mice. *Indian J. Pharmacol.*, **2009**, 41, 167-172.
- [133] Lee, J.K.; Abe, K.; Bridges, A.S.; Patel, N.J.; Raub, T.J.; Pollack, G.M.; Brouwer, K.L. Sex-dependent disposition of acetaminophen sulfate and glucuronide in the in situ perfused mouse liver. *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, 37(9), 1916-1921.
- [134] Liukas, A.; Kuusniemi, K.; Aantaa, R.; Virolainen, P.; Niemi, M.; Neuvonen, P.J.; Olkkola, K.T. Pharmacokinetics of intravenous paracetamol in elderly patients. *Clin. Pharmacokinet.*, **2011**, 50(2), 121-129.
- [135] Hosten, B.; Abbara, C.; Cibert, M.; Petit, B.; Farinotti, R.; Gonin, P.; Bonhomme-Faivre, L. Interleukin-2 treatment effect on imatinib pharmacokinetic, P-gp and BCRP expression in mice. *Anticancer Drugs*, **2010**, 21(2), 193-201.

- [136] Agarwal, S.; Sane, R.; Ohlfest, J.R.; Elmquist, W.F. The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2011**, 336(1), 223-233.
- [137] Stewart, C.F.; Leggas, M.; Schuetz, J.D.; Panetta, J.C.; Cheshire, P.J.; Peterson, J.; Daw, N.; Jenkins, J.J. 3rd, Gilbertson, R.; Germain, G.S.; Harwood, F.C.; Houghton, P.J. Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 7491-7499.
- [138] Arnaud, O.; Boumendjel, A.; Gèze, A.; Honorat, M.; Matera, E.L.; Guitton, J.; Stein, W.D.; Bates, S.E.; Falson, P.; Dumontet, C.; Di Pietro, A.; Payen, L. The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. *Eur. J. Cancer.*, **2011**, *in press*.
- [139] Peng, H.; Dong, Z.; Qi, J.; Yang, Y.; Liu, Y.; Li, Z.; Xu, J.; Zhang, J.T. A novel two mode-acting inhibitor of ABCG2-mediated multidrug transport and resistance in cancer chemotherapy. *PLoS One.*, **2009**, 4(5):e5676.
- [140] Peng, H.; Qi, J.; Dong, Z.; Zhang, J.T. Dynamic vs static ABCG2 inhibitors to sensitize drug resistant cancer cells. *PLoS One.*, **2010**, 5(12):e15276.
- [141] Garimella, T.S.; Ross, D.D.; Eiseman, J.L.; Mondick, J.T.; Joseph, E.; Nakanishi, T.; Bates, S.E.; Bauer, K.S. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) inhibitor fumitremorgin C in SCID mice bearing T8 tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2005**, 55(2), 101-109.
- [142] Zhang, Y.; Bressler, J.P.; Neal, J.; Lal, B.; Bhang, H.E.; Laterra, J.; Pomper, M.G. ABCG2/BCRP expression modulates D-Luciferin based bioluminescence imaging. *Cancer Res.*, **2007**, 67(19), 9389-9397.
- [143] Yanase, K.; Tsukahara, S.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Imai, Y.; Sugimoto, Y. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol. Cancer Ther.*, **2004**, 3(9), 1119-1125.
- [144] Lemos, C.; Jansen, G.; Peters, G.J. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br. J. Cancer*, 2008, 98, 857-862.
- [145] Leggas, M.; Panetta, J.C.; Zhuang, Y.; Schuetz, J.D.; Johnston, B.; Bai, F.; Sorrentino, B.; Zhou, S.; Houghton, P.J.; Stewart, C.F. Gefitinib modulates the function of multiple ATP-binding cassette transporters in vivo. *Cancer Res.*, **2006**, 66, 4802-4807.
- [146] McKillop, D.; Partridge, E.A.; Hutchison, M.; Rhead, S.A.; Parry, A.C.; Bardsley, J.; Woodman, H.M.; Swaisland, H.C. Pharmacokinetics of gefitinib, an epidermal

- growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in rat and dog. *Xenobiotica*, **2004**, *34*, 901-915.
- [147] Kawamura, K.; Yamasaki, T.; Yui, J.; Hatori, A.; Konno, F.; Kumata, K.; Irie, T.; Fukumura, T.; Suzuki, K.; Kanno, I.; Zhang, M.R. In vivo evaluation of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein modulation in the brain using [^{11}C]gefitinib. *Nucl. Med. Biol.*, 2009, *36*, 239-246.
- [148] Sai, K.; Saito, Y.; Maekawa, K.; Kim, S.R.; Kaniwa, N.; Nishimaki-Mogami, T.; Sawada, J.; Shirao, K.; Hamaguchi, T.; Yamamoto, N.; Kunitoh, H.; Ohe, Y.; Yamada, Y.; Tamura, T.; Yoshida, T.; Matsumura, Y.; Ohtsu, A.; Saijo, N.; Minami, H. Additive effects of drug transporter genetic polymorphisms on irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2011**, *66*, 95-105.
- [149] Pérez-Victoria, J.M.; Cortés-Selva, F.; Parodi-Talice, A.; Pérez-Victoria, F.J.; Muñoz-Martínez, F.; Maitrejean, M.; Costi, M.P.; Jiménez, I.A.; Barron, D.; Di Pietro, A.; Castanys, S.; and Gamarro, F.A. Combination of inhibitor subdoses targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes Leishmania resistance to miltefosine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, *50*, 3102-3110.
- [150] Aller, S.G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P.M.; Trinh, Y.T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I.L.; Chang, G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, **2009**, *323*(5922), 1718-1722.
- [151] Dawson, R.J.; Locher, K.P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, **2006**, *443*(7108), 180-185.
- [152] Kerr, I.D.; Jones, P.M.; George, A.M. Multidrug efflux pumps: the structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *FEBS J.*, **2010**, *277*(3), 550-563.
- [153] Wang, H.; Lee, E.W.; Cai, X.; Ni, Z.; Zhou, L.; Mao, Q. Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry*, **2008**, *47*(52), 13778-13787.

Figure and Scheme captions

Figure 1. Initial naturally-occurring flavonoids evaluated as ABCG2 inhibitors

Figure 2. Structures of flavonoids tested in combination for inhibiting ABCG2

Figure 3. Structures of chalcone and boeravenone analogs reported as selective ABCG2 inhibitors.

Figure 4. Strategy of design of chromanones and the structure of the most active inhibitor

Figure 5. Compared structures of various acridones.

Figure 6. ABCG2-specificity of acridones 4a-c by difference to GF120918. Compared inhibitions at 1 μ M and 10 μ M of mitoxantrone efflux from either ABCG2- or ABCB1-transfected HEK293 cells, leading to accumulation monitored by flow cytometry. For ABCG2, the inhibition was referred to GF120918 taken as 100%. For ABCB1, 100% inhibition was referred to accumulation in control HEK293 cells transfected by the pcDNA3.1 alone.

Figure 7. Competitive antagonism by GF120918 (triangles) against acridone 4c/MBLI-97 binding (circles) to purified ABCG2. A, direct binding curves; B, double-reciprocal plots. Human ABCG2 was overexpressed and purified from High-Five insect cell membranes infected by baculovirus. The binding of acridone 4c was monitored by quenching of intrinsic fluorescence [59].

Figure 8. Molecular alignment between tariquidar (orange) and derivatives (green and blue) and elacridar (grey) in A, and acridones 4a-c (grey) in B. A total of 13 Tariquidar analogs were modelled using Sybyl X molecular modelling packages installed on a Linux workstation. All molecules were subjected to minimization with Powell's conjugate gradient method and MMFF94 force field [101]. The minimum energy difference of 0.001 kcal/mol was set as a convergence criterion, and partial atomic charges calculated using the MMFF94 method. The dielectric constant was set to 80, to simulate the water solvent and the electrostatic cut-off to 16 Å. For each structure, the model was examined to check all dihedrals angles, and set to a minimum energy conformation. After validation, all models

were added to a model database; they appeared very diverse, without any common moiety allowing an automatic alignment of compounds. They were aligned manually, using phenyl and polycyclic moiety as an anchor. Final conformation of each model was improved by modifying dihedral angle to fit on a common conformation. All molecules were minimized again to verify that the conformational energy does not raise more than 20 kcal/mol, and conformation corresponds to a minimal energy. The final superposition is shown.

Figure 9. ABCG2 expression in xenografts. When the tumor volume approximately reached 1800 mm³, mice were sacrificed (approximately 26 days after cell implantation for water conditions and 58 days after cell implantation for irinotecan-gefitinib, respectively). Crude membrane fractions were prepared from individual xenografts. ABCG2 expression was quantified with anti-ABCG2 BXP21 antibody. Effects of treatment with irinotecan and/or gefitinib. ABCG2 expression was quantified and normalized to the alpha-tubulin content, with protein levels expressed as arbitrary units (AU). The values are means +/- S.E.

Figure 10. Activity of gefitinib and irinotecan, either alone or in combination, against ABCG2 (A) and pcDNA3.1 (B) xenografts. SCID mice (Charles River Laboratories) were handled in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and all procedures followed protocols approved by the Animal Facility veterinarian board. Eight week-old female mice were subcutaneously inoculated with either pcDNA3.1- or ABCG2-HEK293 cells (8.2×10^6 in 100 μ L PBS/inoculation). Since pcDNA3.1- and ABCG2-xenografts differently responded to irinotecan therapy, each mouse was implanted on the left and right flanks with the same cells. Volume was determined in mm³ by measuring tumor length (l) and width (w), and using the formula: $\text{volume} = (4 \times 3.14 \times ((l+w)/2)^3)/3$. Time zero was the day of cell inoculation. Irinotecan was administrated I.P. at 30 mg/kg (0.1 ml water), 3 days/week on 2 consecutive weeks followed by a 15-day rest period. gefitinib (provided by AstraZeneca, UK) was administered at 15 mg/ml in water by gavage for a total 75-mg/kg dose following the same irinotecan schedule. Each dot represents the size of a single tumor at indicated time. The data at each time period were averaged. A plot was made of tumor volume +/- SE against time. Differences with P-values < 0.05 were considered as statistically significant between two sets of xenograft volume (N=6).

Scheme 1: Synthesis of 6-prenylchrysine and 8-prenylchrysine from chrysine. (a). prenylbromide, K₂CO₃, DMF; (b). 150 °C.

Scheme 2. Synthesis of acridones (azaxanthonenes). (**a**). Cu, K₂CO₃, (**b**) H₃PO₄, (**c**) AlCl₃ for demethylation of OMe at C-1), BBr₃ (for demethylation of OMe at other positions).

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.ejconline.com

The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan

O. Arnaud^d, A. Boumendjel^c, A. Gèze^c, M. Honorat^{a,b}, E.L. Matera^b, J. Guitton^{a,f}, W.D. Stein^e, S.E. Bates^e, P. Falson^d, C. Dumontet^{a,b}, A. Di Pietro^d, L. Payen^{a,b,g,*}

^a ISPB, Université Lyon 1, 69008 Lyon, France

^b Inserm U590, Centre Léon Bérard, FNCLCC, 69008, France

^c Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR 5063, CNRS/Université de Grenoble, 38041 Grenoble Cedex 9, France

^d Equipe labellisée Ligue 2009, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, 69367 Lyon Cedex 07, France

^e Medical Oncology Branch, Center for Cancer Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

^f Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Laboratoire de Ciblage Thérapeutique en Cancérologie, 69495 Pierre-Bénite, France

^g Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Laboratoire de biochimie, 69495 Pierre-Bénite, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2010

Received in revised form 15

November 2010

Accepted 23 November 2010

Available online 7 January 2011

Keywords:

ABC transporter

ABCG2

Irinotecan

Multidrug resistance

Reversion

ABSTRACT

The breast cancer resistance protein ABCG2 confers cellular resistance to irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38. We utilised ABCG2-expressing xenografts as a model to evaluate the ability of a non-toxic ABCG2 inhibitor to increase intracellular drug accumulation. We assessed the activity of irinotecan *in vivo* in SCID mice: irinotecan completely inhibited the development of control pcDNA3.1 xenografts, whilst only delaying the growth of ABCG2-expressing xenografts. Addition of MBLI-87, an acridone derivative inhibitor, significantly increased the irinotecan effect against the growth of ABCG2-expressing xenografts. *In vitro*, MBLI-87 was as potent as GF120918 against ABCG2-mediated irinotecan efflux, and additionally was specific for ABCG2. A significant sensitisation to irinotecan was achieved despite the fact that doses remained well below the maximum tolerated dose (due to the rather limited solubility of MBLI-87). This suggested that MBLI-87 is an excellent candidate to prevent drug efflux by ABCG2, without altering plasma concentrations of irinotecan and SN-38 after IP (intra-peritoneal) injections. This could constitute a useful strategy to improve drug pharmacology, to facilitate drug penetration into normal tissue compartments protected by ABCG2, and potentially to reverse drug resistance in cancer cells.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Multidrug efflux pumps from the ATP-binding cassette (ABC) family are thought to play important roles in drug absorption and distribution, normal tissue protection and, perhaps, anti-cancer drug-resistance. Although efforts to reverse drug resistance using ABCB1/P-glycoprotein (Pgp) inhibitors essentially failed in the past, it is not known whether this was because

the target was not as prevalent as was previously thought or was due to inadequate inhibition or the concurrent expression of other transporters able to compensate for the inhibition of Pgp. The question of whether inhibitors of other ABC transporters could be exploited clinically has rarely been addressed. Since a number of the targeted anticancer agents have been found to be substrates or modulators of multidrug efflux pumps, it has become important to define their possible

* Corresponding author. Address: Inserm U590, 8, Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France. Tel.: +33478777236; fax: +33478777088.

E-mail address: Lea.payen@recherche.univ-lyon1.fr (L. Payen).

0959-8049/\$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ejca.2010.11.019

role in multidrug resistance. Furthermore, inhibition of the multidrug efflux pumps has potential utility beyond reversal of resistance, for instance, in improving the delivery of substrate drugs to the central nervous system (CNS).^{1–3} For example, it was recently reported that CNS penetration of lapatinib in animal models is limited by both Pgp and ABCG2.⁴ Our strategy is to use reversal of drug resistance in xenografts as a proof of the concept that improved drug delivery and accumulation, through inhibition of efflux pumps, can indeed be achieved *in vivo*. HEK293 human embryonic kidney cells were previously shown to be able to grow as xenografts in SCID mice.⁴ This offered the possibility of a defined model system of transfected cells in which ABCG2 would be the only difference from control xenografts, and that levels would not be too high, in contrast to other model systems in which drug selection had been utilised to achieve ABCG2 up-regulation. This would lay the groundwork for re-testing the hypothesis that ABC transporters contribute to drug resistance and that their inhibition could prove useful in patients for targeting ABC transporters that prevent drug accumulation in the CNS or for improving and normalising oral drug bioavailability.

ABCG2, also termed breast cancer resistance protein or BCRP, is an important ABC half-transporter. It effluxes a wide range of substrates, including natural compounds such as porphyrins and anticancer drugs such as mitoxantrone, irinotecan (CPT-11)⁵ and SN-38, its pharmacologically-active metabolite, thus overlapping the substrate spectra of ABCB1 and ABCC1.⁶ A few potent inhibitors have been described, including GF120918, tariquidar, Ko143 – a derivative of fumitremorgin C (a highly toxic tremorgenic mycotoxin isolated from *Aspergillus fumigatus*), imatinib and gefitinib (GEFI, ZD1839, Iressa).⁷ The latter compound is an efficient tyrosine-kinase inhibitor targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) and used in lung cancer clinical trials.^{8,9} Controversial data have been reported about its transport by ABCG2.^{9,10} This is apparently due to the fact that gefitinib is a substrate at low concentrations whereas inhibitory properties are observed *in vivo* at higher concentrations.^{11,12} Nevertheless, high and maximum tolerated doses of gefitinib (over 75 mg/kg) have demonstrated ability to reverse the SN-38-dependent resistant phenotype.^{10,12,13} The requirement for such high gefitinib doses would obviously constitute serious limitations for ABCG2 modulation in a clinical setting. New ABCG2 inhibitors have been recently designed and optimised amongst flavonoids, based on flavone¹⁴ and acridone¹⁵ derivatives. One acridone, MBLI-87, also called acridone 4b, was found to be as potent *in vitro* as GF120918 against ABCG2-mediated mitoxantrone efflux,¹⁵ with the advantage of not inhibiting ABCB1 and ABCC1.¹⁶ To further characterise MBLI-87 effects against ABCG2 transport activity, we evaluated its *in vitro* inhibition of irinotecan efflux and its *in vivo* modulatory effect on ABCG2-related drug resistance in xenografts.

2. Material and methods

2.1. Cell cultures

The two HEK293 cell models used, transfected with either wild-type ABCG2 or empty pcDNA3.1 vector,¹⁷ were cultured as described.¹⁴

2.2. Animal studies

SCID mice (Charles River Laboratories) were handled in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and all procedures followed protocols approved by the Animal Facility veterinarian board. Eight week-old female mice were subcutaneously inoculated with either pcDNA3.1- or ABCG2-HEK293 cells (8.2×10^6 in 100 μ L DMEM medium and matrigel solution (50% v/v)/inoculation). Since pcDNA3.1- and ABCG2-xenografts responded differently to irinotecan therapy, each mouse was implanted on the left and right flanks with the same tumour cell type. All mice implanted with ABCG2-xenografts were randomised within eight groups. Similar procedures were carried out for control (pcDNA3.1) xenografted mice. After randomisation, each mouse was independently identified by a colour code. Tumour volume was determined, in mm³, by measuring tumour length (l) and width (w), and using the formula: volume = $(4 \times 3.14(l + w)/2)^3/3$. Time zero was the day of cell inoculation. Xenograft tumours were harvested when their volume reached approximately 1800 mm³.

2.3. Drug formulation and administration

MBLI-87, which was not soluble in either water or saline vehicles, was formulated in enzymatically modified cyclodextrin-based colloidal suspension by the solvent displacement method.¹⁹ An organic phase containing acetone (30 mL), (γ CD-C10 at 2 mg/mL),^{18,19} benzyl benzoate (600 μ L), a lipophilic surfactant Montane[®] 80 (8 mg/mL) and the drug (9 mg) was added into 60 mL of glucose (3.6% w/w) supplemented with the hydrophilic surfactant Montanox[®] 80 (4 mg/mL) under magnetic stirring (500 rpm) at 25 °C. The obtained organo-aqueous suspension was submitted to reduced pressure in order to eliminate acetone and the aqueous suspension volume was adjusted to reach isotonicity. The suspensions were filtered through 0.45 μ m and stored in sterile glass vials (10 mL) for further *in vivo* studies. The nanoparticle size, measured by quasi-elastic light scattering, was around 185–195 nm (PI 0.05).²⁰ The MBLI-87 concentration recovered in the suspension (0.16 mg/mL) was assayed spectrophotometrically at 393 nm in ethanol after dissolution of a known volume of suspension in the organic solvent. The drug fraction solubilised in the aqueous phase of the suspension was evaluated after separation of the nanoparticles from supernatant by ultracentrifugation (300,000g, 1.5 h, 20 °C) and was in agreement with the poor MBLI-87 aqueous solubility (0.007 mg/mL at 25 °C). In the final suspension, 95% of the drug amount recovered was associated with the nanoparticles. The stability studies indicated that the characteristics of MBLI-87-loaded nanoparticle suspensions remained unchanged in terms of mean size particles and drug concentration during at least 2 months. Thus, the same batch of colloidal suspension could be used repeatedly.

The suspension of MBLI-87-loaded nanoparticles (later called MBLI-87), at 0.16 mg/mL, was administered by intraperitoneal (IP) injection as a 2.4 mg/kg dose, 5 days/week on two consecutive weeks followed by a 14-day rest period. Unloaded colloidal suspension (without MBLI-87) was called NANO (MBLI-87 vehicle). Irinotecan, kindly provided by

Dr. Hamed-Sangsari (MAP-France company), was administered by IP injection at 30 mg/kg (0.1 mL water), 3 days/week on two consecutive weeks followed by a 14-day rest period. Tumour-bearing SCID mice were randomised into eight groups the day after cell implantation, before receiving drugs. The two-week period of drug administration plus its 14-day rest constituted one therapy cycle; mice thus received 2 cycles over 8 weeks.

2.4. Western blot analysis

Xenografts were resuspended in a hypotonic buffer (5 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM KCl, protease inhibitor cocktail) in an ice-cold Dounce homogeniser for 1 h before homogenisation 30 times on ice. After centrifugation (15 min, 1000g), supernatants were collected, and protein content quantified using the bicinchoninic acid assay (provided by Sigma-Aldrich, Inc.). 10 µg of proteins were separated by 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. PVDF membranes were probed with the anti-ABCG2 monoclonal antibody BXP-21 (1/200, Tebu-bio), and a polyclonal alpha-tubulin antibody (1/500, Sigma). ABCG2 was detected using the Enhanced Chemiluminescence Plus detection kit (Amersham Pharmacia Biotech), and densitometry performed using QuantityOne® software.

2.5. In vitro and in vivo quantification of irinotecan and SN-38

For *in vitro* experiments, cells were first plated at 750,000 cells/well in 6-well plates. They were loaded with 2 µM irinotecan in DMEM medium (without FBS) for 60 min at 37 °C in the absence or presence of either 5 µM GF120418, 5 µM MBLI-87 or 10 µM fumitremorgin C. During the uptake period, irinotecan could be metabolised into SN-38. After two washings with ice-cold PBS (to inhibit active efflux capabilities), cells were collected in 1 mL of ice-cold PBS, submitted to centrifugation (5 min at 1500g) and lysed by 500 µL pure methanol. Finally, intracellular irinotecan accumulation was quantified in a cell aliquot by HPLC MS/MS, according the analytical description below. Specific transitions for SN-38, APC and SN-38G were also monitored in order to assess potential metabolism of irinotecan in the cells. We were unable to detect APC and SN-38G under our experimental conditions. Results (expressed in ng irinotecan/mg protein) were normalised to cellular protein content (Bradford assay).

For *in vivo* experiments, irinotecan disposition was evaluated in tumour-free SCID mice after a single MBLI-87 (3.45 mg/kg) and/or irinotecan (20 mg/kg) IP administration (injection route used in *in vivo* protocol). Approximately 1 mL of blood was collected with heparinised syringes (5 animals per time point) at 0.5, 1, 3, 6, or 24 h after injection. Plasma fractions were extracted from each blood sample by centrifugation (5 min, 5000g).

For analytical quantification, irinotecan and SN-38 were kindly furnished by Pfizer (Kalamazoo, USA) and camptothecin was obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). For plasma samples, the preparation was carried out according to the following procedure: 50 µL of plasma, 20 µL of internal standard (camptothecin at 1 µg/mL) and

300 µL of formic acid (2% v/v) were mixed vigorously for 10 s. The mixture was applied to previously conditioned SPE extraction cartridges (Oasis® HLB 30 mg – Waters, Milford, USA). The cartridge was washed with 1 mL of a mixture of methanol and 2% formic acid (20/80, v/v) and the elution was then carried out with 1 mL of methanol. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen, and the residue was resuspended in 100 µL of mobile phase. For cell samples, following the incubation period with irinotecan, the cells were washed three times with ice-cold PBS and then 300 µL of methanol were added and samples were stored at –20 °C in this condition. The sample preparation was performed by adding 20 µL of camptothecin (internal standard) at 1 µg/mL, and then samples were mixed and centrifuged at 12,000g for 5 min at 10 °C. The supernatant was removed and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residues were resuspended in 300 µL of mobile phase.

For plasma and cell incubation samples, the solution was then transferred to a glass vial kept at 10 °C in the autosampler and 10 µL was injected in the HPLC device. Irinotecan and SN-38 were separated on a Hypersil Gold 100 mm × 2.1 mm column (ThermoFisher, San Jose, USA). The separation was performed using a gradient mode with a mobile phase constituted by water and acetonitrile, both solutions containing acetic acid at 0.1%. The mobile phase was delivered through the column (temperature maintained at +30 °C) at a flow rate of 200 µL/min. The detection was carried out with a Quantum-Ultra (ThermoFisher, San Jose, USA) triple quadrupole mass spectrometer. The instrument was operated in positive ion mode with electrospray (ESI) source. The quantification was performed using the transitions m/z 587 → 124 (irinotecan), m/z 393 → 349 (SN-38) and m/z 349 → m/z 305 (camptothecin).

Calibration curves were constructed by plotting the ion abundance peak area ratio irinotecan/camptothecin and SN-38/camptothecin as function of irinotecan or SN-38 plasma concentration. Calibration curves were tested from 5 to 1000 ng/mL and from 0.5 to 100 ng/mL for irinotecan and SN-38, respectively. For both compounds, a weighting factor (1/concentration) was applied and a mean least-squares linear regression correlation coefficient of greater than 0.995 was obtained. The concentrations back-calculated from the equation of the regression analysis were lower than 8.5% for precision and than 5% for accuracy for both compounds. The within-run and between-run variability (precision) and the mean predicted concentration (accuracy) were analysed at three different concentrations (0.5, 5 and 55 ng/mL for SN-38 and 7, 70 and 750 ng/mL for irinotecan) in sextuplicate on four separate days and were lower than 10% except for SN-38 at 0.5 ng/mL, with a between-run variability equal to 12.8%. All parameters fulfilled the respective requirements of the Washington consensus conference on analytical methods validation.

2.6. Statistical analysis

Irinotecan accumulation histograms (Fig. 1) were constructed with Excel, and expressed as mean ± SD. The statistical analyses (unilateral t-test) were performed with Excel. Growth curves were constructed with Excel as a plot of tumour

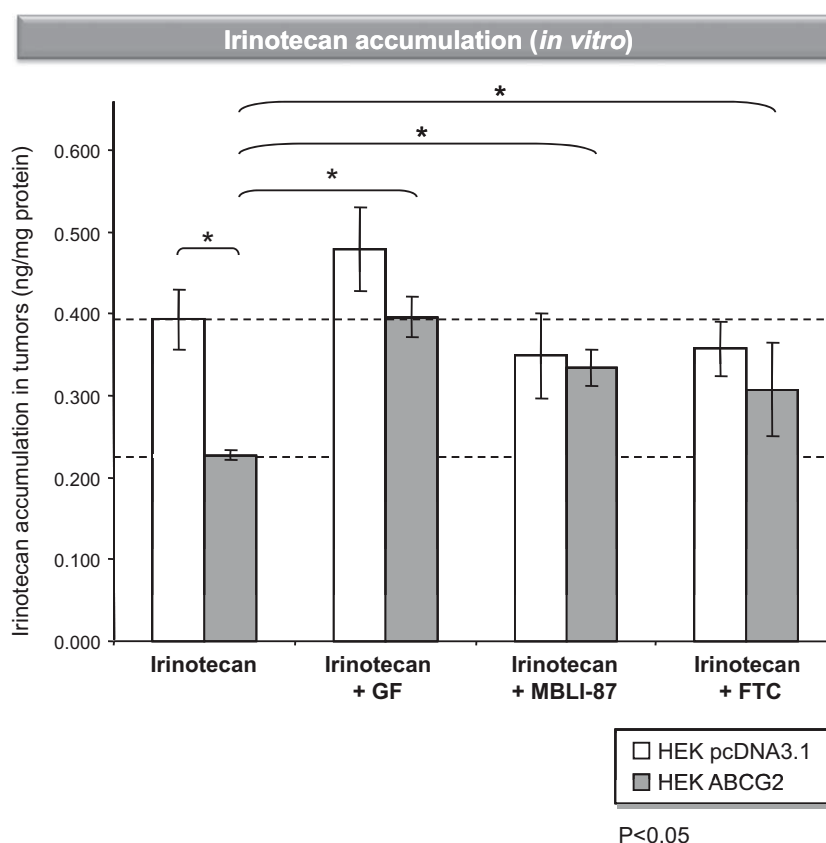


Fig. 1 – *In vitro* irinotecan accumulation in control and ABCG2-expressing cells. Cells were loaded with 2 μ M irinotecan in DMEM medium (without FBS) for 60 min at 37 °C in the absence or presence of either 5 μ M GF120418, 5 μ M MBLI-87 or 10 μ M fumitremorgin C. Intracellular irinotecan accumulation was quantified by HPLC MS/MS. Results were expressed as ng irinotecan/mg protein.

volume $\pm$ SE against time. In Fig. 3A and B, statistical evaluation was carried out with the non-parametric Mann Whitney test. In Fig. 3C and Table 1, growth curves were constructed with SigmaPlot® (Systat Software, San Jose, CA), by analysing data as a plot of tumour volume $\pm$ SE against time, and the statistical analyses (paired t-test) were performed with Sigastat® (Systat Software).

3. Results and discussion

To compare the *in vitro* effects of MBLI-87 on irinotecan accumulation in both control pcDNA3.1-HEK293 cells and ABCG2-expressing HEK293 cells, the two cell lines were incubated for 60 min with 2 μ M irinotecan in the absence or presence of either 5 μ M MBLI-87, 5 μ M GF120918 or 10 μ M fumitremorgin C (Fig. 1). Then, cellular accumulation of irinotecan was quantified by HPLC MS/MS. This demonstrated that irinotecan was approximately 1.7-fold less accumulated in ABCG2-expressing HEK293 cells than in control cells. In ABCG2-HEK293 cells, irinotecan accumulation was increased by co-exposure to any ABCG2 modulator (10 μ M fumitremorgin C, 5 μ M GF120918 or 5 μ M MBLI-87), whilst these modulators had no effect in the control cells (Fig. 1). This demonstrated that MBLI-87 is indeed a potent inhibitor of ABCG2, increasing irinotecan cellular accumulation.

We have used pcDNA3.1 and ABCG2 stable transfectants in HEK293 cells as a cellular tool¹⁷ to characterise both *in vitro* and *in vivo* effects of ABCG2 modulators. In contrast to drug-selected ABCG2 cancer cells, these models allow access to a true negative control (here the empty pcDNA3.1 transfected cell line) in order to validate the specificity, and to exactly evaluate the net effect of our inhibitor on the ABCG2 target. We first confirmed the previously reported tumourigenicity of HEK293 cells²¹ and then determined the optimal concentration range of MBLI-87 and irinotecan, non-toxic doses in combination and the schedule of their administration to SCID mice over the 8-week protocol. We characterised the maximum tolerated doses of irinotecan (30 mg/kg for 3 days/week) in combination with either control NANO (300 μ L for 5 days/week) or MBLI-87 (2.4 mg/kg in 300 μ L NANO for 5 days/week). Higher doses of irinotecan were not used as they resulted in loss of weight and modifications in behaviour, both defined as reference elements by the Animal Facility veterinarian board to *in vivo* quantify the toxicity of the molecules. No difference in toxicity was observed according to the treatments.

MBLI-87 could not be solubilised in oil, saline or water vehicles. The chronic administration schedule of 50 μ L pure DMSO was not recommended by the ethics committee of our institution, as described in the Section 2. We used a

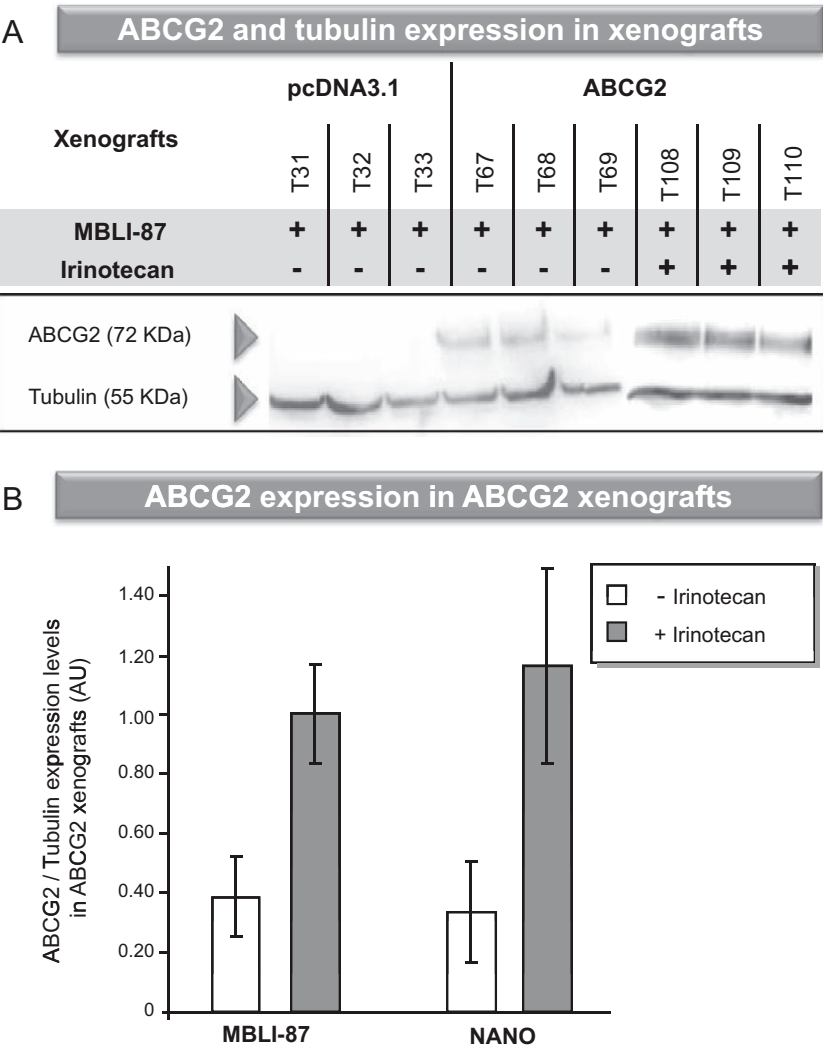


Fig. 2 – (A) ABCG2 expression in xenografts. As soon as the tumour volume reached approximately 1800 mm³, mice were sacrificed, and crude membrane fractions were prepared from (T31–T110) individual xenografts. ABCG2 expression was quantified by immunoblotting with the monoclonal BXP21 antibody, as described in Section 2. **(B) Effects of treatment with irinotecan and/or MBLI-87 on ABCG2 expression levels.** ABCG2 expression was quantified as in A, and normalised to the alpha-tubulin content (ABCG2 expression levels/tubulin expression levels). Protein level ratios were expressed as arbitrary units (AU). The values are means ± S.E.

specific and complex formulation in nanoparticles (NANO) to allow its administration to mice. Consequently, for evaluating the net MBLI-87 effect on the growth of ABCG2-expressing xenografts, we carried out control conditions with the nanoparticles alone (NANO). When the tumour volume reached approximately 1800 mm³, mice were sacrificed and xenografts harvested. ABCG2 expression levels were quantified by Western blot analysis and, as expected, the ABCG2 protein was only detected in ABCG2 xenografts (Fig. 2A). Since control (pcDNA3.1) tumours did not grow during the first 60 days, we did not check any irinotecan effect on ABCG2 expression. We did not find any statistical effect of NANO vehicle on the growth curves of either pcDNA3.1 HEK 293 cells or ABCG2 HEK 293 cells (data not shown). NANO did not significantly alter the effect of irinotecan on the growth of ABCG2 xenografts (data not shown). Interestingly, irinotecan treatment,

whether combined with MBLI-87 or under control conditions (NANO), resulted in higher ABCG2 expression in xenografts (Fig. 2A and B), whereas MBLI-87 alone had no effect (Fig. 2B). This strongly suggested that the anticancer agent irinotecan selected ABCG2-expressing cells having high efflux capability, which then could limit irinotecan chemotherapeutic activity or disposition.

We next evaluated MBLI-87 circumvention of *in vivo* drug resistance by submitting mice to two chemotherapy cycles, administering irinotecan (30 mg/kg for 3 days/week) in combination with either control NANO (300 µL for 5 days/week) or MBLI-87 (2.4 mg/kg in 300 µL NANO for 5 days/week), the day after cell implantation. The first drug therapy period (from day 1 to 15) avoided physical variability of irinotecan distribution in xenografts (since tumours were small and not completely established in 3-D tissue). This first chemo-

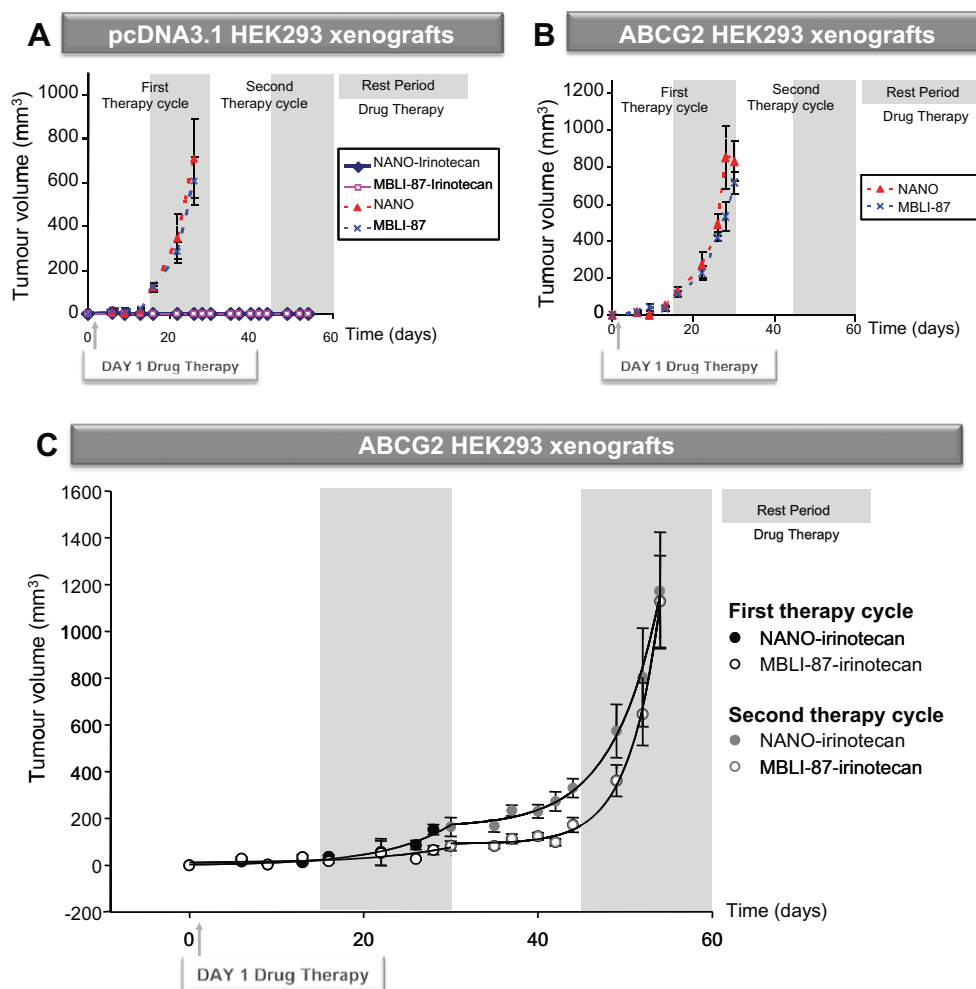


Fig. 3 – Activity of MBLI-87, NANO and irinotecan, either alone or in combination, against control (A) and ABCG2-expressing (B and C) xenografts. Doses and schedules are detailed in Section 2. (A and B) The data at each time period were averaged. The tumour volume values were plotted against time. Differences with p values <0.05 were considered as statistically significant between two sets of xenograft volume ($N = 6/\text{group}$). (C) Mice were treated with either NANO or MBLI-87 in combination with irinotecan. The data were sets of tumour measurements (in sixes) at four time periods: first therapy period, first rest period, second therapy period and second rest period, for two parallel therapy conditions: MBLI-87-irinotecan ($N = 5$) and NANO-irinotecan ($N = 6$). The data at each time period were averaged and standard errors (SE) computed. A plot was made of tumour volume $\pm$ SE against time.

therapy period likely potentiated drug effects on the implanted cells, through a direct action on the cells. In contrast, the second drug therapy period (from day 30 to 44) was performed when xenograft volumes were in the mean range of 100 mm^3 , an established tumour size. Although some concentration variability was observed, both SN-38 and irinotecan were detected in xenografts, by LC-MS/MS, 24 h after irinotecan administration. Control xenografts, treated with NANO, grew and reached a maximal volume at day 28, whereas they did not grow at all during the 8-week period following irinotecan therapy (Fig. 3A). NANO-irinotecan and MBLI-87-irinotecan therapies completely prevented the growth of control xenografts during the first 8 weeks (Fig. 3A). MBLI-87 alone did not significantly modify the growth of either pcDNA3.1- or ABCG2-xenografts when compared to control NANO (Fig. 3A and B). Compared to its effect on the pcDNA3.1 con-

trol xenografts, treatment with irinotecan alone delayed the growth of ABCG2-expressing xenografts by approximately 10 days (Fig. 3C versus B).

We observed an inhibition by MBLI-87 of ABCG2-dependent resistance to irinotecan during the second chemotherapy cycle, examining the day 30–54 period (Fig. 3C). ABCG2 tumour growth was delayed by co-administration of MBLI-87 and irinotecan, in comparison to NANO and irinotecan during the first rest period and the second therapy period. The data points of the overall MBLI-87 series were significantly below those of the NANO series (Paired t -test, $p < 0.001$). This was especially true over the time period of 35–54 days.

To further evaluate the difference between the two treatments, a kinetic analysis was performed. The points depicted in Fig. 3C were better fitted (F test, at $p < 0.01$) for both test and

Table 1 – Parameters of MBLI-87-irinotecan and NANO-irinotecan exponential growth equations^a.

	Coefficient	Std. error		P-value
NANO-irinotecan (0–30 days)				
$R^2 = 0.9702$	$f = -0.6424 + 3.2693 * \exp(0.1322 * x)$			
y_0	–0.6424	10.2939	ns	0.9523
a	3.2693	2.9354	ns	0.308
b	0.1322	0.0294	*	0.0041
MBLI-87-irinotecan (0–30 days)				
$R^2 = 0.7293$	$f = 9.7198 + 2.0402 * \exp(0.1162 * x)$			
y_0	9.7198	16.1066	ns	0.5683
a	2.0402	6.0361	ns	0.7469
b	0.1162	0.0954	ns	0.2691
NANO-irinotecan (30–54 days)				
$R^2 = 0.9954$	$f = 163.1692 + 0.0437 * \exp(0.1857 * x)$			
y_0	163.1692	19.6266	**	0.0002
a	0.0437	0.0361	ns	0.2709
b	0.1857	0.0152	***	<0.0001
MBLI-87-irinotecan (30–54 days)				
$R^2 = 0.9969$	$f = 91.6966 + 0.0002 * \exp(0.2836 * x)$			
y_0	91.6966	11.4804	**	0.0002
a	0.0002	0.0002	ns	0.3233
b	0.2836	0.0173	***	<0.0001

* $p < 0.01$.** $p < 0.001$.*** $p < 0.0001$.

^a The points of the Fig. 3C were better fitted (F test, at $p < 0.01$) for both test and control series, as two separate (rather than a single one) time courses following the augmented (three parameter) exponential growth equation: $y = y_0 + a * \exp(b * t)$, where $y_0 + 1$ is the computed size at $t = 0$, a is 1.71828 times the increment in size at time equal to $1/b$, whilst b is the growth rate constant. The p values reflect the goodness of fit of the growth rate equation to the data, and not the comparison between the two treatments. The two treatments were not statistically different when compared for the period from 0 to 30 days ($p = 0.115$), but they were indeed statistically different when compared for the period from 30 to 54 days ($p < 0.001$).

control series, as two separate (rather than a single one) time courses following the augmented (three-parameter) exponential growth equation: $y = y_0 + a * \exp(b * t)$, where $y_0 + 1$ is the computed size at $t = 0$, a is 1.71828 times the increment in size at times equal to $1/b$, whilst b is the growth rate constant (Table 1). Although there was no statistically-supported difference ($p = 0.115$) for the whole 0–30 day period, a statistically significant difference was indeed observed over the first rest period (day 16–30), $p = 0.039$.

The growth rate during the second drug therapy period (day 30–44) appeared to be slower for MBLI-87-irinotecan than for NANO-irinotecan although this did not reach statistical significance ($p = 0.883$). Surprisingly, following discontinuation of therapy, growth of the tumours accelerated, and more so for the MBLI-87-irinotecan group. Growth started from a lower point and yet reached the same end size. For the statistical analysis of the entire growth period (comprising the second drug therapy and rest combined (day 30–54)), there were enough data points to give a satisfactory p value ($p < 0.001$) for the difference in the growth rate constants: b (NANO-irinotecan) – b (MBLI-87-irinotecan) = $0.1857 - 0.2836 =$

-0.0979 ; $t = -4.251$ with 16 degrees of freedom ($P < 0.001$), and 95 percent confidence interval for difference of means: -0.147 to -0.0491 (the power of performed test with $\alpha = 0.050$:0.981). Thus, the growth rate constant (b) in the MBLI-87-irinotecan case was 50% higher than that in NANO-irinotecan and this was supported at $p < 0.001$ (Table 1). A possible explanation is that the growth rate of the xenograft accelerates when treatment with MBLI-87-irinotecan is discontinued. A similar phenomenon was observed for tumour growth in humans upon cessation of treatment with bevacizumab (Avastin),²² also suggesting a tumour growth acceleration after drug removal and hence an apparently similar phenomenon in our animal model. Regardless of whether the tumour accelerates or simply returns to a pre-treatment growth rate, this model may have relevance for the clinical situation, showing that we cannot expect a “permanent” benefit after discontinuation of therapy.

MBLI-87 was selected as a specific, non-toxic inhibitor of ABCG2, not interacting with ABCB1. MBLI-87 could not be experimentally assayed at a maximum tolerable dose, due to limited solubility. It was not toxic for mice, its usable dose being here limited by the maximal volume that could be injected (300 μ L). Furthermore, since ABCG2 is physiologically expressed in various tissues (liver, BHE and intestine), we evaluated the influence of MBLI-87 on SN-38 and irinotecan in plasma in pharmacokinetic experiments. Irinotecan disposition was evaluated in tumour-free mice after a single IP injection of irinotecan (20 mg/kg) with either MBLI-87 (3.45 mg/kg) or the NANO vehicle control. Under our conditions, irinotecan concentrations followed a two-phase decay (Fig. 4A); they were high at 30 min, decreased strongly after 3 h exposure and remained detectable after 24 h. We also quantified SN-38, the active metabolite of irinotecan, in plasma. Interestingly, with a slight delay likely due to metabolism kinetics, the high concentration of SN-38 was reached at the 3 h timepoint and decreased strongly but remained still detectable 24 h after injection (Fig. 4B). The median values per timepoint and the AUCs (AUC (NANO-irinotecan) = $20117.76 \text{ ng/mL/h} \pm 13356.18$ (SD); AUC (MBLI-87-irinotecan) = $18160.34 \text{ ng/mL/h} \pm 2855.506$ (SD); AUC (SN-38-NANO) = $3712.245 \text{ ng/mL/h} \pm 767.17$ (SD); AUC (SN-38-MBLI-87) = $3242.69 \text{ ng/mL/h} \pm 856.8481$ (SD)) were similar for the different conditions. Consequently, MBLI-87 had no effect on SN-38 and irinotecan concentrations and, presumably, on their related toxicity. Such a lack of interference of MBLI-87 towards irinotecan and SN-38 disposition encourages further studies.

The results presented above show evident sensitisation to therapy by MBLI-87 at earlier timepoints, which at later timepoints is negated by the acceleration of tumour growth that occurs following discontinuation of therapy. We consider that these studies serve as proof of concept and suggest that optimisation of both the injectable MBLI-87 preparation and its *in vivo* therapeutic protocol is a worthwhile endeavour, toward preclinical modelling of ABCG2 inhibition. If MBLI-87 is indeed confirmed as a potent non-toxic inhibitor towards other drugs and in other model systems, it will constitute a good candidate for further development aimed at improving bioavailability of substrate drugs, CNS penetration, accumulation of targeted agents in stem cells and possibly to overcome multidrug resistance in cancer.

Table 1 – Parameters of MBLI-87-irinotecan and NANO-irinotecan exponential growth equations^a.

	Coefficient	Std. error		P-value
NANO-irinotecan (0–30 days)				
$R^2 = 0.9702$	$f = -0.6424 + 3.2693 * \exp(0.1322 * x)$			
y_0	–0.6424	10.2939	ns	0.9523
a	3.2693	2.9354	ns	0.308
b	0.1322	0.0294	*	0.0041
MBLI-87-irinotecan (0–30 days)				
$R^2 = 0.7293$	$f = 9.7198 + 2.0402 * \exp(0.1162 * x)$			
y_0	9.7198	16.1066	ns	0.5683
a	2.0402	6.0361	ns	0.7469
b	0.1162	0.0954	ns	0.2691
NANO-irinotecan (30–54 days)				
$R^2 = 0.9954$	$f = 163.1692 + 0.0437 * \exp(0.1857 * x)$			
y_0	163.1692	19.6266	**	0.0002
a	0.0437	0.0361	ns	0.2709
b	0.1857	0.0152	***	<0.0001
MBLI-87-irinotecan (30–54 days)				
$R^2 = 0.9969$	$f = 91.6966 + 0.0002 * \exp(0.2836 * x)$			
y_0	91.6966	11.4804	**	0.0002
a	0.0002	0.0002	ns	0.3233
b	0.2836	0.0173	***	<0.0001

* $p < 0.01$.** $p < 0.001$.*** $p < 0.0001$.

^a The points of the Fig. 3C were better fitted (F test, at $p < 0.01$) for both test and control series, as two separate (rather than a single one) time courses following the augmented (three parameter) exponential growth equation: $y = y_0 + a * \exp(b * t)$, where $y_0 + 1$ is the computed size at $t = 0$, a is 1.71828 times the increment in size at time equal to $1/b$, whilst b is the growth rate constant. The p values reflect the goodness of fit of the growth rate equation to the data, and not the comparison between the two treatments. The two treatments were not statistically different when compared for the period from 0 to 30 days ($p = 0.115$), but they were indeed statistically different when compared for the period from 30 to 54 days ($p < 0.001$).

control series, as two separate (rather than a single one) time courses following the augmented (three-parameter) exponential growth equation: $y = y_0 + a * \exp(b * t)$, where $y_0 + 1$ is the computed size at $t = 0$, a is 1.71828 times the increment in size at times equal to $1/b$, whilst b is the growth rate constant (Table 1). Although there was no statistically-supported difference ($p = 0.115$) for the whole 0–30 day period, a statistically significant difference was indeed observed over the first rest period (day 16–30), $p = 0.039$.

The growth rate during the second drug therapy period (day 30–44) appeared to be slower for MBLI-87-irinotecan than for NANO-irinotecan although this did not reach statistical significance ($p = 0.883$). Surprisingly, following discontinuation of therapy, growth of the tumours accelerated, and more so for the MBLI-87-irinotecan group. Growth started from a lower point and yet reached the same end size. For the statistical analysis of the entire growth period (comprising the second drug therapy and rest combined (day 30–54)), there were enough data points to give a satisfactory p value ($p < 0.001$) for the difference in the growth rate constants: b (NANO-irinotecan) – b (MBLI-87-irinotecan) = $0.1857 - 0.2836 =$

-0.0979 ; $t = -4.251$ with 16 degrees of freedom ($P < 0.001$), and 95 percent confidence interval for difference of means: -0.147 to -0.0491 (the power of performed test with $\alpha = 0.050:0.981$). Thus, the growth rate constant (b) in the MBLI-87-irinotecan case was 50% higher than that in NANO-irinotecan and this was supported at $p < 0.001$ (Table 1). A possible explanation is that the growth rate of the xenograft accelerates when treatment with MBLI-87-irinotecan is discontinued. A similar phenomenon was observed for tumour growth in humans upon cessation of treatment with bevacizumab (Avastin),²² also suggesting a tumour growth acceleration after drug removal and hence an apparently similar phenomenon in our animal model. Regardless of whether the tumour accelerates or simply returns to a pre-treatment growth rate, this model may have relevance for the clinical situation, showing that we cannot expect a “permanent” benefit after discontinuation of therapy.

MBLI-87 was selected as a specific, non-toxic inhibitor of ABCG2, not interacting with ABCB1. MBLI-87 could not be experimentally assayed at a maximum tolerable dose, due to limited solubility. It was not toxic for mice, its usable dose being here limited by the maximal volume that could be injected (300 μ L). Furthermore, since ABCG2 is physiologically expressed in various tissues (liver, BHE and intestine), we evaluated the influence of MBLI-87 on SN-38 and irinotecan in plasma in pharmacokinetic experiments. Irinotecan disposition was evaluated in tumour-free mice after a single IP injection of irinotecan (20 mg/kg) with either MBLI-87 (3.45 mg/kg) or the NANO vehicle control. Under our conditions, irinotecan concentrations followed a two-phase decay (Fig. 4A); they were high at 30 min, decreased strongly after 3 h exposure and remained detectable after 24 h. We also quantified SN-38, the active metabolite of irinotecan, in plasma. Interestingly, with a slight delay likely due to metabolism kinetics, the high concentration of SN-38 was reached at the 3 h timepoint and decreased strongly but remained still detectable 24 h after injection (Fig. 4B). The median values per timepoint and the AUCs (AUC (NANO-irinotecan) = $20117.76 \text{ ng/mL/h} \pm 13356.18$ (SD); AUC (MBLI-87-irinotecan) = $18160.34 \text{ ng/mL/h} \pm 2855.506$ (SD); AUC (SN-38-NANO) = $3712.245 \text{ ng/mL/h} \pm 767.17$ (SD); AUC (SN-38-MBLI-87) = $3242.69 \text{ ng/mL/h} \pm 856.8481$ (SD)) were similar for the different conditions. Consequently, MBLI-87 had no effect on SN-38 and irinotecan concentrations and, presumably, on their related toxicity. Such a lack of interference of MBLI-87 towards irinotecan and SN-38 disposition encourages further studies.

The results presented above show evident sensitisation to therapy by MBLI-87 at earlier timepoints, which at later timepoints is negated by the acceleration of tumour growth that occurs following discontinuation of therapy. We consider that these studies serve as proof of concept and suggest that optimisation of both the injectable MBLI-87 preparation and its *in vivo* therapeutic protocol is a worthwhile endeavour, toward preclinical modelling of ABCG2 inhibition. If MBLI-87 is indeed confirmed as a potent non-toxic inhibitor towards other drugs and in other model systems, it will constitute a good candidate for further development aimed at improving bioavailability of substrate drugs, CNS penetration, accumulation of targeted agents in stem cells and possibly to overcome multidrug resistance in cancer.

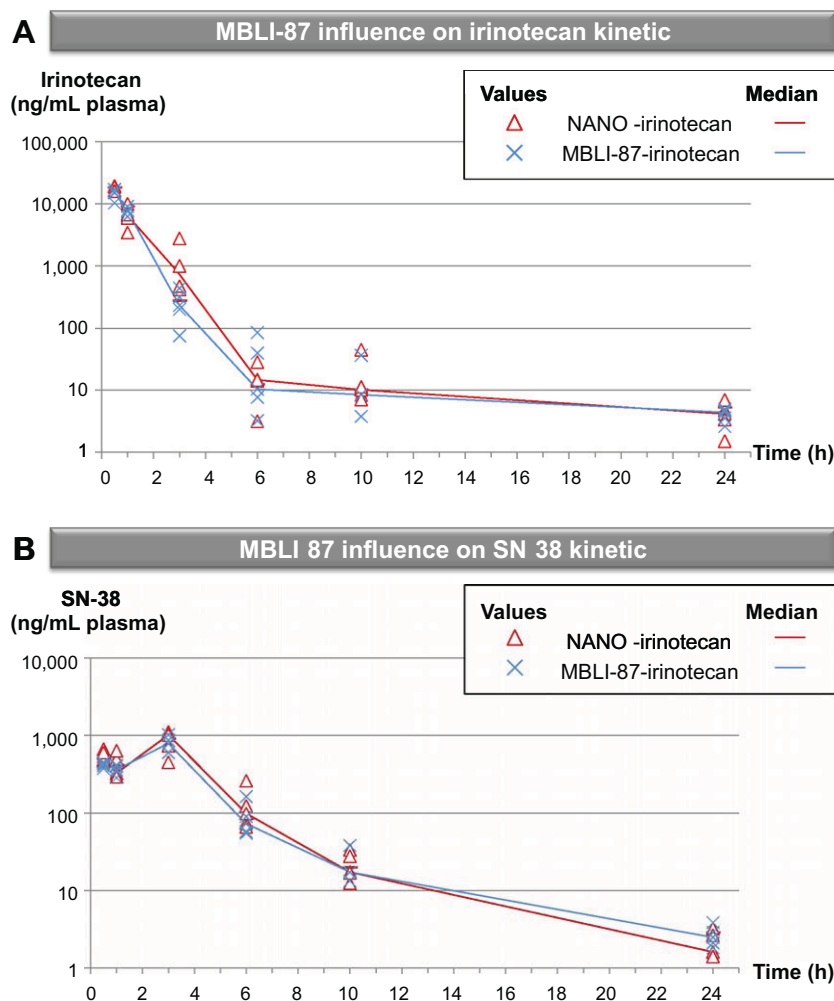


Fig. 4 – Representative plots of irinotecan (A) and SN-38 (B) plasma concentrations as a function of time. Mice were treated by IP injection of irinotecan in combination with either MBLI-87 or NANO (5 mice per condition). HPLC MS/MS determined irinotecan and SN-38 plasma concentrations (ng/mL plasma) are represented as plots as a function of time. Irinotecan (A) or SN-38 (B) plasma concentration of each mouse is shown in the absence (red triangles/NANO-irinotecan) or presence of MBLI-87 (blue crosses/MBLI-87-irinotecan). Median values are either represented by a red line (NANO-irinotecan) or a blue line (MBLI-87-irinotecan). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Conflict interest statement

None declared.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM (UMR 590) and Université Lyon 1, and grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 4007), Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue 2009) and LST (Lyon Science Transfert). M. Honorat and O. Arnaud are respectively recipient of doctoral fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Shukla S, Zaher H, Hartz A, et al. Curcumin inhibits the activity of ABCG2/BCRP1, a multidrug resistance-linked ABC drug transporter in mice. *Pharm Res* 2009;26(2):480–7.
- Deeken JF, Figg WD, Bates SE, Sparreboom A. Toward individualized treatment: prediction of anticancer drug disposition and toxicity with pharmacogenetics. *Anticancer Drugs* 2007;18(2):111–26.
- Loscher W, Potschka H. Blood–brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2005;2(1):86–98.
- Polli JW, Olson KL, Chism JP, et al. An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-[3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl]-6-[5-[[[2-(methylsulfonyl)ethy

- l]amino)methyl]-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016). *Drug Metab Dispos* 2009;**37**(2):439–42.
5. Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. *Toxicol In Vitro* 2006;**20**(2):163–75.
 6. Chu XY, Suzuki H, Ueda K, et al. Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;**288**(2):735–41.
 7. Nicolle E, Boumendjel A, Macalou S, et al. QSAR analysis and molecular modeling of ABCG2-specific inhibitors. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;**61**(1):34–46.
 8. Hida T, Ogawa S, Park JC, et al. Gefitinib for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;**9**(1):17–35.
 9. Lemos C, Jansen G, Peters GJ. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 2008;**98**(5):857–62.
 10. Stewart CF, Leggas M, Schuetz JD, et al. Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Res* 2004;**64**(20):7491–9.
 11. Elkind NB, Szentpetery Z, Apati A, et al. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res* 2005;**65**(5):1770–7.
 12. Leggas M, Panetta JC, Zhuang Y, et al. Gefitinib modulates the function of multiple ATP-binding cassette transporters *in vivo*. *Cancer Res* 2006;**66**(9):4802–7.
 13. Yanase K, Tsukahara S, Asada S, et al. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2004;**3**(9):1119–25.
 14. Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Munoz-Martinez F, et al. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res* 2005;**65**(11):4852–60.
 15. Boumendjel A, Macalou S, Ahmed-Belkacem A, Blanc M, Di Pietro A. Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg Med Chem* 2007;**15**(8):2892–7.
 16. Macalou S, Pozza A, Terreux R, Magnard S, Boumendjel A, Pietro AD. Discriminating selective and non-selective inhibitory sites of ABCG2 with acridone derivatives. 2010, submitted for publication.
 17. Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, et al. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* 2003;**89**(10):1971–8.
 18. Choisnard L, Geze A, Putaux JL, Wong YS, Wouessidjewe D. Nanoparticles of beta-cyclodextrin esters obtained by self-assembling of biotransesterified beta-cyclodextrins. *Biomacromolecules* 2006;**7**(2):515–20.
 19. Gèze A, Choisnard L, Putaux JL, Wouessidjewe D. Colloidal systems made of biotransesterified alpha, beta and gamma cyclodextrins grafted with C10 alkyl chains. *Mater Sci Eng C* 2009;**29**:458–62.
 20. Choisnard L, Geze A, Yameogo BG, Putaux JL, Wouessidjewe D. Miscellaneous nanoaggregates made of beta-CD esters synthesised by an enzymatic pathway. *Int J Pharm* 2007;**344**(1–2):26–32.
 21. Zhang Y, Bressler JP, Neal J, et al. ABCG2/BCRP expression modulates D-luciferin based bioluminescence imaging. *Cancer Res* 2007;**67**(19):9389–97.
 22. Stein WD, Yang J, Bates SE, Fojo T. Bevacizumab reduces the growth rate constants of renal carcinomas: a novel algorithm suggests early discontinuation of bevacizumab resulted in a lack of survival advantage. *Oncologist* 2008;**13**(10):1055–62.



The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes[☆]

Manuela Dezi^{a,b}, Pierre-Frédéric Fribourg^{a,b}, Aurelie Di Cicco^{a,b}, Ophelie Arnaud^c, Sergio Marco^{d,e}, Pierre Falson^c, Attilio Di Pietro^c, Daniel Lévy^{a,b,*}

^a Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, F-75231, France

^b CNRS, UMR168, Paris, F-75231, France

^c Equipe Labellisée Ligue 2009, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1 and IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, F-69367 Lyon, France

^d Institut Curie, Centre de Recherche, Orsay, F-91405, France

^e INSERM, U759, Orsay, F-91405, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2010

Received in revised form 27 July 2010

Accepted 27 July 2010

Available online 4 August 2010

Keywords:

Multidrug resistance

ABCG2

Functionalized lipid layer

Electron microscopy

Sf9 insect cells

Flp-In-293 cells

ABSTRACT

ABCG2 is a human membrane ATP-binding cassette half-transporter that hydrolyzes ATP to efflux a large number of chemotherapeutic agents. Several oligomeric states of ABCG2 from homodimers to dodecamers have been reported depending on the overexpression systems and/or the protocols used for purification. Here, we compared the oligomeric state of His₆-ABCG2 expressed in Sf9 insect cells and in human Flp-In-293/ABCG2 cells after solubilization in mild detergents. His₆-ABCG2 was purified through a new approach involving its specific recognition onto a functionalized lipid layer containing a Ni-NTA lipid. This approach allowed the purification of His-ABCG2 in presence of all solubilized membrane components that might be involved in the stabilisation of native oligomers and without requiring any additional washing or concentration passages. ABCG2 purified onto the NiNTA lipid surfaces were directly analyzed by electron microscopy and by biochemical assays. Altogether, our data are consistent with a tetrameric organization of ABCG2 when expressed in either heterologous Sf9 insect cells or in human homologous cells.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The ability of cells to acquire a multidrug resistance (MDR) phenotype is often related to overexpression within their plasma membranes of ATP-binding cassette (ABC)-transporters able to efflux many chemotherapeutic drugs at the expense of ATP hydrolysis. More recently than P-glycoprotein/ABCB1 and MRP1 (multidrug resistance protein)/ABCC1, breast cancer resistance protein/ABCG2 has also been shown to be associated to an MDR phenotype. The common overall topology of ABC transporters is constituted by two hydrophobic do-

maines that contain drug-binding sites, and two cytoplasmic nucleotide-binding domains (NBDs) that contain the hydrolytic sites. Unlike ABCB1 and other “full” transporters, the predicted topology of ABCG2, ~ 72 kDa, comprises one hydrophobic domain of six transmembrane helices and one cytosolic NBD. Moreover, ABCG2 displays a reverse arrangement with the N-terminal NBD region preceding the transmembrane domain (TM), in comparison to many other ABC transporters. Since two NBDs are required for ATP hydrolysis and substrate transport [1], it is believed that the minimal functional unit of ABCG2 is a dimer. This assumption has also been supported by experiments reporting the co-immunoprecipitation of wild-type and mutated proteins [2], and by the functional expression of dimeric chimera [3]. Moreover the transmembrane dimerization motif GXXXG [4], G553 residue within TM5 [5] or intermolecular disulfide bridges involving Cys603 inside the loop connecting TM5 and TM6 [6,7], have been proposed as molecular basis for ABCG2 dimerization.

However, higher oligomeric states of ABCG2 including tetrameric, octameric and dodecameric forms have also been reported [8–10] raising the question whether they were indeed present in the native membrane with functional relevance. The tendency of ABC membrane transporters to form multimers has also been reported for MRP1 [11,12], CFTR [13] or the yeast Pdr5p full-transporter [14]. Furthermore, transition from dimers to higher oligomeric states during the ATPase cycle has also been reported for ABCA1 [15].

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; BSA, bovine serum albumin, CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate; cmc, critical micelle concentration; DDM, dodecyl-β-D-maltoside; DOTM, dodecyl-β-D-thiomaltoside; DOPC, dioleoyl-phosphatidyl choline; DMPC, dimiristoyl-phosphatidylcholine; EM, electron microscopy; Fos-choline 16, n-Hexadecylphosphocholine; MDR, multidrug resistance; NBD, nucleotide-binding domain; NEM, N-ethylmaleimide; Ni-NTA DOGS, Ni-nitrilotriacetic-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[[N (5-Amino-1-Carboxypentyl) iminodiacetic Acid]Succinyl; TM, transmembrane domain

[☆] This work was supported by the Institut Curie, CNRS and Université Lyon 1 (UMR 5086) and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-BLAN-0420, ANR-PCV06-135269 and ANR-PCV06-135175), and the Ligue Nationale contre le Cancer (ADP & PF, Equipe Labellisée Ligue 2009).

* Corresponding author. Institut Curie UMR CNRS 168, 11 rue P.M.Curie, F-75248 Paris Cedex 05, France. Tel.: +33 1 56 24 67 82; fax: +33 1 40 51 06 36.

E-mail address: daniel.levy@curie.fr (D. Lévy).

The comparison of the different studies on the oligomeric state of ABCG2 is complicated by the fact that proteins have been expressed in different overexpression systems and analyzed by different biochemical approaches, i.e. just after extraction from the membrane or after purification in detergent. Tetramers and dodecamers were reported for transporters expressed in human cell lines, where proteins were extracted from the membrane but not purified in detergent, and analyzed by perfluoro-octanoic acid gels and non denaturing gel electrophoresis [8,9]. Octamers of ABCG2 have been reported after high expression in High-Five insect cells, purification in Fos-choline 16 and 3D reconstruction by electron microscopy [10] while progesterone-induced tetramers were purified after expression in *Lactococcus lactis* [16].

Here, we compare the oligomeric state of ABCG2 expressed in both Sf9 insect cells and in human Flp-In-293 cell lines, two expression systems allowing a functional expression of ABCG2. Moreover, we purified ABCG2 using a new approach of purification, based on the specific binding of His₆-ABCG2 to a functionalized lipid layer. The purification was performed in presence of all membrane components including lipids and bypassing any further purification or concentration steps. The biochemical and electron microscopy analyses of ABCG2 are consistent with a tetrameric organization of ABCG2 after expression in both Sf9 insect cells and Flp-In-293/ABCG2 cell lines.

2. Material and methods

2.1. Materials

Dioleoyl-phosphatidyl choline (DOPC) and Ni-nitrilotriacetic-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[[N-(5-Amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic Acid]Succinyl] (Ni⁺⁺-NTA-DOGS) were of the highest purity available, and purchased from Avanti Polar Lipids (AL, USA). Detergents, dodecyl-β-D-maltoside, DDM, dodecyl-β-D-thiomaltoside, DOTM, Fos-choline 16, n-Hexadecylphosphocholine and 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate CHAPS were purchased from Anatrace (OH, USA). The protease inhibitor cocktail for eukaryotic proteins was from Sigma Aldrich. Monoclonal antibodies BXP-21, 5D3 and anti-His, were purchased from Alexis (CA, USA), Pierce (IL, USA) and BioLegend (CA, USA), respectively.

2.2. Expression of ABCG2 in Sf9 insect cells

Human ABCG2 was expressed in Sf9 insect cells according to [17]. Briefly, the expression plasmid pFastBac Dual–NinaA + ABCG2 was derived from the expression plasmid pTriEx-BCRP and the addition of ABCG2 at its N terminus [18]. The resulting sequence was mahhhhhshsgketaakferqhmdspssglvprgssS₄ ABCG2-S₆₅₅ which included a hexa-histidine affinity tag. Cells were infected with baculovirus at a multiplicity of 0.1 at 27 °C and harvested 72 h post-infection. The pellets were washed twice with ice cold Dulbecco's phosphate buffer saline without CaCl₂ and MgCl₂, then suspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 200 μM DTT, and incubated on ice for 30 min. Cells were suspended in lysis buffer (10 mM HEPES/NaOH, 10 mM NaCl, pH 8) for 1 h at 4 °C, then lysed by 20 passages through a 25Gx5/8" syringe needle. Cellular debris were pelleted by centrifugation at 500×g for 15 min and discarded. The supernatant was centrifuged at 15 000×g for 1 h. Then, the supernatant was centrifuged at 100 000×g for 1 h to obtain a pellet of enriched plasma membranes. Finally, membranes were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. All steps were performed in presence of 10 μl/ml buffer of the protease inhibitor cocktail. ATPase activity of ABCG2 in Sf9 membranes was measured as described below to 12 nmol.mg⁻¹.min⁻¹ and was consistent with the ATPase activities reported by [4]. This corresponded to a turnover number of 0.89 min⁻¹ per monomer, i.e. 3.4 min⁻¹ per tetramer.

2.3. Expression of His₆-ABCG2 in Flp-In 293 cells

Flp-In-293 cells (Invitrogen) were transfected with the ABCG2pcDNA5/FRT vector. The ABCG2pcDNA5/FRT vector was obtained by a subcloning pFastBac Dual–NinaA + ABCG2 as previously used for Sf9 insect cells. The resulting cells are described hereinafter as Flp-In-293/ABCG2 cells. Flp-In-293/ABCG2 cells were maintained in DMEM supplemented by fetal bovine serum (10%) and penicillin/streptomycin (1%) and hygromycin (100 μg/ml) at 37 °C under 5% CO₂. Cells were seeded at 10 millions per hyperflask (Corning) and maintained at 37 °C under 5% CO₂. After 4 days cells were harvested with 100 ml of PBS/EDTA and pelleted by centrifugation (5 min, 1000×g, 4 °C). The cells were resuspended in 10 ml of lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, protease inhibitor) and incubated 1 h in ice. The cells were disrupted on ice by 10 repeated strokes of a Dounce homogenizer with pestle B. Membranes were prepared as previously described for Sf9 membranes. The ATPase activity of ABCG2 in Flp-In-293/ABCG2 membranes was measured as described below to 10 nmol/mg/min.

2.4. Solubilization of membranes

Plasma membranes were resuspended at 2 mg protein/ml in 20 mM MOPS, pH 7.4, 200 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM PMSF, antiprotease cocktail (10 μl/ml buffer). Membranes were solubilized for 1 h at 4 °C in different detergents at defined detergent/total protein ratio before centrifugation at 60 000 rpm for 30 min. Supernatants and pellets were analyzed by both SDS-PAGE and immunoblot.

For SDS PAGE, protein samples, at 0.1–1 μg per lane, were loaded on a 8% sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel immediately after the addition of loading buffer at 4 °C containing 2% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 50 mM, Tris-HCl, pH 6.8, and submitted to electrophoresis at 200 V for 45 min at room temperature. The gels were revealed by silver staining. The high molecular band of ABCG2 above 250 kDa molecular marker was only seen on the SDS-PAGE gel when samples were not boiled.

For immunoblot, gels were submitted to 15 mA over night transfer at 4 °C onto PVDF membranes, and ABCG2 bands were revealed after incubation with a mouse anti-ABCG2 monoclonal antibody BXP-21 at 1:700 dilution, for 1 h at room temperature, followed by an anti-mouse goat IgG (Fab specific)-alkaline phosphatase (AP) conjugate secondary antibody used at 1:10000 dilution. Alternatively, the protein was revealed using the anti-His HisProbe-HRP without significant differences.

Blue native gels were performed combining the addition of Serva Blue G in the cathode buffer with a discontinuous buffer system and gradient gel as proposed in [19]. Briefly, 12 μl of solubilized membranes were mixed with one volume of 4 X loading buffer, 250 mM Tris pH 6.8, 40% glycerol, 0.002% bromophenol blue, and loaded onto a 4–14% gradient of a Laemmli polyacrylamide gel without SDS. Electrophoresis was performed at 4 °C at a constant voltage of 80 V with Blue running buffer in the cathode chamber, 25 mM Tris, 198 mM glycine, pH 8, 0.02% Coomassie Serva Blue G, replaced by running buffer without the blue stain after front gel migration to the middle of the gel. Immunodetection of ABCG2 was performed as described above. The conditions of running were carefully optimized with high molecular weight calibration kit for native electrophoresis (GE Healthcare, UK) and with membrane proteins solubilized in DOTM including BmrA, a bacterial homodimeric ABC half-transporter of 130 kDa [20] and either monomeric (280 kDa) or and dimeric (560 kDa) LH1-RC core complex from *Rba. sphaeroides* [21] (see calibration curve SD1). In experiments performed to evaluate the formation of disulfide bridges during the solubilisation step, membranes were solubilized for 1 h by DOTM or DDM in a buffer supplemented with 10 mM N-ethylmaleimide.

Samples were loaded after addition of one volume of 4 X loading buffer, 250 mM Tris, pH 6.8, 40% glycerol, 5 mM NEM, 0.002% bromophenol blue.

2.5. ATPase activity

The ATPase activity was measured with a colorimetric ascorbic acid/ammonium molybdate assay of inorganic phosphate release according to [18]. Membranes at 10 mg/ml were solubilized in DOTM at a ratio detergent/protein of 5 w/w. After centrifugation at 100 000 × g, the supernatant was supplemented with azolectin solubilized in DOTM at 5 mg/ml final lipid concentration. An aliquot of 20 µl, was mixed with 40 µl of buffer containing 5 mM NaN₃, 7 mM MgCl₂, 5.5 mM ATP, 2 mM ouabain, 0.1 mM EGTA and 20 mM Tris/KCl. Samples were incubated for 30 min at 37 °C and the reaction was stopped by the addition of 30 µl 10% SDS before measurement of the absorbance at 620 nm. The ATPase activity was calculated as the difference of rates in presence and absence of 0.5 mM orthovanadate. Sf9 His₆-ABCG2 and Flp-In-293 His₆-ABCG2 solubilized in DOTM displayed a significant ATPase activity of 6 nmol/mg/min and 5 nmol/mg/min, respectively.

2.6. Binding of His₆-ABCG2 to the Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid layer

A functionalized lipid layer containing Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid was used to specifically bind, concentrate and purify His₆-ABCG2. This lipid ligand that has been designed for the immobilization or the 2D crystallization of his-tagged soluble proteins [22–25], is used here in the case of membrane proteins solubilized in detergent. Briefly, 0.5 µl of Ni⁺⁺-NTA-DOGS/DMPC (1/1 mol/mol) in CHCl₃ at 0.1 mM was spread at the air/water interface of a 50 µl Teflon well provided with a side hole to allow further injections below the lipid monolayer of solubilized proteins in detergent [26]. Due to the geometry of the well, i.e. the concavity of the surface, a slight excess of lipid of ~30% compared to a monolayer of lipids at 45 Å²/molecule, was spread to ensure the formation of a compressed layer. This also often leads to the formation of lipid aggregates at the surface as observed by electron microscopy (Fig. 2B).

Moreover, as observed by us and others [26–29], it was important to spread the lipid layer before the protein injection to stabilize of the lipid layer in presence of detergent. Indeed, after injection of proteins, molecules of detergent reach the surface and compress the lipid monolayer forming condensed lipid domains surrounded by detergent domains and resistant to the solubilization. On the opposite, when lipid are spread onto a surface of detergent containing buffer, micelles of detergent are already present and solubilize the lipid layer [30].

For the purification of His₆-ABCG2 at the lipid surface, 5 µl of solubilized membrane at 2 mg/ml in 1% DOTM were injected below the lipid layer through the side hole of the well and incubated under gentle stirring at 4 °C. Since all membrane proteins were present in the well during the binding step, 5 mM imidazole was added to decrease unspecific interactions. The buffer in the well, 50 mM MOPS, pH 7.8, 150 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, was also supplemented with the 10 µl/ml antiprotease cocktail to avoid degradation of proteins. Surfaces were picked up after 24-h incubation at 4 °C. It should be noted that detergent concentration after injection of the solubilized membranes in the well remained far above the cmc, i.e. 0.1% DOTM, corresponding to ~38 cmc value. Thus, all membrane proteins were solubilized in micelles of detergent during the binding step to the lipid surface. In the case of the purification of His₆-ABCG2 solubilized in DDM, Fos-choline 16 and CHAPS, 5 µl of solubilized membrane in 1% DDM, 2%, Fos-choline 16 or 18 mM CHAPS were injected below the lipid layer. The detergent concentrations in the wells were 0.1% DDM, 0.2% Fos-choline 16 and 8 mM CHAPS, respectively, corresponding to 13-fold, ~388-fold and 1-fold the cmc, respectively (Fig. SD3).

In all experiments, proteins were present at the surface only when Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid was present in the composition of the monolayer. No proteins were found at imidazole concentrations above 20 mM or EDTA above 5 mM. Proteins were found at the surface of Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid above 5% mol/mol and with DOPC or DMPC as diluent lipid. However, no significant differences were observed with increasing amount of lipids spread at the surface from 0.1 mg/ml solution to 0.5 mg/ml.

We also tried the purification procedure using “affinity” grids developed by Kelly et al. [31] that consists of binding His-tagged proteins onto a lipid layer previously deposited onto a carbon grid. However, we did not find recognisable proteins, likely due to a too long time required for the binding of His₆-ABCG2, i.e. several hours that led to solubilization of the Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipids coated onto the carbon grids.

2.7. Protein elution from EM grids for SDS-PAGE and EM analysis

Proteins were recovered from the Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid layer as described [32]. Briefly, a surface with bound proteins was picked up with a carbon-coated gold EM grid, carefully blotted with Whatman 4 filter paper and incubated with a 10 µl drop of the same buffer present in the well including detergent, supplemented with 300 mM imidazole. After 2-min incubation, the same drop was used for the elution of proteins transferred onto a second grid until twenty-four grids were used. The final drop was analyzed by SDS-PAGE or used for EM analysis.

2.8. Mass spectra

The putative band of ABCG2 (Fig. 2D, lane 2) was cut out and subjected to an overnight in-gel trypsin treatment. Peptides were analyzed by MALDI-MS, and sequenced by ES Q-ToF MS/MS analysis. Protein identification was achieved by mass fingerprint of peptides and comparison with the NCBI protein database using the Mascot algorithm (Supplemental data SD2).

2.9. Immunolabeling of Sf9 His₆-ABCG2

To ensure an unambiguous assignment of Sf9 His₆-ABCG2 observed by EM, proteins bound to the lipid layer and transferred onto carbon-coated grids were immunolabeled with 5D3, a specific conformational anti-ABCG2 antibody, before labelling with Protein A gold. Briefly, grids with bound proteins were incubated for 10 min in one drop of PBS-1% paraformaldehyde, then for 4 min in four drops of PBS-100 mM glycine to quench the free aldehyde groups; finally, non-specific sites were saturated by incubation for 10 min with 1% BSA before binding of the 5D3 antibody at 1/50 dilution for 30 min. After extensive rinsing with several PBS drops containing 0.2% BSA, a second cross-linking, the anti-mouse rabbit, antibody at 1/200 dilution was added for 30 min before incubation with Protein A-5 nm gold in PBS and 0.2% BSA for 20 min. After rinsing with PBS, the labelling was stabilized with 1% glutaraldehyde before extensive rinsing with water, and negatively staining with 1% uranyl acetate. A higher amount of bound 5D3 antibody was found when proteins were first incubated in presence of 1% paraformaldehyde before labelling, in agreement with the increase of labelling observed in ABCG2-expressing PLB985 cell line [33]. In the absence of antibodies, less than 5% of gold particles by comparison to the labelling with 5D3 anti-ABCG2 were found at the surface. All buffers were supplemented with 0.01% DOTM.

2.10. Electron microscopy analysis

Sf9 His₆-ABCG2 bound to the surface of Ni⁺⁺-NTA lipids were transferred onto a carbon-coated grid and negatively stained with 1%

uranyl acetate. Images were recorded in low dose mode with a 1024 × 1024 px sCCD Gatan camera on a CM120 Philips microscope operating at 120 kV for images depicted in Fig. 2, and with a 2040 × 2048 sCCD GATAN camera on a JEOL 2200 FS operating at 200 kV for single particles analysis. For the latter, pixel size was calibrated with 2D crystals of purple membrane leading to a pixel size of 2.47 Å/pixel at 40000 X. Images were taken at 0.75–1.2 µm defocus.

2D images analysis was performed using Xmipp package [34]. The intermediate results of the procedure are shown in the Supplemental Data SD5. Briefly, a total of 1694 images of bound Sf9 His₆-ABCG2 corresponding to the extracellular views were windowed 100 × 100 pixels. Particles were masked with an external radius of 89 Å to discard the contribution of the nearest particles. Final self-organizing mapping [35] leads to three groups of images. The first one corresponds to distorted or uneven stained particles and was further discarded, whereas the two others, representing 81% of the population, were pooled. A free alignment reference was applied and the final average image was calculated without symmetry imposition and filtered at the 22 Å resolution estimated according to the FSC 0.5 criteria.

The NBDs views were obtained after elution of the bound proteins and coating onto a new grid. A set of 42 and 55 images of ABCG2 expressed in Sf9 and in Flp-In-293/ABCG2 cells, respectively, were easily recognisable and assigned to NBD views according to previous works [14,36], were centred and free reference aligned. The spectra analysis revealed a four-fold symmetry. After averaging, this symmetry was applied and the average image was filtered at the FSC 0.5 criteria estimated resolution of 31 Å. Extracellular views present on the same grid of eluted proteins were also analyzed. Particles were similar in size, 12 nm in diameter, and with a circular shape than the extracellular views of particles bound to the lipid layer (data not shown).

3. Results and Discussion

As already been shown, ABCG2 can be overexpressed in either Sf9 or High-Five insect cells as a fully functional protein [37,38]. However overexpression in High-Five cells led to two ABCG2 species, one of which was immature and could not be solubilized in mild detergents [18,39] but required SDS or Fos-choline 16 to be extracted [10]. We therefore used Sf9 cells where the protein synthesis rate was lower but produced ABCG2 as single functional specie, as shown in the western blot of solubilized plasma membranes (Fig. 1A).

Flp-In-293/ABCG2 cells were used for the overexpression of ABCG2 in human cell lines. Flp-In-293/ABCG2 cells were derived from the HEK 293 cell lines and provided the complete machineries for the correct glycosylation, plasma membrane targeting and folding for the transporter [40].

3.1. Solubilization of Sf9 His₆-ABCG2

Solubilization trials were performed with several low cmc detergents. The protein with the band running at ~72 kDa, the expected molecular weight of His-ABCG2 expressed in Sf9, was revealed by western blot using BXP-21, a specific ABCG2 monoclonal antibody. The detergents used were DDM, DOTM, undecylthiomaltoside, decylthiomaltoside, Triton X100, and finally Fos-Choline 16 and CHAPS that were previously used for the solubilization of ABCG2 expressed in High-Five insect cells [10,18].

At a detergent/protein ratio of 5 (w/w) almost all His₆-ABCG2 was solubilized with any tested detergents except for CHAPS (Fig. 1A). His₆-ABCG2 was also completely solubilized at detergent/protein ratios of 2.5 w/w with DDM, Fos-choline 16 and Triton X 100 but to a lower extent with DOTM. Increasing the CHAPS concentration up to 2% increased the solubilization yield but still remaining less efficient than other detergents at 1% (data not shown). This is significantly

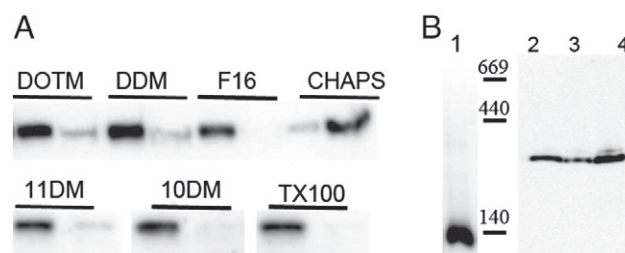


Fig. 1. Solubilization and assignment by biochemical assay of the oligomeric state of His₆-ABCG2 expressed in Sf9 insect cells. (A) Solubilization of membranes and western blot of His₆-ABCG2. Membranes resuspended at 2 mg protein/ml were solubilized in 1% DOTM, 1% DDM, 1% Fos-choline 16, and 18 mM CHAPS, 1% undecylmaltoside (11DM), 1% decylmaltoside (10DM), 1% Triton X100. For each detergent, 10 µl of supernatant (left) and pellet (right) were analyzed by 8% SDS-PAGE and His₆-ABCG2 was revealed using the BXP-21 specific antibody and running at ~70 kDa. (B) 4–14% blue native gel of solubilized His₆-ABCG2 and, for comparison, the homodimeric bacterial ABC transporter, His₆-BmrA (MW 130 kDa) purified in DOTM (lane 1). Immunoblot of membranes solubilized in DOTM in either absence or presence of 5 mM NEM (lanes 2 and 3 respectively) and solubilization in DDM (lane 4). Note that lanes have been immunolabeled separately with anti-Hist antibody for BmrA and with BXP21 for ABCG2.

different from the data reported with ABCG2 expressed in High-Five insect cells highlighting the different composition of membranes and/or the membrane preparations.

We performed the next experiments with DOTM, a mild detergent similar to DDM that was shown to stabilize large membrane protein complexes [41,42] and with DDM without significant differences.

The oligomeric state of ABCG2 solubilized in DOTM was next characterized by blue native gel. The conditions of running were carefully optimized with calibration markers and with membrane proteins solubilized in DOTM including BmrA, a bacterial homodimeric ABC half-transporter of 130 kDa (Fig. 1B, lane 1, and calibration curve in Supplemental data SD1). A single band of His₆-ABCG2 solubilized in DOTM and in DDM (Fig. 1B, lanes 2 and 4 respectively) was found at ~290 kDa between the molecular markers at 140 kDa and 440 kDa. These bands running significantly above the homodimeric BmrA were assigned to tetramers of ABCG2. Moreover, no additional bands at higher molecular weights that would be associated with higher oligomeric states, such as octamers or dodecamers, were found.

Solubilizations in DOTM were also performed in presence of the alkylating agent NEM that prevents the formation of disulfide bridges. The tetrameric band was still present and no additional bands at lower molecular weights were found revealing that tetramers of ABCG2 were the only oligomers extracted from the membrane (Fig. 1C, lane 3).

3.2. Purification of Sf9 His₆-ABCG2 onto functionalized lipid layer

The classical protocols of purification of His₆-ABCG2 usually involved the binding of protein onto a Ni⁺⁺-NTA agarose resin, then a washing step to eliminate contaminants and after elution with imidazole, a concentration step onto calibrated membranes. It cannot be ruled out that, during the successive steps of purification, the oligomeric state might change as due to either loss of important compounds, partners, or the variations in the detergent/protein ratio.

We thus developed a new protocol of purification based on the specific recognition of proteins onto a functionalized lipid layer. This approach consists in spreading a lipid layer containing Ni⁺⁺-NTA-DOGS, a lipid bearing a Ni⁺⁺-NTA group, at the air/buffer interface of a Teflon well. This ligand is similar to the Ni⁺⁺-NTA group used in classical affinity chromatography, in order to bind and purify His-tagged membrane proteins. This approach combines

the concept developed for the 2D crystallization at the surface of His-tagged purified membrane proteins [26,27] and that related to the purification of aquaporin AQPO after few minutes incubation onto a functionalized lipid layer deposited onto a carbon grid [31]. The crucial improvement compared to the latter consisted in a much longer incubation time allowing the binding of membrane proteins either with a low-affinity tag or expressed in very low amount.

Here, membranes were solubilized in 1% DOTM and after the centrifugation step necessary to remove non-solubilized proteins, a few μ l of supernatant were injected below the lipid layer through a side hole (Fig. 2A). As observed in the case of the 2D crystallization of membrane proteins, the lipid layer was stable for several days in presence of detergent when the lipid layer was formed before injection of the protein, whereas it was rapidly solubilized if lipids were spread directly onto a buffer containing the detergent [27,28,30]. After overnight incubation at 4 °C in presence of antiproteases, the surface was picked up with a carbon-coated grid and analyzed by either EM or biochemical methods.

EM analysis of the transferred surface revealed homogeneous population of circular-shaped particles of ~12 nm in size (Fig. 2B) coexisting with recognisable lipid aggregates (large white areas). The presence of the 12 nm particles was found specific to the presence of both His₆-ABCG2 and Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid. No protein was found at the surface without Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid or after incubation with a buffer supplemented with imidazole at a concentration above 20 mM. Proteins bound to the surface were immunolabeled with 5D3, a conformational anti-ABCG2 antibody, followed by the binding of protein A gold. Proteins appeared more aggregated in patches than before labelling, likely due to the successive washing steps including the fixation step in paraformaldehyde. However, several particles were successfully gold labelled demonstrating that the 12 nm particles were indeed ABCG2 (Fig. 2C).

The protein composition at the surface was further analyzed by SDS-Page after elution of bound proteins with a buffer supplemented with 300 mM imidazole.

The SDS-PAGE analysis of proteins bound to lipid surface showed a drastic purification of the membrane content (Fig. 2D). Indeed, only

three bands were present: a well defined band above 250 kDa (***), a faint band at ~72 kDa (*) corresponding to the monomeric ABCG2 and a band below ~60 kDa likely corresponding to unspecifically bound contaminants. By contrast, ABCG2 expressed in High-Five cells and purified with Ni⁺⁺-NTA agarose resins contained more contaminants and required further purification by anionic exchange and size exclusion chromatography to eliminate them [10]. Since the same types of specific interactions were involved at the lipid layer surface and on the agarose beads, i.e. Ni⁺⁺-NTA-polyHis interactions, the observed differences might be related to the known capacity of eukaryotic membrane protein to unspecifically bind to agarose beads.

The band above 250 kDa was analyzed by mass spectra that revealed peptide fragments ambiguously specific to ABCG2 (Supplementary material SD2). A similar band of ABCG2 above 250 kDa has also been reported by others in cross-linking experiments and considered as either defined oligomers or as aggregates [3,5,8,43]. Here, electron microscopy show that the high molecular band correspond to well defined particles of ABCG2 of 12 nm that could not be assigned to aggregates.

We also examined the oligomeric state of Sf9 His₆-ABCG2 solubilized in other detergents. Experiments of binding to the Ni⁺⁺-NTA lipid layer were performed with solubilized membranes and the presence of His₆-ABCG2 was evaluated by EM (Supplemental data, SD3). A similar large amount of ABCG2 bound to the surface was found when starting from membranes solubilized in either DOTM or DDM. In the case of membranes solubilized in Fos-choline 16 and in CHAPS, EM analysis has shown that the lipid layer was unstable. However, fewer particles of ABCG2 but of similar circular shaped were found (data not shown). With all detergents, the size of 11–12 nm diameter and the shape of the particles are similar to tetramers ABCG2 and are larger and smaller than dimers or octamers, respectively. It is thus likely that the oligomeric state of Sf9 ABCG2 as purified at the lipid surface was constant and not related to the detergent used for membrane extraction.

Finally, we controlled if the lipid layer allowed the purification of other membrane proteins and if the binding and the concentration of proteins at the surface did not induce artefactual oligomeric states. *E. coli* membranes expressing His₆-BmrA were solubilized in

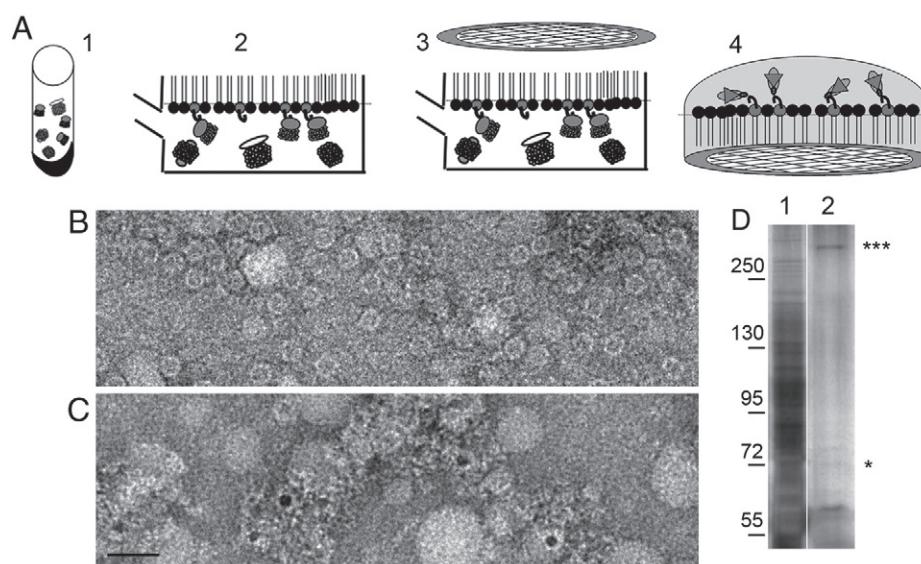


Fig. 2. Single-step purification of His₆-ABCG2 expressed in Sf9 membrane by using a functionalized lipid layer. (A) Principle of the purification at the surface of a functionalized lipid layer. Solubilized membranes in DOTM containing Sf9 His₆-ABCG2 (1) was injected in a Teflon well below a lipid layer containing a Ni⁺⁺-NTA-DOGS lipid (2). After incubation, the surface was picked up with a carbon-coated grid (3) and analyzed by electron microscopy or by 8% SDS-PAGE after elution with a drop of buffer containing 300 mM imidazole (4). (B) Electron micrograph of Sf9 His₆-ABCG2 bound to the lipid layer after incubation of the total solubilized membranes. Bar = 25 nm. (C) Same grid after immunolabelling with the conformational 5D3 anti-ABCG2 and protein A gold; gold particles appeared as black dots. (D) Silver stained SDS-PAGE of proteins bound to the Ni⁺⁺-NTA DOGS surface. Lane 1: solubilized membranes before incubation with the lipid layer. Lane 2: proteins bound at the lipid surface. Two bands were found above 60 kDa, a faint band at ~70 kDa (*) and a main band above 250 kDa (***) likely corresponding to the monomeric and oligomeric ABCG2, respectively.

DOTM and incubated with Ni^{++} -NTA DOGS lipid layer. After elution of bound proteins, SDS-PAGE analysis revealed a successful purification with only two bands, His₆-BmrA and a single contaminant (Supplemental data, SD4). Furthermore, electron microscopy of the surfaces showed small particles consistent with dimeric BmrA without larger particles. The dimeric form of BmrA was also found in the native gel of solubilized membranes (SD4, Supplemental data, SD4) and from the projection calculated from 2D crystals of purified BmrA and reconstituted at the lipid layer [20,27].

3.3. Electron microscopy of Sf9 His₆-ABCG2

3.3.1. Extracellular side

Sf9 His₆-ABCG2 bound to the lipid layer were imaged by EM after negative staining and analyzed using a single particle approach. Almost all images showed the similar feature of circular particles of ~12 nm diameter with a large internal cavity of 6–7 nm (Fig. 3A). His₆-ABCG2 was bound to the surface through its His₆ extension present on the N-terminal cytoplasmic side close to the NBD. In this orientation, the extracellular side is facing the bulk in the Teflon well and after transfer onto the carbon grids, this side was accessible to the negative staining. It is thus likely that the images corresponded to the extracellular views as also shown by the immunolabelling experiments (Fig. 2). Although particles appeared similar in shape, we performed a detailed analysis to identify homogenous populations. We classified particles according to their symmetry using a self-organize mapping approach. This led to 15 classes of proteins, all showing a similar average image with differences due to slightly different tilts relative to the surface (see also Supplemental data SD5). An average image of the closest populations was calculated at 22 Å resolution (Fig. 3C). The extracellular side appeared as an almost continuous circular shaped protein of 11.5 nm diameter with extensions up to 13.5 nm and an internal region of stain-penetrating region of 7.5 nm in diameter. Part of the external extensions corresponded to the contribution of the cytoplasmic NBDs (see below).

The continuous ring of densities was strikingly different from known structures of other ABC exporters. The periplasmic side of Sav1886, in an open outward conformation, showed two separated bundles of helices that would appear as two separated densities in the extracellular projection of negatively-stained ABCG2 at 22 Å resolu-

tion [44]. A single broad density would be expected from the periplasmic side of MsbA homodimer and of the monomer of Pgp in open inward conformation [45,46]. However, it is worth mentioning that ABCG2 contains an additional extracellular large loop ECL3, of ~55 amino-acids, between TMD5 and TMD6. This loop contains the epitope of the 5D3 antibody that was bound to the extracellular side of ABCG2 at the lipid layer (Fig. 2C). We propose that the continuous densities along the extracellular view likely result from the ELC3 loops. In this context, the yeast full transporter Pdr5p, with the same reverse topology as ABCG2, and with two large loops between TMD5 and TMD6 and between TMD11 and TMD12, also show rather large extracellular continuous densities [14].

3.3.2. Intracellular side

To get other views of ABCG2, proteins bound to the surface were transferred onto a carbon-coated grid, eluted and deposited onto a new carbon grid. Very few particles were found on the grid likely due to the low concentration of eluted protein in the drop. Most views were extracellular view indicating a preferential coating of ABCG2 onto the carbon grid. However, particles with a recognizable NBDs view were also present. They showed a square shaped protein of 15 nm width with a central stain penetrating region of 2.5 nm (Fig. 3B). Symmetry analysis revealed a 4-fold symmetry particle. The 4-fold symmetrized average at 31 Å resolution is depicted in Fig. 3D. The resolution was rather low but however sufficient to delineate the different subdomains. The four densities of 6 nm diameter were consistent with the 5–6 nm diameter size of the single NBD observed by electron microscopy as reported for the yeast ABC transporter Pdr5p [14] and for BmrA [20,36].

Finally, alignment by cross-correlation of the extracellular and NBD view averages allowed to orient both views. This revealed that extensions of the extracellular views corresponds to an uneven staining of the NBDs. Overall, the dimensions of the tetrameric ABCG2 of 15 nm and 11.5 nm, for the NBDs and the extracellular side, respectively, were as expected significantly smaller than those reported for the octameric form of ABCG2 purified from High-Five insect cells in Fos-choline 16 with a maximal diameter of 18 nm [10].

3.4. Analysis of the oligomeric state of Flp-In-293 expressed His₆-ABCG2

We next analyzed His₆-ABCG2 expressed in Flp-In-293 cell lines (Fig. 4). Membranes were solubilized in different detergents including DOTM and DDM and monomeric ABCG2 band ran at ~80 kDa likely due to higher glycosylation than in Sf9 (Fig. 4A). Blue native gel electrophoresis shows a single band running between the molecular markers of 140 kDa and 440 kDa. The solubilized membrane contained several proteins including three bands of ABCG2 that were detected on immunoblot by BXP21 antibody and assigned to monomer (*), dimer (**), and a higher molecular weight oligomer (***) (Fig. 4C, lane 1 and 2).

We then performed the purification of ABCG2 after incubation of solubilized membranes with the functionalized lipid layer. It is worth noting that the amount of proteins expressed in Flp-In 293 was lower than in Sf9 [47] and thus a lower amount of ABCG2 was expected starting from 10 µg of solubilized membrane and later bound to the surface. After incubation of the solubilized membrane with the functionalized layer followed by elution of bound proteins, a drastic purification of the protein content was obtained. Although very few proteins were bound, a single faint band was found above the 250 kDa marker at a molecular weight corresponding to the oligomeric ABCG2 (***) (lanes and 3). Image analysis of bound ABCG2 revealed squared particles of 15 nm side with a 4 fold symmetry (supplementary material) and with 4 densities of 5.5 nm each consistent with the size of a single NBD.

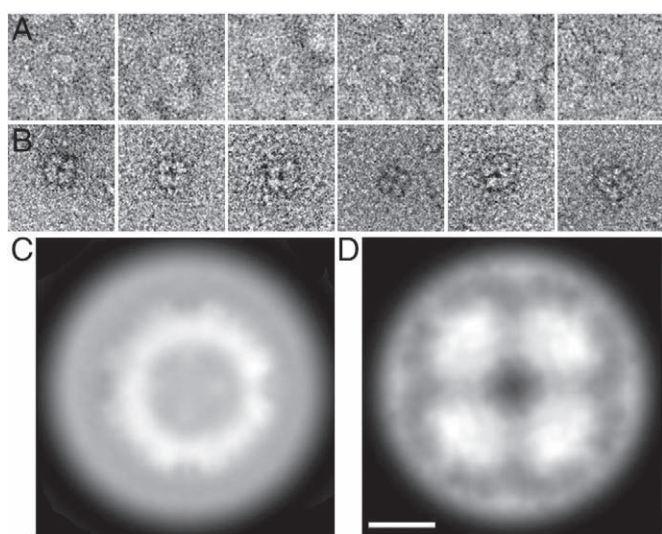


Fig. 3. Electron microscopy analysis of negatively stained His₆-ABCG2 purified from Sf9 membranes. (A) Gallery of extracellular views of His₆-ABCG2 bound to the Ni^{++} -NTA lipid layer. (B) Gallery of NBDs views of His₆-ABCG2 eluted from the lipid layer. The dimensions of the images are 180 Å x 180 Å. (C) Average image of the extracellular side of His₆-ABCG2. (D) The 4-fold symmetrized average image of the NBD side of His₆-ABCG2. Scale bar = 5 nm.

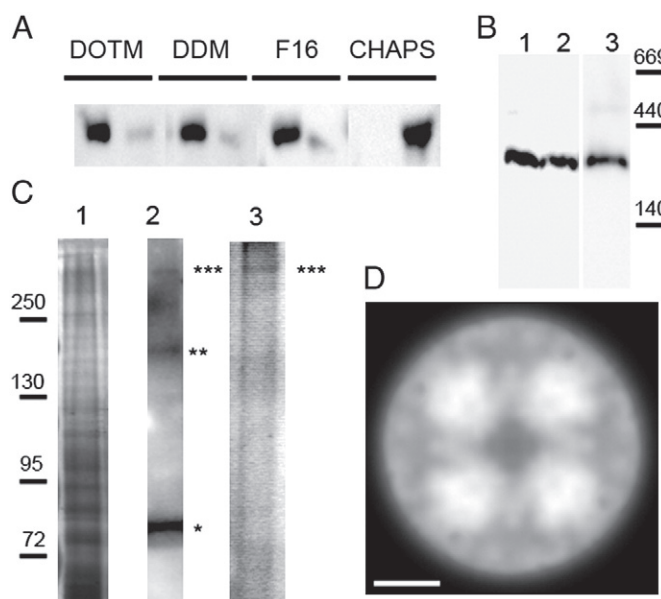


Fig. 4. Oligomeric state of His₆ ABCG2 expressed in Flp-In-293/ABCG2 cell lines. (A) Membranes resuspended at 2 mg protein/ml were solubilized in 1% DOTM, 1% DDM, 1% Fos-choline 16, and 18 mM CHAPS. For each detergent, 10 μ l of supernatant (left) and pellet (right) were analyzed by 8% SDS-PAGE and His₆-ABCG2 was revealed using the BXP-21 specific antibody and running at ~80 kDa. (B) 4–14% blue native gel of His₆-ABCG2, solubilized in DOTM, in either absence or presence of 10 mM NEM (lane 1, lane 2) and in DDM (lane 3). (C) Silver stained SDS PAGE of solubilized membranes (lane 1) and the corresponding western blot (lane 2) revealing monomeric (*), dimeric (**) and oligomeric ABCG2 (***). Solubilized membrane was incubated and purified after specific binding to the Ni²⁺-NTA DOGS lipid surface. Although the amount of bound protein was low, a main band of oligomeric ABCG2 was found (***). (D) The 4-fold symmetrized average image of the NBD side of Flp-In-293 His₆-ABCG2. Scale bar = 5 nm.

4. Conclusion

ABCG2 is the human ABC transporter for which most different oligomeric states have been reported leading to various controversies but highlighting the tendency of this membrane protein to oligomerize within or after extraction from the membrane (reviewed in [48,49]). However, to address the question of the functional relevance of specific oligomeric state of ABCG2, it is important to distinguish oligomers present in the membrane from oligomers that may result from the overexpression cells and/or the methodologies used for their isolation and purification.

Here, we compared the oligomeric state of ABCG2 after heterologous and homologous expression in Sf9 insect cell and in human Flp-In-293/ABCG2 cell lines, respectively. Moreover, we used an improved approach for the purification of ABCG2 that allowed the biochemical and the structural analysis by electron microscopy. Overall, our data are consistent with a tetrameric state of ABCG2.

The human cells compared to the insect cells with the more stringent quality control for the ER sorting, the post-translational modifications and the specific membrane composition, ensured the most complete expression of ABCG2 [50,51]. The bottleneck of the low amount of ABCG2 expressed in human cells that usually prevented further structural analysis was solved through the specific concentration of His-tagged protein onto a functionalized lipid surface. Furthermore, the purification at the surface was significantly different from the classical protocols of purification using the successive affinity resins. In the former case, proteins of interest were purified at the surface in presence of all the membrane components, while in the latter case proteins were gradually purified by removing most of other components. In this context, cholesterol which is present during the purification by the lipid layer, as other lipids, was reported to

specifically increase both ATPase and drugs transport activities ABCG2 [52,53].

The oligomeric state of ABCG2 within the membrane of living cells, being unique or multiple and/or in dynamic equilibrium, is not yet easily accessible experimentally. However, we believed that the methodologies reported here ensured that the tetrameric organisation of ABCG2 is one of the oligomeric states, if not the unique oligomeric state, present in the native membrane.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. G. Raposo for her help in the immunolabeling of ABCG2 with 5D3, to Dr. W. Faigle from the mass spectroscopy platform of the Curie Institute and to J. Manzi for critical reading.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbmem.2010.07.034.

References

- [1] P.C. Smith, N. Karpowich, L. Millen, J.E. Moody, J. Rosen, P.J. Thomas, J.F. Hunt, ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer, *Mol. Cell* 10 (2002) 139–149.
- [2] U. Henriksen, U. Gether, T. Litman, Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 1417–1426.
- [3] A. Bhatia, H.J. Schafer, C.A. Hrycyna, Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers, *Biochemistry* 44 (2005) 10893–10904.
- [4] O. Polgar, R.W. Robey, K. Morisaki, M. Dean, C. Michejda, Z.E. Sauna, S.V. Ambudkar, N. Tarasova, S.E. Bates, Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif, *Biochemistry* 43 (2004) 9448–9456.
- [5] O. Polgar, C. Ozvegy-Laczka, R.W. Robey, K. Morisaki, M. Okada, A. Tamaki, G. Koblos, N.B. Elkind, Y. Ward, M. Dean, B. Sarkadi, S.E. Bates, Mutational studies of G553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization, *Biochemistry* 45 (2006) 5251–5260.
- [6] U. Henriksen, J.U. Fog, T. Litman, U. Gether, Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 36926–36934.
- [7] K. Wakabayashi, H. Nakagawa, A. Tamura, S. Koshiba, K. Hoshijima, M. Komada, T. Ishikawa, Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 27841–27846.
- [8] J. Xu, Y. Liu, Y. Yang, S. Bates, J.T. Zhang, Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 19781–19789.
- [9] J. Xu, H. Peng, Q. Chen, Y. Liu, Z. Dong, J.T. Zhang, Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity, *Cancer Res.* 67 (2007) 4373–4381.
- [10] C.A. McDevitt, R.F. Collins, M. Conway, S. Modok, J. Storm, I.D. Kerr, R.C. Ford, R. Callaghan, Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2, *Structure* 14 (2006) 1623–1632.
- [11] M.F. Rosenberg, Q. Mao, A. Holzenburg, R.C. Ford, R.G. Deeley, S.P. Cole, The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): crystallization and single-particle analysis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16076–16082.
- [12] Y. Yang, Y. Liu, Z. Dong, J. Xu, H. Peng, L. Zhaoqian, J.T. Zhang, Regulation of function by dimerization through the amino-terminal membrane spanning domain of human ABCG2/MRP1, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 8821–8830.
- [13] L. Zhang, L.A. Aleksandrov, Z. Zhao, J.R. Birtley, J.R. Riordan, R.C. Ford, Architecture of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein and structural changes associated with phosphorylation and nucleotide binding, *J. Struct. Biol.* 167 (2009) 242–251.
- [14] A. Ferreira-Pereira, S. Marco, A. Decottignies, J. Nader, A. Goffeau, J.L. Rigaud, Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11995–11999.
- [15] D. Trompier, M. Alibert, S. Davanture, Y. Hamon, M. Pierres, G. Chimini, Transition from dimers to higher oligomeric forms occurs during the ATPase cycle of the ABCA1 transporter, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20283–20290.
- [16] S. Velamakanni, T. Janvilisri, S. Shahi, H.W. van Veen, A functional steroid-binding element in an ATP-binding cassette multidrug transporter, *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 12–17.
- [17] C. Trometer, P. Falson, Mammalian membrane protein expression in baculovirus-infected insect cells, *Methods Mol Biol* 601 (2010) 105–117.
- [18] A. Pozza, J.M. Perez-Victoria, A. Sardo, A. Ahmed-Belkacem, A. Di Pietro, Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 1912–1922.
- [19] M. Niepmann, J. Zheng, Discontinuous native protein gel electrophoresis, *Electrophoresis* 27 (2006) 3949–3951.

- [20] C. Orelle, F. Gubellini, A. Durand, S. Marco, D. Levy, P. Gros, A. Di Pietro, J.M. Jault, Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA, *Biochemistry* 47 (2008) 2404–2412.
- [21] J. Busselez, M. Cotteville, P. Cuniasse, F. Gubellini, N. Boisset, D. Levy, Structural basis for the PufX-mediated dimerization of bacterial photosynthetic core complexes, *Structure* 15 (2007) 1674–1683.
- [22] L. Schmitt, C. Christian Dietrich, R. Tampe, Synthesis and Characterization of Chelator-Lipids for Reversible Immobilization of Engineered Proteins at Self-Assembled Lipid Interfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 8485.
- [23] E.W. Kubalek, S.F. Le Grice, P.O. Brown, Two-dimensional crystallization of histidine-tagged, HIV-1 reverse transcriptase promoted by a novel nickel-chelating lipid, *J. Struct. Biol.* 113 (1994) 117–123.
- [24] C. Dietrich, L. Schmitt, R. Tampe, Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self-assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92 (1995) 9014–9018.
- [25] E. Barklis, J. McDermott, S. Wilkens, E. Schabtach, M.F. Schmid, S. Fuller, S. Karanjia, Z. Love, R. Jones, Y. Rui, X. Zhao, D. Thompson, Structural analysis of membrane-bound retrovirus capsid proteins, *EMBO J.* 16 (1997) 1199–1213.
- [26] D. Levy, G. Mosser, O. Lambert, G. Moeck, D. Bald, J. Rigaud, Two-dimensional crystallization on lipid layer: A successful approach for membrane proteins, *J. Struct. Biol.* 127 (1999) 44–52.
- [27] D. Levy, M. Chami, J.L. Rigaud, Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy, *FEBS Lett.* 504 (2001) 187–193.
- [28] I. Arechaga, D. Fotiadis, Reconstitution of mitochondrial ATP synthase into lipid bilayers for structural analysis, *J. Struct. Biol.* 160 (2007) 287–294.
- [29] J.Y. Lee, I.L. Urbatsch, A.E. Senior, S. Wilkens, Nucleotide-induced structural changes in P-glycoprotein observed by electron microscopy, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 5769–5779.
- [30] P. Fontaine, M.C. Faure, F. Muller, M. Poujade, J.S. Micha, F. Rieutord, M. Goldmann, Unexpected stability of phospholipid langmuir monolayers deposited on Triton X-100 aqueous solutions, *Langmuir* 23 (2007) 12959–12965.
- [31] D.F. Kelly, P.D. Abeyrathne, D. Dukovski, T. Walz, The Affinity Grid: a pre-fabricated EM grid for monolayer purification, *J. Mol. Biol.* 382 (2008) 423–433.
- [32] D.F. Kelly, D. Dukovski, T. Walz, Monolayer purification: a rapid method for isolating protein complexes for single-particle electron microscopy, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105 (2008) 4703–4708.
- [33] C. Ozvegy-Laczka, R. Laczko, C. Hegedus, T. Litman, G. Varady, K. Goda, T. Hegedus, N.V. Dokholyan, B.P. Sorrentino, A. Varadi, B. Sarkadi, Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 26059–26070.
- [34] C.O. Sorzano, R. Marabini, J. Velazquez-Muriel, J.R. Bilbao-Castro, S.H. Scheres, J. M. Carazo, A. Pascual-Montano, XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy, *J. Struct. Biol.* 148 (2004) 194–204.
- [35] A. Pascual-Montano, L. Donate, M. Valle, M. Barcena, R. Pascual-Marqui, J.M. Carazo, A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particle images, *J. Struct. Biol.* (2001) 233–245.
- [36] M. Chami, E. Steinfelds, C. Orelle, J.M. Jault, A. Di Pietro, J.L. Rigaud, S. Marco, Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*, *J. Mol. Biol.* 315 (2002) 1075–1085.
- [37] C. Ozvegy, T. Litman, G. Szakacs, Z. Nagy, S. Bates, A. Varadi, B. Sarkadi, Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 111–117.
- [38] C. Ozvegy, A. Varadi, B. Sarkadi, 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 (2002) 47980–47990.
- [39] A. Pozza, J.M. Prez-Victoria, A. Di Pietro, Overexpression of homogeneous and active ABCG2 in insect cells, *Protein Expr. Purif.* 63 (2009) 75–83.
- [40] A. Tamura, K. Wakabayashi, Y. Onishi, H. Nakagawa, M. Tsuji, Y. Matsuda, T. Ishikawa, Genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2: development of the standard method for functional validation of SNPs by using the Flp recombinase system, *J. Exp. Ther. Oncol.* 6 (2006) 1–11.
- [41] A. Amunts, O. Drory, N. Nelson, The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution, *Nature* 447 (2007) 58–63.
- [42] S. Scheuring, F. Francia, J. Busselez, B.A. Melandri, J.L. Rigaud, D. Levy, Structural role of PufX in the dimerization of the photosynthetic core complex of *Rhodospirillum rubrum*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3620–3626.
- [43] T. Litman, U. Jensen, A. Hansen, K.M. Covitz, Z. Zhan, P. Fetsch, A. Abati, P.R. Hansen, T. Horn, T. Skovsgaard, S.E. Bates, Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2, *Biochim. Biophys. Acta* 1565 (2002) 6–16.
- [44] R.J. Dawson, K.P. Locher, Structure of a bacterial multidrug ABC transporter, *Nature* 443 (2006) 180–185.
- [45] A. Ward, C.L. Reyes, J. Yu, C.B. Roth, G. Chang, Flexibility in the ABC transporter MsaA: Alternating access with a twist, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104 (2007) 19005–19010.
- [46] S.G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, Y.T. Trinh, Q. Zhang, I.L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding, *Science* 323 (2009) 1718–1722.
- [47] A. Tamura, M. Watanabe, H. Saito, H. Nakagawa, T. Kamachi, I. Okura, T. Ishikawa, Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport, *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 287–296.
- [48] W. Mo, J.T. Zhang, Oligomerization of human ATP-binding cassette transporters and its potential significance in human disease, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5 (2009) 1049–1063.
- [49] C.A. McDevitt, R. Collins, I.D. Kerr, R. Callaghan, Purification and structural analyses of ABCG2, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 57–65.
- [50] K. Wakabayashi, H. Nakagawa, T. Adachi, I. Kii, E. Kobatake, A. Kudo, T. Ishikawa, Identification of cysteine residues critically involved in homodimer formation and protein expression of human ATP-binding cassette transporter ABCG2: a new approach using the flp recombinase system, *J. Exp. Ther. Oncol.* 5 (2006) 205–222.
- [51] R.W. Robey, K.K. To, O. Polgar, M. Dohse, P. Fetsch, M. Dean, S.E. Bates, ABCG2: a perspective, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 3–13.
- [52] A. Telbisz, M. Muller, C. Ozvegy-Laczka, L. Homolya, L. Sente, A. Varadi, B. Sarkadi, Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 2698–2713.
- [53] A. Pal, D. Mehn, E. Molnar, S. Gedey, P. Meszaros, T. Nagy, H. Glavinas, T. Janaky, O. von Richter, G. Bathori, L. Sente, P. Krajcsi, Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321 (2007) 1085–1094.

ABCG2 Transports and Transfers Heme to Albumin through Its Large Extracellular Loop^{*[5]}

Received for publication, April 29, 2010, and in revised form, August 12, 2010. Published, JBC Papers in Press, August 12, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.139170

Elodie Desuzinges-Mandon, Ophélie Arnaud, Lorena Martinez, Frédéric Huché, Attilio Di Pietro, and Pierre Falson¹

From the ABC Transporters and Multidrug Resistance Laboratory, "Equipe Labellisée Ligue 2009," Institute of Protein Biology and Chemistry, Unité Mixte de Recherche 5086 CNRS-Université Lyon 1, IFR 128 Lyon, France

ABCG2 is an ATP-binding cassette (ABC) transporter preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. Due to its role in drug resistance, its expression has been correlated with a protection role against protoporphyrin IX (PPIX) accumulation in stem cells under hypoxic conditions. We show here that zinc mesoporphyrin, a validated fluorescent heme analog, is transported by ABCG2. We also show that the ABCG2 large extracellular loop ECL3 constitutes a porphyrin-binding domain, which strongly interacts with heme, hemin, PPIX, ZnPPIX, CoPPIX, and much less efficiently with pheophorbide a, but not with vitamin B12. K_d values are in the range 0.5–3.5 μM , with heme displaying the highest affinity. Nonporphyrin substrates of ABCG2, such as mitoxantrone, doxorubicin, and riboflavin, do not bind to ECL3. Single-point mutations H583A and C603A inside ECL3 prevent the binding of hemin but hardly affect that of iron-free PPIX. The extracellular location of ECL3 downstream from the transport sites suggests that, after membrane translocation, hemin is transferred to ECL3, which is strategically positioned to release the bound porphyrin to extracellular partners. We show here that human serum albumin could be one of these possible partners as it removes hemin bound to ECL3 and interacts with ABCG2, with a K_d of about 3 μM .

ABCG2 is a membrane protein belonging to the human ABC² transporter family (1). Also called breast cancer resistance protein (BCRP), it was discovered for conferring resistance to the anticancer drug mitoxantrone in breast cancer cell lines (2, 3). As other members of the family, it is involved in cell protection against xenobiotics, such as the anticancer drugs mitoxantrone, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), topotecan, and daunorubicin (4), as well as antiviral agents such

as HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (5). As expressed in the brain-blood barrier, intestine, and placenta (6, 7), it constitutes a critical target for both reversing multidrug resistance (4, 8–12) and increasing drug bioavailability (13, 14).

In mammals, heme (ferrous PPIX; see structure in supplemental Fig. S1) and hemin (ferric PPIX) play a central role in cell metabolism. Heme is the prosthetic group of several hemoproteins involved in oxygen sensing, cell respiration and metabolism, and cell growth (for a review, see Ref. 15), whereas hemin is a potent erythroid cell differentiation inducer (16–18). Free heme is toxic, leading to hemolysis, proteolysis, lipid peroxidation, reactive oxygen species generation, and vascular inflammatory disorders (19). Poorly soluble, heme and hemin require extracellular and intracellular carriers, such as albumin and hemopexin, which bind hemin with a K_d of 10^{-8} and 10^{-12} M, respectively (20–22). Several reports have pointed out the role of ABCG2 in porphyrin detoxification, initiated by a study of Jonker and colleagues who described in *Bcrp1*^{−/−} knock-out mice a marked sensitivity to the dietary chlorophyll-catabolite pheophorbide a and an accumulation of PPIX, the heme precursor in erythrocytes and plasma, leading to acute photosensitivity (23). ABCG2 is a hematopoietic stem cell marker (24), expressed at relatively high levels by immature human hematopoietic progenitors SP, 34⁺/38[−] or 34⁺/KDR⁺ populations (25). Levels of porphyrins are normally regulated by metabolic control mechanisms of their biosynthesis; however, ABCG2 was found to prevent PPIX accumulation in erythroid progenitor K562 cells submitted to hypoxic conditions of growth (26) and to regulate PPIX levels during erythroid differentiation (27). These data point toward a role of BCRP in porphyrin homeostasis and protection; however, the molecular mechanism by which porphyrins are transported and handled for controlling their toxicity remains unknown. In addition, although ABCG2 is recognized to export PPIX (26), its capacity to export either hemin or heme has not yet been demonstrated.

ABCG2 consists of a cytosolic nucleotide-binding domain fused to a transmembrane (TM) domain of six α -helices, giving an inverted domain organization by comparison to most other human ABC transporters (4). The minimal functional unit of ABCG2 is a homodimer (28–30). ABCG2 displays several topological and structural specificities, such as the presence of a large external loop, ECL3, located between TM5 and TM6. Approximately 70–80 residues long, ECL3 is large enough to constitute a full domain, although no specific role has been assigned to it. It contains three cysteine residues reported to be involved in both intermolecular (Cys⁶⁰³-Cys⁶⁰³) and intramolecular (Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸) disulfide bridges (31–34). ECL3 also

^{*} This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and University Lyon 1 (UMR5086). This work was also supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) Contracts ANR-06-BLANC-0420, ANR-06-PCVI-0019-01, and ANR-09-PIRI-0002-01, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), which funded the thesis of E. D.-M., and the Ligue Nationale Contre le Cancer Labelisation 2009.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S7, Table S1, and additional references.

¹ To whom correspondence should be addressed: IBCP, 7, passage du Vercors 69367 Lyon, France. Tel.: 33 4 3765 2916; Fax: 33 4 7272 2604; E-mail: p.falson@ibcp.fr.

² The abbreviations used are: ABC, ATP-binding cassette; BCRP, breast cancer resistance protein; FC12, foscholone 12; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; HSA, human serum albumin; NATA, N-acetyltryptophanamide; PPIX, protoporphyrin IX; TEV, tobacco etch virus; TM, transmembrane; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; ZnMP, zinc mesoporphyrin.

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

TABLE 1

Primer sequences for generating the H6ThTeECL3 fusion protein and to introduce single mutations as detailed in the text

Primer	5'–3' Sequence	Res. sites
P _{for}	AAAAAAAAACATATGAATCTTTATTTTCAGGGGGCATCTGGCTGTCATGGC	NdeI
P _{rev}	GGGGCTTGTGGAAGAATCACTAAGGATCCAATA	BamHI
H583A _{for}	GGATTTACGGCTTTGCAGGCCAATGAATTTTGGGACAAAACCTCTGC	
H583A _{rev}	GCAGAAGTTTGTCCCAAAATTCATTGGCCTGCAAAGCCGTAAATCC	
C603A _{for}	GCAACAGGAAACAATCCTGCCAATATGCAACATGTACTGGCGAA	
C603A _{rev}	TTCCGCAATACATGTTGCATAGTTGGCAGGATTGTTCTCTGTTGC	
Y605A _{for}	GCAACAGGAAACAATCCTTGTACGCCGCAACATGTACTGGC	
Y605A _{rev}	GCCAGTACATGTTGCGGCGTTACAAGGATTGTTCTCTGTTGC	

contains a conformational epitope recognized by the 5D3 monoclonal antibody (24), the interaction of which is prevented upon reduction of the intramolecular disulfide bridge Cys⁶⁰³–Cys⁶⁰³ (35), making 5D3 a powerful conformation-sensing tool.

In the present report, we hypothesized that ABCG2 should transport hemin out of the cell, which could be particularly critical in the early stages of hematopoiesis when it is overexpressed, and hemin plays a role in differentiation. We found that ABCG2 transports zinc mesoporphyrin (ZnMP), a validated fluorescent heme analog (36, 37). We also hypothesized that hemin, once exported by ABCG2, should be transferred to an extracellular protein through interaction with an accessible domain of ABCG2 such as ECL3, which could transitorily interact with hemin after membrane translocation. We expressed the ECL3 domain in *Escherichia coli* and purified it in a folded state, as checked by biophysical methods. It was especially found to be able to interact with the 5D3 mAb only when it was oxidized. ECL3 displayed a high affinity for some, but not all, porphyrins, especially for heme and hemin, whereas it does not bind any of the known nonporphyrin substrates and inhibitors of ABCG2. We also found that hemin, when bound onto ECL3, can be rapidly transferred to human serum albumin (HSA).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—The pET15b plasmid was from Novagen. The QuikChange site-directed mutagenesis kit was from Stratagene. Luria Bertani broth, isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside, and ampicillin were from Euromedex. Foscholine 12 (FC12) was from Anatrace. Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) and gel filtration resins and materials for chromatography were from GE Healthcare. An Amicon ultracentrifuge filter device was from Millipore. 5D3-phycoerythrin was purchased from Clinisciences. Other products were from Sigma. Heme was prepared by incubating 0.2 mM hemin with 10 mM dithionite for 1 h at room temperature; the nearly immediate reduction was visible by eye.

Cell Culture—K562 cells, either expressing or not human ABCG2, were kindly provided by Drs. Sheng Zhou and Albert Sorentino and used as described in Ref. 27. K562 cells were pelleted by centrifugation for 5 min at 200 × *g* and washed with fresh DMEM. After centrifugation, cells were suspended in 5 ml of DMEM and seeded at 200 μl/well in a 96-well plate. The medium was removed by centrifugation, and 100 μl of ZnMP (10 μM final) was added with or without 100 μl of Ko143 (1 μM final). Accumulation of ZnMP was allowed for 30 min at 37 °C. Cells were then washed with PBS and centrifuged and then incubated for 1 h with or without Ko143. They were maintained on ice until analysis by flow cytometry. ZnMP accumulation

was quantified with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences), excitation at 488 nm and emission at 575 nm.

Hemin-Agarose Pulldown Assays—Experiments were performed as previously described by Krishnamurthy *et al.* (26), using K562 cells either expressing or not ABCG2 (27). Cells were lysed as described, and 50 μg of proteins were incubated at room temperature for 15 min in the presence of 0–2 ng/μl 5D3 antibody and 500 nM hemin-agarose. After incubation, the resin was pelleted by centrifugation, and unbound material was withdrawn. Pellets were washed with 1 ml of lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mg/ml Triton X-100, and 50 mM Tris-Cl, pH 8.0), suspended in 20 μl of SDS sample loading buffer (38), and centrifuged at 10,000 × *g* for 2 min at 4 °C. Bound and unbound materials were analyzed on a 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane, and ABCG2 was then revealed with the BXP21 monoclonal antibody (1/500, Millipore).

Expression Constructs—The *bcrp1* gene encoding ABCG2, referenced as Q9UNQ0 at the UniProtKB/Swiss-Prot database, was used for constructs. The *E. coli* protein expression plasmid for producing ECL3, as displayed in Fig. 2, was constructed from alanine 562 to histidine 630 of the ABCG2 sequence by PCR using the plasmid pFastBac Dual-NinaA-BCRP (39), with the couple of forward and reverse primers P_{for} and P_{rev} displayed in Table 1. P_{for} included a NdeI restriction site and encoded a tobacco etch virus (TEV) site (40); P_{rev} included a BamHI restriction site. The PCR product was digested by NdeI and BamHI and inserted into the corresponding sites of the pET15b plasmid. The resulting plasmid pET15b-H₆ThTe-ECL3 expressed the ECL3 (A562–H630) domain fused at its N terminus to a His₆ tag through a thrombin site and a TEV site: MGSSHHHHHHSSGLVPRG/SHMNL^{YFQ}/GA⁵⁶²-**ABCG2-H⁶³⁰**, where both cleavage sites are underlined, the cleavage position is indicated by “/,” and the ECL3 sequence is indicated in bold and italic characters. The single-point mutations H598A, C603A, and Y608A were introduced by site-directed mutagenesis using the corresponding primers displayed in Table 1.

The plasmid used for expressing full-length ABCG2 in insect cells was described previously (39); here, we extended from 6 to 10 the length of the N-terminal histidine tag and added a thrombin cleavage site. The resulting sequence H¹⁰Th-ABCG2 was MAHHHHHHHHHHLPRGSGGMDSPPPSGLVPRGS-**S⁴-ABCG2-S⁶⁵⁵**.

Expression and Purification of ECL3—The BL21(DE3) *E. coli* bacteria strain was transformed with the expression plasmid pET15b-H₆ThTe-ECL3 including wild-type or mutated sequences. A single colony of freshly transformed cells was grown overnight at 37 °C in 5 ml of Luria Bertani broth contain-

ing 100 mg/liter ampicillin and then diluted into 2 liters of the same medium. The culture was incubated at 37 °C and shaken at 220 rpm until reaching an $A_{600\text{ nm}}$ of 0.6. Protein expression was then induced by addition of 0.5 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside and continued for 3 h under the same conditions. TEV was expressed with the pRK793 plasmid, kindly given by Dr. David S. Vaugh (NCL, National Institutes of Health, Frederick, MD).

After expression of either wild-type or mutated ECL3, bacteria were harvested by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min. The pellet was suspended in 20 ml of 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 100 mM NaCl. Cells were disrupted by using a French press, and 2 M NaCl was added to the medium, which was shaken for 20 min at room temperature and then centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min, at 4 °C, resulting in supernatant S1 and pellet P1 (see Fig. 2B). The pellet was suspended in 5 ml of 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 29 mM FC12 and incubated for 1 h at room temperature under mild shaking. The solution was then centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C, generating supernatant S2 (see Fig. 2B) which was loaded onto a 1-ml nickel Hi-trap chelating HP column previously equilibrated with 10 ml of 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM DTT, and 14.2 mM FC12. The resin was washed in two steps with 10 ml and 4 ml of the same buffer, lowering the FC12 concentration to 2.8 mM during the second step. The protein was eluted in 5 ml of the latter buffer with a linear gradient of 0–0.5 M imidazole. The pool of protein was concentrated with an Amicon ultracentrifuge filter device, cutoff 3,000 Da, and loaded onto a Superdex-200 gel filtration 10/300 column, equilibrated with 50 mM NaH_2PO_4 , 2.8 mM FC12. Fractions of about 5–20 μg of protein were checked for homogeneity on a 10% Tricine SDS-PAGE, after half-dilution in a 2 $\times$ SDS sample buffer (38) and incubation for 20 min at room temperature before electrophoresis. Fractions of interest were pooled and incubated overnight at 4 °C to allow thiol oxidation to occur. Protein concentration was determined by measuring $A_{280\text{ nm}}$, using a molar extinction coefficient of $29,520\text{ liters}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Bovine thrombin was added at a ratio of 10 units/mg of protein for removing the His₆ tag and incubated for 5 h at room temperature. The efficacy of cleavage was checked by Tricine SDS-PAGE (see Fig. 2B). The His₆ tag peptide was removed by a Ni-NTA-agarose column equilibrated with 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 150 mM NaCl, 2.8 mM FC12. Thrombin was removed on a 1-ml *p*-aminobenzamidine-agarose resin equilibrated with the same buffer.

Expression and Purification of ABCG2—ABCG2 was expressed in Hi5 cells as described in Ref. 39. All subsequent steps were performed at 4 °C. Cells were harvested by centrifugation at $5,000 \times g$ for 10 min, and the pellet was suspended (7 ml/liter of culture) in PBS and centrifuged again. Cells were then suspended (25 ml/liter of culture) in 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 200 μM DTT, 1 mM MgCl_2 , protease inhibitors, and incubated for 1 h. Cells were disrupted by using a tight-fitting Dounce homogenizer and then centrifuged at $15,000 \times g$ for 1 h. The resulting pellet was suspended (500 μl /liter of culture), in 10 mM HEPES, pH 8.0, 50 mM NaCl, 20% glycerol, 100 μM DTT, 1 mM EDTA, protease inhibitors, and stored in liquid nitrogen. The protein concentration was about 40 mg/ml, estimated by the bicinchoninic acid (BCA) method (41).

Membrane suspension was thawed, diluted to 10 mg/ml in 50 mM HEPES, pH 8.0, 2 M NaCl, 15% glycerol, 2 mM DTT, protease inhibitors, and incubated for 1 h before centrifugation at $15,000 \times g$ for 1 h. The resulting pellet was suspended in 50 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 15% glycerol, 40 mM dodecyl β -D-maltoside, 0.2 mM DTT, 20 mM imidazole, protease inhibitors, then incubated for 2 h and centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h. The supernatant was applied to HiTrap chelating HP 1-ml column loaded with Ni^{2+} and equilibrated in 50 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 15% glycerol, 10 mM dodecyl β -D-maltoside, 20 mM imidazole, protease inhibitors. The resin was washed with 16 bed volumes with the same buffer, and ABCG2 was eluted in the same buffer with a 0.02–1 M imidazole gradient. The protein was concentrated using an Amicon Ultra-15 concentrator device 50-kDa cutoff. The His₁₀ tag was removed by thrombin cleavage as described above.

Absorbance Spectroscopy—A saturated solution of hemin was prepared by solubilizing about 10 mg in 100 μl of fresh 0.1 M KOH, followed by a dilution in 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.2, 100 mM NaCl. The solution was clarified by centrifugation at $11,000 \times g$ for 3 min, and hemin concentration was determined at 385 nm using an extinction coefficient of $58,400\text{ liters}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (42). For assays, samples of 10 μM protein were subjected to UV-visible absorbance spectroscopy at room temperature on a DU 640 (Beckman) spectrophotometer, using 50 mM NaH_2PO_4 , 2.8 mM FC12 buffer as blank. Spectra were recorded between 240 and 700 nm using a 1-cm path length cuvette, in a hemin concentration range of 0–50 μM . Difference spectra were obtained by subtracting the buffer spectrum from that of the protein-hemin complex. Spectra were normalized at 280 nm.

Ni-NTA-Agarose Pulldown Assays—Fifty microliters of Ni-NTA magnetic beads were equilibrated with $3 \times 1\text{ ml}$ of 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 150 mM NaCl, 0.1% FC12 and then incubated with 200 μg of H₆ECL3/100 μl (20 nmol) for 30 min 4 °C and mild agitation. The beads were washed three times with 600 μl of the same buffer, and the amount of unbound protein was quantified by the BCA method. H₆ECL3 beads were loaded on a BioSprint 15 robot (Qiagen) to carry out the binding of hemin by incubating beads in 500 μl of 50 μM hemin in the same buffer for 20 min at room temperature. The incubation was followed by three washing steps with 500 μl of the same buffer containing 300 mM NaCl. The protein was eluted in 50 μl of the same buffer containing 300 mM NaCl and 300 mM imidazole. The amount of eluted protein and hemin were quantified by the BCA method and by absorbance, respectively. Bound and unbound materials were analyzed on a 16% SDS-PAGE and revealed by Coomassie Blue staining.

Circular Dichroism (CD)—Far-UV CD of purified ECL3 was performed on a Chirascan (Applied Photophysics). Spectra were recorded at room temperature using a 1-mm path length cuvette from 260 to 185 nm, with a step size of 1 nm. Spectra were recorded in the 190–250-nm wavelength range with a 0.2-nm increment, a bandwidth of 0.5 nm, and a 1-s integration time. Spectra were processed, corrected for baseline, and smoothed by Chirascan software on the basis of the Savitzky-Golay algorithm. The percent secondary structure was calculated by deconvoluting data via the DichroWeb site (43) using methods developed by Provencher and Glockner (44), K2d (45), CDSSTR and a SELCON (46).

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

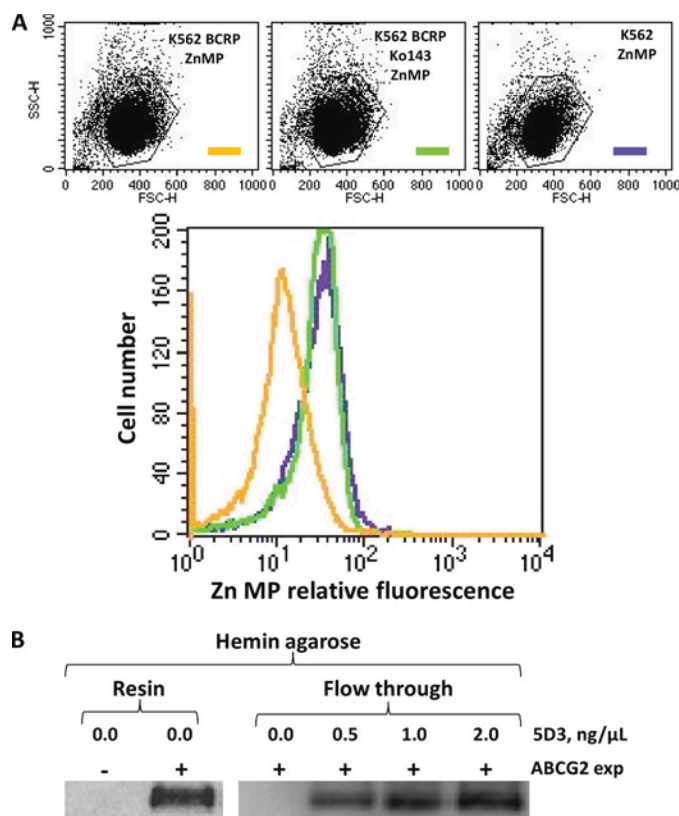


FIGURE 1. Efflux of the heme analog Zn mesoporphyrin (ZnMP) by ABCG2-expressing cells, and decrease of ABCG2 binding to hemin-agarose by the 5D3 mAb raised against ECL3. *A*, ABCG2-expressing K562 cell transport of ZnMP (orange) compared with K562 control cells (green). Addition of the specific ABCG2 inhibitor Ko143 (1 μM) blocks the efflux of ZnMP (violet). *B*, modulation by the 5D3 mAb of *in vitro* ABCG2 binding to hemin-agarose. Whole cell lysates were subjected to a pull-down assay with hemin-agarose in the absence (Resin) or presence of increasing concentrations of 5D3 mAb increasing the amount of unbound ABCG2 (Flow through).

Fluorescence Spectroscopy—Experiments were performed at room temperature using a Photon Technology International Quanta Master I spectrofluorometer. All measurements were recorded in 500-μl quartz cuvettes (Hellma) of 0.5-cm path length. Data were corrected for buffer and the contribution to fluorescence and inner-filter effects of tested ligands by collecting the same spectra with *N*-acetyltryptophan (NATA). ECL3 (3 μM) in 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 2.8 mM FC12, 20% glycerol, or ABCG2 (0.1 μM) in 50 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 15% glycerol, 10 mM dodecyl β-D-maltoside, 1.6 mM CHAPS, was excited at 295 nm, and the fluorescence emission was scanned from 310 to 370 nm. The concentration-dependent quenching studies for the different ligands (0–15 μM) were performed at least three times. Peak areas of corrected fluorescence spectra were fitted with the SigmaPlot software (version 11; Systat Software). Percentages of fluorescence quenching were calculated as a ratio of protein to NATA. Data were fitted assuming one binding site with different possible equations, as indicated,

$$f = B_{\max} \cdot \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x)) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$f = F_{\min} + ((F_{\max} - F_{\min}) \cdot ((E + x + K_d) - \text{SQRT}((E + x + K_d)^2 - 4 \cdot E \cdot x))) / (2 \cdot E) \quad (\text{Eq. 2})$$

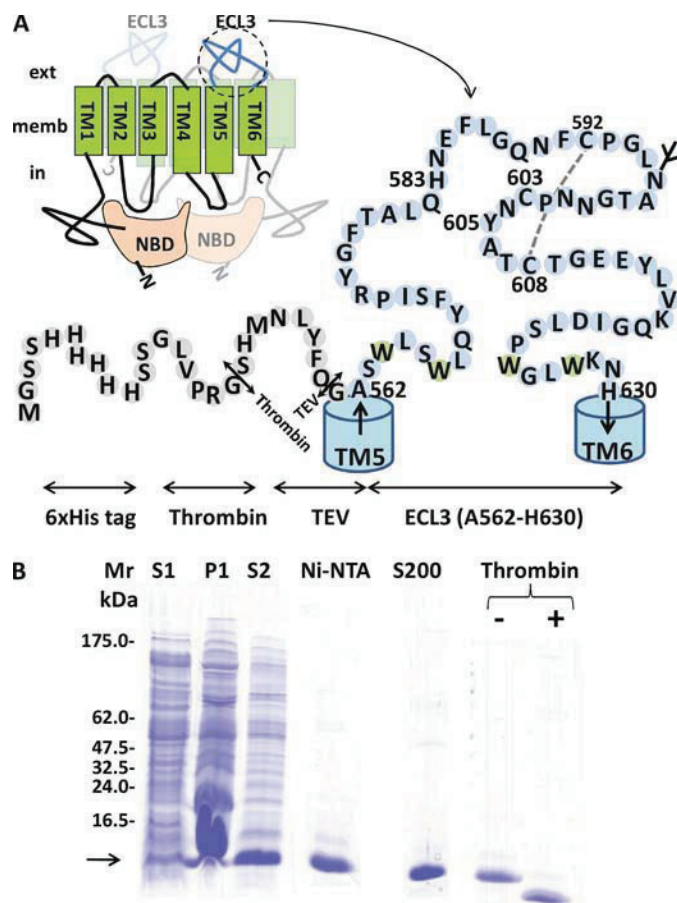


FIGURE 2. ECL3 design, expression, and purification. *A*, ECL3 localized between TM spans 5 and 6 extends from Ala⁵⁶² to His⁶³⁰. It was fused to a His₆ N-terminal tag followed by thrombin (Th) and TEV (Te) proteolytic cleavage sites, resulting in a fusion protein of 10,886 Da. The glycosylation site (in mammals) and disulfide bridge between Cys⁵⁹² and Cys⁶⁰⁸ are indicated. *B*, Tricine SDS-PAGE is used to monitor expression and purification of ECL3. S1 and P1 correspond to the supernatant and pellet fractions obtained at low speed centrifugation of bacteria overexpressing the fusion protein. S2 corresponds to the soluble fraction after FC12 solubilization of P1. Ni-NTA and S200 correspond to ECL3 eluted from each resin. The protein was finally digested by thrombin (+ Thrombin) to remove the tag.

(47). Equation 2 takes into account the residual enzyme concentration and gives a better estimation of the K_d when substrate and enzyme concentration are close, but leads to error values in the same range.

$$f = B_{\max} \cdot \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x) + N_s \cdot x) \quad (\text{Eq. 3})$$

which introduces a correction factor for unspecific binding.

Primary Structure Alignment—Primary structure alignments were performed with Clustal (48), carried out via the NPS@ bioinformatic server.

RESULTS

ZnMP Transport by ABCG2 in K562 Cells and Modulation by the 5D3 mAb of *in Vitro* ABCG2 Binding to Hemin-Agarose—Because ABCG2 was shown to transport PPIX out of stem cells submitted to hypoxia (26), we hypothesized that the transporter could also be able to transport heme or hemin, which correspond to ferrous and ferric PPIX (see the corresponding chemical structure in supplemental Fig. S1). The experiment was carried out with erythroid K562 cells either transfected or

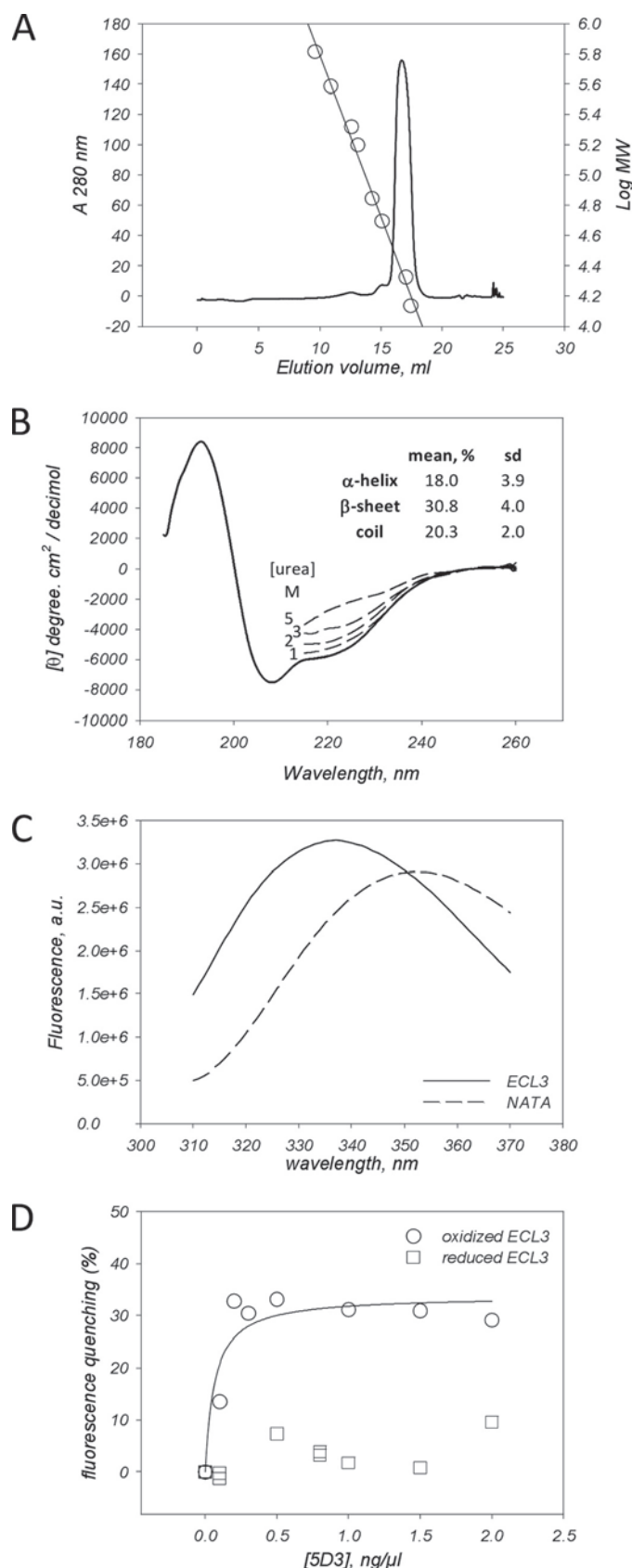


FIGURE 3. ECL3 recombinant domain is folded and recognized by the conformational epitope recognizing 5D3 mAb. *A*, gel filtration on a Superdex-200 10/300 column of ECL3. The column was calibrated with molecular mass markers (right y log axis, circles) thyroglobulin (650 kDa), ferritin (380 kDa), catalase (210 kDa), aldolase (160 kDa), albumin (70 kDa), ovalbumin (50 kDa),

not with the cDNA encoding ABCG2 (27), following the transport of the fluorescent ZnMP. Note that although ZnMP is a validated hemin analog (36, 37), its central zinc atom cannot coordinate with protein residues such as histidine in the same way as the iron atom in heme (49).

As shown in Fig. 1A, ZnMP accumulated in K562 control cells (green), whereas they remained at a lower level in cells expressing ABCG2 (orange). However, the latter showed the same level of accumulation as observed in control cells when incubated with 1 μ M ABCG2 inhibitor Ko143 (50). Hemin and heme being rather cytotoxic, especially heme as due to the ferrous state of bound iron (15), we hypothesized that their efflux could require an intermediate transfer to a carrier via an extracellular domain of ABCG2, fully accessible to this carrier. ABCG2 indeed displays such a domain, which has been shown to interact with the 5D3 mAb (35). As a first experiment to test whether or not ECL3 could play such a role in heme/hemin transfer, we took advantage of the known capacity of the protein to bind *in vitro* onto hemin-agarose (26) to check whether 5D3 binding could alter domain interaction with the affinity column. Results are displayed in Fig. 1B. As shown on the left, ABCG2 expressed in K562 cells (Resin/0.0/+) could fully bind to the hemin-agarose resin, compared with control cells (Resin/0.0/-), no protein remaining in the flow-through fraction as shown in the right (Flow through/0.0/+). Addition of increasing amounts of 5D3 before incubation with the resin indeed prevented the binding of ABCG2 onto hemin-agarose; the protein accumulated in the flow-through fraction proportionally to the amount of added mAb. By revealing an antagonist effect between 5D3 binding onto ECL3 and ABCG2 binding onto hemin-agarose, this experiment suggested a heme-binding capacity of ECL3.

ECL3 Constitutes an Autonomously Folded Domain—To further check the capacity of ECL3 itself to bind heme/hemin separately from the transport sites, we studied ECL3 as an isolated and purified domain, hypothesizing that it should be long enough to fold accurately when expressed alone. Using primary structure alignments, we selected the region extending from alanine 562 to histidine 630 as possible N and C termini of such a domain. These limits are close to those recently reported from various predictions, Trp⁵⁶⁷-Trp⁶²⁷ (51), Leu⁵⁶⁵-Asn⁶²⁹ (52), or Ser⁵⁶³-Gly⁶¹⁸ (35). We noted the amphipathic character of both pairs of tryptophan residues 564–567, 624–627, located at each extremity of ECL3 and likely favoring the anchoring of the loop onto the membrane, rather than belonging to the TM helices 5 and 6. We generated a chimera including a His₆ tag followed by thrombin and TEV (40) endoprotease cleavage sites at the N terminus of ECL3, which were inserted for later removing the nickel affinity tag after purification because histidine residues might be potential hemin ligands. The resulting fusion protein (Fig. 2A) was produced in *E. coli* and then purified as

chymotrypsinogen A (21 kDa), and ribonuclease (14 kDa), fitting the elution volume data with SigmaPlot. *B*, CD spectra of ECL3. The spectrum was fitted for estimating the percentage of each two-dimensional structure (see "Experimental Procedures"). The same experiment was done by adding 1–5 M urea (dashed lines). *C*, fluorescence spectra of ECL3 (straight line) and NATA (dashed line). *D*, intrinsic fluorescence quenching of ECL3 (1.5 μ M), either oxidized (circles) or reduced (squares), by the 5D3 mAb, as measured at 336 nm and fitted with SigmaPlot using Equation 1.

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

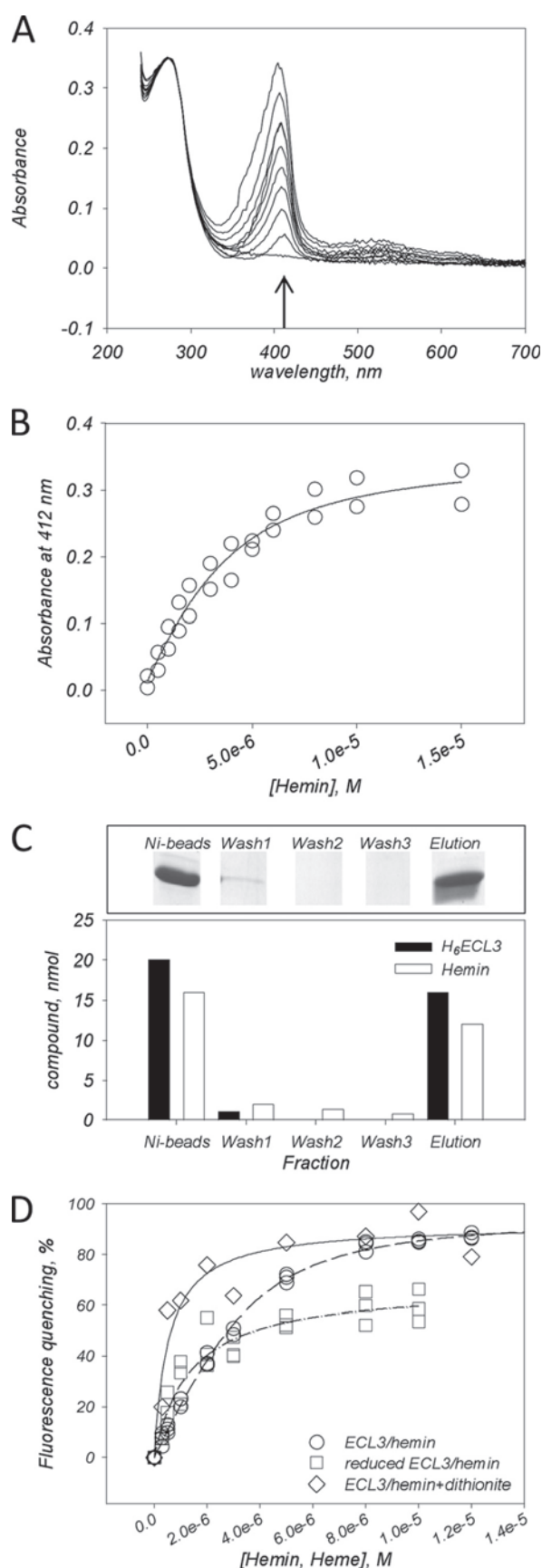


FIGURE 4. Hemin and heme binding to ECL3 as monitored by UV absorbance, pull-down assay, and intrinsic fluorescence. A, UV-visible, corrected and normalized, spectra of oxidized hemin (0–15 μM) in the presence of ECL3

displayed in Fig. 2B. ECL3 was abundant in the insoluble fraction P1 (arrow in B) and was solubilized with FC12 (lane S2), showing that the domain, as designed, still displayed a significant hydrophobic character. The domain was then purified by nickel affinity and gel filtration chromatographies (lanes Ni-NTA, S200), reducing the detergent concentration to 3 mM, a value roughly equivalent to twice the critical micellar concentration. Reducing this concentration below the critical micellar concentration led to protein aggregation, indicating that detergent is required for maintaining the domain in solution. DTT was added during the solubilization step and then removed during the chromatographic steps for favoring the formation of the Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ disulfide bridge, which occurred during overnight incubation at 4 °C. Later, thiol titration with Ellman's reagent (53) showed that one thiol remained free after this step. Thrombin fully digested the protein (lane Thrombin +) generating a protein that migrated at a position compatible with the predicted molecular mass of 8,945 Da. TEV could never cut, which might be due to the presence of detergent as reported before (54). ECL3 was finally purified by repeating both chromatographic steps and adding one for removing thrombin.

We next examined the folding of ECL3. As shown, the protein was eluted from a S200 10/300 gel filtration at 16.7 ml (Fig. 3A), corresponding to an apparent molecular mass of 23 kDa. Taking into account the presence of detergent micelles, this value is compatible with monomeric ECL3 (~9 kDa) embedded inside a FC12 micelle (350 g/mol $\times$ ~40 molecules = 14 kDa). The CD spectrum of the domain (Fig. 3B) was typical of a $\alpha + \beta$ polypeptide which, once deconvoluted, gave the average values of α -helix, β -sheet, and coil which are indicated in the inset. Increasing concentrations of urea induced a progressive loss of secondary structure. Intrinsic fluorescence of the domain (Fig. 3C), which contains four tryptophan residues (Fig. 2A), was also typical of a folded protein in which these tryptophan residues are buried, giving a maximal emission wavelength of 336 nm, much lower than the 354-nm value obtained with NATA used as a control. A further convincing result came from the capacity of the recombinant domain to interact with the 5D3 mAb (24), which has been raised against ECL3 and is sensitive to the oxidized state of the thiol bridge Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ (35). As shown in Fig. 3D, the addition of increasing amounts of the 5D3 mAb quenched the tryptophan fluorescence and led to a saturation curve (circles), allowing us to estimate a K_d value of 0.06 ± 0.03 ng/ μl , i.e. 4 ± 2 nM (all K_d values are summarized in supplemental Table S1), assuming an average IgG molecular mass of 150,000 Da. Because the binding of 5D3 was reported to be prevented upon reduction of the Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ disulfide

(3 μM). B, plot of the absorbance values at 412 nm (arrow in A) of hemin as a function of hemin concentration. C, pull-down assays of the hemin-H₆ECL3 complex. The experiment was carried out as described under "Experimental Procedures," leading to different fractions: Ni-beads, hemin-H₆ECL3 complex bound to Ni-NTA magnetic beads; Wash 1–3, magnetic bead washing steps; Elution, imidazole elution step of hemin-H₆ECL3 complex. Fractions were loaded on a 16% SDS-PAGE (upper panel), and protein (black bars) and hemin (white bars) amounts were quantified (lower panel). D, intrinsic fluorescence quenching of ECL3 (1–3 μM) with hemin (0–14 μM , circles) and heme as generated by dithionite reduction (0–14 μM , diamonds). Squares correspond to the interaction of hemin with reduced ECL3. Data were fitted using Equation 2 (see "Experimental Procedures").

bridge (35), we reproduced a similar experiment with the reduced form of ECL3 (*squares*). As shown, the intrinsic fluorescence of reduced ECL3 was not modified by the mAb addition, suggesting no interaction. These experiments show that the ECL3 domain is self-folded and adopts a three-dimensional structure relevant to the same region within the native full-length ABCG2 transporter.

ECL3 Specifically Binds Porphyrins—We first monitored the binding of hemin (see the structure of each tested compound in [supplemental Fig. S1](#)) by absorbance, following the evolution of the Soret peak at 412 nm which appears in the presence of ECL3 (Fig. 4A). The interaction led to an increase in absorbance at this wavelength when increasing the hemin concentration. The absorbance values, plotted in Fig. 4B, gave a saturation curve from which a K_d of $1.33 \pm 0.72 \mu\text{M}$ was estimated (K_d values are summarized in [supplemental Table S1](#)), assuming one hemin bound per domain. This binding ratio was confirmed experimentally by pulldown experiments as displayed in Fig. 4C using Ni-NTA magnetic beads (see “Experimental Procedures”). Results show that 20 nmol of ECL3 bound to the beads binds 16 nmol of hemin, whereas after washing, elution leads to the removal of 16 nmol of ECL3 and 12 nmol of hemin. Both ratios suggest that up to one hemin binds to the domain. The ECL3-hemin interaction was also monitored by intrinsic fluorescence, leading to similar results (Fig. 4D, *circles*) with a K_d of $0.88 \pm 0.18 \mu\text{M}$. As shown, the maximal quenching of intrinsic fluorescence was approximately 90%. When hemin iron, present as a ferric state Fe^{3+} , was reduced by dithionite to ferrous state, Fe^{2+} , as in heme, a higher maximal quenching of intrinsic fluorescence was observed (Fig. 4D, *diamonds*), and the K_d of $0.47 \pm 0.40 \mu\text{M}$ indicated a 2-fold higher affinity than for the oxidized form. We also monitored hemin binding to the reduced form of ECL3 (Fig. 4D, *squares*) which led to a similar saturation curve, although despite a lower maximal quenching (60%), the K_d of $1.03 \pm 0.69 \mu\text{M}$ was close to that obtained with oxidized species. This suggested that reduction of the Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ disulfide bridge does not dramatically alter hemin binding.

We then examined the interaction of other porphyrins, such as PPIX, ZnPPIX, CoPPIX, pheophorbide a, and vitamin B12, with ECL3. As shown in Fig. 5A, binding of PPIX when monitored by quenching of intrinsic fluorescence led to a saturation curve (*circles*) reaching about 80% and giving a K_d of $1.21 \pm 0.71 \mu\text{M}$. The same experiment carried out after reduction of ECL3 also led to a saturation curve of fluorescence quenching (*squares*), giving a K_d of $3.40 \pm 0.01 \mu\text{M}$. ZnPPIX, which usually reaches a high level in ferropenic anemia, as well as CoPPIX, were found to bind efficiently to ECL3, as shown in Fig. 5B (*circles* and *squares*, respectively), with respective K_d values of $0.80 \pm 0.01 \mu\text{M}$ and $0.71 \pm 0.38 \mu\text{M}$. By contrast to these porphyrins, we observed a much reduced interaction of pheophorbide a (Fig. 5B, *triangles*), producing only 30% of maximal quenching, with a high K_d value of $3.42 \pm 0.50 \mu\text{M}$. No change at all of ECL3 intrinsic fluorescence was observed upon addition of either another porphyrin-type molecule, vitamin B12 ([supplemental Fig S2A](#)), which is not an ABCG2 substrate (55), or bilirubin, a product of heme catabolism ([supplemental Fig S2B](#)).

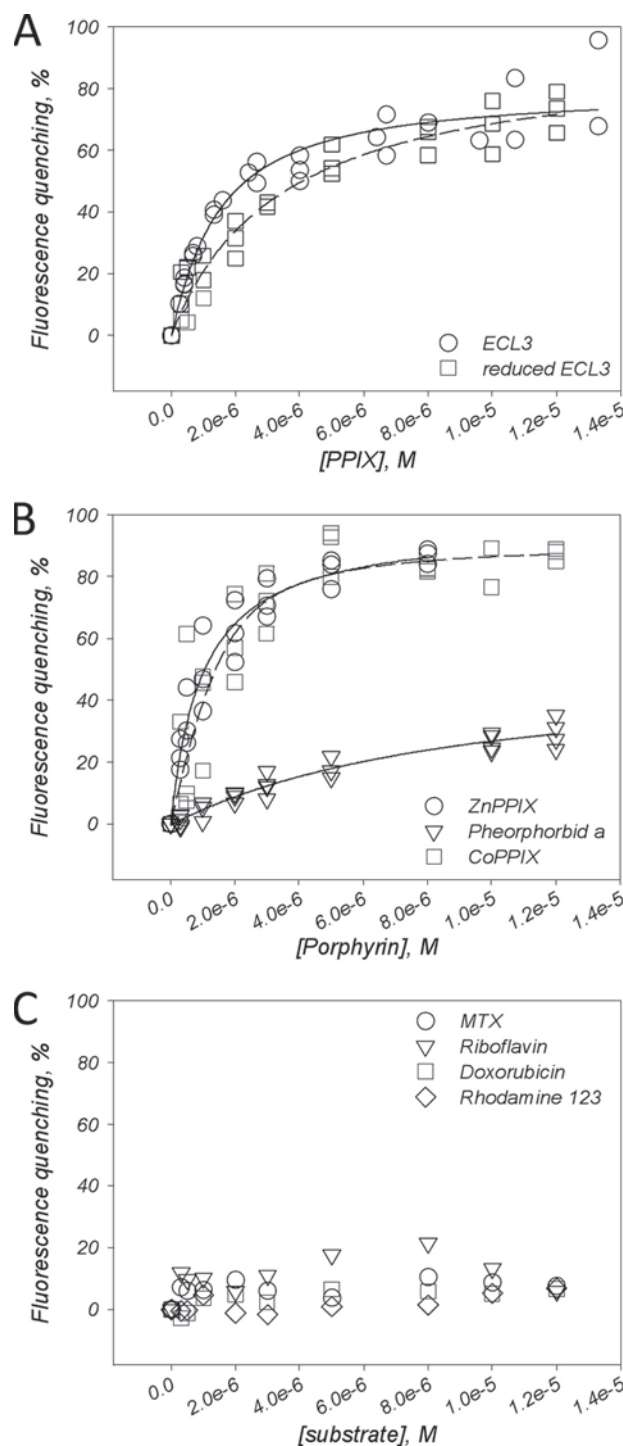


FIGURE 5. Binding of porphyrin and nonporphyrin substrates to ECL3, as monitored by quenching of intrinsic fluorescence. A, binding of PPIX to ECL3, either oxidized (*circles*) or reduced (*squares*). B, binding of ZnPPIX (*circles*), CoPPIX (*squares*), and pheophorbide a (*triangles*) to oxidized ECL3. C, Interaction of mitoxantrone (*circles*), doxorubicin (*squares*), rhodamine 123 (*diamonds*), and riboflavin (*triangles*) with ECL3. Experiments were carried out and analyzed as described in the legend of Fig. 4D.

Finally, we measured the binding of nonporphyrin substrates of ABCG2, such as mitoxantrone (3) and riboflavin (56), and other drugs that bind to ABCG2 but are not transported, such as doxorubicin and rhodamine 123 (12). Results are displayed in Fig. 5C; as shown, all these compounds did not modulate the intrinsic

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

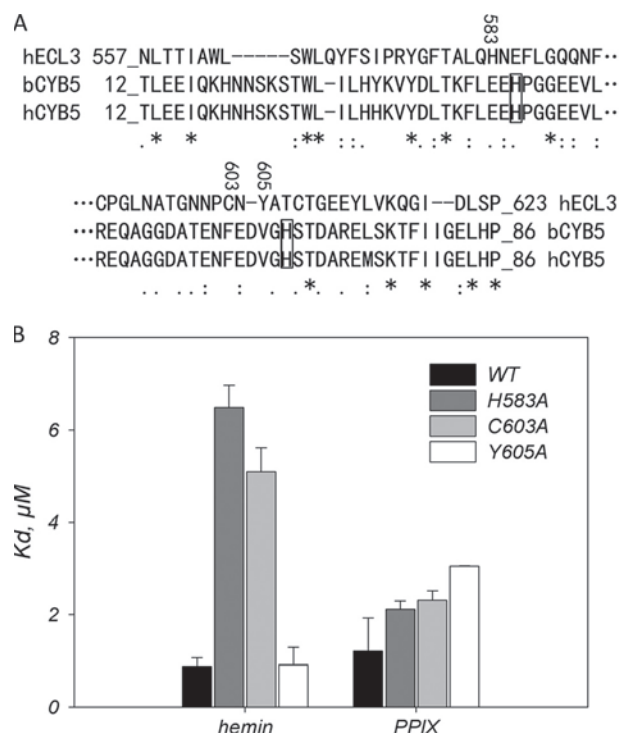


FIGURE 6. Single-point mutations H583A and C603A, but not Y605A, in ECL3 dramatically alter hemin binding but hardly affect PPIX binding. *A*, primary structure alignment of ECL3 with the heme-binding domain of cytochrome *b*₅. The score of homology is as follows: asterisk, identity; colon, strong similarity; period, weak similarity; no symbol for no similarity. Histidine residues of cytochrome *b*₅ involved in iron chelation are boxed. The residues His⁵⁸³, Cys⁶⁰³, and Tyr⁶⁰⁵, which are replaced by an alanine by site-directed mutagenesis, are numbered. *B*, dissociation constants for hemin and PPIX binding to H583A, C603A, and Y605A mutant ECL3. Values are taken from the fit of data displayed in supplemental Fig. S3 and summarized in supplemental Table S1.

fluorescence of ECL3, suggesting no interaction with the domain. We observed that the dual inhibitor of ABCG2 and ABCB1, GF120918, was able to bind but with very low affinity (K_d of $8 \pm 6 \mu\text{M}$) and unspecific contribution (supplemental Fig. S2C).

Single-point Mutations H583A and C603A of ECL3 Alter Hemin Binding—We noticed that ECL3 displays a significant sequence similarity with the heme-binding domain of cytochrome *b*₅, with 14.3% identity and 15.6% similarity, as shown in Fig. 6A. The alignment showed, in addition, that residues His⁵⁸³, Cys⁶⁰³, and Tyr⁶⁰⁵ of ECL3 are close to the histidine residues of cytochrome *b*₅ (boxed in Fig. 6A) which are involved in the strong chelation of hemin iron. We mutagenized these residues into alanine and monitored by intrinsic fluorescence the binding capacity of the mutant proteins toward hemin and PPIX. The quenching curves are displayed in supplemental Fig. S3 and summarized in Fig. 6B. As shown, the most striking differences were observed for hemin binding because the H583A and C603A mutations lowered the binding affinity 5–6-fold. In contrast, the binding of PPIX was hardly affected by the same mutations. These differences suggest that iron may be involved in hemin binding.

ABCG2 First Saturated with Mitoxantrone or Doxorubicin Binds Hemin but Not Pheophorbide a—We then checked whether porphyrins could bind to ECL3 within the whole ABCG2 transporter. A preliminary binding experiment of hemin alone on ABCG2 probed by intrinsic fluorescence was

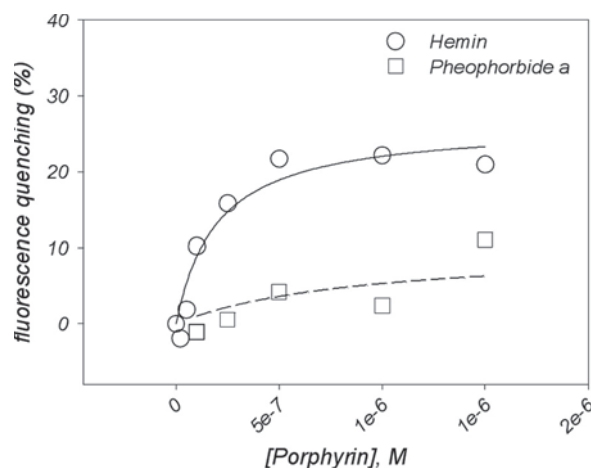


FIGURE 7. Effect of previous saturation of ABCG2 drug-binding sites by drug substrates on the ability to bind other substrates further. The full-length transporter was expressed and purified, and fluorescence quenching experiments were carried out as detailed under “Experimental Procedures.” ABCG2 (0.1 μM) was preincubated with 5 μM mitoxantrone and doxorubicin before addition of hemin (circles) or pheophorbide a (squares). Fluorescence experiments were carried out and analyzed as detailed in the legend of Fig. 3C.

carried out (supplemental Fig. S4), leading to an apparent K_d of $0.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Because the protein contains more than one transport site in the membrane region to which porphyrins such as pheophorbide a (23) or PPIX (26) bind, we saturated these transport sites with nonporphyrin substrates, such as mitoxantrone and doxorubicin, which additionally do not bind to ECL3, as shown in Fig. 5C. The whole ABCG2 transporter was expressed in insect cells, solubilized in β -D-dodecyl maltoside and purified as previously described (12, 39) and detailed here under “Experimental Procedures.” ABCG2 (0.1 μM) was first incubated with 5 μM mitoxantrone or doxorubicin, a concentration large enough to saturate the transports sites, based on the respective K_d values of 0.9 and 1.6 μM previously reported (12). Then, increasing concentrations of hemin (Fig. 7, circles) or pheophorbide a (Fig. 7, squares) were added and their effects monitored by intrinsic fluorescence quenching. As shown, hemin induced a fluorescence quenching of about 25%, leading to a saturation curve from which a K_d value of $0.19 \pm 0.07 \mu\text{M}$ could be estimated, two times better than for isolated ECL3. On the contrary, a much poorer interaction was detected with pheophorbide a ($K_d > 8 \mu\text{M}$), suggesting no additional binding site for the compound.

HSA Removes Hemin Bound to the ECL3 Domain or ABCG2—The fact that ECL3 is extracellularly located and binds hemin and related porphyrins makes it potentially able to interact with serum hemin-binding proteins such as HSA and hemopexin (20, 21). Both proteins bind hemin with a K_d of 10^{-8} and 10^{-12} M, respectively (20–22) (see also supplemental Fig. S5) and have been reported to be involved in heme homeostasis (22). In the present study we have tested such a possible interaction with HSA and the transfer of hemin from ECL3/ABCG2 to that serum protein. Results are displayed in Fig. 8. In a first experiment, we monitored the binding and release of hemin by recording the intrinsic fluorescence of ECL3 (Fig. 8A). As shown, the addition of 2 μM hemin to 3 μM ECL3 induced a fast fluorescence quenching (dark trace) of about 50–60% as

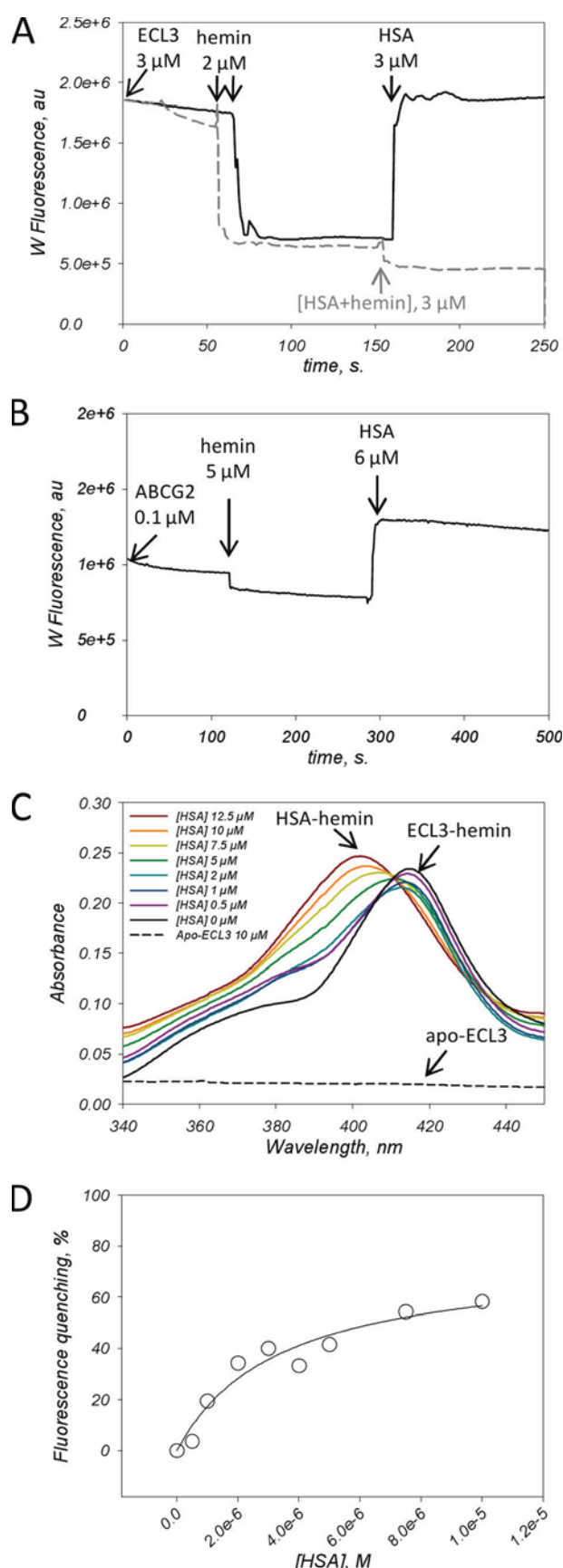


FIGURE 8. Hemin transfer from ECL3 to HSA. A, intrinsic fluorescence of ECL3 (3 μ M) was recorded with time before and after addition at the indicated times of 2 μ M hemin, and then 3 μ M HSA, either alone (black trace) or

expected from Fig. 4D. In addition, the fluorescence signal remained stable with time after the addition of hemin (see the *dark trace* e.g. between 100 and 150 s), indicating that the hemin is stably bound to the domain. Further addition of 3 μ M apoHSA fully reverted ECL3 fluorescence to its initial level, as quickly as for hemin binding, indicating that hemin was released from the domain. Note that the intrinsic fluorescence signal of ECL3 was corrected from the contribution of HSA as detailed in supplemental Fig. S6. The addition of a preformed HSA·hemin complex at the same concentration did not modify the fluorescence of the ECL3·hemin complex (*dashed gray trace* in Fig. 8A), indicating no change in hemin interaction with ECL3. The same type of experiment was carried out using the whole ABCG2 preloaded with mitoxantrone and doxorubicin, as described above. As displayed in Fig. 8B, comparable results were obtained, with, however, a larger increase of ABCG2 fluorescence signal upon addition of HSA. These experiments suggested that hemin is released from ECL3 upon addition of HSA. We then monitored the absorbance of hemin bound to ECL3 in the presence of increasing concentrations of HSA. As shown in Fig. 8C, addition of 5 μ M hemin to 10 μ M apo-ECL3 (*dashed black trace*) generated the expected Soret peak at 412 nm of the ECL3·hemin complex (*dark trace*), with the addition of two shoulders at 360 and 385 nm corresponding to 1 μ M unbound hemin. Despite this, upon addition of HAS, the peak at 412 nm decreased, even at low (0.5–1 μ M) concentrations of HSA, with a new Soret peak at 402 nm of the HSA·hemin complex (57). This result is in agreement with a transfer of hemin from ECL3 to HSA which also supposed an interaction between HSA and ABCG2. We probed such an interaction by monitoring the intrinsic fluorescence signal of ABCG2 in the presence of increasing HSA concentrations. This led to a typical saturation curve displayed in Fig. 8D, reaching to approximately 60% quenching and a rather high K_d of $3.3 \pm 1.1 \mu$ M, suggesting that such an interaction occurs between both proteins.

DISCUSSION

We show that ABCG2 exports heme, formally its fluorescent analog ZnMP (36, 37), and binds porphyrins, preferably the metal-chelated forms, to its large extracellular domain ECL3 and can release them to HSA. Bound compounds are restricted to porphyrins because nonporphyrin molecules, such as mitoxantrone, riboflavin, or doxorubicin (the latter binds to ABCG2 (12) but is only transported by the mutated R482T/G trans-

complexed to hemin (*gray dashed trace*). ECL3 intrinsic fluorescence was recorded at 336 nm. The contribution of HSA to the fluorescence signal was corrected as detailed in supplemental Fig. S6. B, intrinsic fluorescence of ABCG2 (0.1 μ M) preincubated with 5 μ M mitoxantrone and doxorubicin was recorded with time before and after addition at the indicated times of 5 μ M hemin and then 6 μ M HSA. The ABCG2 intrinsic fluorescence was recorded at 328 nm. The contribution of HSA to the fluorescence signal was corrected as detailed in supplemental Fig. S7. C, ECL3 to HSA hemin transfer monitored by UV absorbance. The experiment was carried out as described in Fig. 4 with 10 μ M apoECL3 (*dashed trace*), 5 μ M hemin and 0–12.5 μ M HSA (*black to brown traces*). The Soret bands at 402 and 412 nm resulting from the interaction of hemin with HSA and ECL3, respectively, are indicated. D, interaction of HSA with ABCG2 monitored by quenching of ABCG2 intrinsic fluorescence. Fluorescence experiments were carried out and analyzed as detailed in the legend of Fig. 3C, correcting the intrinsic fluorescence of ABCG2 with that of NATA in the presence of the same concentrations of HSA.

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

porter (4)) do not bind to the domain. Heme and hemin appear to be the preferred ligands, because (i) they display the highest binding affinities for both the isolated ECL3 domain (0.5–1 μM) and the full-length ABCG2 transporter (0.2 μM); (ii) the H583A and C603A single-point mutations alter more markedly the binding of hemin than that of metal-free corresponding PPIX; and (iii) pheophorbide a, which is transported by ABCG2 (26), displays a low binding affinity for ECL3 (3 μM), which is even lower for the full protein ($>8 \mu\text{M}$) when saturated with MTX or doxorubicin, suggesting that pheophorbide a will not bind to ECL3 under physiological conditions.

ECL3 is topologically located downstream from the membrane transport-binding sites and close to them (4, 51). It is consequently better positioned to bind heme or hemin coming from the transport sites of ABCG2 than those already present in the extracellular space. The relatively low affinity of ECL3, either isolated or within ABCG2, for hemin and heme (micromolar to submicromolar range) reinforces that hypothesis, especially when taking into account the affinity of albumin for hemin in the same compartment, which is 100-fold higher (10^{-8} M). The extracellular location of ECL3 likely favors a role for delivering hemin, e.g. to a serum protein such as albumin (or hemopexin, not yet tested) (22), a hypothesis strengthened by our experiments showing that apoHSA releases hemin bound to ECL3 by direct interaction with ABCG2.

To date, ABCG2 has been identified to export pheophorbide a (23) and PPIX (26, 27) for preventing intracellular accumulation of these compounds. Our data show that it also transports hemin and heme, in agreement with protein binding to a hemin-agarose resin (26). Such an efflux is also likely related to protecting from damages that such molecules may produce (19), being more toxic than metal-free porphyrins (15). In that context, ECL3 is strategically located to handle these compounds after membrane translocation and before their extracellular release. FLVCR, a membrane protein of the MFS family, has been shown to export hemin out of the cell (37, 58), making the ABCG2-mediated efflux of hemin apparently redundant. One possible explanation could lie in the expression pattern of these proteins during hematopoiesis: ABCG2, which is a hematopoietic stem cell marker (24), is particularly expressed at high levels in the early stages of hematopoiesis (25), whereas the level of FLVCR is particularly high during erythropoiesis. This suggests complementary roles of the transporters.

Acknowledgments—We thank Aurélie Badillo, Roland Monseret, and François Penin (Institute of Protein Binding and Chemistry (IBCP)) for help in carrying out CD experiments and spectra analyses. We thank Annie Chaboud and Isabelle Grosjean from the “Production et Analyse des Protéines” platform of the IFR 128 for their help in magnetic bead pulldown assays and ABCG2 expression in insect cells. CD analyses were performed on the same platform. We thank Dr. David S. Vaughn (NCI, National Institutes of Health) for the TEV protease-producing bacteria and Dr. Sheng Zhou and Dr. Albert Sorrentino for the K562 cells. We thank Drs Richard. Haser (IBCP), Léa Payen (Lyon I, Rockefeller), and Alain Desbois (CEA Saclay, France) for discussions.

REFERENCES

- Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001) *J. Lipid Res.* **42**, 1007–1017
- Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., and Doyle, L. A. (1999) *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 429–433
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D. D., Miyake, K., Resau, J. H., and Bates, S. E. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 2011–2021
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Németh, K., and Váradi, A. (2004) *FEBS Lett.* **567**, 116–120
- Wang, X., and Baba, M. (2005) *Antivir. Chem. Chemother.* **16**, 213–216
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., van De Vijver, M. J., Scheper, R. J., and Schellens, J. H. (2001) *Cancer Res.* **61**, 3458–3464
- van Herwaarden, A. E., and Schinkel, A. H. (2006) *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 10–16
- Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Muñoz-Martínez, F., Bates, S. E., Castanys, S., Gamarro, F., Di Pietro, A., and Pérez-Victoria, J. M. (2005) *Cancer Res.* **65**, 4852–4860
- Ahmed-Belkacem, A., Macalou, S., Borrelli, F., Capasso, R., Fattorusso, E., Tagliatalata-Scafati, O., and Pietro, A. D. (2007) *J. Med. Chem.* **50**, 1933–1938
- Boumendjel, A., Macalou, S., Ahmed-Belkacem, A., Blanc, M., and Di Pietro, A. (2007) *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2892–2897
- Nicollé, E., Boumendjel, A., Macalou, S., Genoux, E., Ahmed-Belkacem, A., Carrupt, P. A., and Di Pietro, A. (2009) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 34–46
- Pozza, A., Perez-Victoria, J. M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A., and Di Pietro, A. (2006) *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1912–1922
- Seamon, J. A., Rugg, C. A., Emanuel, S., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V., Middleton, S. A., Butler, J., Borowski, V., and Greenberger, L. M. (2006) *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2459–2467
- Bihorel, S., Camenisch, G., Lemaire, M., and Scherrmann, J. M. (2007) *J. Neurochem.* **102**, 1749–1757
- Tsiftoglou, A. S., Tsamadou, A. I., and Papadopoulou, L. C. (2006) *Pharmacol. Ther.* **111**, 327–345
- Sassa, S. (1988) *Semin. Hematol.* **25**, 312–320
- Baliga, B. S., Mankad, M., Shah, A. K., and Mankad, V. N. (1993) *Cell Prolif.* **26**, 519–529
- Zhu, Y., Hon, T., and Zhang, L. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 87–93
- Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005) *Toxicol. Lett.* **157**, 175–188
- Muller-Eberhard, U., and Fraig, M. (1993) *Am. J. Hematol.* **42**, 59–62
- Wardell, M., Wang, Z., Ho, J. X., Robert, J., Ruker, F., Ruble, J., and Carter, D. C. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 813–819
- Taketani, S. (2005) *Tohoku J. Exp. Med.* **205**, 297–318
- Jonker, J. W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M. A., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R. P., Rosing, H., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15649–15654
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B. P. (2001) *Nat. Med.* **7**, 1028–1034
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., and Torok-Storb, B. (2002) *Blood* **99**, 507–512
- Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P., and Schuetz, J. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 24218–24225
- Zhou, S., Zong, Y., Ney, P. A., Nair, G., Stewart, C. F., and Sorrentino, B. P. (2005) *Blood* **105**, 2571–2576
- Bhatia, A., Schäfer, H. J., and Hrycyna, C. A. (2005) *Biochemistry* **44**, 10893–10904
- Polgar, O., Ozvegy-Laczka, C., Robey, R. W., Morisaki, K., Okada, M., Tamaki, A., Koblos, G., Elkind, N. B., Ward, Y., Dean, M., Sarkadi, B., and Bates, S. E. (2006) *Biochemistry* **45**, 5251–5260
- Polgar, O., Robey, R. W., Morisaki, K., Dean, M., Michejda, C., Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V., Tarasova, N., and Bates, S. E. (2004) *Biochemistry* **43**, 9448–9456
- Özvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., and

- Sarkadi, B. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 111–117
32. Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. (2002) *Int. J. Cancer* **97**, 626–630
33. Kage, K., Fujita, T., and Sugimoto, Y. (2005) *Cancer Sci.* **96**, 866–872
34. Henriksen, U., Fog, J. U., Litman, T., and Gether, U. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 36926–36934
35. Özvegy-Laczka, C., Laczkó, R., Hegedus, C., Litman, T., Várady, G., Goda, K., Hegedus, T., Dokholyan, N. V., Sorrentino, B. P., Váradi, A., and Sarkadi, B. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 26059–26070
36. Worthington, M. T., Cohn, S. M., Miller, S. K., Luo, R. Q., and Berg, C. L. (2001) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G1172–G1177
37. Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., and Abkowitz, J. L. (2004) *Cell* **118**, 757–766
38. Montigny, C., Penin, F., Lethias, C., and Falson, P. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1660**, 53–65
39. Trometer, C., and Falson, P. (2010) in *Heterologous Expression of Membrane Proteins: Methods and Protocols* (Mus-Veteau, I., ed) pp. 105–117, Humana Press, Totowa, NJ
40. Kapust, R. B., Tózsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D., and Waugh, D. S. (2001) *Protein Eng.* **14**, 993–1000
41. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76–85
42. Li, S. D., Su, Y. D., Li, M., and Zou, C. G. (2006) *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **38**, 63–69
43. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, W668–W673
44. Provencher, S. W., and Glöckner, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 33–37
45. Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., and Morán, F. (1993) *Protein Eng.* **6**, 383–390
46. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) *Anal. Biochem.* **287**, 252–260
47. Falson, P., Penin, F., Divita, G., Laverigne, J. P., Di Pietro, A., Goody, R. S., and Gautheron, D. C. (1993) *Biochemistry* **32**, 10387–10397
48. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
49. Scheidt, W., and Lee, Y. (1987) in *Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands I*, pp. 1–70, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
50. Allen, J. D., van Loevezijn, A., Lakhai, J. M., van der Valk, M., van Telligen, O., Reid, G., Schellens, J. H., Koomen, G. J., and Schinkel, A. H. (2002) *Mol. Cancer Ther.* **1**, 417–425
51. Li, Y. F., Polgar, O., Okada, M., Esser, L., Bates, S. E., and Xia, D. (2007) *J. Mol. Graph. Model* **25**, 837–851
52. Hazai, E., and Bikádi, Z. (2008) *J. Struct. Biol.* **162**, 63–74
53. Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77
54. Mohanty, A. K., Simmons, C. R., and Wiener, M. C. (2003) *Protein Expr. Purif.* **27**, 109–114
55. Jonker, J. W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A. E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T. C., and Schinkel, A. H. (2005) *Nat. Med.* **11**, 127–129
56. van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J. W., Rosing, H., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1247–1253
57. Monzani, E., Bonafè, B., Fallarini, A., Redaelli, C., Casella, L., Minchiotti, L., and Galliano, M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1547**, 302–312
58. Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblaugh, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., Palis, J., and Abkowitz, J. L. (2008) *Science* **319**, 825–828

Potent and Fully Noncompetitive Peptidomimetic Inhibitor of Multidrug Resistance P-Glycoprotein

Ophélie Arnaud,^{†,‡} Ali Koubeissi,^{‡,‡} Laurent Ettouati,^{*,‡} Raphaël Terreux,[†] Ghina Alamé,[§] Catherine Grenot,[§] Charles Dumontet,^{||} Attilio Di Pietro,[†] Joëlle Paris,[‡] and Pierre Falson^{*,†}

[†]Laboratoire des Protéines de Résistance aux Agents Chimiothérapeutiques, Equipe Labellisée Ligue 2009, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS, Université Lyon 1, IFR 128 BioSciences Gerland Lyon-Sud, F-69367 Lyon, France, [‡]EA 3741 Écosystèmes et Molécules Bioactives, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69373 Lyon, France, [§]Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM, U863, F-69373 Lyon, France, and ^{||}Laboratoire de Cytologie Analytique, Faculté de Médecine, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U590, F-69373 Lyon, France.

[‡]Co-first-authors.

Received July 6, 2010

N^α-Boc-L-Asp(OBn)-L-Lys(Z)-OtBu (reversin 121, **1**), an inhibitor of the P-gp ABC transporter, was used to conceive compounds inhibiting the drug efflux occurring through the Hoechst 33342 and daunorubicin transport sites of P-gp, respectively H and R sites. Replacement of the aspartyl residue by *trans*-4-hydroxy-L-proline (4(*R*)Hyp) gave compounds **11** and **15** characterized by half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of 0.6 and 0.2 μM, which are 2- and 7-fold lower than that of the parent molecule. The difference in IC₅₀ between **11** and **15** rests on the carbonyl group of the peptidyl bond, reduced in **15**. Those compounds are rather specific of P-gp, having no or limited activity on MRP1 and BCRP. **15** displayed no marked cytotoxicity up to 10-fold its IC₅₀. Importantly, **15** equally inhibited the Hoechst 33342 and daunorubicin effluxes through a typical noncompetitive inhibition mechanism, suggesting its binding to a site different from the H and R drug-transport sites.

Introduction

ABC^a (ATP-binding cassette) transporters constitute a key family¹ in the field of public health. Proteins of this family are involved in several genetic diseases² and are responsible for the cellular multidrug resistance phenotype encountered during chemotherapeutic treatments against cancer and viral diseases.^{3–5} In such a context, they represent a serious threat, since cancer cells overexpress them to reduce drug concentration below its cytotoxic threshold. Three ABC transporters are mainly responsible for this phenomenon: P-glycoprotein (P-gp/ABCB1), which was the first identified protein involved in drug resistance⁶ and remains the major agent involved in this phenomenon; the multidrug resistance protein (MRP1/ABCC1), involved in cells where P-gp is not overexpressed;⁷ the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).^{8,9} Drug resistance driven by these membrane proteins is emphasized first by their intrinsic polyspecificity, with these pumps transporting a wide spectrum of molecules, and second by common structural characteristics of their drug-binding sites.

Four sites have been described for the binding of drugs and modulators within P-gp^{10,11} (see also the recent review of Colabufo and colleagues¹²). This suggests a large binding

pocket, as early modeled in silico by Garrigos and Orlowski,¹³ and recently experimentally observed by Chang and colleagues by resolving the 3D structure of the mouse P-gp homologue¹⁴ which displays a volume of 6000 Å³. Among these sites, two drug-binding regions have been functionally identified: one site called “R” from its capacity to bind rhodamine 123 and anthracyclines, such as doxorubicin or daunorubicin, and a second one called “H”, which binds Hoechst 33342, colchicine, and quercetin.¹⁵ Shapiro and Ling observed that these drug-binding sites are distinct and are characterized by a positive cooperativity, although they can partially overlap, since rhodamine 123 above 2 μM quantitatively reduces Hoechst 33342 binding.¹⁵

Numerous multidrug-resistance reversing agents have been described since the discovery of verapamil.^{16,17} Among them, peptides are quite scarce. Valspodar/SDZ-PSC-833, a cyclosporin A derivative, is the best representative of compounds that have ultimately reached phase III clinical trials but were stopped because of pharmacokinetic interactions with anticancer drugs and/or lack of specificity.¹⁸ Two hexacyclic peptides, QZ59-SSS and QZ59-RRR, were recently cocrystallized with the mouse P-gp.¹⁴ Besides these relatively large molecules, a series of short peptide P-gp inhibitors called reversins was first described by Seprödi and colleagues.^{19,20} They consist of di- and tripeptide derivatives sharing common physicochemical and structural features, such as bulky aromatic and/or alkyl groups. Among them, **1** (reversin 121) is an aspartyllysine (Asp-Lys) dipeptide derivative displaying good affinity and specificity for P-gp.²¹

The present work describes a novel class of P-gp ligands, of which the most potent, **15**, behaves as a noncompetitive inhibitor for both the R and H drug-transport sites of P-gp,

*To whom correspondence should be addressed. For L.E.: phone, +33 (0)47 877 7082; fax, +33 (0)47 877 7082; e-mail, laurent.ettouati@univ-lyon1.fr. For P.F.: phone, +33 (0)43 765 2916; fax, +33 (0)47 272 2604; e-mail, p.falson@ibcp.fr.

^a Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; P-gp/ABCB1, P-glycoprotein; MRP1/ABCC1, multidrug resistance protein 1; BCRP/ABCG2, breast cancer resistance protein; LDA, lithium diisopropylamide; THF, tetrahydrofuran; Z, benzyloxycarbonyl; 3D-QSAR, 3D quantitative structure–activity relationship; CoMSIA, comparative molecular similarity indices analysis; LOO, leave one out; Bn, benzyl.

Table 1. First Series of Reversin Derivatives and P-Gp Modulation Activity

compd	R ₁	X	Y	R ₂	R ₃	NIH3T3 transfected cells			K562/R7 resistant cells % inh eff ^a (10 μM)
						% inh eff ^a (10 μM)	% inh eff ^a (2 μM)	IC ₅₀ , μM	
1	-CH ₂ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	75.8 ± 1.6		1.41 ± 0.34	88.0 ± 0.6
30	-CH ₂ COOBn	C=O	CH ₂	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	Bn	35.7 ± 15.3			
17	-CH ₂ COOBn	ψ (CO-CH ₂)-Gly		(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	67.7 ± 7.0			
2	-(CH ₂) ₂ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	63.7 ± 5.4			
3	-(CH ₂) ₂ COO ^t Bu	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	37.2 ± 13.7			
7	-(CH ₂) ₃ COOBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	97.8 ± 4.0	37.0 ± 9.0		65.5 ± 1.3
4	-(CH ₂) ₂ OCOBN	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	59.6 ± 14.7			
5	-(CH ₂) ₂ OCOCHex	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	61.8 ± 3.2			
8	-(CH ₂) ₃ OCOCHex	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	82.3 ± 1.9	35.7 ± 15.2		80.4 ± 4.5
6	-(CH ₂) ₂ OBn	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	49.2 ± 10.2			
13	-CH ₂ <i>p</i> -PhO ^t Bu	C=O	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	34 ± 10.6			
16	-CH ₂ <i>p</i> -PhO ^t Bu	CH ₂	NH	(S)-(CH ₂) ₄ -NHZ	^t Bu	49.1 ± 5.8			
14	-CH ₂ <i>p</i> -PhO ^t Bu	C=O	NH	H	^t Bu	93.4 ± 13.3	38.0 ± 7.2		
19	-CH ₂ <i>p</i> -PhO ^t Bu	C=O	(<i>RS</i>)CHSO ₂ Ph	H	^t Bu	106.5 ± 8.6		1.55 ± 0.86	
20	-CH ₂ <i>p</i> -PhO ^t Bu	(<i>RS</i>)CHOH	(<i>RS</i>)CHSO ₂ Ph	H	^t Bu	104.4 ± 10.4			
21	-CH ₂ <i>p</i> -PhO ^t Bu	ψ (<i>E</i> ,CH=CH)		H	^t Bu	71.2 ± 1.5			
22	-CH ₂ <i>p</i> -PhO ^t Bu	CH ₂	CH ₂	H	^t Bu	78.7 ± 8.3			

^aThe efficacy of inhibition of drug efflux mediated by P-gp (% inh eff) is indicated, estimated as described in the Experimental Section from NIH3T3 mouse cells expressing specifically P-gp or human K562/R7 drug resistant cell line³² which mainly expresses P-gp, and for selected compounds the same experiment was carried out with HEK 293 and BHK expressing BCRP and MRP1, respectively. The efficacy of inhibition was initially measured at 10 μM of each compound and then at 2 μM for those displaying 80% efficacy at 10 μM. The concentration of half maximal inhibition, IC₅₀, was estimated for the most potent compounds as detailed in caption of Figure 1. All data are the mean of duplicate experiments carried out twice.

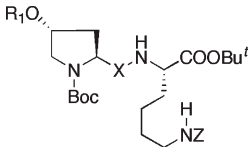
which limits the possibility for such an inhibitor to be itself transported by P-gp or another ABC transporter. We chose **1** as a starting template, modified the aspartic acid side chain length and ester-protecting group, then replaced the aspartic acid residue by side chain constrained derivatives, and finally modified the peptide bond. We also evaluated the inhibitory effect of tyrosylglycine dipeptide derivatives closely related to **1**, especially concerning the hydrophobic protecting groups. Once generated, these derivatives were assayed in vitro, looking for compounds displaying a better inhibition efficacy than **1** and, among them, selecting those behaving as noncompetitive inhibitors for the H and R sites.

Results and Discussion

Chemistry. The products described in this article and presented in Tables 1–4 were synthesized by standard procedures.^{22,23} Reference reversins **1** and *N*^α-Boc-L-Glu(OBn)-L-Lys(Z)-O^tBu (reversin 1092, **2**), as well as other dipeptide derivatives **3–14**, were obtained by the mixed anhydride method (Tables 1 and 2).²⁴ Aminomethylene derivatives **15** and **16** were synthesized using the classical reductive amination strategy, starting from chiral pool-derived aminoaldehydes (Tables 1 and 2).²⁵ Synthesis of ketomethylene derivative **17**, bearing a Gly residue inserted between Asp and Lys residues, was previously reported, as well as the synthesis of β-ketosulfone **18**.²³ Tyr-Gly derivatives **19–22**,²³ and derivatives of (2*S*)-[3-((1*S*),3-bis-benzoyloxycarbonylpropylcarbamoyl)propionylamino]pentanedioic acid dibenzyl ester (reversin 213, **23**) and **24**²² (Tables 1, 3, and 4). To obtain further information on the peptide bond effect on the activity of **1**, we synthesized its ketomethylene derivative **30** (Scheme 1) using a strategy developed by

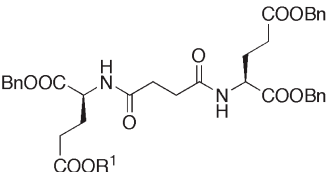
Hoffman and Tao.²⁶ This strategy implies the condensation of an amino acid derived β-keto enolate with an amino acid derived 2-triflyloxy ester, giving rise to the corresponding ketomethylene. It is stressed that triflyloxy ester synthesis undergoes a configuration inversion. However, for the sake of economy and development, L-lysine was used instead of its enantiomer (Scheme 1). The aspartic acid derived β-keto ester **25** was obtained in 32% yield by reaction of aspartic acid imidazolyl ester with the allyl acetate derived enolate generated by the reaction with LDA and allyl acetate in THF. Unexpectedly, the allyl ester byproduct **26** was also recovered in 21% yield. Concerning the synthesis of the L-lysine-derived 2-triflyloxy ester **29**, the Z-protected L-lysine-derived α-hydroxy acid **27** was obtained in quantitative yield by treatment of Z-protected L-lysine with sodium nitrite in 50% aqueous acetic acid.²⁷ We chose a benzyl protection group for the carboxylic acid of **27**, as *tert*-butyl protection would imply a lengthy procedure.²⁸ Finally we prepared the unstable triflyloxy ester **29** in 41% yield, according to the method of Weber et al.²⁹ Coupling of protected triflyloxy ester **29** with aspartic acid derived β-keto ester **25** was carried out in THF with sodium hydride as base for 3 h at room temperature, and then the crude adduct was treated with Pd(0) to finally obtain the ketomethylene derivative **30** in 26% overall yield.³⁰

Biological Results. The efficacy of the compounds to prevent the daunorubicin, mitoxantrone, and Hoechst 33342 efflux carried out by P-gp was evaluated by flow cytometry. The amount of a fluorescent anticancer drug substrate remaining in the cell was quantified in MDR1-transfected NIH3T3/P-gp cell line expressing P-gp, and a P-gp-positive drug-selected human leukemic K562/R7 resistant cell line. The former cellular model has the advantage to selectively express P-gp while the latter one is a biological

Table 2. Second Series of Reversin Derivatives and P-gp Modulation Activity


compd	R ₁	X	NIH3T3 P-gp transfected cells			K 562/R7 resistant cells	HEK293 BCRP transfected cells	BHK MRP1 transfected cells
			% inh eff ^a (10 μM)	% inh eff ^a (2 μM)	IC ₅₀ , μM			
9	COBn	C=O	68.2 ± 10.2			88.2 ± 5.1	10.0 ± 7.5	
15	Bn	CH ₂	106.9 ± 23.0		0.22 ± 0.03	77.6 ± 1.5	42.3 ± 0.8	9.0 ± 3.5
10	COcHex	C=O	105.7 ± 13.4		1.68 ± 0.28	94.9 ± 0.4	11.2 ± 4.6	
11	Bn	C=O	99.7 ± 11.0	120.5 ± 35.3	0.73 ± 0.20	83.5 ± 3.0	16.6 ± 3.4	7.0 ± 2.0
12	CH ₂ cHex	C=O	76.6 ± 10.1	82.2 ± 10.8	1.13 ± 0.34	79.8 ± 1.2	18.8 ± 10.0	

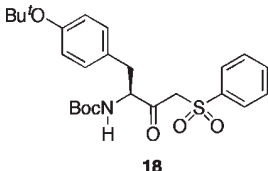
^a The efficacy of inhibition of drug efflux mediated by P-gp (% inh eff) is indicated, estimated as described in the Experimental Section from NIH3T3 mouse cells expressing specifically P-gp or human K562/R7 drug resistant cell line³² which mainly expresses P-gp, and for selected compounds the same experiment was carried out with HEK 293 and BHK expressing BCRP and MRP1, respectively. The efficacy of inhibition was initially measured at 10 μM of each compound and then at 2 μM for those displaying 80% efficacy at 10 μM. The concentration of half maximal inhibition, IC₅₀, was estimated for the most potent compounds as detailed in caption of Figure 1. All data are the mean of duplicate experiments carried out twice.

Table 3. Third Series of Reversin Derivatives and P-gp Modulation Activity


compd	R ₁	NIH3T3 P-gp transfected cells
		% inh eff ^a (10 μM)
23	Bn	26.6 ± 7.7
24	cHex	29.3 ± 12.3

^a The efficacy of inhibition of drug efflux mediated by P-gp (% inh eff) is indicated, estimated as described in the Experimental Section from NIH3T3 mouse cells expressing specifically P-gp or human K562/R7 drug resistant cell line³² which mainly expresses P-gp, and for selected compounds the same experiment was carried out with HEK 293 and BHK expressing BCRP and MRP1, respectively. The efficacy of inhibition was initially measured at 10 μM of each compound and then at 2 μM for those displaying 80% efficacy at 10 μM. The concentration of half maximal inhibition, IC₅₀, was estimated for the most potent compounds as detailed in caption of Figure 1. All data are the mean of duplicate experiments carried out twice.

model close to an in vivo chemoresistance phenotype. All drugs were assayed at 10 μM in the NIH3T3 cells, and the most efficient ones were then tested in K562/R7 cells. Compounds displaying more than 80% efficacy were assayed at 2 μM, and the half-maximal inhibition concentration, IC₅₀, was determined for the most active ones. A typical experiment is displayed in Supporting Information Figure SI 1 to detail the experimental procedure. As shown, values obtained with NIH3T3/P-gp cells can be higher than those obtained with control cells (see panel C, at 0.8 and 1 μM **15**), giving a higher level of variability than observed with the K562/R7 resistant cells. Transfected cells were used to compare all compounds, as they express a unique transporter. The reference compound **1** (Table 1), developed by Sarkadi and colleagues,²¹ displayed 75% inhibition at 10 μM in our transfected-cell system, corresponding to an IC₅₀

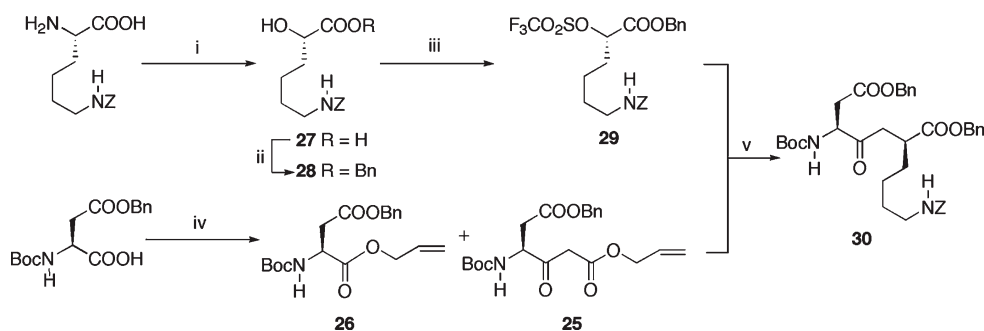
Table 4. Derivative **18** and P-gp Modulation Activity


compd	NIH3T3 P-gp transfected cells % inh eff ^a (10 μM)
18	49.1 ± 8.8

^a The efficacy of inhibition of drug efflux mediated by P-gp (% inh eff) is indicated, estimated as described in the Experimental Section from NIH3T3 mouse cells expressing specifically P-gp or human K562/R7 drug resistant cell line³² which mainly expresses P-gp, and for selected compounds the same experiment was carried out with HEK 293 and BHK expressing BCRP and MRP1, respectively. The efficacy of inhibition was initially measured at 10 μM of each compound and then at 2 μM for those displaying 80% efficacy at 10 μM. The concentration of half maximal inhibition, IC₅₀, was estimated for the most potent compounds as detailed in caption of Figure 1. All data are the mean of duplicate experiments carried out twice.

of 1.41 μM, a value close to the 88% obtained when using the drug-resistant cell lines. Few compounds displayed an efficacy below 40%, such as **30**, **3**, **13** (Table 1), and **23**, **24** (Table 3), whereas most of them such as **2**, **17**, **4**, **5**, **16**, **21**, **22** (Table 1), **12** (Table 2), and **18** (Table 4) displayed an efficacy similar to that of **1**. Finally, nine dipeptides were found to be more efficient than **1**: **7**, **8**, **14**, **19**, **20** (Table 1), and most of the compounds of Table 2 (**9**, **15**, **10**, **11**). Efficacies obtained from drug-selected cells were in the same range (Tables 1 and 2), showing that those compounds remain efficient in a system closer to a physiopathological context than transfected cells.

Structure–Activity Relationships. Several modifications had no positive effect or were negative, e.g., replacement of the amide bond by a ketomethylene isostere in **30** or extension of the aspartate side chain in **2** and **7**. Extending the length of the aspartate side chain slightly increased the efficacy of **7**, which however remained poorly active at 2 μM.

Scheme 1. Synthesis of Ketomethylene Isostere **30**^a

^a Reagents and conditions: (i) (a) 50% aqueous acetic acid, room temp; (b) NaNO₂, H₂O, room temp, quant yield; (ii) BnBr, Et₃N, acetone, room temp, 6 h, 40%; (iii) Tf₂O, CH₂Cl₂, 2,6-lutidine, -78 °C, 4 h, to room temp, 41%; (iv) (a) CDI; (b) CH₃CO₂allyl, LDA, THF, -78 °C, 2 h, **25** 32% and **26** 21%; (v) (a) NaH, THF, -20 °C, 20 min, to room temp, 3 h; (b) Pd(OAc)₂, PPh₃, HCOOH, Et₃N, THF, room temp, 24 h, 26%.

In a similar manner, derivatives obtained from **2**, in which the protecting group of the Asp carboxyl side chain was replaced by a *tert*-butyl in **3** or in which the ester was replaced by a reversed ester in **4**, **5**, and **8** or by a benzyl ether in **6**, were not more efficient than **1**.

In another set of modifications, we replaced the aspartyl residue by a tyrosine. This single replacement reduced the overall efficacy of resulting reversins **13** and **16** to 34%, whereas a surprising increase to about 100% was obtained by additionally replacing the lysine moiety by a (*RS*)CHSO₂-PhCH₂ group. In this series, the most efficient derivative, **19**, led to an IC₅₀ of 1.55 μM, similar to that of **1**. A deep reduction in efficacy was also observed for lengthened derivatives **23** and **24** (Table 3).

Conversely, striking effects were also observed by introducing a higher level of constraint in template **2**, e.g., replacing the N-terminal Glu residue by 4(*R*)Hyp residue, resulting in the products listed in Table 2. Apart from **9**, compounds of that series displayed an inhibition efficacy at 10 μM close to 100%, leading to IC₅₀ values of 1.68, 1.13, 0.73, and 0.22 μM for **10**, **12**, **11**, and **15**, respectively. As shown in Table 2, some of these improvements were due to the replacement of the ester function of the N-terminal residue by either a benzyl ether function in **11** and **15** or cyclohexylmethylene ether in **12**. A significant improvement was obtained by a single reduction of the peptide bond in **15**, compared to **11**, allowing it to reach the highest affinity with an IC₅₀ of 0.22 μM. This value is nearly 1 order of magnitude lower than that of template **1** (Figure 1).

A 3D quantitative structure–activity relationships (3D-QSAR) analysis was then carried out on the reversin derivatives. As detailed in the Experimental Section, models were first energetically minimized and chains were then drawn in a linear conformation. Since those molecules have a great degree of freedom, a linear conformation was chosen for all of them. They were first aligned on the peptide backbone, and then alignment of each side chain was manually carried out by rotating dihedral angles. Each model was then minimized, setting the upper energy threshold to 20 kcal·mol⁻¹. The resulting alignment is displayed in Figure 2A. A database was generated from all models and treated by the CoMSIA method to carry out 3D-QSAR studies (see Experimental Section for details). Values of inhibition efficacy measured at 10 μM of each compound from Tables 1–4 were used for calculations with the LOO (leave one out) cross-validation method. The plot of predicted vs observed inhibitions values is shown in Figure 2B (close circles), with a

linear correlation coefficient q^2 of 0.85, indicating that 3D-QSAR calculations were robust enough to give an accurate prediction of the percent inhibition by a candidate molecule. Isopotential volumes of hydrophobic, electrostatic, and steric fields were drawn as displayed in Figure 2, panels C and D. Analysis of the hydrophobic field (panel C) showed that this character is mainly favored (pink grids) at the vicinity of the phenyl moiety of the Z protecting group, associated with a favorable steric hindrance (panel D, yellow grids). This illustrates the importance of bulky nonpolar protecting groups in this area. A small unfavorable hydrophobic region can be observed close to the Z carbamate group (panel C, black grids), coupled with a sterically favorable region that might be ascribed to HB-acceptor interactions with polar P-gp residues. By contrast, the region encompassing the N-terminal Boc carbamate group appears hydrophobically favorable and sterically unfavorable (pink and green grids, respectively). The same trend is observed for the C-terminal *tert*-butyl region, suggesting that in both cases the local docking pockets of these groups should be hydrophobic and of small size. Region (I) is hydrophobically unfavorable and sterically favorable (black and yellow grids, respectively), suggesting that it should not contain large hydrophobic groups, as those introduced in **23** and **24**. As displayed in panel D, an electrostatic field appears unfavorable (blue grids) at the vicinity of the backbone NH group but favorable (red grids) in the background, which could be ascribed to the positive effects observed with the sulfone-containing compound **18**. Such an electrostatic contribution, limited to the peptide backbone and associated with the global hydrophobic character of the inhibitor, suggests that the corresponding hydrophilic character could be embedded in a hydrophobic environment and that the inhibitor could bind to a hydrophobic pocket. Region II, at the level of the benzyl-protecting group (Bn), appears hydrophobically unfavorable and sterically favorable (black and yellow grids, respectively), which could illustrate the positive impact of ester bridge shift on the inhibition activity.

Specificity, Reversing Efficacy, and Toxicity of Peptides Derivatives. The compounds listed in Table 2 produced only low or even no inhibition of BCRP/ABCG2 and MRP1/ABCC1 when tested at 10 μM on cells expressing those ABC transporters. They thus appear rather specific toward P-gp. This is useful for preserving the physiological activity of ABC transporters not concerned by the drug resistance.

We then characterized the inhibition properties of the most active compound **15**. As shown in Figure 3, the specific expression of P-gp in NIH3T3 cells led to a resistance index

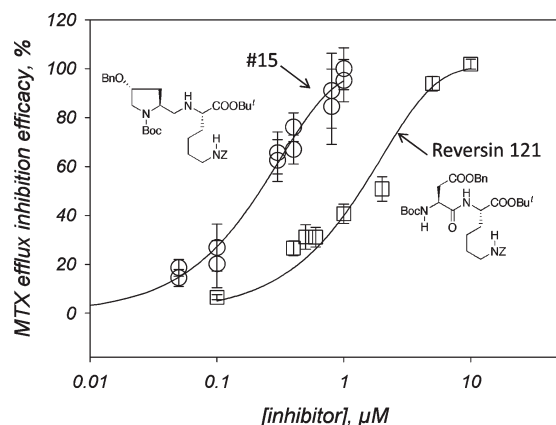


Figure 1. Reversion of P-gp-mediated mitoxantrone efflux by **1** and **15**. The inhibition efficacy of peptide derivatives was assayed by flow cytometry, quantifying the intracellular amount of mitoxantrone as described in the Experimental Section. Values were determined by using eq 1 and fitted with eq 2, as described in the Experimental Section. Squares and circles correspond to **1** and **15**, respectively.

of 8.5 for daunorubicin (circles vs triangles) that remains limited but significant enough to observe a further sensitization effect. Further addition to this drug-resistant cell line of 1 μM **15**, corresponding to 5-fold its IC_{50} , restored its initial sensitivity to the anticancer drug (diamonds), showing the efficacy of **15** to reverse the drug resistance phenotype. At this concentration, no marked cytotoxicity was observed as shown in Figure 4. Indeed, viability of either cell expressing P-gp (squares) or control ones (circles) was not significantly altered up to 1 μM . A much pronounced toxicity was, however, observed above 2 μM , a concentration that is 10 times higher than the corresponding IC_{50} .

Inhibition Mechanism of 15. As mentioned above, the R and H drug-transport sites were identified on P-gp, the former involved in the binding of rhodamine 123 and anthracyclines such as daunorubicin while the latter binds Hoechst 33342, colchicine, and quercetin.¹⁵ We examined the behavior of **15** toward these drug-transport sites, monitoring with flow cytometry the variation of intracellular retention of daunorubicin and Hoechst 33342 in cells expressing P-gp. As detailed in the Experimental Section, substrates were used in the range of 0–20 μM for daunorubicin and 0–10 μM for Hoechst 33342. **15** was added at fixed concentrations of 0.11, 0.22, 0.33, and 1 μM . The resulting retention rates of substrates are displayed in Figure 5 as a direct function of substrate concentrations (panels A and C)

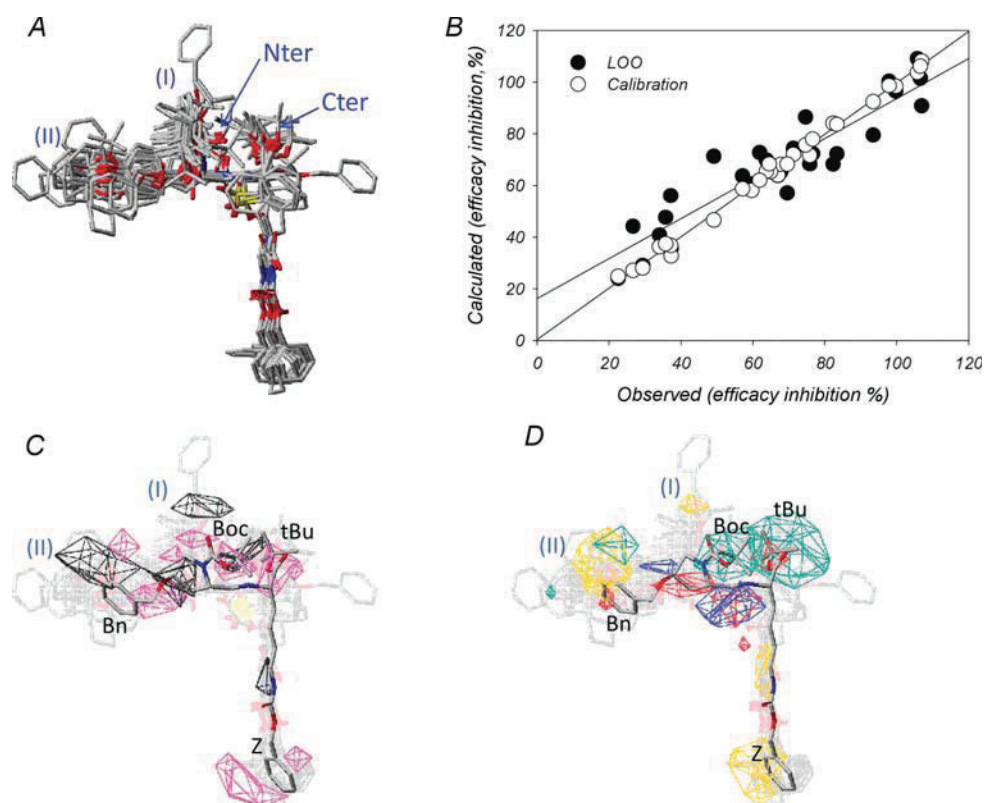


Figure 2. 3D-QSAR of the reversin-derived compounds CT. (A) Superimposed molecules of the series. Molecules were superimposed as detailed in the text. The regions labeled I and II are detailed in the corresponding paragraph in the Results and Discussion section. (B) Predicted versus experimental inhibition efficacy values. Calculated values (closed circles) were obtained with the CoMSIA model by the LOO method as described in the Experimental Section, with a correlation coefficient q^2_{cv} of 0.85, a line intercept of 16.29, and a slope of 0.77. Calculated values (open circles) were obtained with the CoMSIA model without validation method (calibration), as described in the Experimental Section, with a linear fit correlation coefficient r^2 of 0.99, a line intercept of 0.40, and a slope of 0.99. (C, D) Analyses of hydrophobic (C) and electrostatic and steric (D) clusters. They were carried out as described in the Experimental Section and displayed is the structure of the most efficient compound **15**, the remaining derivatives being shown as a ghost. Favorable and unfavorable characters were as follows: pink and black clusters, respectively, for hydrophobicity, red and blue clusters for the electrostatic field and yellow and green for the steric field.

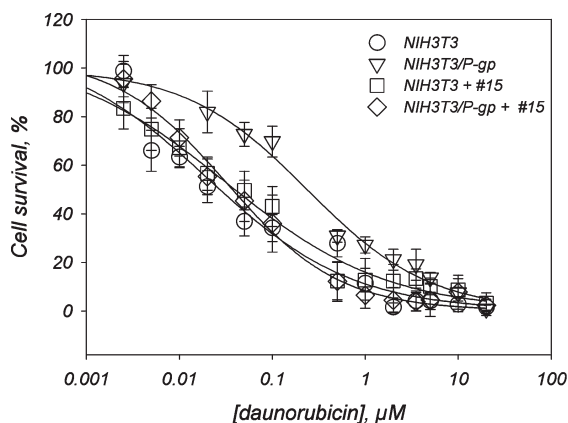


Figure 3. P-gp-expressing cells chemosensitization by **15**. Chemosensitization was assayed and quantified as described in the Experimental Section, using daunorubicin as anticancer drug at indicated concentrations and with **15** added at $1 \mu\text{M}$. Complete cell survival (100%) was estimated as the number of cells in absence of anticancer drug. Squares and circles correspond to control NIH3T3 cells that do not express P-gp incubated with and without **15**, respectively. Triangles and diamonds correspond to the same conditions with NIH3T3/P-gp cells.

or in Lineweaver–Burk double reciprocal plots³¹ (panels B and D). As shown, the maximal retention rates appeared much more affected than the corresponding K_M . Fitting of the Lineweaver–Burk plots tend to a common intercept on the negative x -axis, $[\text{drug}]^{-1}$. Table 5 summarizes the kinetic parameters deduced from the direct plots by using the Michaelis and Menten equation. As shown, the Michaelis constant of each drug did not change while the corresponding maximal retention rates increased with the inhibitor concentration. All these data suggest that **15** behaves as a noncompetitive inhibitor toward both substrates. They allow to estimate K_I values of about 0.5 and $1.5 \mu\text{M}$ (Table 5), suggesting existence of a second, noncompetitive binding site for **15** at high concentration. Further docking experiments on P-gp will be carried out based on the mouse P-gp 3D structure¹⁴ to localize the putative inhibitor binding sites.

Experimental Section

Chemistry. Solvents and reagents were of reagent grade and used without further purification. Melting points were taken on an Electrothermal 9200 apparatus or a Kofler bench and are uncorrected. Specific rotation $[\alpha]_D$ was recorded on Bellingham + Stanley Ltd. ADP 220, Jasco P-1010 or Roussel-Jouan 71 polarimeters. IR spectra were determined on Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR or Perkin-Elmer 1600 series FT-IR spectrometers (KBr film). ^1H , ^{13}C , and ^{19}F NMR spectra were measured on Bruker AC 200 (^1H 200.11 MHz; ^{13}C 50.29 MHz), Bruker ALS 300 (^1H 300.17 MHz), Bruker AM 300 (^1H 300.17 MHz), or Bruker DRX 300 (^{13}C 75.44 MHz; ^{19}F 282.23 MHz) spectrometers (residual protonated solvent signal as internal reference). Elemental analysis was performed on all tested compounds by the Service Central d'Analyse, Vernaison, France, and the results, unless otherwise indicated in the Experimental Section, are within $\pm 0.4\%$ of theoretical values. Electrospray mass spectra were recorded on a Thermo-Finnigan LCQ-Advantage in dichloromethane. Column chromatography was carried out with Merck silica gel 60 (40–63 Å) or SDS silica gel 60 (35–70 Å).

(3S)-tert-Butoxycarbonylamino-4-oxohexanedioic Acid 6-Allyl Ester 1-Benzyl Ester (25). Carbonyldiimidazole (220 mg, 1.312 mmol) was added at room temperature to a stirred

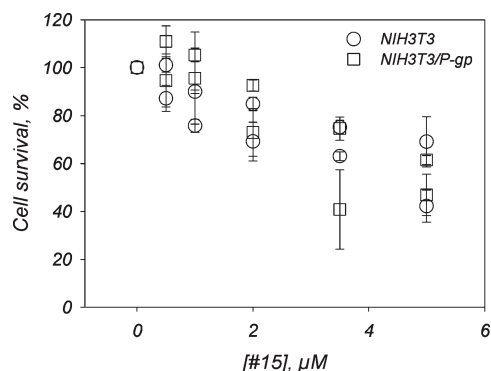


Figure 4. Cytotoxicity of **15**. The compound was added at the indicated concentrations. Complete cell survival (100%) was estimated as the number of cells in absence of compound. Squares and circles correspond to experiments carried out with NIH3T3/P-gp and NIH3T3 cells, respectively.

solution of N^α -Boc-Asp(OBn)-OH (404.5 mg, 1.25 mmol) in dry THF (6 mL) under argon atmosphere. The resulting solution was stirred for 1 h at the same temperature and used for the next step without further purification. Meanwhile, a solution of lithium enolate of allyl acetate was made by addition of 2.5 M BuLi solution in hexane (1.75 mL, 4.375 mmol) to a solution of diisopropylamine (615 μL , 4.375 mmol) in dry THF (6 mL) at 0°C under argon atmosphere. The solution was stirred for 10 min at 0°C and then cooled to -78°C . A solution of allyl acetate (472 μL , 4.375 mmol) in THF (3 mL) was then added dropwise, and the resulting solution was stirred for 15 min at -78°C . The above imidazole solution was added dropwise to the pale-yellow solution of lithium enolate at -78°C under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred for 2 h and then quenched at -78°C with 1 M HCl (20 mL) and extracted with ethyl acetate ($3 \times 30 \text{ mL}$). The organic extracts were combined, washed with saturated sodium bicarbonate solution ($2 \times 40 \text{ mL}$) and brine (40 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated to provide the crude product as a yellow oil which was purified by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate 8:2) to afford 163 mg of **25** (32% yield) as a beige solid. Mp $48-51^\circ\text{C}$. IR (film, cm^{-1}): 3371 (ν_{NH}), 2978 (ν_{CH}), 1733 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1456 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1392 1367 (δ_{CH_3} *t*-Bu), 1167 ($\nu_{\text{O-C-C asym}}$). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.38 (s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc, 9H), 2.74 (dd, $J = 4.6$ and 17.8 Hz , CH_β , 1H), 2.98 (dd, $J = 4.8$ and 17.3 Hz , CH_β , 1H), 3.59 (s, $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{allyl}$, 2H), 4.53 (m, CH_α , 1H), 4.55 (dd, $J = 1.8$ and 6.7 Hz , $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$, 2H), 5.05 (s, CH_2Ph , 2H), 5.23 (m, CH=CH_2 , 2H), 5.57 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, NH , 1H), 5.83 (m, CH=CH_2 , 1H), 7.28 (m, ArH, 5H).

(2S)-tert-Butoxycarbonylamino-succinic Acid 1-Allyl Ester 4-Benzyl Ester (26). The product **26** is a byproduct issued from the synthesis of β -keto allyl ester **25**. This product (95 mg, 21% yield) was isolated by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate 8:2) as a yellow oil. IR (film, cm^{-1}): 3354 (ν_{NH}), 2935 (ν_{CH}), 1731 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1447 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1391 1366 (δ_{CH_3} *t*-Bu), 1152 ($\nu_{\text{O-C-C asym}}$). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.46 (s, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc, 9H), 2.89 (dd, $J = 4.7$ and 17.5 Hz , CH_β , 1H), 3.08 (dd, $J = 5.0$ and 16.7 Hz , CH_β , 1H), 4.60–4.68 (m, CH_α and $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$, 3H), 5.14 (s, CH_2Ph , 2H), 5.28 (m, CH=CH_2 , 2H), 5.50 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, NH , 1H), 5.87 (m, CH=CH_2 , 1H), 7.36 (m, ArH, 5H).

6-Benzoyloxycarbonylamino-(2S)-hydroxyhexanoic Acid (27). Commercial H-Lys(Z)-OH (1.012 g, 3.614 mmol) was dissolved in 50% aqueous acetic acid (120 mL). A solution of sodium nitrite (2 g, 29 mmol) in water (20 mL) was then added at 0°C , and the reaction mixture was stirred for 40 min at the same temperature and then quenched with water (140 mL) and extracted with ethyl acetate ($2 \times 140 \text{ mL}$). The organic extracts

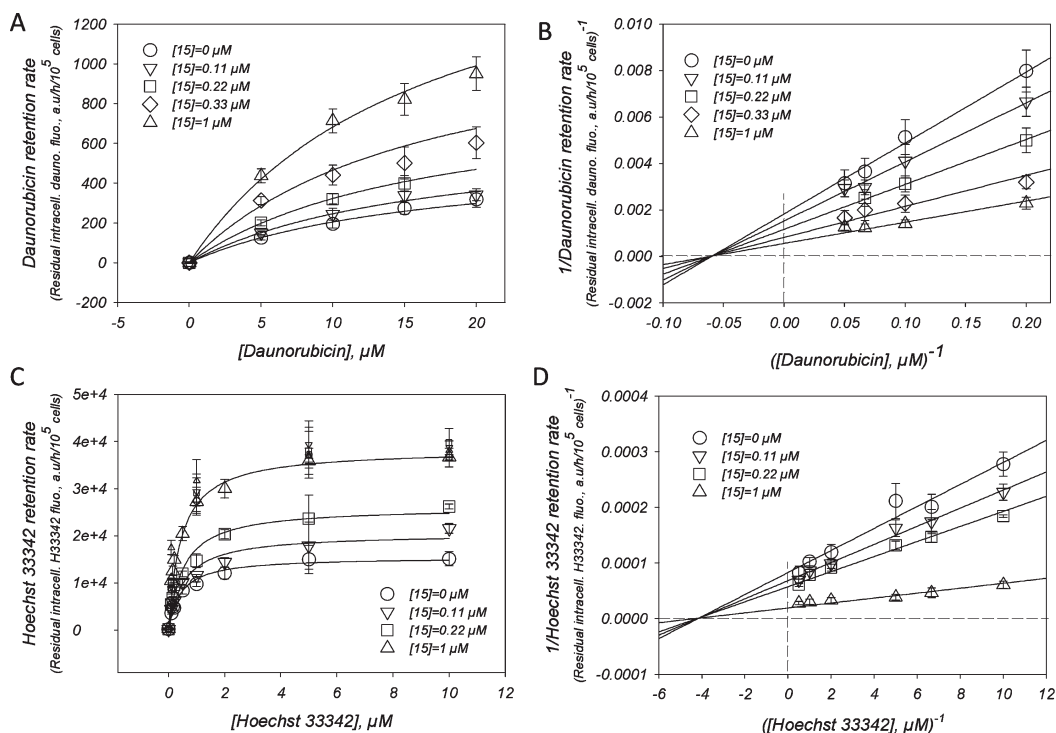


Figure 5. Compound **15** is a noncompetitive inhibitor of H and R drug-transport sites. Experiments were carried out as described in the Experimental Section and in Figure 1, using daunorubicin (A, B) and Hoechst 33342 (C, D) as transported drugs.¹⁵ **15** was either omitted (0% inhibition, circles) or added at 0.11, 0.22, 0.33, and 1 μM corresponding to 25% (bottom-up triangles), 50% (squares), 75% (diamonds), and 100% (bottom-down triangles) inhibition respectively, as deduced from Figure 2. The drug retention rate corresponding to the amount of drug (expressed as arbitrary units of fluorescence, a.u.) remaining inside 10⁵ cells after 1 h was plotted as a function of drug concentration (A, C) and fitted with the Michaelis and Menten equation data. Small symbols in panel C correspond to the same series of experiments, carried out with control NIH3T3 cells. Data are also displayed in Lineweaver–Burk double-reciprocal plots³¹ (B, D). Experiments were carried out in duplicate in two independent series.

Table 5. Kinetic Inhibition Parameters of **15**^a

[15], μM	<i>R</i> _{max}	<i>K</i> _M , μM	<i>K</i> _I , μM
Daunorubicin Substrate			
0	547 ± 42	16.7 ± 1.1	
0.11	656 ± 46	16.7 ± 1.2	0.66 ± 0.01
0.22	860 ± 65	16.4 ± 1.4	0.60 ± 0.01
0.33	1230 ± 58	15.9 ± 1.7	0.59 ± 0.04
1.0	1808 ± 77	16.3 ± 1.2	1.43 ± 0.08
Hoechst 33342 Substrate			
0	15491 ± 562	0.23 ± 0.06	
0.11	20485 ± 1199	0.24 ± 0.12	0.45 ± 0.04
0.22	26098 ± 1278	0.27 ± 0.09	0.54 ± 0.06
1.0	38349 ± 987	0.25 ± 0.07	1.68 ± 0.08

^a Maximal retention rates (*R*_{max}) and Michaelis constants (*K*_M) of daunorubicin and Hoechst 33342, as well as inhibition constants (*K*_I), were estimated from Figure 5, panels A and C, as described in the Experimental Section.

were combined, washed with 0.1 M HCl solution (200 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated to provide the crude product **27** (1 g, quantitative yield) as a yellow oil which was dried under vacuum in order to eliminate the remaining acetic acid and used without further purification. IR (film, cm⁻¹): 3454 3335 (ν_{NH}, ν_{OH}, and ν_{COOH}), 2925 (ν_{CH}), 1683 (ν_{C=O}), 1586, 1539, 1456 (ν_{OC=C}), 1260 (ν_{C-OH}), 1127 (ν_{O-C-C} asym), 1102 (ν_{C-N}). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.40–1.59 (m, CH_{2γ}, CH_{2δ}, 4H), 1.82 (m, CH_{2β}, 2H), 3.22 (q, *J* = 6.4 Hz, CH_{2N}, 2H), 4.28 (m, CH_α, 1H), 4.94 (br, NH, 1H), 5.11 (s, CH₂Ph, 2H), 5.40–5.60 (br, COOH, 1H), 7.36 (s, ArH, 5H).

6-Benzyloxycarbonylamino-(2*S*)-hydroxyhexanoic Acid Benzyl Ester (28). Acid **27** (1 g, 3.56 mmol) was dissolved in acetone

(20 mL), and triethylamine (600 μL, 4.27 mmol) was added. Benzyl bromide (510 μL, 4.27 mmol) was then added dropwise, and the reaction mixture was stirred for 6 h at room temperature. The solvent was evaporated, and the obtained residue was dissolved in ethyl acetate, washed with saturated sodium bicarbonate solution and brine (twice each one), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated. The yellow oily residue was purified by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate 6:4) to yield 516 mg of **28** (40% yield) as a yellow oil. IR (film, cm⁻¹): 3365 (ν_{NH} and ν_{OH}), 3066, 3034 (ν_{CH}), 2937 (ν_{CH}), 1738 1699 (ν_{C=O}), 1587, 1538, 1455 (ν_{OC=C}), 1251 (ν_{C-C-O} asym), 1126 (ν_{O-C-C} asym). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.27–1.89 (m, CH_{2β}, CH_{2γ}, CH_{2δ}, 6H), 3.17 (q, *J* = 6.4 Hz, CH_{2N}, 2H), 4.23 (m, CH_α, 1H), 4.75 (br, NH, 1H), 5.10 (s, CH₂Ph, 2H), 5.20 (AB, *J* = 12.4 Hz, CH₂Ph, 2H), 7.36 (m, 2ArH, 10H).

6-Benzyloxycarbonylamino-(2*S*)-trifluoromethanesulfonylox-yhexanoic Acid Benzyl Ester (29). Alcohol **28** (302.7 mg, 0.816 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and then cooled to -78 °C (acetone). 2,6-Lutidine (265 μL, 2.284 mmol) was added dropwise followed by triflic anhydride (276 μL, 1.632 mmol). The resulting solution was allowed to warm to room temperature and the reaction mixture was stirred under argon for 4 h. An amount of 5 g of silica gel was added directly to the reaction before evaporation of the solvent at room temperature under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate 8:2) afforded 170 mg of **29** (41% yield) as a brownish oil. IR (film, cm⁻¹): 3349 (ν_{NH}), 3068, 3036 (ν_{CH}), 2942 (ν_{CH}), 1760, 1715 (ν_{C=O}), 1587, 1456, 1417 (ν_{OC=C}), 1326 (ν_{SO2} asym), 1246 (ν_{C-C-O} asym), 1144 (ν_{SO2} sym), 698 (ν_{CF3}). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.36–1.59 (m, CH_{2γ}, CH_{2δ}, 4H), 2.03 (m, CH_{2β}, 2H), 3.17 (q, *J* = 6.5 Hz, CH_{2N}, 2H), 4.71

(br, NH , 1H), 5.11 (s, CH_2Ph , 2H), 5.14 (m, CH_α , 1H), 5.27 (AB, $J = 12.0$ Hz, CH_2Ph , 2H), 7.36 (m, 2ArH, 10H). ^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$, δ): -75 (CF_3).

N^α -Boc-(S)-Asp(OBn)- ψ -(CO- CH_2)-(S)-Lys(Z)-OBn (30). A solution of **25** (119 mg, 0.294 mmol) in dry THF (2 mL) was added dropwise to a stirred suspension of NaH (14 mg of 60% in oil, 0.353 mmol) in dry THF (2 mL) at $-20^\circ C$ under argon. The mixture was stirred for 20 min. Then the alkyl triflate **29** (162.7 mg, 0.323 mmol) in dry THF (1 mL) was added. The resulting solution was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h. After being quenched with 1 M HCl (5 mL), the reaction mixture was then extracted with ethyl acetate (3×10 mL). The organic extracts were combined, washed with saturated sodium bicarbonate solution (15 mL) and brine (15 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, passed through a short pad of silica gel, and concentrated to provide a yellow oil. Without further purification, this oil (223 mg, 0.294 mmol) was dissolved in dry THF (2 mL) and added dropwise to a stirred solution of palladium acetate (1.6 mg, $7.23 \cdot 10^{-3}$ mmol), PPh_3 (3.9 mg, 0.0147 mmol), formic acid (22 μ L, 0.588 mmol), and Et_3N (105 μ L, 0.735 mmol) in dry THF (2 mL) at room temperature under argon. The mixture was stirred overnight. After the solvent was evaporated under reduced pressure, the oily residue was purified by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/ethyl acetate 7:3) to afford 52 mg of **30** (26% yield) as a brown oil. $[\alpha]_D^{25} -10.0$ (c 0.19, CH_2Cl_2). IR (film, cm^{-1}): 3360 (ν_{NH}), 3034 (ν_{CH}), 2933 (ν_{CH}), 1715 ($\nu_{C=O}$), 1587, 1456 ($\nu_{C=C}$), 1367 (δ_{CH_3} *t*-Bu), 1251 (ν_{C-O} *asym*), 1165 (ν_{O-C-C} *asym*). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ): 1.37 (s, $C(CH_3)_3$ Boc, 9H), 1.10–1.72 (m, $3CH_2$ Lys, 6H), 2.45–2.91 (m, CH_2CO , CH_2CO_2Bn , 4H), 3.05 (q, $J = 6.7$ Hz, CH_2N , 2H), 4.38 (m, CH_α , 1H), 4.62 (m, CH_α , 1H), 4.97–5.16 (m, $3CH_2Ph$, 6H), 5.45 (d, $J = 8.3$ Hz, NH , 1H), 7.22–7.29 (m, 3ArH, 15H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): 28.7 (3C), 24.4, 30.0, 31.7 (3C), 36.1 (C), 40.3 (C), 40.9 (C), 41.1 (C), 56.3 (C), 67.0, 67.1, 67.2 (3C), 80.7 (C), 128.5, 128.7, 128.8, 128.9, 129.0, 130.2 (15C), 135.7, 136.3, 137.0 (3C), 155.8, 156.7 (2C), 171.4, 175.1 (2C), 206.9 (C). MS-ESI (m/z): 1371.2 [$2M + Na$] $^+$, 697.3 [$M + Na$] $^+$. HRMS-ESI (m/z): [$M + Na$] $^+$ calculated for $C_{38}H_{46}N_2O_9Na$, 697.3101; found, 697.30991.

Biology. Cell Cultures and Drug Efflux Assays. The inhibition of P-gp activity by the studied compounds was evaluated by their ability to prevent the efflux of daunorubicin, mitoxantrone, and Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) in either the K562/R7 drug-selected human cell line³² or the NIH3T3 G185 transfected cell line (ATCC).³³ They were also assayed on human embryonic kidney (HEK) 293 cells transfected with BCRP/ABCG2³⁴ and baby hamster kidney (BHK) 21 expressing MRP1.³⁵ K562/R7 cells (1×10^6 cells) were incubated for 1 h at $37^\circ C$ in 1 mL of RPMI 1640 medium containing a final concentration of 10 μ M daunorubicin, in the presence or absence of 10 μ M reversin derivatives. After incubation, cells were washed with ice-cold PBS and kept on ice until analysis by flow cytometry. Cyclosporin A was used as a positive control (mean inhibitory activity of 100%). NIH3T3 drug-sensitive parental cell line and its derivative cell line transfected with human MDR1-G185, NIH3T3/P-gp, derived from NIH Swiss mouse embryo cultures, were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (PAA laboratories) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA laboratories) and 1% penicillin/streptomycin (PAA Laboratories). The NIH3T3/P-gp growth medium was also supplemented with 60 ng/mL colchicine. Cells were incubated at $37^\circ C$ in humidified 5% CO_2 . NIH3T3 and NIH3T3/P-gp were incubated for 30 min at $37^\circ C$ under 5% CO_2 in the presence of 10 μ M mitoxantrone or various concentrations of either daunorubicin or Hoechst 33342 (as indicated in Figures) as the P-gp transport substrate, with or without reversin derivatives. Compounds were solubilized in DMSO, the final concentration of which was limited to 0.5%. After incubation, cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) (PAA Laboratories) and incubated for 1 h in

the same media without drug; cells were maintained on ice until analysis by flow cytometry.

Flow Cytometry. The fluorescence of intracellular daunorubicin or mitoxantrone was measured with a FacsScan flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Daunorubicin and mitoxantrone were excited at 488 nm, and the fluorescence emission was monitored at 650 nm. The amount of Hoechst 33342 was measured by a LSRII flow cytometer, at 350 nm excitation and 450 nm emission. The compound efficiency was estimated by using eq 1,

$$\% \text{ efficacy} = 100 \times (FA - FBG)/(Fe - FBG) \quad (1)$$

where FA and FBG (background) correspond to the intracellular fluorescence of cells expressing P-gp incubated with (FA) or without (FBG) the fluorescent transported drug, in the presence of each tested compound, Fe corresponding to FA measured on control cells that do not express P-gp. Assays were performed in duplicate. Mean and standard error (SE) were calculated from at least three independent experiments, and curves were fitted with Sigmaplot using the eq 2:

$$\% \text{ efficacy} = a(1 - \exp(-b[\text{inhibitor}, \mu M])) \quad (2)$$

a and *b* parameters being adjusted by the fit.

Cytotoxicity Assays. Cells were seeded in 200 μ L of growth medium at a density of 2500 cells per well in a 96-well plate and were allowed to establish for 24 h at $37^\circ C$ in humidified 5% CO_2 . The medium was then removed, replaced by 100 μ L of growth medium, completed with 100 μ L of each tested compound at increasing concentrations in 1% DMSO. Cells were incubated for 72 h at $37^\circ C$ in humidified 5% CO_2 . The cytotoxicity of each tested compounds was then evaluated with a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay (Sigma-Aldrich).

Chemosensitization Assays. Experiments were carried as for cytotoxicity assays, incubating control or P-gp-expressing cells with increasing concentrations of anticancer drugs as indicated and a concentration of the tested modulator corresponding to 5 times its IC_{50} .

Kinetics. Kinetic parameters for P-gp inhibition by compound **15** were determined by incubating 10^5 NIH3T3/P-gp and NIH3T3 cells with various concentrations of daunorubicin (5, 10, 15, and 20 μ M) in the presence of four to five concentrations (0, 0.11, 0.22, 0.33, and 1 μ M) of **15**. The residual intracellular amount of drugs remaining inside cells after 1 h of incubation with or without **15** was quantified by fluorescence coupled to flow cytometry at each concentration of **15**, with data proportional to a drug retention rate. It was plotted as a function of drug concentration (*A*, *C*) and fitted with the Michaelis and Menten equation $R = R_{max}[D]/([D] + K_M)$ where *R* is the drug retention rate, R_{max} the maximal drug retention rate, [*D*] the drug concentration, and K_M the Michaelis constant of drug efflux. The inhibition constant of **15**, K_I was deduced from the equation $R_{max}' = R_{max}/(1 + [I]/K_I)$, where R_{max}' corresponds to the maximal drug retention rate calculated at each modulator concentration [*I*]. Each value is the mean of two duplicate experiments.

Bioinformatics. 3D-QSAR. Molecules were modeled with the Sybyl molecular-modeling package using the force field and partial charges of MMFF94.^{36–39} The dielectric constant was set to 80 to simulate the solvent, and the electrostatic cut-off was set to 16 Å. In CoMSIA, the steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bond donor, hydrogen bond acceptor, and donor–acceptor similarity index fields were calculated, with a default attenuation factor of 0.3 in a grid box extended by adding 6 Å to the largest model, in all directions of the space. A common probe atom was used, with 1 Å radius and charge, hydrophobicity, and hydrogen bond properties of +1. The indices were evaluated according to the usual CoMSIA protocol with a 2.0 kcal·mol $^{-1}$ column filtering value. The predictive power of the models was

evaluated by LOO cross-validation (SYBYL 6.9–7.3 versions; Tripos Inc.) based on the cross-validated coefficient (q^2), displayed in Figure 2B, finding an optimal component number of 10. The maximal error of prediction is about 22% of inhibition with a mean error value of $5.2\% \pm 6.1$.

Acknowledgment. We thank Léa Payen (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lyon, France) for critical discussion and Philippe Lawton (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lyon, France) for proofreading. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and University of Lyon 1 (UMR5086), and the French Ministry of Research (EA3741, Lyon 1). It was funded by the National Research Agency (Grants ANR-06-BLAN_0420, ANR-06-PCVI-0019-01, ANR piribio09_444706), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), and the Ligue Nationale Contre le Cancer (Labellisation 2009). The Ph.D. fellowship of Ophélie Arnaud was from the French Ministry of Research.

Supporting Information Available: Synthetic procedures and analytical data for compounds 1–24; example of estimation of the inhibition efficacy by flow cytometry. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1007–1017.
- Mourez, M.; Jéhanho, M.; Hofnung, M.; Dassa, E. Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *Med. Sci.* **2000**, *16*, 386–94.
- Kim, R. B. Drug transporters in HIV Therapy. *Top. HIV Med.* **2003**, *11*, 136–139.
- Wang, X.; Furukawa, T.; Nitanda, T.; Okamoto, M.; Sugimoto, Y.; Akiyama, S.; Baba, M. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 65–72.
- Weiss, J.; Rose, J.; Storch, C. H.; Ketabi-Kiyanvash, N.; Sauer, A.; Haefeli, W. E.; Efferth, T. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 238–245.
- Juliano, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1976**, *455*, 152–162.
- Cole, S. P.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M.; Deeley, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **1992**, *258*, 1650–1654.
- Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 15665–15670.
- Litman, T.; Brangi, M.; Hudson, E.; Fetsch, P.; Abati, A.; Ross, D. D.; Miyake, K.; Resau, J. H.; Bates, S. E. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.* **2000**, *113* (Part 11), 2011–2021.
- Pascaud, C.; Garrigos, M.; Orlowski, S. Multidrug resistance transporter P-glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *Biochem. J.* **1998**, *333* (Part 2), 351–358.
- Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Mistry, P.; Charlton, P.; Callaghan, R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 624–632.
- Colabufo, N. A.; Berardi, F.; Cantore, M.; Contino, M.; Inglese, C.; Niso, M.; Perrone, R. Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *J. Med. Chem.* **2009**, *53*, 1883–1897.
- Garrigues, A.; Loiseau, N.; Delaforge, M.; Fertet, J.; Garrigos, M.; André, F.; Orlowski, S. Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1288–1298.
- Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **2009**, *323*, 1718–1722.
- Shapiro, A. B.; Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130–137.
- Avendano, C.; Menendez, J. C. Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR). *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 159–193.
- Teodori, E.; Dei, S.; Martelli, C.; Scapecchi, S.; Gualtieri, F. The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR). *Curr. Drug Targets* **2006**, *7*, 893–909.
- Szakacs, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 219–234.
- Seprödi, J.; Mező, I.; Vadász, Z.; Szabó, K.; Sarkadi, B.; Teplán, I. *Peptides Derivatives against Multidrug Resistance*; Mayflower Scientific Ltd.: Kingswinford, U.K., 1998.
- Vadász, Z.; Szabó, K.; Sarkadi, B.; Teplán, I.; Mák, M.; Miklós, I.; Györfy, E.; Seprödi, J. New Hydrophobic Peptide-like Compounds Modulating MDR1-ATPase Activity. *Proceedings of the 25th European Peptide Symposium*; Bajusz, S., Hudecz, F., Eds.; Akadémiai Kiadó: Budapest, Hungary, 1999; pp 640–641.
- Sharom, F. J.; Yu, X.; Lu, P.; Liu, R.; Chu, J. W.; Szabo, K.; Muller, M.; Hose, C. D.; Monks, A.; Varadi, A.; Seprödi, J.; Sarkadi, B. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 571–86.
- Koubeissi, A.; Raad, I.; Ettouati, L.; Guilet, D.; Dumontet, C.; Paris, J. Inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug efflux by aminomethylene and ketomethylene analogs of reversins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5700–5703.
- Charrier, C.; Ettouati, L.; Paris, J. New application of the Julia olefination for the synthesis of Tyr-Gly E-alkene and carba isostere pseudopeptides. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5705–5707.
- Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M. S.; Sieg, F. Synthesis and pharmacological evaluation of glycine-modified analogues of the neuroprotective agent glycyl-L-prolyl-L-glutamic acid (GPE). *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 533–548.
- Martinez, J.; Bali, J. P.; Rodriguez, M.; Castro, B.; Magous, R.; Laur, J.; Lignon, M. F. Synthesis and biological activities of some pseudo-peptide analogs of tetragastrin: the importance of the peptide backbone. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1874–1879.
- Hoffman, R. V.; Tao, J. Synthesis of Cbz-Protected Ketomethylene Dipeptide Isosteres. In *Peptidomimetics Protocols*; Kazmierski, W. M., Ed.; Methods in Molecular Medicine, Vol. 23; Humana Press: Totowa, NJ, 1999; pp 106–121.
- Shin, I.; Lee, M.; Lee, J.; Jung, M.; Lee, W.; Yoon, J. Synthesis of optically active phthaloyl D-amino acids from L-amino acids or L-hydroxy acids as building blocks for the preparation of aminoxy peptides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7667–75.
- Yang, D.; Li, B.; Ng, F. F.; Yan, Y. L.; Qu, J.; Wu, Y. D. Synthesis and characterization of chiral N–O turns induced by alpha-aminoxy acids. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7303–12.
- Weber, I.; Potier, P.; Thierry, J. Triflates as synthons for the synthesis of lysine analogues. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7083–7086.
- Hoffman, R. V.; Maslouh, N.; Cervantes-Lee, F. Highly stereoselective syntheses of syn- and anti-1,2-amino alcohols. *J. Org. Chem.* **2001**, *67*, 1045–1056.
- Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658–666.
- Comte, G.; Daskiewicz, J.-B.; Bayet, C.; Conseil, G.; Viornerie-Vanier, A.; Dumontet, C.; Di Pietro, A.; Barron, D. C-Isoprenylation of flavonoids enhances binding affinity toward P-glycoprotein and modulation of cancer cell chemoresistance. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 763–768.
- Cardarelli, C. O.; Aksentijevich, I.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Differential effects of P-glycoprotein inhibitors on NIH3T3 cells transfected with wild-type (G185) or mutant (V185) multidrug transporters. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1086–1091.
- Robey, R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S. E. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1242–1246.
- Chang, X.-B.; Hou, Y.-X.; Riordan, J. R. ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30962–30968.

- (36) Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519.
- (37) Halgren, T. A. Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 520–552.
- (38) Halgren, T. A. Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 553–586.
- (39) Halgren, T. A.; Nachbar, R. B. Merck molecular force field. IV. conformational energies and geometries for MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 587–615.

Etude fonctionnelle de la région intracellulaire d'ABCG2 et modulation d'ABCG2 et ABCB1 humains par des peptidomimétiques non compétitifs.

La surexpression de pompes d'efflux par les cellules cancéreuses permet l'élimination d'agents cytotoxiques, induisant alors une résistance à la chimiothérapie. Trois transporteurs ABC sont principalement impliqués dans cette résistance : ABCB1 (aussi appelé P-gp), ABCC1 (ou MRP1) et ABCG2 (ou BCRP, MXR, ABCP).

Du fait de leur implication dans le phénotype de « MultiDrug Resistance », il est essentiel de mieux comprendre le fonctionnement de ces transporteurs. Une étude par mutagenèse dirigée a montré que les boucles intracellulaires, ICL0 et ICL1 sont impliquées dans le transport des substrats. Deux résidus sont particulièrement intéressants : W379 qui agirait comme un filtre des substrats ; et H457 qui participerait à la reconnaissance ou à la fixation des substrats.

Par ailleurs, il est important de moduler cette chimiorésistance. Dans ce contexte nous avons développé une nouvelle classe d'inhibiteurs d'ABCB1 et ABCG2 non compétitifs basés sur un motif dipeptidique. Les composés les plus efficaces, CT1347 pour ABCB1 et CT1364 pour ABCG2, s'avèrent, d'une part peu ou pas cytotoxiques à fortes concentrations, abolissent d'autre part la résistance induite par ABCB1 ou ABCG2 et se comportent comme des inhibiteurs non compétitifs du Hoechst 33342 et de la daunorubicine. De plus, CT1364 inhibe l'activité ATPasique d'ABCG2 et induit une diminution rapide de l'expression de la protéine. Enfin, les 1^{ers} tests *in vivo* de ce composé montrent que l'association avec l'irinotécan ralentit la croissance des xénogreffes de petite taille chez des souris.

Functional study of ABCG2 intracellular loops and human ABCG2 and ABCB1 modulation by non competitive peptidomimetics.

Resistance to chemotherapy is partly due to efflux pumps expressed in the plasma membrane which prevent the accumulation of anticancer drugs in the tumour cells. Three human ATP-binding Cassette (ABC) transporters are particularly involved in this phenotype: P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, and the last discovered BCRP/ABCG2.

Because of their involvement in chemoresistance, it is critical to understand the mechanism by which those ABC transporters recognize and transport drugs. The mutagenesis study of the intracellular loops, ICL0 and 1 shows that these loops are involved in this mechanism. Two amino acids were particularly remarkable: W379 which act as a substrate filter and H457 which can be involved in substrate recognition and binding.

In order to restore the cancer cell sensitivity to chemotherapeutic drugs, we have developed a new class of peptide inhibitors, specific to one transporter. A structure-activity relationship study has been performed and made it possible to develop a second generation of molecules. The most efficient compound inhibiting ABCB1 (CT1347) or ABCG2 (CT1364) have none or limited cytotoxic effects. These compounds restore the activity of chemotherapeutic drugs and act as non competitive inhibitors. Moreover, CT1364 inhibits the ATP hydrolysis activity and lead to a rapid reduction of ABCG2 expression. Initial *in vivo* tests that have been carried out with CT1364 associated with irinotecan allow to observe a growth reduction of small mice xenografts.

DISCIPLINE : Biochimie structurale et fonctionnelle

MOTS CLES : transporteurs ABC, ABCG2, ABCB1, chimiorésistance, inhibiteurs peptidomimétiques non compétitifs, mutagenèse, boucles intracellulaires

Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux

Equipe labellisée Ligue 2009 xMécanisme et modulation de la résistance aux médicaments

UMR5086 – CNRS – Université Claude Bernard LYON 1

7, passage du Vercors - 69367 Lyon cedex 07 – France

ABCG2 Transports and Transfers Heme to Albumin through Its Large Extracellular Loop^{*[5]}

Received for publication, April 29, 2010, and in revised form, August 12, 2010. Published, JBC Papers in Press, August 12, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.139170

Elodie Desuzinges-Mandon, Ophélie Arnaud, Lorena Martinez, Frédéric Huché, Attilio Di Pietro, and Pierre Falson¹

From the ABC Transporters and Multidrug Resistance Laboratory, "Equipe Labellisée Ligue 2009," Institute of Protein Biology and Chemistry, Unité Mixte de Recherche 5086 CNRS-Université Lyon 1, IFR 128 Lyon, France

ABCG2 is an ATP-binding cassette (ABC) transporter preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. Due to its role in drug resistance, its expression has been correlated with a protection role against protoporphyrin IX (PPIX) accumulation in stem cells under hypoxic conditions. We show here that zinc mesoporphyrin, a validated fluorescent heme analog, is transported by ABCG2. We also show that the ABCG2 large extracellular loop ECL3 constitutes a porphyrin-binding domain, which strongly interacts with heme, hemin, PPIX, ZnPPIX, CoPPIX, and much less efficiently with pheophorbide a, but not with vitamin B12. K_d values are in the range 0.5–3.5 μM , with heme displaying the highest affinity. Nonporphyrin substrates of ABCG2, such as mitoxantrone, doxorubicin, and riboflavin, do not bind to ECL3. Single-point mutations H583A and C603A inside ECL3 prevent the binding of hemin but hardly affect that of iron-free PPIX. The extracellular location of ECL3 downstream from the transport sites suggests that, after membrane translocation, hemin is transferred to ECL3, which is strategically positioned to release the bound porphyrin to extracellular partners. We show here that human serum albumin could be one of these possible partners as it removes hemin bound to ECL3 and interacts with ABCG2, with a K_d of about 3 μM .

ABCG2 is a membrane protein belonging to the human ABC² transporter family (1). Also called breast cancer resistance protein (BCRP), it was discovered for conferring resistance to the anticancer drug mitoxantrone in breast cancer cell lines (2, 3). As other members of the family, it is involved in cell protection against xenobiotics, such as the anticancer drugs mitoxantrone, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), topotecan, and daunorubicin (4), as well as antiviral agents such

as HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (5). As expressed in the brain-blood barrier, intestine, and placenta (6, 7), it constitutes a critical target for both reversing multidrug resistance (4, 8–12) and increasing drug bioavailability (13, 14).

In mammals, heme (ferrous PPIX; see structure in supplemental Fig. S1) and hemin (ferric PPIX) play a central role in cell metabolism. Heme is the prosthetic group of several hemoproteins involved in oxygen sensing, cell respiration and metabolism, and cell growth (for a review, see Ref. 15), whereas hemin is a potent erythroid cell differentiation inducer (16–18). Free heme is toxic, leading to hemolysis, proteolysis, lipid peroxidation, reactive oxygen species generation, and vascular inflammatory disorders (19). Poorly soluble, heme and hemin require extracellular and intracellular carriers, such as albumin and hemopexin, which bind hemin with a K_d of 10^{-8} and 10^{-12} M, respectively (20–22). Several reports have pointed out the role of ABCG2 in porphyrin detoxification, initiated by a study of Jonker and colleagues who described in *Bcrp1*^{−/−} knock-out mice a marked sensitivity to the dietary chlorophyll-catabolite pheophorbide a and an accumulation of PPIX, the heme precursor in erythrocytes and plasma, leading to acute photosensitivity (23). ABCG2 is a hematopoietic stem cell marker (24), expressed at relatively high levels by immature human hematopoietic progenitors SP, 34⁺/38[−] or 34⁺/KDR⁺ populations (25). Levels of porphyrins are normally regulated by metabolic control mechanisms of their biosynthesis; however, ABCG2 was found to prevent PPIX accumulation in erythroid progenitor K562 cells submitted to hypoxic conditions of growth (26) and to regulate PPIX levels during erythroid differentiation (27). These data point toward a role of BCRP in porphyrin homeostasis and protection; however, the molecular mechanism by which porphyrins are transported and handled for controlling their toxicity remains unknown. In addition, although ABCG2 is recognized to export PPIX (26), its capacity to export either hemin or heme has not yet been demonstrated.

ABCG2 consists of a cytosolic nucleotide-binding domain fused to a transmembrane (TM) domain of six α -helices, giving an inverted domain organization by comparison to most other human ABC transporters (4). The minimal functional unit of ABCG2 is a homodimer (28–30). ABCG2 displays several topological and structural specificities, such as the presence of a large external loop, ECL3, located between TM5 and TM6. Approximately 70–80 residues long, ECL3 is large enough to constitute a full domain, although no specific role has been assigned to it. It contains three cysteine residues reported to be involved in both intermolecular (Cys⁶⁰³–Cys⁶⁰³) and intramolecular (Cys⁵⁹²–Cys⁶⁰⁸) disulfide bridges (31–34). ECL3 also

^{*} This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and University Lyon 1 (UMR5086). This work was also supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) Contracts ANR-06-BLANC-0420, ANR-06-PCVI-0019-01, and ANR-09-PIRI-0002-01, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), which funded the thesis of E. D.-M., and the Ligue Nationale Contre le Cancer Labelisation 2009.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S7, Table S1, and additional references.

¹ To whom correspondence should be addressed: IBCP, 7, passage du Vercors 69367 Lyon, France. Tel.: 33 4 3765 2916; Fax: 33 4 7272 2604; E-mail: p.falson@ibcp.fr.

² The abbreviations used are: ABC, ATP-binding cassette; BCRP, breast cancer resistance protein; FC12, foscholone 12; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; HSA, human serum albumin; NATA, N-acetyltryptophanamide; PPIX, protoporphyrin IX; TEV, tobacco etch virus; TM, transmembrane; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; ZnMP, zinc mesoporphyrin.

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

TABLE 1

Primer sequences for generating the H6ThTeECL3 fusion protein and to introduce single mutations as detailed in the text

Primer	5'–3' Sequence	Res. sites
P _{for}	AAAAAAAAACATATGAATCTTTATTTTCAGGGGGCATCTGGCTGTCATGGC	NdeI
P _{rev}	GGGGCTTGTGGAAGAATCACTAAGGATCCAATA	BamHI
H583A _{for}	GGATTTACGGCTTTGCAGGCCAATGAATTTTGGGACAAAACCTCTGC	
H583A _{rev}	GCAGAAGTTTGTCCCAAAATTCATTGGCCTGCAAAGCCGTAAATCC	
C603A _{for}	GCAACAGGAAACAATCCTGCCAATATGCAACATGTACTGGCGAA	
C603A _{rev}	TTCCGCAGTACATGTTGCATAGTTGGCAGGATTGTTCTCTGTTGC	
Y605A _{for}	GCAACAGGAAACAATCCTTGTACGCCGCAACATGTACTGGC	
Y605A _{rev}	GCCAGTACATGTTGCGGCGTTACAAGGATTGTTCTCTGTTGC	

contains a conformational epitope recognized by the 5D3 monoclonal antibody (24), the interaction of which is prevented upon reduction of the intramolecular disulfide bridge Cys⁶⁰³–Cys⁶⁰³ (35), making 5D3 a powerful conformation-sensing tool.

In the present report, we hypothesized that ABCG2 should transport hemin out of the cell, which could be particularly critical in the early stages of hematopoiesis when it is overexpressed, and hemin plays a role in differentiation. We found that ABCG2 transports zinc mesoporphyrin (ZnMP), a validated fluorescent heme analog (36, 37). We also hypothesized that hemin, once exported by ABCG2, should be transferred to an extracellular protein through interaction with an accessible domain of ABCG2 such as ECL3, which could transitorily interact with hemin after membrane translocation. We expressed the ECL3 domain in *Escherichia coli* and purified it in a folded state, as checked by biophysical methods. It was especially found to be able to interact with the 5D3 mAb only when it was oxidized. ECL3 displayed a high affinity for some, but not all, porphyrins, especially for heme and hemin, whereas it does not bind any of the known nonporphyrin substrates and inhibitors of ABCG2. We also found that hemin, when bound onto ECL3, can be rapidly transferred to human serum albumin (HSA).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—The pET15b plasmid was from Novagen. The QuikChange site-directed mutagenesis kit was from Stratagene. Luria Bertani broth, isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside, and ampicillin were from Euromedex. Foscholine 12 (FC12) was from Anatrache. Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) and gel filtration resins and materials for chromatography were from GE Healthcare. An Amicon ultracentrifuge filter device was from Millipore. 5D3-phycoerythrin was purchased from Clinisciences. Other products were from Sigma. Heme was prepared by incubating 0.2 mM hemin with 10 mM dithionite for 1 h at room temperature; the nearly immediate reduction was visible by eye.

Cell Culture—K562 cells, either expressing or not human ABCG2, were kindly provided by Drs. Sheng Zhou and Albert Sorentino and used as described in Ref. 27. K562 cells were pelleted by centrifugation for 5 min at 200 × *g* and washed with fresh DMEM. After centrifugation, cells were suspended in 5 ml of DMEM and seeded at 200 μl/well in a 96-well plate. The medium was removed by centrifugation, and 100 μl of ZnMP (10 μM final) was added with or without 100 μl of Ko143 (1 μM final). Accumulation of ZnMP was allowed for 30 min at 37 °C. Cells were then washed with PBS and centrifuged and then incubated for 1 h with or without Ko143. They were maintained on ice until analysis by flow cytometry. ZnMP accumulation

was quantified with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences), excitation at 488 nm and emission at 575 nm.

Hemin-Agarose Pulldown Assays—Experiments were performed as previously described by Krishnamurthy *et al.* (26), using K562 cells either expressing or not ABCG2 (27). Cells were lysed as described, and 50 μg of proteins were incubated at room temperature for 15 min in the presence of 0–2 ng/μl 5D3 antibody and 500 nM hemin-agarose. After incubation, the resin was pelleted by centrifugation, and unbound material was withdrawn. Pellets were washed with 1 ml of lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mg/ml Triton X-100, and 50 mM Tris-Cl, pH 8.0), suspended in 20 μl of SDS sample loading buffer (38), and centrifuged at 10,000 × *g* for 2 min at 4 °C. Bound and unbound materials were analyzed on a 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane, and ABCG2 was then revealed with the BXP21 monoclonal antibody (1/500, Millipore).

Expression Constructs—The *bcrp1* gene encoding ABCG2, referenced as Q9UNQ0 at the UniProtKB/Swiss-Prot database, was used for constructs. The *E. coli* protein expression plasmid for producing ECL3, as displayed in Fig. 2, was constructed from alanine 562 to histidine 630 of the ABCG2 sequence by PCR using the plasmid pFastBac Dual-NinaA-BCRP (39), with the couple of forward and reverse primers P_{for} and P_{rev} displayed in Table 1. P_{for} included a NdeI restriction site and encoded a tobacco etch virus (TEV) site (40); P_{rev} included a BamHI restriction site. The PCR product was digested by NdeI and BamHI and inserted into the corresponding sites of the pET15b plasmid. The resulting plasmid pET15b-H₆ThTe-ECL3 expressed the ECL3 (A562-H630) domain fused at its N terminus to a His₆ tag through a thrombin site and a TEV site: MGSSHHHHHHSSGLVPRG/SHMNLYFQ/GA⁵⁶²-**ABCG2-H⁶³⁰**, where both cleavage sites are underlined, the cleavage position is indicated by “/,” and the ECL3 sequence is indicated in bold and italic characters. The single-point mutations H598A, C603A, and Y608A were introduced by site-directed mutagenesis using the corresponding primers displayed in Table 1.

The plasmid used for expressing full-length ABCG2 in insect cells was described previously (39); here, we extended from 6 to 10 the length of the N-terminal histidine tag and added a thrombin cleavage site. The resulting sequence H¹⁰Th-ABCG2 was MAHHHHHHHHHHLPRGSGGMDSPPPSGLVPRGS-**S⁴-ABCG2-S⁶⁵⁵**.

Expression and Purification of ECL3—The BL21(DE3) *E. coli* bacteria strain was transformed with the expression plasmid pET15b-H₆ThTe-ECL3 including wild-type or mutated sequences. A single colony of freshly transformed cells was grown overnight at 37 °C in 5 ml of Luria Bertani broth contain-

ing 100 mg/liter ampicillin and then diluted into 2 liters of the same medium. The culture was incubated at 37 °C and shaken at 220 rpm until reaching an $A_{600\text{ nm}}$ of 0.6. Protein expression was then induced by addition of 0.5 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside and continued for 3 h under the same conditions. TEV was expressed with the pRK793 plasmid, kindly given by Dr. David S. Vaughn (NCI, National Institutes of Health, Frederick, MD).

After expression of either wild-type or mutated ECL3, bacteria were harvested by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min. The pellet was suspended in 20 ml of 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 100 mM NaCl. Cells were disrupted by using a French press, and 2 M NaCl was added to the medium, which was shaken for 20 min at room temperature and then centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min, at 4 °C, resulting in supernatant S1 and pellet P1 (see Fig. 2B). The pellet was suspended in 5 ml of 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 29 mM FC12 and incubated for 1 h at room temperature under mild shaking. The solution was then centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C, generating supernatant S2 (see Fig. 2B) which was loaded onto a 1-ml nickel Hi-trap chelating HP column previously equilibrated with 10 ml of 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM DTT, and 14.2 mM FC12. The resin was washed in two steps with 10 ml and 4 ml of the same buffer, lowering the FC12 concentration to 2.8 mM during the second step. The protein was eluted in 5 ml of the latter buffer with a linear gradient of 0–0.5 M imidazole. The pool of protein was concentrated with an Amicon ultracentrifuge filter device, cutoff 3,000 Da, and loaded onto a Superdex-200 gel filtration 10/300 column, equilibrated with 50 mM NaH_2PO_4 , 2.8 mM FC12. Fractions of about 5–20 μg of protein were checked for homogeneity on a 10% Tricine SDS-PAGE, after half-dilution in a $2 \times$ SDS sample buffer (38) and incubation for 20 min at room temperature before electrophoresis. Fractions of interest were pooled and incubated overnight at 4 °C to allow thiol oxidation to occur. Protein concentration was determined by measuring $A_{280\text{ nm}}$, using a molar extinction coefficient of $29,520\text{ liters}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Bovine thrombin was added at a ratio of 10 units/mg of protein for removing the His₆ tag and incubated for 5 h at room temperature. The efficacy of cleavage was checked by Tricine SDS-PAGE (see Fig. 2B). The His₆ tag peptide was removed by a Ni-NTA-agarose column equilibrated with 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 150 mM NaCl, 2.8 mM FC12. Thrombin was removed on a 1-ml *p*-aminobenzamidine-agarose resin equilibrated with the same buffer.

Expression and Purification of ABCG2—ABCG2 was expressed in Hi5 cells as described in Ref. 39. All subsequent steps were performed at 4 °C. Cells were harvested by centrifugation at $5,000 \times g$ for 10 min, and the pellet was suspended (7 ml/liter of culture) in PBS and centrifuged again. Cells were then suspended (25 ml/liter of culture) in 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 200 μM DTT, 1 mM MgCl_2 , protease inhibitors, and incubated for 1 h. Cells were disrupted by using a tight-fitting Dounce homogenizer and then centrifuged at $15,000 \times g$ for 1 h. The resulting pellet was suspended (500 μl /liter of culture), in 10 mM HEPES, pH 8.0, 50 mM NaCl, 20% glycerol, 100 μM DTT, 1 mM EDTA, protease inhibitors, and stored in liquid nitrogen. The protein concentration was about 40 mg/ml, estimated by the bicinchoninic acid (BCA) method (41).

Membrane suspension was thawed, diluted to 10 mg/ml in 50 mM HEPES, pH 8.0, 2 M NaCl, 15% glycerol, 2 mM DTT, protease inhibitors, and incubated for 1 h before centrifugation at $15,000 \times g$ for 1 h. The resulting pellet was suspended in 50 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 15% glycerol, 40 mM dodecyl β -D-maltoside, 0.2 mM DTT, 20 mM imidazole, protease inhibitors, then incubated for 2 h and centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h. The supernatant was applied to HiTrap chelating HP 1-ml column loaded with Ni^{2+} and equilibrated in 50 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 15% glycerol, 10 mM dodecyl β -D-maltoside, 20 mM imidazole, protease inhibitors. The resin was washed with 16 bed volumes with the same buffer, and ABCG2 was eluted in the same buffer with a 0.02–1 M imidazole gradient. The protein was concentrated using an Amicon Ultra-15 concentrator device 50-kDa cutoff. The His₁₀ tag was removed by thrombin cleavage as described above.

Absorbance Spectroscopy—A saturated solution of hemin was prepared by solubilizing about 10 mg in 100 μl of fresh 0.1 M KOH, followed by a dilution in 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.2, 100 mM NaCl. The solution was clarified by centrifugation at $11,000 \times g$ for 3 min, and hemin concentration was determined at 385 nm using an extinction coefficient of $58,400\text{ liters}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (42). For assays, samples of 10 μM protein were subjected to UV-visible absorbance spectroscopy at room temperature on a DU 640 (Beckman) spectrophotometer, using 50 mM NaH_2PO_4 , 2.8 mM FC12 buffer as blank. Spectra were recorded between 240 and 700 nm using a 1-cm path length cuvette, in a hemin concentration range of 0–50 μM . Difference spectra were obtained by subtracting the buffer spectrum from that of the protein-hemin complex. Spectra were normalized at 280 nm.

Ni-NTA-Agarose Pulldown Assays—Fifty microliters of Ni-NTA magnetic beads were equilibrated with $3 \times 1\text{ ml}$ of 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0, 150 mM NaCl, 0.1% FC12 and then incubated with 200 μg of H₆ECL3/100 μl (20 nmol) for 30 min 4 °C and mild agitation. The beads were washed three times with 600 μl of the same buffer, and the amount of unbound protein was quantified by the BCA method. H₆ECL3 beads were loaded on a BioSprint 15 robot (Qiagen) to carry out the binding of hemin by incubating beads in 500 μl of 50 μM hemin in the same buffer for 20 min at room temperature. The incubation was followed by three washing steps with 500 μl of the same buffer containing 300 mM NaCl. The protein was eluted in 50 μl of the same buffer containing 300 mM NaCl and 300 mM imidazole. The amount of eluted protein and hemin were quantified by the BCA method and by absorbance, respectively. Bound and unbound materials were analyzed on a 16% SDS-PAGE and revealed by Coomassie Blue staining.

Circular Dichroism (CD)—Far-UV CD of purified ECL3 was performed on a Chirascan (Applied Photophysics). Spectra were recorded at room temperature using a 1-mm path length cuvette from 260 to 185 nm, with a step size of 1 nm. Spectra were recorded in the 190–250-nm wavelength range with a 0.2-nm increment, a bandwidth of 0.5 nm, and a 1-s integration time. Spectra were processed, corrected for baseline, and smoothed by Chirascan software on the basis of the Savitzky-Golay algorithm. The percent secondary structure was calculated by deconvoluting data via the DichroWeb site (43) using methods developed by Provencher and Glockner (44), K2d (45), CDSSTR and a SELCON (46).

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

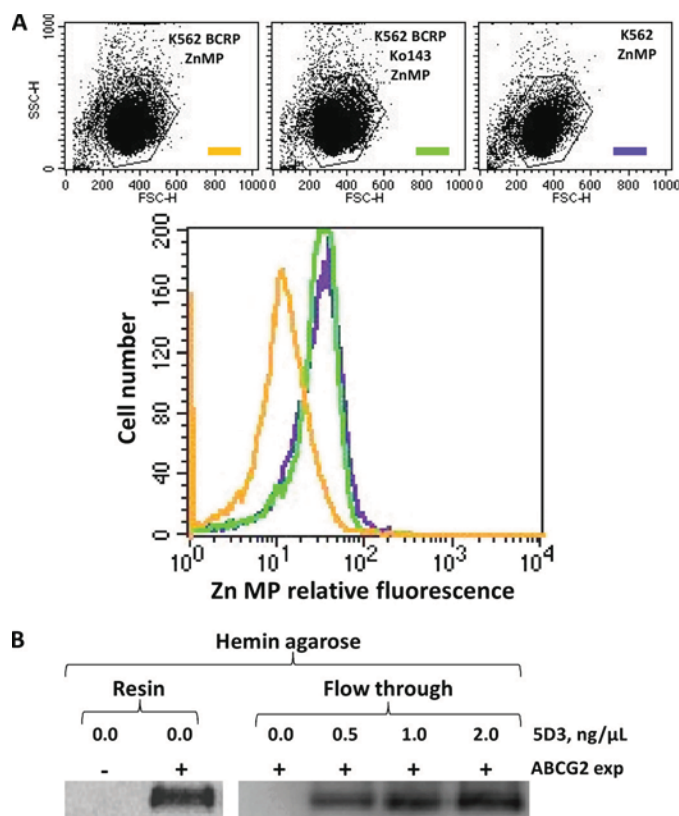


FIGURE 1. Efflux of the heme analog Zn mesoporphyrin (ZnMP) by ABCG2-expressing cells, and decrease of ABCG2 binding to hemin-agarose by the 5D3 mAb raised against ECL3. *A*, ABCG2-expressing K562 cell transport of ZnMP (orange) compared with K562 control cells (green). Addition of the specific ABCG2 inhibitor Ko143 (1 μM) blocks the efflux of ZnMP (violet). *B*, modulation by the 5D3 mAb of *in vitro* ABCG2 binding to hemin-agarose. Whole cell lysates were subjected to a pull-down assay with hemin-agarose in the absence (Resin) or presence of increasing concentrations of 5D3 mAb increasing the amount of unbound ABCG2 (Flow through).

Fluorescence Spectroscopy—Experiments were performed at room temperature using a Photon Technology International Quanta Master I spectrofluorometer. All measurements were recorded in 500-μl quartz cuvettes (Hellma) of 0.5-cm path length. Data were corrected for buffer and the contribution to fluorescence and inner-filter effects of tested ligands by collecting the same spectra with *N*-acetyltryptophan (NATA). ECL3 (3 μM) in 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 2.8 mM FC12, 20% glycerol, or ABCG2 (0.1 μM) in 50 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 15% glycerol, 10 mM dodecyl β-D-maltoside, 1.6 mM CHAPS, was excited at 295 nm, and the fluorescence emission was scanned from 310 to 370 nm. The concentration-dependent quenching studies for the different ligands (0–15 μM) were performed at least three times. Peak areas of corrected fluorescence spectra were fitted with the SigmaPlot software (version 11; Systat Software). Percentages of fluorescence quenching were calculated as a ratio of protein to NATA. Data were fitted assuming one binding site with different possible equations, as indicated,

$$f = B_{\max} \cdot \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x)) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$f = F_{\min} + ((F_{\max} - F_{\min}) \cdot ((E + x + K_d) - \text{SQRT}((E + x + K_d)^2 - 4 \cdot E \cdot x))) / (2 \cdot E) \quad (\text{Eq. 2})$$

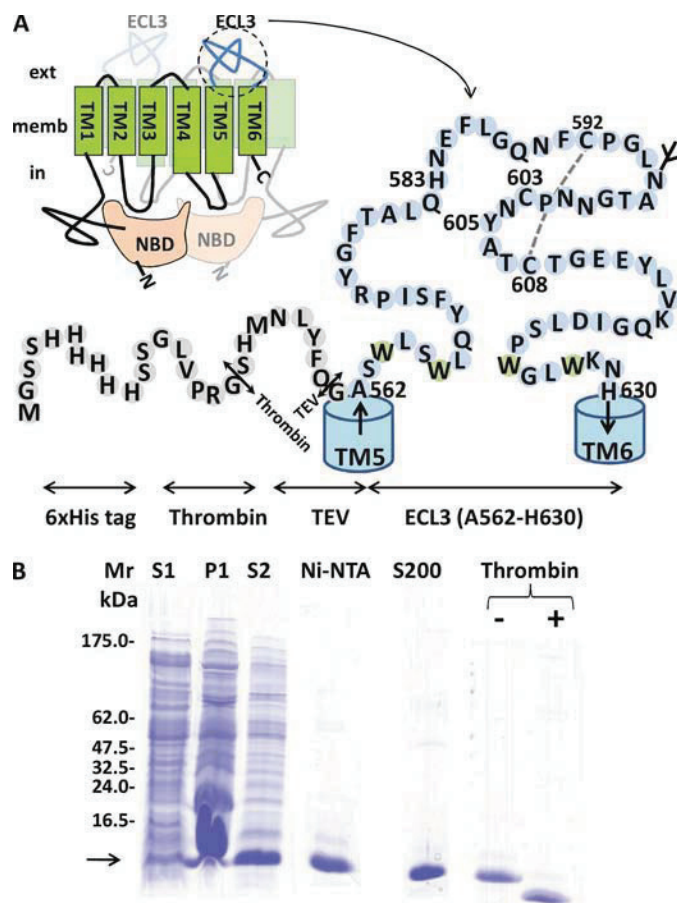


FIGURE 2. ECL3 design, expression, and purification. *A*, ECL3 localized between TM spans 5 and 6 extends from Ala⁵⁶² to His⁶³⁰. It was fused to a His₆ N-terminal tag followed by thrombin (Th) and TEV (Te) proteolytic cleavage sites, resulting in a fusion protein of 10,886 Da. The glycosylation site (in mammals) and disulfide bridge between Cys⁵⁹² and Cys⁶⁰⁸ are indicated. *B*, Tricine SDS-PAGE is used to monitor expression and purification of ECL3. S1 and P1 correspond to the supernatant and pellet fractions obtained at low speed centrifugation of bacteria overexpressing the fusion protein. S2 corresponds to the soluble fraction after FC12 solubilization of P1. Ni-NTA and S200 correspond to ECL3 eluted from each resin. The protein was finally digested by thrombin (+ Thrombin) to remove the tag.

(47). Equation 2 takes into account the residual enzyme concentration and gives a better estimation of the K_d when substrate and enzyme concentration are close, but leads to error values in the same range.

$$f = B_{\max} \cdot \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x) + N_s \cdot x) \quad (\text{Eq. 3})$$

which introduces a correction factor for unspecific binding.

Primary Structure Alignment—Primary structure alignments were performed with Clustal (48), carried out via the NPS@ bioinformatic server.

RESULTS

ZnMP Transport by ABCG2 in K562 Cells and Modulation by the 5D3 mAb of *in Vitro* ABCG2 Binding to Hemin-Agarose—Because ABCG2 was shown to transport PPIX out of stem cells submitted to hypoxia (26), we hypothesized that the transporter could also be able to transport heme or hemin, which correspond to ferrous and ferric PPIX (see the corresponding chemical structure in supplemental Fig. S1). The experiment was carried out with erythroid K562 cells either transfected or

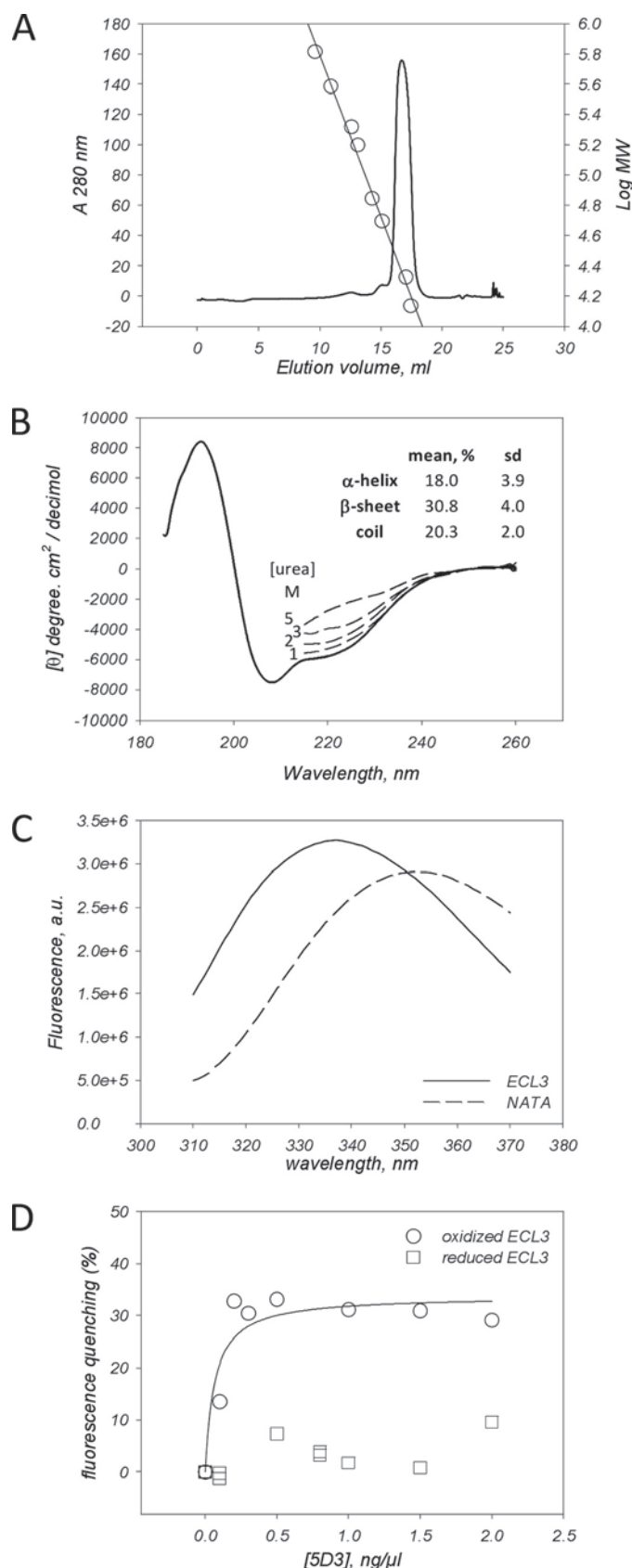


FIGURE 3. ECL3 recombinant domain is folded and recognized by the conformational epitope recognizing 5D3 mAb. A, gel filtration on a Superdex-200 10/300 column of ECL3. The column was calibrated with molecular mass markers (right y log axis, circles) thyroglobulin (650 kDa), ferritin (380 kDa), catalase (210 kDa), aldolase (160 kDa), albumin (70 kDa), ovalbumin (50 kDa),

not with the cDNA encoding ABCG2 (27), following the transport of the fluorescent ZnMP. Note that although ZnMP is a validated hemin analog (36, 37), its central zinc atom cannot coordinate with protein residues such as histidine in the same way as the iron atom in heme (49).

As shown in Fig. 1A, ZnMP accumulated in K562 control cells (green), whereas they remained at a lower level in cells expressing ABCG2 (orange). However, the latter showed the same level of accumulation as observed in control cells when incubated with 1 μ M ABCG2 inhibitor Ko143 (50). Hemin and heme being rather cytotoxic, especially heme as due to the ferrous state of bound iron (15), we hypothesized that their efflux could require an intermediate transfer to a carrier via an extracellular domain of ABCG2, fully accessible to this carrier. ABCG2 indeed displays such a domain, which has been shown to interact with the 5D3 mAb (35). As a first experiment to test whether or not ECL3 could play such a role in heme/hemin transfer, we took advantage of the known capacity of the protein to bind *in vitro* onto hemin-agarose (26) to check whether 5D3 binding could alter domain interaction with the affinity column. Results are displayed in Fig. 1B. As shown on the left, ABCG2 expressed in K562 cells (Resin/0.0/+) could fully bind to the hemin-agarose resin, compared with control cells (Resin/0.0/-), no protein remaining in the flow-through fraction as shown in the right (Flow through/0.0/+). Addition of increasing amounts of 5D3 before incubation with the resin indeed prevented the binding of ABCG2 onto hemin-agarose; the protein accumulated in the flow-through fraction proportionally to the amount of added mAb. By revealing an antagonist effect between 5D3 binding onto ECL3 and ABCG2 binding onto hemin-agarose, this experiment suggested a heme-binding capacity of ECL3.

ECL3 Constitutes an Autonomously Folded Domain—To further check the capacity of ECL3 itself to bind heme/hemin separately from the transport sites, we studied ECL3 as an isolated and purified domain, hypothesizing that it should be long enough to fold accurately when expressed alone. Using primary structure alignments, we selected the region extending from alanine 562 to histidine 630 as possible N and C termini of such a domain. These limits are close to those recently reported from various predictions, Trp⁵⁶⁷-Trp⁶²⁷ (51), Leu⁵⁶⁵-Asn⁶²⁹ (52), or Ser⁵⁶³-Gly⁶¹⁸ (35). We noted the amphipathic character of both pairs of tryptophan residues 564–567, 624–627, located at each extremity of ECL3 and likely favoring the anchoring of the loop onto the membrane, rather than belonging to the TM helices 5 and 6. We generated a chimera including a His₆ tag followed by thrombin and TEV (40) endoprotease cleavage sites at the N terminus of ECL3, which were inserted for later removing the nickel affinity tag after purification because histidine residues might be potential hemin ligands. The resulting fusion protein (Fig. 2A) was produced in *E. coli* and then purified as

chymotrypsinogen A (21 kDa), and ribonuclease (14 kDa), fitting the elution volume data with SigmaPlot. B, CD spectra of ECL3. The spectrum was fitted for estimating the percentage of each two-dimensional structure (see "Experimental Procedures"). The same experiment was done by adding 1–5 M urea (dashed lines). C, fluorescence spectra of ECL3 (straight line) and NATA (dashed line). D, intrinsic fluorescence quenching of ECL3 (1.5 μ M), either oxidized (circles) or reduced (squares), by the 5D3 mAb, as measured at 336 nm and fitted with SigmaPlot using Equation 1.

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

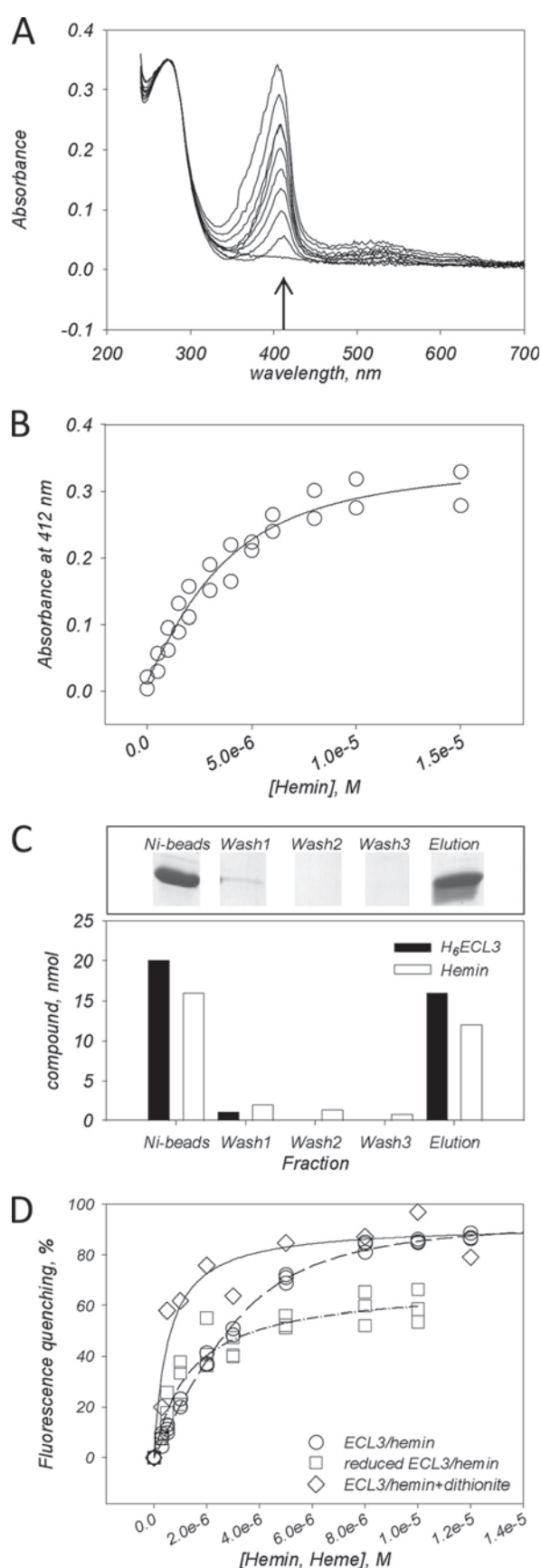


FIGURE 4. Hemin and heme binding to ECL3 as monitored by UV absorbance, pull-down assay, and intrinsic fluorescence. A, UV-visible, corrected and normalized, spectra of oxidized hemin (0–15 μ M) in the presence of ECL3

displayed in Fig. 2B. ECL3 was abundant in the insoluble fraction P1 (arrow in B) and was solubilized with FC12 (lane S2), showing that the domain, as designed, still displayed a significant hydrophobic character. The domain was then purified by nickel affinity and gel filtration chromatographies (lanes Ni-NTA, S200), reducing the detergent concentration to 3 mM, a value roughly equivalent to twice the critical micellar concentration. Reducing this concentration below the critical micellar concentration led to protein aggregation, indicating that detergent is required for maintaining the domain in solution. DTT was added during the solubilization step and then removed during the chromatographic steps for favoring the formation of the Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ disulfide bridge, which occurred during overnight incubation at 4 °C. Later, thiol titration with Ellman's reagent (53) showed that one thiol remained free after this step. Thrombin fully digested the protein (lane Thrombin +) generating a protein that migrated at a position compatible with the predicted molecular mass of 8,945 Da. TEV could never cut, which might be due to the presence of detergent as reported before (54). ECL3 was finally purified by repeating both chromatographic steps and adding one for removing thrombin.

We next examined the folding of ECL3. As shown, the protein was eluted from a S200 10/300 gel filtration at 16.7 ml (Fig. 3A), corresponding to an apparent molecular mass of 23 kDa. Taking into account the presence of detergent micelles, this value is compatible with monomeric ECL3 (~9 kDa) embedded inside a FC12 micelle (350 g/mol $\times$ ~40 molecules = 14 kDa). The CD spectrum of the domain (Fig. 3B) was typical of a $\alpha + \beta$ polypeptide which, once deconvoluted, gave the average values of α -helix, β -sheet, and coil which are indicated in the inset. Increasing concentrations of urea induced a progressive loss of secondary structure. Intrinsic fluorescence of the domain (Fig. 3C), which contains four tryptophan residues (Fig. 2A), was also typical of a folded protein in which these tryptophan residues are buried, giving a maximal emission wavelength of 336 nm, much lower than the 354-nm value obtained with NATA used as a control. A further convincing result came from the capacity of the recombinant domain to interact with the 5D3 mAb (24), which has been raised against ECL3 and is sensitive to the oxidized state of the thiol bridge Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ (35). As shown in Fig. 3D, the addition of increasing amounts of the 5D3 mAb quenched the tryptophan fluorescence and led to a saturation curve (circles), allowing us to estimate a K_d value of 0.06 ± 0.03 ng/ μ l, i.e. 4 ± 2 nM (all K_d values are summarized in supplemental Table S1), assuming an average IgG molecular mass of 150,000 Da. Because the binding of 5D3 was reported to be prevented upon reduction of the Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ disulfide

(3 μ M). B, plot of the absorbance values at 412 nm (arrow in A) of hemin as a function of hemin concentration. C, pull-down assays of the hemin-H₆ECL3 complex. The experiment was carried out as described under "Experimental Procedures," leading to different fractions: Ni-beads, hemin-H₆ECL3 complex bound to Ni-NTA magnetic beads; Wash 1–3, magnetic bead washing steps; Elution, imidazole elution step of hemin-H₆ECL3 complex. Fractions were loaded on a 16% SDS-PAGE (upper panel), and protein (black bars) and hemin (white bars) amounts were quantified (lower panel). D, intrinsic fluorescence quenching of ECL3 (1–3 μ M) with hemin (0–14 μ M, circles) and heme as generated by dithionite reduction (0–14 μ M, diamonds). Squares correspond to the interaction of hemin with reduced ECL3. Data were fitted using Equation 2 (see "Experimental Procedures").

bridge (35), we reproduced a similar experiment with the reduced form of ECL3 (*squares*). As shown, the intrinsic fluorescence of reduced ECL3 was not modified by the mAb addition, suggesting no interaction. These experiments show that the ECL3 domain is self-folded and adopts a three-dimensional structure relevant to the same region within the native full-length ABCG2 transporter.

ECL3 Specifically Binds Porphyrins—We first monitored the binding of hemin (see the structure of each tested compound in [supplemental Fig. S1](#)) by absorbance, following the evolution of the Soret peak at 412 nm which appears in the presence of ECL3 (Fig. 4A). The interaction led to an increase in absorbance at this wavelength when increasing the hemin concentration. The absorbance values, plotted in Fig. 4B, gave a saturation curve from which a K_d of $1.33 \pm 0.72 \mu\text{M}$ was estimated (K_d values are summarized in [supplemental Table S1](#)), assuming one hemin bound per domain. This binding ratio was confirmed experimentally by pulldown experiments as displayed in Fig. 4C using Ni-NTA magnetic beads (see “Experimental Procedures”). Results show that 20 nmol of ECL3 bound to the beads binds 16 nmol of hemin, whereas after washing, elution leads to the removal of 16 nmol of ECL3 and 12 nmol of hemin. Both ratios suggest that up to one hemin binds to the domain. The ECL3-hemin interaction was also monitored by intrinsic fluorescence, leading to similar results (Fig. 4D, *circles*) with a K_d of $0.88 \pm 0.18 \mu\text{M}$. As shown, the maximal quenching of intrinsic fluorescence was approximately 90%. When hemin iron, present as a ferric state Fe^{3+} , was reduced by dithionite to ferrous state, Fe^{2+} , as in heme, a higher maximal quenching of intrinsic fluorescence was observed (Fig. 4D, *diamonds*), and the K_d of $0.47 \pm 0.40 \mu\text{M}$ indicated a 2-fold higher affinity than for the oxidized form. We also monitored hemin binding to the reduced form of ECL3 (Fig. 4D, *squares*) which led to a similar saturation curve, although despite a lower maximal quenching (60%), the K_d of $1.03 \pm 0.69 \mu\text{M}$ was close to that obtained with oxidized species. This suggested that reduction of the Cys⁵⁹²-Cys⁶⁰⁸ disulfide bridge does not dramatically alter hemin binding.

We then examined the interaction of other porphyrins, such as PPIX, ZnPPIX, CoPPIX, pheophorbide a, and vitamin B12, with ECL3. As shown in Fig. 5A, binding of PPIX when monitored by quenching of intrinsic fluorescence led to a saturation curve (*circles*) reaching about 80% and giving a K_d of $1.21 \pm 0.71 \mu\text{M}$. The same experiment carried out after reduction of ECL3 also led to a saturation curve of fluorescence quenching (*squares*), giving a K_d of $3.40 \pm 0.01 \mu\text{M}$. ZnPPIX, which usually reaches a high level in ferropenic anemia, as well as CoPPIX, were found to bind efficiently to ECL3, as shown in Fig. 5B (*circles* and *squares*, respectively), with respective K_d values of $0.80 \pm 0.01 \mu\text{M}$ and $0.71 \pm 0.38 \mu\text{M}$. By contrast to these porphyrins, we observed a much reduced interaction of pheophorbide a (Fig. 5B, *triangles*), producing only 30% of maximal quenching, with a high K_d value of $3.42 \pm 0.50 \mu\text{M}$. No change at all of ECL3 intrinsic fluorescence was observed upon addition of either another porphyrin-type molecule, vitamin B12 ([supplemental Fig S2A](#)), which is not an ABCG2 substrate (55), or bilirubin, a product of heme catabolism ([supplemental Fig S2B](#)).

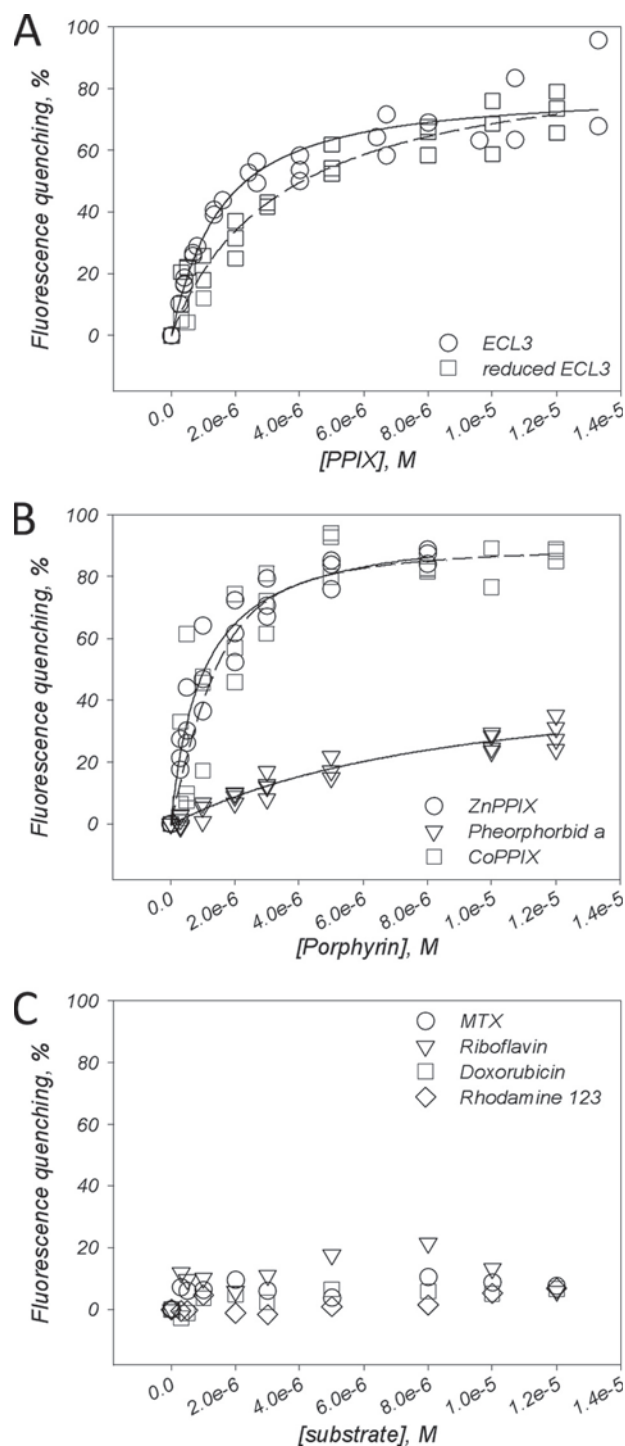


FIGURE 5. Binding of porphyrin and nonporphyrin substrates to ECL3, as monitored by quenching of intrinsic fluorescence. A, binding of PPIX to ECL3, either oxidized (*circles*) or reduced (*squares*). B, binding of ZnPPIX (*circles*), CoPPIX (*squares*), and pheophorbide a (*triangles*) to oxidized ECL3. C, Interaction of mitoxantrone (*circles*), doxorubicin (*squares*), rhodamine 123 (*diamonds*), and riboflavin (*triangles*) with ECL3. Experiments were carried out and analyzed as described in the legend of Fig. 4D.

Finally, we measured the binding of nonporphyrin substrates of ABCG2, such as mitoxantrone (3) and riboflavin (56), and other drugs that bind to ABCG2 but are not transported, such as doxorubicin and rhodamine 123 (12). Results are displayed in Fig. 5C; as shown, all these compounds did not modulate the intrinsic

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

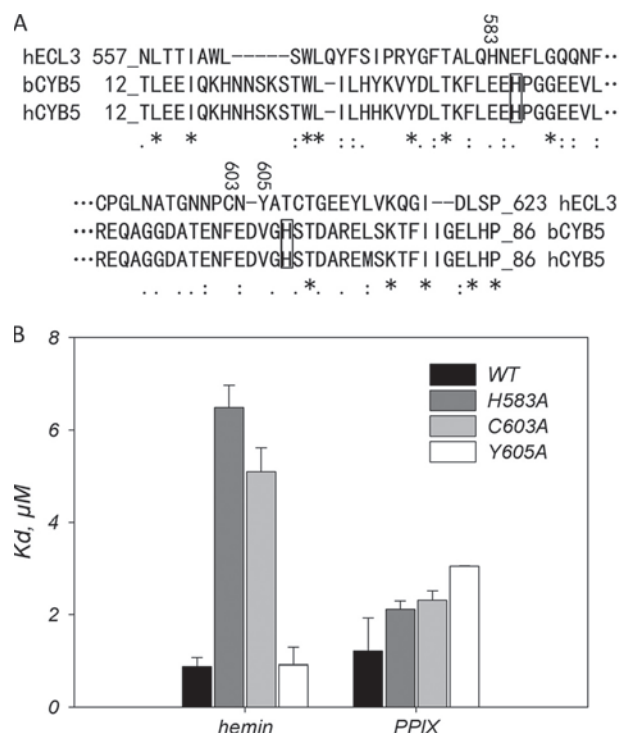


FIGURE 6. Single-point mutations H583A and C603A, but not Y605A, in ECL3 dramatically alter heme binding but hardly affect PPIX binding. *A*, primary structure alignment of ECL3 with the heme-binding domain of cytochrome *b₅*. The score of homology is as follows: *asterisk*, identity; *colon*, strong similarity; *period*, weak similarity; no symbol for no similarity. Histidine residues of cytochrome *b₅* involved in iron chelation are *boxed*. The residues His⁵⁸³, Cys⁶⁰³, and Tyr⁶⁰⁵, which are replaced by an alanine by site-directed mutagenesis, are numbered. *B*, dissociation constants for heme and PPIX binding to H583A, C603A, and Y605A mutant ECL3. Values are taken from the fit of data displayed in supplemental Fig. S3 and summarized in supplemental Table S1.

fluorescence of ECL3, suggesting no interaction with the domain. We observed that the dual inhibitor of ABCG2 and ABCB1, GF120918, was able to bind but with very low affinity (K_d of $8 \pm 6 \mu\text{M}$) and unspecific contribution (supplemental Fig. S2C).

Single-point Mutations H583A and C603A of ECL3 Alter Hemin Binding—We noticed that ECL3 displays a significant sequence similarity with the heme-binding domain of cytochrome *b*₅, with 14.3% identity and 15.6% similarity, as shown in Fig. 6A. The alignment showed, in addition, that residues His⁵⁸³, Cys⁶⁰³, and Tyr⁶⁰⁵ of ECL3 are close to the histidine residues of cytochrome *b*₅ (boxed in Fig. 6A) which are involved in the strong chelation of hemin iron. We mutagenized these residues into alanine and monitored by intrinsic fluorescence the binding capacity of the mutant proteins toward hemin and PPIX. The quenching curves are displayed in [supplemental Fig. S3](#) and summarized in Fig. 6B. As shown, the most striking differences were observed for hemin binding because the H583A and C603A mutations lowered the binding affinity 5–6-fold. In contrast, the binding of PPIX was hardly affected by the same mutations. These differences suggest that iron may be involved in hemin binding.

ABCG2 First Saturated with Mitoxantrone or Doxorubicin Binds Hemin but Not Pheophorbide a—We then checked whether porphyrins could bind to ECL3 within the whole ABCG2 transporter. A preliminary binding experiment of hemin alone on ABCG2 probed by intrinsic fluorescence was

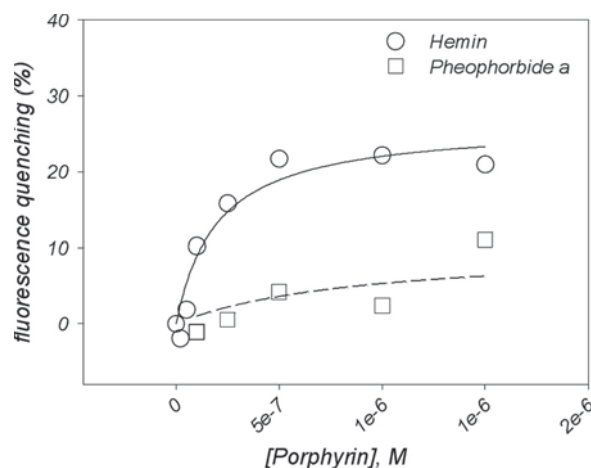


FIGURE 7. Effect of previous saturation of ABCG2 drug-binding sites by drug substrates on the ability to bind other substrates further. The full-length transporter was expressed and purified, and fluorescence quenching experiments were carried out as detailed under "Experimental Procedures." ABCG2 (0.1 μM) was preincubated with 5 μM mitoxantrone and doxorubicin before addition of hemin (*circles*) or pheophorbide a (*squares*). Fluorescence experiments were carried out and analyzed as detailed in the legend of Fig. 3C.

carried out (supplemental Fig. S4), leading to an apparent K_d of $0.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Because the protein contains more than one transport site in the membrane region to which porphyrins such as pheophorbide a (23) or PPIX (26) bind, we saturated these transport sites with nonporphyrin substrates, such as mitoxantrone and doxorubicin, which additionally do not bind to ECL3, as shown in Fig. 5C. The whole ABCG2 transporter was expressed in insect cells, solubilized in β -D-dodecyl maltoside and purified as previously described (12, 39) and detailed here under "Experimental Procedures." ABCG2 ($0.1 \mu\text{M}$) was first incubated with $5 \mu\text{M}$ mitoxantrone or doxorubicin, a concentration large enough to saturate the transport sites, based on the respective K_d values of 0.9 and $1.6 \mu\text{M}$ previously reported (12). Then, increasing concentrations of hemin (Fig. 7, *circles*) or pheophorbide a (Fig. 7, *squares*) were added and their effects monitored by intrinsic fluorescence quenching. As shown, hemin induced a fluorescence quenching of about 25%, leading to a saturation curve from which a K_d value of $0.19 \pm 0.07 \mu\text{M}$ could be estimated, two times better than for isolated ECL3. On the contrary, a much poorer interaction was detected with pheophorbide a ($K_d > 8 \mu\text{M}$), suggesting no additional binding site for the compound.

HSA Removes Hemin Bound to the ECL3 Domain or ABCG2—The fact that ECL3 is extracellularly located and binds hemin and related porphyrins makes it potentially able to interact with serum hemin-binding proteins such as HSA and hemopexin (20, 21). Both proteins bind hemin with a K_d of 10^{-8} and 10^{-12} M, respectively (20–22) (see also [supplemental Fig. S5](#)) and have been reported to be involved in heme homeostasis (22). In the present study we have tested such a possible interaction with HSA and the transfer of hemin from ECL3/ABCG2 to that serum protein. Results are displayed in Fig. 8. In a first experiment, we monitored the binding and release of hemin by recording the intrinsic fluorescence of ECL3 (Fig. 8A). As shown, the addition of $2\ \mu\text{M}$ hemin to $3\ \mu\text{M}$ ECL3 induced a fast fluorescence quenching (*dark trace*) of about 50–60% as

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

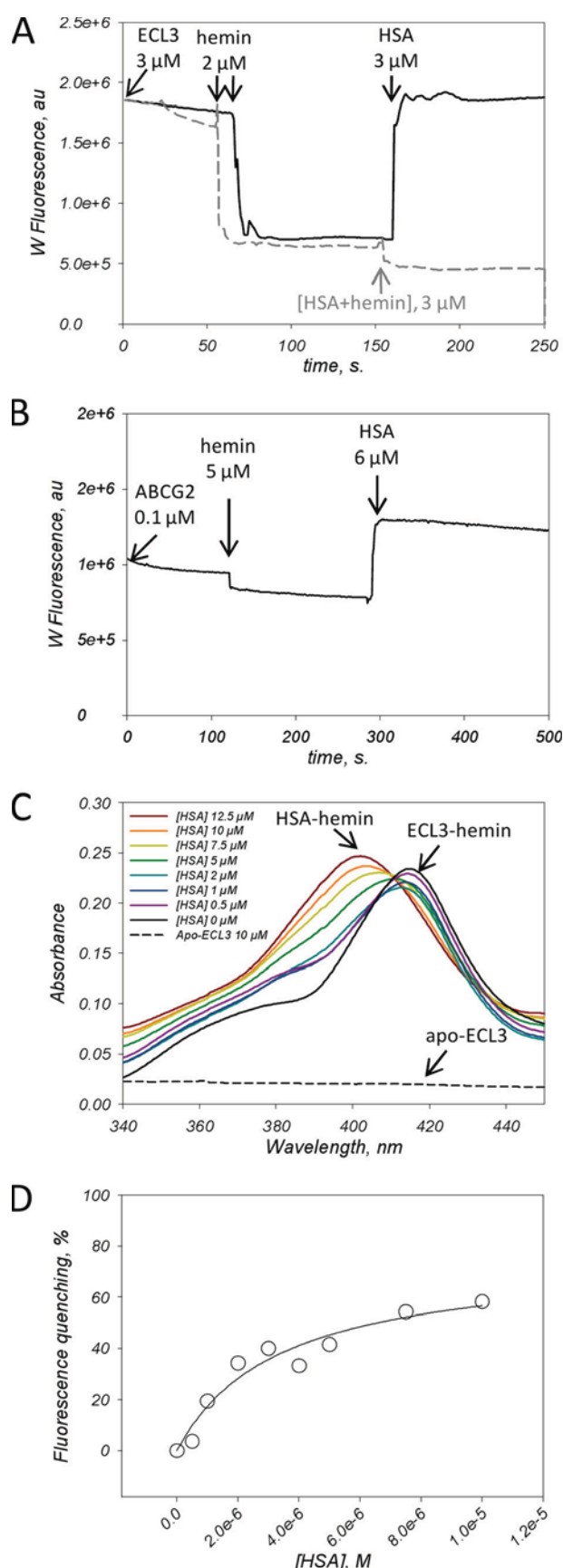


FIGURE 8. Hemin transfer from ECL3 to HSA. **A**, intrinsic fluorescence of ECL3 (3 μM) was recorded with time before and after addition at the indicated times of 2 μM hemin, and then 3 μM HSA, either alone (black trace) or

expected from Fig. 4D. In addition, the fluorescence signal remained stable with time after the addition of hemin (see the *dark trace* e.g. between 100 and 150 s), indicating that the hemin is stably bound to the domain. Further addition of 3 μM apoHSA fully reverted ECL3 fluorescence to its initial level, as quickly as for hemin binding, indicating that hemin was released from the domain. Note that the intrinsic fluorescence signal of ECL3 was corrected from the contribution of HSA as detailed in supplemental Fig. S6. The addition of a preformed HSA-hemin complex at the same concentration did not modify the fluorescence of the ECL3-hemin complex (*dashed gray trace* in Fig. 8A), indicating no change in hemin interaction with ECL3. The same type of experiment was carried out using the whole ABCG2 preloaded with mitoxantrone and doxorubicin, as described above. As displayed in Fig. 8B, comparable results were obtained, with, however, a larger increase of ABCG2 fluorescence signal upon addition of HSA. These experiments suggested that hemin is released from ECL3 upon addition of HSA. We then monitored the absorbance of hemin bound to ECL3 in the presence of increasing concentrations of HSA. As shown in Fig. 8C, addition of 5 μM hemin to 10 μM apo-ECL3 (*dashed black trace*) generated the expected Soret peak at 412 nm of the ECL3-hemin complex (*dark trace*), with the addition of two shoulders at 360 and 385 nm corresponding to 1 μM unbound hemin. Despite this, upon addition of HSA, the peak at 412 nm decreased, even at low (0.5–1 μM) concentrations of HSA, with a new Soret peak at 402 nm of the HSA-hemin complex (57). This result is in agreement with a transfer of hemin from ECL3 to HSA which also supposed an interaction between HSA and ABCG2. We probed such an interaction by monitoring the intrinsic fluorescence signal of ABCG2 in the presence of increasing HSA concentrations. This led to a typical saturation curve displayed in Fig. 8D, reaching to approximately 60% quenching and a rather high K_d of $3.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$, suggesting that such an interaction occurs between both proteins.

DISCUSSION

We show that ABCG2 exports heme, formally its fluorescent analog ZnMP (36, 37), and binds porphyrins, preferably the metal-chelated forms, to its large extracellular domain ECL3 and can release them to HSA. Bound compounds are restricted to porphyrins because nonporphyrin molecules, such as mitoxantrone, riboflavin, or doxorubicin (the latter binds to ABCG2 (12) but is only transported by the mutated R482T/G trans-

complexed to hemin (*gray dashed trace*). ECL3 intrinsic fluorescence was recorded at 336 nm. The contribution of HSA to the fluorescence signal was corrected as detailed in supplemental Fig. S6. **B**, intrinsic fluorescence of ABCG2 (0.1 μM) preincubated with 5 μM mitoxantrone and doxorubicin was recorded with time before and after addition at the indicated times of 5 μM hemin and then 6 μM HSA. The ABCG2 intrinsic fluorescence was recorded at 328 nm. The contribution of HSA to the fluorescence signal was corrected as detailed in supplemental Fig. S7. **C**, ECL3 to HSA hemin transfer monitored by UV absorbance. The experiment was carried out as described in Fig. 4 with 10 μM apoECL3 (*dashed trace*), 5 μM hemin and 0–12.5 μM HSA (*black to brown traces*). The Soret bands at 402 and 412 nm resulting from the interaction of hemin with HSA and ECL3, respectively, are indicated. **D**, interaction of HSA with ABCG2 monitored by quenching of ABCG2 intrinsic fluorescence. Fluorescence experiments were carried out and analyzed as detailed in the legend of Fig. 3C, correcting the intrinsic fluorescence of ABCG2 with that of NATA in the presence of the same concentrations of HSA.

Hemin Binding to the Large Extracellular Loop of ABCG2

porter (4)) do not bind to the domain. Heme and hemin appear to be the preferred ligands, because (i) they display the highest binding affinities for both the isolated ECL3 domain (0.5–1 μM) and the full-length ABCG2 transporter (0.2 μM); (ii) the H583A and C603A single-point mutations alter more markedly the binding of hemin than that of metal-free corresponding PPIX; and (iii) pheophorbide a, which is transported by ABCG2 (26), displays a low binding affinity for ECL3 (3 μM), which is even lower for the full protein ($>8 \mu\text{M}$) when saturated with MTX or doxorubicin, suggesting that pheophorbide a will not bind to ECL3 under physiological conditions.

ECL3 is topologically located downstream from the membrane transport-binding sites and close to them (4, 51). It is consequently better positioned to bind heme or hemin coming from the transport sites of ABCG2 than those already present in the extracellular space. The relatively low affinity of ECL3, either isolated or within ABCG2, for hemin and heme (micromolar to submicromolar range) reinforces that hypothesis, especially when taking into account the affinity of albumin for hemin in the same compartment, which is 100-fold higher (10^{-8} M). The extracellular location of ECL3 likely favors a role for delivering hemin, e.g. to a serum protein such as albumin (or hemopexin, not yet tested) (22), a hypothesis strengthened by our experiments showing that apoHSA releases hemin bound to ECL3 by direct interaction with ABCG2.

To date, ABCG2 has been identified to export pheophorbide a (23) and PPIX (26, 27) for preventing intracellular accumulation of these compounds. Our data show that it also transports hemin and heme, in agreement with protein binding to a hemin-agarose resin (26). Such an efflux is also likely related to protecting from damages that such molecules may produce (19), being more toxic than metal-free porphyrins (15). In that context, ECL3 is strategically located to handle these compounds after membrane translocation and before their extracellular release. FLVCR, a membrane protein of the MFS family, has been shown to export hemin out of the cell (37, 58), making the ABCG2-mediated efflux of hemin apparently redundant. One possible explanation could lie in the expression pattern of these proteins during hematopoiesis: ABCG2, which is a hematopoietic stem cell marker (24), is particularly expressed at high levels in the early stages of hematopoiesis (25), whereas the level of FLVCR is particularly high during erythropoiesis. This suggests complementary roles of the transporters.

Acknowledgments—We thank Aurélie Badillo, Roland Monseret, and François Penin (Institute of Protein Binding and Chemistry (IBCP)) for help in carrying out CD experiments and spectra analyses. We thank Annie Chaboud and Isabelle Grosjean from the “Production et Analyse des Protéines” platform of the IFR 128 for their help in magnetic bead pulldown assays and ABCG2 expression in insect cells. CD analyses were performed on the same platform. We thank Dr. David S. Vaughn (NCI, National Institutes of Health) for the TEV protease-producing bacteria and Dr. Sheng Zhou and Dr. Albert Sorrentino for the K562 cells. We thank Drs Richard. Haser (IBCP), Léa Payen (Lyon I, Rockefeller), and Alain Desbois (CEA Saclay, France) for discussions.

REFERENCES

- Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001) *J. Lipid Res.* **42**, 1007–1017
- Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., and Doyle, L. A. (1999) *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 429–433
- Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D. D., Miyake, K., Resau, J. H., and Bates, S. E. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 2011–2021
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Németh, K., and Váradi, A. (2004) *FEBS Lett.* **567**, 116–120
- Wang, X., and Baba, M. (2005) *Antivir. Chem. Chemother.* **16**, 213–216
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., van De Vijver, M. J., Scheper, R. J., and Schellens, J. H. (2001) *Cancer Res.* **61**, 3458–3464
- van Herwaarden, A. E., and Schinkel, A. H. (2006) *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 10–16
- Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Muñoz-Martínez, F., Bates, S. E., Castanys, S., Gamarro, F., Di Pietro, A., and Pérez-Victoria, J. M. (2005) *Cancer Res.* **65**, 4852–4860
- Ahmed-Belkacem, A., Macalou, S., Borrelli, F., Capasso, R., Fattorusso, E., Tagliatalata-Scafati, O., and Pietro, A. D. (2007) *J. Med. Chem.* **50**, 1933–1938
- Boumendjel, A., Macalou, S., Ahmed-Belkacem, A., Blanc, M., and Di Pietro, A. (2007) *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2892–2897
- Nicollé, E., Boumendjel, A., Macalou, S., Genoux, E., Ahmed-Belkacem, A., Carrupt, P. A., and Di Pietro, A. (2009) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 34–46
- Pozza, A., Perez-Victoria, J. M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A., and Di Pietro, A. (2006) *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1912–1922
- Seamon, J. A., Rugg, C. A., Emanuel, S., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V., Middleton, S. A., Butler, J., Borowski, V., and Greenberger, L. M. (2006) *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2459–2467
- Bihorel, S., Camenisch, G., Lemaire, M., and Scherrmann, J. M. (2007) *J. Neurochem.* **102**, 1749–1757
- Tsiftoglou, A. S., Tsamadou, A. I., and Papadopoulou, L. C. (2006) *Pharmacol. Ther.* **111**, 327–345
- Sassa, S. (1988) *Semin. Hematol.* **25**, 312–320
- Baliga, B. S., Mankad, M., Shah, A. K., and Mankad, V. N. (1993) *Cell Prolif.* **26**, 519–529
- Zhu, Y., Hon, T., and Zhang, L. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 87–93
- Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005) *Toxicol. Lett.* **157**, 175–188
- Muller-Eberhard, U., and Fraig, M. (1993) *Am. J. Hematol.* **42**, 59–62
- Wardell, M., Wang, Z., Ho, J. X., Robert, J., Ruker, F., Ruble, J., and Carter, D. C. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 813–819
- Taketani, S. (2005) *Tohoku J. Exp. Med.* **205**, 297–318
- Jonker, J. W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M. A., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R. P., Rosing, H., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15649–15654
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B. P. (2001) *Nat. Med.* **7**, 1028–1034
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., and Torok-Storb, B. (2002) *Blood* **99**, 507–512
- Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P., and Schuetz, J. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 24218–24225
- Zhou, S., Zong, Y., Ney, P. A., Nair, G., Stewart, C. F., and Sorrentino, B. P. (2005) *Blood* **105**, 2571–2576
- Bhatia, A., Schäfer, H. J., and Hrycyna, C. A. (2005) *Biochemistry* **44**, 10893–10904
- Polgar, O., Ozvegy-Laczka, C., Robey, R. W., Morisaki, K., Okada, M., Tamaki, A., Koblos, G., Elkind, N. B., Ward, Y., Dean, M., Sarkadi, B., and Bates, S. E. (2006) *Biochemistry* **45**, 5251–5260
- Polgar, O., Robey, R. W., Morisaki, K., Dean, M., Michejda, C., Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V., Tarasova, N., and Bates, S. E. (2004) *Biochemistry* **43**, 9448–9456
- Özvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., and

- Sarkadi, B. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 111–117
32. Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. (2002) *Int. J. Cancer* **97**, 626–630
33. Kage, K., Fujita, T., and Sugimoto, Y. (2005) *Cancer Sci.* **96**, 866–872
34. Henriksen, U., Fog, J. U., Litman, T., and Gether, U. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 36926–36934
35. Özvegy-Laczka, C., Laczkó, R., Hegedus, C., Litman, T., Várady, G., Goda, K., Hegedus, T., Dokholyan, N. V., Sorrentino, B. P., Váradi, A., and Sarkadi, B. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 26059–26070
36. Worthington, M. T., Cohn, S. M., Miller, S. K., Luo, R. Q., and Berg, C. L. (2001) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G1172–G1177
37. Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., and Abkowitz, J. L. (2004) *Cell* **118**, 757–766
38. Montigny, C., Penin, F., Lethias, C., and Falson, P. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1660**, 53–65
39. Trometer, C., and Falson, P. (2010) in *Heterologous Expression of Membrane Proteins: Methods and Protocols* (Mus-Veteau, I., ed) pp. 105–117, Humana Press, Totowa, NJ
40. Kapust, R. B., Tózsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D., and Waugh, D. S. (2001) *Protein Eng.* **14**, 993–1000
41. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76–85
42. Li, S. D., Su, Y. D., Li, M., and Zou, C. G. (2006) *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **38**, 63–69
43. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, W668–W673
44. Provencher, S. W., and Glöckner, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 33–37
45. Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., and Morán, F. (1993) *Protein Eng.* **6**, 383–390
46. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) *Anal. Biochem.* **287**, 252–260
47. Falson, P., Penin, F., Divita, G., Laverigne, J. P., Di Pietro, A., Goody, R. S., and Gautheron, D. C. (1993) *Biochemistry* **32**, 10387–10397
48. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
49. Scheidt, W., and Lee, Y. (1987) in *Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands I*, pp. 1–70, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
50. Allen, J. D., van Loevezijn, A., Lakhai, J. M., van der Valk, M., van Telligen, O., Reid, G., Schellens, J. H., Koomen, G. J., and Schinkel, A. H. (2002) *Mol. Cancer Ther.* **1**, 417–425
51. Li, Y. F., Polgar, O., Okada, M., Esser, L., Bates, S. E., and Xia, D. (2007) *J. Mol. Graph. Model* **25**, 837–851
52. Hazai, E., and Bikádi, Z. (2008) *J. Struct. Biol.* **162**, 63–74
53. Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77
54. Mohanty, A. K., Simmons, C. R., and Wiener, M. C. (2003) *Protein Expr. Purif.* **27**, 109–114
55. Jonker, J. W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A. E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T. C., and Schinkel, A. H. (2005) *Nat. Med.* **11**, 127–129
56. van Herwaarden, A. E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J. W., Rosing, H., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1247–1253
57. Monzani, E., Bonafè, B., Fallarini, A., Redaelli, C., Casella, L., Minchiotti, L., and Galliano, M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1547**, 302–312
58. Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblaugh, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., Palis, J., and Abkowitz, J. L. (2008) *Science* **319**, 825–828